

Zelluläre und molekulare  
Mechanismen der Entzündungsauflösung  
im postoperativen Ileus

Dissertation  
zur  
Erlangung  
des  
Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Kathy Stein**  
aus  
Greifswald  
Bonn 2015



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
am Universitätsklinikum Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg C. Kalff

2. Gutachter: Prof. Dr. Sven Burgdorf

Tag der Promotion: 27.11.2015

Erscheinungsjahr: 2015

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

## **Erklärung:**

Diese Dissertation wurde im Sinne von §6 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn vom 17.06.2011 im Zeitraum von Februar 2011 bis Juli 2015 von Herrn Prof. Dr. Jörg Kalff betreut.

## **Eidesstaatliche Erklärung:**

Hiermit versichere ich, dass

- die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.
- die aus anderen Arbeiten direkt oder indirekt übernommenen Daten oder Konzepte unter Angabe der jeweiligen Quellen kenntlich gemacht wurden.
- die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind, sowie eine Erklärung über frühere Promotionsversuche und deren Resultate.
- für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde sowie keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Bonn, den 17. Juli 2015

*Für meine Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>DIE ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DES DARMS</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>DER POSTOPERATIVE ILEUS</b>	<b>5</b>
2.2.1	DEFINITION UND KLINISCHES BILD	5
2.2.2	DIE PATHOPHYSIOLOGIE DES POI	5
2.2.2.1	Die drei Phasen des POI	6
2.2.2.2	Leukozyten im POI	8
<b>2.3</b>	<b>DIE ENTZÜNDUNGSAUFLÖSUNG</b>	<b>12</b>
2.3.1	DIE PRINZIPIEN DER ENTZÜNDUNGSAUFLÖSUNG	12
2.3.2	DIE MAKROPHAGEN-POLARISIERUNG	13
2.3.2.1	M1 Makrophagen	13
2.3.2.2	M2 Makrophagen	14
2.3.2.3	Mechanismen der Makrophagen-Polarisierung	14
2.3.3	ENTZÜNDUNGSAUFLÖSENDE MEDIATOREN IM POI	15
2.3.3.1	Interleukin 10	15
2.3.3.2	Entzündungsauflösende Lipidmediatoren	16
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNGEN DER ARBEIT</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALEN UND METHODEN</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIALEN</b>	<b>21</b>
4.1.1	GERÄTE	21
4.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	22
4.1.3	REAGENZIEN	23
4.1.4	PUFFER UND LÖSUNGEN	25
4.1.5	KIT SYSTEME	26
4.1.6	ANTIKÖRPER	27
4.1.7	PRIMER SEQUENZEN	27
4.1.8	MAUSLINIEN	28
4.1.9	COMPUTERSOFTWARE	28
<b>4.2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>29</b>
4.2.1	DAS MAUSMODELL DES POSTOPERATIVEN ILEUS	29
4.2.2	ISOLATION PRIMÄRER LEUKOZYTEN AUS DER ME	29
4.2.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	30
4.2.4	FUNKTIONELLE ANALYSEN DES GASTROINTESTINALEN TRANSITS	31
4.2.5	IMMUNHISTOCHEMIE UND –FLUORESZENZMIKROSKOPIE	32
4.2.6	ME-LYSATANALYSEN	33
4.2.7	IN VIVO STIMULATIONSVERSUCHE	35
4.2.8	STATISTIK	36

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>TEIL I: DIE ROLLE VON IL-10 AUF DIE DIFFERENZIERUNG UND CHEMOTAXIS INFILTRIERENDER LEUKOZYTEN IM KONTEXT DES POI</b>	<b>37</b>
5.1.1	MONOZYTEN STELLEN DIE DOMINANT INFILTRIERENDE LEUKOZYTENPOPULATION IM POI DAR	37
5.1.2	M2 MAKROPHAGEN-AKTIVITÄT IN DER SPÄTPHASE DES POI	41
5.1.3	IL-10 WIRD PRIMÄR VON MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN WÄHREND DES POI EXPRIMIERT	43
5.1.4	DIE IL-10 PRODUZIERENDEN MONOZYTEN INFILTRIEREN CCR2 ABHÄNGIG	46
5.1.5	IL-10 VERHINDERT EIN ÜBERSCHIEßEN DER IMMUNANTWORT IN DER FRÜHPHASE DES POI	50
5.1.6	IL-10 VERZÖGERT DIE ENTZÜNDUNGS AUFLÖSUNG IN DER SPÄTPHASE DES POI	51
<b>5.2</b>	<b>TEIL II: FETTSÄUREDERIVATE SIND MAßGEBLICH AN DER ENTZÜNDUNGS AUFLÖSUNG IM POI BETEILIGT</b>	<b>54</b>
5.2.1	DIE 12/15-LOX WIRD ÜBERWIEGEND DURCH INFILTRIERENDE MONOZYTEN IN DER POSTOPERATIVEN ME EXPRIMIERT	54
5.2.2	ENTZÜNDUNGS AUFLÖSENDE WIRKUNG VON N-3 PUFA IM POI IST 12/15-LOX-ABHÄNGIG	56
5.2.3	ENTZÜNDUNGS AUFLÖSENDE LIPIDMEDIATOREN WERDEN VERMEHRT IN DER POSTOPERATIVEN ME GEBILDET	58
5.2.4	DIE EXOGENE GABE VON PDX, NICHT ABER RVD2 VERBESSERT DEN POI DURCH EINE REDUKTION DER NEUTROPHILENINFLTRATION	60
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>63</b>
<b>6.1</b>	<b>TEIL I: DIE ROLLE VON IL-10 AUF DIE DIFFERENZIERUNG UND CHEMOTAXIS INFILTRIERENDER LEUKOZYTEN IM KONTEXT DES POI</b>	<b>63</b>
<b>6.2</b>	<b>TEIL II: FETTSÄUREDERIVATE SIND MAßGEBLICH AN DER ENTZÜNDUNGS AUFLÖSUNG IM POI BETEILIGT</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>89</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>91</b>





# 1 Zusammenfassung

Nach postoperativen Eingriffen kommt es regelhaft zu einer Darmmotilitätsstörung, dem sogenannte postoperativen Ileus (POI). Obwohl es sich dabei meist um eine selbstlimitierende Erkrankung handelt, wird durch einen prolongierten POI die Rekonvaleszenz des Patienten maßgeblich beeinträchtigt. Mögliche schwerwiegende Folgekomplikation reichen von einer Aspirationspneumonie bis hin zur Sepsis und einem Multiorganversagen. Die Dauer und Intensität des POI werden von einer komplexen Entzündungsreaktion in der Muscularis externa (ME) bestimmt, welche durch residente Makrophagen der ME induziert wird. Ein Hauptmerkmal dieser Entzündung ist die frühe Infiltration von Leukozyten aus dem Blut. Das leukozytäre Infiltrat besteht noch mehrere Tage nach funktioneller Normalisierung der postoperativen Darmmotilität. Dies lässt eine entscheidende Rolle dieser Zellen in der Auflösung des POI und der zugrundeliegende Entzündungsreaktion vermuten. Die zellulären und molekularen Aspekte dieser Entzündungsauflösung wurden in der hier vorliegenden Arbeit in zwei Projekten untersucht.

Im ersten Projekt wurden in einem standardisierten Mausmodell des POI die an der Auflösung beteiligten Leukozyten und deren regulatorische Funktion untersucht. Hierbei zeigte sich die Präsenz sogenannter anti-inflammatorischer M2 Makrophagen in der postoperativen ME, die über die Expression und Aktivität von prototypischen M2-Markern identifiziert und lokalisiert werden konnten. Die M2-Polarisierung erfolgte dabei in Abhängigkeit des Zytokins Interleukin-10 (IL-10). Mit Hilfe eines Makrophagen/Monozyten-spezifischen IL-10 Knockoutmodells, konnten wir neben den residenten Gewebemakrophagen in die ME infiltrierende Blutmonozyten als Hauptquelle für IL-10 identifizieren. Die Monozyteninfiltration war abhängig von dem Chemokinrezeptor CCR2. Konsequenterweise geht eine CCR2- Defizienz mit der Abwesenheit von M2 Makrophagen einher. Weitere Versuche zeigten, dass eine ubiquitäre sowie Monozyten/Makrophagen-spezifische IL-10- Defizienz mit einer überschießenden Immunantwort in der ME während der frühen postoperativen Phase einhergeht. In der klinisch relevanten Spätphase führte dies jedoch zu einer beschleunigten Auflösung des POI, welche durch eine Reduktion infiltrierter Neutrophiler Granulozyten begründet ist. Damit wird deutlich, dass die postoperative IL-10- Expression immunsupprimierend in die Frühphase des POI eingreift und damit vermutlich ein Überschießen der Entzündung nach chirurgischem Trauma verhindert. Der immunprotektive Mechanismus von IL-10 geht jedoch auf Kosten der

zeitnahen Wiedererlangung einer regulären Darmmotilität und erhöht damit signifikant das Risiko von Folgekomplikationen.

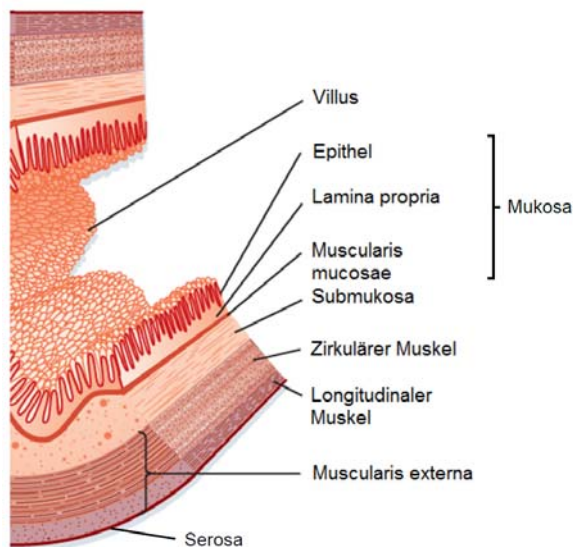
Das zweite Projekt beschäftigte sich mit der Bedeutung entzündungsauflösender Lipidmediatoren im POI. Diese werden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) gebildet. Schlüsselenzyme in der Biosynthese dieser Mediatoren sind Lipoxygenasen (LOX), insbesondere die 12/15-LOX. Unsere Studien zeigen, dass es nach einer intestinalen Manipulation zu einer erhöhten Expression und Aktivität der 12/15-LOX innerhalb der ME kommt. Diese wird dabei primär von infiltrierten Monozyten/Makrophagen exprimiert. Massenspektrometrische Analysen der postoperativen ME zeigten hohe Konzentrationen von Maresin-1, Resolvin D2 und Protektin D1/DX sowie deren Vorläufermolekülen 14- und 17-HDHA. Diese entstehen als Endprodukte der 12/15-LOX- Metabolisierung aus der PUFA Docosahexanensäure (DHA). 12/15-LOX defiziente Mäusen (ALOX15) zeigten ein vermehrtes leukozytäres Infiltrat in der ME, was eine entzündungsauflösende Funktion der 12/15-LOX entstammenden Lipidmediatoren bestätigt. Die Supplementierung einer DHA-angereicherten Lipidemulsion führte zu einer Verbesserung der postoperativen Entzündung und des POI. Dieser Effekte wurde jedoch nicht unter 12/15-LOX Defizienz beobachtet. In weiteren Studien stellte sich Protektin DX als Schlüsselmediator in der 12/15-LOX vermittelten Immunmodulation heraus. So wirkte sich dessen perioperative Supplementierung protektiv auf den Entzündungsverlauf und den POI aus. Aus dieser Studie ergeben sich neue vielsprechende Ansätze zur Therapie des POI durch natürlich vorkommende hochpotente, immunmodulierende Lipidmediatoren.

Zusammenfassend beschreiben unsere Daten neue zelluläre und molekulare Mechanismen der Entzündungsauflösung im POI. Infiltrierende Monozyten und Makrophagen sind eine Hauptquelle des immunregulatorischen IL-10, welches in einem autokrinen Mechanismus deren Polarisierung und damit Funktion bestimmt. Überraschenderweise resultierte die immunsuppressive Wirkung des IL-10 in eine verzögerte Entzündungsauflösung und damit einem prolongierten POI. Eine Intervention im IL-10-Signalweg könnte möglicherweise Patienten vor einem prolongierten Ileus schützen oder dessen Auflösung begünstigen. Neben diesem Zytokin-vermittelten Mechanismus konnten wir die immunregulatorische Funktion spezifischer 12/15-LOX prozessierter Lipidmetabolite der DHA im POI aufdecken. Protektin DX kam dabei eine Schlüsselfunktion zu. Diese Studie verdeutlicht, dass sich die perioperative Applikation von Protektin DX bzw. die Modulation des 12/15-LOX- Signalwegs in Patienten vorteilhaft auf die postoperative Entzündungsreaktion und Darmmotilität nach abdominal-chirurgischen Operationen auswirken könnte.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Anatomie und Physiologie des Darms

Der Darm ist Teil des Verdauungstraktes des Menschen und lässt sich in zwei große Abschnitte gliedern: Dünn- und Dickdarm. Histologisch lässt sich die Darmwand von luminal nach basal wiederum in vier Schichten einteilen (**Abbildung 1**): Mukosa (Schleimhaut), Submukosa (Bindegewebsschicht), Muskularis (längs- und ringförmig angeordnete glatte Muskulatur) und Serosa (umkleidende Gewebsschicht des Gastrointestinaltrakts) [1].



**Abbildung 1:** Aufbau der Darmwand

Der menschliche Dünndarm hat etwa eine Länge von 3-4 m und wird in die folgenden Abschnitte unterteilt: Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Krummdarm). Die physiologische Funktion des Dünndarms besteht in der Aufspaltung der Nahrungsbestandteile sowie Resorption der Nährstoffe. Dafür ist die Mukosa des Dünndarms mit Schleimhautfalten (Kerckring-Falten) durchzogen, auf denen sich etwa 1 mm hohe Zotten befinden. Deren Epithelzellen, auch Enterozyten genannt, tragen zusätzlich an der lumenständigen Seite sogenannte Mikrovilli, so dass eine maximale Resorptionsfläche von etwa 200 m<sup>2</sup> entsteht. Richtung Ileum werden die Schleimhautfalten spärlicher und die Zotten flachen ab. In der Schleimhaut des Ileums befindet sich lymphatisches Gewebe (Peyer's

Plaques, Lymphfollikel), welches Teil des Darm-assoziierten lymphatischen Systems (GALT; engl. gut associated lymphoid tissue) ist, dem Immunsystem des Darms. Es hat die Aufgabe den Körper vor Fremdstoffen und Pathogenen zu schützen, aber gleichzeitig eine Toleranz gegenüber kommensalen Bakterienstämmen und Antigenen aus der Nahrung aufzubauen. Die Epithelzellen, welche durch Abschlussleisten (tight junctions) miteinander verbunden sind, haben ihre Hauptaufgabe in der Resorption von Nährstoffen, spielen aber auch eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion. Im Gegensatz zum Dünndarm weist die Oberfläche des Dickdarms, welcher aus Zökum (Blinddarm), Kolon (Grimmdarm) und Rektum (Mast- oder Enddarm) besteht, eine deutlich geringere Vergrößerung auf und ist zottenlos. Im Dickdarm, mit etwa 1 m Länge, werden vor allem Wasser und Elektrolyte resorbiert und der Darminhalt eingedickt. Die Krypten sind tiefer angelegt und das Epithel besteht vorwiegend aus Becherzellen zur Mukusproduktion und verbesserten Stuhltransportfähigkeit.

Umschlossen wird die Submukosa von der Tunica muscularis (muscularis externa, ME), einer zweischichtigen Muskulatur, welche aus der inneren, zirkulären und der äußeren, longitudinalen Muskulatur besteht. Zwischen den Muskulaturen befindet sich der Plexus myentericus (Auerbach Plexus) des parasympathischen Nervensystems, welcher die Kontraktion der Muskelschichten koordiniert und für die rhythmische Peristaltik des Darms verantwortlich ist. Hinzukommt der Plexus submucosus, der sich in der Submukosa befindet, d.h. zwischen Tunica submucosa und Tunica muscularis. Dieser Plexus reguliert unter anderem die Bewegungen der Muskulatur der Darmschleimhaut (Muscularis submucosae) und ist an der Zell- und Epithelfunktion beteiligt.

Innerhalb der Mukosa und Muskulatur liegen residente Gewebsmakrophagen, die unter Homöostase ein dichtes Netzwerk ausbilden [2-4]. Während die Makrophagen der glatten Darmmuskulatur im Gegensatz zu den mukosalen für lange Zeit in ihrer regulatorischen Funktion nicht beachtet wurden [5], gelten sie heute als hochpotente Immunzellen [6]. Innerhalb der ME bilden sie mehrere Lagen aus: zwischen der inneren und äußeren zirkulären Muskulatur, zwischen zirkulärer und longitudinaler Muskulatur, sowie zwischen longitudinaler Muskulatur und der Serosa [7]. Die intestinalen Gewebsmakrophagen werden bereits während der embryonalen Entwicklung angelegt und können sich somit unabhängig von Blutmonozyten entwickeln und sich lebenslang selbst erhalten [8, 9]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Gewebsmakrophagen die Fähigkeit der Proliferation innerhalb ihres Gewebes besitzen [10, 11]. Im Rahmen akuter postoperativer Entzündungen kommt ihnen eine besondere Funktion zuteil, die die Grundlage für diese Arbeit darstellt.

## 2.2 Der postoperative Ileus

---

### 2.2.1 Definition und klinisches Bild

Operative Eingriffe im Abdomen führen nahezu bei jedem Patienten zu einer temporären Störung der Funktion des Gastrointestinaltrakts (GIT), wobei der Schweregrad abhängig von Dauer, Lokalisation des Eingriffes und Stärke der Manipulation des Darms ist. Bei einer Inhibition der Darmmotilität durch eventuelle postoperative Komplikationen, wie intraabdominelle Abszesse, wird von einem sekundären postoperativen Ileus (POI) gesprochen [12]. Aber auch Operationen am Herzen oder orthopädische Eingriffe können einen POI auslösen [13-15]. Ein weiterer Auslöser neben Operationen und Traumata ist die Verwendung von Opioiden in der postoperativen Schmerzbehandlung [16]. Die Symptome des POI umfassen Übelkeit und Erbrechen, Schmerzen und Druckempfindlichkeit des Bauches, sowie eine verzögerte Darmpassage von Flatus und Stuhl. Lange wurde der POI als eine Art routinemäßige, postoperative Nebenwirkung beschrieben, gilt jedoch heute als ein wichtiger Bestandteil der postoperativen Patientenversorgung. Denn der POI ist immer noch ein entscheidender Faktor für verlängerte Krankenhausaufenthalte. Er nimmt somit großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf sowie das Wohlempfinden des Patienten und die Ressourcenauslastung der Kliniken [17-19].

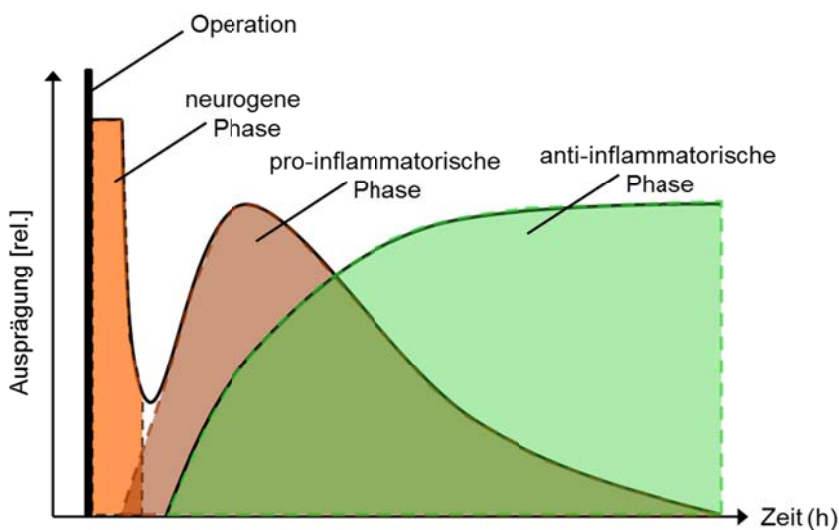
### 2.2.2 Die Pathophysiologie des POI

Die normale Darmmotilität ist ein komplexes Zusammenspiel aus elektrophysiologischer Aktivität der glatten Muskelzellen, dem enterischen (intrinsischen) und extrinsischen autonomen Nervensystem, Hormonen und dem koordinierten Zusammenspiel der glatten Muskulatur für die aborale Kontraktionsbewegung [20]. Als Ursache für die Funktionseinschränkung werden vier Signalwege beschrieben: (1) der neurogene Signalweg, welcher durch den operativen Stress und ausgelöstes Gewebetrauma inhibitorische neuronale Reflexe aktiviert, die zu einer Verringerung der Motilität führen [21]; (2) der inflammatorische Signalweg, bei dem in der Muskelschicht sitzende, gewebständige Makrophagen durch die Manipulation des Darms stimuliert werden, inflammatorische Mediatoren und Zytokine freisetzen, welche wiederum eine Entzündungskaskade aktivieren und sich ebenfalls negativ auf die Darmmotilität auswirken [21]; (3) der hormonelle Signalweg, in dem, bedingt durch das operative Geschehen, das Corticotropin-Releasing Hormon (CRH) ausgeschüttet wird, das eine wesentliche Rolle in Stressreaktionen des Körpers spielt und die Sezernierung entzündlicher

Mediatoren auslöst [22], welche zum POI führen; (4) der pharmakologische Signalweg, in dem es durch die Gabe von Opioid-basierten Analgetika zur Aktivierung überwiegend peripherer  $\mu$ -Opioidrezeptoren kommt, die auf den Neuronen des enterischen Nervensystems vorkommen. Folglich wird die Freisetzung von Neurotransmittern, wie Acetylcholin, gehemmt, welches sowohl zu einer Lähmung der glatten Längsmuskulatur als auch zu einer verstärkten Aktivierung der Zirkulärmuskulatur führt, und somit zur Inhibierung der Motilität [16, 23]. Derzeit werden insbesondere die neurogenen und inflammatorischen Mechanismen als Schlüsselereignisse für die Entwicklung und Dauer des POI angesehen [24].

### 2.2.2.1 Die drei Phasen des POI

Der POI lässt sich in drei Phasen (**Abbildung 2**) einteilen: Initiation, Manifestation und Auflösung, wobei die initiale neurogene Phase bis dato die am besten untersuchte ist.



**Abbildung 2:** Die drei Phasen des POI: Initiations- (neurogen), Manifestations- (inflammatorisch) und Auflösungsphase (anti-inflammatorisch)

#### Initiationsphase (neurogene Phase)

Viele Studien beschäftigten sich hauptsächlich mit den neuralen Einflüssen auf die Funktionsstörung. Die Initiationsphase beginnt mit dem ersten Schnitt am OP-Tisch und ist bereits mit oder kurz nach Ende der Operation abgeschlossen [24].

Die normale Funktion des GIT ist abhängig von einem koordinierten Zusammenspiel von kontraktilitätsinduzierenden parasymphatischen und kontraktilitätsinhibierenden sympathischen Stimuli. Durch eine Hyperaktivierung des autonomen Nervensystems begleitet von einer erhöhten Sympathikus-Aktivität, verringert sich die Darmmotilität, wobei der Grad der Reduktion reizabhängig ist [25]. Nach dem Ansetzen des Hautschnittes kommt es zu einer

kurzzeitigen Inhibition der Motilität aufgrund adrenerger Reflexbögen [24]. Durch die mechanische Manipulation des Darms werden zusätzlich Reflexbögen im Stammhirn aktiviert, die zu einer längeren Inhibition führen [26-28]. Hierbei werden nicht-adrenerge Signalwege induziert, welche durch den Vagusnerv vermittelt, hemmende, nitrerge Motoneurone und VIPerge Neurone ansteuern [29]. Insgesamt wird die Rolle der neurogenen Initialphase als wichtig eingestuft, kann aber nicht die teilweise über Tage verzögerte und klinisch-relevante Dysfunktion bzw. Paralyse erklären.

#### *Manifestation (inflammatorische Phase)*

Bereits 1978 konnten nach abdominellen Operationen an Hunden und Schafen zwei Phasen der intestinalen Paralyse beobachtet werden. Die erste Phase zeigte eine komplette Inhibition elektrischer Impulse im Verlauf der Operation, während die zweite Inhibition erst nach 3-4h postoperativ beobachtet werden konnte und je nach Ausmaß des operativen Eingriffs bis zu 94h anhielt. Die erste Inhibition war über neuronale Signalwege erklärbar, die Ursache der zweiten blieb jedoch lange ungeklärt [30]. Erst 20 Jahre später demonstrierten Kalff *et al.* im Tiermodell einen direkten Zusammenhang zwischen der prolongierten Motilitätsstörung und der Aktivierung sowie Einwanderung inflammatorischer Immunozyten in die ME [31], der auch in humanen Gewebeproben bestätigt werden konnten [32, 33]. Diese Phase ist ausschlaggebend für die Erholungszeit des Patienten. Je stärker der mechanische Manipulationsreiz, desto höher der inflammatorische Grad der Entzündung und die Zeit bis zur Wiederherstellung der Darmfunktion [31]. Es wurde vermutet, dass die intestinale Manipulation zu einer Aktivierung residenter Gewebsmakrophagen führt, die durch die Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen 3-4h nach Operation die Extravasation von Leukozyten bewirken. Andere Forschergruppen konnten den Zusammenhang zwischen Immunsystem, autonomen Nervensystem und der muskulären Funktion des Darms bestätigen [24, 34, 35]. Neben den residenten Makrophagen stehen ebenfalls Mastzellen als Initiatoren der inflammatorischen Kaskade zur Diskussion. Im Mausmodell, aber auch im Menschen, konnte eine Aktivierung peritonealer Mastzellen mit anschließender Freisetzung der Mediatoren Histamin und murinem MCP-1 in die Peritonealhöhle nachgewiesen werden [33, 36]. Jedoch müssen die Studien in Frage gestellt werden, da erst kürzlich mit Hilfe eines spezifischen Mastzell-defizienten Tiermodells der Einfluss von murinen Mastzellen in der Entwicklung des POI widerlegt werden konnte [37].

### *Auflösung (anti-inflammatorische Phase)*

Die Auflösungsphase des POI ist die bis dato am geringsten erforschte. Die maximale Entzündungsreaktion wird mit 24-48h postoperativ angegeben, wobei eine deutliche Korrelation zwischen operativem Trauma und Entzündungsgrad besteht [38]. Im besten Fall löst sich die Entzündung beim Menschen nach etwa 2-3 Wochen selbständig auf [39]. Nur beim Auftreten zusätzlicher postoperativer Schädigungen oder Komplikationen kann es zu einer persistierenden Entzündungsreaktion kommen, die folglich die Gefahr einer systemischen Entzündung (Sepsis) bei tiefer gelegenen Ileusformen (distaler Dünndarm, Kolon) birgt [40]. Im Tiermodell ist das Zellinfiltrat bis zu sieben Tage postoperativ quantifizierbar, trotz bereits funktionaler Besserung der Paralyse. Vermutet wird ein frühzeitiges Einsetzen von anti-inflammatorischen Mechanismen, die zur Auflösung führen und die Wundheilung ermöglichen. Erste Untersuchungen im Mausmodell zeigten die bedeutende Funktion des regulatorischen Zytokins IL-10 im Kontext des POI [41]. Durch die prä- und postoperative Applikation von rekombinantem IL-10 konnte eine merkliche Verbesserung des POI beobachtet werden. Da Makrophagen als Hauptakteure der Entzündungsinitiierung gesehen werden und über mehrere Tage in der ME verweilen, wird vermutet, dass sie auch in der Auflösungsphase eine Rolle spielen. Mechanismen der Gegenregulation, zeitlich wie auch ursächlich, sind jedoch unbekannt und Gegenstand dieser Arbeit.

### *2.2.2.2 Leukozyten im POI*

#### *Makrophagen im POI*

Die residenten Gewebsmakrophagen haben vorwiegend phagozytäre Eigenschaften, können aber auch als antigenpräsentierende Zellen (APC) fungieren [42-44], weshalb sie auch teilweise für Dendritische Zellen (DC) gehalten wurden [44, 45]. Vorarbeiten unserer Gruppe konnten den residenten Makrophagen eine entscheidende Schlüsselfunktion in der Pathogenese des POI zukommen lassen. Sowohl mittels Depletion durch Clodronat-Liposomen beziehungsweise spontaner Mutation des M-CSF (engl. macrophage colony-stimulating factor)-Gens in Osteoporosis-Mäusen (op/op Mäuse) [46], als auch durch chemische Inaktivierung (Gadoliniumchlorid), konnte die Entzündung ohne Entwicklung eines POI signifikant verringert werden [47, 48]. Auch die Verwendung des temporär wirkenden Makrophageninhibitors Semapimod (CNI-1493), sowie seines Salzderivats (CPSI-2364) konnten den POI im Mausmodell verhindern. Als mögliche Auslöser dieser Makrophagen-getriggerten Entzündungsreaktion werden sogenannte DAMPs (engl. danger-associated-molecular patterns) [49], Zytokine, LPS [6, 50] und die Translokation von Bakterien oder deren Produkten [51] vermutet. Als



Mediatoren, die maßgeblich an der Pathogenese des auf einer Entzündung basierenden POI beteiligt sind, wurden Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandine beschrieben. Die Hochregulierung von Stickstoffmonoxid (NO) und pro-inflammatorischen Lipidderivaten, wie Prostaglandine, in residenten Makrophagen sowie einwandernden Leukozyten spielt eine entscheidende Rolle in der Motilitätsdysfunktion des manipulierten Darms [52, 53].

### *Charakterisierung von Makrophagen*

Für die allgemeine Identifizierung von Makrophagen werden für die verschiedenen Gewebe spezifische Marker eingesetzt (**Tabelle 1**).

**Tabelle 1:** Charakterisierung von Gewebsmakrophagen während der Homöostase

Gewebe	Makrophagenpopulation	Phenotyp
Gastrointestinaltrakt	Intestinalmakrophagen	CX3CR1 <sup>high</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD68 <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup>
Haut	Langerhans-Zellen	CX3CR1 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> Langerin <sup>+</sup>
Knochenmark	Knochenmarksmakrophagen	CX3CR1 <sup>-</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>low</sup> CD68 <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> CD169 <sup>+</sup>
	Osteoklasten	CX3CR1 <sup>-</sup> F4/80 <sup>-</sup> CD11b <sup>low</sup> CD68 <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup> CD169 <sup>+</sup>
Leber	Kupffer-Zellen	CX3CR1 <sup>-</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>low</sup> CD68 <sup>+</sup> MHCII <sup>+</sup>
Lunge	Alveolarmakrophagen	CX3CR1 <sup>-</sup> F4/80 <sup>low</sup> CD11b <sup>-</sup> CD68 <sup>+</sup> MHCII <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup>
Milz	Metallophile Makrophagen	CX3CR1 <sup>-</sup> F4/80 <sup>-/low</sup> CD11b <sup>-/low</sup> CD68 <sup>+</sup> MHCII <sup>-</sup>
	Makrophagen der Marginalzone	
Peritoneum	Peritonealmakrophagen	CX3CR1 <sup>-</sup> F4/80 <sup>high</sup> CD11b <sup>+</sup> CD68 <sup>+</sup> MHCII <sup>-</sup>
Uterus	Uterusmakrophagen	CX3CR1 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD68 <sup>+</sup> MHCII <sup>+/-</sup>
Zentrales Nervensystem	Mikroglia	CX3CR1 <sup>high</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD68 <sup>+</sup> MHCII <sup>-</sup>

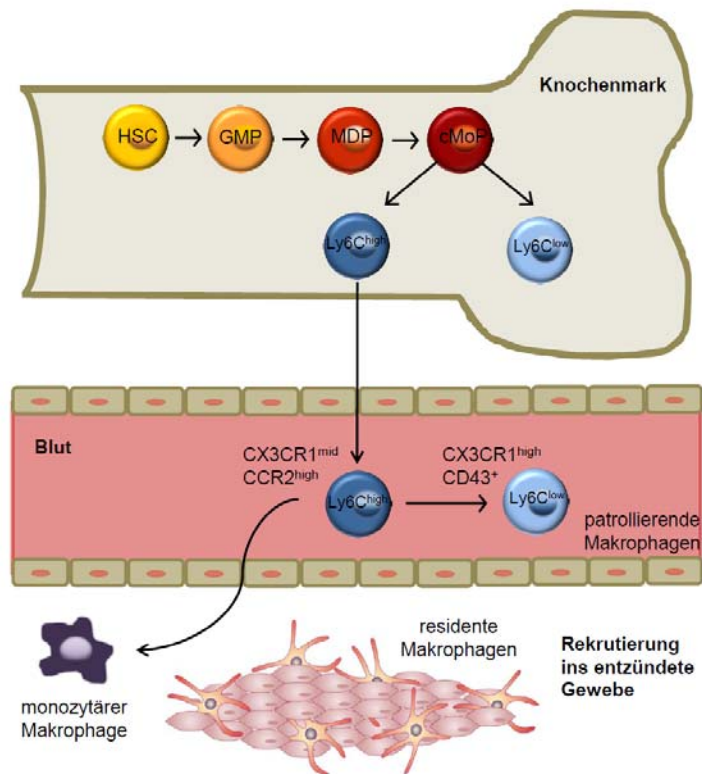
Im GIT können die residenten Gewebsmakrophagen über den Fraktalkinrezeptor CX3CR1, den murinen Makrophagenmarker F4/80 [54], CD11b (Teil des C3 Komplementrezeptors), das Transmembran-Antigen CD68 oder über Haupthistokompatibilitätskomplex MHCII detektiert werden.

Die aktuell besten Methoden sind zum einen die Markierung des Promoters vom CSF-1 (engl. colony-stimulated factor 1) Rezeptor mit grün-fluoreszierendem Protein (GFP)[55], da CSF-1 auf allen Makrophagenlinien exprimiert wird. Zum anderen hat sich die Verwendung von F4/80 bewährt [56], was auf den meisten Gewebsmakrophagen exprimiert wird. Im Menschen wird F4/80 hauptsächlich auf Eosinophilen exprimiert, weshalb Makrophagen im Menschen

überwiegend über die Marker CD68 oder CD33 charakterisiert werden [57]. Makrophagen werden als hoch heterogene Zellpopulation mit stark abweichenden morphologischen und funktionellen Unterschieden beschrieben, die eine genauere Charakterisierung der Zellen in dem zu untersuchenden Gewebe, wie z.B. im Gastrointestinaltrakt, notwendig macht. Dabei ermöglichen zusätzliche Genexpressionsanalysen ihre Diversität, sowohl in den verschiedenen Organen, aber auch auf Einzelzellebene, herauszuarbeiten [58].

