



Technische Universität München
TUM School of Medicine and Health

Der Effekt einer oralen Applikation
Pektin-Chitosan-beschichteter Ac2-26-Nanopartikel auf die
Heilung intestinaler Anastomosen unter experimenteller Kolitis
im Mausmodell

Robert Leon Walter

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfende der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Philipp-Alexander Neumann
2. Prof. Dr. Radu Roland Rad

Die Dissertation wurde am 19.04.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 10.10.2024 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	i
1 Abstract.....	1
1.1 Abstract (deutsch).....	1
1.2 Abstract (english)	2
2 Abkürzungsverzeichnis	4
3 Einleitung	5
3.1 Die Darmwand	5
3.2 Colitis ulcerosa.....	6
3.3 Anastomosenheilung.....	8
3.3.1 Inflammatorische Phase / Exsudative Phase.....	9
3.3.2 Proliferative Phase.....	10
3.3.3 Reparative Phase	10
3.4 Anastomoseninsuffizienz.....	11
3.5 Die physiologische Rolle von ANXA1.....	13
3.6 Auflösung von Entzündung.....	15
3.7 Der pharmakologische Einsatz von ANXA1	15
3.8 ANXA1 und <i>Pro-resolving mediators</i>	16
3.9 Nanopartikel	16
3.9.1 Entwicklung der Nanopartikel	17
4 Fragestellung.....	21
5 Methoden und Materialien.....	22
5.1 Tierversuche	25
5.2 Auswahl des Mausstammes und Haltung der Versuchstiere	25
5.3 Anwendung von Dextran Sodium Sulfat (DSS)	25
5.4 Pektin-Chitosan beschichtete-Ac2-26-beladene NP	26
5.5 Orale Applikation von Ac2-26-beladenen NP	26
5.6 Medikamentenansatz.....	27
5.7 Narkose.....	27
5.8 Operativer Eingriff / Anlegen der Anastomose.....	28
5.9 <i>Disease Activity Index (DAI)</i>	31
5.10 Postoperative Verlaufskontrollen	32
5.11 Koloskopie	34
5.12 Adhäsionsscore	36

Tabellenverzeichnis

5.13	Tötung	36
5.14	Organentnahme und Berstungsdruck	36
5.15	Swiss Rolls.....	37
5.16	Histologische Aufarbeitung und Färbung.....	38
5.17	Histologische Evaluation der Anastomosen	40
5.18	Statistik.....	43
6	Ergebnisse.....	45
6.1	DSS und dessen Einfluss auf die intestinale Entzündungsaktivität	45
6.2	Verwendung von Pektin-Chitosan beschichteten Nanopartikeln.....	46
6.3	Einfluss von Ac2-26 beladenen NP auf die Krankheitsaktivität	48
6.4	Verbesserung der makroskopischen Anastomosenheilung	51
6.5	Gewichtsverläufe	53
6.6	Intraabdominelle Adhäsionen	55
6.7	Stabilität der Anastomosen im Vergleich zum umliegenden Gewebe.....	55
6.8	Gesamtstabilität des operierten Darmabschnitts erhoben durch den Berstungsdruck	57
6.9	Wundheilung unter mikroskopischen Aspekten.....	58
7	Diskussion	62
7.1	Klinische Relevanz	62
7.2	Methodenkritik	62
7.2.1	Verwendung junger, weiblicher Mäuse	62
7.2.2	Dosisfindung der DSS-Lösung.....	64
7.2.3	Verwendung einer Pektin-Chitosan Beschichtung der Nanopartikel	64
7.2.4	Gewichtsverläufe und klinische Untersuchung	65
7.2.5	Berstungsdruck.....	65
7.2.6	Adhäsionsscore.....	67
7.3	Ergebnisdiskussion	67
7.3.1	Vorwort der Diskussion.....	67
7.3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	67
7.3.3	Verbesserung der mukosalen Wundheilung	68
7.3.4	Krankheitsaktivität.....	69
7.3.5	Koloskopie	70
7.3.6	Gewichtsverläufe	71
7.3.7	Intraperitoneale Adhäsionen.....	71
7.3.8	Berstungsdruck und Berstungslokalisation	72
7.3.9	Histologie / Mikroskopische Heilung	73
8	Fazit	76

Tabellenverzeichnis

9	Zusammenfassung.....	77
10	Literaturverzeichnis.....	78
11	Eigene Veröffentlichungen	87
12	Lebenslauf.....	88
13	Danksagung.....	89

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Phasen der intestinalen (Anastomosen-)Heilung.....	8
Tabelle 2: Materialien.....	22
Tabelle 3: Klassifikationssystem des Krankheitsaktivitätsindex.....	31
Tabelle 4: Parameter der Score-Sheets.....	32
Tabelle 5: Klassifikationssystem des endoskopischen Scores.....	34
Tabelle 6: Klassifikationssystem des Adhäsionsscores.....	36
Tabelle 7: Histologisches Klassifikationssystem.....	40
Tabelle 8: Berstungslokalisation.....	56

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Aufbau der Nanopartikel.	19
Abbildung 2: Dimensionen der NP sowie Freisetzung von Ac2-26.....	19
Abbildung 3: Zeitleiste zum Versuchsablauf mit Applikation der NP.	27
Abbildung 4: Operative Anlage einer kolorektalen Anastomose unter dem Mikroskop.....	30
Abbildung 5: Anastomosen unter endoskopischer Kontrolle am Evaluationstag.....	35
Abbildung 6: Scoring der Anastomosen.....	41
Abbildung 7: Beispielbilder von Anastomosen mit erzielten Scores.	43
Abbildung 8: Beispiel einer Swiss-Roll.	45
Abbildung 9: HCS-Score der Swiss Rolls.	47
Abbildung 10: Präoperative Krankheitsaktivität.....	49
Abbildung 11: Postoperative Krankheitsaktivität.....	50
Abbildung 12: Endoskopie.....	52
Abbildung 13: Gewichtsverläufe.....	54
Abbildung 14: Intraabdominelle Adhäsionen.....	55
Abbildung 15: Berstungsdruck.	57
Abbildung 16: Histologische Anastomosenheilung.	60

1 ABSTRACT

1.1 ABSTRACT (DEUTSCH)

Einleitung: Entzündliche Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa treten in der westlichen Welt mit Prävalenzraten von bis zu 300 / 100.000 Menschen auf. Sie sind durch Symptome wie wiederkehrende Durchfälle, Gewichtsverlust und Schmerzen gekennzeichnet. Bis zu 80 % der Patienten, die an einer entzündlichen Darmerkrankung leiden, werden mindestens einmal im Leben operiert. Nach der Resektion des betroffenen Darmabschnitts kommt es in bis zu 20 % der Fälle zu einer Anastomoseninsuffizienz welche durch entzündliche Veränderungen bei diesen Patienten zusätzlich begünstigt wird. Anastomoseninsuffizienz ist eine lebensbedrohliche Komplikation, welche in 20 % der Fälle zu intraabdominaler Sepsis und zum Tod führt. Eine entzündungshemmende Behandlung mit Annexin A1, welches die Auflösung der Entzündung fördert, kann die Kolitis abmildern und verschiedene positive Effekte auf den perioperativen Krankheitsverlauf nehmen. Positive Effekte auf den perioperativen Verlauf durch die systemische Administration sind bereits bewiesen.

Ziele: Ziel dieses Projekts ist das therapeutische Potenzial einer perioperativen oralen Verabreichung einer neuartigen Formulierung von Pektin-Chitosan beschichteten Nanopartikeln, welche das funktionelle Peptid von Annexin A1 (Ac2-26) enthalten, zur Förderung der intestinalen Wundheilung bei Kolitis zu untersuchen.

Methoden: Am Mausmodell wurde vor einer Darmoperation eine experimentelle Kolitis durch Dextran-Natriumsulfat ausgelöst. Nach 7 Tagen wurde erneut reines Trinkwasser verabreicht, dann das Colon descendens chirurgisch durchtrennt und die Kontinuität des Darms durch 12 Einzelstiche in mikrochirurgischer Technik wiederhergestellt. Es wurden mit Ac2-26 beladene Kollagen-IV-bindende Nanopartikel synthetisiert und zusätzlich mit Pektin/Chitosan beschichtet, um die Magenpassage und die Freisetzung im Dickdarm durch mikrobielle Pektinaseaktivität zu ermöglichen. Die Nanopartikel wurden während des gesamten Verfahrens (Beginn der Kolitis bis zur Auswertung) alle 3,5 Tage über eine orale Schlundsonde verabreicht. Die Mäuse wurden am dritten bzw. siebten postoperativen Tag (POD) euthanasiert. Der Schweregrad der Kolitis und die Anastomosenheilung wurden anhand des Krankheitsaktivitätsindex bewertet, welcher sich aus Gewichtsverlust, Blut im Stuhl und Stuhlkonsistenz zusammensetzt. Die Heilung der Anastomose wurde mittels Koloskopie, Bewertung der intraabdominalen Adhäsionen und Berstdruck der Anastomose sowie verschiedener histologischer Verfahren bewertet.

Ergebnisse: Die orale Behandlung mit Ac2-26-Nanopartikeln führte zu einer signifikanten Verbesserung der Krankheitsaktivität an POD 7, während sich der präoperative

Abstract

Krankheitsaktivitätsindex zwischen den Gruppen nicht unterschied. Die endoskopisch evaluierte Heilung wurde durch die Behandlung mit Ac2-26 Nanopartikeln an POD 3 und POD 7 signifikant verbessert. In der Behandlungsgruppe traten an POD 3 und POD 7 weniger intraabdominelle Adhäsionen auf, was ebenfalls ein Hinweis auf einen verbesserten Wundverschluss des Darms ist. Die Verläufe der Berstdrucke und des Körpergewichts zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die histologische Heilung wurde durch die Behandlung sowohl an POD 3 als auch an POD 7 signifikant verbessert.

Schlussfolgerung: Die orale Behandlung mit Ac2-26, welches in Pektin-beschichteten Col-IV-Nanopartikeln verabreicht wurde, wirkt sich positiv auf die Wundheilung von Darmanastomosen im entzündeten Gewebe aus. Die Wirkung ist überwiegend lokal, da sich die postoperative Gewichtszunahme in den beiden Gruppen nicht unterscheidet. Somit könnte die orale nanomedizinische Behandlung mit Annexin A1 und den hier verwendeten Nanopartikeln ein vielversprechender Ansatz für die perioperative Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen sein. Die Pharmakokinetik und die molekularen Mechanismen müssen weiter untersucht werden und erfordern zusätzliche Studien.

1.2 ABSTRACT (ENGLISH)

Introduction: Inflammatory bowel diseases, as ulcerative colitis, are frequent. They occur with prevalence rates up to 300 / 100,000 people in the western world. They are marked by severe symptoms, such as pain, recurrent diarrhea and weight loss. Up to 80% of patients suffering from inflammatory bowel disease undergo surgery at least once in their lifetime. Anastomotic leakage following resection of the affected intestinal segment still occurs in up to 20% of cases and is further promoted by mucosal inflammation in these patients. As a life-threatening complication, anastomotic leakage leads to intraabdominal sepsis and death in 20% of cases. Anti-inflammatory treatment by Annexin A1 promoting the resolution of inflammation has shown the potential to improve colitis conditions.

Aims: The aim of this project is to evaluate the therapeutic potential of perioperative oral administration of a novel formulation of pectin/chitosan-coated collagen IV targeted nanoparticles containing Ac2-26, the functional peptide of Annexin A1, to promote intestinal wound healing during colitis conditions.

Methods: In a murine model dextran sodium sulphate in drinking water was used to induce an experimental colitis prior to intestinal surgery. Following 7 days of colitis induction surgical transection of the descending colon and restoration of bowel continuity by 12 single stitches were performed in a microsurgical technique. Collagen IV targeted nanoparticles loaded with Ac2-26 were synthesized and

Abstract

additionally coated with pectin/chitosan to allow unharmed gastric passage and targeted release in the colon by microbial pectinase activity. Nanoparticles were administered by oral gavage every 3.5 days throughout the whole procedure (initiation of colitis to evaluation). Evaluation was performed on postoperative day (POD) three or seven, respectively. Severity of colitis and anastomotic healing were evaluated by disease activity index, consisting of weight loss, blood in stool and stool consistency. Anastomotic healing was scored by colonoscopy, scoring of abdominal adhesions and bursting pressure of the anastomosis. Furthermore, multiple histologic parameters were used for evaluation of anastomotic healing.

Results: Oral Ac2-26-nanoparticle treatment resulted in a significant improvement of postoperative disease activity at POD 7, while the preoperative disease activity index did not differ between the groups. Wound closure score was significantly improved in endoscopic examination by nanoparticle treatment at POD 3 and POD 7. Less adhesions occurred in the treatment group at POD 3 and POD 7, which is also a marker for improved intestinal wound closure. Bursting pressures and body weight curves showed no significant differences between the groups. Histological evaluation showed significant improvement in healing both on POD 3 and POD 7.

Conclusion: Oral treatment with Ac2-26 encapsulated in pectin-coated Col-IV targeted nanoparticles has a positive impact on intestinal anastomotic wound healing. The effect is predominantly local as postoperative weight recovery and other systemic parameters did not differ between the groups. Thus, oral nanomedicine-based treatment with Annexin A1 might be a promising approach for perioperative treatment during colitis conditions. Effectiveness of the collagen IV targeting, molecular mechanisms and pharmacokinetics need to be further investigated and require additional studies.

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANXA1	Annexin A1
Ac2-26	Das aktive Peptid von ANXA1
DAI	<i>Disease activity index</i>
NP	Nanopartikel
DSS	Dextran Sodium Sulfat
POD	Postoperativer Tag
FPR	Formylpeptidrezeptor
Il	Interleukin
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
TGF-beta	<i>Transforming Growth Factor β</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Scrm	<i>Scrambled</i> (Peptide), besteht aus den gleichen Aminosäuren wie Ac2-26, jedoch in randomisierter, isoelektrischer Anordnung
HCS	Histologic colitis score
M	Mittelwert
SD	Standardabweichung
Md	Median
IQA	Interquartilsabstand

3 EINLEITUNG

3.1 DIE DARMWAND

Der Aufbau der Darmwand weist in den verschiedenen Abschnitten sowohl Gemeinsamkeiten als auch Variationen auf. Diese Arbeit bezieht sich spezifisch auf die Anastomosenheilung im Colon ascendens, weshalb dessen histologische Wandschichtung zu Beginn genauer beschrieben werden soll. Die Wand besteht von luminal nach peritoneal aus Tunica mucosa, Tela submucosa und Tunica muscularis sowie Tunica serosa. Die Tunica mucosa enthält wiederum eine einschichtige und aus hochprismatischem Zylinderepithel bestehende Lamina epithelialis mucosae, eine Lamina propria mucosae und eine dünne Lamina muscularis mucosae, welche parallel zu der Epithelschicht verläuft. Die Schleimhaut im Kolon weist vermehrt tiefe Krypten auf, besitzt aber im Gegensatz zu proximalen Darmabschnitten keine Zotten. In der Tunica mucosa enthaltene Becherzellen (Goblet-Zellen) produzieren eine muzinöse Schleimschicht, welche die Epithelzellen bedeckt. Diese Schicht spielt neben der Barrierefunktion auch eine essenzielle Rolle in der Antigenexposition. Die darunter lokalisierte Tela submucosa enthält den mit Ganglien gefüllten Plexus submucosus, welcher über die Regulation von Drüsen die Sekretion von Wasser und Elektrolyten kontrolliert. Des Weiteren wird über ihn die Durchblutung des Darmgewebes reguliert. In dieser Schicht kommen zusätzlich vereinzelt Drüsen vor. Die Tunica muscularis besteht aus zwei Muskelschichten, dem inneren Stratum circulare und dem äußeren Stratum longitudinale. Zwischen diesen Muskelschichten liegt der Plexus myentericus, welcher diese Muskelschichten innerviert. Er initiiert die Peristaltik im Darm. Die Tunica serosa bildet die äußere Schicht und umschließt den Darm intraperitoneal. Außerhalb des Peritoneums wird diese Schicht durch die Tunica adventitia ersetzt. Im Darm nimmt die extrazelluläre Durchlässigkeit, bedingt durch die vorherrschende Anzahl von *tight junctions*, von proximal nach distal ab. Während somit im Dünndarm die parazelluläre Passage von Elektrolyten stattfindet, steht im Kolon eher eine Resorption von Wasser im Vordergrund.

3.2 COLITIS ULCEROSA

Colitis ulcerosa gehört wie Morbus Crohn der Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen an. In der westlichen Welt beläuft sich die Inzidenzrate auf etwa 9 bis 20 Neuerkrankungen pro 100 000 Menschen (Ordas, Eckmann, Talamini, Baumgart, & Sandborn, 2012), die Prävalenz beträgt etwa 160-300 pro 100 000 Menschen (Ng et al., 2018; Ordas et al., 2012). Speziell in Europa werden Inzidenzraten zwischen 1,5 bis 20,3 Fälle pro 100 000 Personenjahren (Roin & Roin, 1989; Vucelic et al., 1991) mit Prävalenzraten von 21,4 bis 243 Fällen pro 100 000 Personenjahren (Rubin, Hungin, Kelly, & Ling, 2000; Vucelic et al., 1991) berichtet. Während die Prävalenz in der westlichen Welt in der Vergangenheit tendenziell stieg, ist hier inzwischen eine Stagnation zu beobachten. Stattdessen ist in den letzten Jahren ein Anstieg von Inzidenz und Prävalenz vor allem in bisher weniger entwickelten Regionen wie Afrika, dem Mittleren Osten (Sharara et al., 2018) und östlichen Teilen Asiens (Loftus & Sandborn, 2002; Thia, Loftus, Sandborn, & Yang, 2008) zu vermerken. Das Erstmanifestationsalter zeigt eine bimodale Verteilung. Der erste Altersgipfel liegt zwischen 15 und 30 Jahren. Ein zweiter, jedoch kleinerer Häufigkeitsgipfel ist in der Altersgruppe zwischen 50 und 70 Jahren (Loftus & Sandborn, 2002; Ordas et al., 2012) zu finden wobei Frauen und Männer in beiden Gruppen etwa gleich häufig betroffen sind oder das männliche Geschlecht speziell bei Colitis ulcerosa einen geringen Risikofaktor (Loftus & Sandborn, 2002; Trallori et al., 1996) darstellen kann. Die Ätiologie ist unbekannt, nach heutigem Stand der Wissenschaft wird ein multifaktorielles Geschehen vermutet. Umweltfaktoren welche sowohl Auftreten als auch Verlauf der Erkrankung beeinflussen können sind vielseitig. Verbesserte Hygiene durch einen hohen Lebensstandard mit einer eingeschränkten Entwicklung des mukosalen Immunsystems wird im späteren Leben mit vermehrtem Auftreten von Colitis assoziiert, umgekehrt stellen ein niedriger sozioökonomischer Status und vermehrtes Rauchen protektive Faktoren dar (Lopez-Serrano et al., 2010). Genetisch anfällige Patienten scheinen auf die physiologisch vorkommende Mikroflora mit einer überschießenden mukosalen Immunantwort zu reagieren (Ordas et al., 2012). Auch genetische Faktoren spielen für das Erkrankungsrisiko eine Rolle. Erkrankte Verwandte ersten Grades erhöhen das Risiko um etwa 8 % (Monsen, Brostrom, Nordenvall, Sorstad, & Hellers, 1987).

Colitis ulcerosa ist durch eine das Rektum befallende, diffuse Entzündungsreaktion mit kontinuierlicher Ausbreitung nach proximal gekennzeichnet. Nach einem schleichenden Beginn der Erkrankung sind typische Symptome rezidivierende schleimige Diarrhoe mit Darmblutungen, Bauchschmerzen, Tenesmen oder auch Fieber. Auch extraintestinale Manifestationen können vorliegen.

Die durch Muzine bedeckte Epithelschicht stellt die Barriere zwischen intra- und extraluminal. So werden Gewebe und die enthaltenen Immunzellen vor dem intestinalen Mikrobiom separiert. Unter Colitis ulcerosa kann die Anzahl der Becherzellen verringert sein, was eine verringerte

Einleitung

Mukusproduktion und somit den vermehrten Kontakt mit Antigenen bedingt (Ordas et al., 2012). Chronische Entzündungsaktivität des Gewebes kann folglich zu Komplikationen führen. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein sich selbst verstärkender entzündlicher Prozess entstehen kann, da durch Zytokine bedingt, die Durchlässigkeit der Epithelschicht weiter verstärkt wird (Heazlewood et al., 2008). Die verminderte Produktion verschiedener Muzine führt zu einer Beeinträchtigung der Schutzbarriere (Van Klinken, Van der Wal, Einerhand, Buller, & Dekker, 1999), mit konsekutiver Schädigung der *tight junctions* zwischen Epithelzellen (Heller et al., 2005). Auf diese Mechanismen folgt die fehlregulierte Immunantwort. Wichtige Auslöser dieser Immunantwort, und somit der verschiedenen entzündlichen Darmerkrankungen entspringen wohl dem Spektrum der kommensalen Mikroflora des Darms (Taurog et al., 1994). In der Lamina propria ansässige dendritische Zellen und Makrophagen präsentieren Antigene an B- und T-Zellen. Das Vorkommen dieser Zellen scheint für eine Aufrechterhaltung sowie den Verlauf der Erkrankung verantwortlich zu sein (Hart et al., 2005). Dendritische Zellen aktivieren über Toll-like-Rezeptoren (TLR) die adaptive Immunantwort. *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B) als repräsentativer Transkriptionsfaktor aktiviert dann zahlreiche Prozesse der Entzündungskaskade (Harada et al., 2003). Die gestörte Immunantwort beinhaltet unter anderem T-Helferzellen und Interleukin-13 (IL-13), welche eine Apoptose der Epithelzellen sowie der weiteren Beeinträchtigung vorliegender Tight Junctions vorantreiben (Heller, Fromm, Gitter, Mankertz, & Schulzke, 2008). Einen weiteren Aspekt der aktivierten Entzündungskaskade stellen T-Killerzellen durch die Produktion verschiedener Zytokine, als nur ein Beispiel ist hier erneut IL-13 zu erwähnen. Zytokine und weitere Entzündungsmediatoren führen unter kolitischen Zuständen zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten an Gefäßmembranen mit konsekutiver Diapedese in das umliegende Gewebe (Ordas et al., 2012).

Die Erstlinientherapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erfolgt medikamentös. Durch die Entwicklung neuartiger Therapeutika kann eine verbesserte Heilung der Mukosa induziert werden. Das Therapieziel besteht aus einer zügigen Induktion einer steroidfreien Remission mit Prävention von, durch Erkrankung und Therapie verursachten, Komplikationen. Die chirurgische Resektion von entzündetem Gewebe spielt eine wichtige Rolle in der Behandlung von starken Schüben (akuter) und fulminanter Colitis ulcerosa in einem ausgewählten Patientenkollektiv (Harms, Myers, Rosenfeld, & Starling, 1994). Während die Ursache der entzündlichen Darmerkrankungen weiterhin unbekannt ist, liegt das Lebenszeitrisko für die Indikation und Durchführung einer chirurgischen Intervention im teils hohen zweistelligen Prozentbereich. Patienten mit Colitis ulcerosa untergehen in 20 % der Fälle einer chirurgischen Intervention, dieser Anteil steigt unter Morbus Crohn auf 60-80 % an (Lightner, 2020). Kommt es zur chirurgischen Intervention, führt dies in den meisten Fällen zu einer Resektion des befallenen Darmanteils mit darauffolgender Wiederherstellung der Kontinuität durch chirurgische

Einleitung

Nähte. Die konsekutiven physiologischen Heilungsschritte sind in folgendem Kapitel genauer beschrieben.

3.3 ANASTOMOSENHEILUNG

Die intestinale Heilung ist ein multifaktorieller Vorgang, an dem verschiedene Zelltypen und Signalmoleküle (z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Interferone) beteiligt sind.

Der Heilungsprozess kann in drei Phasen gegliedert werden (Marjanovic & Hopt, 2011). Es bleibt anzumerken, dass hier ein idealisiertes Modell der Heilung präsentiert wird und die Vorgänge sequenziell und überlappend stattfinden können. Die Zeitangaben zu den einzelnen Phasen müssen als grobe Orientierung interpretiert werden.

Tabelle 1: Phasen der intestinalen (Anastomosen-)Heilung.

Adaptiert nach (Marjanovic & Hopt, 2011).

Phase	Zeitpunkt	Beteiligte Zellen	Beteiligte Faktoren	Funktion / Prozesse
Inflammatorische Phase / Exsudative Phase	Tag 0-4	Thrombozyten, Endothelzellen, Neutrophile, Granulozyten, Makrophagen, Fibroblasten	TGF-beta, VEGF, PDGF, IL-1, IL4, PDGF, IGF-1	Primärverschluss
Proliferative Phase	Tag 5-14	Fibroblasten, Lymphozyten, glatte Muskelzellen, Makrophagen, Endothelzellen	TGF- beta, VEGF, FGF	Stabilisierung der Anastomose / Wunde
Reparative Phase	Wochen – Jahre	Fibroblasten, Lymphozyten		Remodellierung / endgültige Stabilität

3.3.1 Inflammatorische Phase / Exsudative Phase

Auf das Auftreten einer Verletzung des Gewebes, wie im Rahmen von Darmresektionen, folgt die Ödembildung mit konsekutiver Einwanderung von Blutbestandteilen in das Gewebe. Bevor das Gewebe durch eine lokale Entzündungsaktivität gekennzeichnet wird, kommt es zur primären Blutstillung in kleinen Gefäßen durch Thrombozyten. Diese wird initiiert durch die Freilegung von subendothelialelem Gewebe mit dem dort vorliegenden Kollagen, welches über eine Konformationsänderung von oberflächlichen Integrinen auf den Thrombozyten jene aktiviert. Dieser Prozess beginnt mit der Verursachung der Wunde und ist zur Minimierung des Blutverlustes essenziell. Die Blutstillung wird zusätzlich durch, von Thrombozyten freigesetztes, Thromboxan A₂ unterstützt welches eine Vasokonstriktion vermittelt. Darauf folgt über die Aktivierung der Gerinnungskaskade die sekundäre Blutgerinnung. Die vorliegenden Thrombozyten wiederum sezernieren TGF-beta, VEGF und PDGF. Durch PDGF werden Makrophagen stimuliert, welche zusätzlich VEGF und IGF-1 freisetzen (Rijcken, Sachs, Fuchs, Spiegel, & Neumann, 2014). Weiter werden über das Vorliegen von PAF, Fibronectin und Serotonin sowie der anderen Wachstumsfaktoren und Zytokinen Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Fibroblasten chemotaktisch an den Ort der Verletzung gebracht (Marjanovic & Hopt, 2011). Makrophagen und neutrophile Granulozyten nehmen unterschiedliche Funktionen im Heilungsprozess ein. Neutrophile Granulozyten erreichen die maximale Konzentration im Gewebe etwa am zweiten Tag und dienen während ihrer frühen Präsenz der Abwehr von Mikroorganismen und bakteriellen Antigenen (Leibovich & Ross, 1975) (Simpson & Ross, 1972). In stark kontaminiertem Darmgewebe ist die Abwehr der bakteriellen Besiedlung von besonderer Bedeutung. Die fortwährende Darmpassage stellt durch mechanische Belastung und den Kontakt mit dem intestinalen Mikrobiom ein Risiko für den ungestörten Heilungsverlauf dar. Makrophagen erreichen etwa am dritten Tag nach Verletzung ihre maximale Konzentration und phagozytieren bakterielles Material und nekrotische Zellen im Gewebe (Leibovich & Ross, 1975). Zusätzlich tragen Makrophagen durch freigesetzte Wachstumsfaktoren wie VEGF zur Matrixproliferation bei und über Zytokine können weitere Effektoren der Wundheilung aktiviert werden. Makrophagen beeinflussen während der frühen Phase der Heilung zusätzlich die Stabilität der Wunde, dies wird vermutlich durch ein vermehrte Querverbindungen von bestehenden Kollagenfasern verursacht (Browder et al., 1988).

Die mechanische Stabilität wird in den ersten drei bis vier Tagen primär durch die angebrachten Nahtpunkte gewährleistet. Die Tela submucosa ist zu diesem Zeitpunkt die wichtigste Schicht für die mechanische Stabilität der Naht (Marjanovic & Hopt, 2011). Durch überschießende Entzündung kann die Stabilität des Gewebes gefährdet sein und ein Ausreißen der Fäden vorkommen. Dies geschieht durch die Freisetzung von verschiedenen Enzymen, wie z.B. MMPs, Kollagenasen, Gelatinasen und Elastasen (Hawley, Faulk, Hunt, & Dunphy, 1970). In dieser vulnerablen Phase führen solche Prozesse zu einem massiven Abbau von Kollagen mit einer daraus folgenden, eingeschränkten

Einleitung

Widerstandsfähigkeit des Gewebes. Nach der Phase des Kollagenabbaus gewinnt das Gewebe rasch an Stabilität und der Anteil der Nahtpunkte an der mechanischen Stabilität tritt in den Hintergrund (Jonsson, Jiborn, & Zederfeldt, 1983). Das frühe Auftreten von Insuffizienzen im Gewebe kann durch oben genannte Prozesse erklärt werden. Auf- und Abbauprozesse erfordern eine balancierte Regulation (Chowcat, Savage, Hembry, & Boulos, 1988).

3.3.2 Proliferative Phase

Die proliferative Phase ist durch die Anwesenheit von Granulationsgewebe gekennzeichnet. Das Vorliegen von Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, FGF, TGF-beta) aus Makrophagen, Thrombozyten und Epithelzellen fördert die Revaskularisation im Gewebe. Die Angiogenese findet im Granulationsgewebe in zwei Phasen statt. Blutgefäße wachsen sowohl in die Tela submucosa als auch in die Serosa ein. Während die serösen Blutgefäße zeitweise einen größeren Anteil an der Blutversorgung einnehmen, bilden sie sich mit dem Untergang des Granulationsgewebes zum Ende der Phase wieder zurück. Die Gefäße in der Submukosa bleiben bestehen (Houdart, Lavergne, Valleur, Villet, & Hautefeuille, 1985). Zuvor eingewanderte Makrophagen stimulieren chemotaktisch die Einwanderung von Fibroblasten. Diese werden durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie TGF-beta, FGF und IL-2 stimuliert. Durch glatte Muskelzellen aus der Lamina muscularis mucosae und Fibroblasten wird die extrazelluläre Matrix über produziertes Kollagen weiter aufgebaut. Die maximale Kollagenproduktion liegt zu Beginn der proliferativen Phase vor. Kollagen Typ III kennzeichnet diese Phase und gibt der Anastomose elastische Widerstandsfähigkeit. Im weiteren Verlauf erhöht sich der Anteil von festerem, aber auch weniger elastischem Kollagen Typ I. Mit Kollagen Typ I gewinnt die Anastomose zusätzlich Stabilität und Reißfestigkeit (Marjanovic & Hopt, 2011). Weitere Produkte der Fibroblasten sind Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Fibronektine, Glykosaminoglykane und Glykoproteine (Katsuno et al., 2011). Zusätzlich wird durch FGF auch die Entzündung selbst beeinflusst, indem Lymphozyten zur Proliferation angeregt werden (Powers, McLeskey, & Wellstein, 2000). TGF-beta fördert zusätzlich zu den genannten Funktionen die Bildung der Epithelschicht im Lumen und reguliert die Entzündung im Granulationsgewebe (Barrientos, Stojadinovic, Golinko, Brem, & Tomic-Canic, 2008).

3.3.3 Reparative Phase

Das Ziel dieser Phase ist die finale Reorganisation des Gewebes sowie das Erreichen der endgültigen Stabilität. Durch Umbauprozesse werden die Schichten der Darmwand zumindest teilweise wiederhergestellt. Hervorgerufen durch den fortschreitenden Wandel von Kollagen Typ III hin zu Kollagen Typ I gewinnt die Anastomose zunehmend an Stabilität. Die vorliegenden Kollagenfibrillen werden zudem parallel organisiert. Beteiligte Zellen sind weiterhin Lymphozyten, Makrophagen und vor allem Fibroblasten wie auch die Kollagen bildenden glatten Myozyten der Lamina muscularis

mucosae. Über ein Gleichgewicht zwischen Kollagenbildung durch besagte Zellen und dem Abbau durch TIMPs und MMPs erfolgt die Reorganisation (Rijcken et al., 2014). Die reparative Phase läuft deutlich langsamer als die vorangegangenen Phasen ab. Zudem ist die klinische Signifikanz in Bezug auf die Entstehung von Anastomosen eher begrenzt, da die vulnerable Phase am Beginn des Heilungsprozesses liegt (Marjanovic & Hopt, 2011).

3.4 ANASTOMOSENINSUFFIZIENZ

Unbeeinträchtigte Heilung benötigt eine Balance aus pro- und antientzündlichen Faktoren und ist essenziell für den zeitnahen und primären Verschluss von Anastomosen. Das vermehrte Vorliegen von proentzündlichen Faktoren kann zu einer gestörten Wundheilung mit einer signifikanten Steigerung der Morbidität führen (McDermott et al., 2015). Die Anastomoseninsuffizienz stellt heute, mit vermehrter Morbidität und Mortalität, eine gefährliche Komplikation offener und laparoskopischer Chirurgie dar. Die Manifestation der ersten Symptome liegt gehäuft zwischen dem vierten und dem siebten postoperativen Tag (Gonzalez & Nwomeh, 2017). Komplikationen wie Peritonitis oder Sepsis können tödlich verlaufen. Selbst unter einwandfreier Anlage (wasserdicht und luftdicht) einer spannungsfreien Anastomose, angelegt zwischen zwei kongruenten Darmenden, treten Insuffizienzen mit einer Häufigkeit von 1-24 % auf (Hyman, Manchester, Osler, Burns, & Cataldo, 2007; McDermott et al., 2015; Raptis, Pramateftakis, & Kanellos, 2018), die Insuffizienzraten kolorektaler Anastomosen können in erfahrenen Zentren auf 3,4-5,3 % reduziert werden (Hohenberger, Merkel, & Hermanek, 2013; K. Weber, Merkel, Perrakis, & Hohenberger, 2013). Die klinische und wissenschaftliche Signifikanz der Eindämmung und Behandlung von Entzündungsaktivität im operierten Gebiet zeigt sich an Studien zum Resektionsrand unter Kolitis, wobei eine limitierte Resektion (Resektionsrand 2 cm entfernt vom makroskopisch abgrenzbar entzündeten Gewebe) der erweiterten Resektion (Resektionsrand 12 cm entfernt vom makroskopisch abgrenzbar entzündeten Gewebe) überlegen ist. Hier nehmen verschiedene Faktoren einen wichtigen Einfluss auf die Prognose des Patienten. Zusätzlich zu einer einwandfreien Anastomose soll unter anderem ein Kurzdarmsyndrom bei Patienten verhindert werden. Ein Resektionsrand im Abstand von zwei Zentimetern zum entzündeten Gewebe ist einem wesentlich größeren Resektionsrand bezüglich der Rezidivrate nicht unterlegen (Fazio et al., 1996). Die Anlage von Anastomosen geschieht also häufig in limitiert entzündetem Gewebe beziehungsweise in einer Region zwischen der maximalen Entzündung und dem entzündungsfreien Gebiet. Obwohl in der Literatur kein Konsens zum Einfluss von entzündetem Gewebe der Resektionsränder (de Buck van Overstraeten et al., 2017; Post et al., 1991) auf das Auftreten von Komplikationen wie der Entstehung von Insuffizienzen vorliegt, wurde bei Eingriffen im entzündeten Gewebe ein vermehrtes Auftreten von, mit intraabdomineller Sepsis einhergehenden Komplikationen beschrieben (Shental, Tulchinsky, Greenberg, Klausner, & Avital, 2012).

Einleitung

Verschiedene Risikofaktoren für intestinale Insuffizienz von Anastomosen hängen direkt oder indirekt mit der Entstehung und der Präsenz von Entzündung zusammen. Um mögliche Nebenwirkungen und Effekte von, Entzündungsaktivität modulierenden, Wirkstoffen zu zeigen werden im Folgenden kurz einige Beispiele aus der aktuellen Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen aufgeführt. Diese sollen die Notwendigkeit neuer und von weniger Nebenwirkungen belasteten Behandlungsansätzen verdeutlichen.

Als Standardtherapeutikum der unkomplizierten Kolitis hat Mesalazin einen positiven Effekt auf die Anastomosenheilung sowie deren strukturelle Integrität (Aslan et al., 2008). Im Fall komplizierter Verläufe spielt diese Medikation jedoch eine untergeordnete Rolle und wird bei refraktären Verläufen durch potentere Medikamente verdrängt.

Tierversuche konnten eine reduzierte intestinale Heilung mit erniedrigter Stabilität von Anastomosen unter Gabe von hochdosierten Steroiden (0,533 mg/kg Prednisolon) aufzeigen. Eine kurzzeitige Applikation von niedrig dosiertem Prednisolon (0,133 mg/kg) konnte die mikroskopische Heilung verbessern sowie einer Abszessbildung entgegenwirken (M. C. Weber et al., 2023). Hier zeigten sich unter Steroidbehandlung verminderte Konzentrationen von Kollagenfasern und Immunzellen sowie Blutgefäßen und Fibroblasten (Phillips, Kim, Fonkalsrud, Zeng, & Dindar, 1992). Da die exakten Prozesse der (insuffizienten) Wundheilung weiter nicht vollständig entziffert sind, wird auch in dieser Arbeit eine modifizierte Version des etablierten Phillips-Score zur Evaluation histologischer Wundheilung verwendet.

Am Rattenmodell konnten Mantzoros et al. (2004) zeigen, dass die perioperative intraperitoneale Applikation von Hydrokortison die Anastomosenheilung im Kolon in Hinsicht auf Berstungsdruck sowie Kollagenablagerung im Sinne der mechanischen Stabilität aber auch der zellulären Integrität negativ beeinflusst. Die Inzidenz von Anastomoseninsuffizienzen steigt. Diese Effekte gehen einher mit einer reduzierten Infiltration von Entzündungszellen. Dies konnte von Myrelid et al. (2015) in Experimenten unter DSS induzierter Kolitis ebenfalls nachgewiesen werden. Baca et al. (2010) beschreiben, dass der negative Effekt auf die Anastomosenheilung mit einer Verlängerung der Applikationszeitspanne sowie einer zunehmenden Dosis verstärkt wird. Postoperative infektiöse Komplikationen werden durch die präoperative Applikation von Kortikosteroiden bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen verstärkt, das konnten auch Aberra et al. (2003) nachweisen, hier wurde zusätzlich erwähnt, dass eine additive Gabe von Immunmodulatoren wie 6-Mercaptopurin/Azathioprin dieses Risiko für Komplikationen nicht zusätzlich erhöht.

Modernere Behandlungsansätze mit TNF-alpha Inhibitoren steigern in Kombination mit Immunmodulatoren das Risiko für infektiöse Komplikationen wie die intraabdominelle Sepsis in

Einleitung

Patientenkollektiven nach Segmentresektion und Anastomosenanlage unter Morbus Crohn (C. S. Yu et al., 2019).

Das Makrolid Tacrolimus nimmt durch seine Calcineurin-hemmende Wirkung Einfluss auf die Entzündungsaktivität und stellt einen Wirkstoff zur Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dar. Aufgrund der immunsuppressiven Wirkung unterdrückt er die typische Entzündungsaktivität von Colitis ulcerosa und führt gleichzeitig zu einer mechanisch stabileren Anastomose (Raptis et al., 2012).

Auch wegen der enormen klinischen Häufung und der daraus folgenden klinischen Relevanz stellt ein hoher perioperativer Bedarf an Steroiden einen wichtigen Risikofaktor der Anastomoseninsuffizienz dar.

Die inkomplette Regeneration der Epithelschicht bedingt strukturelle Fehler in der Regeneration von Anastomosen mit Insuffizienz der betroffenen Regionen (Pantelis et al., 2010). Insuffiziente Anastomosen sind also in vielen Fällen mit vermehrter Entzündung verbunden. Patienten mit akuten Schüben, welche auf die medikamentöse Therapie nur unzureichend ansprechen oder immunsuppressiv behandelt werden stellen schon präoperativ ein Hochrisikokollektiv dar. Nebenwirkungsarme Therapien solcher Entzündungen könnten also zu besserer Heilung beitragen und gezielte perioperative Therapien könnten von großer Bedeutung für die Behandlung chronischer Darmentzündungen sein (Dhyani et al., 2019). Trotz großer Fortschritte in der Erforschung pathophysiologischer Konzepte der Wundheilung sind die molekularen Vorgänge und Hintergründe weiterhin nicht vollständig verstanden. In Kombination mit der begrenzten Anzahl von kompatiblen in vivo Modellen zwingen diese Umstände oft zur Verwendung von in vitro Modellen (Bettenworth et al., 2014). Es existiert deshalb wenig Literatur zu molekularen Mechanismen im entzündeten Gewebe von Anastomosen.

3.5 DIE PHYSIOLOGISCHE ROLLE VON ANXA1

Die physiologische Produktion von Glukokortikoiden im entzündeten Gewebe nimmt eine zentrale Rolle in der endogenen Auflösung von Entzündungen ein (Sapolsky, Romero, & Munck, 2000). Als endogenes Mediatormolekül wird ANXA1 in verschiedenen Geweben durch Glukokortikoide und Interleukin-1 vermittelt produziert (Mizuno et al., 1997; Solito, de Coupade, Parente, Flower, & Russo-Marie, 1998). ANXA1 Knockout-Mäuse weisen eine partielle Resistenz gegenüber der antientzündlichen Wirkung von Glukokortikoiden auf (Hannon et al., 2003). Unter experimenteller Kolitis liegen, bedingt durch eine Überexpression, erhöhte intra- und extrazelluläre Spiegel von ANXA1 vor (Babbin et al., 2008; Vergnolle, Coméra, & Buéno, 1995).

Einleitung

ANXA1 wurde als erster Vertreter einer Gruppe von Phospholipid-bindenden Molekülen bekannt. Die Gruppe A der Annexine unterteilt sich in 13 Untergruppen (ANXA1-13).

ANXA1 kommt in Makrophagen, Epithelzellen, neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten vor (Croxtall & Flower, 1992; De Caterina et al., 1993; Perretti et al., 1996), welche dieses durch unterschiedliche Mechanismen vor allem anhand von extrazellulären Vesikeln sezernieren (Dalli et al., 2008). Die genaue Signalkaskade der Freisetzung von ANXA1 variiert zwischen den verschiedenen Zelltypen. Gemeinsamer Endpunkt aller Sekretionswege ist eine vermehrte Translokation von ANXA1 aus dem Zytoplasma über die Zellmembran in den extrazellulären Raum. Extrazelluläre Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) spalten proteolytisch das NH₂-terminale Ende von ANXA1 ab und produzieren somit Ac2-26, welches als aktives Peptid seine Wirkung entfaltet.

Diese Wirkung vermittelt das Molekül über spezielle Rezeptoren, welche als Formylpeptidrezeptoren (FPR, FPRL1, FPRL2) bekannt sind. Diese Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Vertreter einer Gruppe von 7-Transmembranhelix-Rezeptoren (Ye et al., 2009). Sie werden unter anderem auf der Oberfläche von Phagozyten und Epithelzellen präsentiert. In den hier beschriebenen Versuchen wird nicht ANXA1, sondern vielmehr Ac2-26 verwendet. Ac2-26 ist das aktive Peptid von ANXA1 welches dessen anti-entzündliche Eigenschaften über oben beschriebene Mechanismen vermittelt, indem es FPR2/ALX und auch FPR1 bindet. Es besteht aus 26 Aminosäuren und wird durch kontrollierte Proteolyse vom N-terminalen Ende des ANXA1 abgespalten (Perretti, 1998). Dosisabhängig haben ANXA1 und Ac2-26 unterschiedliche Effekte auf physiologische Entzündungsprozesse. Liegen niedrige Konzentrationen vor, werden neutrophile Granulozyten über FPR1 an der Migration über Endothelien ins Gewebe gehindert.

Eine aktuell bekannte, und im Sinne dieser Arbeit grundlegend wichtige Signalkaskade von ANXA1 fördert die intestinale Heilung der Mukosa wie im Folgenden genauer beschrieben. Abhängig von NOX1 werden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies generiert. Die darauffolgende Hemmung spezieller Phosphatasen (PTEN und PTP-PEST) fördert die Produktion und Aktivität fokaler Adhäsionskinasen, welche einen wichtigen Faktor für die Zelladhäsion darstellt. In diesem Zusammenhang spielt ANXA1 eine wichtige Rolle in Wundheilung und Restitution von intestinalem Gewebe. Mit der Entdeckung dieser Signalkaskade konnte eine Assoziation zwischen mukosalen Wunden und verstärkter Expression von ANXA1 gezeigt werden. Auch intestinales Gewebe von Colitis ulcerosa Patienten weist höhere Level von ANXA1 auf. Durch die Bindung von ANXA1 an oberflächlich präsentierte FPR 1 werden Epithelzellen zu vermehrter Migration aktiviert. Auch die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten kann über diesen Weg initiiert werden. Im umliegenden Gewebe vermittelt das Molekül seine endokrine Wirkung auf die Zellmobilität (Babbini et al., 2006).

Einleitung

Eine weitere Signalkaskade von ANXA1 beeinflusst polymorphkernige Leukozyten (PMN) über einen autokrinen negativen Rückkopplungsprozess. Hierbei externalisieren Endothelien ANXA1, was zu einer verminderten trans-epithelialen Passage von PMN führt. Eine abgeschwächte Entzündungsaktivität durch verminderte Rekrutierung von Entzündungsmediatoren ist die Folge (Perretti et al., 1996).

3.6 AUFLÖSUNG VON ENTZÜNDUNG

Aktuell basiert die Therapie von entzündlichen Darmerkrankungen vorwiegend auf der Beeinflussung von Entzündungsmediatoren mit dem Ziel der Hemmung pro-entzündlicher Prozesse. Exemplarisch erfolgt dies durch die Regulierung von T-Zellen, durch Steroide oder durch Antikörper gegen Zytokine. Die Entwicklung von Strategien zur aktiven Auflösung der Entzündung durch spezielle Mediatoren (Zytokine / Lipide) stellt einen neuen Ansatz dar welcher exemplarisch durch die Gruppe der Resolvine erreicht werden kann (Rogler, 2017). Diese Auflösung von Entzündung ist für die Heilung von Gewebe sowie zur vollständigen Restitution und dem Erreichen von Rekonvaleszenz essenziell (Majno & Joris, 2004). Auf histologischer Ebene kann die Auflösung der Entzündung als Zeitintervall zwischen dem Zeitpunkt der maximalen Anzahl/Infiltration von polymorphen neutrophilen Granulozyten und dem Zeitpunkt der vollständigen Abwesenheit dieser Zellen definiert werden (Bannenberget al., 2005). Unter diesem Aspekt könnte ANXA1 ein wichtiger Faktor in der Wundheilung in entzündetem Gewebe (zum Beispiel bei intestinalen Anastomosen) darstellen.

3.7 DER PHARMAKOLOGISCHE EINSATZ VON ANXA1

Eine Behandlung von Lungenödemen mit Derivaten des ANXA1 im Rattenmodell zeigte einen Rückgang eines induzierten Lungenödems mit gleichzeitiger Reduktion von proentzündlichen Zytokinen, oxidativem Stress sowie Apoptose und der Anzahl von neutrophilen Granulozyten mit verbesserter Wundheilung. Unter Verwendung von nichtselektiven FPR-Rezeptorblockern wie Boc2 werden protektive Effekte von ANXA1 auf das umliegende Gewebe abgeschwächt und verhindert (Liao et al., 2017).

ANXA1 (-/-) Knockout Mäuse zeigen unter DSS-induzierter Kolitis zudem eine verringerte Expression verschiedener FPR gegenüber dem ANXA1 Wildtyp. Dies impliziert einen möglichen regulatorischen Einfluss von ANXA1 auf diese Gruppe antientzündlicher Rezeptoren. Auch zeigten ANXA1 (-/-) Knockout Mäuse eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber der induzierten DSS-Kolitis, gemessen an verschiedenen krankheitsspezifischen Parametern (Babbin et al., 2008).

Zudem hat ANXA1 einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf DSS-induzierter Kolitis in Mausstämmen. Intraperitoneale Injektionen von ANXA1 verbessern die Heilung bioptisch induzierter Wunden der Mukosa im Mausmodell (Leoni et al., 2013).

Einleitung

Weitere Experimente zeigen eine Reduktion von Ulzerationen des Kolons unter DSS-induzierter Kolitis nach intraperitonealer oder intramukosaler Applikation von Ac2-26. Auch hier wird der positive Effekt auf die intestinale Wundheilung der Bindung an FPR1 und FPR2/ALX zugeschrieben (Leoni, Neumann, Kamaly, et al., 2015).

3.8 ANXA1 UND PRO-RESOLVING MEDIATORS

In einem Schlüsselkonzept der endogenen Auflösung der Entzündung nehmen *specialised pro-resolving mediators* (SPM) eine zentrale Rolle in der aktiven Wiederherstellung einer Homöostase in (chronisch) entzündetem Gewebe ein (Panigrahy, Gilligan, Serhan, & Kashfi, 2021). Zu diesen Gruppen der langwirkenden lokalen SPMs gehören Lipoxine, Resolvine, Maresine sowie Protektine, welche entgegen von Proteinen wie ANXA1 aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren metabolisiert werden. An Mausmodellen konnte ein positiver Effekt von Lipoxinen und Resolvinen auf Kolitis nachgewiesen werden. Dies geschieht im Falle von Lipoxinen durch die Phagozytose von Bakterien und der Limitierung von Zytokinen (Prescott & McKay, 2011) sowie durch die Hemmung von Zytokinen durch NF- κ B (Gewirtz et al., 2002). Resolvine hemmen Entzündung durch einen Einfluss auf Makrophagen (Ishida et al., 2010), Leukozyten (Arita et al., 2005) und eine Verringerung der Infiltration von Neutrophilen (Bento, Claudino, Dutra, Marcon, & Calixto, 2011). Insgesamt kann die Hemmung der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten sowie der vermehrten Apoptose dieser Zellen als zentrale Rolle in der endogenen Entzündungsauflösung angesehen werden (Gilroy & De Maeyer, 2015).

3.9 NANOPARTIKEL

Die moderne Nanomedizin ermöglicht durch nanotechnologische Prinzipien eine gezielte und selektive Applikation von Wirkstoffen an einem spezifischen Wirkungsort (Farokhzad & Langer, 2006). Der Beginn der Forschungsaktivität im Feld der Nanomedizin steht in den 1970er Jahren. Erstmals erwähnt wurden Liposome im Jahr 1965 (Bangham, Standish, & Watkins, 1965). Neun Jahre später konnte erstmals eine kontrollierte und langsame Freisetzung aus Makromolekülen verzeichnet werden (Langer & Folkman, 1976). Das auf PEG-beschichteten Nanoliposomen basierende Zytostatikum Doxil (Doxorubicin hydrochloride liposomal) stellte 1995 das erste zugelassene Medikament der Nanomedizin zur Therapie von Tumoren dar. In der Zwischenzeit wurden neue Einsatzgebiete erschlossen, wodurch sich der Einsatz von Nanomedizin auf andere Fächer ausbreitete. Das Feld der Nanomedizin kann in zwei Hauptkategorien unterteilt werden. Erstens die Nanovektoren, welche im Rahmen der Therapie oder zur Bildgebung eine gezielte Applikation von verschiedenen Molekülen vermitteln können. Die erste Generation der Nanovektoren besteht aus Liposomen und polymeren Konjugaten. Das zweite Feld der Nanomedizin eröffnet sich in der strukturierten Markierung von Oberflächen zur präzisen Erkennung von Zielstrukturen. Zukünftiges Potential der Nanotechnologie

Einleitung

auf den medizinischen Sektor liegt unter anderem in der Erkennung molekularer Veränderung, der Diagnose von Krankheiten, Vesikeln zur Beurteilung von therapeutischen Interventionen sowie der Applikation und dem Transport von Wirkstoffen. Auch Kombinationen mit dualer Funktion zur Diagnostik und Therapie sind potenziell zukunftsfähige Konstrukte (Farokhzad & Langer, 2006). Durch den Einsatz von Nanopartikeln in der Applikation von Wirkstoffen kann vor allem die Pharmakokinetik (Freisetzung, Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion) beeinflusst werden, was sich dann auch auf die Pharmakodynamik auswirken kann.

Die dreiteilige Basiseinheit eines Nanovektors besteht erstens aus einem hydrophilen Vesikel, welches eine verbesserte Bereitstellung von hydrophoben Wirkstoffen ermöglicht. Diese Vesikel enthalten und transportieren Moleküle oder Wirkstoffe. Zusätzlich bestehen Oberflächenmarkierungen zur Identifikation von Zielstrukturen, welche eine Bereitstellung an spezifische Zellen oder Gewebe ermöglichen. Anhand von Bildgebungsverfahren kann die gezielte Aufnahme oder Markierung im Gewebe kontrolliert werden (Farokhzad & Langer, 2009). Die Eigenschaften von Nanovektoren können durch zusätzliche Bestandteile weiter modifiziert und in ihren Eigenschaften spezialisiert werden. Hier sollen zum Beispiel Beschichtungen der Vesikel zum Schutz vor vorzeitigem Abbau genannt werden.

3.9.1 Entwicklung der Nanopartikel

Zur intraperitonealen Applikation wurden die Ac2-26-Peptide mit poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) NPs umhüllt. Hier wurde sowohl PLGA-PEG-COOH sowie PLGA-PEG-Col-IV und PLGA-Cy5.5 verwendet. Die verwendete PEG-Sequenz ist mit 534,6 Da kurz und ermöglicht die Anlagerung weiterer Hüllen (Kamaly et al., 2013) (Lee et al., 2024)

Für die orale Applikation mussten in früheren Experimenten zur intraperitonealen Applikation entwickelte Nanopartikel modifiziert werden. Die Verwendung von oralen polymeren NP wird schon seit einiger Zeit in Forschungsprojekten angewendet (Galindo-Rodriguez, Allemann, Fessi, & Doelker, 2005). Diese beschichteten NP können ihren Inhalt während des Magentransits vor vorzeitigem Abbau schützen. Einfluss auf die NP nehmen während des Magen- sowie Dünndarmtransport unter anderem erhöhte Druckwerte, das saure Magenmilieu und Proteasen. Weiter können über einen längeren Zeitraum gleichbleibende Dosen von Wirkstoffen freigesetzt werden. Polymere NP haben sich bisher im Rahmen der Nanomedizin als vielversprechender Ansatz zur verzögerten und ortsspezifischen Applikation bewiesen (Fredman et al., 2015; Kamaly, Xiao, Valencia, Radovic-Moreno, & Farokhzad, 2012; Kamaly, Yameen, Wu, & Farokhzad, 2016). Die in diesen Experimenten verwendeten Nanopartikel besitzen eine zusätzliche Hülle aus Pektin und Chitosan. Das protektive Potential vergleichbarer Hüllensysteme während der Magenpassage wurde bereits beschrieben. Diese Hülle schützt ihren Inhalt während der Magenpassage vor vorzeitigem Abbau und stellt eine gängige Methode zur spezifischen und gezielten Verabreichung von Wirkstoffen im Darm dar (Atyabi, Majzoub,

Einleitung

Iman, Salehi, & Dorkoosh, 2005; Deshmukh, 2020). Im Darm befindliche Anaerobier produzieren Pektinasen welche dann zum Abbau der Hülle und der Liberation der Kollagen Typ IV spezifischen NP beitragen (Atyabi et al., 2005; Das & Ng, 2010; Maestrelli, Cirri, Corti, Mennini, & Mura, 2008; Shimono, Takatori, Ueda, Mori, & Nakamura, 2003).