#### *Vom Monozyten zum reifen Makrophagen*

Makrophagen lassen sich zusammen mit Monozyten und DCs in das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) einteilen, welches 1968 von Ralph van Furth und Kollegen eingeführt wurde [59, 60]. Dieses System stellte ein einfaches Modell der Entwicklung dar, ausgehend von Vorläuferzellen im Knochenmark über den Promonozyt (Knochenmark), den Monozyt (Knochenmark und Blut) bis hin zum reifen Gewebemakrophagen. Obwohl die Grundzüge des Modells bestehen bleiben, wurde es in den letzten Jahren aufgrund der starken Heterogenität der einzelnen Makrophagenlinien erweitert (**Abbildung 3**) [61]. Die Heterogenität der peripheren Blutmonozyten lässt sich unter anderem über die Stärke der Expression der Marker Ly6C, CCR2 und CX3CR1 demonstrieren (Abbildung 3) [62]. Dabei sind die meisten Blutmonozyten für Ly6C und CCR2 hoch positiv, aber gering für CX3CR1 (Ly6C<sup>high</sup>-Monozyten). Ihre Rekrutierung aus dem Knochenmark ist stark von dem Chemokinrezeptor CCR2 und dessen Liganden CCL2/MCP-1 abhängig. Folglich zeigte die genetische Depletion von CCR2 im Mausmodell wesentlich geringere Monozytenzahlen in der Zirkulation [63]. Diese Monozyten werden, auch aufgrund ihrer Präferenz in entzündetes Gewebe zu infiltrieren, als inflammatorische oder klassische Monozyten beschrieben. Die zweite, kleinere Monozytenpopulation exprimiert die Oberflächenantigene Ly6C und CCR2 zu einem geringeren Anteil, jedoch CX3CR1 (Ly6C<sup>low</sup>-Monozyten) zu einem höheren. Sie werden als „patrolling“ oder „nicht-klassische“ Monozyten beschrieben und haben ihre Hauptfunktion in der Phagozytose, sowie in dem Patrouillieren der Blutgefäße [64] und nicht, wie früher angenommen, in der Erneuerung der Gewebemakrophagen [65]. Gen-Expressionsanalysen konnten viele Parallelen zwischen den einzelnen Monozyten-Populationen in Mensch und Maus ziehen [66]. Die klassischen Monozyten im Menschen (CD14<sup>high</sup>, CD16<sup>neg</sup>) exprimieren ebenfalls hohe CCR2- und niedrige CX3CR1-Level, unterscheiden sich jedoch erheblich in ihrem Zytokinprofil [62, 67]. Im Gegensatz dazu exprimiert die nicht-klassische Population (CD14<sup>low</sup> CD16<sup>high</sup>) hohe Level an CX3CR1 und geringe an CCR2 und kann auch in ihrer Funktion mit dem murinen Pendant verglichen werden [62, 67].



**Abbildung 3:** Generierung muriner intestinaler Makrophagen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) im Knochenmark über den Makrophagen/DC-Vorläufer (MDP) und Zwischenstadien des gemeinsamen Monozyten-Vorläufers (cMoP) [63]. Die daraus entstehenden Ly6C<sup>high</sup>- und Ly6C<sup>low</sup>-positive Monozyten zirkulieren im Blut und üben verschiedene Funktionen aus. Ly6C<sup>low</sup>-Monozyten patrouillieren das Endothel, während Ly6C<sup>high</sup>-Monozyten im Rahmen einer Entzündung ins Gewebe rekrutiert werden.

Bei der akuten Entzündung, werden inflammatorische Monozyten (Ly6C<sup>high</sup> in Mäusen) aus der Zirkulation in das betroffene Gewebe rekrutiert und differenzieren im Gewebe zu reifen Makrophagen. Im Kontext des POI konnten infiltrierende Monozyten bereits in vorangegangenen immunohistochemischen Färbungen bestimmt werden [39], jedoch blieben die Stadien ihrer Entwicklung und die Einteilung in eventuell unterschiedliche Phänotypen bislang ungeklärt. Neue Methoden, wie die Verwendung von CX3CR1<sup>GFP/+</sup>-Reportermäusen [68] oder weiterer Marker auf Genexpressions- und Proteinebene sind jedoch hilfreich für die genaue Identifikation der Zellen und der Bestimmung ihrer Funktion im POI.

### Neutrophile

Während Eosinophile und Basophile Granulozyten zusammen mit Mastzellen primär in der parasitären Immunabwehr eine Rolle spielen, werden Neutrophile Granulozyten schnell und effizient bei der Invasion von Pathogenen oder einer sterilen Inflammation ins betroffene Gewebe rekrutiert [69, 70]. Typische Merkmale von Neutrophilen sind ein segmentierter Zellkern, sekretorische Vesikel und Granula (primäre, sekundäre und tertiäre), die

unterschiedliche pro-inflammatorische Proteine wie z.B. Myeloperoxidase (MPO) enthalten. Neben der Phagozytose und Freisetzung antimikrobieller Substanzen aus den Vesikeln, ist auch die Ausbildung sog. NETs durch Neutrophile beschrieben. Dies sind Strukturen aus Chromatin, Histonen und granulären Proteinen, die extrazellulär Bakterien binden, ihre Verbreitung verhindern und abtötend wirken [71].

Sie stammen wie Monozyten von Vorläuferzellen des Knochenmarks ab (Myeloblast) und betreten die Zirkulation als reife Neutrophile [72]. Während akuter Entzündungsreaktionen werden Neutrophile zunächst aus dem Knochenmark (G-CSF, engl. Granulocyte colony-stimulating factor) rekrutiert. Kurze Zeit später (7-9h) werden sie aus der Zirkulation [73] über von Gewebsmakrophagen sezernierten pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , über die Chemokine CXCL1 und CXCL2 oder Leukotrien (LT)B<sub>4</sub> in das geschädigte Gewebe zum Entzündungsort angelockt. Dort sind sie primär für die Identifizierung und Phagozytose von Pathogenen zuständig [74]. Jedoch besitzen sie auch immunregulatorische Funktionen, unter anderem durch die Expression von Zytokinen [75], die Transmigration zurück in Blut [76] und Knochenmark [77] oder die Differenzierung in APCs [78]. Ebenso kürzlich erschienene Studien zeigen, dass Neutrophile keine homogene Population sind [76, 79, 80]. In einem endotoxischen Entzündungsmodell mit humanen Zellen konnten drei Subtypen charakterisiert werden, wovon eine immunsupprimierende Eigenschaften zeigte [80].

Während residente Makrophagen in der initialen Phase des POI aktiviert werden, beginnt die Infiltration Neutrophiler Granulozyten erst mehrere Stunden nach Manipulation, jedoch vor der der Monozyten [31]. Im Modell des POI wurde ihre Rekrutierung in die ME bisher primär als Marker für die Stärke der Entzündungsreaktion verwendet. Jedoch lassen die genannten Studien Neutrophile zu einem neuen Target in der Entzündungsreaktion des POI werden, da sie neben Monozyten die zweitstärkste infiltrierende Leukozytenpopulation sind [31].

## 2.3 Die Entzündungsauflösung

---

### 2.3.1 Die Prinzipien der Entzündungsauflösung

Die Auflösungsphase der Entzündung wird als koordinierter und aktiver Prozess beschrieben, welcher sich aus vier Grundmechanismen zusammensetzt: 1) die Blockade der Neutrophilen-Infiltration, 2) die gezielte Apoptose der Neutrophilen, 3) die Aktivierung der Wundheilung durch Makrophagen sowie 4) die Wiederherstellung der Homöostase im Gewebe [81]. Dabei wird die Efferozytose durch Makrophagen über sog. „find me“-Signale wie CX3CL1 oder Nukleotide [82, 83] und „eat me“-Signale wie Phosphatidylserin (PS) gesteuert [84] und ist von

großer Bedeutung für die Auflösungsphase. Die im Anschluss stattfindende Wundheilung wird durch Makrophagen über die Ausschüttung von anti-inflammatorischen und reparativen Mediatoren (IL-1 Antagonisten, IL-10, TGF $\beta$ , VEGF, Wachstumsfaktoren) gesteuert. Sie fungiert als Wiederherstellung der Funktionalität des Gewebes, im besten Fall ohne Fibrose und Narbenbildung. Ein weiterer wichtiger Punkt in der Wiederherstellung der Homöostase ist die Regression der Makrophagen über die Lymphgefäße. Erfolgt kein „Rückzug“, kommt es zur Ansammlung von Makrophagen, die zu chronischen Entzündungsprozessen führen können. Obwohl innerhalb der ME noch 7 Tage nach intestinaler Manipulation signifikant erhöhte Immunozytenzahlen nachgewiesen werden konnten [31], ist die Entzündungsreaktion im POI selbstbegrenzend und wird in der Maus als akutes Entzündungsmodell verwendet. Jedoch kann es im Menschen in seltenen Fällen zu einer deutlichen Verzögerung der Entzündungsauflösung mit anhaltendem Funktionsverlust kommen, welcher die klinisch relevante Form des prolongierten POI darstellt. Da die Entzündung noch nachweisbar ist, wird eine dysregulierte Entzündungsauflösung vermutet, die weitere Schädigungen des Gewebes beinhaltet.

### *2.3.2 Die Makrophagen-Polarisierung*

Das simplifizierte Differenzierungsschema für Makrophagen ist ihre Unterteilung in pro-inflammatorische M1 Makrophagen und anti-inflammatorische M2 Makrophagen. Auch wenn dieses nach neuen Studien (im Sinne einer Spezifikation) überarbeitet werden muss, soll es für die Darstellung der relevanten Änderungen des Makrophagenzustands im POI hier herangezogen werden.

#### *2.3.2.1 M1 Makrophagen*

Die Aktivierung von M1 Makrophagen beinhaltet die Ausschüttung verschiedener pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 und Chemokine wie CXCL9 und CXCL10 [85]. Bereits 2005 konnte unsere Gruppe IL-6 als ein Schlüsselzytokin bei der Entwicklung des POI identifizieren, das von den residenten Makrophagen, aber auch infiltrierten Leukozyten mit nachfolgender Aktivierung des gegenregulatorischen STAT3-Transkriptionsfaktor einherging [86]. Zusätzlich konnte ebenfalls die Hochregulierung der Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1, sowie von Adhäsionsmolekülen und Chemoattraktanzien (ICAM-1, P-selectin, LFA-1, Mac-1, MCP-1) gezeigt werden [48, 87-89], was auf die Induktion eines M1 Makrophagen-Phänotyp in der Frühphase des POI hindeutete.

### 2.3.2.2 M2 Makrophagen

Im Gegensatz zu M1 Makrophagen sind M2 Makrophagen heterogener. Allgemein werden sie in T<sub>H</sub>2-Helferzell (T<sub>H</sub>2)-Reaktionen, parasitären Infektionen, bei Allergien, in der Tumorentwicklung und in Wundheilungsprozessen nach Gewebsverletzungen lokalisiert [90]. Sie werden überwiegend durch die T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4, IL-13 und IL-33 aktiviert, jedoch können auch weitere Zytokine, wie das regulatorische Zytokin IL-10 ihre Entwicklung beeinflussen [91]. Charakteristisch für den M2 Typ ist eine hohe phagozytäre Aktivität sowie die Expression von CD206, FIZZ1 und Ym1 [91]. Ein weiteres Kennzeichen ist die Expression des Enzyms Arginase-1 (Arg1), welches L-Arginin in L-Ornithin umsetzt und für Gewebeumbau, Zellproliferation, Fibrose und Einkapselung von Helminthen gebraucht wird [91]. Im Gegensatz zu M1, zeigen M2 Makrophagen geringe Produktionslevel pro-inflammatorischer und erhöhte Level anti-inflammatorischer Mediatoren wie IL-10, TGFβ oder dem vascular-endothelial growth factor (VEGF), ein wichtiges Signalmolekül der Vaskulogenese und Angiogenese [92]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Chemokine wie CCL2 und CXCL4 die Entwicklung von M2 Makrophagen positiv beeinflussen können [93, 94].

### 2.3.2.3 Mechanismen der Makrophagen-Polarisierung

Die Frage nach den Mechanismen der M2 Makrophagen-Entwicklung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [95]. Eine Theorie ist die Differenzierung rekrutierter Monozyten zu M1 Makrophagen im Gewebe während der Frühphase der Entzündung, während sie in der Spätphase zu M2 Makrophagen polarisieren. Dieses klassische M1/M2-Modell von Mantovani und Kollegen [96] beschreibt dabei die Liganden-abhängige M2 Makrophagen-Polarisierung in die M2 Subtypen M2a (Polarisierung über IL-4/IL-13), M2b (Polarisierung über Immunkomplex + TLR Liganden) und M2c (Polarisierung über IL-10 + Glukokortikoide). Jedoch wird dieses klassische M1/M2 Polarisationsmodell zunehmend kritisch betrachtet, da die Einteilung vorwiegend auf *in vitro* Experimenten basierte. Diese können durch selektive Liganden nicht das komplexe Zusammenspiel der Immunzellen im *in vivo* Krankheitsmodell nachbilden und müssen begleitende Faktoren wie Zellreifung, Adhäsion, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix oder Chemokine außer Acht lassen. Weitere Modelle der Makrophagen Polarisierung werden momentan diskutiert. Eine Theorie beschäftigt sich mit der Phänotyp-Differenzierung ausgehend von den Subpopulationen der Blutmonozyten. Dabei differenzieren Ly6C<sup>+</sup>-Blutmonozyten primär im Gewebe zu M1 Makrophagen, während Ly6C<sup>low</sup>-Monozyten bzw. residente Gewebemakrophagen in den M2-Subtyp differenzieren [65, 97]. Eine weitere Theorie

stellt die beliebige Polarisierung von M1 in M2 Makrophagen und umgekehrt dar, die vom jeweiligen Gewebemilieu abhängig ist [98-100]. Jedoch beruhen die erhobenen Daten ebenfalls vorwiegend auf *in vitro* Experimenten. Deshalb bleibt unklar, ob M1 und M2 Makrophagen phänotypisch klar voneinander abgrenzbare Subpopulationen sind oder ihren Phänotyp den Signalen ihrer Umgebung anpassen [101]. Hinzu kommt, dass während einer Entzündung M1 und M2 Makrophagen parallel existieren können, so dass nicht nur ganze Zellpopulationen angeschaut werden dürfen, sondern Prozesse auch auf Einzelzellebene betrachtet werden müssen [102]. Obwohl die Phänotypen nicht strikt zu trennen sind, wurde dennoch in dieser Studie die Unterteilung in M1 und M2 Makrophagen für ein besseres Verständnis gewählt.

### 2.3.3 Entzündungsauflösende Mediatoren im POI

#### 2.3.3.1 Interleukin 10

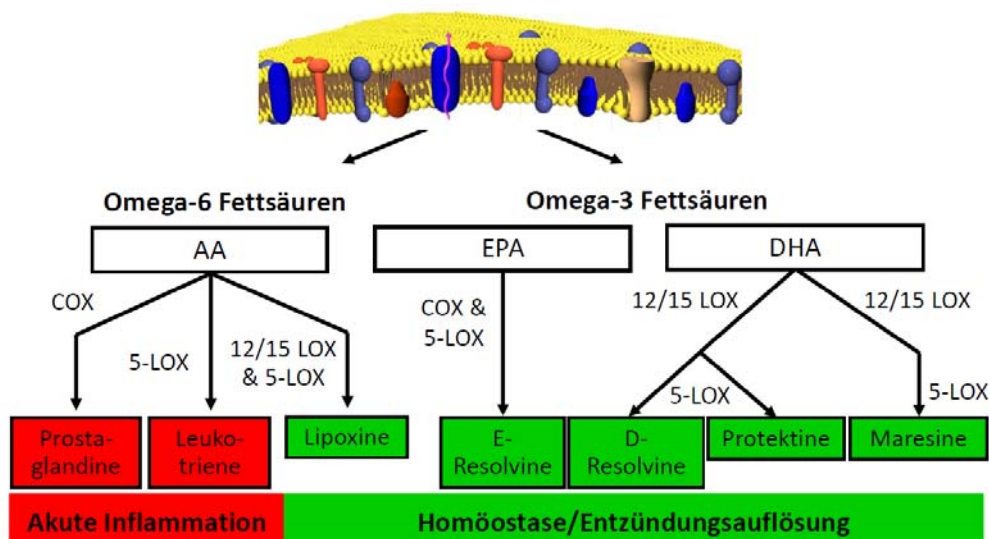
Auch in Tiermodellen des POI wurden bereits gegenregulatorische Mechanismen untersucht, die jedoch primär die Inhibierung pro-inflammatorischer Zytokine oder die Unterdrückung der Immunozytenaktivität in der Frühphase des POI untersuchten. Eine IL-10 Expression konnte bereits in der ME nachgewiesen werden. Diese Studie befasste mit der Rolle von IL-10, das eine Runterregulation aktiv inflammatorische Prozesse im POI bewirkte [41]. Zudem demonstrierten Stoffels et al., dass eine IL-10 Defizienz zu einer verzögerten Aufhebung der Dysmotilität, sowie zu einer erhöhten pro-inflammatorischen Zytokinexpression während der Spätphase des POI führte. Jedoch blieb die Frage nach der zellulären Quelle von IL-10 und den Mechanismen des IL-10 Signalwegs noch offen.

IL-10 ist ein regulatorisches, die Entzündung limitierendes Zytokin und wird im Darm überwiegend von Monozyten/Makrophagen, aber auch von Zellen des adaptiven Immunsystems exprimiert [103, 104]. Auch Neutrophile können IL-10 exprimieren [105]. Die meisten hämatopoetischen Zellen tragen auch den IL-10 Rezeptor, welcher aus zwei Untereinheiten besteht (IL-10R $\alpha$ + $\beta$ ) [106]. In mehreren Studien konnte bereits die regulatorische Funktion in der Erhaltung der Homöostase durch die kontinuierliche Sekretion von IL-10 durch residente Makrophagen in einem autokrinen Mechanismus herausgestellt werden. Durch die Defizienz von IL-10 [107], seines Rezeptors [108], oder auch des Transkriptionsfaktors STAT3 [109] in intestinalen Makrophagen und Neutrophilen, kam es zur Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. IL-10 aktiviert eine STAT3-vermittelte

Expression von Genen (IL-10, TGF $\beta$ 1, Mannose Rezeptor 1), die mit dem M2 Makrophagen Phänotyp assoziiert sind und macht es zum M2 Polarisierungsinduktor [91, 110].

### 2.3.3.2 Entzündungsauflösende Lipidmediatoren

In jüngster Zeit wurde neben klassischen anti-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-10, eine ganz neue Klasse von immunmodulierenden Mediatoren entdeckt. Hierbei handelt es sich um entzündungsauflösende Lipidmediatoren, welche aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (engl. Polyunsaturated fatty acids; PUFA) metabolisiert werden. Diese werden je nach Position der ersten Doppelbindung vom Methyl-Ende her in zwei wichtige Gruppen unterschieden: die Omega (n)-3 und n-6 Fettsäuren (**Abbildung 4**).



**Abbildung 4:** Immunmodulatorische Lipidmediatoren; (AA) Arachidonsäure, (EPA) Eicosapentaensäure, (DHA) Docosahexaensäure, (COX) Cyclooxygenase, (LOX) Lipoxygenase

#### Vorkommen und Synthese

Sie können vom Körper entweder gar nicht oder nur in eingeschränkter Menge gebildet werden und müssen deshalb mit der Nahrung zugeführt werden. Dabei ist das Verhältnis von n-6- zu n-3-Fettsäuren durch eine bewusste Ernährung beeinflussbar. So kann durch eine erhöhte Zufuhr von unter anderem marinem Fischöl das Gleichgewicht in Richtung n-3-Fettsäuren verschoben werden, welche einen entzündungshemmenden Charakter aufweisen. Dieser Effekt wird auch bei der Therapie von entzündlichen Erkrankungen wie Gicht, rheumatoider Arthritis (Rheuma), Psoriasis (Schuppenflechte) und Neurodermitis genutzt [111, 112]. Auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigten n-3-Fettsäuren positive



Effekte [113]. Unsere Gruppe konnte ebenfalls eine Immunomodulation durch die intravenöse Verabreichung einer mit n-3-Fettsäuren angereicherten Emulsion im POI-Rattenmodell erreichen [114]. Die mehrtägige Gabe von n-3-Fettsäuren verminderte das intestinale Trauma signifikant im Vergleich zu einer n-6 angereicherten Emulsion bzw. einer Elektrolyt-Kontrolllösung. Interessanterweise entdeckte man bereits damals eine Verschiebung der Lipidzusammensetzung in den Zellmembranen der Darmwand in Richtung n-3. Heute wird vermutet, dass die gegenregulatorische Wirkung auf die Synthese entzündungsaflösender Lipidmediatoren zurückzuführen ist [115-117].

An der enzymatisch gesteuerten Metabolisierung der Fettsäuren sind sog. Lipoxygenasen (LOX) beteiligt [118, 119]. Im Menschen sind unter anderem die 5-LOX, 12-LOX und 15-LOX beschrieben. Im Gegensatz zum Menschen, besitzt die Maus neben einer thrombozytären und epidermalen, eine leukozytäre 12-LOX (12/15-LOX), welche der humanen 15-LOX entspricht [118, 120]. Ihre Expression ist auf leukozytäre Zellen wie unter anderem auf aus peripheren Blutmonozyten gereiften Makrophagen, die anti-inflammatorische Funktionen ausüben, beschränkt [121-123]. Expression und Wirkung von Lipidmediatoren mit anti-inflammatorischen Eigenschaften, insbesondere die der n-3-Fettsäuren, wurde im Tiermodell als Bestandteil der Entzündungsaflösung beschrieben [124, 125].

#### *Einteilung und Wirkmechanismen*

Der pro-inflammatorische Effekt vieler Lipidmediatoren, wie z.B. von Prostaglandinen, die sich im Wesentlichen von der n-6 PUFA Arachidonsäure (AA) ableiten, ist wissenschaftlich gut etabliert. Basierend auf den Pionierarbeiten von Charles Serhan konnten zunehmend anti-inflammatorische Lipidmediatoren detektiert werden, zu denen Lipoxine, Resolvine der Klasse E und D, sowie Protektine und Maresine gezählt werden. Sie werden entweder aus der n-6-Fettsäure AA (Lipoxine) oder den n-3 Fettsäuren Eicosapentaen- (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) generiert (**Tabelle 2**, Abbildung 4).

**Tabelle 2:** Entzündungsauflösende Lipidmediatoren

Ursprung	Lipid-mediator	Kurzform	Strukturname	Quelle
Docosahexaensäure (DHA)	Maresin 1	MaR1	7R,14S-dihydroxy-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-docosahexaensäure	[126]
	Protectin D1	PD1	10R,17S-dihydroxy-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-docosapentaensäure	[127]
	Protectin DX	PDX	10(S),17(S)-dihydroxy-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaensäure	[128]
	Resolvin D1	RvD1	7S,8R,17S-trihydroxy-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-docosahexaensäure	[129]
	Resolvin D2	RvD2	7S,16R,17S-trihydroxy-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-docosahexaensäure	[125]
Arachidonsäure (AA)	Lipoxin A4	LXA4	5S,6R,15S-trihydroxy-7E,9E,11Z,13E-eicosatetraensäure	[130]
	Lipoxin B4	LXB4	5S,14R,15S-trihydroxy-6E,8Z,10E,12E-eicosatetraensäure	[131]
Eicosapentaensäure (EPA)	Resolvin E1	RvE1	5S,12R,18R-trihydroxy-6Z,8E,10E,14Z,16E-eicosapentaensäure	[132]
	Resolvin E2	RvE2	15S,18R-dihydroxy-eicosapentaensäure	[133]

Die genauen molekularen Mechanismen, die hinter der potentiellen Wirkung stecken, sind noch unklar, ebenso der Nutzen für den Menschen in Prävention oder auch in der Behandlung von Krankheiten. Lipidmediatoren wirken als Resolutionsagonisten mit dem Potential Schlüsselreaktionen in der Entzündungsauflösung zu regulieren, wie zum Beispiel die Infiltration von Neutrophilen zu limitieren, die Polarisierung des Makrophagen-Phänotyps von M1 zu M2 zu stimulieren, als auch die Efferozytoserate von Makrophagen zu erhöhen [134]. RvE1 war der erste Lipidmediator, für den mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor ChemR23 ein spezifischer Rezeptor charakterisiert werden konnte [135]. Vermittelt durch diesen Rezeptor ist RvE1 in der Lage die Aktivität des Transkriptionsfaktors NFκB zu hemmen, was folglich zur Unterdrückung pro-inflammatorischer Entzündungsprozesse führt, und das bereits in nanomolaren Konzentrationen [132, 136, 137]. Zusätzlich konnte eine Bindung von Resolvin E1 an den LTB4-Rezeptor BLT-1 nachgewiesen werden, welcher auch im Modell des POI aufreguliert ist, und, wie bereits woanders gezeigt, eine durch LTB4 ausgelöste NFκB-Aktivierung unterdrücken kann [138]. Da unter anderem NFκB in unserem Krankheitsmodell ein wichtiger Faktor in der Pathogenese ist [35], liegt ein entzündungsmodulierender Einfluss von Resolvinen oder allgemein Lipidmediatoren im POI nahe.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von sowohl zellulären als auch molekularen bzw. Mediatoren-gesteuerten Mechanismen in der Entzündungsauflösung des POI. Jede Entzündung wird durch gegenregulatorische Prozesse beendet. Welche Zellen diese Funktion bei der Entzündungsauflösung im POI übernehmen, ist unbekannt. Die folgenden Untersuchungen sollten helfen die regulatorischen Immunozyten in der Spätphase des POI zu charakterisieren. Eine zweite Fragestellung der Arbeit war die Analyse möglicher Therapieansätze im POI. Vorversuche unserer Gruppe, die eine positive Wirkung von n-3 Fettsäuren auf die Pathogenese des POI zeigten, aber auch der Einsatz von n-3 Fettemulsionen im klinischen Alltag [139], sowie vielversprechende Studien, die mit entzündungsauflösenden Lipidmediatoren durchgeführt wurden, führten uns zu der Fragestellung, welchen immunomodulierenden Einfluss entzündungsauflösende Mediatoren im POI haben.

### 3 Zielsetzungen der Arbeit

Der POI lässt sich in drei Phasen unterteilen: eine initiale (frühe) Phase, gefolgt von einer mittleren Phase, in welcher sich die Inflammation entwickelt sowie manifestiert und einer späten entzündungsauflösenden Phase. Ziel dieser Arbeit war es, zum einen die zellulären und molekularen Mechanismen der bis dato unerforschten Entzündungsauflösungsphase zu identifizieren. Des Weiteren wurde im zweiten Teil der Arbeit die Bedeutung erst in jüngerer Zeit beschriebener Lipidmediatoren als geeignete Therapieoption zur Auflösung des prolongierten und damit risikoreichen POI ergründet.

Hieraus ergaben sich folgende zentrale Fragestellungen:

- (1) Welche Zellpopulationen sind in der postoperativen ME zu finden? Die im POI aktivierten Immunozyten sollten hierfür detektiert und anschließend auf ihre Aktivierung, Funktion und Bedeutung für die Auflösung des POI untersucht werden. Verschiedene Mausmodelle sollten dabei helfen, die an der Auflösung beteiligten Zelltypen sowie zentrale Signalmoleküle zu identifizieren.
- (2) Welche Rolle spielen entzündungsauflösende Lipidmediatoren während des POI? In diesem Zusammenhang sollte zunächst die endogene Expression von Lipidmediatoren mittels Massenspektrometrie analysiert sowie die Bedeutung dieser Mediatoren in der Auflösungsphase des POI untersucht werden.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

---

#### 4.1.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Firma</i>
Durchflusszytometer	Canto II, Vantage SE, Becton, Dickinson and Company (BD), Heidelberg, DE
Elektrophoresekammer	Life Technologies, Darmstadt, DE
Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen, DE
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf, DE
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Stuttgart, DE
Gefrierschrank -80°C	Sanyo, Hamburg, DE
Homogenisator (Precellys 24 Dual)	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Inkubator	New Brunswick Scientific (Innova 4230), Edison, NJ, USA
Kühlschränke 4°C	Liebherr, Ochsenhausen, DE Bosch, Stuttgart, DE
Laser-Scanning Mikroskop	LSM700, Zeiss, Oberkochen, DE
Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar, DE
Magnetrührer (RCT B)	IKA Labortechnik, Staufen, DE
Nanodrop Spektrophotometer	Thermo-Scientific, Schwerte, DE
Narkoseanlage	Drägerwerk AG Lübeck, Lübeck, DE
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, DE
PCR Gerät Taqman	C1000 <sup>TM</sup> Thermal Cycler, Bio Rad, München, DE
pH-Meter	Mettler Toledo, Balingen, DE
Schüttelwasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, GFL (1092), Burgwedel, DE
Sterile Werkbank	Kendro (Hera Safe KS18), Langenselbold, DE
Thermomixer (Typ 5355)	Eppendorf, Hamburg, DE
Thermoblock cDNA-Synthese	MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR, Darmstadt, DE

<i>Gerät</i>	<i>Firma</i>
Tischzentrifuge 5415D + 5415R	Eppendorf, Hamburg, DE
Ultraschallbad	Bandelin sonorex, Berlin, DE
Ultraschallgerät	Bandelin electronic, Berlin, DE
Vortex MS3 basic	IKA, Staufen, DE
Wasserbad	Julabo, Seelbach, DE
Wasser-Deionisierungsanlage	Millipore, Billerica, MA, USA
Western Blot- Blottingsystem	C.B.S. Scientific, Del Mar, CA, USA
Western Blot- Detektion (LAS-3000)	Fujifilm, Düsseldorf, DE
Wippe	CAT M. Zipperer GmbH, Etzenbach, DE
Zell-Sortierer, FACS-DiVa	Becton, Dickinson And Company (BD), Heidelberg, DE

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

<i>Material</i>	<i>Firma</i>
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Einmalkanülen Sterican	BD Microlance, Heidelberg, DE
Einmalspritzen 1/2/5/10/20 ml	Becton, Dickinson And Company (BD), Heidelberg, DE
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Falcon-Röhrchen 15/50 ml	Greiner Bio-One Cellstar, Frickenhausen, DE
Filterspitzen 30µl	Thermo Scientific, Schwerte, DE
Gaze, Maschenweite 30µm	Heidland GmbH, Harsewinkel, DE
Keramikbeads (Sillibeads)	Sigmund Lindner GmbH, Warmensteinach, DE
Kryoröhrchen 1,8ml	Nune, Roskilde, Dänemark
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, DE
Nähfaden (Naturseide 5.0)	Catgut, Markneukirchen, DE
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Pipetten 5/25 ml	Corning Incorporated, NY, USA
Pipetten 10ml	Greiner Bio-One Cellstar, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen (blau, gelb)	Greiner Bio-One Cellstar, Frickenhausen, DE

<i>Material</i>	<i>Firma</i>
Pipettenspitzen (weiß)	Corning Life Science, Amsterdam, Niederlande
Pipettenspitzen 10/100/200/1000 µl	Nerbeplus, Winsen/Luhe, DE
Reaktionsgefäß 0,2ml (PCR)	Corning Life Science, Amsterdam, Niederlande
Reaktionsgefäß 0,6ml (PCR)	Corning Life Science, Amsterdam, Niederlande
Reaktionsgefäß 1,5ml	Plastibrand, Wertheim, DE
Reaktionsgefäß 1,5ml safe lock	Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäß 2,0ml	Sarstedt, Nürnberg, DE
Reaktionsgefäß 2,0ml safe lock	Eppendorf, Hamburg, DE
Sterilfilter 0,2 µm, rotrand	Whatman, Freiburg, DE
sterile Kompressen	Paul Hartmann AG, Heidenheim, DE
Wattestäbchen	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, DE
WB Membran (Immobilon-P Transfer Membran, 0,45µm)	Millipore, Billerica, MA, USA
Zellkulturplatten 6-well	Greiner Bio-One Cellstar, Frickenhausen, DE
Zellkulturplatten 24-well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten 48-well	Becton, Dickinson And Company (BD), Heidelberg, DE
Zellkultur-Rundbodenplatten 96-well	Greiner Bio-One Cellstar, Frickenhausen, DE
WB Gele NuPage 4-12% Bis-Tris	Life Technologies, Darmstadt, DE
384 Well Polypropylen Microplatten	Thermo Scientific, Schwerte, DE

### 4.1.3 Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Firma</i>
β-Glycerolphosphat	Sigma, München, DE
BSA V	Applichem, Darmstadt, DE
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma, München, DE
Collagenase II	Worthington, Lakewood, NJ, USA
CCF4	Life Technologies, Darmstadt, DE
Dispase II	Roche, Mannheim, DE
DNase	Roche, Mannheim, DE

<i>Reagenz</i>	<i>Firma</i>
Eindeckmedium Fluorogel TRIS	Science Services, München, DE
Eindeckmedium Aqua Tex	Merck, Darmstadt, DE
EDTA	Applichem, Darmstadt, DE
Essigsäure	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol, absolut	Applichem, Darmstadt, DE
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Hanker Yates	Polyscience Inc., Eppelheim, DE
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Lonza, Basel, Schweiz
Histofix	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hoechst 33342	Life Technologies, Darmstadt, DE
Isofluran	AbbVie, Wiesbaden, DE
1-phenyl- 1,2-propanedione-2-oxime (ISPF)	Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem, Darmstadt, DE
L-Arginin	Sigma, München, DE
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma, München, DE
Natriumchlorid	Applichem, Darmstadt, DE
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma, München, DE
Natriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma, München, DE
Nonidet P40 (NP40)	Applichem, Darmstadt, DE
NuPAGE MES Running Puffer 20x	Life Technologies, Darmstadt, DE
NuPAGE Transfer Puffer 20x	Life Technologies, Darmstadt, DE
PBS-Tabletten	Life Technologies, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt, DE
Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, DE
pHrodo	Life Technologies, Darmstadt, DE
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, München, DE
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, DE
RPMI 1640 Medium	Lonza, Basel, Schweiz
Sodiumdeoxycholate	Sigma, München, DE



<i>Reagenz</i>	<i>Firma</i>
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma, München, DE
Sodium Orthovanadate (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma, München, DE
SYBR Green PCR Master Mix	Life Technologies, Darmstadt, DE
Tris base	Sigma, München, DE
Tris-HCl	Appllichem, Darmstadt, DE
Triton-X 100	Sigma, München, DE
Trizol	Life Technologies, Darmstadt, DE
Trypanblau	Sigma, München, DE
Trypsin-Inhibitor	Appllichem, Darmstadt, DE
Tween-20	Sigma, München, DE
Urea	Sigma, München, DE
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	SAV-Liquid Production GmbH, Flintsbach, DE
70 kDa FITC-dextran	Sigma, München, DE

#### 4.1.4 Puffer und Lösungen

<i>Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Lagerung</i>
ACK-Lysepuffer	dd H <sub>2</sub> O 250ml NH <sub>4</sub> Cl 2g KHCO <sub>3</sub> 0,25g EDTA (0,5M) 50µl	4°C
Blockpuffer IHC	BSA 3g P/S 1ml PBS 99ml	4°C
EDTA (0,5M)	EDTA (372,24 g/mol) 136,12g Dd H <sub>2</sub> O 1000ml pH=7	4°C/RT
FACS Puffer	PBS 100ml FCS 1ml (1%) EDTA 450µl (2mM) Na-Azid 0,1%	4°C
Gewebelyse-Puffer	pro 1mg Gewebe: 10µl PBS 2mM EDTA 2mM EGTA Proteininhibitor Cocktail (PIC, 1:200, -20°C)	-
Gewebe-Verdaulösung	Collagenase II 50mg DNase I 5mg Dispase II 120mg	-20°C

<i>Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>	<i>Lagerung</i>
	BSA 50mg Trypsin Inhibitor 35mg HBSS 50ml	
Krebs-Ringer-Puffer	NaCl 7,06g KCl 0,44g NaHCO <sub>3</sub> 1,3g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,17g Glucose 2,07g 2(H <sub>2</sub> O)CaCl <sub>2</sub> 1,47ml 6(H <sub>2</sub> O)MgCl <sub>2</sub> 0,97ml	4°C
2xRIPA Puffer	Tris-HCl (pH8; stock 400mM) 4ml NaCl (stock 1,5M) 2ml NP40 (stock 10%) 2ml Sodiumdeoxycholate (stock 10%) 2ml SDS (stock 10%) 0,4ml β-Glycerolphosphate (stock 150mM) 0,4ml Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (stock 100mM) 0,2ml ddH <sub>2</sub> O 8,54ml Protease Inhibitor Cocktail 0,2ml	-20°C
10x TAE Puffer	Tris base 48,4g (40mM) EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz 20ml (1mM) Essigsäure 11,42ml (40mM) ddH <sub>2</sub> O 968,58ml	4°C
10x TBST	NaCl 80,06g Tris-HCl 24,23g ddH <sub>2</sub> O 1000ml pH=7,6	4°C
Western Blot Laufpuffer	20x Running Buffer 50ml ddH <sub>2</sub> O 950ml	4°C/RT
Western Blot Blockpuffer	Milchpulver 5g 1xTBST 100ml	4°C
Western Blot Transferpuffer	20x Transferpuffer 50ml 20% vergällter Alkohol 285ml ddH <sub>2</sub> O 765 ml	
Western Blot Waschpuffer	10x TBST 100ml Tween20 1ml ddH <sub>2</sub> O 899ml	4°C/RT

#### 4.1.5 Kit Systeme

<i>Kit</i>	<i>Firma</i>
BCA Assay	Thermo Scientific, MA, USA
cDNA	Life Technologies, Darmstadt, DE
DNA free-Aufreinigung	Life Technologies, Darmstadt, DE
Reverse-Transkriptions-Kit	Life Technologies, Darmstadt, DE
Western Blot Entwicklungskit	Thermo Scientific, MA, USA

### 4.1.6 Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Klon</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Firma</i>	<i>Anwendung</i>
CD 45	30-F11	PE	ebioscience	Durchflusszytometrie
CD11b	M1/70	APC	ebioscience	Durchflusszytometrie
F4/80	BM8	PE, APC-Cy7 unkonjugiert	Biologend Liefertechnologies	Durchflusszytometrie IHC
Ly6C	HK1.4	PE-Cy7	Biologend	Durchflusszytometrie
Ly6G	1A8	APC	Biologend	Durchflusszytometrie
CD31	MEC13.3	PE	Biologend	Durchflusszytometrie
MPO	8F4	PE	Hycult Biotech	Durchflusszytometrie
Gal3	M3/38	unkonjugiert	ebioscience	Western Blot
5-LOX		unkonjugiert	Cayman Chemicals	Western Blot
12/15-LOX		unkonjugiert	Cayman Chemicals	Durchflusszytometrie
		unkonjugiert		Western Blot
		unkonjugiert		IHC
β-Aktin	AC-74	unkonjugiert	Sigma Aldrich	Western Blot
Arg1	N-20	unkonjugiert	Santa Cruz	IHC

### 4.1.7 Primer Sequenzen

<i>Transkript</i>	<i>forward Sequenz</i> <i>reverse Sequenz</i>	<i>SYBR Green</i> <i>QuantiTect</i> <i>Primer (Assay ID)</i>	<i>TaqMan</i> <i>(Assay ID)</i>
GAPDH			NM_008084.2
Arg1		QT00134288	
Ym1		QT02241722	
IL-4		QT00160678	
IL-13		QT02423449	
IL-10	GATGCCCCAGGCAGAGAA CACCCAGGGAATTCAAATGC		
IL-6		QT00098875	
IL-1β			Mm00434228_m1
CCL-2			Mm00441242_m1
CXCL1	TCTCCGTTACTTGGGGACAC CCCACTCAAGAATGGTCGC		
CXCL2	TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC CGGTCAAAAAGTTTGCCTTG		
SOCS3	CCTTTGACAAGCGGACTCTC GCCAGCATAAAAACCCTTCA		
5-LOX	ACTACATCTACCTCAGCCTCATT GGTGACATCGTAGGAGTCCAC		
12-LOX	ACCGATGCAGACCAAGGGGCTAAC CAGTGTATGGAGGGGAGGGCAGAA		
12/15-LOX	GGCTCCAAC AACGAGGTCTAC AGGTATTCTGACACATCCACCTT		

### 4.1.8 Mauslinien

<i>Mauslinie</i>	<i>Beschreibung</i>
ALOX15	Charles River
C57BL/6	Janvier
CCR2 <sup>-/-</sup>	Jackson
CX3CR1 <sup>GFP/+</sup>	Jackson
IL-10 <sup>-/-</sup>	Jackson
ITIB <sup>+/-</sup>	Hicham Bouabe, TU München [140]
LysM <sup>cre</sup> IL10 <sup>fl/fl</sup>	Axel Roers, TU Dresden [141]

### 4.1.9 Computersoftware

<i>Software</i>	<i>Firma</i>
Acrobat	Adobe
Endnote	Tomson Reuters
FACS DiVa Canto II	BD Bioscience
FlowJo 7.6.5.	Tree star, Inc.
Illustrator CS3	Adobe
Multigauge	Fujifilm
Office 2010	Microsoft
Prism 5	Graphpad
SDS2.2	Applied Biosystems

## 4.2 Methoden

---

### 4.2.1 *Das Mausmodell des postoperativen Ileus*

Die intestinale Manipulation (IM) am Mausmodell ist eine standardisierte Technik zur Induktion einer akuten Entzündung der Darmwand, vorwiegend der Muscularis externa (ME), die ihren Höhepunkt etwa 24 h nach Abschluss der IM findet. Sie dient der Imitation des chirurgischen Traumas, welches im Rahmen abdominal-chirurgischer Eingriffe unvermeidbar ist. Die Tiere wurden dabei mittels Isofluran narkotisiert und anschließend einer medianen Laparotomie unterzogen. Danach wurde der Dünndarm auf eine sterile Gaze eventriert und mittels zweier steriler Wattestäbchen unter moderater Kompression von oral nach aboral rollend manipuliert. Das Duodenum und das terminale Ileum wurden dabei ausgespart. Bei der Manipulation wurde zudem vermieden das Mesenterium zu komprimieren, um Einblutungen in die Darmwand zu verhindern. Der Schweregrad des POI ist hierbei direkt abhängig von der Intensität des mechanischen Traumas [38]. Die IM wurde insgesamt zweimal durchgeführt, anschließend wurde der Darm in die Bauchhöhle rückverlagert und die Bauchwand mit einer fortlaufenden Naht (Faszie und Hautnaht) verschlossen.

### 4.2.2 *Isolation primärer Leukozyten aus der ME*

Die Isolation von primären Leukozyten aus der ME des Dünndarms erfolgte nach Isofluran-Narkotisierung der Mäuse mit anschließender zervikaler Dislokation und Darmentnahme. Der Dünndarm wurde in etwa 2-3 cm lange Segmente geteilt, jedes Segment über einen dünnen Glasstab gestülpt, das Mesenterium mit einer Pinzette abgezupft und die ME vorsichtig mit einem Wattestäbchen von der darunter liegenden Mukosaschicht abgestriffen. Anschließend wurden die ME-Segmente mechanisch mit einer Rasierklinge zerkleinert und zweimalig in Krebs-Henseleit-Puffer gewaschen (500xg, 5 min, 4°C) bevor 3 ml der aufgetauten Verdauungslösung (Rezept siehe 4.1.4 Puffer und Lösungen) auf das ME-Pellet gegeben wurden. In einem Schüttelwasserbad (37°C, 130 rpm) wurden dann die Leukozyten aus dem Gewebe herausgelöst. Nach 35 min Inkubationszeit wurde die Lösung mehrfach mit einer 1000µl Pipette resuspendiert, um den restlichen Muskelverband noch mechanisch zu zerkleinern. Die Verdauungslösung wurde über eine 45 µm-Gaze gegeben und anschließend mit HBSS-Puffer gewaschen (500xg, 5min, 4°C). Das entstandene Leukozyten-Zellpellet wurde dann entweder für die anschließende durchflusszytometrische Messung in FACS-Puffer oder für die Zellkultur in dementsprechendem Medium aufgenommen.

### 4.2.3 Durchflusszytometrie

#### *Bestimmung der Zellzahl*

Ein Teil der Zellsuspension wurde 1:2 mit Trypan Blau verdünnt und anschließend 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zahl der lebenden, nicht blau gefärbten Zellen wurde dann mit Hilfe eines Lichtmikroskops durch das Auszählen der vier Quadranten und folgender Rechnung bestimmt:

$$\text{Zellen / ml} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \times 2 [\text{Verdünnungsfaktor}] \times 10000 [\text{Kammerfaktor}]$$

#### *Färbung von Oberflächenmolekülen*

Für die Färbung der Oberflächenmoleküle wurden die isolierten Zellen in FACS-Röhrchen zunächst für 20 min in 50µl Fc-Block (anti-CD16/32, 10µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen (500xg, 5min, 4°C) und 50µl des jeweiligen Master-Mixes mit den spezifischen Antikörpern auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4°C im Kühlschrank. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen für die Messung in einem Gesamtvolumen von 300µl gegeben. Kurz vor dem Messvorgang wurde 1µl einer 1:20.000 Verdünnung des lebend-tot Farbstoffes Hoechst 33342 zu den Zellen gegeben.

#### *Färbung von intrazellulären Proteinen*

Die intrazelluläre Färbung von Proteinen erfolgte im Anschluss der Oberflächenfärbung und diente der Färbung von MPO<sup>+</sup> und 12/15-LOX<sup>+</sup> Zellen. Hierfür wurden die Zellen zunächst in einer 4%-PFA-Lösung für 15 min bei RT inkubiert bevor sie für weitere 20min mit Triton-X 100 permeabilisiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des jeweiligen Antikörpers für 30 min im Dunkeln. Abschließend wurden die Zellen gewaschen (500xg, 5min, 4°C) und für die durchflusszytometrische Messung in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen.

#### *Färbung von ITIB positiven Zellen zur Detektierung von IL-10*

Zunächst wurden die Zellen isoliert und in Einzelsuspension gebracht, wie unter 4.2.2. beschrieben. Anschließend wurde der Mastermix aus CCF4-AM-beta-lactamase Substrat und Probenecid, abhängig von Anzahl der Proben und Zellzahl, vorbereitet. Im Folgenden ein Beispiel für den Mastermix für 16 Proben, wobei jede Probe etwa 4x10<sup>6</sup> Zellen beinhaltet:

4ml PBS

7-10 µl CCF4-AM (Stocklösung: 1mM in DMSO)

60-100 µl Probenecid (Stocklösung: 180mM)

Die Zellen wurden in 250 µl Mastermix resuspendiert und anschließend bei 28°C im Thermomix (800rpm) abgedunkelt inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 90 min wurden die Zellen mit 1 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen und pelletiert (500xg, 5min, 4°C). Im direkten Anschluss konnten die Zellen für die Durchflusszytometrie geblockt und gefärbt werden.

#### *Sortierung von residenten Makrophagen und Monozyten*

Zur Gewinnung von residenten Makrophagen und infiltrierenden Monozyten für anschließende Genexpressionsanalysen wurden Einzelzellsuspensionen aus der ME des Dünndarms wie oben beschrieben hergestellt. Für diese Versuche wurde das Gewebe aus jeweils 12 Mäusen gepoolt, um eine höhere Zellausbeute zu erreichen. Die gewonnenen Zellen wurden mit den Oberflächen-Antikörpern F4/80 und Ly6C angefärbt und nach dem Einmessen in den BD FACSAria™ III Flow Cytometer in die Fraktionen F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> und F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> sortiert und in FACS-Puffer (+10% FCS) aufgefangen.

#### *Phagozytose Assay*

Die ME Zellen wurden wie oben beschrieben isoliert und ausgezählt. Anschließend wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro well in einer 24 well Platte mit RPMI Medium (+10% FCS und P/S) in einem Volumen von 300µl ausgesät und für 1,5h bei 37°C inkubiert. Für den Phagozytose Assay wurden 25µl pHrodo-Beads (2 mg/ml) in 200µl/well Medium gelöst und zusätzlich auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden weitere 2,5h bei 37°C inkubiert. Die Negativkontrolle wurde stattdessen auf Eis gestellt, um eventuell eine passive Aufnahme der Beads von aktiver Phagozytose unterscheiden zu können. Nach der Inkubationszeit wurden die adherenten Zellen mit einem Rubber mechanisch vom well-Boden gelöst und in FACS-Puffer gewaschen (500xg, 5min, 4°C). Im Anschluss erfolgte die Oberflächenfärbung von Makrophagen/Monozyten mittels F4/80- und Ly6C-Antikörpern.

#### **4.2.4 Funktionelle Analysen des Gastrointestinalen Transits**

Die Tiere wurden 24h oder 72h nach IM der Messung des gastrointestinalen Transits (GI-Transit) unterzogen. Hierfür wurde den Tieren 100µl einer nicht-resorbierbaren 70kDa großen FITC-Dextranlösung gavagiert. Nach weiteren 90 min unter Wasser- und Nahrungskarenz wurden die Tiere getötet und die Verteilung des FITC-Dextrans in Magen, Dünndarm (Einteilung in zehn gleichmäßige Segmente), Zökum und Dickdarm (Einteilung in drei gleichmäßige Segmente) mittels Fluoreszenzspektrometrie bei einer Wellenlänge von 488nm

gemessen. Für die Quantifizierung der FITC-Dextran-Konzentration und um eine Vergleichbarkeit innerhalb der Tiergruppen zu ermöglichen, erfolgt die Berechnung des sogenannten geometrischen Zentrums (GC) wie folgt:  $\sum$  (Prozent des absoluten Fluoreszenzsignals in jedem Segment x die Segmentnummer) /100 [48].

#### 4.2.5 Immunhistochemie und –fluoreszenzmikroskopie

##### *Herstellung von whole mounts*

Die Herstellung sogenannter whole mounts erfolgte unter einem Lichtmikroskop. Dafür wurde das Segment Nummer acht (siehe 4.2.4) aus dem mittleren Teil des Ileums entnommen, am Mesenterium fixiert, längs aufgeschnitten und mit der mucosalen Fläche nach oben schauend aufgespannt. Das Gewebestück wurde anschließend für 10 min mit absolutem Ethanol fixiert. Nach der Fixierung wurde das Gewebestück dreimal mit KHB-Puffer gewaschen und anschließend die Mucosalschicht vorsichtig mit Hilfe von Feinpinzetten von der darunter liegenden Muskelschicht abgelöst.

##### *Quantifizierung Myeloperoxidase positiver (MPO<sup>+</sup>)– Zellen*

Nach der Herstellung von einem „whole mount“- Darmstück wurden anschließend die MPO<sup>+</sup>-Zellen in der Muskelschicht angefärbt. Dafür wurde auf das vorpräparierte Darmstück eine Färbelösung bestehend aus Hanker Yates (1 mg/ml in KHB-Puffer) und Wasserstoffperoxid (1%) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde die Färbelösung abgegossen und das „whole mount“ dreimal mit KHB-Puffer gewaschen. Das whole mount konnte anschließend auf einen Objektträger gezogen und eingedeckt werden. Die Quantifizierung der MPO<sup>+</sup>-Zellen erfolgte mit dem Lichtmikroskop bei 200-facher Vergrößerung. Hierfür wurden die angefärbten Zellen von jeweils fünf Gesichtsfeldern ausgezählt und der Mittelwert pro Präparat ermittelt. Die Angabe der MPO<sup>+</sup>-Zellen erfolgte dann unter Berücksichtigung des Kalibrierungsfaktors in Zellen pro mm<sup>2</sup>.

##### *Das Anfärben von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen im whole mount*

Nach dem Fixieren mit Paraformaldehyd (4%) und Abziehen der Mukosalschicht wurde das Präparat mit PBS gewaschen und mit 0,1% TritonX-100 Lösung für 15 min permeabilisiert. Anschließend wurde das whole mount zum Blocken unspezifischer Bindungen 1h bei RT in 3%iger BSA-Lösung inkubiert. Danach wurde das whole mount über Nacht (4°C) mit den jeweiligen Primärantikörpern inkubiert (F4/80, Arg1, 12/15-LOX). Am nächsten Tag wurde das Präparat mit PBS gewaschen (3x10 min), bevor es mit den jeweiligen Zweitantikörpern



inkubiert wurde (1h bei RT). Im Anschluss wurde erneut mit PBS gewaschen (3x10 min), bevor das whole mount auf einen Objektträger gezogen und mit Fluka-Medium eingebettet wurde.

#### 4.2.6 ME-Lysatanalysen

##### *Arginase Aktivitäts-Assay*

Für den Arginase Assay wurden durchschnittlich 60-80mg ME-Gewebe verwendet. Nach dem Wiegen wurden die ME Stücke mit 0,1% TritonX-100 Lösung (10µl/mg Gewebe) unter Verwendung von Protease Inhibitoren für 30min inkubiert. Um das Enzym zu aktivieren, wurden 50µl des Überstandes mit 50µl 10mM MnCl<sub>2</sub> und 50µl Tris-HCl (pH 7,5) bei 55°C für 10min im Thermomixer bei 650rpm inkubiert. Anschließend wurden 25µl der aktivierten Enzymlösung in ein neues Tube überführt, 25µl 0,5M L-Arginin (pH 9,7) dazugegeben und bei 37°C für 60min im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400µl Säure-Mix (1:3:7 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und H<sub>2</sub>O) gestoppt und 25µl 9 % ISPF (in abs. Ethanol gelöst) zugegeben und bei 100°C im Thermomixer für 45min erhitzt bevor nochmals 10min bei RT (dunkel) inkubiert wurde. Die Urea-Konzentration wurde danach bei einer OD von 540nm in einem Mikroplattenlesegerät mit Hilfe einer Urea-Standardreihe bestimmt.

##### *LC-MS/MS (Lipidanalysen Ambiotis)*

Die Lipidanalysen erfolgten mit der LC-MS/MS Methode, welche von der französischen Firma Ambiotis durchgeführt wurden [142]. Dafür wurden ME-Proben von sham-operierten und intestinal manipulierten (IM24h) Tieren ohne die Verwendung von Puffern isoliert sowie das Gewebe direkt nach Isolation mit Stickstoff Schock gefroren. Mit Hilfe der LC-MS/MS wurden die für den Entzündungsauflösungsprozess relevanten Lipidmediatoren untersucht.

##### *Quantitative Real-Time PCR*

Die quantitativen Real-Time PCR Analysen unterteilten sich in RNA-Isolierung, Reverse Transkription und Real-Time PCR zur Analyse der Expressionsstärke der untersuchten Gene.

##### RNA-Isolierung

Zum einen wurde aus dem Dünndarm isoliertes ME-Gewebe (20-30mg), zum anderen sortierte Makrophagen/Monozyten aus der ME mit 1ml Trizol überschichtet. Das Gewebe wurde mit Hilfe von Keramikbeads, die Zellen mittels Sonifizierung lysiert. Das Lysat wurde mit 200µl Chloroform für 15min inkubiert und die Phasentrennung durch die sich anschließende Zentrifugation (maximale Geschwindigkeit, 5min, RT) erreicht, wobei die obere wässrige Phase

die RNA enthielt. Diese wurde vorsichtig abgenommen und für die RNA-Fällung mit 500µl Isopropanol versetzt. Nach 15min Inkubation auf Eis und sich anschließender Zentrifugation (maximale Geschwindigkeit, 15min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das RNA-Pellet dreimalig mit 1ml kaltem Ethanol (70%) gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in DEPC-Wasser aufgenommen. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration mit dem Nano-Drop bestimmt.

#### Reverse Transkription

Für das Umschreiben der isolierten mRNA in cDNA wurde das High Capacity Reverse Transcription kit von Applied Biosystems verwendet. Die Konzentration der RNA betrug dabei in jeder Probe 50ng/µl. Zusätzlich wurden 2µl 10x RT-PCR Puffer, 2µl 10x RT-Random Primer, 0,8µl dNTPs, 1µl Reverse Transkriptase und 1µl RNase-Inhibitor verwendet. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese in folgenden Programmschritten: Denaturierung durch Erhitzen auf 110°C, Bindung der Primer bei 25°C für 10min, Elongation bei 37°C für 2h, Denaturierung bei 85°C für 5s und abschließendes Abkühlen auf 4°C. Die fertige cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

In Kombination mit spezifischen Primern (siehe Primerliste unter 4.1.7) wurde jeweils für 1µl cDNA bei 40 Zyklen (94°C für 15s, 55°C für 30s, 72°C für 30s) die Real Time PCR durchgeführt. Als House-Keeping Gen wurde GAPDH verwendet, dessen Expression in der ME sehr konstant ist und mit dessen Hilfe die eingesetzte RNA-Menge normalisiert werden konnte, um die relative Expression des analysierten Gens zu bestimmen. Die Messungen wurden in Triplikaten in 384-Well-Platten durchgeführt. Als Gerät wurde ein C1000™ Thermal Cycler benutzt. Die Quantifizierung erfolgte mittels der  $\Delta\Delta CT$  Methode.

#### *Western Blot*

Für die Western Blot Analyse wurden zunächst die Proteine aus der zuvor entnommenen ME mittels Gewebelysepuffer isoliert. Dafür wurden zwischen 20-50mg Gewebe abgewogen und zusammen mit Keramikbeads (Sillibeads) im Tissue Lyser homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein 2ml Eppendorf-Tube überführt und mit gleicher Menge 2x RIPA Puffer (10µl auf 1mg Gewebe) für 10s sonifiziert. Anschließend wurde es auf Eis für 15min inkubiert und anschließend zentrifugiert (maximale Geschwindigkeit, 4°C, 15min). Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der in den Proben enthaltenen Proteinmenge wurde ein BCA-Assay durchgeführt.

Vor der Beladung wurden die Proben zusammen mit SDS-loading buffer für 10min bei 72°C erhitzt. Für die Gelelektrophorese wurden die Taschen des NuPage 4-12% Bis-Tris Gels mit jeweils 30µg Protein geladen und 5µl des Größenmarkers. Die Gelelektrophorese lief konstant bei 150V. Nach dem Beenden der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF (polyvinylidenedifluoride) Membran. Vor dem Transfer wurde die Membran für 10min in Methanol aktiviert und anschließend nach Anleitung Schwämme, Gel und Membran übereinander gelegt. Die Blotting-Kammer wurde in eiskalten Transfer Puffer gestellt und die Proteine bei 90V für 1,5h geblottet. Nach dem Transferieren wurde die Membran in 5%igem Milchpulver (TBS/Tween) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran nach dreimaligem Waschen in TBS/Tween bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem Horse-Radish-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Nach wiederholtem Waschen wurde die Membran zur Detektion der Proteine mit dem Chemiluminescent Substrat des Western Blot Entwicklungskits für 5min inkubiert und die spezifischen Banden anschließend mit Hilfe des LAS-3000 Imaging System detektiert. Die quantitative Auswertung der Banden erfolgte über die Messung der Pixelstärke der Banden mit dem Programm Multigauge und wurde mit der Dichtemessung der Ladekontrolle „beta-Aktin“ verrechnet.

#### *4.2.7 in vivo Stimulationsversuche*

##### *Omegaven*

Für die Untersuchung der Wirkung von Omega-3 Fettsäuren auf den post-operativen Ileus, wurden C57Bl/6 bzw. ALOX15 sechs Tage präoperativ 10ml/kg KG Omegaven® (Fresenius-Kabi, Bad Homburg, Deutschland) bzw. NaCl per Injektion in die Schwanzvene verabreicht. Am Tag sechs wurden die Tiere nach der letzten Supplementierung einer intestinalen Manipulation unterzogen. Nach 24h wurden der GIT und die MPO<sup>+</sup>-Zellen bestimmt, sowie die ME für weitere Analysen wie Durchflusszytometrie oder qPCR isoliert.

##### *Lipidmediatoren*

Protectin DX (PDX) und Resolvin D2 (RvD2) (Cayman Chemical Company, Michigan, USA), aus der n-3- Fettsäure DHA synthetisierte Lipidmediatoren, wurden durch einmalige post-operative Gabe als potenzielle Wirkstoffe in der Entzündungsauflösungsphase des POI untersucht. Hierfür wurden sowohl C57Bl/6 als auch ALOX15 Tiere einer intestinalen

Manipulation unterzogen. Direkt nach dem Verschluss der Peritonealhöhle wurde 1µg/Maus der PDX/RvD2-Lösung (in 240µl NaCl) i.p. injiziert, bevor die Bauchdecke verschlossen wurde. Als Vehicle wurde eine Lösung aus 10µl EtOH absolut in 240µl NaCl verabreicht. Nach IM24h wurden folgende Analysen wie bereits oben beschrieben durchgeführt: GIT, Anfärben der MPO<sup>+</sup>-Zellen, ME-Isolierung für Genexpressions- und Proteinanalysen.

#### 4.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Die gemittelten Abweichungen werden mit einem Fehlerbalken dargestellt (*engl.* standard deviation, SD bzw. standard error of the mean, SEM). Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels One-way ANOVA sowie Bonferroni's Post-Hoc-Test oder dem zweiseitigem Student's t-Test (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  bzw. # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ ).

## 5 Ergebnisse

Im Gegensatz zu den bereits gut verstandenen Mechanismen zur Entzündungsentstehung im POI, sind die Mechanismen, die die Entzündungsreaktion wieder beenden, noch unerforscht. Entgegen der ursprünglichen Annahme, die Auflösung der Entzündung sei ein passiver Prozess, welcher die Abnahme pro-inflammatorischer Mediatoren beinhaltet, ist heute bekannt, dass es ein aktiv regulierter Prozess ist.

Der Ergebnisteil ist im Folgenden in zwei Teile unterteilt: Teil I beschäftigt sich mit den an der Entzündungsauflösung beteiligten Immunozyten und ihrer regulatorischen Funktion, während Teil II klärt, welche Bedeutung entzündungsauflösenden Lipidmediatoren im POI zukommt.

### 5.1 Teil I: Die Rolle von IL-10 auf die Differenzierung und Chemotaxis infiltrierender Leukozyten im Kontext des POI

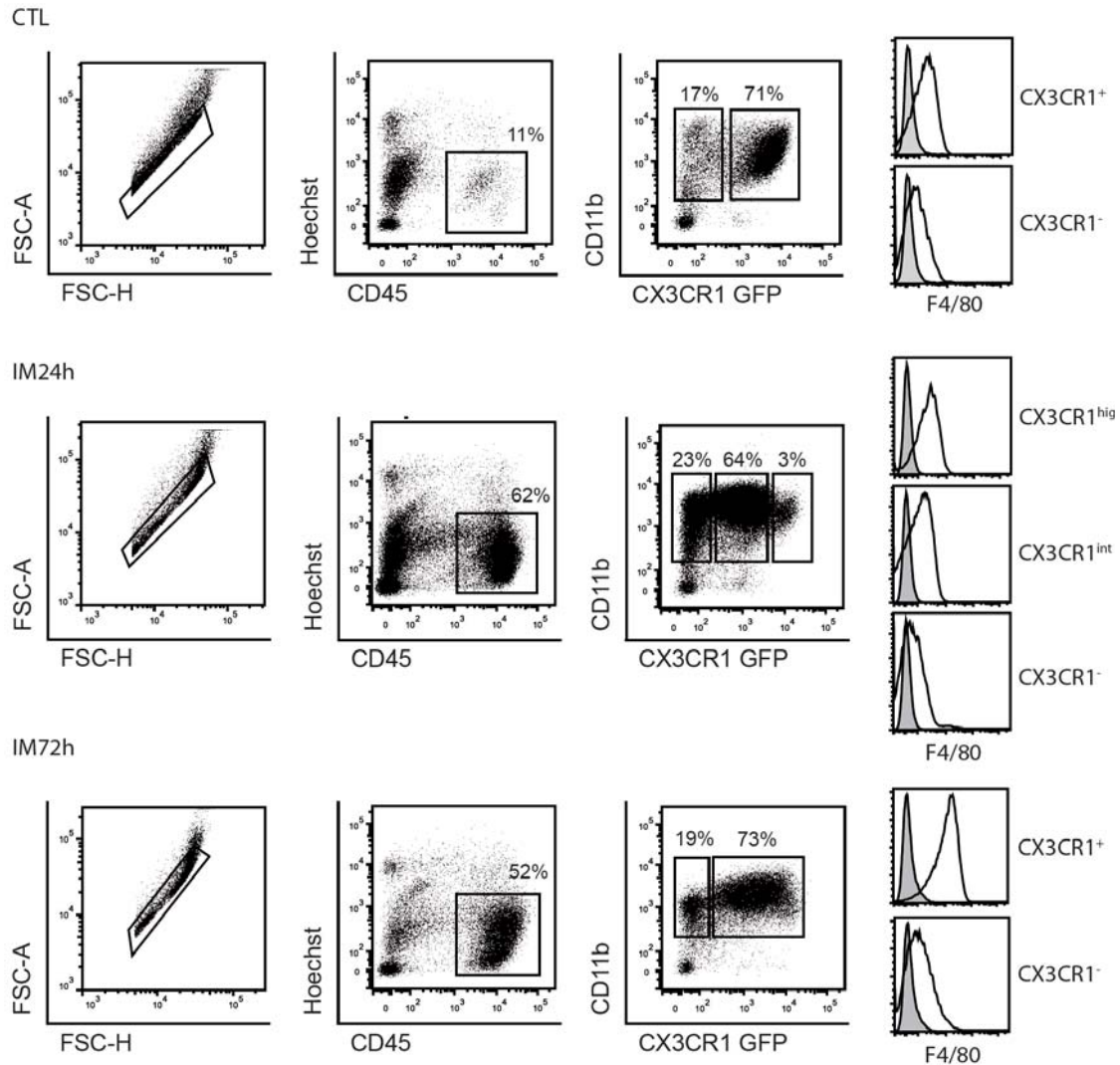
---

#### *5.1.1 Monozyten stellen die dominant infiltrierende Leukozytenpopulation im POI dar*

In Vorversuchen konnten wir hauptsächlich den Influx von Monozyten und Neutrophilen in die ME beobachten [31, 39]. Für die genaue Charakterisierung der in der Spätphase des POI relevanten Leukozyten wurden die aus der ME isolierten Zellen zu den Zeitpunkten 24h und 72h postoperativ via Durchflusszytometrie analysiert (**Abbildung 5**). Ausgehend von der Expression spezifischer Leukozyten-Oberflächenmarker wurden die Zellen unter Kontrollbedingungen mit denen unter der Ausbildung eines POI verglichen. Drei distinkte Populationen konnten innerhalb der lebenden CD45<sup>+</sup>- und CD11b<sup>+</sup>- Zellen in CX3CR1<sup>+/GFP</sup>-Mäusen definiert werden: CX3CR1<sup>-</sup>, CX3CR1<sup>int</sup> und CX3CR1<sup>high</sup> (Abbildung 5), wobei die CX3CR1<sup>int</sup> mit 64% ± 11 den größten Anteil 24h postoperativ ausmachte. Im Gegensatz dazu waren im Kontrollgewebe nur jeweils eine negative und positive Fraktion der CX3CR1 exprimierenden Zellen detektierbar. Die Kombination mit dem Makrophagenmarker F4/80 lässt die stärkste Expression von F4/80 in der Großzahl der CX3CR1<sup>high</sup>-Fraktion erkennen. Diese Zellen entsprechen somit dem Phänotyp von residenten Makrophagen. Die CX3CR1<sup>int</sup> Fraktion ist ebenfalls zu einem hohen Maße F4/80<sup>+</sup>, während die CX3CR1<sup>-</sup> Fraktion nur gering positiv für den Makrophagenmarker ist (Abbildung 5). Vergleichbar mit den Ergebnissen unter Kontrollbedingungen zeigte sich 72h postoperativ eine ähnliche Zellverteilung der CD45<sup>+</sup>, Hoechst-negativen Zellen in ihrer CX3CR1-Expression. Es waren zwei distinkte Populationen

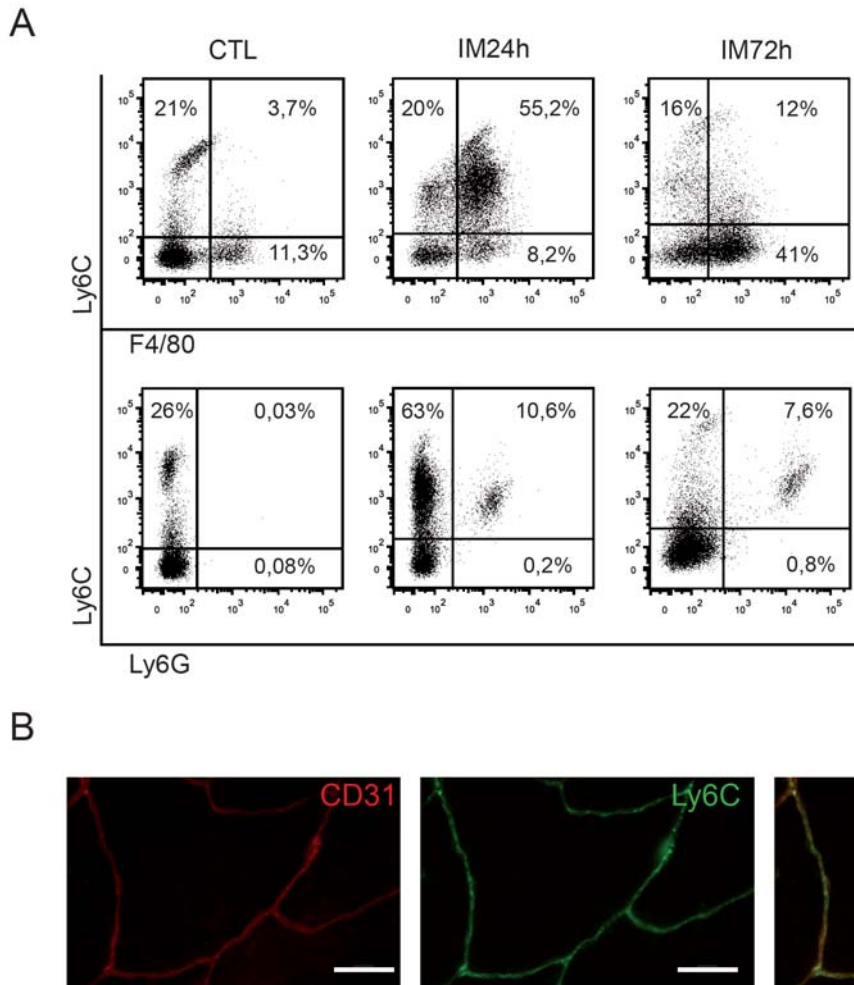
erkennbar: eine kleine CX3CR1<sup>-</sup> und eine große CX3CR1<sup>+</sup>- Fraktion. Die hoch für CX3CR1 hoch-positiven Zellen waren ebenfalls hoch-positiv für F4/80.