Einleitung

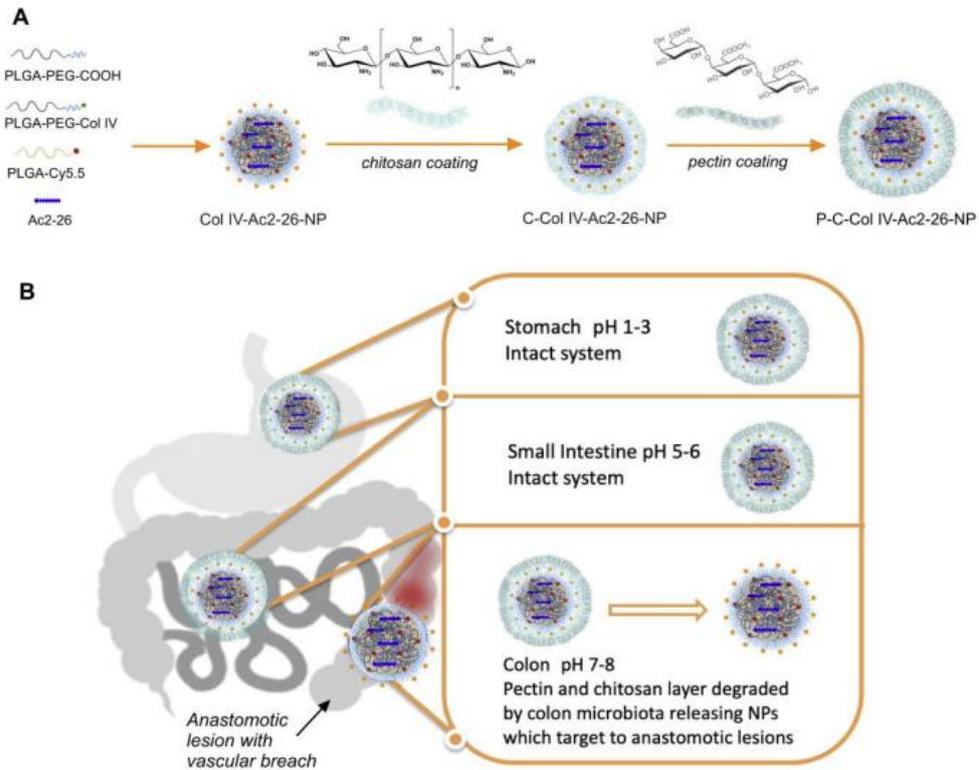


Abbildung 1: Aufbau der Nanopartikel.

Die Pektin-Beschichtung schützt vor dem sauren Magenmilieu, sowie der Passage des Dünndarms. Die Pektin-Chitosan-Hülle wird im Kolon abgebaut. Kollagen Typ IV spezifische NP können an freiliegendes Gewebe binden und Ac2-26 freisetzen (Lee et al., 2024).

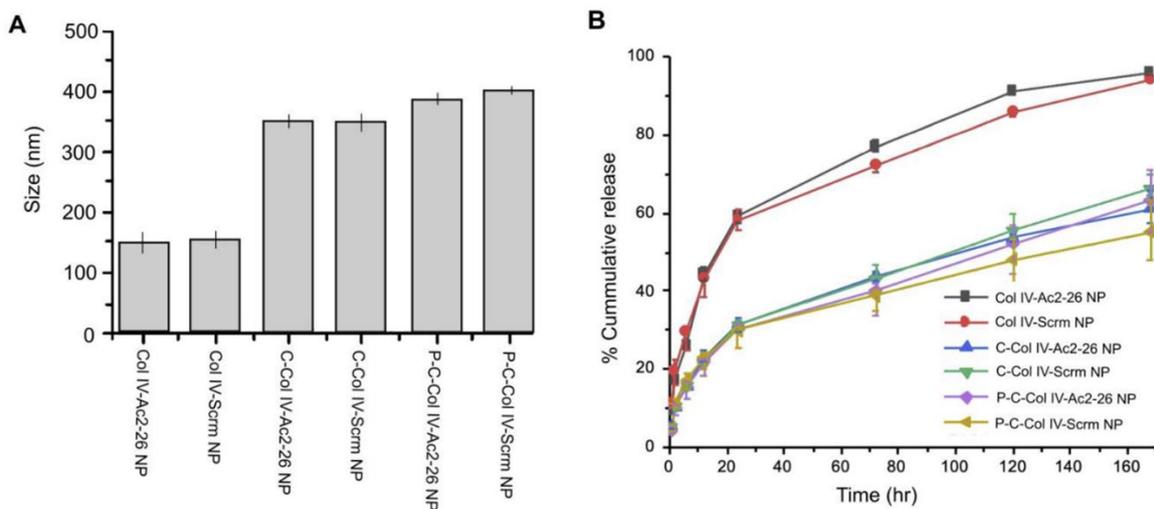


Abbildung 2: Dimensionen der NP sowie Freisetzung von Ac2-26.

Einleitung

A) Die Kollagen Typ IV spezifischen NP vergrößern ihren Durchmesser durch Anlage von Chitosan (C) und Pektin (P); B) Kumulierte Freisetzung des Ac2-26/Scrm-Peptids aus den NP bei 37 °C in Stunden; Kollagen-IV-spezifische Nanopartikel mit Ac2-26 beladen (Col IV-Ac2-26 NP); Pektin-Chitosan Hülle (P-C); durch mismatch erzeugte Peptide (Scrm); (Lee et al., 2024).

4 FRAGESTELLUNG

Pathophysiologie und molekulare Mechanismen der intestinalen Wundheilung von Anastomosen sind zum aktuellen Zeitpunkt weiterhin unvollständig beschrieben und erforscht. Während Glukokortikoide bereits eine mit vielen Nebenwirkungen verbundene Methode in der Behandlung von Kolitis darstellen, strebt die Wissenschaft nach neuartigen und komplikationsarmen Behandlungsmethoden. Ein positiver Effekt von ANXA1/Ac2-26 auf die Entzündungsaktivität konnte bereits vielfach gezeigt werden. Im Falle der intestinalen Wundheilung bestehen erste Erkenntnisse basierend auf systemischer Applikation dieser Peptide. Die von uns durch orales DSS induzierte experimentelle Kolitis ähnelt unter mikroskopischen Aspekten der Colitis ulcerosa. Schon zuvor konnte unsere Arbeitsgruppe anhand einer systemischen Applikation positive Effekte von ANXA1-beladenen Nanopartikeln auf die intestinale Anastomosenheilung zeigen.

Erstens soll der Effekt einer lokalen, oralen Applikation von Ac2-26 auf klinische, funktionelle und histologische Aspekte von Wundheilung und Krankheitsaktivität eruiert werden. Diese Versuche beziehen sich auf den perioperativen Verlauf von chirurgischen Interventionen im intestinalen Gewebe unter experimenteller Kolitis.

Zweitens soll die Applikation von Ac2-26 durch neuartige und speziell formulierte Nanopartikel geschehen, welche eine Bindungsstelle für Kollagen IV besitzen und zur gastrointestinalen Passage mit Pektin und Chitosan beschichtet sind. Diese Nanopartikel sowie deren Wirkung sollen als neuartiger Ansatz der perioperativen Therapie von experimenteller Kolitis repräsentativ für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen evaluiert werden.

5 METHODEN UND MATERIALIEN

Tabelle 2: Materialien.

Pinzette (fein)	Student Dumont #5 Forceps Art. Nr. 9115020 (FINE SCIENCE TOOLS, Heidelberg, GER)
Pinzette 2	Peha-Micro-Adson-Pinzette REF Nr. 9910671 (Paul Hartmann AG, Heidenheim, GER)
Schere (fein)	Fine Scissors Art. Nr. 14060-11 (FINE SCIENCE TOOLS, Heidelberg, GER)
Retraktor	Alm Retractor with Blades Art. Nr. 17009-08 (FINE SCIENCE TOOLS, Heidelberg, GER)
Nadelhalter (fein)	Round Handled Needle Holders Art. Nr. 12075-12 (FINE SCIENCE TOOLS, Heidelberg, GER)
Nadelhalter 2	Castroviejo Needle Holder Art. Nr. 12565-14 (FINE SCIENCE TOOLS, Heidelberg, GER)
Bulldog Klemme	Bulldog Serrefined REF Nr. 18501-50 (FINE SCIENCE TOOLS, Heidelberg, GER)
Pipetten	Eppendorf Research plus (Eppendorf AG, Hamburg, GER)
Biopsie Stanze	Standard Biopsiestanze Art. Nr. 48501 (pfm medical ag, Köln, GER)
Ohrstanze	Napox REF Nr. KN292-2
Spritze	Injekt Luer Solo, REF Nr. 4606051V (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER)
Einmalkanülen	Sterican Standardkanülen REF Nr. 4657705 (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER)
Kompressen	Vliwasoft (R) Split dressing REF 12009 (Lohmann & Rauscher GmbH & Co.KG, Neuwied, GER)
Wattestäbchen	Wattestäbchen-steril REF 974205 (NOBAMED Paul Danz AG, Wetter, GER)
Mainz COLOVIEW System	Siehe nächste 8 Zeilen
Kamerasystem	IMAGE1 S H3-Z Drei Chip-FULL-HD- Kamerakopf (KARL Storz SE & Co. KG, Tuttlingen, GER)

Methoden und Materialien

Kontrollsystem	IMAGE 1 HUB HD-Kamera-Kontrolleinheit SCB (KARL Storz SE & Co. KG, Tuttlingen, GER)
Kaltlicht-Fontäne	Cold Light Fountain XENON 175 SCB (KARL Storz SE & Co. KG, Tuttlingen, GER)
Schaft	Protection and Examination Sheath, 8,5 cm, 7 Fr, blue (KARL Storz SE & Co. KG, Tuttlingen, GER)
Optik	Hopkins Straight Forward Telescope 0° (KARL Storz SE & Co. KG, Tuttlingen, GER)
Fiberoptik Kabel	Fiber Optic Cable, diameter 2,5mm, length 180 cm (KARL Storz SE & Co. KG, Tuttlingen, GER)
Display	X-17 (AG neovo, Taipei, TWN)
Katheter	OMNIBAR E5F (RAUMEDIC AG, Helmbrechts, GER)
Datalogger	MPR 1 DATALOGGER (RAUMEDIC AG, Helmbrechts, GER)
PVK	Vasofix® Braunüle® 1,10 x 33 mm G 20 rosa, FEP (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER)
Waage	Präzisionswaage PCB Art. Nr. PCB 1000-2 (KERN & Sohn SmbH, Balingen-Frommern, GER)
Heizmatte	Pet-Mat Dragon Heizmatte Deluxe 10 Watt 15x25 cm (Dragon Terraristik, Duisburg, GER)
Mikroskop	Olympus SZ61 (OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG, Hamburg, GER)
Narkosegerät	UniVet Porta (Groppler, Deggendorf, GER)
Operationsleuchte	LED 2 SC Art. Nr. 16 000 151 (Dr. Mach, Ebersberg, GER)
Hämocult	HAEMOCCULT SENSА Art. Nr. 395034 (Beckmann Coulter, Brea, USA)
PFA	PFA vom Klinikum rechts der Isar Krankenhausapotheke 8 %, 1000ml
PBS	PBS Dulbecco Art. Nr. 182-50 (Biochrom GmbH, Berlin, GER)

Methoden und Materialien

RNAlater	RNAlater RNA Stabilization Reagent (250 ml) Art. Nr. 76106 (QIAGEN GmbH, Hilden, GER)
DSS	Dextran Sulfate Sodium Salt – Kolitis Grade (36 000-50 000 MW) Art. Nr. 160110 (MP Biomedicals, LCC, Solon, Ohio, USA)
NaCl	Isotonische Kochsalzlösung 0,9 % Art. Nr. B101153 (Fresenius KABI, Bad Homburg, GER)
Wunddesinfektion	Octeniderm (R) farblos, REFPZN-3673202 (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, GER)
Rollenpflaster	Leukofix REF 02138-00 (BSN medical GmbH, Hamburg, GER)
Isofluran	Isofluran Baxter vet 1000mg/ml (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, GER)
Gleitgel	Instillagel 6ml, Artikelnummer 335003 (FARCO-PHARMA GmbH, Köln, GER)
Faden	Ethicon VICRYL violett monofil 9-0 Art. Nr. V239G (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, GER)
Faden 2	Ethicon PROLENE blau monofil 5-0 Art. Nr. EH7477H (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, GER)
Faden 3	Ethicon Vicryl SUTUPAK 4-0 REF V1214 (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, GER)
Slide Scanner	Pannoramic MIDI (3DHISTECH, Budapest, HUN)
Mikrotom	Leica RM2255 (Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA)
Kühlplatte	COP 30 (MEDITE Cancer Diagnostics, Inc., Orlando, FL, USA)
Wasserbad	GFL 1052 (GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, GER)
Tierfutter	1314 Zuchtdiät – fortified, 10mm Pellets (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Seelenkamp, D)
Käfigstreu	Safe Selection (J. RETTENMAIER & SÖHNE GmbH + Co. KG, Rosenberg, D)
Histologie-Evaluationssoftware	CaseViewer (3DHISTECH Ltd, Budapest, HUN)

5.1 TIERVERSUCHE

Die hier durchgeführten Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium der Regierung von Oberbayern genehmigt (TVA-Nummer: Vet_02-17-203 sowie Vet_03-18-24).

5.2 AUSWAHL DES MAUSSTAMMES UND HALTUNG DER VERSUCHSTIERE

Die im Experiment verwendeten Mäuse entspringen dem Inzuchtstamm BALB/c vom Züchter Charles River. Die Auswahl des Mausstammes sowie des Geschlechts war durch vorangegangene Experimente in unserer Arbeitsgruppe vorgegeben.

Die Versuchstiere waren zu Beginn des Experiments zwischen 9 und 16 Wochen alt. Das Startgewicht lag zwischen 19-23 g. Zur Haltung wurden Greenline GM500 Mausekäfige vom Hersteller Tecniplast verwendet. Das Käfigstreu bestand aus Naturfaser (J. RETTENMAIER & SÖHNE GmbH + Co. KG, Rosenberg, D). Hierbei betrug die maximale Anzahl der Mäuse pro Käfig vier Tiere. Tiere, welche aggressives Verhalten gegenüber Artgenossen aufzeigten, wurden in Einzelkäfigen isoliert. Dies trat jedoch nur vereinzelt auf und war meist erst postoperativ der Fall. Futter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Seelenkamp, D) und Trinkwasser wurde den Mäusen ad libitum zur Verfügung gestellt. Nach dem operativen Eingriff wurden die Tiere in frische Käfige mit einigen angefeuchteten Futterpellets gegeben, um die Nahrungsaufnahme zu erleichtern. Operierte Tiere wurden nur mit anderen operierten Tieren untergebracht, sodass zu keinem Zeitpunkt prä- und postoperative Tiere in einem Käfig waren, um aggressives Verhalten zu unterbinden. Der natürliche Hell-Dunkel-Zyklus von 12:12h/d wurde stets eingehalten. Im Operationsraum wurden die Tiere in einem separaten Lagerungsschrank aufbewahrt, um auch hier ideale Umgebungsbedingungen zu wahren. Die Umweltbedingungen wurden an die natürlichen Bedürfnisse der Mäuse angepasst. Die Temperatur betrug 23-25 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45-55 %.

5.3 ANWENDUNG VON DEXTRAN SODIUM SULFAT (DSS)

DSS (MP Biomedicals, LCC, Solon, Ohio, USA) induziert im Mausmodell eine Kolitis, welche der menschlichen Colitis ulcerosa sehr ähnlich ist (aborale Betonung, von der Mukosa ausgehend, Ulzerationen). Als Ursache wird eine Schädigung der Epithelzellen im Darm vermutet. Im Experiment wurden 250 ml Wasser mit verschiedenen Mengen DSS gemischt. Für die 2 % Lösung wurden 5 g DSS-Pulver verwendet, während wir für die 3 % Lösung 7,5 g DSS verwendeten und für die 5 % Lösung 12,5 g DSS auf jeweils 250 ml Wasser verwendeten. Nach dem vollständigen Auflösen des Pulvers wurden die Flaschen sofort an den Käfigen angebracht. Die DSS-Lösung blieb für 7 Tage die einzige Trinkwasserquelle der Mäuse und stand diesen ad libitum zur Verfügung (Abbildung 3). Postoperativ wurden die Tiere in einen neuen Käfig gesetzt, in welchem wieder reines Trinkwasser zur Verfügung

stand. Durch dieses Absetzen der Kolitis-auslösenden Lösung wurde die Remission des entzündeten Gewebes nach einem Gewebe resezierenden operativem Eingriff bei den Mäusen simuliert.

5.4 PEKTIN-CHITOSAN BESCHICHTETE-AC2-26-BELADENE NP

Alle Methoden im Zusammenhang mit Nanotechnologie und den NP wurden in Kooperation mit *Dr. Nazila Kamaly* vom Imperial College London / Technische Universität Dänemark in Kopenhagen entwickelt und angewendet. Hierzu gehören die Synthese sowie die Entwicklung, aber auch die biochemische Analyse der NP. Details zu den NP sowie zu Entwicklung und Synthese der NP finden sich auch in der dazugehörigen Publikation von *Kamaly et al.* (Kamaly et al., 2013) (Lee et al., 2024).

Für die orale Applikation mussten die in früheren Experimenten zur intraperitonealen Applikation entwickelten Nanopartikel modifiziert werden. Die in diesen Experimenten verwendeten Nanopartikel besitzen eine zusätzliche Hülle aus Pektin und Chitosan.

Diese Nanopartikel enthalten biologisch abbaubare Kollagen Typ IV-bindende Polymere. Die verwendete sehr kurze PEG-Sequenz von etwa 534,6 Da ermöglicht eine Chitosanhülle um die Nanopartikel. Die positiv geladene Chitosan-Hülle ermöglicht im nächsten Schritt eine elektrostatische Anlagerung von negativ geladenen Pektin-Polymeren. Diese Hülle schützt ihren Inhalt während der Magenpassage vor vorzeitigem Abbau und stellt eine gängige Methode zur spezifischen und gezielten Verabreichung von Wirkstoffen im Darm dar. Als Kontrollgruppen wurden Kollagen Typ IV bindende NP mit zufällig generierten, isoelektrischen *miss-match scrambled (Scrm)* Peptidsequenzen hergestellt. Die Größe der Kol-IV Ac2-26 NP sowie der Kol-IV Scrm Ac2-26 NP beträgt 149.0 ± 2.5 nm und 155.25 ± 3.7 nm. Durch die zusätzliche Chitosan-Hülle vergrößern sich die NP auf etwa 350 nm. Mit dem äußeren Pektinmantel beträgt der Durchmesser der Nanopartikel etwa 400 nm. Nach der eintägigen Produktion wird das Endprodukt durch Gefriertrocknung stabilisiert.

5.5 ORALE APPLIKATION VON AC2-26-BELADENEN NP

Wirkstoff und Placebo wurden im Gefrierfach bei maximal -8°C gelagert. Die lokale Wirkstoff-, und Placebo-Applikation erfolgte anhand einer oralen Gavage alle 3,5 Tage. Die jeweilige Dosis der NP wurde in 0,25 ml isotonischer Kochsalzlösung gelöst, dann wurde die Lösung in einer Spritze aufgezogen. Die Tiere wurden an Nackenfalte und Schwanz fixiert und in aufrechter Lage gehalten. Ein peripherer Venenkatheter wurde peroral in den Magen vorgeschoben. Zuerst wurde die Spitze des Katheters in Richtung des Rachens der Maus navigiert bevor der Kopf im Nacken extendiert wurde, um den Katheter senkrecht nach unten in den Magen der Maus vorzuschieben. Dort folgte die Applikation der Nanopartikel in das Magenlumen. Beobachtungen und Kontrollen während der Versuche zeigten, dass die Tiere das gesamte applizierte Flüssigkeitsvolumen im Magen behielten und somit kein Wirkstoff verloren ging.

Methoden und Materialien

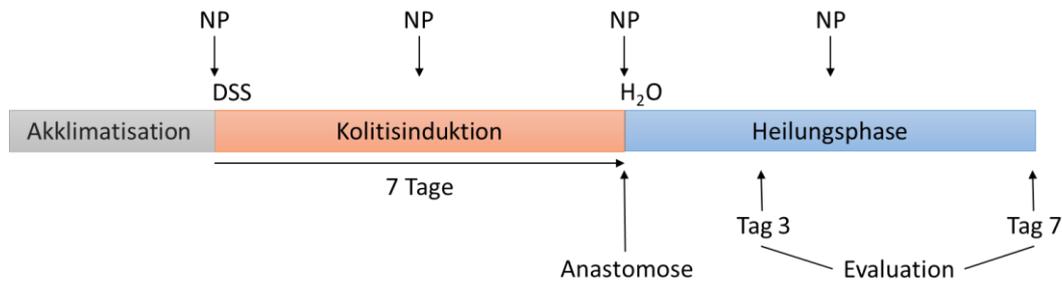


Abbildung 3: Zeitleiste zum Versuchsablauf mit Applikation der NP.

5.6 MEDIKAMENTENANSATZ

Die Analgesie bestand aus einer Kombination von zwei Wirkstoffen. Erstens aus dem nichtsteroidalen Antirheumatikum Metacam (Meloxicam) aus der Gruppe der Oxicame. Gemäß seiner Wirkstoffklasse wirkt Metacam antiphlogistisch, antipyretisch und analgetisch. Zusätzlich wurde das hochpotente Opioid Buprenorphin verwendet (WHO Stufenschema Klasse 3), welches als Partialantagonist der μ -Rezeptoren und κ -Rezeptoren eine Wirkdauer von 6 bis 8 Stunden besitzt und stark analgetisch wirkt. Metacam wurde präoperativ 20 Minuten vor dem Eingriff sowie am Operationstag postoperativ während der Abendkontrolle verabreicht. Zusätzlich erhielten die Mäuse Metacam am ersten und zweiten postoperativen Tag jeweils am frühen Morgen um 7 Uhr um eine bestmögliche Analgesie zu erreichen. Die Dosis betrug jeweils 0,02 mg. Buprenorphin wurde präoperativ 20 Minuten vor dem Eingriff und postoperativ bei der Abendkontrolle am Operationstag in einer Dosis von jeweils 0,002 mg verabreicht. Die Injektion erfolgte jeweils in das subkutane nuchale Fettgewebe. Zeigten die Versuchstiere Anzeichen von Schmerzen wie Abwehrspannung unter Palpation des Abdomens oder ein ängstlich-vermeidendes Verhalten verbunden mit Schmerzen, so wurden Metacam als Bedarfsmedikation prolongiert oder in seltenen Fällen nach dem Absetzen wieder neu angesetzt. Die jeweilige Dosis der Bedarfsmedikation belief sich in diesem Fall auf die angegebenen Dosen der Standardmedikation.

5.7 NARKOSE

Zur Sedierung wurden die Versuchstiere in einer für Mäuse undurchsichtige Einleitungskammer aus rotem Plexiglas platziert. Nach dem schnellen Anfluten der Kammer mit Isofluran und dem Aussetzen des Stellreflexes wurde die Maus in Rückenlage auf ein teilweise isoliertes Wärmepad gelegt. Dabei platzierten wir die Nase in der Respirationsmaske, um die Narkose unter 2-3 % Isofluran und einem Sauerstofffluss von 1-2 Liter pro Minute aufrecht zu erhalten. Zur Analgesie wurde zusätzlich 0,02mg Metacam und 0,002mg Buprenorphin 20 Minuten vor Beginn des operativen Eingriffs subkutan verabreicht.

5.8 OPERATIVER EINGRIFF / ANLEGEN DER ANASTOMOSE

Die Operation erfolgte in Rückenlage der Maus, wobei die Extremitäten durch Rollenpflaster an der Unterlage fixiert wurden. Zur Kontrolle der Narkosetiefe wurde ein erloschener Zwischenzehenreflex getestet. Es folgte eine Applikation von Bepanthen-Augensalbe zum Schutz der Augen gegen das Austrocknen. Dann wurde der Bauch der Maus im Operationsgebiet rasiert und mit Haut- und Wunddesinfektionsmittel desinfiziert. Eine zweizeitige, mediane Laparotomie wurde nach Desinfektion des Operationsgebietes durchgeführt. Die Schnitte verliefen von dem Unterrand des Sternums bis zur Oberkante der Symphyse. Der tatsächliche Schnitt war jedoch fast immer etwas kleiner um die Tiere zu schonen und die Wundheilung zu erleichtern. Im Idealfall betrug die Länge der Inzision etwa 2 cm. Hierbei wurde zuerst ein Hautschnitt durchgeführt, auf welchen in einem zweiten Schritt ein Schnitt entlang der Linea alba durch die Bauchwand folgte. Die Bauchwand wurde mit dem Wundspreizer offengehalten. Das Dünndarmpaket wurde mit der Hilfe von sterilen Wattestäbchen stumpf aus dem Abdomen präpariert und seitlich der Maus abgelegt. Die Lagerung des Darmpakets während der Operation erfolgte zwischen den Lagen einer befeuchteten Kompresse, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Das Präparieren des Kolons bedurfte in den meisten Fällen einer Mobilisierung des Uterus sowie des umgebenden Fettgewebes in Richtung der Symphyse. Hierbei wurde durch eine druckfreie Lagerung unter einer weiteren feuchten Kompresse das Operationsgebiet von störendem Gewebe befreit. Auch die Blase und jegliches weitere Fettgewebe wurden perioperativ mit befeuchteten Kompressen abgedeckt. Dann wurde mit einer atraumatischen Schere ein Schnitt quer durch das Kolon durchgeführt. Das zum Lumen parallel an der Unterseite verlaufende Hauptgefäß und die quer verlaufenden Arkadengefäße wurden dabei geschont. Während eine Blutung der Arkadengefäße mit einem Tupfer gestillt werden kann, verlief ein Schnitt durch das versorgende Hauptgefäß, welches dorsal des Darms am Mesenterium verläuft, spätestens im postoperativen Verlauf letal. Um diese Blutungen zu verhindern wurde der Darm vor dem Schnitt mithilfe von Pinzetten atraumatisch angehoben. Zwischen den Arkadengefäßen wurde das Mesenterium mittels spitzer Pinzette perforiert und stumpf gespreizt. Durch einen in der Mesolücke rasch durchgeführten Schnitt mit der Schere wurde die Kontinuität des Darms unterbrochen, um hier eine Anastomose anzulegen. Mit VICRYL 9-0 Faden (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, GER) wurde zuerst ein dorsaler Haltefaden nahe an Mesenterium und Hauptgefäß angebracht. Es folgte ein ventraler Haltefaden, positioniert in einer Lage von 180° zum ersten Haltefaden beziehungsweise genau gegenüber. Diese Haltefäden wurden durch Bulldog-Klemmen fixiert, welche seitlich am Tier abgelegt die Darmenden während der Operation fixierten. Somit wurde eine optimale Annäherung sowie die bestmögliche Adaption der Anastomosenränder erreicht. Nach dem Aufspannen der Anastomose konnte dann die Vorderwand mit fünf weiteren Einzelknöpfen genäht werden. Hierbei wurde zuerst ein die Strecke halbierender zentraler Knoten angebracht um dann

Methoden und Materialien

zwischen diesem und den Haltefäden zwei weitere Knoten zu setzen. Zum Nähen der Hinterwand musste der Darm gewendet werden. Dazu wurde ein Haltefaden durch das vorher erzeugte oder präformierte Loch im Mesenterium hindurchgeführt bevor beide Bulldog-Klemmen auf der jeweils entgegengesetzten Seite platziert wurden. Nun wurde die rückseitige Darmwand in oben beschriebener Knotenabfolge ebenfalls mit fünf Einzelknöpfen genäht. Nach Vervollständigung der Anastomose wurden die Haltefäden gekürzt und der Darm wurde in seiner natürlichen Lage in das Abdomen reponiert. Unter Applikation von 1 Milliliter isotonischer Kochsalzlösung in das Abdomen wurde diese Rückverlagerung erleichtert sowie ein potenziell erfolgter Flüssigkeitsverlust ausgeglichen. Die Bauchwand wurde anschließend in zweizeitiger Technik mit PROLENE monofil 5-0 Faden (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, GER) in umgekehrter Reihenfolge zur Eröffnung der Bauchhöhle verschlossen. Bauchwand und Haut wurden jeweils in fortlaufender Nahttechnik verschlossen. Hierbei wurde auf eine spannungsfreie Anlage der Naht geachtet, um eine zugbedingte Anteflexion im Abdomen zu vermeiden. Zusätzlich sollte die Naht für die Versuchstiere nicht als störend empfunden werden, um Automanipulationen zu vermeiden. Bis zum Erwachen der Versuchstiere aus der Anästhesie wurden diese zur verbesserten postoperativen Beobachtung sowie zur Verringerung des Wärmeverlusts in der Hand des Operateurs gehalten. Erst nach dem vollständigen Erwachen aus der Narkose kamen die Versuchstiere in den ihnen zugeteilten postoperativen Käfig mit am selben Tag operierten Tieren aus demselben präoperativen Käfig.