Da F4/80 nur schwach auf dem Großteil der infiltrierenden Zellen exprimiert wurde, sollten die Marker Ly6C (Monozyten, Neutrophile) und Ly6G (Neutrophile) für eine weitere Charakterisierung dieser Zellen herangezogen werden.



**Abbildung 5:** Monozyten stellen die dominante infiltrierende Leukozytenpopulation im POI dar. Durchflusszytometrische Analyse von aus der ME isolierten Zellen zu den Zeitpunkten 24h (IM24h) und 72h (IM72h) postoperativ, verglichen zur Kontrolle (CTL). Dafür wurden die Mäuse einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen. Die lebenden CD45<sup>+</sup> Zellen wurden anschließend hinsichtlich ihrer Expression von CD11b, CX3CR1 und F4/80 untersucht. Die Daten sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente pro Zeitpunkt; angegeben wurde der prozentuale Mittelwert der einzelnen Zellpopulationen der Tiere.

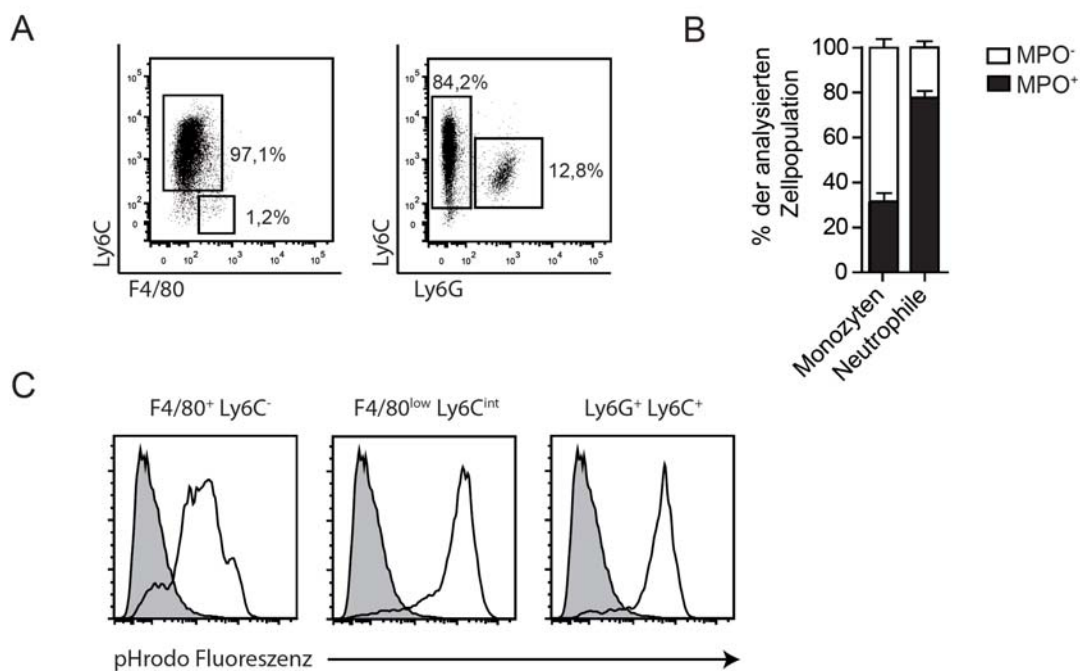
Hierbei wurde deutlich, dass der Großteil der in die ME infiltrierenden Leukozyten aus peripheren infiltrierten Blutmonozyten bestand (**Abbildung 6A**). Diese zeigten eine mittlere Expressionsstärke von Ly6C, verloren Ly6C jedoch im zeitlichen Verlauf (24h bis 72h postoperativ) komplett, während sie zu F4/80-exprimierenden Makrophagen reiften.



**Abbildung 6:** Monozyten stellen die dominante infiltrierende Leukozytenpopulation im POI dar. **(A)** Die Tiere wurden einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen und die Immunzellen des postoperativen Darmgewebes isoliert. Durchflusszytometrische Analyse der isolierten Zellen zu den Zeitpunkten 24h (IM24h) und 72h (IM72h) postoperativ, verglichen zur Kontrolle (CTL). Die lebenden Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression von F4/80, Ly6C und Ly6G untersucht. Die Daten sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente pro Zeitpunkt; angegeben wurde der prozentuale Mittelwert der einzelnen Zellpopulationen der Tiere. **(B)** Immunhistochemische Färbung von CD31 (rot) und Ly6C (grün) in einem präparierten whole mount eines naiven Tiers. Die Färbung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Die Balken entsprechen einer Länge von 50µm.

Neutrophile, die sowohl Ly6C als auch Ly6G tragen, machten im Vergleich zu den infiltrierten peripheren Monozyten (55,2%) einen deutlich geringeren prozentualen Anteil (10,6%) 24h postoperativ aus. In einer zusätzlichen immunhistochemischen Färbung im whole mount von unmanipulierten Tieren konnten wir eine Koexpression von Ly6C mit dem Endothelmarker CD31 darstellen (**Abbildung 6B**). Aufgrund der starken Vaskularisierung der isolierten ME-Zellen wurden die Endothelzellen ebenfalls in den FACS-Analysen als Ly6C<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> sichtbar (CTL; **Abbildung 6A**).

Des Weiteren sollten die Leukozyten aus der nativen sowie postoperativen ME über ihre Myeloperoxidase (MPO)- und Phagozytoseaktivität charakterisiert werden. MPO wurde von  $23\% \pm 9,9$  der infiltrierenden Leukozyten in der postoperativen ME exprimiert, wobei sowohl Neutrophile als auch Monozyten positiv für MPO sind. Letztere machen einen Anteil von  $84,2\% \pm 2,6$  aller MPO exprimierenden Zellen aus, während nur  $12,8\% \pm 2,2$  aller MPO<sup>+</sup>-Zellen Neutrophile sind. Hingegen sind residente Makrophagen nur gering positiv für MPO (**Abbildung 7A**). Ausgehend von den einzelnen Zellpopulationen exprimieren jedoch  $77,5\% \pm 5,8$  der Neutrophilen MPO, während nur  $31,2\% \pm 7,6$  der Monozyten positiv für MPO sind (**Abbildung 7B**). Bei der Betrachtung der Phagozytoseleistung (**Abbildung 7C**) der einzelnen Leukozytenpopulationen (IM24h) zeigten die einwandernden F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup>- Monozyten die stärkste Aufnahme der *E.coli* Biopartikel (pHrodo) im Vergleich zu Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>- Neutrophilen und F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>- Makrophagen.



**Abbildung 7:** Die einwandernden Leukozyten weisen eine hohe MPO- und Phagozytoseaktivität auf. Hierfür wurden die Tiere einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen und die isolierten Leukozyten nach 24h postoperativ untersucht. **(A)** Die isolierten ME Zellen wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse auf ihre MPO-Expression gegated und im Anschluss auf ihre Expression von Ly6C, F4/80 und Ly6G analysiert. Die dargestellten Dot plots sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Angegeben wurde der prozentuale Mittelwert der einzelnen Zellpopulationen. **(B)** Mittels Durchflusszytometrie wurden die isolierten ME-Zellen hinsichtlich der Lokalisation von MPO in Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>-Monozyten und Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>-Neutrophilen untersucht. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM und ist repräsentativ für vier unabhängige Experimente. **(C)** Messung der Phagozytose-Aktivität mittels pHrodo-Assay in den durch IM infiltrierenden Leukozyten F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>, F4/80<sup>low</sup>Ly6C<sup>int</sup> und Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>. Repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse der Negativkontrolle (grau) und der analysierten Populationen für das pHrodo-Signal (weiß). Die Daten sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente für den Zeitpunkt IM24h.

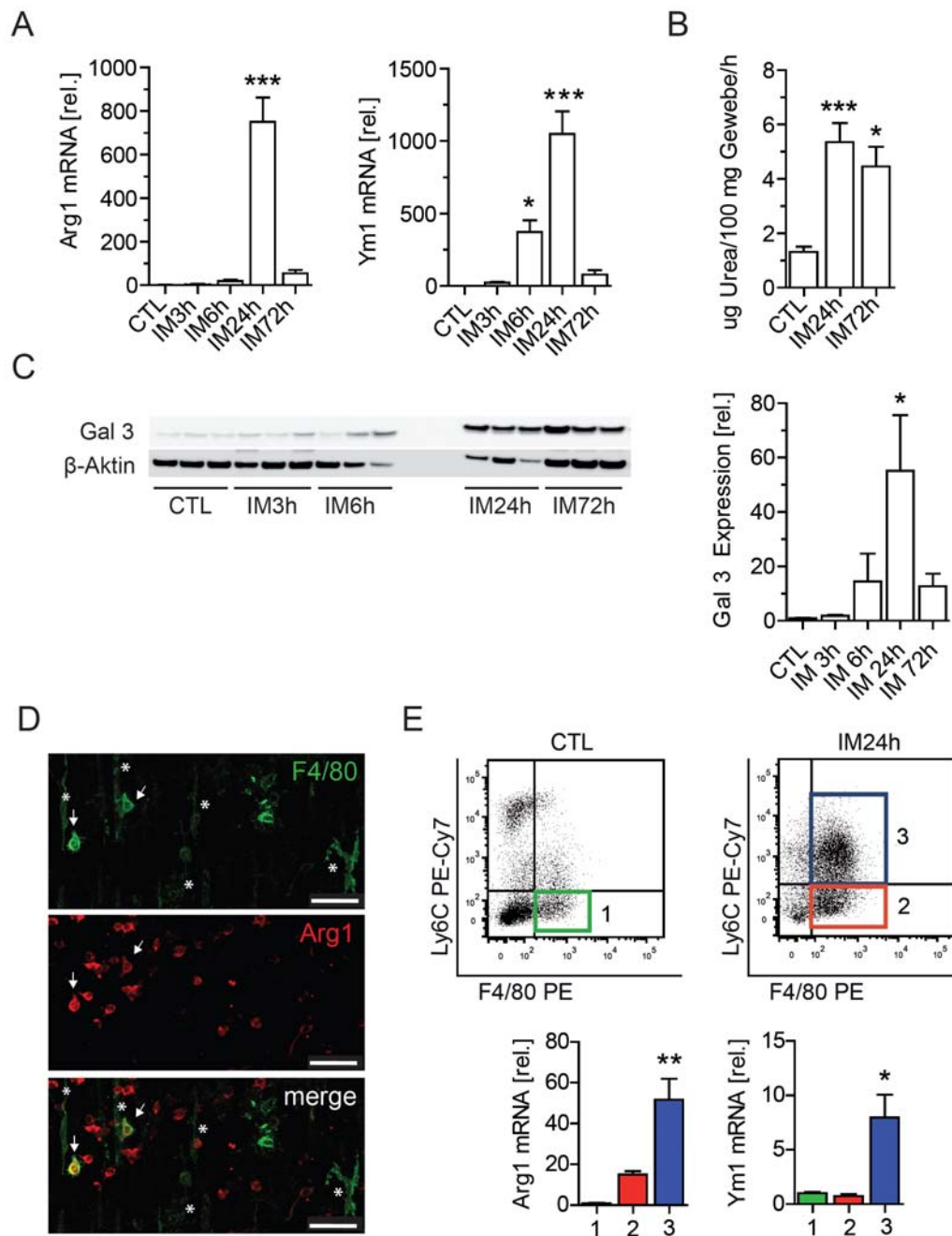


Diese Analysen zeigen die infiltrierenden ME-Monozyten im Verlauf des POI als dominierende Leukozytenpopulation, welche innerhalb von drei Tagen nach IM zu reifen Makrophagen werden. Bereits 24h postoperativ zeigen sie mit hoher MPO- und Phagozytose-Aktivität entzündungsauflösende Eigenschaften.

### *5.1.2 M2 Makrophagen-Aktivität in der Spätphase des POI*

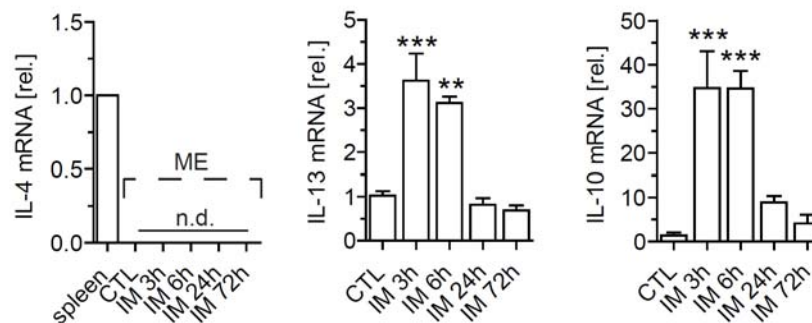
Aufgrund der hohen Präsenz von aus peripheren Blutmonozyten gereiften Makrophagen in der postoperativen ME und ihren entzündungsregulierenden Eigenschaften, sollte geklärt werden, ob die Entzündungsauflösung im POI möglicherweise über M2 Makrophagen erfolgt.

Eine quantitative PCR Analyse der gängigen M2-Marker Arg1 und Ym1 in isolierten ME-Proben des Dünndarms zeigte eine deutliche M2-Aktivität innerhalb von drei Tagen postoperativ in Wildtyp-Mäusen (**Abbildung 8A**). Dabei konnten wir die stärkste Genexpression von Arg1 ( $p < 0,001$ ) und Ym1 ( $p < 0,001$ ) in der späten postoperativen Phase (IM24h) erkennen. Funktionell wurde die Arginase Aktivität mittels eines Arginase Assays bestimmt (**Abbildung 8B**), der nach der einstündigen Inkubation in Gegenwart von 0,5 M L-Arginin unter Kontrollbedingungen eine basale Arginase-Aktivität von  $1,3 \pm 0,48 \mu\text{g Urea}/100\text{mg Gewebe}$  zeigte. Postoperativ konnte eine etwa fünffache Zunahme der Aktivität zu den Zeitpunkten IM24h ( $p < 0,001$ ) und IM72h ( $p < 0,05$ ) im ME-Gewebe von Wildtyp-Tieren verzeichnet werden. Zudem zeigte sich eine erhöhte Expression des Proteins Galectin 3 (Gal3) 24h postoperativ (**Abbildung 8C**), welches als M2-Makrophagen aktivierendes Protein innerhalb des Wundheilungsprozesses beschrieben wird [143]. Als nächstes sollte die Expression der Arginase mittels Immunofluoreszenzmikroskopie im whole mount lokalisiert werden (**Abbildung 8D**). Hierbei wurden hauptsächlich infiltrierende Monozyten als Arg1<sup>+</sup> identifiziert, welche mit ihrer typisch runden Morphologie 24h nach IM teilweise bereits den Makrophagenmarker F4/80 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Residente Makrophagen, welche sich mit langgestreckten Ausläufern, ähnlich Dendriten, leicht identifizieren lassen, exprimierten hingegen keine Arginase (Abbildung 8D; markiert mit Sternchen). Quantitative PCR-Analysen von sortierten F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>-residenten Makrophagen (**Abbildung 8E**; Gruppe 1) aus unmanipulierten Tieren, sowie F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>-Monozyten (Gruppe 3) und F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>-Makrophagen (Gruppe 2) aus manipulierten Tieren (IM24h) bestätigten die erhöhten Arg1- ( $p < 0,01$ ) und Ym1-Expressionslevel ( $p < 0,05$ ) innerhalb der F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>-Monozyten. Dies deutete darauf hin, dass die Polarisierung der M2 Makrophagen vorwiegend in den aus peripheren Blutmonozyten gereiften Makrophagen initiiert wurde.



**Abbildung 8:** M2-Makrophagen Aktivität in der Spätphase des POI. Für die folgenden Analysen wurden die Mäuse einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen. **(A)** Quantitative Genexpressionsanalyse der M2-Marker Arginase 1 (Arg1) und Ym1 in der ME von WT-Tieren (n=5). **(B)** Bestimmung der Arginase Aktivität in der ME von WT-Tieren verwendet bei (A) durch die Messung des Umsatzes von Urea pro 100mg Gewebe  $\pm$ SEM pro Stunde. **(C)** Quantitative Proteinexpressionsanalyse des M2-Markers Galektin 3 (Gal 3) in einer WT-Zeitreihe (n=3) mittels Western Blot, relativiert auf  $\beta$ -Aktin. **(D)** ME whole mounts von WT Tieren (n=3) wurden 24h nach IM auf die Präsenz von Arg1 (rot) in F4/80<sup>+</sup>-Monozyten/Makrophagen mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Die Sternchen zeigen dabei auf F4/80<sup>+</sup>Arg1<sup>-</sup>-residente Makrophagen, die Pfeile auf F4/80<sup>+</sup>Arg1<sup>+</sup>-infiltrierte Monozyten. Zu beachten sind dabei die Arg1<sup>+</sup> typisch rund-geformten Monozyten, welche noch nicht positiv für F4/80 sind. Die Balken entsprechen einer Länge von 50 $\mu$ m. **(E)** Sortierung von drei unterschiedlichen Zellpopulationen, welche als F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>-residente Makrophagen (1, CTL, grün; 2, IM24h, rot) und F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>-Monozyten (3, IM24h, blau) definiert wurden. Die sortierten Zellen unterliefen anschließend eine quantitative PCR-Analyse mit den M2-Markern Arg1 und Ym1, relativiert auf die residenten Makrophagen des Kontrollgewebes. Dargestellt werden die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 3 unabhängigen Experimenten. In allen Analysen wurden die Signifikanzen mittels One-way ANOVA und anschließendem Bonferroni post hoc-test ermittelt (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$ ) vs. CTL

Die während des POI an der M2-Polarisierung beteiligten Mediatoren sind noch ungeklärt. Allgemein beschriebene Polarisierungsmediatoren sind IL-4, IL-13 und IL-10. Im postoperativen Zeitverlauf waren keine IL-4-Transkripte messbar, während die Genexpression von IL-13 während der Frühphase leicht erhöht war (IM3h:  $3,6 \pm 0,6$  -fach; IM6h:  $3,1 \pm 0,15$  -fach) (**Abbildung 9**). Im Gegensatz zu IL-13 wurden die Transkripte von IL-10 im Vergleich zu den Kontrollen in der frühen postoperativen Phase deutlich aufreguliert (IM3h:  $34,7 \pm 8,4$  -fach; IM6h:  $34,6 \pm 4,0$  -fach).



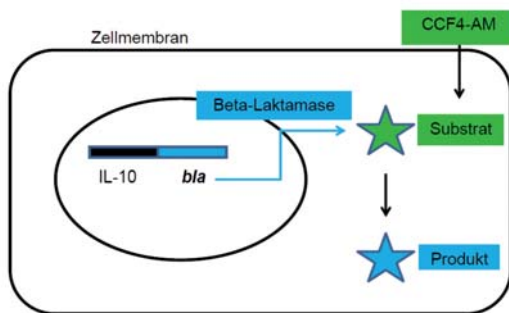
**Abbildung 9:** Die M2 Makrophagen-Polarisierung verläuft unabhängig von IL-4. Die Mäuse wurden einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen. An unterschiedlichen postoperativen Zeitpunkten wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse von IL-4, IL-13 und IL-10 in der postoperativen ME von WT-Mäusen im Vergleich zu ihren naiven Kontrollen durchgeführt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM von fünf individuellen Experimenten pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels One-way ANOVA und Bonferroni post-test (n.d. = nicht detektiert; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend demonstrieren die Daten eine M2 Makrophagen-Aktivität während der Spätphase des POI, die vermutlich überwiegend durch den IL-10 als durch den IL-4/13-Signalweg gesteuert wird.

### 5.1.3 IL-10 wird primär von Monozyten und Makrophagen während des POI exprimiert

Als nächstes wurde die Rolle von IL-10 näher untersucht, welches bereits erhöhte Transkripte innerhalb der Zeitreihe zeigte (Abbildung 9) und entscheidend an der Polarisierung von M2 Makrophagen beteiligt sein könnte. IL-10 wird von verschiedensten Immunzellen sezerniert, unter anderem auch von Monozyten/Makrophagen. Prinzipiell wird seine Funktion darin beschrieben, Entzündungsprozesse zu reduzieren und zu terminieren [106]. Deshalb sollte zunächst herausgefunden werden, welche infiltrierende Leukozytenpopulation IL-10 exprimiert. Hierfür verwendeten wir ein transgenes Mausmodell, welches auf heterogenem

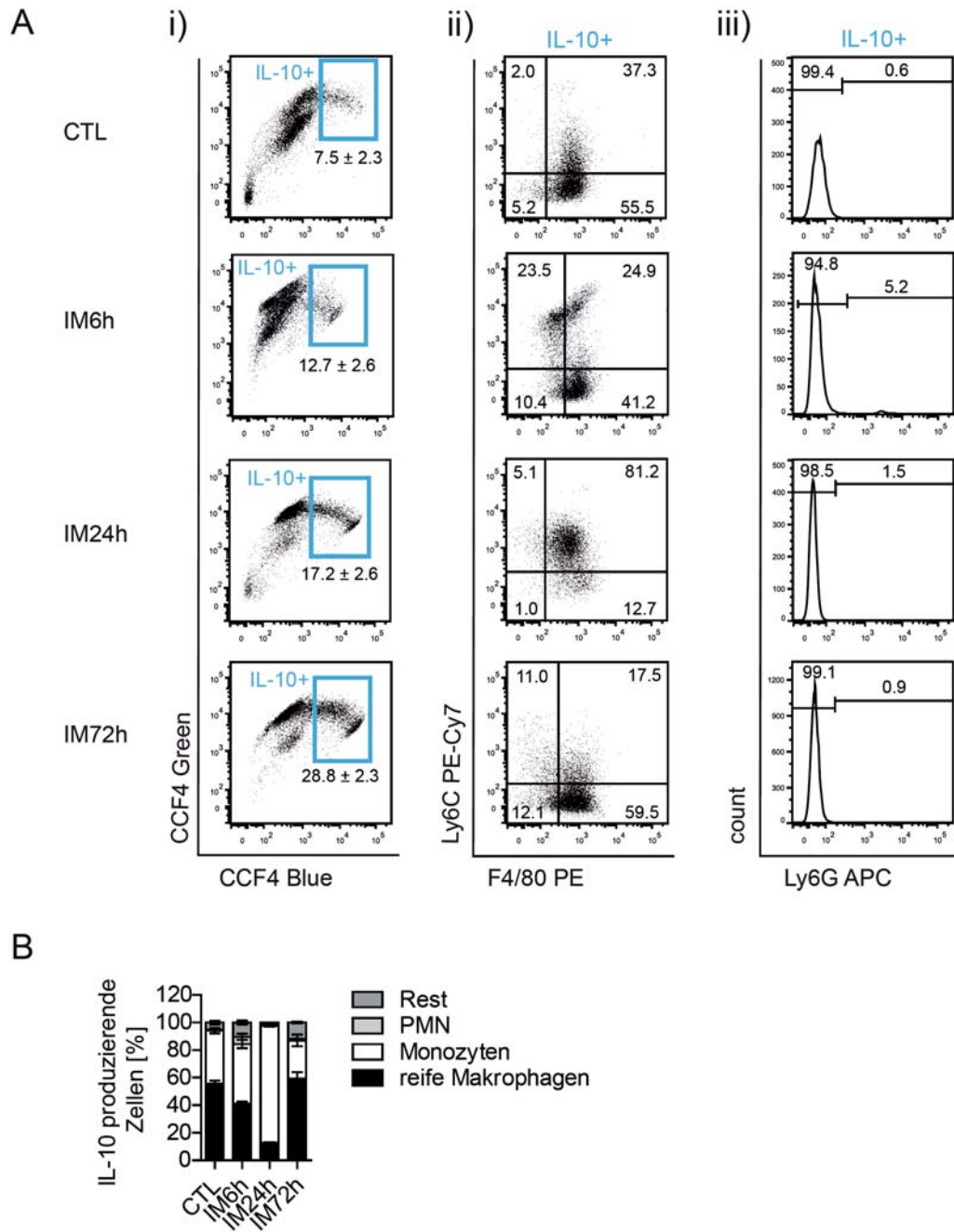
Hintergrund das Beta-Laktamase-Gen unter der Regulierung des IL-10 Promoters exprimiert [140] (**Abbildung 10**).



**Abbildung 10:** Die IL-10 Expression von isolierten Leukozyten der ME. Schematische Darstellung des Anfärbens IL-10 positiver Zellen durch die Inkubation der isolierten Zellen mit dem Beta-Laktamase-Substrat CCF4-AM in Zellen einer IL-10 Reportermaus (ITIB<sup>+/-</sup>)

Mit der Inkubation des lipophilen Substrats CCF4-AM, welches durch das Enzym beta-Laktamase IL-10-abhängig in ein im kleinwelligen Bereich (447nm) sichtbares Produkt umgesetzt wird, können IL-10-produzierende Zellen sichtbar gemacht werden. Unter Verwendung dieser hoch sensitiven Reportermaus (ITIB<sup>+/-</sup>), konnten IL-10 positive Zellen innerhalb der ME detektiert werden (**Abbildung 11Ai**). In naiven ITIB<sup>+/-</sup> Tieren wurde IL-10 von 7,5%±2,3 aller Zellen exprimiert, von denen 92,8%±3,7 F4/80 trugen (**Abbildung 11Aii, 11B**). IL-10<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>-Zellen wurden weiter untergliedert in Ly6C<sup>-</sup>-Monozyten (37,3%±4,2) und Ly6C<sup>-</sup>-Makrophagen (55,5%±5,5) (**Abbildung 11Aii**). Innerhalb von drei postoperativen Tagen stieg der prozentuale Anteil IL-10 exprimierender Zellen kontinuierlich an (6h: 12,7%±2,6; 24h: 17,2%±2,6; 72h: 28,8%±2,3). Obwohl die F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>-residenten Makrophagen auch nach 24h postoperativ IL-10 exprimierten (12,7%±0,8), lag die Hauptexpression bei den einwandernden F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>-Monozyten (81,2%±1,3). Nach IM72h waren diese bereits zu reifen Makrophagen differenziert und machten hier den Großteil der IL-10 exprimierenden Leukozyten aus (59,5%±10,2%). Ly6G<sup>+</sup>-Neutrophile, die in der unmanipulierten ME nicht vorhanden sind, wanderten bereits früh in die postoperative Darmwand ein und waren über mindestens drei Tage postoperativ vertreten (**Abbildung 6A**). Jedoch waren im Gegensatz zu den infiltrierenden Monozyten nur ein geringer Teil der IL-10 positiven Leukozyten Neutrophile (**Abbildung 11Aiii, 11B**).

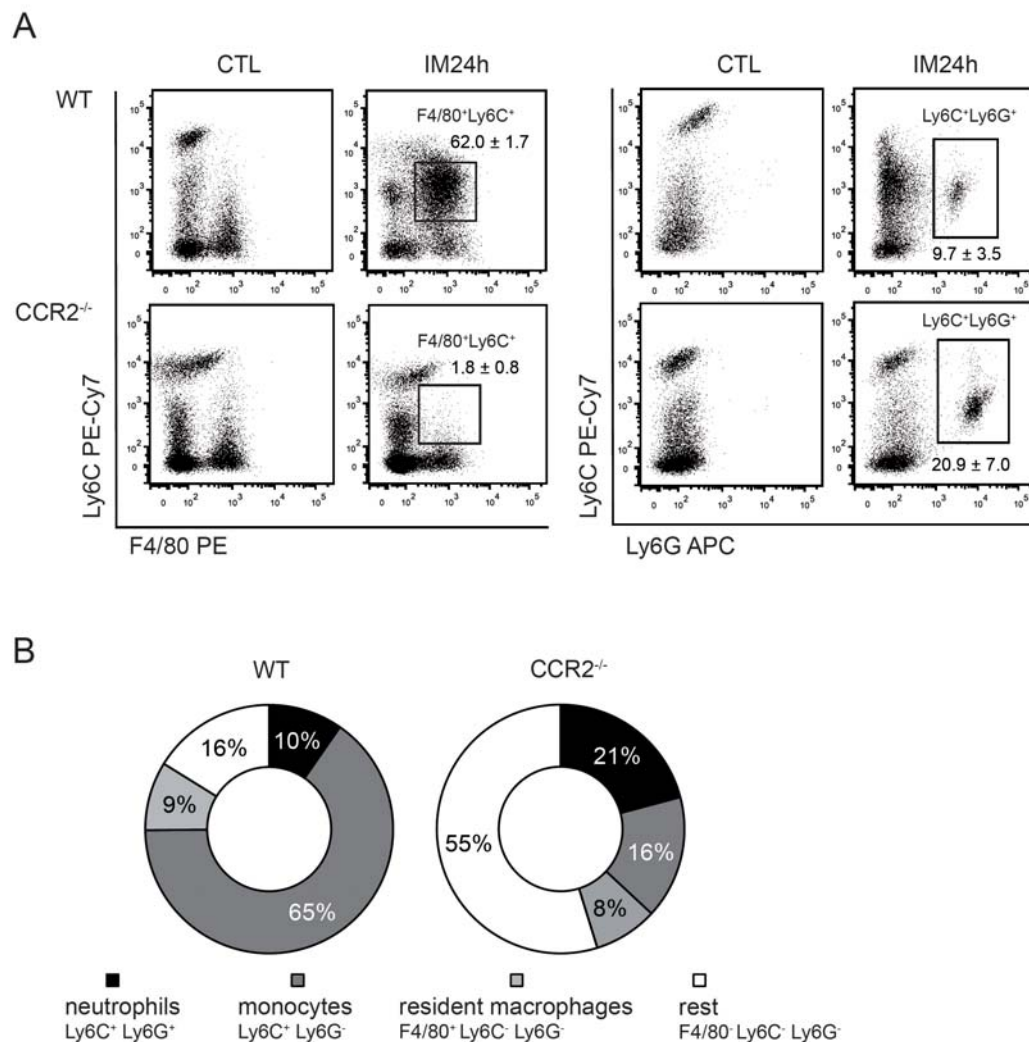
Diese Ergebnisse zeigen, dass IL-10 überwiegend von postoperativ infiltrierten ME Makrophagen exprimiert wurde.



**Abbildung 11:** *IL-10* wird primär von Monozyten und Makrophagen während des POI exprimiert. **(A)** ITIB<sup>+/-</sup> Mäuse wurden einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen. Nach 6h, 24h und 72h wurden die ME-Zellen isoliert, mit dem Substrat CCF4 inkubiert, für die Ly6C-, Ly6G- und F4/80- Expression angefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Die dargestellten Analysen zeigen beispielhaft die prozentuale Verteilung (Mittelwert ± SD) der einzelnen Zellpopulationen. **(i)** IL-10-Beta-Laktamase-exprimierende Zellen wurden als grün und blau emittierende Zellen identifiziert. **(ii und iii)** IL-10<sup>+</sup>- Zellen wurden eingegrenzt und für die Expression der angegebenen Marker analysiert. IL-10<sup>+</sup>- Zellen setzen sich hauptsächlich aus Monozyten/Makrophagen und nur zu einem geringen Prozentsatz aus Ly6G<sup>+</sup>- Neutrophilen zusammen. **(B)** Verteilung der IL-10-produzierenden Zellen innerhalb der ME von CTL und intestinal manipulierten WT-Mäusen. Die gezeigten Daten setzen sich aus den Mittelwerten ± SEM aus fünf unabhängigen Experimenten zusammen.

### 5.1.4 Die IL-10 produzierenden Monozyten infiltrieren CCR2 abhängig

Als nächstes sollte die Bedeutung der infiltrierenden Monozyten während des POI näher untersucht werden, die als Hauptquelle für IL-10 identifiziert wurden. Hierfür wurden CCR2-defiziente Mäuse verwendet, die maßgeblich an der Rekrutierung von Monozyten aus dem Knochenmark in das entzündete Gewebe beteiligt sind, wie bereits in Modellen der akuten Entzündung gezeigt werden konnte [144, 145]. Zunächst sollte untersucht werden, ob die im POI einwandernden Monozyten CCR2-abhängig rekrutiert werden (**Abbildung 12**).



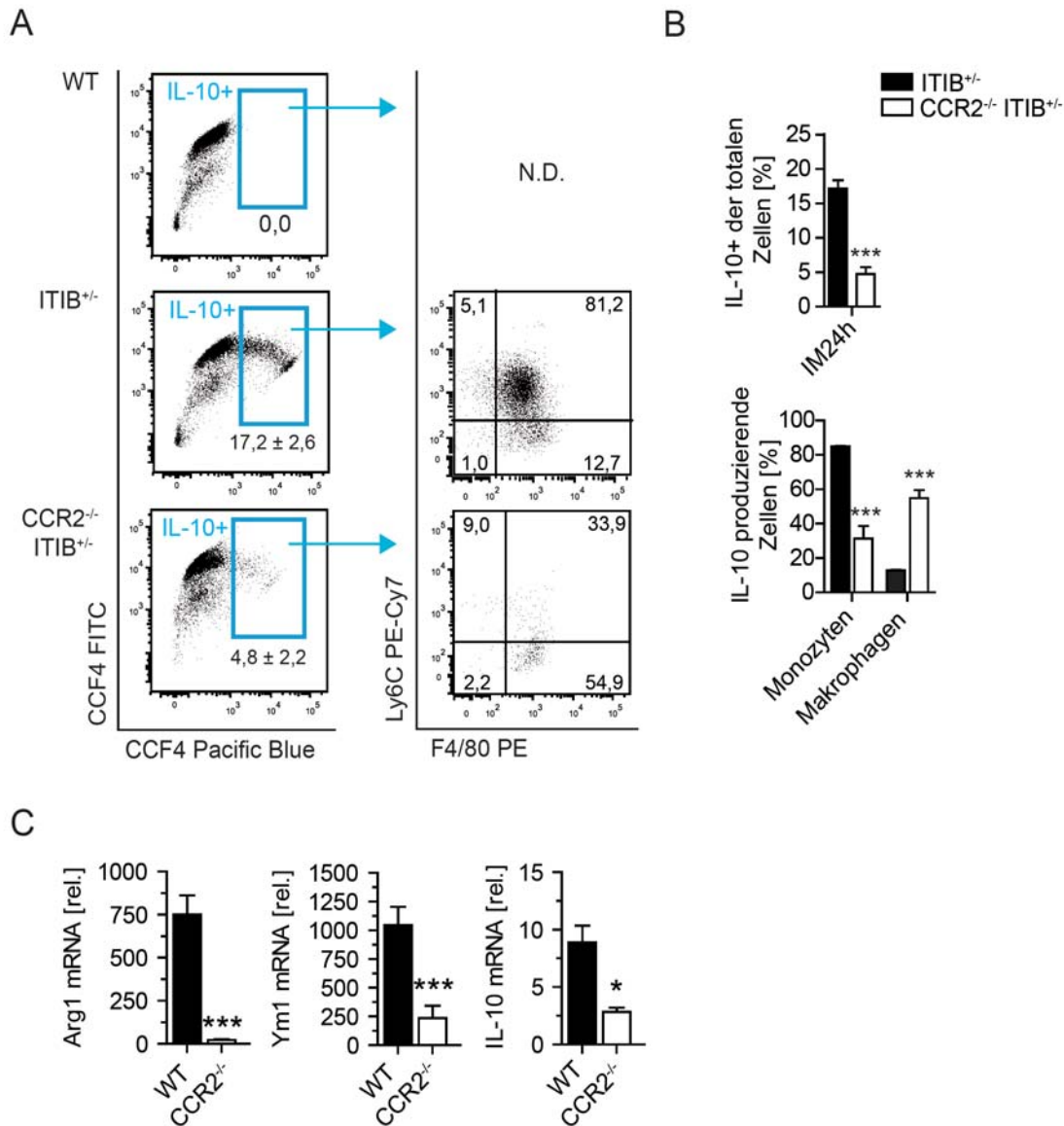
**Abbildung 12:** Die postoperative Monozyten im POI infiltrieren CCR2 abhängig. Die Mäuse wurden für die nachfolgenden Analysen einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen. **(A)** Durchflusszytometrische Analyse der in die postoperative ME infiltrierenden F480<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>-Monozyten und Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>-Neutrophilen in CCR2<sup>-/-</sup> im Vergleich zu WT Tieren. Die FACS-Plots sind repräsentativ für fünf unabhängige Experimente pro Zeitpunkt; angegeben wurde der prozentuale Mittelwert aller lebenden Zellen (± SD). **(B)** Relative Quantifizierung der aus der postoperativen ME (IM24h) isolierten Zellpopulationen von CCR2<sup>-/-</sup>- und WT-Tieren.

Die durchflusszytometrische Analyse der postoperativen ME (IM24h) CCR2-defizienter Tiere zeigte, dass die Infiltration der F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> Monozyten (1,8%±0,8) im Vergleich zu der von WT-Tieren (62%±1,7) nahezu ausblieb (p<0,001, **Abbildung 12A**). Konträr verhielten sich hingegen Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>-Neutrophile, deren Anteil in der postoperativen ME von CCR2-defizienten Mäusen auf das Doppelte (20,9%±7,0) anstieg (Abbildung 12A). Im Gegensatz dazu wurden die F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>-residenten Makrophagen durch die CCR2-Defizienz in ihrer Rekrutierung nicht beeinflusst (**Abbildung 12B**). Generierte CCR2<sup>-/-</sup>ITIB<sup>+/-</sup>-Mäuse zeigten zusätzlich, dass die postoperative IL-10 Expression in der ME durch eine CCR2-Defizienz stark vermindert wurde (4,8%±2,2) im Vergleich zu den ITIB<sup>+/-</sup> Kontrollen (17,2%±2,6; p<0,001; Abbildung 12A+B). Die Spezifität des ITIB-Reporter-Konstrukts wurde im WT bestätigt, die keine Reporteraktivität in den isolierten ME-Zellen nach Inkubation mit dem Beta-Laktamase-Substrat CCF4-AM zeigten (**Abbildung 13A**). Aufgrund der fehlenden IL-10<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>-Monozyten in den CCR2<sup>-/-</sup>ITIB<sup>+/-</sup>-Mäusen, konnte das verbleibende IL-10 in F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>-residenten Makrophagen sowie einer geringen Anzahl CCR2-unabhängig rekrutierter Monozyten detektiert werden (**Abbildung 13A+B**). Übereinstimmend mit unseren vorherigen Ergebnissen in ITIB<sup>+/-</sup>-Mäusen (Abbildung 4.3-2Aiii) exprimierten die Neutrophilen in CCR2<sup>-/-</sup>ITIB<sup>+/-</sup>-Mäusen ebenfalls nur geringe Mengen IL-10 (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend demonstrieren die Daten, dass CCR2 für die Infiltration der Monozyten und in Folge dessen auch für den Großteil der IL-10 produzierender Zellen während des POI verantwortlich ist (Abbildung 13B).

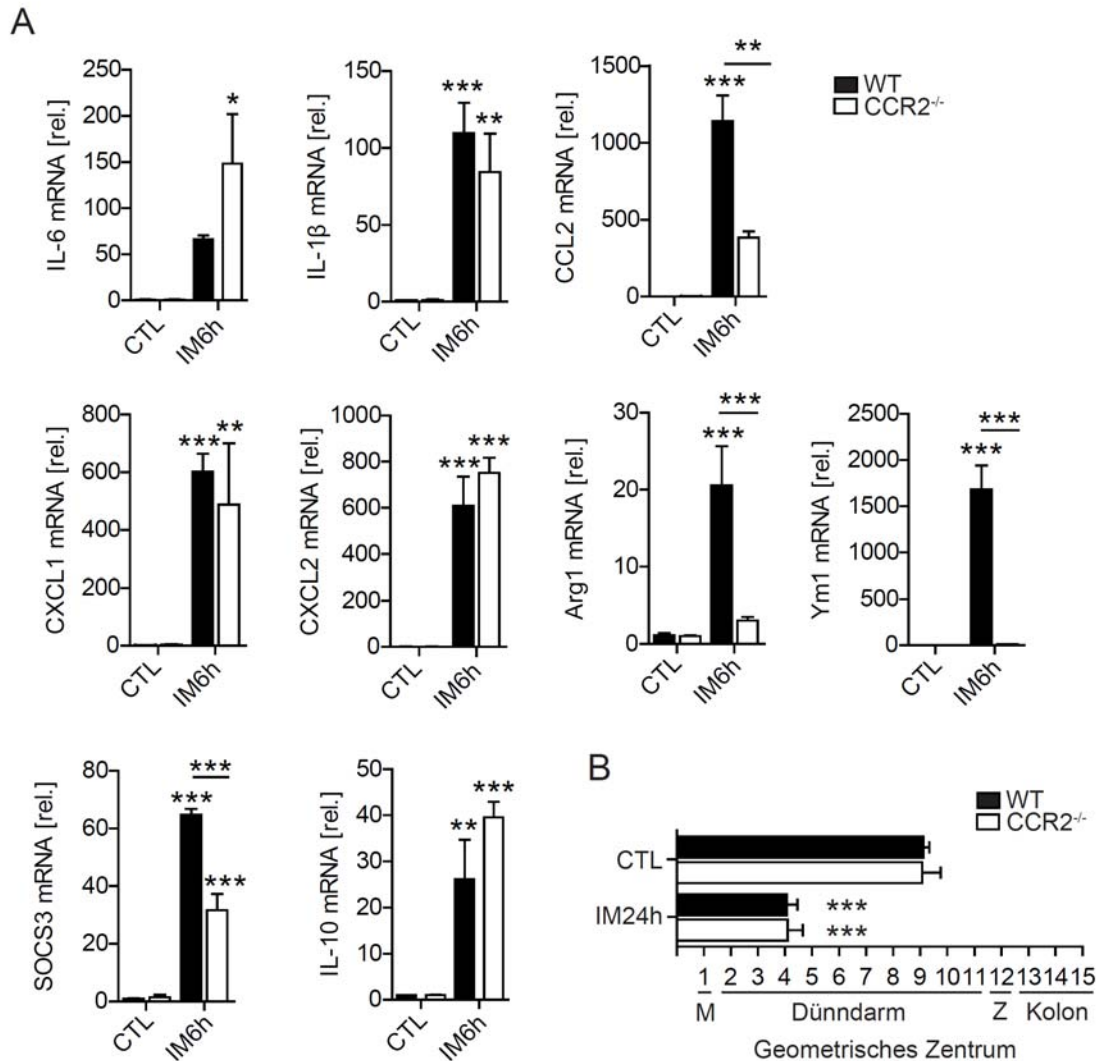
Zusätzlich untersuchten wir, ob das Fehlen der CCR2<sup>+</sup>-Monozytenpopulation mit einer veränderten M2-Polarisierung oder auch Expression von Chemokinen/Zytokinen in Zusammenhang steht. Durch Genexpressionsanalysen konnten wir eine deutliche Verminderung der M2-Marker Arg1 (p<0,001), Ym1 (p<0,001) und IL-10 (p<0,05), 24h nach Manipulation, in der ME von CCR2<sup>-/-</sup> im Vergleich zu WT-Tieren verzeichnen (**Abbildung 13C**). Ein ähnliches Bild zeigte sich bereits in der Frühphase des POI, 6h nach Manipulation. CCR2<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten reduzierte Arg1- (p<0,001), Ym1- (p<0,001), SOCS3- (p<0,001) sowie CCL2- (p<0,01) Expressionslevel nach IM im Vergleich zu WT-Tieren (**Abbildung 14A**). Gleichzeitig waren die Expressionslevel von IL-6 (p<0,05), IL-1β (p<0,01), CXCL1 (p<0,01) und CXCL2 (p<0,001) erhöht, unterschieden sich jedoch nicht von den WT-Transkripten. Interessanterweise gab es zu diesem frühen Zeitpunkt noch keinen Unterschied in den IL-10 Transkripten zwischen den Tierlinien. Dies weist auf eine stetige Expression von IL-10 durch die residenten Makrophagen hin. Diese Daten bestätigten das Ausbleiben der Expression von M2-Markern über die komplette Entzündungsdauer hinweg. Die Funktion der Darmmotilität war

wie in den WT Tieren (GC:  $4,1 \pm 0,4$ ;  $p < 0,001$ ) stark eingeschränkt 24h nach Manipulation (GC:  $4,1 \pm 0,6$ ;  $p < 0,001$ ) (**Abbildung 14B**).



**Abbildung 13:** Die IL-10 Expression in der postoperativen ME ist abhängig von CCR2<sup>+</sup>-Monozyten sowie residenten Makrophagen. Die Mäuse wurden einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen. Anschließend wurde die ME 24h postoperativ entnommen, die Immunzellen aus dem Gewebe isoliert und diese mit dem Substrat CCF4-AM inkubiert. **(A)** Dargestellt ist die Expression von IL-10 in der postoperativen ME (IM24h) von WT- bzw. IL-10 Reportermäusen (ITIB<sup>+/-</sup>) im Vergleich zu CCR2<sup>-/-</sup> (CCR2<sup>-/-</sup>ITIB<sup>+/-</sup>) Tieren mittels Durchflusszytometrie. Die Analysen zeigen die prozentuale Verteilung (Mittelwert ± SD) der einzelnen Zellpopulationen aus fünf unabhängigen Experimenten. **(B)** Statistische Analyse der IL-10 positiven Zellen in ITIB<sup>+/-</sup> und CCR2<sup>-/-</sup> ITIB<sup>+/-</sup>-Mäusen, sowie die prozentuale Verteilung dieser auf residente Makrophagen und infiltrierende Monozyten. **(C)** Relative Genexpression von Arg1, Ym1 und IL-10 in der isolierten ME (IM24h) von CCR2<sup>-/-</sup> und WT- Mäusen im Vergleich zu ihren naiven Kontrollen. Die Daten zeigen jeweils fünf individuelle Experimente und deren Mittelwerte ± SEM. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels One-way ANOVA und Bonferroni post-test (\*= $p < 0,05$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ).





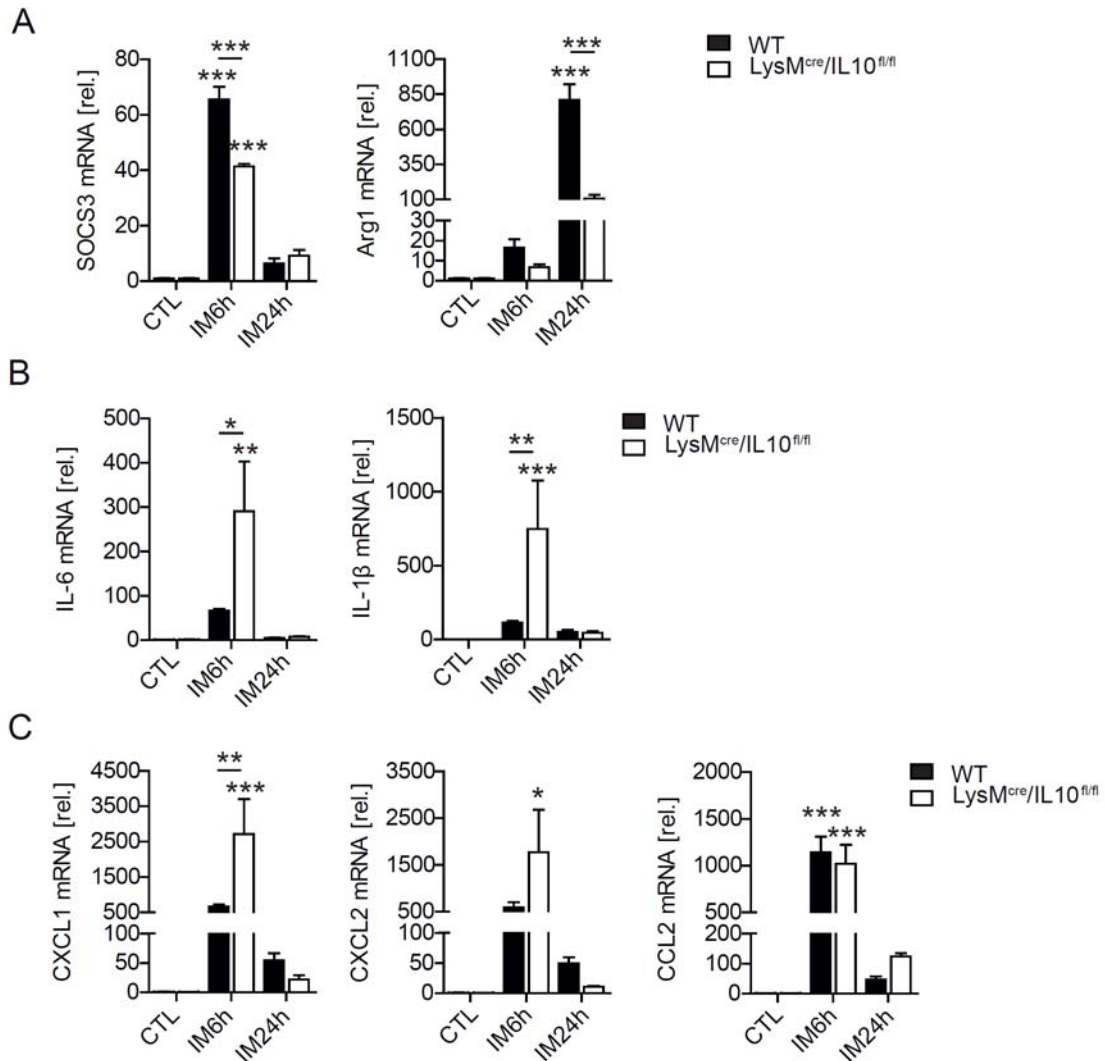
**Abbildung 14:** Ausbleibende M2-Makrophagen Polarisierung in CCR2<sup>-/-</sup>-Tieren. CCR2<sup>-/-</sup> und WT- Mäuse wurden einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen. **(A)** Genexpressionsanalyse der pro-inflammatorischen Marker IL-6 und IL-1 $\beta$ , der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CCL2, der M2 Makrophagen-Marker Arg1 und Ym1, sowie SOCS3 und IL-10 in der ME von CCR2<sup>-/-</sup>-Tieren 6h nach IM im Vergleich zu dem naiven Kontrollgewebe sowie WT-Mäusen. **(B)** Bestimmung des GIT nach der Gabe einer fluoreszierenden Zuckerlösung durch die Berechnung des geometrischen Zentrums von unmanipulierten oder manipulierten CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu ihren naiven Kontrollen bzw. WT-Tieren. M=Magen; Z=Zökum. Die jeweiligen Daten zeigen fünf individuelle Experimente und deren Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels One-way ANOVA und Bonferroni post-test (\*= $p < 0,05$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass durch die Defizienz des CCL2-Rezeptors die Infiltration des Großteils der Monozyten ausbleibt, was in einer Reduktion der M2 Marker und der IL-10 Expression resultiert, während die intestinale Dysmotilität unverändert blieb.

### 5.1.5 IL-10 verhindert ein Überschießen der Immunantwort in der Frühphase des POI

Unsere vorherigen Ergebnisse zeigten, dass ein Ausbleiben der Infiltration der Monozyten, welche die Hauptquelle für das in der postoperativen ME exprimierte IL-10 sind, zu einer persistenten Dysmotilität des Darms führte. Deshalb stellte sich für uns die Frage, welche Rolle IL-10 in der Pathogenese des POI zukommt. Da in unserem Modell IL-10 überwiegend in infiltrierenden Monozyten und residenten Makrophagen exprimiert wird, sollte die Rolle von IL-10 in diesen Zellen durch die Verwendung von  $LysM^{cre}/IL10^{fl/fl}$ - im Vergleich WT-Mäusen untersucht werden. LysM steht für das murine Lysozym 2-Gen, welches sich auf den myeloiden Zellen, sprich Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, befindet [146].

Die Mäuse zeigten zum frühen als auch späten postoperativen Zeitpunkt verminderte Genexpressionslevel von SOCS3 ( $p < 0,001$ ) und Arg1 ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu WT-Tieren (**Abbildung 15A**). Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 $\beta$  waren stark erhöht in den  $LysM^{cre}/IL10^{fl/fl}$ - Tieren ( $p < 0,01$  und  $p < 0,001$ ) und unterschieden sich 6h nach IM deutlich von der Expression in WT-Tieren (**Abbildung 15B**;  $p < 0,05$  und  $p < 0,01$ ). Die Neutrophilen-Chemokine CXCL1 und CXCL2, sowie CCL2 waren ebenfalls 6h nach IM signifikant erhöht, wobei nur CXCL1 im Vergleich zum WT stärker exprimiert wurde ( $p < 0,01$ ) in den  $LysM^{cre}/IL10^{fl/fl}$ - Mäusen (**Abbildung 15C**). Die Zytokin- und Chemokinspiegel fielen in allen Gruppen 24h nach IM auf nahezu Basisniveau zurück.

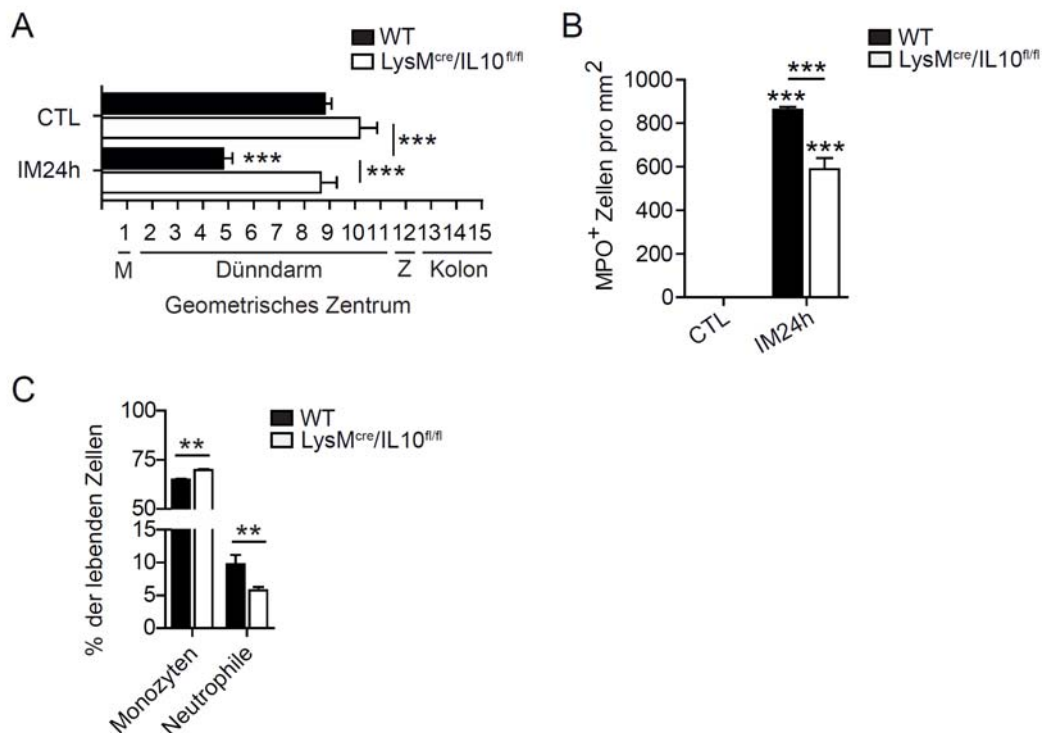


**Abbildung 15:** *IL-10-Defizienz führt zu einer beschleunigten Entzündungsreaktion.* Die Mäuse wurden einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen und anschließend die ME für die folgenden quantitativen Genexpressionsanalysen isoliert und aufgearbeitet: **(A)** der IL-10 induzierten Proteine SOCS3 und Arg1 **(B)** der neutrophilen Chemokine CXCL1/CXCL2 und des monozytären Chemokins CCL2 **(C)** der in der postoperativen ME (IM24h) von LysM<sup>cre</sup>/IL10<sup>fl/fl</sup>-Tieren im Vergleich zu ihren unmanipulierten Kontrollen bzw. WT-Tieren. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von fünf individuellen Experimenten pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels One-way ANOVA und Bonferroni post-test (\*=p<0,05; \*\*=p<0,01; \*\*\*=p<0,001).

### 5.1.6 IL-10 verzögert die Entzündungsauflösung in der Spätphase des POI

Die überschießende Immunreaktion aufgrund der leukozytär-bedingten IL-10 Defizienz legte die Hypothese nahe, dass IL-10 eine Schlüsselrolle in der Auflösung des POI zukommt. Dies sollte funktionell in der Spät- bzw. Auflösungsphase des POI untersucht werden. Überraschenderweise konnten wir eine merkliche Verbesserung der Darmmotilität (p<0,001) 24h nach IM über die Messung des GI-Transits in den LysM<sup>cre</sup>IL-10<sup>fl/fl</sup>-Tieren (GC: 8,6±0,6) im Vergleich zu den WT-Tieren (GC: 4,8±0,4) feststellen, während sich die Werte der

unmanipulierten Tiere nicht unterschieden (**Abbildung 16A**). Ebenfalls zeigte sich eine deutliche Reduktion in der Anzahl der MPO<sup>+</sup>-Leukozyten ( $p < 0,001$ ), die bei etwa 40% 24h postoperativ, lag (**Abbildung 16B**). Diese Ergebnisse konnten in IL-10<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die deutliche Reduktion der MPO<sup>+</sup>-Zellen in der postoperativen ME IL-10-defizienter Tiere warf die Frage auf, ob Neutrophile, Monozyten oder beide im Gewebe reduziert vorliegen, da beide Leukozyten MPO exprimieren (Abbildung 7A+B). Um die prozentuale Zellverteilung der jeweiligen Populationen in der postoperativen ME zu untersuchen, wurden Neutrophile und Monozyten mittels Durchflusszytometrie in LysM<sup>cre</sup>IL-10<sup>fl/fl</sup>-Tieren analysiert und mit der in den WT-Tieren verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion in dem Anteil der Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> Neutrophilen in den LysM<sup>cre</sup>IL-10<sup>fl/fl</sup>-Tieren ( $5,7\% \pm 0,5$ ;  $p < 0,01$ ) im Vergleich zu den WT-Kontrollen ( $9,7\% \pm 1,4$ ), wobei der Anteil an Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup> Monozyten nur leicht zunahm ( $7,4\%$ ;  $p < 0,01$ ) (**Abbildung 16C**).



**Abbildung 16:** IL-10 verzögert die Entzündungsauflösung in der Spätphase des POI. WT- und IL-10-defiziente Mäuse (LysM<sup>cre</sup>/IL10<sup>fl/fl</sup>) wurden einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen und im Anschluss die ME für die nachfolgenden Analysen isoliert und aufgearbeitet. **(A)** Bestimmung des GIT nach der Gabe einer fluoreszierenden Zuckerlösung durch die Berechnung des geometrischen Zentrums von unmanipulierten oder manipulierten LysM<sup>cre</sup>/IL10<sup>fl/fl</sup> im Vergleich zu WT-Tieren. M=Magen; Z=Zökum **(B)** Auszählung der MPO<sup>+</sup> Zellen in der postoperativen ME (IM24h), sowie des Kontrollgewebes von LysM<sup>cre</sup>/IL10<sup>fl/fl</sup> - im Vergleich zu WT-Tieren. Ausgezählt wurden fünf nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Bereiche in präparierten ME whole mounts. Es wurden dieselben Tiere wie in (A) verwendet. **(C)** Durchflusszytometrische Analyse der infiltrierenden Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und Ly6C<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen in LysM<sup>cre</sup>/IL10<sup>fl/fl</sup> - im Vergleich zu WT-Tieren, 24h postoperativ. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf individuellen Experimenten pro Gruppe. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels One-way ANOVA und Bonferroni post-test (\*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ) vs. CTL oder den angegebenen Gruppen.

Zusammenfassend demonstrieren unsere Daten, dass infiltrierende Monozyten und residente ME Makrophagen die Hauptquelle für IL-10 sind, welches eine essentielle Rolle in der postoperativen M2-Polarisierung von infiltrierenden Monozyten spielt. Unter IL-10-Defizienz konnten wir eine verstärkte Entzündungsreaktion in der Frühphase des POI beobachten, was jedoch in der Spätphase zu einer forcierten Auflösungsreaktion führte. Durch die beobachtete Reduktion von Neutrophilen und nicht Monozyten in der Spätphase des POI vermuteten wir, dass die Anzahl Neutrophiler mit der Funktionsstörung der Darmperistaltik korreliert.

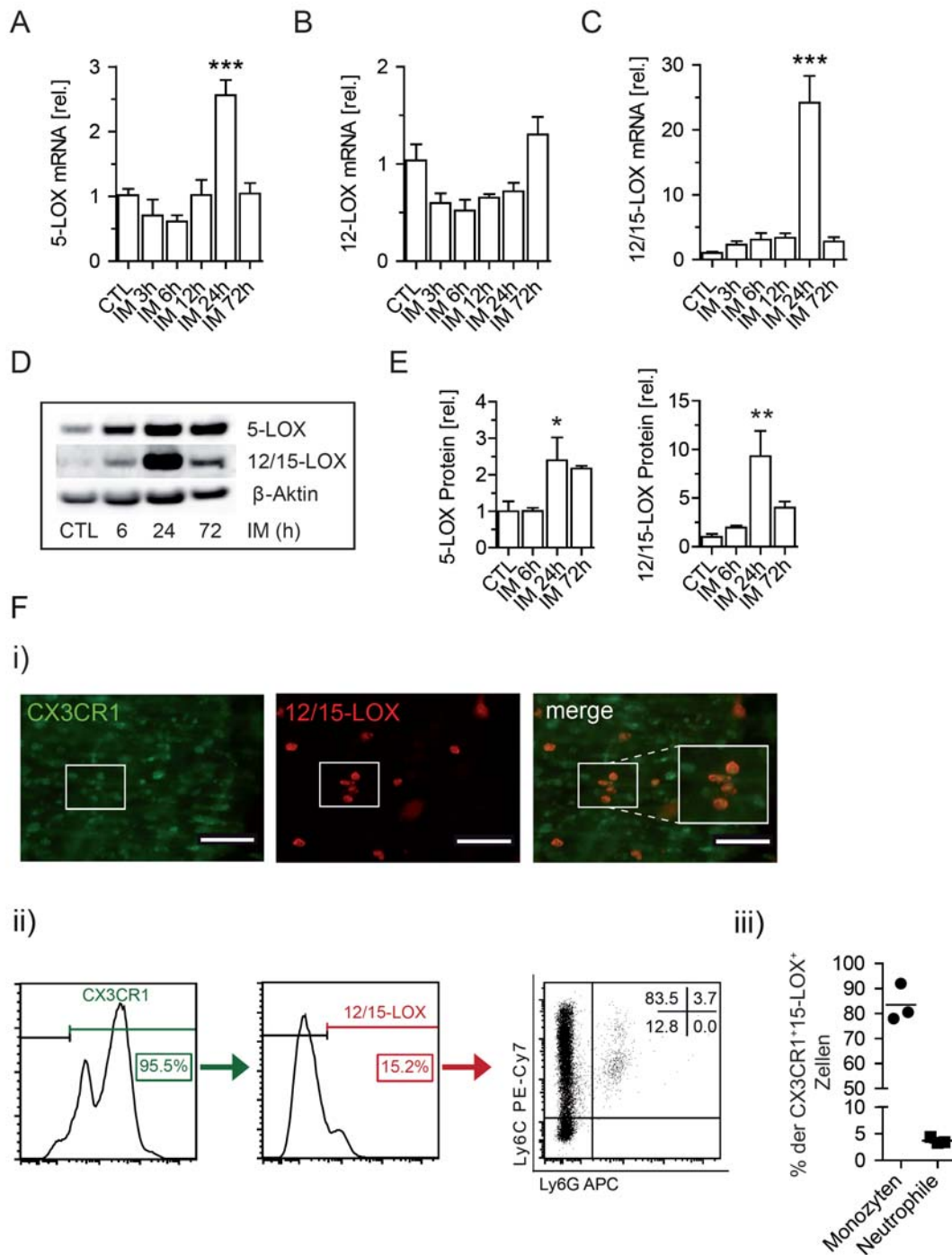
## 5.2 Teil II: Fettsäurederivate sind maßgeblich an der Entzündungsauflösung im POI beteiligt

---

Der zweite Ergebnisteil beschäftigt sich mit dem Einfluss entzündungsauflösender Lipidmediatoren auf den POI. Diese wirken nachweislich unterstützend auf Wundheilungsprozesse und werden sowohl über die 5- als auch die 12/15-LOX generiert [115, 147-149]. Dieses Teilprojekt sollte klären, ob gegenregulatorische Lipidmediatoren in der postoperativen ME nachweisbar sind und ob die gezielte Supplementation dieser präventiv auf die Pathogenese des POI wirkt.

### *5.2.1 Die 12/15-LOX wird überwiegend durch infiltrierende Monozyten in der postoperativen ME exprimiert*

Da die entzündungsauflösenden Lipidmediatoren durch Oxidation der n-3 und n-6 PUFA und weiterer Vorläufermoleküle durch die 5- und 12/15-LOX generiert werden, sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob die Lipoxygenasen in der ME exprimiert werden. Hierfür wurde die ME von naiven sowie manipulierten Mäusen isoliert und die Expression der LOX auf Gen- sowie Proteinebene untersucht. In einer Zeitreihe von über 72h postoperativ konnte eine erhöhte Expression der 5- (2,5-fach; **Abbildung 17A**) und 12/15-LOX (24,2-fach; **Abbildung 17C**) 24h nach Manipulation ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden, nicht jedoch der 12-LOX (**Abbildung 17B**). Die Expressionsmuster der 5- und 12/15-LOX konnten anschließend auf Proteinebene bestätigt werden (**Abbildung 17D**). Zu den untersuchten Zeitpunkten (0h, 6h, 24h und 72h postoperativ) zeigte die densitometrische Analyse der LOX ebenfalls 24h postoperativ die höchste Expression in den ME-Lysaten (**Abbildung 17E**), wobei die 12/15-LOX auch hier deutlich stärker hochreguliert wurde (9,3-fach,  $p < 0,01$ ) im Vergleich zur 5-LOX (2,4-fach,  $p < 0,05$ ). Da die 12/15-LOX überwiegend während des POI exprimiert wird, konzentrierten wir uns in den nachfolgenden Experimenten primär auf die Funktion der 12/15-LOX. Die Expression der 12/15-LOX wurde mittels einer immunohistochemischen Färbung zellulär hauptsächlich in den einwandernden CX3CR1<sup>+</sup>-Leukozyten lokalisiert, die in der postoperativen ME eine typisch runde Zellform annehmen (**Abbildung 17Fi**). In einer zusätzlichen phänotypischen Analyse mittels Durchflusszytometrie konnten diese Zellen als überwiegend CX3CR1<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> Monozyten identifiziert werden (**Abbildung 17Fii**).



**Abbildung 17:** Die 15-LOX wird überwiegend durch infiltrierende Monozyten in der postoperativen ME exprimiert. **(A-C)** WT Mäuse wurden einer standardisierten intestinalen Manipulation (IM) unterzogen und eine quantitative Genexpressionsanalyse der 5-, 12- und 12/15-Lipoxygenase (LOX) zu den angegebenen Zeitpunkten im Vergleich zu naiven Kontrollen durchgeführt. Die Daten setzen sich aus fünf unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  SEM) zusammen. **(D)** Repräsentativer Blot für die Western Blots aus fünf unabhängigen Experimenten. Gezeigt wird die 5- und 12/15-LOX-Expression in der postoperativen ME von WT-Tieren. **(E)** Densitometrische Expressionsanalyse der 5- und 12/15-LOX aus (D) relativiert zu  $\beta$ -Aktin und der Basisexpression (CTL). Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  SEM von fünf unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels One-way ANOVA und Bonferroni post-test (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ). **(F i)** Immunohistochemische Färbung der 12/15-LOX (rot) im whole mount von manipulierten CX3CR1<sup>GFP/+</sup> (grün) Mäusen (IM24h). **ii)** Zusätzliche durchflusszytometrische Analyse der CX3CR1<sup>GFP/+</sup>- Mäuse aus (i) zur Bestimmung der 12/15-LOX-Expression in Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> Monozyten und Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen. Der gezeigte Mikrograph (Maßstab 50 $\mu$ m) als auch die durchflusszytometrischen Analysen (Mittelwert  $\pm$  SEM) setzen sich aus drei unabhängigen Experimenten zusammen.