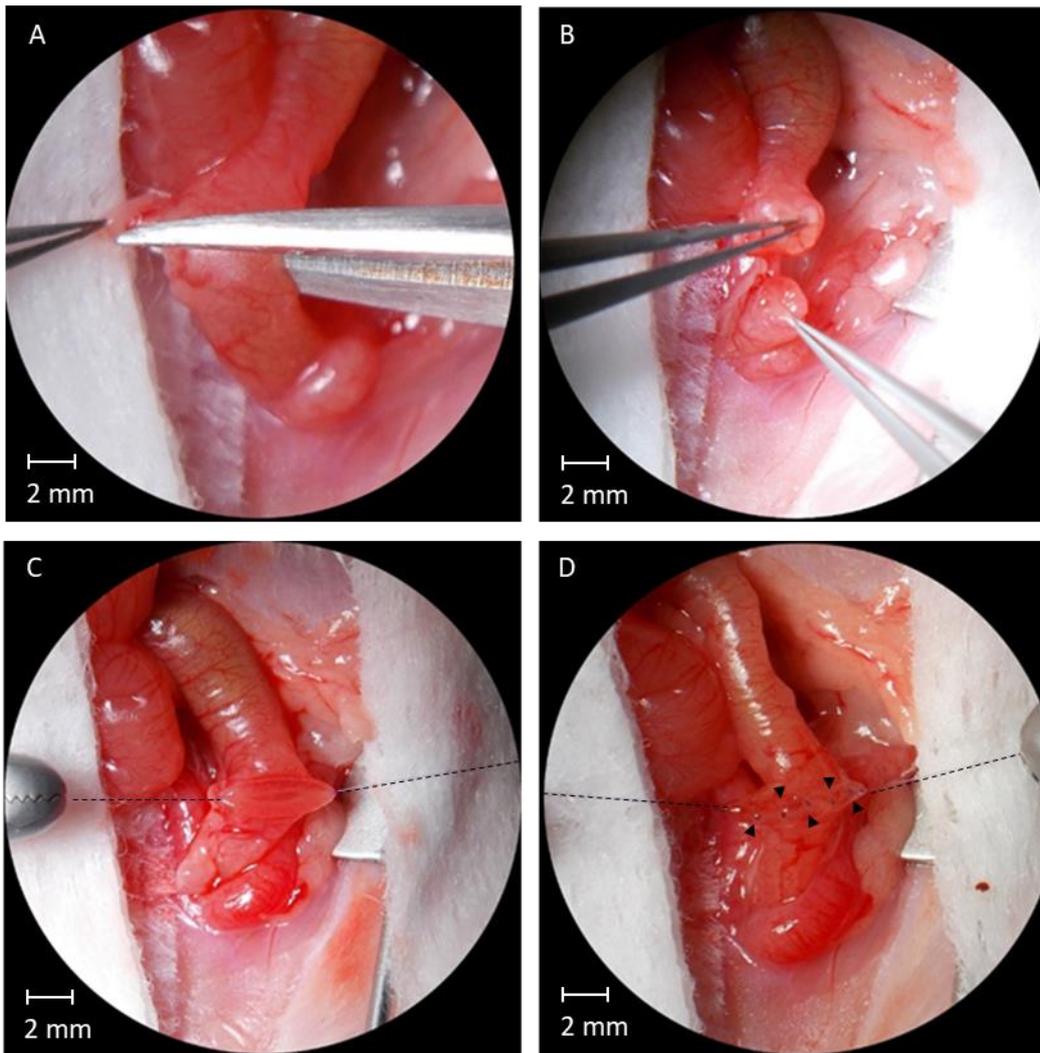


Abbildung 4: Operative Anlage einer kolorektalen Anastomose unter dem Mikroskop.

Nähte optisch hervorgehoben; A) Diskontinuität des Kolons; B) Adaption der Anastomosenenden und Nahtpunkte der Mesocolon Darmwand; C) Anbringung der Haltefäden; D) Nahtpunkte an der Meso-nahen Darmwand. Adaptiert nach: (Miltshitzky et al., 2021).

5.9 DISEASE ACTIVITY INDEX (DAI)

Zur Evaluation der experimentellen Kolitis und deren Krankheitsaktivität wurde der DAI verwendet. Hierbei wurden während der Experimente die Stuhlkonsistenz, Blut im Stuhl und der Gewichtsverlust als Parameter erhoben. Der DAI wurde sowohl präoperativ zum Abschluss der Induktion der Inflammation als auch am dritten und siebten postoperativen Tag erhoben. Der prozentuale Gewichtsverlust der Versuchstiere bezieht sich auf das Ausgangsgewicht zum Start der Experimente. Ein Gewichtsverlust von mehr als 20 % führte aus Tierschutzgründen gemäß TVA zur Euthanasie des betroffenen Versuchstieres. Lagen Blutbeimischungen vor, so wurde hier zwischen okkultem Blut und makroskopisch sichtbarem Blut unterschieden. Zur Detektion von okkultem Blut wurde ein Teststreifen (HAEMOCCULT SENS) verwendet. Die Stuhlkonsistenz wurde mit Hilfe von Wattetupfern per Druckprobe getestet. Die exakte Zuordnung der erhobenen Parameter und die daraus erhobene, den Gesamtscore des DAI bildende Summe des DAI sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Klassifikationssystem des Krankheitsaktivitätsindex.

Der Krankheitsaktivitätsindex (DAI)-Wert stellt den Durchschnitt der Einzelwerte aus Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz und Blut im Stuhl dar und beschreibt somit die Krankheitsaktivität beziehungsweise die Entzündung des Darmgewebes und den damit verbundenen Manifestationen. Der DAI nimmt einen Wert zwischen 0 und 4 an.

DAI-Wert	Gewichtsverlust	Stuhlkonsistenz	Sichtbares Blut im Stuhl
0	Kein Gewichtsverlust	Normal	Kein Blut
1	0 %-5 %	Normal	Kein Blut
2	6 %-10 %	Weich	Leichte Blutung
3	11 %-19 %	Weich	Leichte Blutung
4	>19 %	Durchfall	Starke Blutung

5.10 POSTOPERATIVE VERLAUFSKONTROLLEN

Die postoperativen Kontrollen wurden mit standardisierten Score-Sheets evaluiert. Die erfassten Parameter sind in Tabelle 4 Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 4: Parameter der Score-Sheets.

Ein summierter Wert von ≥ 4 führte zu Euthanasie.

Gewicht	0 = keine Reduktion
	1 = Reduktion von 0-5 %
	2 = Reduktion von 6-10 %
	3 = Reduktion von 11-19 %
	4 = Reduktion von >19%
Fell	0 = normal
	1 = Piloerektion
Verhalten	0 = normal
	1 = reduzierte Interaktion, keine Exploration
	4 = Apathie, Isolation, stereotypes Verhalten
Körperhaltung	0 = normal
	2 = intermittierendes Zittern oder Kauern
	4 = permanentes Zittern oder Kauern
Wundheilung	0 = unauffällig
	2 = nässende oder rote Wunde
	4 = Dehiszenz der Sutur / Platzbauch
Dehydration	0 = stehende Hautfalte < 2 s
	1 = stehende Hautfalte > 2 s
Schleimhäute	0 = rosig
	1 = blass
Stuhlkonsistenz	0 = geformt
	1 = Durchfall

Alle Versuchstiere durchliefen zur Kontrolle des Tierwohls eine tägliche Untersuchung gemäß den Kriterien der Scoresheets. Nach der Induktion der Kolitis wurden die Tiere täglich gewogen, da im Krankheitsverlauf das Gewicht der Mäuse variiert. Der Stuhl der Mäuse wurde auf dessen Konsistenz und (okkultes) Blut untersucht. Zusätzlich wurden Verhalten und Bewegung der Mäuse beobachtet. Anzeichen von Schmerzen, apathisches Verhalten, verringerte Fellpflege als Zeichen von Belastung und

Methoden und Materialien

Abwehrreaktionen bei Druck auf das Abdomen wurden täglich erhoben. Postoperativ war zusätzlich die Inspektion von Wunde und Hautnaht wichtiger Bestandteil der Untersuchung. Jedes Tier hatte ein zugewiesenes Dokument, auf welchem die Ergebnisse der täglichen Untersuchung dokumentiert wurden. Die tägliche Kontrolle der angegebenen Parameter stellte die Grundlage für den Verbleib der Tiere im Versuch oder deren Exklusion und Tötung im Rahmen des TVA.

5.11 KOLOSKOPIE

Das verwendete System war das Mainz COLOVIEW System (KARL Storz SE & Co. KG, Tuttlingen, GER). Die mit Isofluran sedierten Tiere wurden zur Koloskopie in Bauchlage gelagert und an den Hinterläufen mit Rollenpflaster fixiert. Zur Erleichterung der Untersuchung und im Rahmen der Gewebeschonung platzierten wir einen Tropfen steriles Instillagel (FARCO-PHARMA GmbH, Köln, GER) am Anus der Versuchstiere. Zur Insufflation des Darmrohres während der Koloskopie verwendeten wir eine 0,9% NaCl Lösung. Zwar wäre die Insufflation durch Luft theoretisch die bevorzugte Methode gewesen, jedoch benötigten die meisten Koloskopien Wasser zur Reinigung des Sichtfeldes von Stuhlrückständen. Dies konnte unter mehrfacher Injektion von Wasser in das Darmlumen erreicht werden. Nachteil und Preis dieser Methode war jedoch eine eingeschränkte Bildqualität, welche jedoch keinesfalls die Beurteilung der Koloskopien beeinflusste. Lediglich die Darstellung der Bilder in Druckform zeigt eine leichte Eintrübung durch die Flüssigkeit. Unter Sichtkontrolle am Bildschirm wurde die Optik bis zur linken Kolonflexur vorgeschoben. Die Videoaufnahme wurde vor Beginn des Rückzugs gestartet. Dann erfolgte die Videokoloskopie zur späteren Untersuchung und Evaluation der Anastomose sowie des restlichen Kolons. Besonderes Interesse galt hier der Anastomose selbst sowie der distalen Darmabschnitte zur Beurteilung der Entzündung, welche mit einer zirkulären Bewegung vollständig ausgelichtet und abgebildet wurden. Nach dem Verlassen des Darms wurde das Video beendet und gespeichert. Die visuell erkennbare Entzündungsaktivität im distalen Kolon diente zwar zur peri-experimentellen Beurteilung der Krankheitsaktivität für die Versuchsdurchführenden, ging jedoch später nicht in die Evaluation der Experimente ein. Auf eine in Vorgängerversuchen präoperativ durchgeführte Koloskopie wurde zur Schonung des Gewebes verzichtet, da sie keinen zusätzlichen Informationsgewinn darstellen konnte. Die Koloskopie stellte die zuerst durchgeführte invasive Evaluationsmethode vor der Tötung der Versuchstiere dar. Der endoskopische Score nimmt einen Wert zwischen 0 und 4 an und wurde anhand folgender Kriterien (Tabelle 5) erhoben.

Tabelle 5: Klassifikationssystem des endoskopischen Scores.

Endoskopischer Score	Visuelle Korrelation
0	keine Dehiszenz
1	Faden ragt ins Lumen
2	Dehiszenz weniger als $\frac{1}{4}$ der Zirkumferenz
3	Dehiszenz mehr als $\frac{1}{4}$ der Zirkumferenz
4	komplette Dehiszenz

Ein Durchschimmern des blauen Fadens durch die transparente Darmwand wurde nicht als Wert 1 definiert, da hier der Faden keinerlei Kontakt zum Darmlumen vorwies. Einzig ein Durchbruch des

Methoden und Materialien

Fadens in den Darm durch insuffiziente Heilung in der umgebenden Region ging mit einem Punkt in die Bewertung der Koloskopie ein. In diesen Fällen zeigte sich das Fadenende deutlich und teilweise durch Fibrinfaden ummantelt im Lumen.

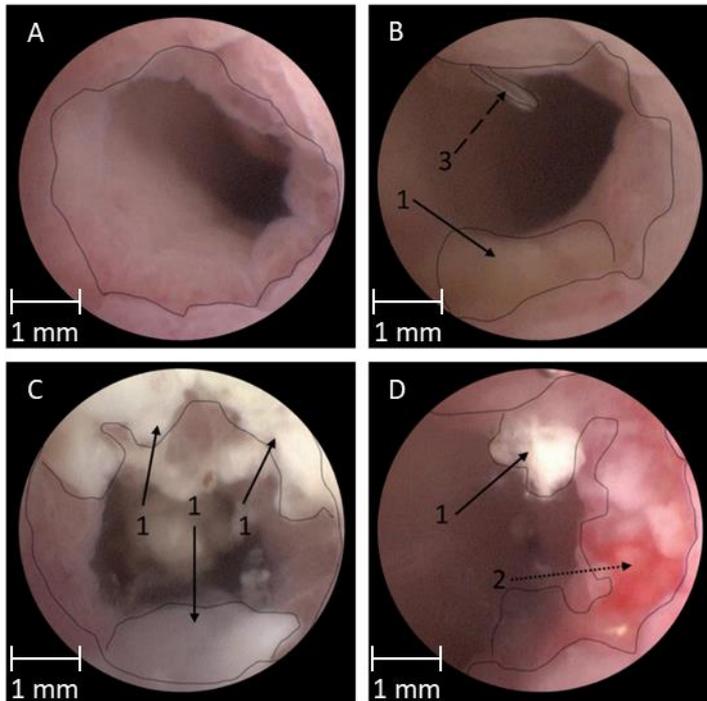


Abbildung 5: Anastomosen unter endoskopischer Kontrolle am Evaluationstag.

A) Gut verheilte Anastomose ohne Dehiszenzen, gut verheilte Anastomosenränder (graue Linie); B) Dehiszenz im unteren Abschnitt der Zirkumferenz (1) mit Fibrinbelägen, Faden ragt von oben ins Lumen (3); C) Vermehrte Zeichen von Dehiszenz (1) mit umlaufender Fibrinbildung, Sicht durch Schleim und Fibrin eingeschränkt; D) Kleine Dehiszenz (1) im oberen Abschnitt mit Einblutung (2) ins Lumen.

5.12 ADHÄSIONSSCORE

Um vor der Organentnahme einen Eindruck der intraperitonealen Situation zu beurteilen wurde ein Adhäsionsscore (Miltschitzky et al., 2021) angewendet. Dieser beurteilt die Umgebung der Anastomose je nach Vorliegen von sowie Quantität und Qualität von Adhäsionen. Der Adhäsionsscore nimmt Werte von 0 bis 7 an. Die einfließenden Parameter sollen in Tabelle 6 aufgeführt werden. Eine möglichst atraumatische und gleichzeitig vollständige Ablösung der Anastomosen nach Erhebung der Adhäsionen war in Hinsicht auf die Berstungsexperimente gewünscht.

Tabelle 6: Klassifikationssystem des Adhäsionsscores.

Der Adhäsionsscore betrachtet intraabdominelle Verhältnisse und nimmt einen Wert zwischen 0-7 an.

Uterus, Dünndarm oder Omentum verbunden mit der Anastomose?	1 Punkt je anhaftendem Organ
Haften weitere Organe an der Anastomose an?	0 = Nein; 1 = Ja
Sind anhaftende Organe per Tupfer abzulösen?	0 = keine Adhäsion vorhanden 1 = alle Adhäsionen sind stumpf ablösbar 2 = Adhäsionen nur teilweise ablösbar 3 = Adhäsionen nicht ablösbar

5.13 TÖTUNG

Die Tötung der Mäuse erfolgte im Anschluss an die Koloskopie durch zervikale Dislokation. Hierzu wurde der Nacken subokzipital mit der flachen Seite einer Pinzette fixiert, während der Schwanz proximal in die andere Hand genommen wurde. Durch eine rasche entgegengesetzte Zugbewegung wurde dann die Halswirbelsäule unter der Kontaktfläche von Nacken und Pinzette disloziert. Die dislozierten Enden der zertrennten Halswirbelsäule wurden zur Erfolgskontrolle mit dem Finger getastet. Zusätzlich zeigte sich bei den toten Mäusen ein Urinabgang, welcher jedoch nicht als sicheres Todeszeichen gewertet werden konnte. Die Organentnahme erfolgte im Anschluss. Im Rahmen der vorangegangenen Koloskopie befanden sich die Versuchstiere zum Zeitpunkt der Tötung noch in der Narkose, da sie entweder mit der Nase in der Atemmaske getötet wurden oder noch nicht aus der Narkose erwacht waren. Zwischen dem Herausnehmen der Tiere aus Narkoseapparatur und der Tötung vergingen in diesen Fällen nur wenige Sekunden.

5.14 ORGANENTNAHME UND BERSTUNGSDRUCK

Der post-mortem entnommene Darmabschnitt besaß eine Länge von circa 3 Zentimetern und enthielt die Anastomose im Zentrum. Vor weiterer Beeinträchtigung der Integrität des Gewebes wurde der

Darm mit einem Ende auf einen peripheren Venenkatheter (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER) gespannt. Das andere Ende wurde über einen Katheter zur Druckmessung des Kompartmentsyndroms (RAUMEDIC AG, Helmsbrechts, GER) gestülpt. Mit einem 4-0 Faden wurden beide Enden fixiert. Über den Venenkatheter wurde bis zum Erreichen einer Insuffizienz Kochsalzlösung in die Anastomose instilliert. Dabei wurde auf dem Datalogger zu jedem Zeitpunkt (RAUMEDIC AG, Helmsbrechts, GER) der Druckverlauf gemessen. Beim Erreichen des maximalen Drucks und dem folgenden Versagen der Darmwand wurde die genaue Lokalisation der Insuffizienz erhoben. Hier wurde eine unterscheidende Einteilung in zwei Kategorien vorgenommen. So konnte die Berstung entweder an der Anastomose und somit zwischen den beiden anastomosierten Darmenden oder außerhalb der Anastomose entstehen. Das Gewebe wurde zur histologischen Evaluation der Anastomose in PFA eingelegt.

5.15 SWISS ROLLS

Eine einfache Methode zur histologischen Aufarbeitung und Evaluation des gesamten Darms von Nagetieren stellt das sogenannte Swiss Roll Verfahren dar. Anhand dieser Methode war es möglich, den Darm histologisch in seiner vollen Länge auf Entzündung und ulzerierte oder in der Integrität gestörte Läsionen sowie andere Kolitis-typische Aspekte zu untersuchen. Im Gegenzug konnte bei diesen Tieren keine klassische Auswertung der Anastomose per Berstungsdruck durchgeführt werden, da diese zum Gewebeschaden führen würde. Die Methode wurde somit vor dem Durchführen der Hauptexperimente zur Beurteilung einer experimentellen DSS-Konzentration von 3 % verwendet. Die angedachte Konzentration von 3 % stellte sich zu Beginn der Experimente in Kombination mit der Operation als zu belastend für die Tiere dar. Das Swiss Roll Verfahren ermöglichte durch Betrachtung der histologischen Folgen verschiedener DSS-Dosen eine Dosisfindung. Eine optimale Ausprägung der experimentellen Kolitis erreichten wir durch eine DSS-Konzentration von 2 % (Reischl et al., 2021), hier lagen Ulzerationen und Erosionen vor ohne in Kombination mit der Operation eine zu hohe Belastung für die Versuchstiere zu bedeuten.

Wichtiger war das Swiss-Roll-Verfahren jedoch in der Entscheidungsfindung zur Auswahl der wirksamsten Beschichtung der neuen, oral applizierten Nanopartikel. Hier wurde ein Vergleich zwischen Placebo-Gruppen, mit Pektin-Chitosan beschichteten Nanopartikeln und Beta-Lactoglobulin beschichteten Nanopartikeln durchgeführt. Details zur Architektur dieser Nanopartikel sind dem dazugehörigen Kapitel zu entnehmen. In diesen Versuchsgruppen führten wir eine 7-tägige Induktion der Kolitis mit DSS in einer Konzentration von 5 % durch. Zwar wurde in diesen Gruppen keine Operation durchgeführt, die Induktion der Entzündung wurde dennoch am siebten Tag beendet. Die Organentnahme wurde in den Gruppen je 3 und 7 Tage nach dem Ende der Induktionsphase durchgeführt.

Der gesamte Dickdarm wurde vom Zäkum bis zum Darmausgang entnommen und mit PFA ausgespült. Dann wurde er längs aufgeschnitten, unter Schonung der Mukosa ausgebreitet, und von distal nach proximal auf einer feinen Pinzette aufgerollt. Zur Prävention von Läsionen der Mukosa und im Sinne der Replizierbarkeit der Auswertung sollte hier die Mukosa immer nach innen gerichtet sein. Im Anschluss wurde die Swiss Roll mit einer feinen Kanüle fixiert und in PFA konserviert. Eine regelrechte Einbettung in Paraffin wurde durchgeführt und daraus erhaltene Schnitte wurden in HE-Technik gefärbt. Nach der histologischen Aufarbeitung wurden die Präparate eingescannt und zur weiteren Analyse digitalisiert. Die Auswertung erfolgte nach der histologischen Aufarbeitung am Computer. Hierbei wurde der Zustand der Darmwand in drei unterschiedliche Gruppen kategorisiert. Es bestand eine Abstufung je nach Beeinträchtigung der Integrität. Hierbei wurde zuerst die Gesamtlänge des aufgerollten Darmabschnitts an der Lamina muscularis mucosae gemessen. Um den *histologic colitis score* (HCS) (Garcia-Hernandez et al., 2021) zu ermitteln wurden die Darmabschnitte dann anteilmäßig in die drei Kategorien unterteilt:

- gesunde Schleimhaut
- entzündetes Gewebe
- ulzerierte Schleimhaut

Für diese Messungen verwendeten wir eine digitale Mikroskopie-Software (CaseViewer, 3DHISTECH Ltd, Budapest, HUN). Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte rechnerisch durch relative Anteile der verschiedenen Zustände an der Gesamtlänge des Darmabschnitts.

5.16 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG UND FÄRBUNG

Die histologische Aufarbeitung erfolgte in mehreren Schritten. Das zuvor in PFA eingelegte Gewebe wurde nach 10 Stunden in PBS eingelegt und dann entwässert. Darauf folgte die Einbettung des Gewebes in Paraffin. Die Paraffinblöcke wurden auf -15 °C abgekühlt. Zum Anfertigen der Schnitte verwendeten wir ein Leica RM2255 Mikrotom (Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA). Die Schnitte besaßen eine Dicke von 2,5 Mikrometer. Direkt nach dem Schneiden wurden das Gewebe in ein Wasserbad mit Temperaturen zwischen 40-50 °C gelegt. Dieser Schritt hatte den Zweck der Abflachung der Paraffinschnitte im direkten Kontakt mit dem warmen Wasser. Nach etwa zehn Minuten erfolgte die Applikation der Paraffinschnitte auf einen Objektträger. Diese wurden daraufhin für 24 Stunden in einem Trockenschrank bei konstanten 37 °C gelagert. Danach wurden die Schnitte, wie im Folgenden beschrieben, mit Hämatoxilin-Eosin-Färbung gefärbt.

Zunächst erfolgte die dreimalige Anwendung von Roticlear, wobei für jede Anwendung eine Dauer von 10 Minuten vorgesehen war. Anschließend wurde das Probenmaterial einer absteigenden Ethanol-Reihe unterzogen. Dabei wurden sechs Durchgänge durchgeführt, wobei jeder Durchgang drei

Methoden und Materialien

Minuten dauerte. Die verwendeten Ethanol-Konzentrationen für diese Reihe betragen 100 %, 100 %, 100 %, 95 %, 70 % und 50 %. Nach Abschluss dieser Schritte wurde das Probenmaterial für eine Minute in reinem Wasser geschwenkt.

Im Anschluss daran wurde das Probenmaterial für einen Zeitraum von 5-6 Minuten in einer lichtgeschützten Hämatoxylin-Lösung belassen, um eine angemessene Färbung zu gewährleisten. Nach der Hämatoxylin-Färbung erfolgte eine gründliche Spülung des Materials unter langsam fließendem Leitungswasser über einen Zeitraum von 10 Minuten. Anschließend wurde das Probenmaterial für einen Zeitraum von 90 Sekunden in Eosin eingetaucht.

Nach der Eosin-Färbung wurde das Material kurz in Wasser geschwenkt. Darauf folgte eine Serie von fünf Durchgängen in aufsteigender Ethanol-Reihe, wobei jeder Durchgang eine Dauer von drei Minuten aufwies. Die angewendeten Ethanol-Konzentrationen für diese Serie betragen 70 %, 95 %, 100 %, 100 % und 100 %. Nach Abschluss dieser Schritte wurde Roticlear erneut dreimal angewendet, wobei für jede Anwendung eine Dauer von 10 Minuten vorgesehen war.

Abschließend wurden Eindeckmittel aufgetragen und die Probenmaterialien mit Deckgläsern versehen. Diese durchgeführten Schritte stellen den Prozess dar, der im Rahmen dieser Experimente für die Präparation und Färbung der Probenmaterialien angewendet wurde.

5.17 HISTOLOGISCHE EVALUATION DER ANASTOMOSEN

Im Rahmen der Evaluation von Wundheilung und Entzündungsaktivität wurde nach der Tötung der Versuchstiere der Abschnitt rund um die Anastomose zur histologischen Evaluation entnommen. Dieser 1-2 cm lange Gewebeabschnitt wurde in 4 % Formalin-Lösung konserviert und im Labor histologisch aufgearbeitet sowie mit Hämatoxylin-Eosin eingefärbt. Zur Bewertung der Schnitte und der korrespondierenden Heilung der Anastomosen wurde der etablierte Phillips-Score hinzugezogen, und in einem weiteren Schritt durch funktionelle Kriterien erweitert. Die Kriterien der verschiedenen Evaluationsmethoden sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Histologisches Klassifikationssystem.

Zusammensetzung des Gesamtwertes der histologischen Evaluation aus Phillips-Score sowie dem funktionellen Score.