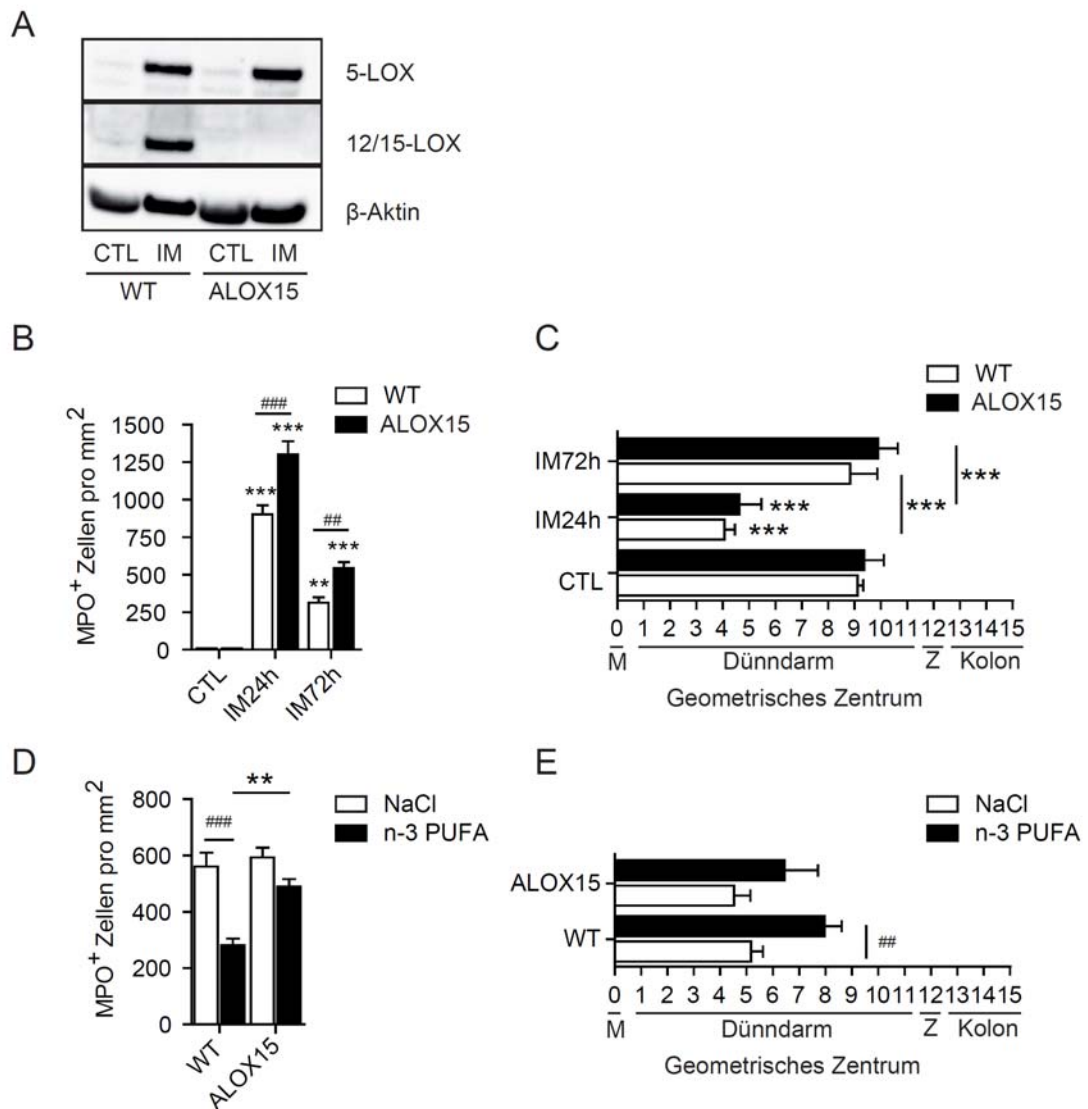
### 5.2.2 Entzündungsauflösende Wirkung von n-3 PUFA im POI ist 12/15-LOX-abhängig

Unsere Daten deuteten auf eine erhöhte leukozytäre 12/15-LOX Aktivität während des POI hin, die uns veranlasste die Rolle der 12/15-LOX in ALOX15- Mäusen, die für die 12/15-LOX defizient sind, zu untersuchen. Zunächst bestätigten wir das fehlende 12/15-LOX-Signal mittels Immunoblotting in unbehandelten als auch intestinal manipulierten ALOX15-Tieren. Im Vergleich dazu blieb das 5-LOX-Signal unverändert (**Abbildung 18A**). Als nächstes sollte untersucht werden, inwieweit sich eine Defizienz der 12/15-LOX auf Funktion und Entzündungsgrad des postoperativen Ileus auswirkt. Hierfür wurden die MPO<sup>+</sup>- Zellen in der postoperativen ME, sowie die Funktion des Darms durch die Berechnung des geometrischen Zentrums bestimmt. Im Vergleich zu WT-Tieren, beobachteten wir allgemein ein erhöhtes Zellinfiltrat, welches bei dem Auszählen der aus der ME herausgelösten Zellen in der Neubauer-Zählkammer (Daten nicht gezeigt) beobachtet wurde. Dieses spiegelte sich ebenfalls in der Bestimmung der MPO<sup>+</sup>-Leukozyten wieder, die vermehrt in die postoperative ME (IM24h;  $p < 0,001$ ) von ALOX15- Mäusen einwanderten und ebenfalls in ihrer Zahl über drei Tage nach IM erhöht blieben (IM72h;  $p < 0,01$ ) (**Abbildung 18B**). Unter Kontrollbedingungen zeigte sich kein Unterschied. Auch funktionell konnte kein Unterschied zwischen den Linien festgestellt werden (**Abbildung 18C**). Die Darmmotilität der ALOX15- Tiere war wie bei den WT- Tieren 24h nach IM stark eingeschränkt, erreichte jedoch drei Tage nach Operation wieder Normwerte.

Eine vorangegangene Studie aus unserer Gruppe konnte eine deutliche Verbesserung des Fettsäureprofils in Ratten, unter anderem der n-3- Fettsäure DHA in zirkulierenden Blutmonozyten durch die parenterale Langzeit-Supplementierung einer Fischölemulsion, reich an n-3 PUFA, feststellen [114]. Die präoperative Gabe der Fischölemulsion über sechs Tage konnte die intestinale Entzündungsreaktion deutlich reduzieren, was sich unter anderem in einer verminderten gastrointestinalen Dysfunktion zeigte. Um eine potentielle Beteiligung der 12/15-LOX und der damit verbundenen endogenen Synthese entzündungsauflösender Lipidmediatoren zu untersuchen, wurden das leukozytäre Infiltrat in ALOX15-Tieren nach sechstägiger präoperativer Gabe einer n-3 PUFA Lösung bestimmt. Die behandelten WT- Tiere zeigten eine signifikante Verringerung des MPO<sup>+</sup>- Leukozyten-Infiltrats sowie eine Verbesserung des GI-Transits (**Abbildung 18E**). Hingegen zeigte die n-3 PUFA Supplementierung in den ALOX15-Tieren keine Veränderung in den bestimmten Parametern (**Abbildung 18D+E**). Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung einer potentiellen Beteiligung der stark in der postoperativen ME exprimierten 12/15-LOX. Ein gezieltes Ausschalten der



12/15-LOX durch die Verwendung von ALOX15-Mäusen demonstrierte die 12/15-LOX-abhängige Metabolisierung und entzündungsauflösende Aktivität von n-3 PUFA.



**Abbildung 18:** Entzündungsauflösende Wirkung von n-3 PUFA im POI ist 12/15-LOX-abhängig. **(A)** WT- Mäuse wurden einer intestinalen Manipulation unterzogen. Proteinexpression der 5- und 12/15-LOX wurde in WT- und ALOX15- Mäusen in der postoperativen (IM) ME im Vergleich zu naiven Kontrollen (CTL) analysiert. Die Blots sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente zu den angegebenen Zeitpunkten. **(B)** Bestimmung der MPO<sup>+</sup>-Zellen in WT- und ALOX15- Tieren zu den postoperativen Zeitpunkten IM24h und IM72h im Vergleich zu naiven Tieren (CTL). Ausgezählt wurden fünf nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Bereiche in präparierten ME whole mounts. **(C)** Bestimmung des GITs (Mittelwert ± SEM) in den Tieren von (B) durch die Berechnung des geometrischen Zentrums nach der Gabe einer fluoreszierenden Zuckerlösung. **(D)** WT und ALOX15 Tiere wurden mit einer DHA-reichen n-3-PUFA oder einem Vehikel (NaCl) über sechs Tage vor IM supplementiert. Die MPO<sup>+</sup>-Zellen wurden 24h nach IM bestimmt und mit den WT- Tieren verglichen. Ausgezählt wurden fünf nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Bereiche in präparierten ME whole mounts. **(E)** Bestimmung des GITs (Mittelwert ± SEM) in den Tieren von (D) durch die Berechnung des geometrischen Zentrums nach der Gabe einer fluoreszierenden Zuckerlösung. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für jeweils fünf unabhängige Experimente, die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels One-way ANOVA und Bonferroni post-test (\*\*=p<0,01; \*\*\*=p<0,001 vs. CTL oder wie gekennzeichnet; ## =p<0,01; ###=p<0,001 vs. WT oder Vehikel). M=Magen, Z=Zökum

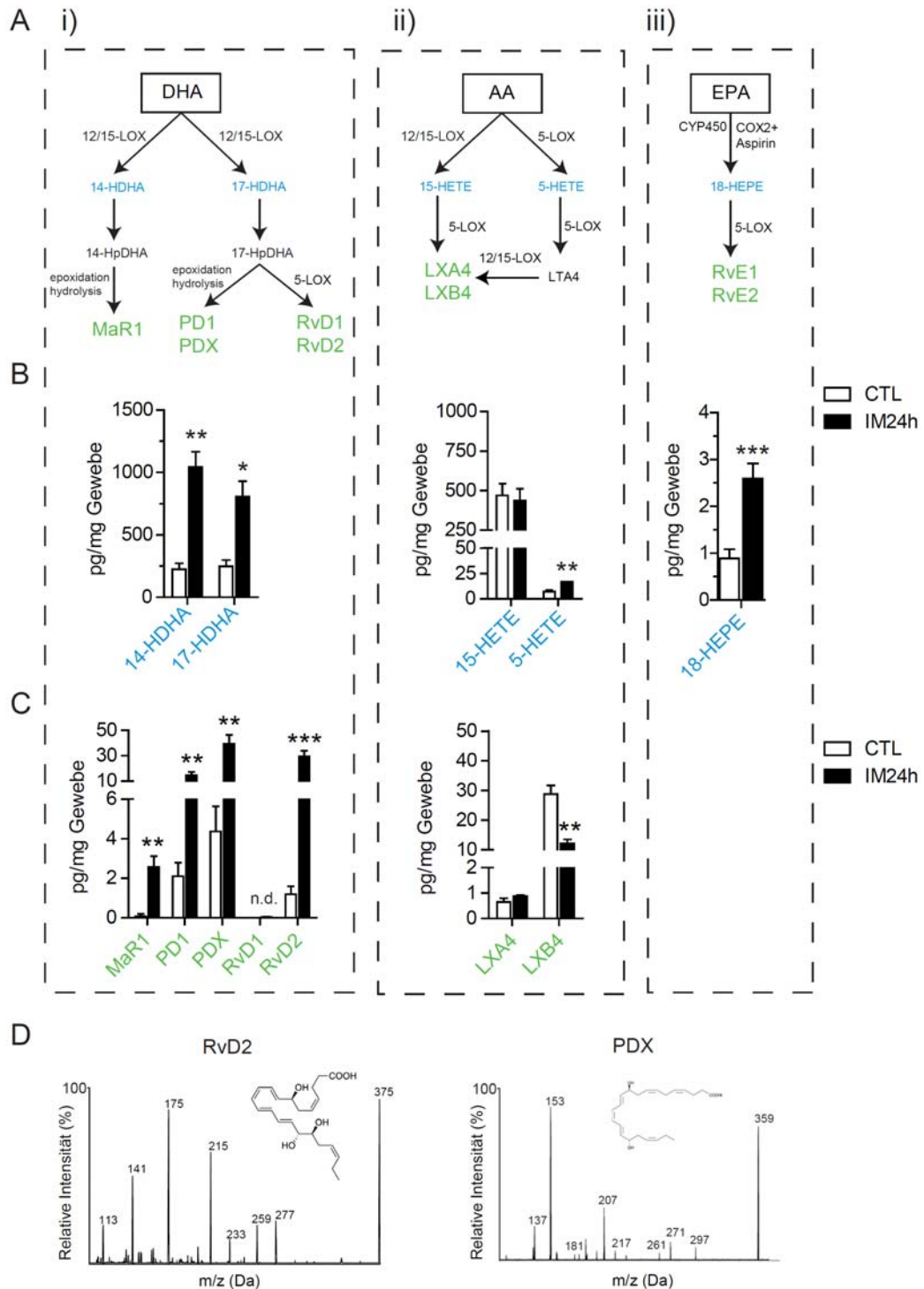
### 5.2.3 Entzündungsauflösende Lipidmediatoren werden vermehrt in der postoperativen ME gebildet

Die Biosynthese der hier untersuchten Lipidmediatoren ist komplex und zum besseren Verständnis sei auf **Abbildung 19Ai-iii** verwiesen, welche eine detaillierte Übersicht der aus den n-6 (AA) und n-3 Fettsäuren (EPA, DHA) metabolisierten Lipidmediatoren (grün) und ihrer Vorläuferprodukte (blau) darstellt, deren Metabolisierung maßgeblich durch die 5- und 12/15-LOX gesteuert wird.

Ziel der nächsten Analysen war es, die in der postoperativen ME generierten Lipidmediatoren zu quantifizieren. Dafür wurden jeweils drei ME-Darmproben von sham-operierten (CTL) sowie intestinal manipulierten WT- Tieren (IM24h) zu einer massenspektrometrischen (LC-MS-MS)-Lipidanalyse an die Firma Ambiotis (Frankreich) gegeben. Dabei zeigte sich bereits in den Kontrollgeweben eine Grundexpression der Lipid-Vorläufermoleküle (**Abbildung 19Bi-iii**). Während des POI stellten wir eine signifikant erhöhte Expression in den Vorläufer 14-HDHA sowie 17-HDHA (**Abbildung 19Bii**), 5-HETE (**Abbildung 19Bii**) und 18-HEPE (**Abbildung 19Biii**) fest, die auf eine Metabolisierung der PUFA DHA, AA und EPA hindeuten. Die Zwischenprodukte 14-HDHA und 17-HDHA der DHA erreichten dabei die höchsten Konzentrationen im postoperativen Gewebe (807 bzw. 1044 pg/mg). Im Vergleich dazu wurden die Zwischenprodukte 5-HETE (17 pg/mg) und 18-HEPE (2,6 pg/mg) nur leicht nach IM hochreguliert. Das aus der AA-metabolisierte Vorläufermolekül 15-HETE war zwar reichlich vorhanden in der ME (436 pg/mg), hingegen veränderte sich seine Expression nicht während des POI. Zeitgleich bestimmten wir die Konzentrationen der aus den PUFA DHA und AA metabolisierten Lipidmediatoren Maresin 1 (MaR1), Protektin D1/DX (PD1/PDX), Resolvin D1/D2 (RvD1/RvD2) sowie der Lipoxine A4/B4 (LXA4/LXB4) (**Abbildung 19Ci+Cii**). Aufgrund der geringen Basislevel des Vorläufers 18-HEPE wurden die Resolvine der E-Klasse nicht weiter analysiert.

Die stärkste Veränderung innerhalb der Analyse der übrigen Lipidmediatoren, wie bereits durch die hohen Konzentrationen der Vorläuferprodukte 14-HDHA und 17-HDHA vermutet, lag in den Endprodukten der PUFA DHA (**Abbildung 19Ci**). Alle Lipidmediatoren der DHA waren in den Geweben der sham-operierten Tiere vorhanden, ausgenommen von RvD1, welches auch nicht während des POI reguliert wurde. Der stärkste Anstieg 24h nach IM konnte in den Lipidmediatoren PD1 ( $14,6 \pm 1,5$ ;  $p < 0,01$ ), seinem Stereoisomer PDX ( $39,5 \pm 4,0$ ;  $p < 0,01$ ) und RvD2 ( $29,5 \pm 2,6$ ;  $p < 0,001$ ) verzeichnet werden (LC-MS/MS-Spektren von RvD2 und PDX sind in **Abbildung 19D** dargestellt). Im Gegensatz dazu konnten in beiden Gruppen nur geringe Level der Lipidmediatoren MaR1 ( $2,6 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ) und LXA4 ( $0,9 \pm 0,04$ ) detektiert werden. Während

die Konzentration von LXA4 unverändert blieb, wurde LXB4 hingegen sogar herunterreguliert in der postoperativen ME ( $12,2 \pm 1,3$ ;  $p < 0,01$ ) (Abbildung 19Cii).



**Abbildung 19:** Entzündungsauflösende Lipidmediatoren sind erhöht in der postoperativen ME. Schematischer Metabolismus der (Ai) DHA (Aii) AA und (Aiii) EPA sind dargestellt. WT- Mäuse wurden einer intestinalen Manipulation (IM24h) bzw. einer sham-OP unterzogen. n=3 Mäuse pro Gruppe. Die ME wurde isoliert für die LC-MS/MS-Analyse, um die Vorläuferlipide (Bi) 14- und 17-HDHA, (Bii) 5- und 15-HETE sowie (Biii) 18-HEPE aus den jeweiligen Fettsäuren DHA, AA und EPA zu identifizieren. (Ci) Lipidmediator-Konzentrationen der Fettsäure DHA und (Cii) AA. (D) Repräsentative MS-MS-Spektren, die für die Identifizierung der DHA-metabolisierten Lipidmediatoren RvD2 und PDX verwendet wurden. Die statistischen Analysen wurden mittels One-way ANOVA und Bonferroni post-test (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ ) vs. CTL durchgeführt. n.d.=nicht detektierbar

Insgesamt zeigte die massenspektrometrische Analyse der ME bereits unter Kontrollbedingungen eine konstante Expression der meisten Lipidmediatoren und ihrer Vorläufermoleküle. Durch die intestinale Manipulation konnte eine Aufregulation ihrer Expression verzeichnet werden, insbesondere der durch die DHA metabolisierten Lipidmediatoren PD1, PDX sowie RvD2.

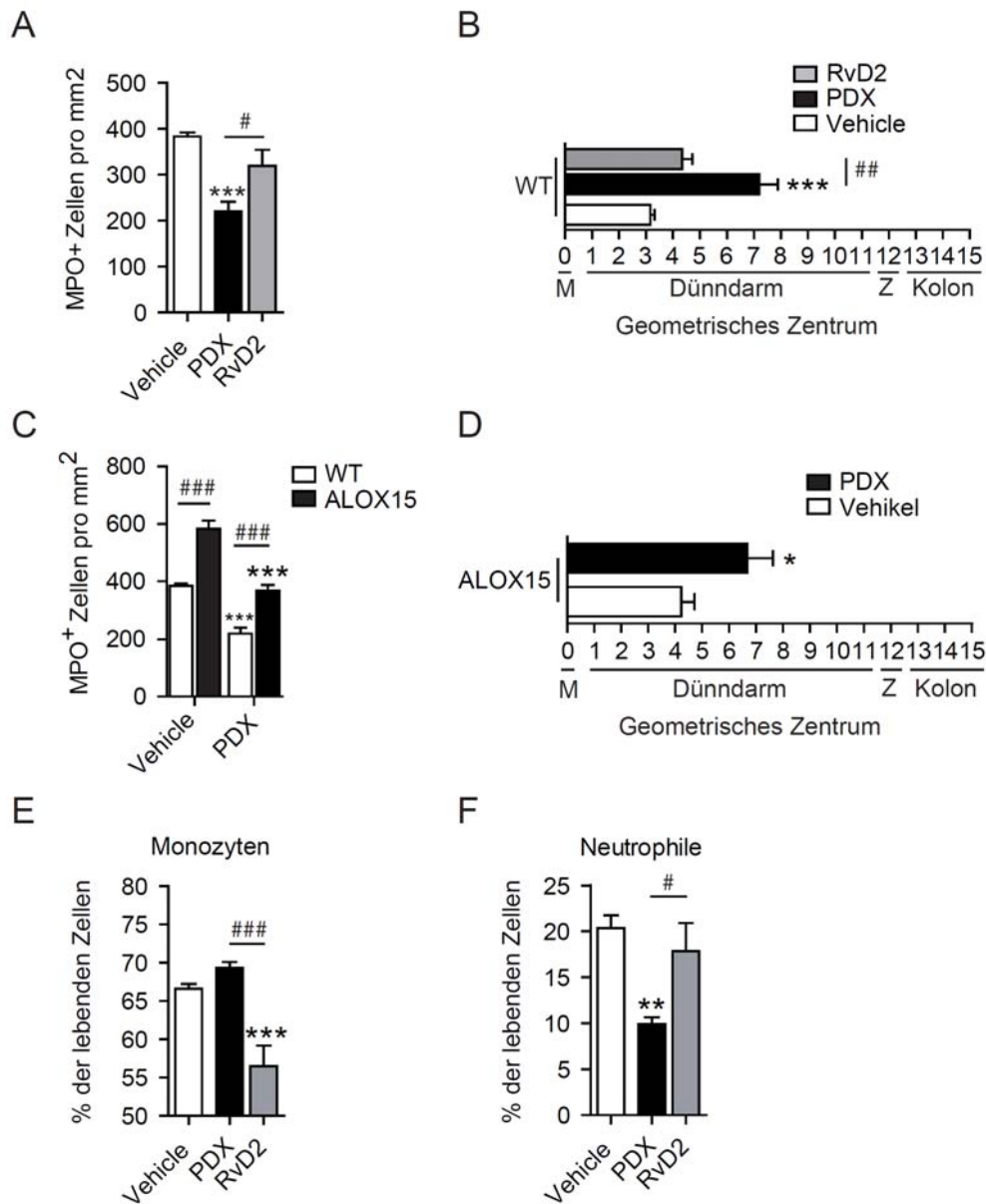
#### *5.2.4 Die exogene Gabe von PDX, nicht aber RvD2 verbessert den POI durch eine Reduktion der Neutrophileninfiltration*

Die vorherigen Analysen der Massenspektrometrie zeigten eine deutliche Erhöhung der PD1-, PDX- und RvD2-Konzentrationen in der postoperativen ME gegenüber den Kontrollen. Da bisweilen nur PDX und RvD2 im Handel frei verfügbar sind, haben wir zunächst ihre präventive Rolle während der Entstehung des POI, durch eine exogene Gabe der Substanzen, überprüft.

PDX-behandelte WT Tiere zeigten in der Tat eine reduzierte Anzahl MPO<sup>+</sup>- Zellen (219±21 Zellen/mm<sup>2</sup>; p<0,001) in der postoperativen ME, während sich die Zelldichte der RvD2-behandelten Tiere nicht veränderte (319±35 Zellen/mm<sup>2</sup>; **Abbildung 20A**) im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren (383±9 Zellen/mm<sup>2</sup>). Dies spiegelte sich ebenfalls in der Bestimmung des intestinalen Transits wieder. Das geometrische Zentrum lag 24h nach IM in den hinteren Dünndarmabschnitten durch die PDX-Behandlung (7,2±0,7; p<0,001; **Abbildung 20B**). Im Gegensatz hierzu zeigte die Behandlung der Tiere mit dem Lipidmediator RvD2 keine Verbesserung (4,3±0,4) verglichen zu den Kontrollen (3,2±0,1).

Anschließend wurde die exogene Supplementierung des Lipidmediators in ALOX15-Mäusen bestätigt. Die PDX-behandelten Tiere zeigten auch hier eine Verringerung der postoperativen MPO<sup>+</sup>- Leukozyten (**Abbildung 20C**) sowie eine Verbesserung des intestinalen Transits (6,7±1; p<0,05; **Abbildung 20D**).

Als nächstes untersuchten wir mit Hilfe der Durchflusszytometrie, ob die Verringerung der MPO<sup>+</sup>- Zellen durch die PDX-Behandlung auf die Reduktion monozytärer oder neutrophiler Leukozyten beruht. Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> Monozyten sind die dominierende Zellpopulation in der postoperativen ME, waren jedoch im Vergleich zu den Vehikel-behandelten WT- Tieren nur geringfügig in ihrer Anzahl durch die Behandlung mit PDX verändert (p<0,05; **Abbildung 20E**). Hingegen konnte die Anzahl Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>- Neutrophiler durch PDX signifikant reduziert werden (p<0,01; **Abbildung 20F**). Im Gegensatz zu PDX, verringerte die RvD2 den prozentualen Anteil der Monozyten, während die Neutrophilen durch die Behandlung unbeeinflusst blieben (**Abbildung 20E+F**). Diese Daten deuten darauf hin, dass die positive Wirkung von PDX durch die Verringerung der Neutrophilenzahl in der postoperativen ME erklärbar ist.



**Abbildung 20:** PDX, nicht jedoch RvD2, verbessert den POI durch die Reduktion der Neutrophilen-Extravasation. **(A)** WT- Mäuse unterliefen einer intestinalen Manipulation (IM24h) und erhielten perioperativ PDX, RvD2 oder ein Vehikel. Die MPO<sup>+</sup>- Zellen in der postoperativen ME von RvD2- oder PDX-behandelten Tieren wurde mit denen der Vehikelgruppe verglichen. Ausgezählt wurden jeweils fünf nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Bereiche in präparierten ME whole mounts. **(B)** Bestimmung des GITs (Mittelwert ± SEM) in den Tieren von (A) durch die Berechnung des geometrischen Zentrums nach der Gabe einer fluoreszierenden Zuckerlösung. **(C)** ALOX15 und WT Mäuse unterliefen einer intestinalen Manipulation sowie einer PDX- oder Vehikel-Behandlung. Die MPO<sup>+</sup>- Zellen wurden 24h postoperativ in der ME bestimmt. Ausgezählt wurden jeweils fünf nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Bereiche in präparierten ME whole mounts. **(D)** Bestimmung des GITs (Mittelwert ± SEM) in den PDX- bzw. Vehikel-behandelten ALOX15-Tieren von (C) durch die Berechnung des geometrischen Zentrums nach der Gabe einer fluoreszierenden Zuckerlösung. **(E+F)** WT-Tiere unterliefen einer intestinalen Manipulation und wurden mit PDX oder Vehikel behandelt. 24h nach IM wurde mittels Durchflusszytometrie die Verteilung von Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>- Monozyten (E) und Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>- Neutrophile (F) in der postoperativen ME analysiert. Die gezeigten Daten sind jeweils repräsentativ für 7 unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mittels One-way ANOVA und Bonferroni post-test oder einem zweiseitigen Student's t-Test. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$  vs. Vehikel und #= $p < 0,05$ ; ##= $p < 0,01$ ; ###= $p < 0,001$  vs. die angegebenen Gruppen. M=Magen, Z=Zökum

Zusammenfassend zeigen die Daten des zweiten Ergebnisteils, dass in die postoperative ME infiltrierende Monozyten die dominierende Zellpopulation sind, sowie die Hauptquelle für die 12/15-LOX darstellen, welche für die Bildung von entzündungsauflösenden Lipidmediatoren verantwortlich ist. Die Auflösung der intestinalen Entzündung umfasst eine erhöhte Aktivität der 12/15-LOX, die unter anderem maßgeblich an der Metabolisierung des Lipidmediators PDX beteiligt ist. Die exogene Behandlung der Mäuse mit PDX konnte aufgrund seiner suppressiven Wirkung auf die Extravasation von Neutrophilen, die Pathogenese des POI deutlich verbessern.

## 6 Diskussion

### 6.1 Teil I: Die Rolle von IL-10 auf die Differenzierung und Chemotaxis infiltrierender Leukozyten im Kontext des POI

---

Residente CX3CR1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>- Gewebsmakrophagen durchziehen die ME als ein dichtes Netzwerk [150] und sind vermutlich für die Aufrechterhaltung der Homöostase verantwortlich, wie unter anderem in der intestinalen Mucosa gezeigt [151]. Im POI konnte durch die gezielte Inhibition und Depletion der ME-Makrophagen ihre Schlüsselfunktion als Wächterzelle herausgestellt werden [48]. Ein mögliches Durchbrechen der Darmbarriere und somit das Übertreten von Bakterien von luminal nach distal wurde bereits als ein möglicher initialer Stimulus für das Auslösen der Immunantwort in residenten Makrophagen der ME diskutiert [152, 153]. Allerdings konnten wir ebenfalls zeigen, dass sich der POI TLR2/4-unabhängig entwickelt und wir deshalb, zumindest im Tiermodell, von einer allein durch den mechanischen Reiz ausgelösten, sterilen Entzündungsreaktion ausgehen [88]. Ebenfalls bereits bekannt war, dass sowohl Monozyten als auch Neutrophile in die manipulierte Darmwand von Nagetier, Schwein und Mensch nach abdominaler Operation einwandern [48, 89]. Obwohl die als Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> identifizierte Neutrophile bereits früh rekrutiert wurden und auch noch an Tag drei nach IM in der ME detektierbar sind, übersteigt der prozentuale Anteil des monozytären Infiltrats den des neutrophilären um etwa das fünf- bis sechsfache. Ihr hoher Anteil sowie ihre lange Beständigkeit in der postoperativen ME (>7 Tage) [39] führte zu der Hypothese, dass die Monozyten eine Schlüsselfunktion in der Entzündungsauflösung einnehmen. Jedoch war bislang ungeklärt, welchen Phänotyp diese Zellen während des POI besitzen. Für diese Fragestellung sollten die Makrophagen der ME unter Homöostase und die rekrutierten Leukozyten unter Entzündung, sowie deren phänotypische Veränderung während des POIs charakterisiert werden.

Unter Verwendung von CX3CR1<sup>GFP/+</sup>-Reportermausen sind deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke des CX3CR1- Rezeptors zu beobachten, welcher überwiegend von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird [68]. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich zwei divergierende Makrophagen-Populationen über die Expression von F4/80, Ly6C und CX3CR1 in der Maus herauszustellen. Unter Homöostase können die gewebständigen Makrophagen als CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CX3CR1<sup>high</sup>F4/80<sup>+</sup> charakterisiert werden und verändern auch nach intestinaler Manipulation ihr Markerprofil nicht (IM6h-IM72h), was sich mit vorherigen

Beobachtungen in der Mukosa deckte [154]. Nach IM infiltrieren überwiegend  $CD45^+CXCR1^{int}$ -Leukozyten in der ME, die während des POIs deutlich dominieren (62%). Während diese Zellen Ly6C langsam verlieren, exprimieren sie zunehmend F4/80 und CX3CR1 während der Auflösungsphase ( $\geq$  IM24h). Drei Tage nach IM zeigen diese aus peripheren Blutmonozyten gereiften Makrophagen den Phänotyp von residenten Gewebsmakrophagen (IM72h) auf, was auf eine Wiederherstellung der Homöostase hindeutet.

Die phänotypischen Veränderungen in der ME spiegeln sich auch in ihrer funktionellen Veränderung wieder. Die durch die Manipulation ausgelöste Extravasation der Leukozyten korreliert mit der gemessenen MPO- Aktivität in der postoperativen ME [52, 155, 156]. Da die MPO-Expression in unserem Modell überwiegend mittels einer Hanker Yates Färbung bestimmt wird, wurde in den früheren Arbeiten von einer alleinigen Expression durch Neutrophile ausgegangen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie zeigen wir im Kontext des POIs, dass MPO nicht nur von infiltrierten Neutrophilen, sondern auch von Monozyten gebildet wird, wie bereits in anderen Krankheitsbildern gezeigt [157-160]. Interessanterweise divergieren die Zellen jedoch in ihrer MPO- Expressionsstärke. Dabei sind mit fast 80% der Großteil der Neutrophilen positiv für MPO, da Monozyten während ihrer Reifung zu Makrophagen in einem abnehmenden Verlauf MPO exprimieren [157]. Jedoch infiltrieren insgesamt um ein vielfaches mehr Monozyten in die postoperative ME, so dass der Großteil der MPO- positiven Zellen infiltrierte Monozyten/Makrophagen sind.

Die Rekrutierung von Monozyten in traumatisiertes Gewebe ist ein entscheidender Punkt in der Immunabwehr. Für eine vollständige Entzündungsauflösung ist der Abzug dieser wiederum ausschlaggebend. Während M1 Makrophagen die Entzündungsantwort durch die Aufnahme und Lyse von Bakterien und Debris initiieren [121, 161], ist der M2 Makrophagen-Phänotyp mit der Phagozytose apoptotischer Zellen (Efferozytose) während der Entzündungsauflösung assoziiert [162, 163]. Obwohl aufgrund der allgemein hohen Phagozytoseaktivität der infiltrierten Monozyten keine Aussage bezüglich ihres genauen Phänotyps zum Analysezeitpunkt getroffen werden kann, wird dennoch die zentrale Rolle der infiltrierten Zellen in der Entzündungsreaktion verdeutlicht.

Anzeichen einer Polarisierung in der postoperativen ME können wir bereits 24h nach intestinaler Manipulation mit einer Hochregulation der prototypischen M2- Marker Arg1 und Ym1, sowie einer erhöhten Arginase Aktivität demonstrieren. Letztere kann überwiegend in den infiltrierten  $F4/80^+Ly6C^{int}CCR2^+$ - Makrophagen detektiert werden. Hierbei stellt der Metabolismus der Aminosäure Arginin durch die Arg1 das Zentrum der M1/M2 Polarisierung dar [164]. Arg1 unterstützt die primäre Funktion von M2 Makrophagen, die der Wundheilung und Geweberestoration [85, 99]. Ob die aus peripheren Blutmonozyten gereiften



Makrophagen zunächst als M1 Makrophagen einwandern und während des POI zu M2 Makrophagen polarisieren oder unabhängig in die ME einwandern und ihr Anteil der proinflammatorischen Fraktion gegenüber überwiegt, muss hier noch ungeklärt bleiben.

In der Literatur werden unterschiedliche Aktivierungsmechanismen in der M2- Polarisierung beschrieben, die jedoch wesentlich über die Zytokine IL-4 und IL-10 gesteuert wird [96, 121]. Während IL-4 überwiegend von Th2-Zellen produziert wird, wird IL-10 sowohl von Zellen des adaptiven als auch des innate Immunsystems exprimiert [165]. Engel et. al demonstrierten eine gleichbleibende Expression lymphozytärer Zytokine, unter anderem von IL-4 und IL-5 in der ME von naiven sowie manipulierten Tieren [166]. Überraschenderweise können wir die vorherige Expression von IL-4- Transkripten in der ME nicht bestätigen, weder in der ME von naiven, noch in der von postoperativen Tieren. Mit der Bestimmung der Arginase Aktivität in IL-4<sup>-/-</sup> Mäusen können wir eine IL-4- unabhängige Polarisierung im POI bestätigen (Daten nicht gezeigt). Allgemein gilt die lang existierende Meinung von Forschern, dass eine Aktivierung von M2 Makrophagen von Signalwegen des adaptiven Immunsystems abhängt, als überholt. Unter anderem konnte in sterilen Wunden eine T-Zell und IL-4- unabhängige M2 Aktivierung mit einem erhöhten Arg1-Expressionsprofil demonstriert werden [167]. Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse in unserem Modell können wir subsumieren, dass IL-4 keine Rolle im POI spielt und die Polarisierung von einem anderen Stimulus, wie IL-10, abhängt [167, 168].

In einer vorherigen Studie von Stoffels et al. konnte bereits eine starke Beteiligung von IL-10 in der Pathogenese des POI demonstriert werden [41]. Dabei zeigten sie, dass die exogene Gabe von IL-10 die Mäuse vor der Ausbildung eines POI bewahrte. Allerdings blieb sowohl die zelluläre Quelle, als auch die endogene Rolle von IL-10 und seine mögliche Beteiligung an der M2- Polarisierung ungeklärt. Durch die Verwendung einer sensitiven IL-10 Reportermaus (ITIB<sup>+/-</sup>) [140], können F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup>- Makrophagen als Hauptquelle von IL-10 in der postoperativen ME identifiziert werden, welche ebenfalls in der Genexpressionsanalyse erhöhte IL-10- Expressionsspiegel demonstrieren.

Die Rekrutierung von Monozyten aus dem Knochenmark in das entzündete Gewebe verläuft überwiegend CCR2-abhängig [63, 169] und kann in unserem Modell durch die Manipulation von CCR2<sup>-/-</sup>- Mäusen validiert werden. In einem nächsten Schritt bestätigen wir die CCR2-abhängige Produktion von IL-10. In manipulierten CCR2<sup>-/-</sup>ITIB<sup>+/-</sup>- Tieren bleibt die Infiltration von F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>int</sup>- Makrophagen aus, die ansonsten für die erhöhten IL-10- Level in der postoperativen ME verantwortlich sind. Übereinstimmend mit den verringerten IL-10- Spiegeln, zeigen sich ebenfalls reduzierte Transkripte der M2- Marker Arg1, Ym1 und IL-10 in den CCR2- defizienten Tieren, was die Hypothese einer IL-10- abhängigen Polarisierung zu M2 Makrophagen unterstützt. Die noch verbleibenden Arg1-, Ym1- und IL-10- Transkripte

stammen vermutlich von CCR2-unabhängig infiltrierte Monozyten bzw. den  $F4/80^+Ly6C^-$ -residenten Makrophagen, die ebenfalls nicht über CCR2 rekrutiert werden [170, 171]. In einer weiteren Analyse können wir zeigen, dass die während des POI rekrutierten Neutrophilen ebenfalls CCR2-unabhängig einwandern (Daten nicht gezeigt). Frühere Studien demonstrierten bereits, dass Neutrophile primär durch residente Gewebsmakrophagen angelockt werden [172, 173]. Die Charakterisierung der IL-10 produzierenden Zellen ergab, dass nur eine kleine Subpopulation der Neutrophilen IL-10 exprimiert, was auf eine unbedeutende Rolle der Neutrophilen in der M2- Polarisierung hindeutet. Im Gegensatz dazu zeigen die residenten ME-Makrophagen bereits im nativen Tier eine basale Expression von IL-10, die vermutlich zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase benötigt wird. Die Notwendigkeit der basalen IL-10- Sekretion wurde bereits in der Lamina propria mucosae gezeigt, die sich spontan entzündet, wenn IL-10 im Gewebe fehlt [107].

Als nächstes sollte die Rolle des endogen exprimierten IL-10 in der M2- Polarisierung sowie in der Pathogenese des POI geklärt werden. Da die Entwicklung der M2 Makrophagen mit der Auflösung einer Entzündung einhergeht, erwarteten wir eine deutliche Verschlechterung des Krankheitsbildes durch eine IL-10 Defizienz in den Tieren. Die Untersuchung der prototypischen M2- Marker- Expression in  $LysM^{cre}IL10^{fl/fl}$ - als auch die ubiquitäre Deletion von IL-10 in  $IL-10^{-/-}$ - Mäusen deutet auch darauf hin. Andere Studien in Krankheitsmodellen von Diabetes oder Colitis Ulcerosa demonstrierten ein Ausbleiben der M2- Polarisierung verursacht durch IL-10 Defizienz [174, 175]. Im Gegensatz dazu ist jedoch das Ergebnis bezüglich der Funktionalität des Darms überraschend. Die IL-10- defizienten Tiere zeigen postoperativ einen verbesserten GIT sowie ein insgesamt deutlich verbessertes Krankheitsbild. Diese Ergebnisse stehen in Konflikt zu der Studie von Stoffels et al., die durch die intraperitoneale Gabe von rekombinantem IL-10 eine verbesserte Kontraktilität des Darms sowie der Transitzeit sahen. Jedoch muss beachtet werden, dass die peritoneale Applikation nicht kontrollierbare, systemische Antworten auslösen kann, während sich unser Knockoutmodell auf die  $LysM^+$ - Leukozyten, das heißt Monozyten, Makrophagen und Neutrophile, konzentriert und somit auf das endogene IL-10 beschränkt. Deshalb sind die beiden Modelle nicht direkt miteinander vergleichbar.

In unserer Studie zeigt sich die Verbesserung des POI in den  $LysM^{cre}IL10^{fl/fl}$ - Mäusen in einer Reduktion des zellulären Anteils an Neutrophilen und nicht Monozyten in der postoperativen ME. Dies deutet darauf hin, dass Neutrophile und nicht Monozyten einen Einfluss auf die Funktionalität des Darms nehmen. Diese Beobachtung deckt sich auch mit unseren Ergebnissen in den CCR2-defizienten Mäusen, die trotz deutlich reduzierter Monozytenzahlen

einen im Vergleich zu WT- Mäusen unverändert verzögerten GIT zeigen. Insgesamt deuten unsere in der Spätphase erhobenen (24h nach Manipulation) zellulären und funktionalen Daten auf einen nachteiligen Effekt des IL-10 auf den POI hin. Jedoch stellten wir uns anschließend die Frage, ob IL-10 auch bereits in der Frühphase des POI eine Rolle spielt (3-6h nach Manipulation). Die hier durchgeführten Analysen zeigen einen großen Einfluss von IL-10 auf den Entzündungsverlauf im POI. Die ermittelten Genexpressionen von IL-6 und IL-1 $\beta$  sind deutlich erhöht in den IL-10- defizienten Tieren im Vergleich zu den WT- Tieren. Ebenfalls maßgeblich hochreguliert wird das Chemokin CXCL1, was als primäres Chemoattraktans für periphere Neutrophile wirkt. Hingegen zeigt MCP-1, welches das zentrale Chemokin für die Rekrutierung der peripheren Monozyten in unserem Modell ist, keine Veränderung in der Expression. Dies deutet darauf hin, dass endogen sezerniertes IL-10 eine überschießende Immunreaktion in der Frühphase des POI verhindert. Dadurch, dass unter IL-10- Defizienz die erste Entzündungsphase zwar übermäßig stark verläuft, zeigt die zweite Phase eine signifikant schnellere Aufhebung der Entzündung sowie der intestinalen Dysmotilität. Erhobene Langzeitwerte sieben Tage nach IM zeigen in den Tieren keinerlei Folgeschäden aufgrund der IL-10- Defizienz (Daten nicht gezeigt). Die erst kürzlich erschienene Studie in einem akuten intestinalen Krankheitsmodell [176] konnte ebenfalls die Bedeutung von Makrophagen-sezerniertem IL-10 in der innate Immunantwort herausstellen, welches die Maus vor einer exzessiven Inflammation schützte.

Trotzdessen das Eingreifen in den IL-10- Signalweg eine mögliche Intervention zur Verbesserung des POI darstellt, muss die Möglichkeit mit großer Vorsicht betrachtet werden. Weitere Arbeiten sind notwendig, um zu klären, ob die IL-10- Defizienz den POI über die Regulation pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine verbessert und somit zur Reduktion von Neutrophilen führt oder sie direkten Einfluss auf die Neutrophilen nimmt. Andere Gruppen konnten bereits einen direkten Einfluss von IL-10 auf den Metabolismus von Neutrophilen hinsichtlich ihrer bakteriziden Wirkung, ihrer Phagozytoseaktivität und ihrer Zytotoxizität demonstrieren [177-180]. Kürzlich erhobene Daten zeigten die Aktivierung von intrazellulär in Granula gespeicherten IL-10- Rezeptoren (IL-10R) über die Stimulation der Neutrophilen mit LPS oder Zytokinen, wie TNF $\alpha$  und GM-CSF (engl. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) [181]. Da bereits frühere Studien unserer Gruppe einen Anstieg der genannten Zytokine im Modell des POI beobachten konnten [32, 41], wäre ein direkter Stimulus durch IL-10 auf die Effektorfunktion in Neutrophilen denkbar.

Abschließend deuten unsere Daten darauf hin, dass IL-10 aufgrund einer kontinuierlichen Ausschüttung durch die residenten Makrophagen an der Regulation der Homöostase in der ME

beteiligt ist. Da diese Makrophagen ebenfalls den IL-10R (Daten nicht gezeigt) tragen, vermuten wir eine autokrin gesteuerte IL-10- Stimulation der Zellen. Generell ist bekannt, dass das Binden von IL-10 an seinen Rezeptor den STAT3- Signalweg aktiviert, welcher ausschlaggebend für die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10 in myeloiden Zellen ist [182, 183]. Diese Daten wurden erst kürzlich durch eine Studie von Zigmond et al. unterstützt, die eine entscheidende Rolle für IL-10 und seinen Rezeptor während der Homöostase in der intestinalen Mukosa zeigen konnten. Im Falle einer Dysfunktion des IL-10R wird ein pro-inflammatorischer Phänotyp in den gewebständigen Makrophagen generiert [184].

Zusammenfassend liefern unsere Studienergebnisse einen neuen Einblick in die Funktion von IL-10 im Kontext des POI. IL-10 wird von residenten Makrophagen exprimiert und ist vermutlich ein entscheidender Faktor in der Aufrechterhaltung der Homöostase und dem Verhindern exzessiver Entzündungsreaktionen. Nach intestinaler Manipulation zeigten sich aus peripheren Blutmonozyten gereifte Makrophagen als die Hauptproduzenten von IL-10 und Initiatoren der autokrin-gesteuerten M2- Polarisierung. Die Deletion von IL-10 in Leukozyten resultiert insgesamt in eine Verbesserung des POI. Wir vermuten hierbei eine zunächst überschießende Entzündungsreaktion in der Frühphase des POI, welche dann zu einem beschleunigten Entzündungsverlauf führt und in der Spätphase des POI bereits stark vermindert bzw. abgeschlossen ist. Verglichen mit vorherigen Ergebnissen, die benefizielle Effekte im POI durch die exogene Gabe von IL-10 zeigten, konnten wir herausarbeiten, dass endogenes IL-10 protektiv auf das erste Aufflammen der Entzündung wirkt und ein Überhandnehmen der Entzündung im POI verhindert. Jedoch wird diese kontrollierte Immunantwort von einer verzögerten Auflösung und Aufhebung der Dysmotilität begleitet. Zur Unterstützung unserer Hypothese könnte ein Folgeexperiment sein, die Rolle des IL-10R sowohl auf residenten Makrophagen, als auch auf Neutrophilen zu untersuchen. Spezifische Knockoutmodelle könnten zum einen untersuchen, ob die Aufrechterhaltung der Homöostase in der ME über einen autokrinen Mechanismus verläuft. Zum anderen, ob Neutrophile Granulozyten im Kontext des POI den IL-10R exprimieren und ob sie über diesen in einem direkten Mechanismus durch IL-10 aktiviert werden.

## 6.2 Teil II: Fettsäurederivate sind maßgeblich an der Entzündungsauflösung im POI beteiligt

---

Ein weiterer Schwerpunkt der Studie war die Beteiligung von Lipidmediatoren an der Entzündungsauflösung im POI. Allgemein spielen Lipidmediatoren eine Schlüsselrolle in der Entstehung sowie der Auflösung einer Entzündung [185]. Im POI konnte bereits in früheren Studien eine Beteiligung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) festgestellt werden, welche nach der Manipulation des Darms stark erhöht transkribiert wird und für die enzymatische Bildung von pro-inflammatorischen Prostaglandinen verantwortlich ist [53]. Ein weiteres wichtiges Enzym, das durch die Umsetzung der n-6-Fettsäure AA zur Bildung pro-inflammatorischer Lipidmediatoren wie Leukotriene führt, ist die 5-Lipoxygenase (5-LOX). Durch gezielte genetische Depletion der COX-2 und der 5-LOX (Daten nicht gezeigt) ließen sich die Entzündungsprozesse im POI deutlich abmildern. Dies betraf zum einen die zellulären Prozesse in der ME, zum anderen eine verbesserte Funktion der Glattmuskelfunktion und der Darmmotilität [53]. Im Gegensatz zu den pro-inflammatorischen Lipidmediatoren war eine eventuelle Beteiligung anti-inflammatorischer Lipidmediatoren während des POI noch gänzlich unerforscht. In dieser Studie konnten wir zum ersten Mal eine Beteiligung von PUFA-generierten anti-inflammatorischen Lipidmediatoren in der Entzündungsauflösung des POI demonstrieren.

Während die 12/15-LOX nur gering in der ME von naiven Tieren exprimiert wird, wird sie im postoperativen Zeitverlauf in ihrer Expression deutlich hochreguliert, was auf eine mögliche Rolle in der Pathogenese des POI schließen lässt. Im Gegensatz dazu wird die 5-LOX in unbehandelten Tieren zwar detektiert, zeigt im postoperativen Zeitverlauf jedoch nur eine geringe Hochregulation. Dies deutete auf eine überwiegende Rolle in der Homöostase und weniger in der Pathogenese des POI hin. Die thrombozytäre 12-LOX hingegen zeigt keine Veränderung in ihrer Genexpression und scheint deshalb keine definierte Rolle im POI zu übernehmen. Durch die Charakterisierung der 12/15-LOX exprimierenden Zellen in CX3CR1<sup>GFP/+</sup>-Mäusen können wir den Großteil der 12/15-LOX in CX3CR1<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>-Monozyten lokalisieren. Eine kleine Population Ly6G<sup>+</sup>-Neutrophile ist ebenfalls positiv für CX3CR1 sowie die 12/15-LOX. Diese Entdeckung ist konträr zu früheren Studien, in denen berichtet wurde, dass Neutrophile die 5-LOX, jedoch nicht die 12/15-LOX exprimieren [186, 187].

Unsere Ergebnisse ließen uns vermuten, dass eine endogene Defizienz der 12/15-LOX und somit der daraus resultierenden, 12/15-LOX metabolisierten, entzündungsauflösenden Lipidmediatoren folglich zu einer prolongierten Entzündung der ME führen würde. Diese Hypothese wurde in ALOX15-Mäusen untersucht, welche postoperativ erhöhte

Leukozytenzahlen und eine vermehrte MPO-Expression zeigen, die auf eine verstärkte Entzündungsreaktion hindeuten. Funktionell, gemessen an der postoperativen Transitzeit, ist jedoch kein Unterschied zwischen den WT- und ALOX15- Tieren erkennbar. Unserer Einschätzung nach sind die Diskrepanz eines erhöhten Leukozyten- Infiltrats und die Bestimmung des Ausmaßes der Motilitätsstörung als technische Grenze des Messbaren zu werten. Die stärkere Infiltration der Zellen hat vermutlich keine weitere Auswirkung auf die intestinale Dysmotilität.

In vorherigen Arbeiten unserer Gruppe zeigte sich bereits eine Anreicherung des 12/15-LOX- Substrates DHA in zirkulierenden Blutmonozyten durch die mehrtägige parenterale Supplementierung einer DHA-angereicherten n-3 PUFA- Emulsion [114]. In dieser Studie sollte nun getestet werden, ob die Gabe von n-3 PUFA in ALOX15- Mäusen zu einem Ausbleiben des protektiven Effekts führt. In der Tat können wir in den WT- Tieren eine Verminderung der postoperativen Entzündung der ME durch die n-3 PUFA Gabe bestätigen, nicht jedoch in den ALOX15- Tieren. Diese zeigen trotz präoperativer Behandlung eine hohe Leukozytendichte, die vergleichbar ist mit der von unbehandelten WT- Tieren. Diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle des 12/15-LOX- abhängigen Metabolismus der DHA in der Entzündungsauflösung des POI hin.

Für eine detailliertere Untersuchung der entzündungsauflösenden Mechanismen während des POI, haben wir die Konzentrationen der in der Entzündungsauflösung generierten Lipidmediatoren bestimmt. Die durch die Enzyme COX-2 und 5-LOX bestimmte Metabolisierung der n-3 Fettsäure EPA resultiert in den Resolvinen der Klasse E, RvE1 und RvE2 [188]. Beide Resolvine konnten bereits in einem murinen Peritonitismodell in der Peritonealflüssigkeit als entzündungsregulierende Mediatoren identifiziert werden, durch welche unter anderem die endotheliale Transmigration sowie die Wanderung von Neutrophilen zum Entzündungsherd unterdrückt werden konnte [124, 136, 137, 189]. In unserem Modell scheinen diese jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen. Ihr Vorläufermolekül 18-HEPE ist sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in der postoperativen ME nur in sehr niedrigen Konzentrationen detektierbar, die etwa 300-fach unter denen der Vorläufermoleküle 14- und 17-HDHA liegen, welche aus der n-3 PUFA DHA generiert werden. Jedoch können wir die Präsenz von RvE1 und RvE2 nicht komplett ausschließen, da die internen Standards für die massenspektrometrischen Analysen noch nicht kommerziell erhältlich waren.

Ein anderes Expressionsmuster zeigte sich hingegen in den DHA-stämmigen Lipidmediatoren. Die analysierten Lipidmediatoren MaR1, PDX, PD1, und RvD2 sind detektierbar sowie deutlich hochreguliert in der postoperativen ME im Vergleich zum Kontrollgewebe. Die einzige

Ausnahme bildet RvD1, welches in der ME nicht gebildet wird. Dies wurde bereits in anderen intestinalen Entzündungsmodellen beobachtet [142, 190]. Der höchste Konzentrationsanstieg in der postoperativen ME zeigt sich in den Mediatoren RvD2 und PDX, wobei ihr Anstieg mit der Präsenz ihrer Vorläufermoleküle 14- und 17-HDHA korreliert. Hohe Spiegel dieser Vorläufermoleküle sind geeignete Biomarker für die Aktivierung der Biosynthese der Maresine und Resolvine [126]. Im Vergleich zu anderen Entzündungsmodellen, in denen die Expression von 14- und 17-HDHA in der kompletten Darmwand von Dünndarm und Kolon bestimmt wurde, ist die basale Produktion der ME zwar geringer, steigt jedoch postoperativ stärker an (~3,5-fach) als z.B. in einem Modell der Ischämie/Reperfusion (~1,8-fach) [190] bzw. der bakteriellen Infektion (~1,3-fach) [142]. Jedoch muss beachtet werden, dass Lipidmediatoren sehr flüchtige Substanzen sind und die Menge innerhalb der massenspektrometrischen Analyse stark variiert [119, 191].

Interessant ist ebenfalls das Ergebnis der Bestimmung der Lipidmediatoren der n-6 PUFA AA. Während in den Vorläufermolekülen kein Unterschied (15-HETE) zwischen Kontroll- und manipuliertem Gewebe bzw. nur ein geringer Anstieg (5-HETE) während des POI zu verzeichnen ist, zeigt LTB<sub>4</sub> sogar verringerte Level in der postoperativen ME. LXA<sub>4</sub> bleibt hingegen unverändert. Dies ist sehr konträr zu den Ergebnissen anderer Mausmodelle wie z.B. der Peritonitis [142] oder der intestinalen Ischämie/Reperfusion [190], wo die Expression insbesondere von LXA<sub>4</sub> während der Entzündung deutlich erhöht war. Daraus schlussfolgern wir, dass sich die einzelnen Lipidmediatoren je nach Krankheitsbild oder Symptomatik spezifisch zusammensetzen und unterschiedlich in der Entzündungsauflösung agieren.

Als nächstes untersuchten wir die funktionelle Rolle von RvD2 und PDX während des POI. Unsere Daten zeigen hierbei, dass die exogene Gabe von PDX, nicht jedoch RvD2 Einfluss auf die Rekrutierung von Neutrophilen in die manipulierte ME und somit auf die Modulierung der Darmmotilität nimmt. Da Monozyten/Makrophagen an der Bildung anti-inflammatorischer Lipidmediatoren maßgeblich beteiligt sind, könnten die Effekte von RvD2 auf diese Zellpopulation als Gegenspieler zu PDX gesehen werden, um eine ausgewogene Balance herzustellen. Zusätzlich könnte RvD2 an der Modulierung monozytärer Prozesse beteiligt sein, die nicht die Darmmotilität betreffen, jedoch ebenfalls entscheidend für die Entzündungsauflösung sind. Ergebnisse anderer Forschergruppen unterstützen unsere Theorie bezüglich der Wirkung von PDX. Eine kürzlich erschienene Studie konnte eine verringerte ROS-Produktion sowie MPO-Freisetzung in humanen Neutrophilen durch die Behandlung der Zellen mit PDX feststellen [192]. Auch sein Stereoisomer, PD1, konnte in einem Peritonitis-Mausmodell die Infiltration von Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten unterdrücken

[127]. Zusätzlich können wir durch die Verabreichung von PDX in ALOX15- Mäusen die gegenregulatorische Wirkung von PDX im Modell des POI untermauern. Mögliche Wirkmechanismen an der Zielzelle müssen jedoch noch unklar bleiben, da potentiell beteiligte Rezeptoren und intrazelluläre Signalwege noch unerforscht sind. Im Gegensatz zu PDX oder PD1 wurden für LXA4, RvE1 und RvD1 bereits spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie ChemR23, FPRL1 (ALX/FPR2) und GPR32 entdeckt, welche die Lipidmediatoren binden und anti-inflammatorische Signalwege aktivieren [138, 193-195].

Weitere Studien sind notwendig, welche die einzelnen Lipidmediatoren in der Pathogenese des POI adressiert. Denn nur weil RvD2 nicht die Infiltration der Neutrophilen beeinflusst, bedeutet dies nicht, dass es nicht andere gegenregulatorische Aufgaben in der Auflösung des POI übernimmt, wie bereits in anderen Studien gezeigt [196-198]. MaR1, welches ebenfalls während des POI in seiner Expression hochreguliert wird, ist ein weiterer interessanter Kandidat. Erst kürzlich erschienene Daten in Modellen der akuten Lungenentzündung, Kolitis und Gewebsregeneration stellten die homöostatische und protektive Wirkung von MaR1, das von Makrophagen exprimiert wird, heraus [199-201].

Aufgrund der sehr aufwendigen und teuren organischen Synthese natürlich vorkommender Lipidmediatoren, wird zunehmend an der Herstellung chemisch stabiler Mimetika geforscht [202, 203]. RvE1 befindet sich unter anderem in der Phase III einer klinischen Studie (Trockenes-Auge-Syndrom), während PD1 und MaR1 sich in der klinischen Entwicklung befinden [191]. Im Kontext der Behandlung oder Prävention des POI müsste noch geklärt werden, wann der effektivste Zeitpunkt der Gabe wäre oder ob sogar eine mehrfache Gabe, z.B. über eine intraoperativ gelegte Drainage, sinnvoll wäre, da die Mediatoren lokal verabreicht werden sollten.

Zusammenfassend können wir durch unsere Ergebnisse eine bis dato noch unbekannte Rolle von entzündungsauflösenden Lipidmediatoren im Kontext des POI, insbesondere seiner anti-inflammatorischen Phase, herauskristallisieren. Der ausgehend von der n-3- Fettsäure DHA generierte Lipidmediator PDX nimmt in unserem Modell vermutlich einen direkten Einfluss auf die Extravasation peripherer Neutrophile, was im Gegenzug die Aufhebung der Dysmotilität positiv beeinflusst. Unsere Ergebnisse weisen damit einen neuen potentiellen Therapieansatz in der Behandlung des POI auf, der über den 12/15-LOX- Signalweg bzw. den Lipidmediator PDX gesteuert werden kann.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Schmidt, R. F., Lang, Florian, Heckmann, Manfred (2011) Physiologie des Menschen.
2. Kalff, J. C., Schwarz, N. T., Walgenbach, K. J., Schraut, W. H., Bauer, A. J. (1998) Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. *Journal of leukocyte biology* 63, 683-91.
3. Mikkelsen, H. B. and Rumessen, J. J. (1992) Characterization of macrophage-like cells in the external layers of human small and large intestine. *Cell Tissue Res* 270, 273-9.
4. Bain, C. C. and Mowat, A. M. (2014) Macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Immunological reviews* 260, 102-17.
5. Mikkelsen, H. B. (1995) Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines. *Histology and histopathology* 10, 719-36.
6. Hori, M., Kita, M., Torihashi, S., Miyamoto, S., Won, K. J., Sato, K., Ozaki, H., Karaki, H. (2001) Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 280, G930-8.
7. Mikkelsen, H. B. (2010) Interstitial cells of Cajal, macrophages and mast cells in the gut musculature: morphology, distribution, spatial and possible functional interactions. *Journal of cellular and molecular medicine* 14, 818-32.
8. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., Merad, M. (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-5.
9. Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., Choy, S. H., Grisotto, M., Renia, L., Conway, S. J., Stanley, E. R., Chan, J. K., Ng, L. G., Samokhvalov, I. M., Merad, M., Ginhoux, F. (2012) Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine* 209, 1167-81.
10. Parwaresch, M. R. and Wacker, H. H. (1984) Origin and kinetics of resident tissue macrophages. *Parabiosis studies with radiolabelled leucocytes. Cell and tissue kinetics* 17, 25-39.
11. Sawyer, R. T., Strausbauch, P. H., Volkman, A. (1982) Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 46, 165-70.
12. Delaney CP, K. H., Senagore AJ, Bauer AJ, Beart R, Billingham R, Coleman RL, Dozois EJ, Leslie JB, Marks J, Megibow AJ, Michelassi F, Steinbrook RA. (2006) Clinical Consensus Update in General Surgery: Postoperative Ileus: Profiles, Risk Factors, and Definitions-A Framework for Optimizing Surgical Outcomes in Patients Undergoing Major Abdominal and Colorectal Surgery. *Clinical Consensus Update in General Surgery [Consensus statement]* 2006 [cited 12-01-2009]. Available from: URL: <http://www.clinicalwebcasts.com>.
13. Luckey, A., Livingston, E., Tache, Y. (2003) Mechanisms and treatment of postoperative ileus. *Arch Surg* 138, 206-14.
14. Parvizi, J., Han, S. B., Tarity, T. D., Pulido, L., Weinstein, M., Rothman, R. H. (2008) Postoperative ileus after total joint arthroplasty. *The Journal of arthroplasty* 23, 360-5.
15. Rusinak, J. and Winstead, P. S. (2007) Pharmacologic management of postoperative ileus. *Orthopedics* 30, 25-8.

16. Van Noord, B. A., Roffey, P., Thangathurai, D. (2013) Abdominal compartment syndrome following opioid-induced postoperative ileus. *Journal of clinical anesthesia* 25, 146-9.
17. Resnick, J., Greenwald, D. A., Brandt, L. J. (1997) Delayed gastric emptying and postoperative ileus after nongastric abdominal surgery: part II. *The American journal of gastroenterology* 92, 934-40.
18. Resnick, J., Greenwald, D. A., Brandt, L. J. (1997) Delayed gastric emptying and postoperative ileus after nongastric abdominal surgery: part I. *The American journal of gastroenterology* 92, 751-62.
19. Vather, R., O'Grady, G., Bissett, I. P., Dinning, P. G. (2014) Postoperative ileus: mechanisms and future directions for research. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 41, 358-370.
20. Augestad, K. M. and Delaney, C. P. (2010) Postoperative ileus: impact of pharmacological treatment, laparoscopic surgery and enhanced recovery pathways. *World journal of gastroenterology : WJG* 16, 2067-74.
21. Bauer, A. J. and Boeckxstaens, G. E. (2004) Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 16 Suppl 2, 54-60.
22. Tache, Y., Monnikes, H., Bonaz, B., Rivier, J. (1993) Role of CRF in stress-related alterations of gastric and colonic motor function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 697, 233-43.
23. Sarna, S. K. and Otterson, M. F. (1990) Small intestinal amyogenesis and dysmyogenesis induced by morphine and loperamide. *The American journal of physiology* 258, G282-9.
24. Boeckxstaens, G. and de Jonge, W. (2009) Neuroimmune mechanisms in postoperative ileus. *Gut* 58, 1300-1311.
25. Miedema, B. W. and Johnson, J. O. (2003) Methods for decreasing postoperative gut dysmotility. *The lancet oncology* 4, 365-72.
26. Boeckxstaens, G. E., Hirsch, D. P., Kodde, A., Moojen, T. M., Blackshaw, A., Tytgat, G. N., Blommaert, P. J. (1999) Activation of an adrenergic and vagally-mediated NANC pathway in surgery-induced fundic relaxation in the rat. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 11, 467-74.
27. Barquist, E., Bonaz, B., Martinez, V., Rivier, J., Zinner, M. J., Tache, Y. (1996) Neuronal pathways involved in abdominal surgery-induced gastric ileus in rats. *The American journal of physiology* 270, R888-94.
28. Sagrada, A., Fargeas, M. J., Bueno, L. (1987) Involvement of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in the postlaparotomy intestinal motor disturbances in the rat. *Gut* 28, 955-9.
29. The, F. O., de Jonge, W. J., Bennink, R. J., van den Wijngaard, R. M., Boeckxstaens, G. E. (2005) The ICAM-1 antisense oligonucleotide ISIS-3082 prevents the development of postoperative ileus in mice. *British journal of pharmacology* 146, 252-8.
30. Bueno, L., Fioramonti, J., Ruckebusch, Y. (1978) Postoperative intestinal motility in dogs and sheep. *The American journal of digestive diseases* 23, 682-9.
31. Kalff, J., Schraut, W., Simmons, R., Bauer, A. (1998) Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Annals of surgery* 228, 652-663.
32. Kalff, J. C., Turler, A., Schwarz, N. T., Schraut, W. H., Lee, K. K., Twardy, D. J., Billiar, T. R., Simmons, R. L., Bauer, A. J. (2003) Intra-abdominal activation of a local inflammatory response within the human muscularis externa during laparotomy. *Ann Surg* 237, 301-15.

33. The, F. O., Bennink, R. J., Ankum, W. M., Buist, M. R., Busch, O. R., Gouma, D. J., van der Heide, S., van den Wijngaard, R. M., de Jonge, W. J., Boeckxstaens, G. E. (2008) Intestinal handling-induced mast cell activation and inflammation in human postoperative ileus. *Gut* 57, 33-40.
34. De Winter, B. Y. and De Man, J. G. (2010) Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: effect on gastrointestinal motility. *World journal of gastroenterology : WJG* 16, 5523-35.
35. Wehner, S., Vilz, T. O., Stoffels, B., Kalff, J. C. (2012) Immune mediators of postoperative ileus. *Langenbecks Arch Surg* 397, 591-601.
36. de Jonge, W. J., The, F. O., van der Coelen, D., Bennink, R. J., Reitsma, P. H., van Deventer, S. J., van den Wijngaard, R. M., Boeckxstaens, G. E. (2004) Mast cell degranulation during abdominal surgery initiates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 127, 535-45.
37. Gomez-Pinilla, P. J., Farro, G., Di Giovangiulio, M., Stakenborg, N., Nemethova, A., de Vries, A., Liston, A., Feyerabend, T. B., Rodewald, H. R., Boeckxstaens, G. E., Matteoli, G. (2014) Mast cells play no role in the pathogenesis of postoperative ileus induced by intestinal manipulation. *PLoS one* 9, e85304.
38. Kalff, J. C., Schraut, W. H., Simmons, R. L., Bauer, A. J. (1998) Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Annals of surgery* 228, 652.
39. Kalff, J., Buchholz, B., Eskandari, M., Hierholzer, C., Schraut, W., Simmons, R., Bauer, A. (1999) Biphasic response to gut manipulation and temporal correlation of cellular infiltrates and muscle dysfunction in rat. *Surgery* 126, 498-509.
40. Isenmann R., H.-B. D. (2013) *Ileus*. Springer Berlin Heidelberg. pp 399-405.
41. Stoffels, B., Schmidt, J., Nakao, A., Nazir, A., Chanthaphavong, R., Bauer, A. (2009) Role of interleukin 10 in murine postoperative ileus. *Gut* 58, 648-660.
42. Eskandari, M. K., Kalff, J. C., Billiar, T. R., Lee, K. K., Bauer, A. J. (1997) Lipopolysaccharide activates the muscularis macrophage network and suppresses circular smooth muscle activity. *The American journal of physiology* 273, G727-34.
43. Fabriek, B. O., van Bruggen, R., Deng, D. M., Ligtenberg, A. J., Nazmi, K., Schornagel, K., Vloet, R. P., Dijkstra, C. D., van den Berg, T. K. (2009) The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* 113, 887-92.
44. Flores-Langarica, A., Meza-Perez, S., Calderon-Amador, J., Estrada-Garcia, T., Macpherson, G., Lebecque, S., Saeland, S., Steinman, R. M., Flores-Romo, L. (2005) Network of dendritic cells within the muscular layer of the mouse intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 19039-44.
45. Muller, P. A., Kosco, B., Rajani, G. M., Stevanovic, K., Berres, M. L., Hashimoto, D., Mortha, A., Leboeuf, M., Li, X. M., Mucida, D., Stanley, E. R., Dahan, S., Margolis, K. G., Gershon, M. D., Merad, M., Bogunovic, M. (2014) Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility. *Cell* 158, 300-13.
46. Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L. D., Nishikawa, S. (1990) The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 345, 442-4.
47. Mikkelsen, H. B. and Thuneberg, L. (1999) Op/op mice defective in production of functional colony-stimulating factor-1 lack macrophages in muscularis externa of the small intestine. *Cell Tissue Res* 295, 485-93.
48. Wehner, S., Behrendt, F., Lyutenski, B., Lysson, M., Bauer, A., Hirner, A., Kalff, J. (2007) Inhibition of macrophage function prevents intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Gut* 56, 176-185.

49. Bauer, A. J. (2008) Mentation on the immunological modulation of gastrointestinal motility. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 20 Suppl 1, 81-90.
50. Torihashi, S., Ozaki, H., Hori, M., Kita, M., Ohta, S., Karaki, H. (2000) Resident macrophages activated by lipopolysaccharide suppress muscle tension and initiate inflammatory response in the gastrointestinal muscle layer. *Histochemistry and cell biology* 113, 73-80.
51. Turler, A., Schnurr, C., Nakao, A., Togel, S., Moore, B. A., Murase, N., Kalff, J. C., Bauer, A. J. (2007) Endogenous endotoxin participates in causing a panenteric inflammatory ileus after colonic surgery. *Ann Surg* 245, 734-44.
52. Kalff, J., Schraut, W., Billiar, T., Simmons, R., Bauer, A. (2000) Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Gastroenterology* 118, 316-327.
53. Schwarz, N., Kalff, J., Türler, A., Engel, B., Watkins, S., Billiar, T., Bauer, A. (2001) Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus. *Gastroenterology* 121, 1354-1371.
54. Austyn, J. M. and Gordon, S. (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11, 805-15.
55. Sasmono, R. T., Oceandy, D., Pollard, J. W., Tong, W., Pavli, P., Wainwright, B. J., Ostrowski, M. C., Himes, S. R., Hume, D. A. (2003) A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* 101, 1155-63.
56. Hume, D. A., Ross, I. L., Himes, S. R., Sasmono, R. T., Wells, C. A., Ravasi, T. (2002) The mononuclear phagocyte system revisited. *Journal of leukocyte biology* 72, 621-7.
57. Hamann, J., Koning, N., Pouwels, W., Ulfman, L. H., van Eijk, M., Stacey, M., Lin, H. H., Gordon, S., Kwakkenbos, M. J. (2007) EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor. *Eur J Immunol* 37, 2797-802.
58. Gautier, E. L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K. G., Gordonov, S., Mazloom, A. R., Ma'ayan, A., Chua, W. J., Hansen, T. H., Turley, S. J., Merad, M., Randolph, G. J., Immunological Genome, C. (2012) Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature immunology* 13, 1118-28.
59. van Furth, R. and Cohn, Z. A. (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine* 128, 415-35.
60. van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., Langevoort, H. L. (1972) The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization* 46, 845-52.
61. Hettlinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A. C., Krijgsveld, J., Feuerer, M. (2013) Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature immunology* 14, 821-30.
62. Geissmann, F., Jung, S., Littman, D. R. (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71-82.
63. Serbina, N. V. and Pamer, E. G. (2006) Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology* 7, 311-7.
64. Carlin, L. M., Stamatiades, E. G., Auffray, C., Hanna, R. N., Glover, L., Vizcay-Barrena, G., Hedrick, C. C., Cook, H. T., Diebold, S., Geissmann, F. (2013) Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153, 362-75.

65. Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann, F. (2007) Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666-70.
66. Ingersoll, M. A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E. L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., Habenicht, A. J., Ziegler-Heitbrock, L., Randolph, G. J. (2010) Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115, e10-9.
67. Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J. P., D'Cruz, D., Casanova, J. L., Trouillet, C., Geissmann, F. (2010) Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33, 375-86.
68. Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M. J., Kreutzberg, G. W., Sher, A., Littman, D. R. (2000) Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* 20, 4106-14.
69. Soehnlein, O. and Lindbom, L. (2010) Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 427-39.
70. Kolaczowska, E. and Kubes, P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13, 159-75.
71. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532-5.
72. Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., Chilvers, E. R. (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31, 318-24.
73. Dancey, J. T., Deubelbeiss, K. A., Harker, L. A., Finch, C. A. (1976) Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest* 58, 705-15.
74. Furze, R. C. and Rankin, S. M. (2008) Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 125, 281-8.
75. Tecchio, C. and Cassatella, M. A. (2014) Neutrophil-derived cytokines involved in physiological and pathological angiogenesis. *Chemical immunology and allergy* 99, 123-37.
76. Buckley, C. D., Ross, E. A., McGettrick, H. M., Osborne, C. E., Haworth, O., Schmutz, C., Stone, P. C., Salmon, M., Matharu, N. M., Vohra, R. K., Nash, G. B., Rainger, G. E. (2006) Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *Journal of leukocyte biology* 79, 303-11.
77. Rankin, S. M. (2010) The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *Journal of leukocyte biology* 88, 241-51.
78. Matsushima, H., Geng, S., Lu, R., Okamoto, T., Yao, Y., Mayuzumi, N., Kotol, P. F., Chojnacki, B. J., Miyazaki, T., Gallo, R. L., Takashima, A. (2013) Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood* 121, 1677-89.
79. Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., Albelda, S. M. (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell* 16, 183-94.
80. Pillay, J., Kamp, V. M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J. W., Ulfman, L. H., Leenen, L. P., Pickkers, P., Koenderman, L. (2012) A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest* 122, 327-36.
81. Ortega-Gomez, A., Perretti, M., Soehnlein, O. (2013) Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO molecular medicine* 5, 661-74.

82. Truman, L. A., Ford, C. A., Pasikowska, M., Pound, J. D., Wilkinson, S. J., Dumitriu, I. E., Melville, L., Melrose, L. A., Ogden, C. A., Nibbs, R., Graham, G., Combadiere, C., Gregory, C. D. (2008) CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* 112, 5026-36.
83. Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J. J., Harden, T. K., Leitinger, N., Ravichandran, K. S. (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282-6.
84. He, M., Kubo, H., Morimoto, K., Fujino, N., Suzuki, T., Takahasi, T., Yamada, M., Yamaya, M., Maekawa, T., Yamamoto, Y., Yamamoto, H. (2011) Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO reports* 12, 358-64.
85. Mosser, D. and Edwards, J. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology* 8, 958-969.
86. Wehner, S., Schwarz, N. T., Hundsdoerfer, R., Hierholzer, C., Tweardy, D. J., Billiar, T. R., Bauer, A. J., Kalff, J. C. (2005) Induction of IL-6 within the rodent intestinal muscularis after intestinal surgical stress. *Surgery* 137, 436-46.
87. Schwarz, N., Kalff, J., Türler, A., Speidel, N., Grandis, J., Billiar, T., Bauer, A. (2004) Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility. *Gastroenterology* 126, 159-169.
88. Stoffels, B., Hupa, K. J., Snoek, S. A., van Bree, S., Stein, K., Schwandt, T., Vilz, T. O., Lysson, M., Veer, C. V., Kummer, M. P., Hornung, V., Kalff, J. C., de Jonge, W. J., Wehner, S. (2014) Postoperative ileus involves interleukin-1 receptor signaling in enteric glia. *Gastroenterology* 146, 176-87 e1.
89. Kalff, J., Carlos, T., Schraut, W., Billiar, T., Simmons, R., Bauer, A. (1999) Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology* 117, 378-387.
90. Martinez, F., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M. (2008) Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, 453-461.
91. Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.
92. Lin, E. Y., Li, J. F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D. A., Qian, H., Xue, X. N., Pollard, J. W. (2006) Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer research* 66, 11238-46.
93. Gleissner, C. A., Shaked, I., Little, K. M., Ley, K. (2010) CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 184, 4810-8.
94. Roca, H., Varsos, Z. S., Sud, S., Craig, M. J., Ying, C., Pienta, K. J. (2009) CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J Biol Chem* 284, 34342-54.
95. Italiani, P. and Boraschi, D. (2014) From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* 5, 514.
96. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677-686.
97. Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M. J. (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* 204, 3037-47.
98. Italiani, P., Mazza, E. M., Lucchesi, D., Cifola, I., Gemelli, C., Grande, A., Battaglia, C., Biciato, S., Boraschi, D. (2014) Transcriptomic profiling of the development of the inflammatory response in human monocytes in vitro. *PloS one* 9, e87680.

99. Mylonas, K. J., Nair, M. G., Prieto-Lafuente, L., Paape, D., Allen, J. E. (2009) Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. *J Immunol* 182, 3084-94.
100. Stout, R. D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S. K., Suttles, J. (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175, 342-9.
101. Crane, M. J., Daley, J. M., van Houtte, O., Brancato, S. K., Henry, W. L., Jr., Albina, J. E. (2014) The monocyte to macrophage transition in the murine sterile wound. *PLoS one* 9, e86660.
102. Pettersen, J. S., Fuentes-Duculan, J., Suarez-Farinas, M., Pierson, K. C., Pitts-Kiefer, A., Fan, L., Belkin, D. A., Wang, C. Q., Bhuvanendran, S., Johnson-Huang, L. M., Bluth, M. J., Krueger, J. G., Lowes, M. A., Carucci, J. A. (2011) Tumor-associated macrophages in the cutaneous SCC microenvironment are heterogeneously activated. *The Journal of investigative dermatology* 131, 1322-30.
103. Sabat, R., Grutz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., Geginat, J. (2010) Biology of interleukin-10. *Cytokine & growth factor reviews* 21, 331-44.
104. Saraiva, M. and O'Garra, A. (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10, 170-81.
105. Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C., Lo-Man, R. (2009) Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* 31, 761-71.
106. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.
107. Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Muller, W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-74.
108. Glocker, E. O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E. M., Schaffer, A. A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J., Allroth, A., Murugan, D., Hatscher, N., Pfeifer, D., Sykora, K. W., Sauer, M., Kreipe, H., Lacher, M., Nustede, R., Woellner, C., Baumann, U., Salzer, U., Koletzko, S., Shah, N., Segal, A. W., Sauerbrey, A., Buderus, S., Snapper, S. B., Grimbacher, B., Klein, C. (2009) Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *The New England journal of medicine* 361, 2033-45.
109. Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I., Akira, S. (1999) Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 10, 39-49.
110. Sica, A. and Mantovani, A. (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* 122, 787-795.
111. Calder, P. C. (2006) n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *The American journal of clinical nutrition* 83, 1505S-1519S.
112. Calder, P. C. (2008) Session 3: Joint Nutrition Society and Irish Nutrition and Dietetic Institute Symposium on 'Nutrition and autoimmune disease' PUFA, inflammatory processes and rheumatoid arthritis. *The Proceedings of the Nutrition Society* 67, 409-18.
113. Calder, P. C. (2008) Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. *Molecular nutrition & food research* 52, 885-97.
114. Wehner, S., Meder, K., Vilz, T., Altheld, B., Stehle, P., Pech, T., Kalff, J. (2012) Preoperative short-term parenteral administration of polyunsaturated fatty acids ameliorates intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie* 397, 307-315.
115. Serhan, C. N. (2010) Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *The American journal of pathology* 177, 1576-1591.

116. Serhan, C. N., Brain, S. D., Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Haslett, C., O'Neill, L. A., Perretti, M., Rossi, A. G., Wallace, J. L. (2007) Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J* 21, 325-32.
117. Taggart, C. C., Greene, C. M., Carroll, T. P., O'Neill, S. J., McElvaney, N. G. (2005) Elastolytic proteases: inflammation resolution and dysregulation in chronic infective lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171, 1070-6.
118. McDonnell, M., Davis, W., Li, H., Funk, C. D. (2001) Characterization of the murine epidermal 12/15-lipoxygenase. *Prostaglandins* 63, 93-107.
119. Serhan, C. N. (2014) Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92-101.
120. Funk, C. D., Chen, X. S., Johnson, E. N., Zhao, L. (2002) Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, 303-12.
121. Gordon, S. and Martinez, F. O. (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593-604.
122. Kuhn, H. and Thiele, B. J. (1999) The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS letters* 449, 7-11.
123. Schiff-Zuck, S., Gross, N., Assi, S., Rostoker, R., Serhan, C. N., Ariel, A. (2011) Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b low macrophages: modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur J Immunol* 41, 366-79.
124. Serhan, C. N., Clish, C. B., Brannon, J., Colgan, S. P., Chiang, N., Gronert, K. (2000) Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *The Journal of experimental medicine* 192, 1197-204.
125. Serhan, C. N., Hong, S., Gronert, K., Colgan, S. P., Devchand, P. R., Mirick, G., Moussignac, R. L. (2002) Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *The Journal of experimental medicine* 196, 1025-37.
126. Serhan, C. N., Yang, R., Martinod, K., Kasuga, K., Pillai, P. S., Porter, T. F., Oh, S. F., Spite, M. (2009) Maresins: novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. *The Journal of experimental medicine* 206, 15-23.
127. Serhan, C. N., Gotlinger, K., Hong, S., Lu, Y., Siegelman, J., Baer, T., Yang, R., Colgan, S. P., Petasis, N. A. (2006) Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J Immunol* 176, 1848-59.
128. Chen, P., Fenet, B., Michaud, S., Tomczyk, N., Vericel, E., Lagarde, M., Guichardant, M. (2009) Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. *FEBS letters* 583, 3478-84.
129. Sun, Y. P., Oh, S. F., Uddin, J., Yang, R., Gotlinger, K., Campbell, E., Colgan, S. P., Petasis, N. A., Serhan, C. N. (2007) Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J Biol Chem* 282, 9323-34.
130. Serhan, C. N., Nicolaou, K. C., Webber, S. E., Veale, C. A., Dahlen, S. E., Puustinen, T. J., Samuelsson, B. (1986) Lipoxin A. Stereochemistry and biosynthesis. *J Biol Chem* 261, 16340-5.
131. Serhan, C. N., Hamberg, M., Samuelsson, B., Morris, J., Wishka, D. G. (1986) On the stereochemistry and biosynthesis of lipoxin B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 1983-7.
132. Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J. N., Petasis, N. A., Blumberg, R. S., Serhan, C. N. (2005) Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 7671-6.



133. Tjonahen, E., Oh, S. F., Siegelman, J., Elangovan, S., Percarpio, K. B., Hong, S., Arita, M., Serhan, C. N. (2006) Resolvin E2: identification and anti-inflammatory actions: pivotal role of human 5-lipoxygenase in resolvin E series biosynthesis. *Chemistry & biology* 13, 1193-202.
134. Dalli, J. and Serhan, C. N. (2012) Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* 120, e60-72.
135. Arita, M., Bianchini, F., Aliberti, J., Sher, A., Chiang, N., Hong, S., Yang, R., Petasis, N. A., Serhan, C. N. (2005) Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *The Journal of experimental medicine* 201, 713-22.
136. Hasturk, H., Kantarci, A., Ohira, T., Arita, M., Ebrahimi, N., Chiang, N., Petasis, N. A., Levy, B. D., Serhan, C. N., Van Dyke, T. E. (2006) RvE1 protects from local inflammation and osteoclast-mediated bone destruction in periodontitis. *FASEB J* 20, 401-3.
137. Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M., Serhan, C. N. (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869-74.
138. Arita, M., Ohira, T., Sun, Y. P., Elangovan, S., Chiang, N., Serhan, C. N. (2007) Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol* 178, 3912-7.
139. Han, Y. Y., Lai, S. L., Ko, W. J., Chou, C. H., Lai, H. S. (2012) Effects of fish oil on inflammatory modulation in surgical intensive care unit patients. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* 27, 91-8.
140. Bouabe, H., Liu, Y., Moser, M., Bösl, M., Heesemann, J. (2011) Novel highly sensitive IL-10-beta-lactamase reporter mouse reveals cells of the innate immune system as a substantial source of IL-10 in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187, 3165-3176.
141. Siewe, L., Bollati-Fogolin, M., Wickenhauser, C., Krieg, T., Muller, W., Roers, A. (2006) Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. *Eur J Immunol* 36, 3248-55.
142. Le Faouder, P., Baillif, V., Spreadbury, I., Motta, J. P., Rousset, P., Chene, G., Guigne, C., Terce, F., Vanner, S., Vergnolle, N., Bertrand-Michel, J., Dubourdeau, M., Cenac, N. (2013) LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 932, 123-33.
143. MacKinnon, A., Farnworth, S., Hodgkinson, P., Henderson, N., Atkinson, K., Leffler, H., Nilsson, U., Haslett, C., Forbes, S., Sethi, T. (2008) Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180, 2650-2658.
144. Ingersoll, M. A., Platt, A. M., Potteaux, S., Randolph, G. J. (2011) Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* 32, 470-7.
145. Shi, C. and Pamer, E. G. (2011) Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology* 11, 762-774.
146. Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., Forster, I. (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic research* 8, 265-77.
147. Aksam, J. M., Kerry, K., Katherine, H. G., Charles, N. S., Lawrence, C. (2008) Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.

148. Godson, C., Mitchell, S., Harvey, K., Petasis, N. A., Hogg, N., Brady, H. R. (2000) Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *The Journal of Immunology* 164, 1663-1667.
149. Gronert, K., Maheshwari, N., Khan, N., Hassan, I. R., Dunn, M., Laniado Schwartzman, M. (2005) A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting epithelial wound healing and host defense. *J Biol Chem* 280, 15267-78.
150. Mikkelsen, H. B., Mirsky, R., Jessen, K. R., Thuneberg, L. (1988) Macrophage-like cells in muscularis externa of mouse small intestine: immunohistochemical localization of F4/80, M1/70, and Ia-antigen. *Cell Tissue Res* 252, 301-6.
151. Zigmund, E. and Jung, S. (2013) Intestinal macrophages: well educated exceptions from the rule. *Trends Immunol* 34, 162-8.
152. Snoek, S. A., Dhawan, S., van Bree, S. H., Cailotto, C., van Diest, S. A., Duarte, J. M., Stanisor, O. I., Hilbers, F. W., Nijhuis, L., Koeman, A., van den Wijngaard, R. M., Zuurbier, C. J., Boeckxstaens, G. E., de Jonge, W. J. (2012) Mast cells trigger epithelial barrier dysfunction, bacterial translocation and postoperative ileus in a mouse model. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 24, 172-84, e91.
153. Schwarz, N. T., Beer-Stolz, D., Simmons, R. L., Bauer, A. J. (2002) Pathogenesis of paralytic ileus: intestinal manipulation opens a transient pathway between the intestinal lumen and the leukocytic infiltrate of the jejunal muscularis. *Ann Surg* 235, 31-40.
154. Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Guilliams, M., Malissen, B., Agace, W. W., Mowat, A. M. (2013) Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal immunology* 6, 498-510.
155. Wehner, S., Straesser, S., Vilz, T., Pantelis, D., Sielecki, T., de la Cruz, V., Hirner, A., Kalff, J. (2009) Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase pathway as prophylaxis of postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 136, 619-629.
156. Vilz, T. O., Sommer, N., Kahl, P., Pantelis, D., Kalff, J. C., Wehner, S. (2013) Oral CPSI-2364 treatment prevents postoperative ileus in swine without impairment of anastomotic healing. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 32, 1362-73.
157. Klebanoff, S. J. (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology* 77, 598-625.
158. Arnhold, J. (2004) Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry. Biokhimia* 69, 4-9.
159. Arnhold, J. and Flemmig, J. (2010) Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Archives of biochemistry and biophysics* 500, 92-106.
160. Winterbourn, C. C., Vissers, M. C., Kettle, A. J. (2000) Myeloperoxidase. *Current opinion in hematology* 7, 53-8.
161. Biswas, S. K. and Mantovani, A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology* 11, 889-96.
162. Korn, D., Frisch, S. C., Fernandez-Boyanapalli, R., Henson, P. M., Bratton, D. L. (2011) Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol* 2, 57.
163. Ariel, A. and Serhan, C. N. (2012) New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. *Front Immunol* 3, 4.
164. Mills, C. D. (2012) M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical reviews in immunology* 32, 463-88.
165. Moore, K., de Waal Malefyt, R., Coffman, R., O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* 19, 683-765.

166. Engel, D., Koscielny, A., Wehner, S., Maurer, J., Schiwon, M., Franken, L., Schumak, B., Limmer, A., Sparwasser, T., Hirner, A., Knolle, P., Kalff, J., Kurts, C. (2010) T helper type 1 memory cells disseminate postoperative ileus over the entire intestinal tract. *Nature medicine* 16, 1407-1413.
167. Daley, J. M., Brancato, S. K., Thomay, A. A., Reichner, J. S., Albina, J. E. (2010) The phenotype of murine wound macrophages. *Journal of leukocyte biology* 87, 59-67.
168. Lang, R., Patel, D., Morris, J. J., Rutschman, R. L., Murray, P. J. (2002) Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* 169, 2253-63.
169. Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., Bravo, R. (1997) Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *The Journal of experimental medicine* 186, 1757-62.
170. Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S. (2013) Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79-91.
171. Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S. W., Forsberg, E. C., Tanaka, M., van Rooijen, N., Garcia-Sastre, A., Stanley, E. R., Ginhoux, F., Frenette, P. S., Merad, M. (2013) Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792-804.
172. Mia, P. and Paul, K. (2011) The neutrophil in vascular inflammation. *Nature medicine*.
173. Sadik, C. D., Kim, N. D., Luster, A. D. (2011) Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends in immunology* 32, 452-460.
174. Yang, Y., Wang, X., Huycke, T., Moore, D. R., Lightfoot, S. A., Huycke, M. M. (2013) Colon Macrophages Polarized by Commensal Bacteria Cause Colitis and Cancer through the Bystander Effect. *Translational oncology* 6, 596-606.
175. Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Ikutani, M., Oya, T., Kanatani, Y., Tsuneyama, K., Nagai, Y., Takatsu, K., Urakaze, M., Kobayashi, M., Tobe, K. (2009) Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58, 2574-82.
176. Krause, P., Morris, V., Greenbaum, J. A., Park, Y., Bjoerheden, U., Mikulski, Z., Muffley, T., Shui, J. W., Kim, G., Cheroutre, H., Liu, Y. C., Peters, B., Kronenberg, M., Murai, M. (2015) IL-10-producing intestinal macrophages prevent excessive antibacterial innate immunity by limiting IL-23 synthesis. *Nature communications* 6, 7055.
177. Cassatella, M. (1998) The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. *International journal of clinical & laboratory research* 28, 148-161.
178. Laichalk, L., Danforth, J., Standiford, T. (1996) Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity. *FEMS immunology and medical microbiology* 15, 181-187.
179. Capsoni, F., Minonzio, F., Ongari, A., Carbonelli, V., Galli, A., Zanussi, C. (1997) Interleukin-10 down-regulates oxidative metabolism and antibody-dependent cellular cytotoxicity of human neutrophils. *Scandinavian journal of immunology* 45, 269-275.
180. Kasama, T., Strieter, R., Lukacs, N., Burdick, M., Kunkel, S. (1994) Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152, 3559-3569.
181. Elbim, C., Reglier, H., Fay, M., Delarche, C., Andrieu, V., El Benna, J., Gougerot-Pocidallo, M. (2001) Intracellular pool of IL-10 receptors in specific granules of human neutrophils: differential mobilization by proinflammatory mediators. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166, 5201-5207.
182. El Kasmi, K. C., Holst, J., Coffre, M., Mielke, L., de Pauw, A., Lhocine, N., Smith, A. M., Rutschman, R., Kaushal, D., Shen, Y., Suda, T., Donnelly, R. P., Myers, M. G., Jr.,

- Alexander, W., Vignali, D. A., Watowich, S. S., Ernst, M., Hilton, D. J., Murray, P. J. (2006) General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. *J Immunol* 177, 7880-8.
183. Williams, L., Bradley, L., Smith, A., Foxwell, B. (2004) Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* 172, 567-76.
184. Zigmond, E., Bernshtein, B., Friedlander, G., Walker, C. R., Yona, S., Kim, K. W., Brenner, O., Krauthgamer, R., Varol, C., Muller, W., Jung, S. (2014) Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* 40, 720-33.
185. Serhan, C. N., Chiang, N., Van Dyke, T. E. (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 8, 349-61.
186. Nadel, J. A., Conrad, D. J., Ueki, I. F., Schuster, A., Sigal, E. (1991) Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells. *J Clin Invest* 87, 1139-45.
187. MacMillan, D. K., Hill, E., Sala, A., Sigal, E., Shuman, T., Henson, P. M., Murphy, R. C. (1994) Eosinophil 15-lipoxygenase is a leukotriene A4 synthase. *J Biol Chem* 269, 26663-8.
188. Bannenberg, G. and Serhan, C. N. (2010) Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochimica et biophysica acta* 1801, 1260-73.
189. Haworth, O., Cernadas, M., Yang, R., Serhan, C. N., Levy, B. D. (2008) Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon-gamma and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nature immunology* 9, 873-9.
190. Gobbetti, T., Le Faouder, P., Bertrand, J., Dubourdeau, M., Barocelli, E., Cenac, N., Vergnolle, N. (2013) Polyunsaturated fatty acid metabolism signature in ischemia differs from reperfusion in mouse intestine. *PLoS one* 8, e75581.
191. Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Serhan, C. N. (2014) Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity* 40, 315-27.
192. Liu, M., Boussetta, T., Makni-Maalej, K., Fay, M., Driss, F., El-Benna, J., Lagarde, M., Guichardant, M. (2014) Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. *Lipids* 49, 49-57.
193. Rogerio, A. P., Haworth, O., Croze, R., Oh, S. F., Uddin, M., Carlo, T., Pfeffer, M. A., Priluck, R., Serhan, C. N., Levy, B. D. (2012) Resolvin D1 and aspirin-triggered resolvin D1 promote resolution of allergic airways responses. *J Immunol* 189, 1983-91.
194. Oh, S. F., Pillai, P. S., Recchiuti, A., Yang, R., Serhan, C. N. (2011) Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation. *J Clin Invest* 121, 569-81.
195. Krishnamoorthy, S., Recchiuti, A., Chiang, N., Yacoubian, S., Lee, C. H., Yang, R., Petasis, N. A., Serhan, C. N. (2010) Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 1660-5.
196. Park, C. K., Xu, Z. Z., Liu, T., Lu, N., Serhan, C. N., Ji, R. R. (2011) Resolvin D2 is a potent endogenous inhibitor for transient receptor potential subtype V1/A1, inflammatory pain, and spinal cord synaptic plasticity in mice: distinct roles of resolvin D1, D2, and E1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 18433-8.
197. Klein, C. P., Sperotto, N. D., Maciel, I. S., Leite, C. E., Souza, A. H., Campos, M. M. (2014) Effects of D-series resolvins on behavioral and neurochemical changes in a fibromyalgia-like model in mice. *Neuropharmacology* 86, 57-66.
198. Bohr, S., Patel, S. J., Sarin, D., Irimia, D., Yarmush, M. L., Berthiaume, F. (2013) Resolvin D2 prevents secondary thrombosis and necrosis in a mouse burn wound model.

- Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 21, 35-43.
199. Gong, J., Wu, Z. Y., Qi, H., Chen, L., Li, H. B., Li, B., Yao, C. Y., Wang, Y. X., Wu, J., Yuan, S. Y., Yao, S. L., Shang, Y. (2014) Maresin 1 mitigates LPS-induced acute lung injury in mice. *British journal of pharmacology* 171, 3539-50.
  200. Marcon, R., Bento, A. F., Dutra, R. C., Bicca, M. A., Leite, D. F., Calixto, J. B. (2013) Maresin 1, a proresolving lipid mediator derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids, exerts protective actions in murine models of colitis. *J Immunol* 191, 4288-98.
  201. Serhan, C. N., Dalli, J., Karamnov, S., Choi, A., Park, C. K., Xu, Z. Z., Ji, R. R., Zhu, M., Petasis, N. A. (2012) Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J* 26, 1755-65.
  202. O'Sullivan, T. P., Vallin, K. S., Shah, S. T., Fakhry, J., Maderna, P., Scannell, M., Sampaio, A. L., Perretti, M., Godson, C., Guiry, P. J. (2007) Aromatic lipoxin A4 and lipoxin B4 analogues display potent biological activities. *Journal of medicinal chemistry* 50, 5894-902.
  203. Serhan, C. N. and Petasis, N. A. (2011) Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chemical reviews* 111, 5922-43.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AAM	Alternativ-aktivierte Makrophagen
ANOVA	Varianzanalyse (von engl. Analysis of Variance)
APC	Antigenpräsentierende Zelle (von engl. Antigen Presenting Cell)
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCR	Chemokinrezeptor (von engl. chemokine receptor)
CD	Differenzierungs-Cluster (von engl. Cluster of Differentiation)
cMoP	Monozytäre Vorläuferzelle (von engl. Common Monocyte Progenitor)
CMP	Myeloiden Vorläuferzelle (von engl. Common Myeloid Progenitor)
COX	Cyclooxygenase
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon
CSF1	von engl. Colony-Stimulating Factor 1
CTL	Kontrolle
DAMPs	von engl. Danger-Associated-Molecular Patterns
DE	Deutschland
DC	Dendritische Zellen (von engl. Dendritic Cells)
dd	bidestilliert (von engl. double-distilled)
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure (von engl. deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	Eicosapentaensäure
ERK	von engl. Extracellular Signal-Regulated Kinase
et al.	und andere (von lat. et alteres)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (von engl. Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fötales Kälberserum (von engl. Fetal Calf Serum)
g	Gramm
GALT	Darmassoziiertes Immunsystem (von engl. Gut Associated Lymphoid Tissue)
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein

GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	von engl. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GMP	Granulozyten/Makrophagen Vorläuferzelle (von engl. Granulocytic/Macrophage Progenitor)
h	Stunde
HBSS	von engl. Hank's Balanced Salt Solution
HPS	Hämatopoetische Stammzellen (von engl. Hematopoetic Stem Cells)
HRP	von engl. Horse-Radish-Peroxidase
ICAM	Von engl. Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IHC	Immunohistochemie
IL	Interleukin
IM	Intestinale Manipulation
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
l	Liter
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LX	Lipoxin
m	Milli- bzw. Meter
MaR1	Maresin 1
MCP1	von engl. Monocyte Chemotactic Protein 1
MDP	Makrophagen/Dendritische Vorläuferzelle (von engl. macrophage/dendritic cell progenitor)
ME	Muscularis externa
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (von engl. Major Histocompatibility Complex)
min	Minute
MIP-1 $\alpha$	von engl. Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha
ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
n	Omega

n.d.	nicht detektiert
NO	Stickstoffmonoxid
p	P-Wert
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (von engl. Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (von engl. Polymerase chain reaction)
PD1	Protektin D1
PDX	Protektin DX
PFA	Paraformaldehyd
pH	Von lat. Potentia Hydrogenii
POI	Postoperativer Ileus
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenedifluorid
RNA	Ribonukleinsäure (von engl. ribonucleic acid)
RT-PCR	von engl. Real-time Polymerase Chain Reaction
Rv	Resolvin
SAP	Stress-aktiviertes Protein (von engl. Stress-Activated Protein)
SD	Standardabweichung (von engl. Standard deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (von engl. standard error of the mean)
STAT	von engl. Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF $\beta$	von engl. Transforming Growth Factor beta
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
TLR	von engl. Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor (von engl. Tumor Necrosis Factor)
VEGF	von eng. Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
$\mu$	mikro



## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1: AUFBAU DER DARMWAND</b> .....	3
<b>ABBILDUNG 2: DIE DREI PHASEN DES POI:</b> .....	6
<b>ABBILDUNG 3: GENERIERUNG MURINER INTESTINALER MAKROPHAGEN AUS HÄMATOPOETISCHEN STAMMZELLEN</b> .....	11
<b>ABBILDUNG 4: IMMUNMODULATORISCHE LIPIDMEDIATOREN</b> .....	16
<b>ABBILDUNG 5: MONOZYTEN STELLEN DIE DOMINANT INFILTRIERENDE LEUKOZYTENPOPULATION IM POI DAR.</b> .....	38
<b>ABBILDUNG 6: MONOZYTEN STELLEN DIE DOMINANT INFILTRIERENDE LEUKOZYTENPOPULATION IM POI DAR.</b> .....	39
<b>ABBILDUNG 7: DIE EINWANDERNDEN LEUKOZYTEN WEISEN EINE HOHE MPO- UND PHAGOZYTSEAKTIVITÄT AUF.</b> .....	40
<b>ABBILDUNG 8: M2 MAKROPHAGEN AKTIVITÄT IN DER SPÄTPHASE DES POI.</b> .....	42
<b>ABBILDUNG 9: DIE M2 MAKROPHAGEN-POLARISIERUNG VERLÄUFT UNABHÄNGIG VON IL-4.</b> .....	43
<b>ABBILDUNG 10: DIE IL-10 EXPRESSION VON ISOLIERTEN LEUKOZYTEN DER ME.</b> .....	44
<b>ABBILDUNG 11: IL-10 WIRD PRIMÄR VON MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN WÄHREND DES POI EXPRIMIERT.</b> .....	45
<b>ABBILDUNG 12: DIE POSTOPERATIVEN MONOZYTEN IM POI INFILTRIEREN CCR2 ABHÄNGIG.</b> .....	46
<b>ABBILDUNG 13: DIE IL-10 EXPRESSION IN DER POSTOPERATIVEN ME IST ABHÄNGIG VON CCR2<sup>+</sup>.</b> .....	48
<b>ABBILDUNG 14: AUSBLEIBENDE M2-MAKROPHAGEN POLARISIERUNG IN CCR2<sup>-/-</sup> TIEREN.</b> .....	49
<b>ABBILDUNG 15: IL-10-DEFIZIENZ FÜHRT ZU EINER BESCHLEUNIGTEN ENTZÜNDUNGSREAKTION.</b> .....	51
<b>ABBILDUNG 16: IL-10 VERZÖGERT DIE ENTZÜNDUNGSAUFLÖSUNG IN DER SPÄTPHASE DES POI.</b> .....	52
<b>ABBILDUNG 17: DIE 15-LOX WIRD ÜBERWIEGEND DURCH INFILTRIERENDE MONOZYTEN IN DER POSTOPERATIVEN ME EXPRIMIERT.</b> .....	55
<b>ABBILDUNG 18: ENTZÜNDUNGSAUFLÖSENDE WIRKUNG VON N-3 PUFA IM POI IST 12/15-LOX- ABHÄNGIG.</b> .....	57
<b>ABBILDUNG 19: ENTZÜNDUNGSAUFLÖSENDE LIPIDMEDIATOREN SIND ERHÖHT IN DER POSTOPERATIVEN ME.</b> .....	59
<b>ABBILDUNG 20: PDX, NICHT JEDOCH RVD2, VERBESSERT DEN POI DURCH DIE REDUKTION DER NEUTROPHILEN-EXTRAVASATION.</b> .....	61

## 10 Tabellenverzeichnis

<b>TABELLE 1:</b> CHARAKTERISIERUNG VON GEWEBSMAKROPHAGEN WÄHREND DER HOMÖOSTASE .....	9
<b>TABELLE 2:</b> ENTZÜNDUNGSAUFLÖSENDE LIPIDMEDIATOREN.....	18

## 11 Publikationen

Stoffels B, Hupa KJ, Snoek A, van Bree A, **Stein K**, Schwandt T, Vilz T, Lysson M, van't Veer LJ, Hornung V, Kalff JC, de Jonge WJ, Wehner S. *Interleukin-1 receptor signaling contributes to postoperative ileus by targeting enteric glial cells.* **Gastroenterology**. 2014 Jan

Glowka TR, Steinebach A, **Stein K**, Schwandt T, Lysson M, Holzmann B, Tsujikawa K, de Jonge WJ, Kalff JC, Wehner S. *The novel CGRP receptor antagonist BIBN4096BS alleviates a postoperative intestinal inflammation and prevents postoperative ileus.* **Neurogastroenterol Motil**. 2015 Apr

Schultz M, Lai CC, Lindstroem AL, **Stein K**, Donaldson G, Thompson-Fawcett M, Butt AG. *Aggravation of established colitis in specific pathogen-free IL-10 knockout mice by restraint stress is not mediated by increased colonic permeability.* **J Crohns Colitis**. 2015 Jun

Hong GS, Schwandt T, **Stein K**, Schneiker B, Heneka M, Kummer M, Kitamura K, Kalff JC, Wehner S. *Macrophage-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) signaling prevents adhesion formation after abdominal surgery in an animal model.* **Br J Surg**. 2015 Aug

Lingohr P, Dohmen J, Matthaei H, Schwandt T, Stein K, Konieczny N, Hong GS, Steitz J, Longerich T, Wehner S, Kalff JC. *Advantages of laparoscopic compared to conventional surgery are not related to an innate immune response of peritoneal immune activation: an animal study in rats.* **Surgical Endoscopy** under review

Auszüge dieser Arbeit sind enthalten in:

**Stein K**, Stoffels M, Lysson M, Schneiker B, Dewald O, Krönke G, Kalff JC, Wehner S. *15-lipoxygenase-derived protectin DX prevents neutrophil extravasation and postoperative ileus in mice.* **J Leukoc Biol**. 2015 Aug

**Stein K**, Lysson M, Schmidt A, Schumak B, Specht S, Bouabe H, Heesemann J, Roers A, Kalff JC, Wehner S. *Monocyte-restricted IL-10 deficiency affects M2 differentiation and drives accelerated resolution of postoperative bowel inflammation in mice.* **J Immunol**. in revision 2015 Aug