Phillips score	Entzündungszellen	(0 = Konfluente Zellen oder Fasern, 1 = Reichliches Vorkommen, 2 = Leichte Streuung, 3 = gelegentliches Vorkommen, 4 = kein Vorkommen)
	Einwachsende Blutgefäße/ Angiogenese	(0 = kein Vorkommen, 1 = gelegentliches Vorkommen, 2 = Leichte Streuung, 3 = Reichliches Vorkommen, 4 = Konfluente Zellen oder Fasern)
	Fibroblasten	(0 = kein Vorkommen, 1 = gelegentliches Vorkommen, 2 = Leichte Streuung, 3 = Reichliches Vorkommen, 4 = Konfluente Zellen oder Fasern)
	Kollagenbildung	(0 = kein Vorkommen, 1 = gelegentliches Vorkommen, 2 = Leichte Streuung, 3 = Reichliches Vorkommen, 4 = Konfluente Zellen oder Fasern)
Funktioneller Score	Erste verschlossene Schicht	erste histologische Schicht welche verschlossen / geheilt ist (von der Serosa aus gezählt / 0 = keine Schicht geheilt, 1 = Serosa, 2 = Muskularis, 3 =Submukosa, 4 = Mukosa)
	Anzahl verheilte Schichten	Anzahl der aneinander geheilten Schichten. (Bereich 0-4 / als Schichten zählen Mukosa, Submukosa, Muskularis, Serosa)
	Epithelschicht geschlossen	1 = ja, 0 = nein
	Krypten- Architektur wiederhergestellt	1 = ja, 0 = nein

Methoden und Materialien

Der histologische Gesamtwert bildet sich aus der Summe der einzelnen Scores; ein hoher Wert korreliert mit der histologischen Integrität und Heilung sowie Stabilität der Anastomose.

Unter den gegebenen Punkten wurde eine Evaluation durch die einzelnen Scores wie auch gemeinsam als eine Kombination aus Phillips-Score und den funktionellen Kriterien durchgeführt. Im Folgenden soll diese Analyse stellvertretend an einer Anastomose präsentiert werden.

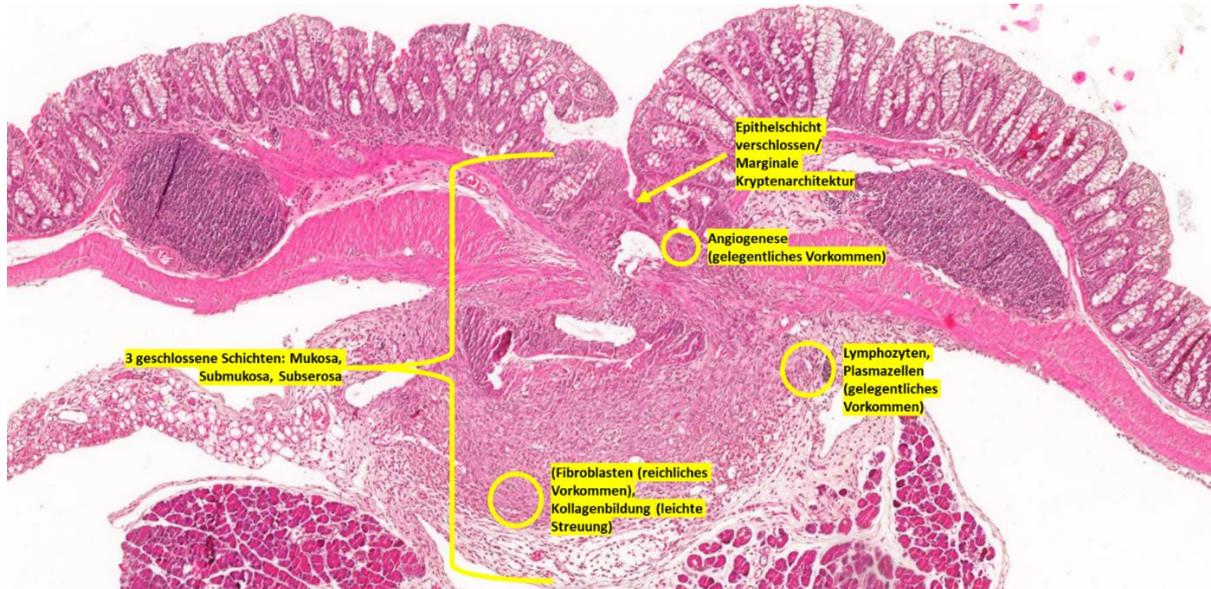


Abbildung 6: Scoring der Anastomosen.

Exemplarisch eine verheilte Anastomose (Niedrigdosisgruppe, POD 7) plus Evaluationsparameter (funktioneller Score = 9, Phillips Score = 8, Gesamtscore = 17).

Der Wundheilungserfolg der Anastomosen am Evaluationstag wird in den Experimenten zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Um Beispiele stellvertretend für verschiedene Heilungserfolge zu veranschaulichen, werden exemplarisch drei Anastomosen gezeigt. Diese Schnitte entspringen den verschiedenen Behandlungsgruppen sowie der Kontrollgruppe und wurden entweder am dritten postoperativen Tag oder am siebten postoperativen Tag entnommen. Die beiliegenden Gesamtwerte verbinden Phillips-Score und den funktionellen Score. Hier ist das Spektrum stellvertretend für die Allgemeinheit und umfasst sowohl insuffiziente Anastomosen ohne Wundheilung als auch fortgeschrittene Heilungsphasen mit wiederhergestellter Kryptenarchitektur.

Der Phillips-Score berücksichtigt das Vorkommen von Entzündungszellen, sowie Angiogenese, Fibroblasten und Kollagenbildung in der Region der Anastomose. Hier werden hauptsächlich Faktoren, welche die Wundheilung maßgeblich beeinflussen und die aktuelle Situation in der Umgebung des heilenden Gewebes mit dem Einfluss von Entzündungsaktivität beschrieben. Funktionelle Aspekte werden hier weniger genau betrachtet.

Methoden und Materialien

Um eine präzisere Beschreibung der Wundheilung zu erreichen, wurden weitere Merkmale zur Beschreibung des Heilungszustandes hinzugefügt. Die erste verschlossene Schicht, von der Serosa von extraluminal nach intraluminal gezählt, bestimmt maßgeblich sowohl die Stabilität als auch die Tiefe des geheilten Gewebes. Hier spielt auch die Anzahl der bisher geheilten und verschlossenen Schichten eine große Rolle. Eine verschlossene Epithelschicht zeigt oft eine weit fortgeschrittene Heilung an, wenn diese auch oft an der Epithelschicht beginnt. An einer wiederhergestellten Krypten-Architektur können weit fortgeschrittene Heilungsverläufe genauer in verschiedene Stadien unterteilt werden. Die funktionellen Evaluationsparameter, welche zum Phillips-Score hinzugefügt werden, ermöglichen somit eine bessere Grundlage zur Analyse der intestinalen Wundheilung. Funktionelle Aspekte mit klinischer Orientierung ermöglichen eine bessere Beurteilung der mechanischen Stabilität sowie der Dichte des Wundverschlusses gegenüber im Colon enthaltenen Pathogenen und Mikroorganismen. Da der Phillips Score jedoch sehr etabliert ist, gibt er in diesem System mehr Punkte und nimmt somit im Vergleich einen größeren Einfluss auf die Ergebnisse.

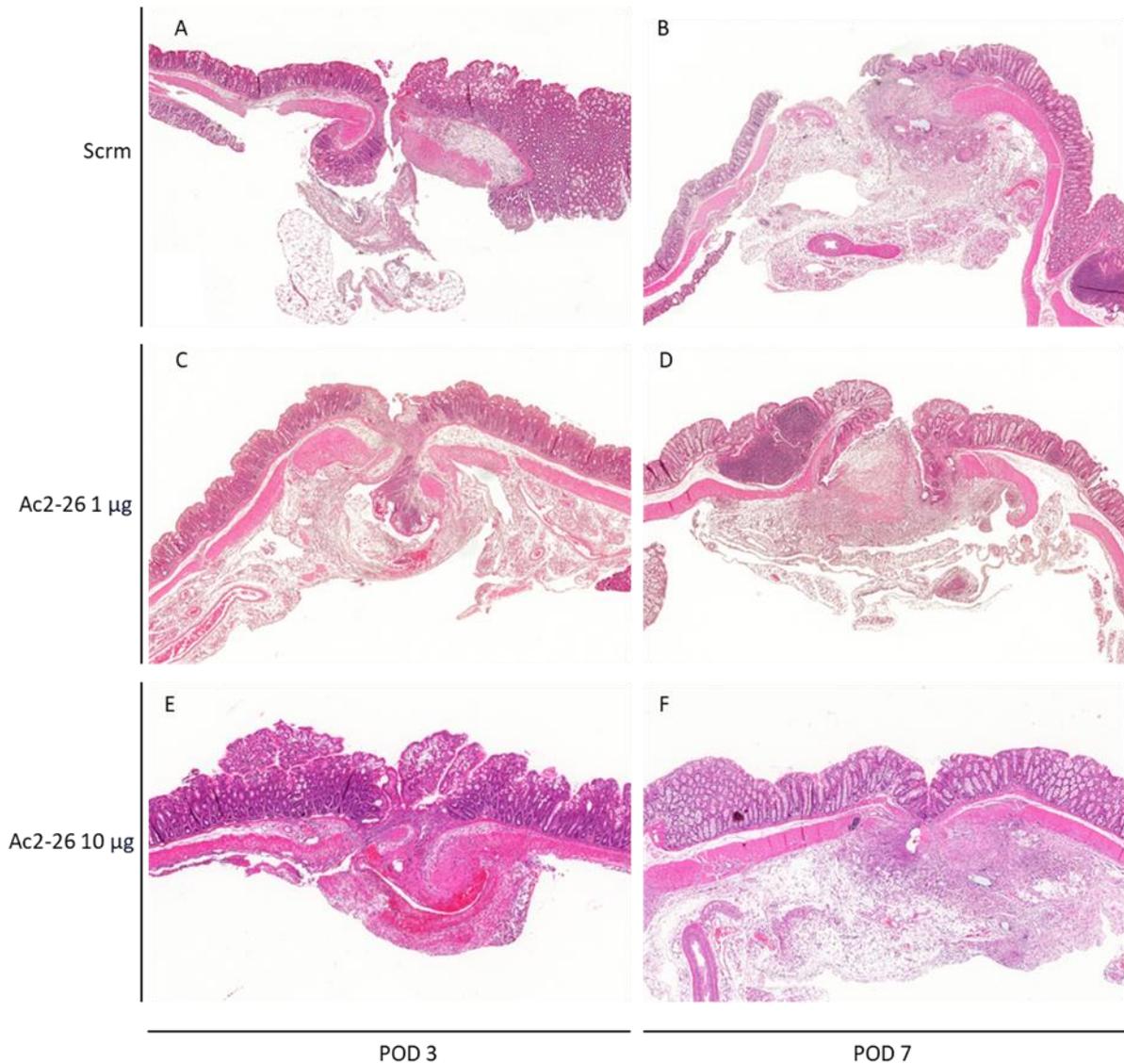


Abbildung 7: Beispielbilder von Anastomosen mit erzielten Scores.

Gefärbt in Hämatoxylin-Eosin Technik. Geordnet zu den einzelnen Behandlungsgruppen zu respektiven Evaluationszeitpunkten. A) (Phillips-: 1; Funktioneller-: 0; Gesamtscore: 1); B) (Phillips-: 3; Funktioneller-: 2; Gesamtscore: 5); C) (Phillips-: 4; Funktioneller-: 7; Gesamtscore: 11); D) (Phillips-: 7; Funktioneller-: 2; Gesamtscore: 9); E) (Phillips-: 6; Funktioneller-: 9; Gesamtscore: 15); F) (Phillips-: 7; Funktioneller-: 8; Gesamtscore: 15)

5.18 STATISTIK

Zur Testung auf Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk Test genutzt. Parametrische Ergebnisse sind als Mittelwert + Standardabweichung angegeben während nichtparametrische Ergebnisse als Median + Interquartilsabstand angegeben sind. Für parametrische Ergebnisse wurde ein t-Test

Methoden und Materialien

zwischen den einzelnen Gruppen durchgeführt. Nichtparametrische Ergebnisse wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz getestet.

6 ERGEBNISSE

In den hier beschriebenen Ergebnissen soll nun die orale Applikation in Verbindung mit einer neuen Formulierung der schon zuvor verwendeten Nanopartikel auf deren Wirksamkeit und Effekt auf die Heilung der Anastomosen und die Entzündungsaktivität getestet werden.

6.1 DSS UND DESSEN EINFLUSS AUF DIE INTESTINALE ENTZÜNDUNGSAKTIVITÄT

Vor Beginn der Experimente wurden zwei Versuchsgruppen zur Dosisfindung der DSS-Konzentration verwendet. Die erste Versuchsgruppe erhielt eine 3 % DSS-Lösung zur Induktion der Entzündung. In dieser Gruppe war die Krankheitsaktivität jedoch so stark, dass eine Kombination mit der Operation unmöglich war. Von acht Tieren erreichten nur 25 % der Tiere das gewünschte Evaluationsdatum, während die anderen Versuchstiere schon vor dem geplanten Endpunkt ausgeschlossen werden mussten und bei diesen Tieren am geplanten Evaluationstag ohne vorhergegangene Operation lediglich Gewebeproben im Swiss-Roll-Verfahren zu entnehmen waren. Die zweite Versuchsgruppe erreichte eine 2 % DSS-Lösung. Diese Konzentration eignete sich in Kombination mit der angedachten Operation deutlich besser für die folgenden Experimente.

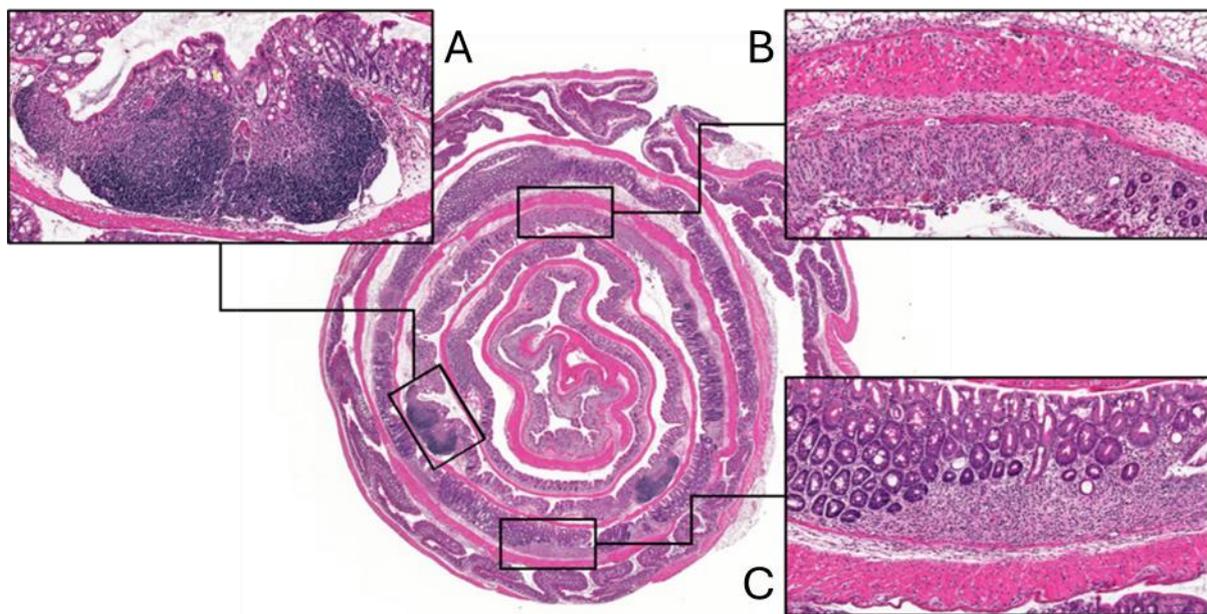


Abbildung 8: Beispiel einer Swiss-Roll.

Exemplarisch nach 7-tägiger Induktion der Kolitis, dargestellt sind typische Zeichen einer Colitis ulcerosa mit A) Ulzerationen der Mukosa, B) Verlust der Krypten-Architektur und C) Infiltration von Lymphozyten.

6.2 VERWENDUNG VON PEKTIN-CHITOSAN BESCHICHTETEN NANOPARTIKELN

Im Rahmen der oralen Gavage benötigen die NP eine additional Schutzhülle. Diese soll die NP im sauren Magenmilieu und vor den dort vorliegenden Proteasen schützen. Hier wird sowohl eine Biopolymer-basierte als auch eine Protein-basierte Methode verwendet. Im direkten Vergleich konnte eine Pektin-Hülle (Tag 10: M = 3,42; SD = 0,74) (Tag 14: M = 2,84; SD = 0,37) sowohl am 10. Tag nach Beginn der Kolitisinduktion als auch am 14. Tag nach Beginn der Induktion bessere Ergebnisse als eine Beta-Lactoglobulin-Hülle (Tag 10: M = 3,37; SD = 0,48) (Tag 14: M = 3,30; SD = 0,96) oder als das Placebomedikament (Tag 10: M = 3,97; SD = 0,56) (Tag 14: M = 3,75; SD = 1,02) erzielen.

Die Auswertung erfolgte anhand mikroskopischer Gesichtspunkte. Hierzu wurde in den verschiedenen Gruppen in Bezug auf die Gesamtlänge des entnommenen Darms zwischen Ileozökalklappe und Enddarm der Anteil von entzündetem und ulzeriertem Gewebe berechnet. Aus diesen Ergebnissen wurde der HCS-Wert erhoben. Es konnte weder am 10. noch am 14. Tag nach Beginn der Induktion ein signifikanter Unterschied zwischen der Placebo-, sowie den Behandlungsgruppen (Pektin-Beschichtung und Beta-Lactoglobulin-Beschichtung) festgestellt werden. Dennoch führte die Pektin-Beschichtung zu den niedrigsten HCS-Werten, gefolgt von Beta-Lactoglobulin-Beschichtung. Die höchsten Werte erreichte die Placebogruppe. Hohe Werte im HCS-Wert korrelieren mit hohen Anteilen von entzündeten und ulzerierten Darmabschnitten. Trotz fehlender Signifikanz in der statistischen Analyse fiel die Entscheidung nach Evaluation der Swiss-Rolls zugunsten der Pektin-Chitosan Beschichtung.

Ergebnisse

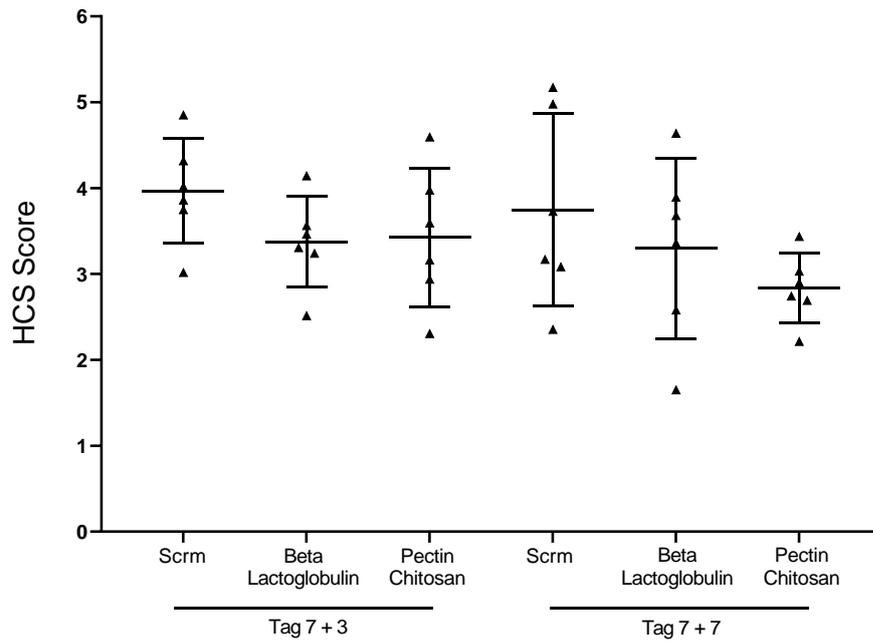


Abbildung 9: HCS-Score der Swiss Rolls.

Summe der Anteile von Ulzerationen und Inflammation an der Gesamtlänge der Swiss Rolls. Die mikroskopischen Auswirkungen der DSS-Kolitis auf die Darmwand und die Dämpfung des Befalls durch Ac2-26-NP (jeweils umhüllt mit Pectin-Chitosan, Beta-Lactoglobulin, sowie dem Placebo-Medikament) Bei parametrischer Verteilung durch ungepaarte beidseitige t-Tests. Gezeigt sind Mittelwert + SD. N=6 pro Gruppe. Keine Tiere ausgeschlossen.

6.3 EINFLUSS VON AC2-26 BELADENEN NP AUF DIE KRANKHEITSAKTIVITÄT

Während in Abschnitt 6.1 und 6.2 einzig die Colitis die Ergebnisse beeinflusste, werden ab 6.3 Ergebnisse aus Experimenten nach durchgeführter (Anastomosens-)Operation aufgeführt. Wie zuvor im Methodenteil beschrieben nimmt der DAI-Wert Bezug auf Stuhlkonsistenz, Blutbeimengungen im Stuhl sowie Gewichtsverlust. Bei Betrachtung des präoperativen DAI am siebten Tag der Induktionsphase zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Der DAI der mit Hochdosisgruppe (Md = 0,33; IQA = 0,67) war dennoch niedriger als in der Kontrollgruppe (Md = 0,67; IQA = 0,67). Der DAI der Niedrigdosisgruppe (Md = 0,67; IQA = 0,67) war vergleichbar mit dem DAI der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse zeigen keinen signifikanten Einfluss der Behandlung auf den präoperativen Verlauf der Kolitis. Die zur Induktion verwendete DSS-Konzentration führte zu einer milden Kolitis. Wie später im Kapitel zur Endoskopie beschrieben, führt dies in makroskopischer Hinsicht zu gering ausgeprägter Kolitis.

Die während der Experimente erhobene DAI-Werte korrelierten mit dem Allgemeinzustand und der subjektiv beobachteten Krankheitsaktivität der Mäuse. Der Gewichtsverlust hatte auf den präoperativen DAI nur wenig Einfluss da er sich in dieser Phase in allen Gruppen auf 1-3 % vom Ausgangswert belief. Tendenziell war der Stuhl zu Beginn des Experiments fest und geformt oder weich und geformt. Im Verlauf der Induktionsphase war ein Verlust von Konsistenz mit zunehmender Schleimbildung zu beobachten. Die Schleimfäden lagerten sich entweder direkt auf den Stuhl an oder waren in Schlieren daran gebunden. In letzterem Fall erschien der Stuhl in Schleim gebettet. In den ersten 2 bis 3 postoperativen Tagen war meist ein Rückgang in der Stuhlfrequenz zu beobachten. Teilweise waren bei den Tieren a.e. paralytisch bedingte Obstipationen zu beobachten, diese lagen aber in allen Gruppen zu einem gewissen Anteil vor. Ein bis zwei Tage postoperativ lagen vermehrt breiförmige, ungeformte Stuhlgänge von weicher Konsistenz, makroskopischer Blutbeimengung und viel Schleim vor. Um den dritten postoperativen Tag gingen diese Blutbeimischungen tendenziell in okkulte Mengen über, bevor sich der Stuhlgang etwa ab dem fünften postoperativen Tag zu normalisieren begann. Im Großteil der Fälle konnte dann kein Blut mehr im Stuhl nachgewiesen werden. Diese Normalisierung war vorrangig in den Behandlungsgruppen zu sehen, wohingegen die Kontrollgruppe weiterhin regelmäßig okkultes Blut und weniger geformten Stuhl aufwies. In den Kontrollgruppen lag vermehrt Blut im Kot am Ende der siebentägigen postoperativen Phase vor. Während es am dritten postoperativen Tag oft lange dauerte bis der Defäkation erfolgte, zeigte sich am siebten postoperativen Tag eine Zunahme der Stuhlfrequenz.

Ergebnisse

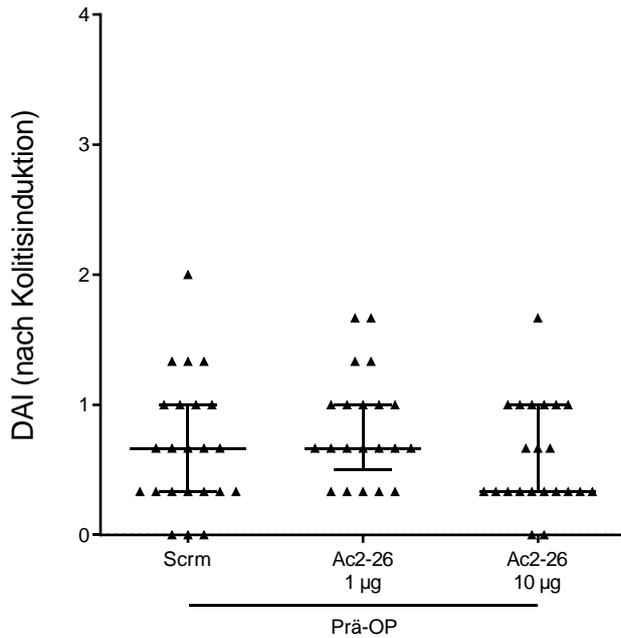


Abbildung 10: Präoperative Krankheitsaktivität.

Der präoperative DAI wurde nach der 7-tägigen Induktion der Kolitis durch 2 % DSS erhoben. Zur statistischen Evaluation der nichtparametrischen Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, $*(P < 0.05)$. Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. Gezeigt sind Median + IQA. $N=23$ (P-C-Col IV-Scrm NPs), $N=21$ (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 1 µg), $N=22$ (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 10 µg). Drei Tiere erreichten Abbruchkriterien und wurden ausgeschlossen (jeweils ein Versuchstier pro Gruppe), 3 Tiere wurden wegen intraoperativen Komplikationen ausgeschlossen (2 in Ac2-26 1 µg, 1 in Ac2-26 10 µg).

An POD 3 waren die DAI-Werte der Hochdosisgruppe (Md = 0,33; IQA = 0,17) nicht signifikant ($p = 0,05$) niedriger als die Werte der Kontrollgruppe (Md = 1,00; IQA = 0,67). Hier zeigte sich dennoch eine dosisabhängige Abschwächung der Entzündungsaktivität. Zwischen Niedrigdosisgruppe (Md = 0,33; IQA = 0,67) und Hochdosisgruppe lag kein Unterschied in der Krankheitsaktivität vor.

An POD 7 waren die DAI-Werte der Hochdosisgruppe (Md = 1,00; IQA = 0,53) signifikant ($p = 0,03$) niedriger als die Werte der Kontrollgruppe (Md = 1,00; IQA = 1,00), auch hier lag die Niedrigdosisgruppe (Md = 0,66; IQA = 0,67) zwischen den anderen beiden Gruppen, ohne zu diesen einen signifikanten Unterschied aufzuweisen. Eine Verbesserung der Krankheitsaktivität innerhalb der Gruppen von POD3 zu POD 7 lag nicht vor.

Die orale Behandlung mit den beladenen NP beeinflusst somit den postoperativen Krankheitsverlauf positiv. Der Gewichtsverlauf trägt hier nicht zum Ergebnis bei da hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorliegt. Geprägt sind diese Ergebnisse von einer Normalisierung der Stuhlkonsistenz. Zusätzlich kann die Behandlung mit den NP die Blutbeimengung reduzieren. Im Vergleich zum präoperativ erhobenen DAI verbessert sich der Wert postoperativ mit einer steigenden Behandlungsdosis.

Ergebnisse

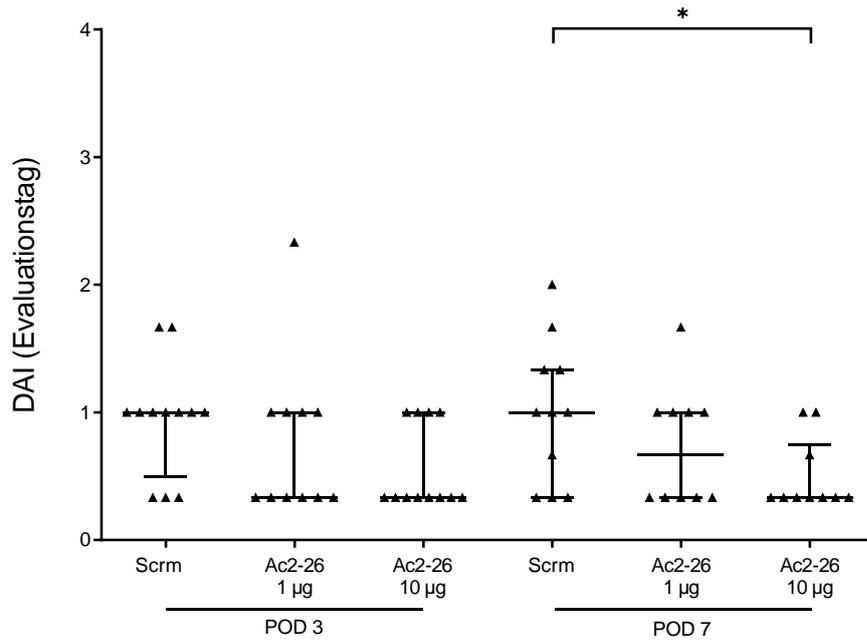


Abbildung 11: Postoperative Krankheitsaktivität.

Die postoperative Krankheitsaktivität an Evaluationstag 3 und 7. Zur statistischen Evaluation der nichtparametrischen Ergebnisse wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, $*(P < 0.05)$. Gezeigt sind Median + IQA. $N=12/11$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Scrm NPs), $N=11/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 1 µg), $N=12/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 10 µg). Drei Tiere erreichten Abbruchkriterien und wurden ausgeschlossen (jeweils ein Versuchstier pro Gruppe), 3 Tiere wurden wegen intraoperativen Komplikationen ausgeschlossen (2 in Ac2-26 1 µg, 1 in Ac2-26 10 µg).

6.4 VERBESSERUNG DER MAKROSKOPISCHEN ANASTOMOSENHEILUNG

Am dritten und siebten postoperativen Tag war jeweils der endoskopische Score der Kontrollgruppe am höchsten (höherer Wert repräsentiert eine schlechtere Heilung) und nahm mit steigender Behandlungsdosis von Ac2-26 stetig ab. Eine signifikant ($p = 0,02$) verbesserte Heilung konnte an POD 3 zwischen der Kontrollgruppe (Md = 2,50; IQA = 1,00) und der Hochdosisgruppe (Md = 0; IQA = 2,00) gezeigt werden. An POD 7 konnte zwischen der Kontrollgruppe (Md = 2,00; IQA = 1,00) und der Hochdosisgruppe (Md = 0,50; IQA = 2,00) eine signifikant verbesserte endoskopische Heilung ($p = 0,0006$) sowie zwischen der Niedrigdosisgruppe (Md = 2,00; IQA = 2,00) und der Hochdosisgruppe eine signifikant ($p = 0,03$) verbesserte Heilung erreicht werden.

Anastomosen mit sehr guter Wundheilung zeigten keinerlei muköse oder fibrinhaltige Verwachsungen auf. In Fällen von sehr gut verheilten Anastomosen war die Darmwand weiß oder mit einem dezenten lividen Ton gefärbt.

Schlechtere Wundheilung zeigte sich durch, die Koloskopie erschwerende, Infiltration und Verwachsungen von Fibrinbelägen in das Darmlumen. Diese zeigten oft eine gewisse Dehiszenz im Bereich der Anastomose an und wurden wie oben beschrieben je nach Ausmaß der Verwachsung eingeteilt. Fistelbildung lag nur in wenigen Fällen vor. Auffällig waren in diesen Fällen von schlechter Wundheilung auch Rötungen im Wundbereich mit Blutungen von unterschiedlichem Ausmaß.

Zusätzlich zur Evaluation der Anastomose konnten in der Endoskopie typische Kennzeichen einer Colitis ulcerosa beobachtet werden. Eine oft diskret rötliche Feinzeichnung von distalem Kolon mit zusätzlicher Bildung von Schleimfäden im Lumen zeigte sich in einem Großteil der Fälle. Dies lag jedoch primär aboral der angelegten Anastomose.

Ergebnisse

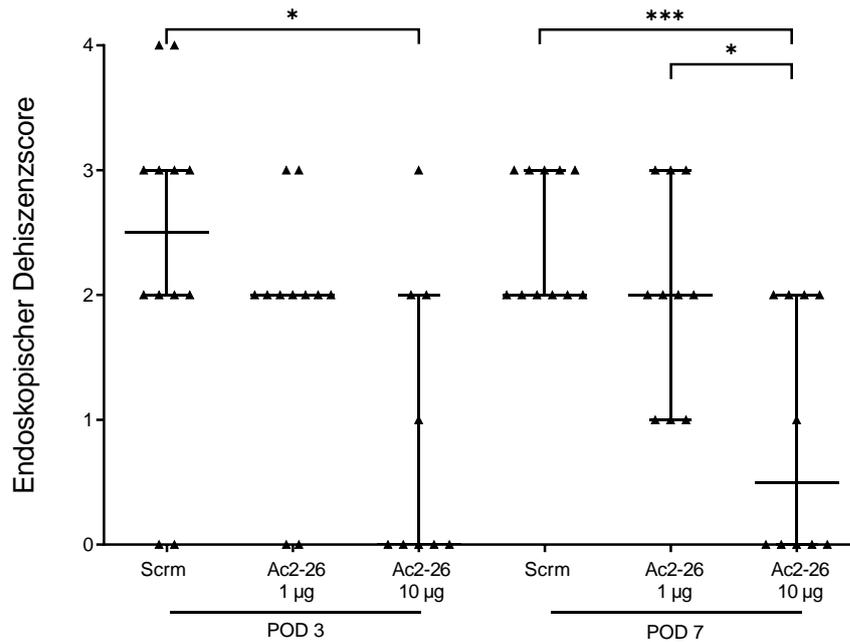


Abbildung 12: Endoskopie.

Vor der Tötung der Tiere wurde eine Koloskopie zur Evaluation der Anastomosenregion durchgeführt. Betrachtet wurden der Anteil von Dehissenzen an der kompletten Zirkumferenz, sowie das Vorliegen von Nahtmaterial im Lumen. Zur statistischen Evaluation der nichtparametrischen Ergebnisse wurde ein Mann Whitney-U Test durchgeführt, *($P < 0.05$) und ***($p \leq 0.001$). Gezeigt sind Median + IQA. $N=12/11$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Scrm NPs), $N=11/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 1 µg), $N=9/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 10 µg). Drei Tiere erreichten Abbruchkriterien und wurden ausgeschlossen (jeweils ein Versuchstier pro Gruppe), 3 Tiere wurden wegen intraoperativen Komplikationen ausgeschlossen (2 in Ac2-26 1 µg, 1 in Ac2-26 10 µg). Drei Koloskopien mit technischen Komplikationen (Ac2-26 10 µg) und konsekutivem Ausschluss aus der Statistik.

6.5 Gewichtsverläufe

Das Gewicht der Versuchstiere wurde während der Experimente täglich erhoben. Die Werte sind angegeben als prozentualer Teil des Ausgangswertes (Mittelwert \pm Standardabweichung). Während der Phase der Entzündung verringerten sich die Gewichte in allen Gruppen geringfügig. Bei vielen Mäusen war jedoch insbesondere am zweiten Tag der Induktion ein gewisser Gewichtsverlust auch wegen einer verringerten Trinkmenge auffällig. Die salzhaltige DSS-Lösung hat einen anderen Geschmack als das geläufige Trinkwasser. Jedoch ist hier anzumerken, dass die Tiere zu keinem Zeitpunkt des Experiments vermehrte Zeichen von Dehydration aufwiesen. Am Ende der Kolitisinduktion (präoperativ) lag das Gewicht der Kontrollgruppe bei $M = 0,99$; $SD = 0,03$ des Ausgangswertes, während das Gewicht der Niedrigdosis bei $M = 0,97$; $SD = 0,04$ und das Gewicht der Hochdosisgruppe bei $M = 0,98$; $SD = 0,02$ des Ausgangswertes lag. Erst postoperativ konnte in allen Gruppen ein starker Gewichtsverlust verzeichnet werden. An POD 3 wurde das minimale Gewicht sowohl in der Kontrollgruppe ($M = 0,86$; $SD = 0,03$) als auch in der Hochdosisgruppe ($M = 0,87$; $SD = 0,03$) erreicht. An POD 4 erreichte die Niedrigdosisgruppe ($M = 0,88$; $SD = 0,05$) ihr Minimum. Der Gewichtsverlust in diesem Abschnitt war innerhalb der Kontrollgruppe am ausgeprägtesten, jedoch ohne signifikante Unterschiede.

An POD 7 Tag erreicht die Kontrollgruppe ein Gewicht von $M = 0,89$; $SD = 0,04$ des Ausgangswertes. Die Niedrigdosisgruppe erreicht einen Wert von $M = 0,91$; $SD = 0,04$ des Ausgangswertes während die Hochdosisgruppe eine Endgewicht von $M = 0,90$; $SD = 0,03$ des Ausgangswertes erreicht. Die Gewichtsverluste zwischen den verschiedenen Gruppen sind zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

Betrachtet man allein den Gewichtsverlust zwischen dem Tag der Operation (präoperativ) und dem Ende der Versuche an POD 7, so liegt der relative Gewichtsverlust in der Kontrollgruppe bei 10 %, bei der Niedrigdosisgruppe bei 6 % und in der Hochdosisgruppe bei 9 %.

Ergebnisse

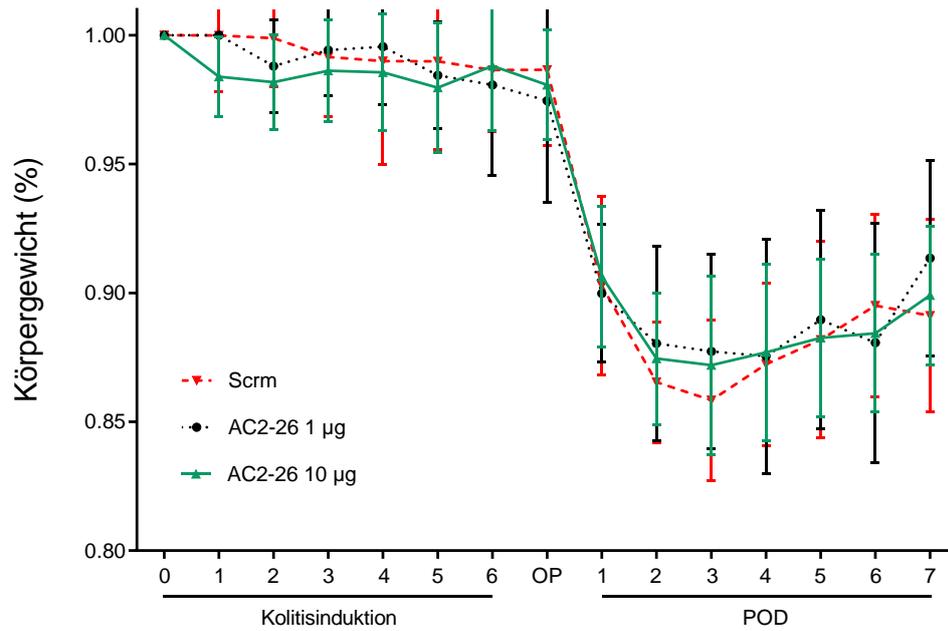


Abbildung 13: Gewichtsverläufe.

Postoperativer Gewichtsverlust mit Minimum an POD 3 und POD 4. Typischer Gewichtsverlust durch DSS und nach Operation mit folgender Erholung. Bei parametrischer Verteilung wurde durch ungepaarte beidseitige t-Tests geprüft und mit $*(p \leq 0.05)$ gekennzeichnet, Ergebnisse nicht signifikant. Gezeigt sind Mittelwert + SD. $N=23/11$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Scrm NPs), $N=21/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 1 µg), $N=22/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 10 µg). Drei Tiere erreichten Abbruchkriterien und wurden ausgeschlossen (jeweils ein Versuchstier pro Gruppe), 3 Tiere wurden wegen intraoperativen Komplikationen ausgeschlossen (2 in Ac2-26 1 µg, 1 in Ac2-26 10 µg).

6.6 INTRAABDOMINELLE ADHÄSIONEN

In den Behandlungsgruppen zeigten sich reduzierte Adhäsionen im Bereich der Anastomose. Diese Ergebnisse waren an POD 3 zwischen der Kontrollgruppe (Md = 3,50; IQA = 1,00) und der Niedrigdosisgruppe (Md = 2,00; IQA = 2,00) signifikant ($p = 0,02$), ebenso zwischen der Kontrollgruppe und der Hochdosisgruppe (Md = 2,00; IQA = 1,00) ($p = 0,006$). An POD 7 konnten intraperitoneale Adhäsionen zwischen der Kontrollgruppe (Md = 5,00; IQA = 2,00) und der Hochdosisgruppe (Md = 3,50; IQA = 1,00) signifikant ($p = 0,02$) reduziert werden. An POD 7 lagen die Ergebnisse der Niedrigdosisgruppe (Md = 4,00; IQA = 1,00) zwischen den beiden anderen Gruppen und somit kann das Ergebnis als dosisabhängig angesehen werden.

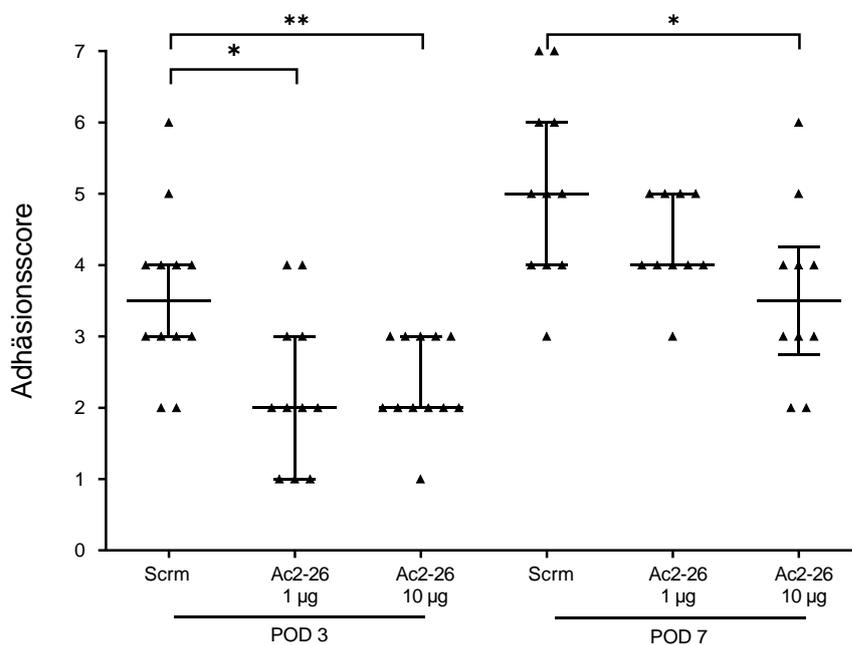


Abbildung 14: Intraabdominelle Adhäsionen.

Zur statistischen Evaluation der nichtparametrischen Ergebnisse wurde ein Mann Whitney-U Test durchgeführt, * ($P < 0.05$) und ** ($p \leq 0.01$). Gezeigt sind Median + IQA. $N = 12/11$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Scrm NPs), $N = 11/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 1 µg), $N = 12/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 10 µg). Drei Tiere erreichten Abbruchkriterien und wurden ausgeschlossen (jeweils ein Versuchstier pro Gruppe), 3 Tiere wurden wegen intraoperativen Komplikationen ausgeschlossen (2 in Ac2-26 1 µg, 1 in Ac2-26 10 µg).

6.7 Stabilität der Anastomosen im Vergleich zum umliegenden Gewebe

Im Verlauf der Versuche konnten verschiedene Lokalisationen für die Entstehung der Insuffizienz beobachtet werden. Insuffizienzen, welche direkt an der Anastomose entstanden, zeichneten sich durch ein Auseinanderweichen der Anastomosenenden zwischen den angelegten Nähten aus. Die ausgeprägtesten Insuffizienzen, welche zwischen 50-100 % des Umfangs der Anastomose betrafen waren schon vor der Entnahme primär insuffizient und erreichten dann sehr niedrige Maximalwerte

Ergebnisse

unter Druckbelastung. Solche Fälle von primärer Insuffizienz lagen zum Zeitpunkt der Evaluation nur selten vor. Tiere mit dieser Komplikation konnten oft schon früher erkannt werden, da ihr Gesundheitszustand oder Ernährungszustand entsprechend vermindert war.

Eine Berstungslokation außerhalb der Anastomose konnte vor allem bei den verschiedenen Behandlungsgruppen beobachtet werden. Hier war auffällig, dass diese Lokalisation fast immer in einer großen Entfernung zur Stelle der Anastomose lag. Regionen mit vermehrtem Auftreten lagen im Bereich der zum Berstungsdruck messenden Apparatur, also in räumlicher Nähe zu Druckmesssonde oder der zuführenden Kanüle. Diese Bereiche kennzeichnen im Experiment die Randbereiche der getesteten Region und stellen möglichst gesundes Gewebe dar. Sie lagen etwa 1-2 cm proximal und distal der Anastomose, da der getestete Bereich 2-4 cm um die Anastomose umfasste. War umliegendes Gewebe durch Adhäsionen nicht durch minimale Zugbelastung abzutrennen, wurde es zum Zweck der Gewebeschonung an der Anastomose belassen.

An POD 3 lag die Insuffizienz in der Kontrollgruppe in 27% der Fälle an der Anastomose. In dieser Gruppe verringerte sich die Anzahl der Insuffizienzen an POD 7 auf 17%. In der Niedrigdosisgruppe lag die Insuffizienz an POD 3 in 9% der Fälle in diesem Bereich. An POD 7 erhöhte sich der Anteil der Insuffizienzen in der Niedrigdosisgruppe leicht auf 10%. In der Hochdosisgruppe lag eine Insuffizienz der Anastomose an POD 3 in 25 % der Fälle vor, an POD 7 lag in dieser Gruppe keine Insuffizienz (0%) der Anastomose vor. Die Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Behandlungsgruppen waren zu keinem Evaluationszeitpunkt signifikant (der kleinste p-Wert lag an POD 7 zwischen Kontrollgruppe und Hochdosisgruppe ($p=0,48$)).

Tabelle 8: Berstungslokalisation.

Ja = Berstung an der Anastomose; Nein = Berstung nicht an der Anastomose. Die Anastomosen und die angrenzenden Darmabschnitte wurden nach der Tötung entnommen. Durch Instillation der Anastomosenregion mit isotonischer Kochsalzlösung wurde eine Insuffizienz herbeigeführt. Liegt die Insuffizienz an der Anastomose, so ist dort eine geringere Stabilität als im umgebenden Gewebe gegeben. Statistische Signifikanz wurde durch den Fisher's Exact Test geprüft und liegt nicht vor. N=11/11 (POD 3/7) (P-C-Col IV-Scrm NPs), N=11/10 (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 1 µg), N=12/10 (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 10 µg). Drei Tiere erreichten Abbruchkriterien und wurden ausgeschlossen (jeweils ein Versuchstier pro Gruppe), 3 Tiere wurden wegen intraoperativen Komplikationen ausgeschlossen (2 in Ac2-26 1 µg, 1 in Ac2-26 10 µg), 1 Tier wurde wegen technischen Problemen in den Berstungsexperimenten ausgeschlossen (P-Col IV-Scrm NPs).

	POD 3			POD 7		
	Scrm	Ac2-26 1µg	Ac2-26 10µg	Scrm	Ac2-26 1µg	Ac2-26 10µg
Ja	3	1	3	2	1	0
Nein	8	10	9	10	9	10
Summe	11	11	12	12	10	10

6.8 Gesamtstabilität des operierten Darmabschnitts erhoben durch den Berstungsdruck

Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. An POD 3 lagen in der Kontrollgruppe (M = 176,97 mmHg; SD = 35,43 mmHg) die höchsten Werte im Berstungsdruck vor. Diese Druckmessungen überstiegen sowohl die der Niedrigdosisgruppe (M = 164,69 mmHg; SD = 23,64 mmHg) (nicht signifikant) als auch die der Hochdosisgruppe (M = 130,41 mmHg; SD = 38,25 mmHg) mit signifikantem Unterschied ($p = 0,01$). Auch zwischen der Niedrigdosisgruppe und der Hochdosisgruppe lag ein signifikanter Unterschied ($p = 0,02$) im Berstungsdruck vor. An POD 7 wiesen die Ergebnisse sowohl der Niedrigdosisgruppe (M = 171,72 mmHg; SD = 18,05 mmHg) als auch der Hochdosisgruppe (M = 169,97 mmHg; SD = 26,87 mmHg) höhere Werte als die der Kontrollgruppe auf, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

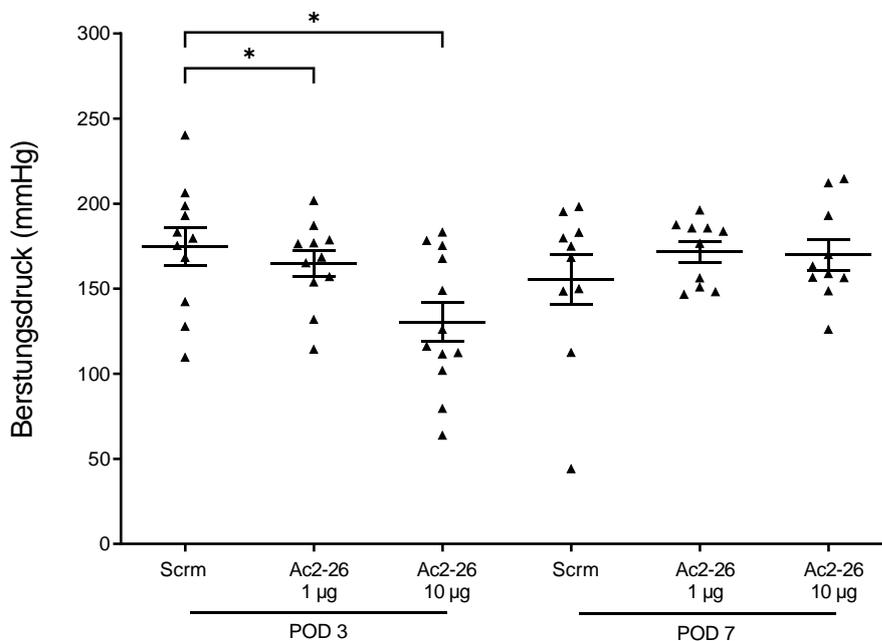


Abbildung 15: Berstungsdruck.

Die Anastomosen und die angrenzenden Darmabschnitte wurden nach der Tötung entnommen. Durch Insufflation der Anastomosenregion mit isotonischer Kochsalzlösung wurde eine Insuffizienz herbeigeführt. Der maximal erreichte Druck stellt den Berstungsdruck dar. Statistische Signifikanz wurde bei parametrischen Ergebnissen durch ungepaarte zweiseitige t-Tests geprüft und mit $*$ ($p \leq 0,05$) gekennzeichnet. $N=11/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Scrm NPs), $N=11/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 1 µg), $N=12/10$ (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 10 µg). Drei Tiere erreichten Abbruchkriterien und wurden ausgeschlossen (jeweils ein Versuchstier pro Gruppe), 3 Tiere wurden wegen intraoperativen Komplikationen ausgeschlossen (2 in Ac2-26 1 µg, 1 in Ac2-26 10 µg), 2 Tiere wurden wegen technischen Problemen aus den Berstungsexperimenten ausgeschlossen (P-Col IV-Scrm NPs).

6.9 Wundheilung unter mikroskopischen Aspekten

Um die intestinale Anastomosenheilung deutlich darzustellen, werden hier nicht nur die Scores der verschiedenen Versuchsgruppen verglichen. Zusätzlich sollen Auffälligkeiten innerhalb des Evaluationssystems aufgezeigt werden, um individuelle Effekte der Behandlung mit Ac2-26-beladenen NP in Bezug auf den Heilungserfolg besser darzustellen. Zusätzlich zum Gesamtscore sind das funktionelle Evaluationssystem und der Phillips-Score getrennt aufgeführt. Die Werte sind als (Median \pm Interquartilsabstand) angegeben.

Die orale Applikation der NP verbesserte den Verschluss der Mukosa, aber auch die Integrität der Darmwand durch eine höhere Anzahl von verschlossenen Schichten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Innerhalb der Hochdosisgruppe lagen an POD 3 Tag 80 % der Anastomosen mit geschlossener Mukosa vor, an POD 7 stieg dieser Anteil auf 87,5 %. Im Vergleich waren in der Kontrollgruppe an POD 3 50 % Anastomosen und POD 7 40 % der Anastomosen bereits auf Höhe der Mukosa verheilt. Die Niedrigdosisgruppe zeigte unter diesem Aspekt ähnliche Ergebnisse wie die Kontrollgruppe. Auch die Anzahl verheilte Schichten der Darmwand unterschied sich innerhalb der Gruppen. Während die Hochdosisgruppe an POD 3 durchschnittlich Md = 3,60; IQA = 0,83 und an POD 7 Md = 3,90; IQA = 0,50 verschlossene Schichten besaß, waren es in der Kontrollgruppe an POD 3 Md = 3,0; IQA = 1,03 beziehungsweise an POD 7 Md = 2,40; IQA = 0,87 Schichten. Erneut nahm die Niedrigdosisgruppe Werte ähnlich denen der Kontrollgruppe an.

Betrachtet man die Anastomosenheilung unter den Kriterien des funktionellen Scores, so zeigte sich eine dosisabhängige Verbesserung der histologischen Heilungsparameter. Dieser Effekt war vorrangig an POD 7 ausgeprägt. Während die im funktionellen Score berücksichtigten Parameter die mechanische Stabilität der Anastomosen sowie deren Dichtigkeit beschreiben, nimmt der Phillips-Score Bezug auf Entzündung, Vaskularisation und einwachsendes Bindegewebe. Die Ergebnisse des Phillips-Scores zeigten signifikant reduzierte Entzündungsaktivität und vermehrte Kollagenbildung im Gewebe der Behandlungsgruppen. Die Reperfusion durch einwachsende Blutgefäße konnte durch die Behandlung nicht verbessert werden. Diese Effekte lagen bereits an POD 3, aber auch an POD 7 vor.

Im funktionellen Score lagen folgende Ergebnisse vor. An POD 3 erzielte die Hochdosisgruppe (Md = 8; IQA = 1,5) höhere Werte als die Kontrollgruppe (Md = 6,00; IQA = 3,00), diese Ergebnisse waren signifikant ($p = 0,02$). Auch an POD 7 lag in der Hochdosisgruppe (Md = 8,50; IQA = 1,00) eine signifikant ($p = 0,001$) verbesserte Heilung vor als in der Kontrollgruppe (Md = 2,00; IQA = 4,50).

Im Phillips-Score lagen folgende Ergebnisse vor. An POD 3 lag sowohl in der Niedrigdosisgruppe (Md = 7,00; IQA = 2,50) eine signifikant ($p = 0,03$) verbesserte Heilung als auch in der Hochdosisgruppe (Md = 6,00; IQA = 2,00) eine signifikant ($p = 0,03$) verbesserte Heilung verglichen mit der

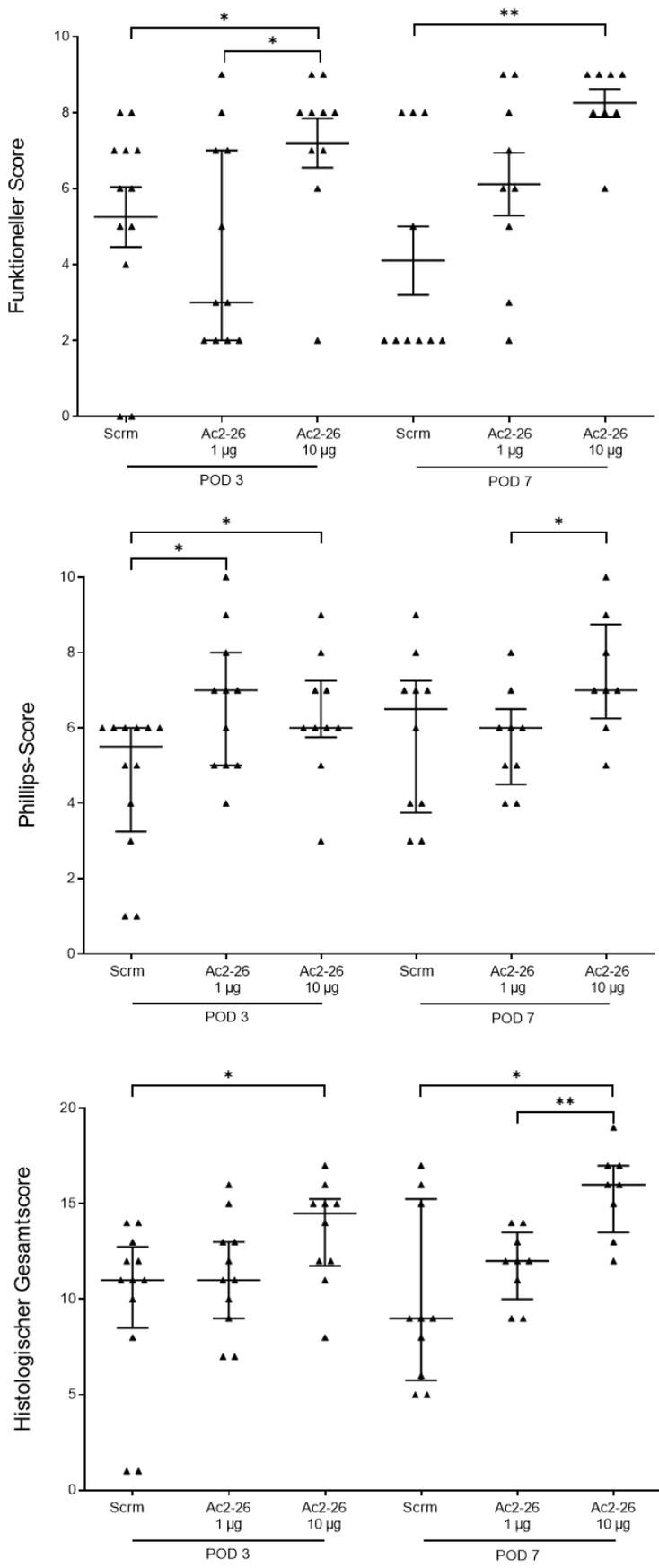
Ergebnisse

Kontrollgruppe (Md = 5,50; IQA = 3,00) vor. An POD 7 lagen die niedrigsten Werte in der Niedrigdosisgruppe bei Md = 8,00; IQA = 2,00, ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit Md = 6,50; IQA = 3,50. Die der Hochdosisgruppe (Md = 7,00; IQA = 2,00) waren signifikant ($p = 0,03$) höher.

Die Kombination beider Scores ergab folgende Ergebnisse. An POD 3 lag in der Hochdosisgruppe (Md = 14,50; IQA = 3,50) eine zur Kontrollgruppe (Md = 11,00; IQA = 4,00) signifikant ($p = 0,02$) verbesserte histologische Heilung vor. An POD 7 lag eine dosisabhängige Wirkung vor bei denen die Hochdosisgruppe (Md = 16,00; IQA = 4,00) sowohl zur Kontrollgruppe (Md = 9,00; IQA = 6,50) als auch zur Niedrigdosisgruppe (Md = 12,00; IQA = 2,50) eine signifikante Verbesserung der Heilung zeigte.

Ein Effekt der Behandlung konnte unter histologischen Aspekten hauptsächlich für die Hochdosisgruppe, welche $10\mu\text{g}$ Ac2-26 pro Applikation erhielten, berichtet werden. In der Niedrigdosisgruppe lagen weniger statistisch signifikante Verbesserungen der Heilung vor.

Ergebnisse



Ergebnisse

Gefärbt in Hämatoxylin-Eosin Technik. A) Der funktionelle Histologiescore mit der ersten verschlossenen Schicht (von luminal nach abdominal) der Anzahl verheilter Schichten sowie der (verschlossenen) Epithelschicht und der (wiederhergestellten) Kryptenarchitektur. B) Der Phillips-Score mit Entzündungszellen, Angiogenese, Vorliegen von Fibroblasten und Kollagenbildung. C) Der Gesamt-Score als Kombination aus A) und B). Statistische Signifikanz wurde bei nichtparametrischen Ergebnissen durch Mann Whitney-U testgeprüft und mit $^(p \leq 0.05)$ und $^{**}(p \leq 0.01)$ gekennzeichnet. N=12/10 (POD 3/7) (P-C-Col IV-Scrm NPs), N=11/9 (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 1 μ g), N=10/8 (POD 3/7) (P-C-Col IV-Ac2-26 NPs 10 μ g). Drei Tiere erreichten humane Endpunkte und wurden ausgeschlossen (jeweils ein Versuchstier pro Gruppe), 3 Tiere wurden wegen intraoperativen Komplikationen ausgeschlossen (2 in Ac2-26 1 μ g, 1 in Ac2-26 10 μ g). 6 Tiere wurden wegen technischen Problemen in der histologischen Aufarbeitung ausgeschlossen (1 in P-C-Col IV-Scrm NPs, 1 in Ac2-26 1 μ g, 4 in Ac2-26 10 μ g).*

7 DISKUSSION

7.1 KLINISCHE RELEVANZ

Das häufige Auftreten von Colitis ulcerosa sowie häufig assoziierte Komplikationen stellen eine hohe sozioökonomische Belastung dar. Komplikationen der medikamentösen Therapie, Wundheilungsstörungen und Anastomoseninsuffizienzen stellen auch für betroffene Patienten große Einschränkungen und Hürden dar. Neuartige nebenwirkungsarme Therapien sowie heilungsunterstützende Medikamente sind daher von großem Interesse.

7.2 METHODENKRITIK

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden wurden kritisch geprüft und mit alternativen Ansätzen und Versuchsaufbauten verglichen. Im Voraus und im Verlauf wurden die einzelnen Methoden getestet und eventuell an die Mausversuche angepasst. Um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden wenn möglich bereits in der Literatur beschriebene Methoden verwendet. Um die aufeinanderfolgenden Evaluationen zu ermöglichen, durfte zudem in vorherigen Schritten das benötigte Material nicht beeinträchtigt werden. Die verwendeten Methoden und damit verbundene Limitationen und Problematiken sollen hier zu Beginn aufgezeigt und diskutiert werden.

7.2.1 Verwendung junger, weiblicher Mäuse

Die in den Experimenten verwendeten Tiere entspringen dem Mausstamm BALB/c, es handelte sich hierbei ausschließlich um weibliche Tiere im Alter von etwa 20 Monaten. Der Mausstamm BALB/c eignet sich gut zur Induktion einer akuten experimentellen DSS-Kolitis sowie zur Testung potenzieller CED-Therapeutika (Hoffmann et al., 2018). Die Anastomosen wurden in moderat entzündetem Gewebe der Darmwand angelegt da eine stärkere Ausprägung der Entzündung von den Versuchstieren nicht toleriert wurde. In die vorausgegangene Entscheidung für weibliche BALB/c Tiere gingen verschiedene Entscheidungskriterien aus gegebener Literatur ein. Hier wurden vermehrt Vergleiche zwischen BALB/c und C57BL/6 zur Entscheidungsfindung herangezogen. Es ist beschrieben, dass BALB/c Tiere innerhalb weniger Tage den gewünschten Entzündungseffekt im Darm entwickelten, diese Entzündung jedoch nach dem Absetzen von DSS-haltigem Trinkwasser schnell rückläufig ist. Während die Induktion der experimentellen Kolitis im C57BL/6 Stamm nach kurzer Zeit eine vergleichsweise schwerere und chronische Erkrankung bedingte, zeigten BALB/c Tiere nach dem Absetzen von DSS einen direkten Wechsel in die Remissionsphase mit Rückgang der Entzündung und Symptomfreiheit nach zwei Wochen (Melgar, Karlsson, & Michaelsson, 2005; Mukhopadhyay & Aich, 2020). Das Geschlecht der Tiere wurde durch vorangegangene Versuche in der Arbeitsgruppe beeinflusst. Zusätzlich besitzen weibliche Tiere ein signifikant längeres Kolon als männliche Vertreter

Diskussion

von BALB/c (Babickova et al., 2015), was in Hinblick auf die hier durchgeführten Versuche von Vorteil sein kann da auch geringe Unterschiede eine deutlich bessere intraoperative Handhabung mit geringerer Zugbelastung durch Faktoren wie die anliegenden Haltefäden bedeuten können. Unter experimenteller Kolitis ist bei weiblichen BALB/c Tieren zudem ein geringerer Gewichtsverlust mit weniger Entzündungszellen in der Histologie mit vermindertem Verlust der physiologischen Kryptenarchitektur beschrieben (Babickova et al., 2015). Durch eine geringere Anfälligkeit weiblicher Tiere auf geringe DSS-Konzentrationen könnte eine bessere Steuerung der Ausprägung der Kolitis erreicht werden. Zudem Verhalten sich weibliche Tiere vor allem nach dem operativen Eingriff in der Gruppe generell weniger aggressiv gegenüber ihren Artgenossen.

Bei menschlichen Patienten wird die chirurgische Behandlung von Colitis ulcerosa, wenn nicht vermeidbar, auch unter therapieresistenten und stark entzündeten Verläufen in Betracht gezogen (Ordas et al., 2012). Die Tiere waren im Alter von etwa 20 Wochen zwar ausgewachsen, hatten aber noch nicht ihr eigentliches Endgewicht erreicht. Es wurde beobachtet, dass ältere Tiere nochmal etwa 3-4 Gramm zunehmen konnten (durchschnittlich werden weibliche BALB/c Mäuse 20 Monate alt (Ebbesen, 1971)). Mit der Induktion der Kolitis wurde eine weitere Gewichtszunahme jedoch weitgehend verhindert. Eine mögliche Verfälschung der Gewichtverläufe ist letztendlich nicht auszuschließen.

Bisher wurden zur Erforschung von Anastomosenheilung vermehrt Hunde und Ratten verwendet (Yauw, Wever, Hoesseini, Ritskes-Hoitinga, & van Goor, 2015). Die intestinale Immunantwort von Menschen kann am Mausmodell jedoch realistischer simuliert werden (Pommergaard, Rosenberg, Schumacher-Petersen, & Achiam, 2011). Studien zu Geschlechtsdifferenzen von Colitis ulcerosa zeigten bei weiblichen Ratten eine veränderte Aktivität von Östrogen-Rezeptor (ER)-beta vermittelten Signalkaskaden. Diese bewirkten eine Veränderung der Permeabilität der intestinalen Epithelschicht und verminderte ER-beta vermittelte mRNA-Expression unter aktiver Kolitis (Rustgi, Kayal, & Shah, 2020). Bei weiblichen Tieren konnte unter Östrogenrezeptor-beta-Expression ein vermindertes Ansprechen auf DSS-induzierte Kolitis beobachtet werden (Babickova et al., 2015). Die Versuchstiere und deren Eintritt in die Versuche wurden nicht auf den Zyklus synchronisiert. Basierend auf diesen Daten könnten zyklusbedingte Schwankungen im Östrogenspiegel den Verlauf der hier induzierten Kolitis beeinflussen. Intraoperativ bedingten zyklusbedingt geschwollene Uteri lediglich eine eingeschränkte Übersicht im Operationsgebiet.

Die Colitis ulcerosa unterscheidet sich wohl deutlich von der toxisch ausgelösten DSS-Kolitis. So tritt Colitis ulcerosa am häufigsten bei jungen Patienten auf, hat aber einen zweiten Häufigkeitsgipfel im höheren Alter (Loftus & Sandborn, 2002). Die verwendeten Tiere zeigten im Experiment starkes Ansprechen auf die induzierte Kolitis mit teilweise hohem postoperativem Gewichtsverlust. Dennoch

tritt Colitis ulcerosa beim Menschen ohne geschlechterspezifische Häufung auf, mit eventueller Tendenz zum männlichen Geschlecht (Trallori et al., 1996). Die Versuchstiere repräsentieren somit in dieser Hinsicht nur teilweise die Verteilung der Erkrankung beim Menschen. Eine Studie zur Häufigkeit und Verteilung von erfolgten Anastomosen zeigte sogar eine leichte Häufung der Anlage von Anastomosen bei Männern, welche mit 57 % häufiger betroffen waren als Frauen. Das Durchschnittsalter lag hier bei 42 Jahren (Hoang et al., 2020). Relativiert man dieses Alter und bezieht es auf das Alter der Versuchstiere, so waren diese während der Versuche jünger als ihr menschliches Pendant. Die Wahl der Versuchstiere steht jedoch im Sinne der Vergleichbarkeit zu vorhergegangenen Versuchen (Reischl et al., 2021).

7.2.2 Dosisfindung der DSS-Lösung

Experimente der eigenen Arbeitsgruppe, welche vor den hier beschriebenen Versuchen durchgeführt wurden, zeigten eine milde Ausprägung der experimentellen Kolitis unter 2%iger DSS-Lösung. Für die nachfolgenden Versuche war deshalb vorerst eine höhere Dosierung des DSS zur Induktion der Kolitis angedacht. Zwischenexperimente mit 3%iger DSS-Lösung führten aber zu einer zu hohen Abbruchrate durch das Erreichen der definierten humanen Endpunkte. Hier war vor allem ein hoher Gewichtsverlust ausschlaggebend für den Abbruch. Diese Vorgehensweise zur Definition der idealen Dosisfindung stehen im Einklang mit den Empfehlungen weiterer Autoren (Jiang et al., 2023). Es ist beschrieben, dass weibliche Mäuse eine insgesamt mildere Entzündung entwickeln als männliche Artgenossen (Chassaing, Aitken, Malleshappa, & Vijay-Kumar, 2014). Insgesamt stellt eine 2% DSS-Lösung eine ausgewogene Dosis dar, welche eine zuverlässige Versuchsdurchführung erlaubt ohne zu hohe Belastungen für die Versuchstiere darzustellen.

7.2.3 Verwendung einer Pektin-Chitosan Beschichtung der Nanopartikel

Aktuelle Forschungsergebnisse untermauern die gute Eignung von Polysaccharid-basierten Beschichtungen wie Pektin-Chitosan. Die Vorteile liegen hier in der, durch lokale Enzyme bedingte, verbesserte und gezielte Liberation der Wirkstoffe und der Harmlosigkeit der Beschichtung gegenüber dem Organismus (Amidon, Brown, & Dave, 2015). Zudem ist die Verwendung von Pektin-Beschichtungen bereits weit verbreitet und in Verwendung (Naeem et al., 2020). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche zeigten einen positiven Effekt der Behandlung auf die Anastomosenheilung. Weniger wirkte sich diese Behandlung mit Ac2-26 auf systemische Effekte wie den Gewichtsverlauf aus.

Das vermehrte Vorliegen von Kollagen Typ IV in den basalen Schichten der Darmwand ist einerseits in anatomischem Grundlagenwissen beschrieben, andererseits liegen Forschungsergebnisse zur vermehrten Expression in heilenden intestinalen Wunden vor. Hier liegt eine Dynamik der Expression und Produktion von Kollagen Typ IV vor, welche bis zum zweiten Tag nach Verletzung sinkt, um dann

Diskussion

über das physiologische Niveau anzusteigen (Brasken, 1991). An der Heilung beteiligt ist Kollagen Typ IV, vor allem in der Basalmembran einwachsender Kapillarnetzwerke des initial einwachsenden Bindegewebes (Brasken, Lehto, & Renvall, 1989, 1990). Allerdings liegen zum Zeitpunkt der verminderten Expression in der frühen Heilungsphase Kollagene durch die Unterbrechung der Kontinuität und der damit verbundenen Offenlegung von tieferen Gewebeschichten vermehrt frei. In Kombination mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt sich die Methode Kollagen Typ IV bindende Nanopartikel als ein erfolgsversprechender Ansatz in der gezielten Unterstützung der intestinalen Wundheilung.

Offen und durch die hier beschriebenen Experimente letztendlich nicht nachweisbar bleibt, ob eine Assoziation / Bindung der NP mit den freiliegenden Kollagen wirklich stattfindet. Alternativ könnte der Wirkstoff während der Passage zufällig im Bereich der Anastomose freigesetzt worden sein. Eine stattgefundenen Bindung lässt sich nur indirekt durch die lokale Wirkung und die teils gering ausgeprägten systemischen Effekte vermuten. Letztendlich wären hierzu Tracingexperimente mittels Fluoreszenz-markierten NPs notwendig, welche in unserer Arbeitsgruppe nicht gelungen sind und bisher nur eingeschränkt verfolgt wurden. Ein direkter Nachweis einer Kollagenbindung der NPs liegt uns also derzeit nicht vor.

7.2.4 Gewichtsverläufe und klinische Untersuchung

Bei der täglichen Inspektion der Tiere wurden die Gewichtsverläufe aufgezeichnet. In den Experimenten zu diesem Projekt konnten die Gewichtsverläufe aus vorherigen Versuchen reproduziert werden (Miltschitzky et al., 2021; Reischl et al., 2021), wodurch ein initiales Ansprechen auf die Kolitis, sowie einen deutlichen Gewichtsverlust postoperativ mit anschließendem Wiederanstieg erneut aufgezeigt werden konnte. Wie zuvor beschrieben, können diese Daten wichtige Informationen zum aktuellen Krankheitsverlauf liefern aber bleiben durch Variablen wie verminderte Nahrungsaufnahme im postoperativen Verlauf aufgrund eines eingeschränkten Allgemeinzustandes oder postoperativer Schmerzen beeinflussbar. Wir versuchten den Tieren die Nahrungsaufnahme durch ein zusätzliches Angebot weicher Nahrung zu erleichtern. Die Ergebnisse werden dadurch möglicherweise verfälscht. Als einfach zu erhebender Parameter bieten sich jedoch die Gewichtsverläufe auch in Folgeprojekten an. Die Gewichtsverläufe zu erheben war aus Tierschutzgründen essenziell, da in einigen Fällen ein zu hoher Verlust ein Abbruchkriterium bedeutete.

7.2.5 Berstungsdruck

Der Berstungsdruck stellt prinzipiell eine simple Methode zur Beurteilung der funktionellen und strukturellen Stabilität der Anastomose dar und kann somit den Heilungsverlauf qualitativ widerspiegeln. Zusätzlich kann ein Bersten der Anastomose innerhalb der Grenzen der physiologisch erreichten Maxima prinzipiell eine eingeschränkte Heilung aufzeigen. Durch verschiedene Faktoren

Diskussion

kann die Methode jedoch falsche oder nicht aussagekräftige Ergebnisse liefern. Der Prozess der Wundheilung ist stark abhängig vom Kollagenstoffwechsel des Gewebes. Experimente zum Heilungsverlauf von intestinalen Anastomosen zeigten, dass Kollagenablagerung die mechanische Stabilität erst ab dem dritten bis fünften Tag nach der initialen Verletzung beeinflussen (Migaly, Lieberman, Long, Fisher, & Rolandelli, 2004). Zuvor ist für die mechanische Stabilität vorrangig das eingebrachte Nahtmaterial und die dadurch erreichte Adaption für die mechanische Stabilität verantwortlich (Dubay & Franz, 2003). An den ersten zwei Tagen bewirken vorliegende Kollagenasen durch vermehrten Abbau von Kollagen eine Reduktion der intestinalen Stabilität um bis zu 70 % (Thornton & Barbul, 1997). Die Evaluation des Berstungsdrucks an POD 3 darf somit bezüglich ihrer Aussagekraft durchaus in Frage gestellt werden. Eine Maskierung defekter Wundheilung durch suffiziente mechanische Stabilität bei einliegendem Nahtmaterial ist ein Nachteil des Berstungsdrucks. Adhäsionen und Konstriktionen im Bereich der Anastomose verringert den Durchmesser der Anastomose. Bei Berstung außerhalb der Anastomose kann dann lediglich eine höhere Stabilität der Anastomose ohne genauen Druckwert angenommen werden. Weitere Studien mit Versuchen zur Methode des Berstungsdrucks zeigten ähnliche Ergebnisse. Hier konnte bei Ratten unter Kolitis ein vermehrtes Auftreten der Insuffizienzen außerhalb des Bereichs der Anastomosen beschrieben werden da die Stabilität der umliegenden Darmwand durch die Entzündung reduziert wurde, so dass sie die Stabilität der Anastomose nicht erreichte (Rabau, Eyal, Kluger, & Dayan, 1998). Sinnvoll ist in dieser Hinsicht eher die Betrachtung von Berstungsdrücken, welche unter den physiologisch vorherrschenden Druckverhältnissen liegen, um hier eine negative Beeinflussung der Anastomose beziehungsweise eine eingeschränkte Wundheilung zu detektieren.

Zusätzlich muss erwähnt werden, dass durch die Präparation bei der Gewebeentnahme potenziell stabilisierende Adhäsionen und umliegendes Gewebe entfernt werden könnten. Dies würde dann nicht nur falsch niedrige Berstungsdrücke, sondern auch die Berstungslokalisation beeinflussen. Im Gegenzug könnten an anderen Anastomosen durch eine geringere Abtragung der Adhäsionen mögliche Schwachstellen an Anastomosen maskiert werden.

Während der Versuche konnte eine allgemeine Tendenz in der Messung des Berstungsdrucks beobachtet werden. Im Verlauf der Versuche wurden bei älteren Sonden vermehrt minimal höhere Drucke gemessen, was auf die Entstehung einer Druckresistenz durch mögliche Beschädigungen der verwendeten Sonden hindeuten könnte. Um solche Messfehler zu vermeiden, wurden diese Sonden stetig gewechselt, geringe messbedingte Fehler können nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend stellte sich der Berstungsdruck als suboptimale Methode zur Auswertung und Beurteilung der Qualität der Anastomose dar. Dennoch zeigte die Berstungslokalisation ohne statistische Relevanz zu erreichen eine Tendenz zur erhöhten Stabilität der Anastomose gegenüber der

Diskussion

umliegenden Darmwand herbeigeführt durch die Behandlung mit den Ac2-26-beladenen Nanopartikeln. Die Methode des Berstungsdrucks ist dennoch nur eingeschränkt aussagekräftig und liefert klinisch relevante Informationen nur bei Berstungsdrücken, welche deutlich unter der in diesen Experimenten erreichten Maxima liegen.

7.2.6 Adhäsionsscore

Der Adhäsionsscore und die hier einfließende Abszessbildung stellen eine standardisierte Methode zur makroskopischen Evaluation des Heilungsfortschrittes innerhalb des Abdomens dar, welche die Verhältnisse zum Evaluationszeitpunkt darstellen können. Jedoch erschweren weiterhin fehlende Forschungsergebnisse zu Verbindungen zwischen Anastomosenheilung und Adhäsionsformation die Interpretation dieser Ergebnisse. Der Adhäsionsscore kann somit als deskriptive Methode gewertet werden, ohne wissenschaftlich belegbare Aussagen zum Heilungsfortschritt zu bieten (Miltschitzky et al., 2021). Zukünftiges Wissen aus weiteren Forschungsprojekten könnte mit errungenen Ergebnissen die Rolle der Adhäsionsbildung weiter spezifizieren.

7.3 ERGEBNISDISKUSSION

7.3.1 Vorwort der Diskussion

Einige Effekte und Auswirkungen von ANXA1 auf Wundheilung und Entzündungsmediation sind bereits bekannt und beschrieben. Methoden zur Unterstützung dieser Mechanismen zur verbesserten Krankheitskontrolle wurden in unterschiedlichen Bereichen intensiv erforscht. Antientzündliche Effekte von ANXA1 konnten bereits in Modellen zu Peritonitis, Arthritis und Endotoxämie nachgewiesen werden (Damazo et al., 2005; Damazo, Yona, Flower, Perretti, & Oliani, 2006; Yang et al., 2004). Hierbei liegt ein Fokus der Forschungsaktivität in der Fähigkeit zur Auflösung der vorliegenden Entzündungsaktivität. Ein weitgehend unerforschter Aspekt ist der Einfluss von ANXA1 auf die intestinale Wundheilung. Vergleiche der Ergebnisse aus dieser Arbeit mit anderen Publikationen sind deshalb zum aktuellen Zeitpunkt nur eingeschränkt möglich. Im Folgenden werden Ergebnisse aus diesem Projekt deshalb vermehrt mit vorhergegangenen Experimenten aus der eigenen Forschungsgruppe verglichen, wobei sich hierbei vermehrt auf Experimente zur systemischen Applikation bezogen wird.

7.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im präoperativen DAI lag kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor.

Der postoperative DAI zeigte an POD 7 eine signifikant geringere Krankheitsaktivität in der Hochdosisgruppe.

Diskussion

Endoskopisch zeigte sich sowohl an POD 3 als auch an POD 7 eine verbesserte Wundheilung der Anastomosen in der Hochdosisgruppe.

Die Gewichtsverläufe unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht signifikant.

Intraperitoneale Adhäsionen waren an POD 3 sowohl in der Niedrigdosisgruppe als auch in der Hochdosisgruppe signifikant geringer ausgeprägt. An POD 7 konnte nur in der Hochdosisgruppe signifikant geringere Adhäsionen nachgewiesen werden.

Bezüglich der Berstungslokalisation lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

Der Berstungsdruck war an POD 3 in der Kontrollgruppe signifikant höher als in den Behandlungsgruppen. An POD 7 lag kein signifikanter Unterschied vor.

Die histologische Heilung war sowohl an POD 3 als auch an POD 7 in der Hochdosisgruppe signifikant besser. Hier kann aber zusätzlich in Phillips-Score und funktionellen Score unterteilt werden. Bei Ersterem lag in beiden Behandlungsgruppen eine signifikant bessere Heilung an POD 3 vor. Der funktionelle Score zeigte eine signifikant verbesserte Heilung der Hochdosisgruppe an POD 7.

7.3.3 Verbesserung der mukosalen Wundheilung

In der Literatur liegen zum aktuellen Zeitpunkt wenige Daten zum Einfluss von NP basierten Methoden auf die intestinale Wundheilung unter Entzündung vor. Eine Arbeit, in welcher ein positiver Einfluss von ANXA1 NP auf die mukosale Epithelheilung nachgewiesen werden konnte, kommt hierbei den hier durchgeführten Versuchen am nächsten (Leoni, Neumann, Kamaly, et al., 2015). In dieser Hinsicht auch zu erwähnen ist die Arbeit von *Li, Zhao et al (Li et al., 2019)*. Diese befasst sich mit der Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen durch die Regulation des Mikrobioms im Darm anhand einer oralen Gabe von Ac2-26 beladenen NP (Li et al., 2019). Verbesserte intestinale Epithelheilung durch den Einfluss von Resolvin E1 NP wurde ebenfalls beschrieben (Quiros et al., 2020).

Die Komposition der NP beeinflusst maßgeblich deren pharmakodynamische Eigenschaften wie die Aufnahme in das Gewebe. Einer der größten Faktoren in Hinsicht auf diesen Einfluss hat die Größe der NP. *Yu et al.* konnten zeigen, dass die Internalisierung von NP in Makrophagen während der Behandlung durch eine natürliche Fragmentierung kontinuierlich abnimmt (S. S. Yu et al., 2012). Für PEG-basierte sphärische NP liegen die idealen Dimensionen bei einem Durchmesser von etwa 100 nm (Hoshyar, Gray, Han, & Bao, 2016). Die Dimensionen unserer NP übersteigen auch ohne Pektin-Chitosan-Hülle (welche abgebaut wird) diesen idealen Durchmesser. Gegenüber Versuchen zur lokalen Injektion von Ac2-26 in die Basis der Wunde müssen im Rahmen der oralen Applikation Faktoren wie Durchfall oder variable Dauer des Darmtransits berücksichtigt werden (Leoni, Neumann, Kamaly, et al., 2015). Stuhlfrequenz sowie die Stuhlkonsistenz werden jedoch durch die Induktion der Kolitis beeinflusst und sind somit wenig kontrollierbar. Trotz vorliegender perioperativer Diarrhoe könnten

Diskussion

sich die Kollagen Typ IV *targeted* Nanopartikel zu diesem Zweck eignen, da sie theoretisch an verletztem Gewebe anhaften und es dort zur Liberation des Wirkstoffes kommen sollte (fehlende Tracingexperimente, Bindung nicht belegt). Weitere Studien zur expliziten Aufnahme der Wirkstoffe ins Gewebe sowie der Konzentration von ANXA1 müssten hier im Verlauf ergänzt werden.

Bei einer Beladung von etwa 4 % (Peptide/Polymer wt/wt) bleiben die NP stabil und erreichen eine optimale Freisetzung von Peptiden. Täglich setzen die NP etwa 20 % des Wirkstoffes frei (Kamaly et al., 2013). Somit wird eine kontinuierliche Liberation von antientzündlichem Peptid über mehrere Tage ermöglicht. Die Nanopartikel besitzen eine sphärische, uniforme Struktur. Bedingt durch die geringen Dimensionen der NP wird eine gute Retention gewährleistet (Kamaly et al., 2013). Ac2-26 NP limitieren im Vergleich zu nativem Ac2-26 ohne NP die Rekrutierung von polymononuklearen neutrophilen Granulozyten in einem größeren Umfang und bedingen eine vergleichsweise zeitnahe Auflösung von Entzündung (Kamaly et al., 2013). Als Hauptbestandteil der (vaskulären) Basalmembran und Stabilisator der extrazellulären Matrix, mit Funktionen in der Genese, Homöostase und Reorganisation, wird Kollagen Typ IV in Regionen mit Gewebeschaden freigelegt (Boudko, Danylevych, Hudson, & Pedchenko, 2018; Kalluri, 2003). Die NP binden durch ihre Oberflächenmarkierung möglicherweise das oberflächliche Kollagen Typ IV ulzerierter oder in der Struktur gestörter Regionen im Bereich der Anastomosen sowie im Bereich entzündeter Schleimhaut. In unseren Versuchen mit schwacher Ausprägung der Kolitis und wenigen Ulzera schien sich der Effekt der NP vor allem auf die Anastomosenregion zu fokussieren.

7.3.4 Krankheitsaktivität

Durch die entzündungshemmende Wirkung von ANXA1 kann ein positiver Effekt auf die Krankheitsaktivität der Kolitis erreicht werden. In welcher Phase oral applizierte NP die Krankheitsaktivität beeinflussen und wie sich andere Ansätze im Ergebnis unterscheiden soll im folgenden Abschnitt herausgearbeitet werden. Der DAI stellt eine etablierte Methode zur Beurteilung der Krankheitsaktivität im murinen Kolitis-Modell (Friedman et al., 2009).

Präoperativ ergab die Behandlung mit ANXA1 keine signifikante Verbesserung der Krankheitsaktivität. Postoperativ konnte die Krankheitsaktivität durch ANXA1 dann signifikant reduziert werden. In Verbindung mit dem in den DAI eingehenden Gewichtsverlust können die Ergebnisse spezifiziert werden. Die Gewichtsverluste zeigten keine signifikanten Ergebnisse. Dadurch beeinflussen verstärkt das Vorkommen von Blut im Stuhl und die Stuhlkonsistenz die Ergebnisse. Speziell reduzierte Blutbeimengungen in den Behandlungsgruppen deuten auf verbesserte Wundheilung mit einem frühzeitigen Verschluss zumindest der luminalen Schichten hin.

Bekanntermaßen reduziert ANXA1 die entzündliche Krankheitsaktivität. So reagieren ANXA1-Knockout Mäuse auf eine Kolitisinduktion durch DSS stärker als Wildtyp-Tiere (da Rocha et al., 2020). Die

intraperitoneale Applikation von Ac2-26 dämpft die Entzündungsaktivität nach DSS-Induktion und verringerte das Ausmaß von endoskopisch verursachten Ulzerationen (Leoni et al., 2013; Leoni, Neumann, Kamaly, et al., 2015). Im Kontrast dazu konnte in unseren Ergebnissen ANXA1 keinen signifikant dämpfenden Effekt auf die präoperative Krankheitsaktivität nehmen, während es begleitend zur DSS-Induktion appliziert wurde. Das Ausbleiben signifikanter Ergebnisse präoperativ könnte mit der Struktur der verwendeten NP assoziiert sein. Da die NP spezifisch an Kollagen Typ IV binden sollen, könnte eine Freisetzung des ANXA1 vor der Anlage der Anastomose weitgehend unterdrückt bleiben. Dies unterstreicht die These der tatsächlichen Bindung im freiliegenden Gewebe als auch die These der (durch Kollagen Typ IV bindenden NP verstärkten) lokalen Wirkung. Durch die geringe Krankheitsaktivität unter 2 % DSS, präoperativ lagen endoskopisch kaum nachweisbare Ulzerationen der Mukosa vor. Das gezielte Anheften der NPs mit konsekutiver Liberation von ANXA1 an postoperativ freigelegtes Kollagen Typ IV würde somit das Absenken der Krankheitsaktivität erst im Verlauf erklären. Durch eine intraperitoneale Applikation systematisch applizierter ANXA1 beladener Kollagen Typ IV spezifischer NPs konnten in vorhergegangenen Experimenten sowohl die präoperative als auch die postoperative Krankheitsaktivität verringern (Reischl et al., 2021).

Offen bleibt, ob bei gesteigerter Krankheitsaktivität durch höhere Dosen von DSS oder weitere Auslöser von Kolitis wie zum Beispiel TNBS durch das Vorliegen von Ulzerationen die Behandlung auch die präoperative Krankheitsaktivität beeinflussen könnte. Versuche unter solchen Bedingungen könnten dann auch das Ansprechen der oralen Behandlung mit ANXA1 ohne angelegte Anastomosen untersuchen, und damit dessen Behandlungsspektrum ausweiten. Zukünftige Experimente zur Spezifikation von Freisetzung und Konzentration des ANXA1 nach oraler Applikation sowie eine Evaluation der Konzentration an der Anastomose könnten hier eine genauere Aussage erlauben.

7.3.5 Koloskopie

Experimente zur koloskopische Beurteilung der Anastomosenheilung unter dem Einfluss von ANXA1 liegen bisher außerhalb unserer Arbeitsgruppe nicht vor. Vergleiche zu ähnlichen Experimenten entfallen deshalb weitgehend. Durch Fistelbildung oder gestörte Wundheilung an der Anastomose führen Einblutungen zur Bildung von Fibrin, welches in der Endoskopie ausgewertet wurde. Anastomosen mit eingeschränkter Heilung können somit beurteilt werden. Signifikant bessere Ergebnisse in der endoskopischen Evaluation waren dosisabhängig vorhanden und stützen somit die Hypothese der verbesserten Heilung in den Behandlungsgruppen. Innerhalb der Behandlungsgruppen zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen POD 3 und POD 7. Bei mäßiger Anastomosenheilung beeinflussten maßgeblich Fibrinverwachsungen die Ergebnisse. Bezüglich der Blutbeimischungen im Stuhl konnte ein Rückgang von Blutbeimischungen zwischen POD 3 und POD 7 beobachtet werden. So könnte man die weitgehend unveränderten Zustände an der Anastomose zwischen POD 3 und POD 7

Diskussion

durch den Rückgang weiterer Einblutungen erklären. Studien zur Expression von Fibrin durch intestinale Epithelzellen assoziieren die Abwesenheit von Fibrin unter entzündlichen Bedingungen jedoch mit der Bildung von Ulzerationen, verschlechterter Heilung und einer erhöhten Krankheitsaktivität (Seltana et al., 2022). Dieser Widerspruch könnte in unseren Experimenten jedoch in einer quantitativ überschießenden Bildung des Fibrins durch Einblutungen insbesondere postoperativ in der frühen Heilungsphase erklärt werden. Versuche aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten durch die intraperitoneale Gabe ähnlicher NPs ebenfalls verbesserte koloskopische Ergebnisse, welche jedoch nur an POD 3 statistische Signifikanz aufweisen konnten (Reischl et al., 2021). Die Beurteilung von Wundheilungsstörungen, welche auch im klinischen Umfeld koloskopisch eingesehen werden, war durch die Koloskopie gut möglich. Koloskopisch beobachtete Ergebnisse korrelierten gut mit weiteren Methoden und sollten somit auch in zukünftigen Experimenten erhoben werden.

7.3.6 Gewichtsverläufe

Die durch Kolitis-induzierten Gewichtsverluste sowie ein starker postoperativer Abfall entsprachen in diesen Versuchen den Erwartungen. Ein Nadir zwischen POD 3 und POD 4 spiegelte die Gewichtsverläufe vorheriger Versuche zur intraperitonealen Applikation, in welchen jedoch die Behandlung zusätzlich einen Gewichtsvorteil bedingte, wider (Reischl et al., 2021). Entgegen der Hypothese konnte die Behandlung mit ANXA1 anhand der oralen Gabe jedoch keine Verbesserung der Gewichtsverläufe feststellen. Im Vergleich zur intraperitonealen Applikation könnte durch die orale Applikation alle 3,5 Tage eine Beeinträchtigung der Nahrungsaufnahme oder ein beschleunigter Darmtransit mit verminderter Verwertung der Nährstoffe Einfluss nehmen, der Versuchsaufbau lässt hier jedoch keine endgültige Aussage zu. Zum Vergleich der Gruppen der oralen Applikation ist festzuhalten, dass auch die Kontrollgruppen dieselbe Menge Flüssigkeit erhielten und somit kein Bias vorliegen sollte. Diese Ergebnisse stehen der Reduktion von Durchfall, welche durch ANXA1 hervorgerufen wurden gegenüber. In Zusammenschau mit weiteren Evaluationsparametern und der Ergebnisse auf vorherigen Experimenten bleibt der fehlende Effekt der oralen Applikation von ANXA1 auf das Körpergewicht ungeklärt.

7.3.7 Intraperitoneale Adhäsionen

Zu Adhäsionen von Organen im Umfeld der Anastomose bestand in unserer Arbeitsgruppe Konsens, dass vorliegende Adhäsionen als Zeichen einer Insuffizienz der Anastomose sowie einer erhöhten Entzündungsaktivität zu deuten seien. Durch die Behandlung mit ANXA1 konnte das Auftreten von Adhäsionen in Quantität und Qualität reduziert werden. Eine angedachte Mitbeurteilung von Abszessbildung entfiel da in den Experimenten keine Abszesse vorlagen, könnte aber zukünftig mit erhoben werden. Experimente der eigenen Arbeitsgruppe zur intraperitonealen Applikation von ANXA1 konnten keinen Effekt der Behandlung auf die Adhäsionen aufzeigen. Durch den hier gewählten

lokalen Ansatz der Applikation könnten vorliegende Insuffizienzen schon in einer frühen Heilungsphase durch einen Verschluss der Epithelschicht verhindert werden und somit die hier beschriebene Reduktion der Adhäsionsbildung erklären. Versuche mit ANXA1-Knockout-Mäusen konnten in frühen Entzündungsphasen eine erhöhte Expression von MMPs aufzeigen (Reischl et al., 2021). Weiter konnte eine Inhibition verschiedener MMP durch ANXA1 beschrieben werden (Kim et al., 2020). Durch eine postoperative Inaktivierung von MMP kann eine Remodellierung extrazellulärer Matrix sowie die Bildung von Kollagen unterstützt werden (Agren et al., 2011; Agren et al., 2006; Agren, Jorgensen, & Delaisse, 2004; Krarup et al., 2013). Erhöhte MMP-Level bedingen gestörte Wundheilung unter chronischen Entzündungszuständen (Eming, Krieg, & Davidson, 2007; Wysocki, Staiano-Coico, & Grinnell, 1993). Weiter ist eine verlängerte MMP-Aktivität mit vermehrten Insuffizienzen von Anastomosen assoziiert (Savage, Lacombe, Boulos, & Hembry, 1997). So könnten erhöht vorliegende ANXA1-Level die Aktivität verschiedener MMP reduzieren und die Qualität der extrazellulären Matrix verbessern und weiter durch verminderte Leckage sekundär Adhäsionsbildung verhindern. Hingegen konnten an Ratten durch die vermehrte Expression von MMP intraperitoneale Adhäsionen reduziert werden, dort wurden jedoch keine Anastomosen angelegt. Potenzielle Effekte einer Leckage gingen somit nicht in diese Ergebnisse mit ein (Ibrahim, Kamel, & Soliman, 2022; Yue et al., 2018). Weitere Forschung zu den weitestgehend unbekanntem Zusammenhängen zwischen der Bildung von Adhäsionen und intestinaler Entzündung wäre für eine bessere Beurteilung der von uns erzielten Ergebnissen notwendig.

7.3.8 Berstungsdruck und Berstungslokalisation

Mit Ausnahme von drei Messungen lagen alle Ergebnisse oberhalb der physiologischen, intraluminal vorliegenden Druckwerte. Zusätzlich wurden in den Behandlungsgruppen an POD 3 niedrigere Werte erreicht als in den Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse erschweren die Interpretation. Die Hypothese von vermehrter mechanischer Stabilität konnte somit in diesen Versuchen nicht bestärkt werden. Innerhalb der ersten 3-5 Tage nach Anlage der Anastomose wird deren mechanische Stabilität primär durch vorhandene Nahtpunkte hervorgerufen. Berücksichtigt man diesen Punkt, so erlaubt der Berstungsdruck an POD 3 keine Aussage über die Wundheilung der Anastomose. Hingegen müsste an POD 7 die Stabilität des Gewebes die der Nahtpunkte übersteigen. Dies trifft für die Behandlungsgruppen an POD 7 zu, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Vorherige Versuche der eigenen Arbeitsgruppe zur intraperitonealen Applikation konnten ebenfalls keinen positiven Effekt der Behandlung mit ANXA1 auf Berstungsdruck oder Lokation nachweisen (Ergebnisse nicht publiziert) (Reischl et al., 2021).

7.3.9 Histologie / Mikroskopische Heilung

Die Induktion der Kolitis per DSS stellt eine der am weitest verbreiteten Methoden zur chemischen Induktion der experimentellen Kolitis dar (Randhawa, Singh, Singh, & Jaggi, 2014). Hierbei stellt die durch DSS induzierte Kolitis ein gutes Modell für die Colitis ulcerosa beim Menschen dar, da die erzeugte Krankheit bezüglich der morphologischen (Cooper, Murthy, Shah, & Sedergran, 1993) und histologische Ausprägung sowie Symptomatik der Colitis ulcerosa sehr ähnlich ist (Randhawa et al., 2014). Die Erstmanifestation der Erkrankung äußert sich mit einem Verlust der basalen Kryptenregionen am dritten Tag, ehe am fünften Tag die Krypten teilweise vollständig verschwinden und der Darm beginnt, Erosionen aufzuweisen. Die hier beschriebenen Vorgänge treten vorerst nur fokal auf und die Entzündung geht im Modell insbesondere mit Erosionen einher (Cooper et al., 1993). Der Krankheitsbeginn kann nach etwa zwei Tagen erwartet werden. Unsere Ergebnisse aus Anastomosen und Swiss-Rolls zur verursachten Darmentzündung decken sich weitgehend mit der Literatur.

Die Mukosa stellt eine essentielle Barriere für den Host zwischen dem Immunsystem der Lamina propria und den intraluminalen Antigenen dar (Sartor, 2006). Somit kann durch eine intakte Epithelschicht eine Homöostase zwischen Darmlumen und Darmwand erhalten werden. Treten intestinale Wunden auf, so ist diese Barrierefunktion gestört und es kommt zur Translokation von Antigenen im Host. Eine unvollständige intestinale Barriere ist mit vermehrtem Auftreten von verschiedenen Erkrankungen assoziiert (Turner, 2009). Eine vollständige Wiederherstellung der Barrierefunktion wird vom Körper angestrebt, um eine verlängerte Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe mit verbundenen Risiken wie einer Sepsis zu vermeiden. Vorliegende experimentelle Ergebnisse zeigen verbesserte Wundheilung der Mukosa unter Behandlung mit dem ANXA1-Derivat Ac2-26 am Tiermodell. Diese Ergebnisse gingen einher mit vermehrter Einwanderung von Epithelzellen (Leoni et al., 2013; Leoni, Neumann, Kamaly, et al., 2015).

Wie zuvor beschrieben, teilt die mikroskopische Auswertung die Heilung in den Phillips-Score, welcher vorliegende Zellarten sowie Kollagenvorkommen betrachtet, und die funktionellen Heilungsparameter, in welchen die Heilung der einzelnen Schichten der Darmwand einget. In unseren Versuchen konnte verbesserte Anastomosenheilung innerhalb beider Scores getrennt sowie kombiniert beobachtet werden. Diese Ergebnisse sollen im Folgenden mit weiteren Experimenten verglichen werden, sowie eine Ausführung über vorliegende Zellen vorgenommen werden soll.

Der entzündungshemmende Effekt von ANXA1, basierend auf verminderter Aktivierung und Transmigration von Leukozyten, wurde anhand verschiedener Modelle (Endotoxämie, Arthritis, Peritonitis) beschrieben (Damazo et al., 2005; Damazo et al., 2006; Perretti & D'Acquisto, 2009; Yang et al., 2004). Spezifischer auf die intestinale Wundheilung gingen dann weitere Untersuchungen ein,

Diskussion

welche die Regeneration der Epithelschicht sowie von intraluminal verursachten Wunden untersuchten, und einen Heilungsvorteil durch ANXA1 aufzeigen konnten (Leoni et al., 2013; Leoni, Neumann, Kamaly, et al., 2015). Ein positiver Effekt von ANXA1 auf die intestinale Wundheilung mit Prävention von Insuffizienzen liegt in seiner anti-entzündlichen Wirkung (Perretti & Gavins, 2003). Unsere Ergebnisse zu Insuffizienzen und Entzündungsaktivität decken sich mit dieser These.

Die beobachteten Evaluationszeitpunkte sind am ehesten der exsudativen Phase (POD 3) und der proliferativen Phase (POD 7) der intestinalen Wundheilung zuzuordnen. Diese Zeitpunkte sind bezüglich vorliegender Zellen ähnlich und zeichnen sich durch einen unscharfen Übergang ineinander aus. Während die frühe Phase durch das Vorliegen von neutrophilen Granulozyten geprägt ist, überwiegen später Makrophagen im Wundbett. Das Zusammenspiel dieser Zellen stellt einen essenziellen Aspekt der Auflösung von Entzündung und der ungestörten Wundheilung dar (Leoni, Neumann, Sumagin, Denning, & Nusrat, 2015). Der angewandte Phillips-Score unterscheidet jedoch die vorliegenden Immunzellen nicht weiter. Eine genauere Aussage anhand immunhistochemischer Methoden wäre ein ergänzender Ansatz für zukünftige Experimente. Betrachtet man die einzelnen Parameter des Phillips-Score, so konnten durch ANXA1 analog zur Hypothese eine verminderte Entzündungsaktivität sowie vermehrtes Vorkommen von Fibroblasten und Kollagenablagerungen nachgewiesen werden. Im Falle der Gefäßneubildung zeigte sich entgegen der Hypothese ein vermindertes Einwachsen (Daten nicht explizit abgebildet). Während ein Zusammenspiel von pro- und antiinflammatorischen Faktoren und Zellen für eine ungestörte Anastomosenheilung essenziell ist, schreiben verschiedene Arbeiten der Reduktion der Gesamtmenge von Entzündungszellen eine wichtige Rolle hierbei zu. Im Peritonitis-Modell konnte eine Reduktion von Granulozyten sowie Monozyten unter akuter Entzündung durch ANXA1 beschrieben werden (Getting, Flower, & Perretti, 1997). Eine reduzierte Transmigration von Leukozyten über Gefäßwände in das Gewebe ist ein weiterer Effekt von ANXA1 (Perretti et al., 1996). Präoperativ erhöhte Level von Makrophagen und Granulozyten steigern das Risiko der Entstehung von Anastomoseninsuffizienzen (Binnebosel et al., 2014). Der entzündungshemmende Effekt von ANXA1 könnte somit einen positiven Einfluss auf die Wundheilung haben.

Um histologische Korrelate für mechanische Stabilität sowie Integrität im heilenden Gewebe zu beurteilen, wurden Fibroblasten und Kollagendepositionen betrachtet. In Hautzellen konnten durch ANXA1 gesteigerte Kollagenablagerung sowie verminderter Abbau, vermittelt durch eine Hemmung von MMPs beobachtet werden (Kim et al., 2020). Auch in unseren Experimenten zeigten die Behandlungsgruppen gesteigerte Kollagenablagerungen sowie ein vermehrtes Vorkommen von Fibroblasten im Bereich der Anastomose. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Berstungsversuche wurde dadurch ein vermuteter Gewinn von mechanischer Stabilität nicht erreicht.

Diskussion

Ebenfalls eine wichtige Rolle nimmt die Sauerstoffversorgung im Gewebe ein, welche durch schonende Operationstechnik sowie durch neugebildete Gefäße gewährleistet wird. Durch ANXA1-vermehrte Expression von Hypoxie-induzierten Faktoren konnte in Hämangiomen bereits einen nachweisbaren Effekt auf die Kapillarneubildung bewirken (Pan, Hui, Teng, & Wei, 2022). Ähnliche Effekte von ANXA1 im Darm sind jedoch bisher nicht beschrieben. In unseren Experimenten konnte die Behandlung mit ANXA1 die Gefäßneubildung nicht nachweisbar fördern.

Der funktionelle Score zur histologischen Auswertung betrachtet die Kryptenarchitektur sowie die Epithelschicht und die Anzahl der insgesamt verschlossenen Schichten der Darmwand. Reparaturmechanismen von ANXA1 auf der Ebene der Mukosa wurden bereits beschrieben (Babbin et al., 2008). Weiter konnte eine Signalkaskade ausgemacht werden, welche die ANXA1-basierte Regeneration und Wundheilung der Epithelschicht vermittelt (Leoni et al., 2013). Später konnte der positive Effekt von ANXA1 auf die Epithelregeneration auch durch eine lokale Applikation von NP nachgewiesen werden (Leoni, Neumann, Kamaly, et al., 2015). Einhergehend mit den hier durchgeführten Ergebnissen konnte zuvor eine intraperitoneale Applikation vergleichbarer NP die histologische Wundheilung von Anastomosen im entzündeten Gewebe verbessern, ebenfalls konnten hier unterliegende Mechanismen weiter spezifiziert werden (Reischl et al., 2021).

Die Anastomosenheilung unter Kolitis und der positive Einfluss von intraperitonealem ANXA1 auf diese Heilung konnte durch unsere Arbeitsgruppe vor der Durchführung dieser Experimente dargestellt werden (Reischl et al., 2021). Während die intraperitoneale Applikation von ANXA1 lediglich an POD 3 eine Verbesserung der Wundheilung bewirken konnte, lag in unseren Experimenten zur oralen Applikation zu beiden Evaluationszeitpunkten fortgeschrittene und dosisabhängige histologische Heilung vor. Während sich innerhalb der Behandlungsgruppen zwischen POD 3 und POD 7 unter oraler Applikation die Heilung nur wenig verbesserte, konnte unter systemischer Applikation ein deutlicher Heilungsfortschritt zwischen POD 3 und POD 7 beschrieben werden. Eine Erklärung dieser Ergebnisse könnte durch den lokalen Ansatz mit zeitnaher Freisetzung des ANXA1 direkt an den Kollagenfasern der verletzten Darmwand erfolgen. Während sich die Heilung unter oraler Applikation schon an POD 3 dem erreichten Maximum im Beobachtungszeitraum näherte, erreichte die Heilung unter intraperitonealer Applikation erst an POD 7 ihre Maxima, welche dann ähnliche Werte annahm. Die zusätzliche Hülle aus Pektin und Chitosan, welche für die orale Applikation verwendet wurde, führt dabei zu einer verlangsamten Freisetzung des ANXA1 aus den NP (Lee et al., 2024). Beobachtet man also die kombinierten Ergebnisse dieser Versuche könnte der Vorteil der oralen Applikation in einer zügigeren Heilung der Anastomosen liegen, wobei folglich durch eine Vermeidung von Leckagen sowie Blutungen Komplikationen in folgenden Phasen verhindert werden könnten.

8 FAZIT

Die im Verlauf dieser Arbeit erhobenen Daten weisen auf ein therapeutisches Potential von ANXA1 beziehungsweise Ac2-26 beladenen Nanopartikeln auf die Wundheilung im entzündeten intestinalen Milieu hin. Die orale Applikation von Pektin beschichteten Kollagen Typ IV bindenden und gezielt wirkenden Nanopartikeln zeigte sich als potenzieller Behandlungsansatz in der Zukunft von entzündlichen Darmkrankheiten, wobei beschriebene Ansätze und Versuche als Vertreter der vorklinischen Grundlagenforschung noch eine sehr frühe Phase im Ausblick auf weitere Forschungsprojekte zu der Methode darstellen. Als perioperatives Konzept konnten die Nanopartikel als Trägersubstanz für Ac2-26 die intestinale Wundheilung im entzündeten Milieu besonders unter lokal wirksamen Aspekten verbessern. Im Gegensatz zur systemischen Applikation ähnlicher Nanopartikel blieb jedoch in manchen Aspekten ein signifikanter systemischer Effekt auf den Krankheitsverlauf aus. Die Pektin-Chitosan-Hülle konnte in diesem Kontext erstmals in Kombination unserer Nanopartikel zur oralen Applikation verwendet werden. Die signifikanten Ergebnisse in der Verbesserung der Wundheilung deuten darauf hin, dass die verwendete Umhüllung die beinhalteten Wirkstoffe vor vorzeitigem Abbau schützt. Dies kann indirekt aus der erzielten Wirkung der Behandlung gefolgert werden. Außer der experimentellen DSS-Kolitis könnte die verwendete medikamentöse Kombination auch auf weitere (entzündliche) Darmerkrankungen sowie deren operative Behandlung einen positiven Einfluss haben. Weitere Erkenntnisse zum Darmtransit der Nanopartikel sind ausstehend. Eine genaue Analyse der lokal freigesetzten und im Zielgewebe zur Wirkung verfügbaren Wirkstoffmenge von Ac2-26 sowie der Verteilung der Nanopartikel könnte weitere wichtige Informationen zur klinischen Anwendbarkeit und des tatsächlichen Potenzials der verwendeten Methoden haben. Hierzu könnten Tracingexperimente mittels Fluoreszenzmarkierungen genauere Daten liefern, da aktuell eine Kollagenbindung der Nanopartikel nur vermutet werden kann.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Colitis ulcerosa ist zum aktuellen Zeitpunkt eine Krankheit, deren Pathogenese nicht vollständig beschrieben und verstanden ist. Eine kausale medikamentöse Behandlung besteht zum aktuellen Zeitpunkt nicht und somit kann eine Heilung nur durch operative Maßnahmen realisiert werden. Jedoch sind Komplikationen unter dieser Behandlung häufig und schwerwiegend. Durch überschießende Entzündungsreaktionen wird der Heilungsprozess von angelegten Anastomosen behindert. Die Anastomoseninsuffizienz als kausale Folge insuffizienter Wundheilung stellt einen weiteren, zum aktuellen Zeitpunkt nicht vollständig verstandenen Aspekt dieser Arbeit dar. Konventionelle perioperative Medikationen zeigen oft keine oder negative Effekte auf diesen Verlauf. Hypothese dieser Arbeit war die Verbesserung des perioperativen Verlaufs nach dem Anlegen einer intestinalen Anastomose im entzündeten Kolonmilieu von Mäusen, herbeigeführt durch die orale Applikation Kollagen Typ 4 bindender ANXA1, beziehungsweise mit dessen aktivem Peptid Ac2-26 beladener Pektin-Chitosan umhüllter Nanopartikel. Diese Nanopartikel wurden durchschnittlich alle 3,5 Tage als orale Gavage verabreicht. Auf zellulärer Ebene konnte durch diesen Ansatz eine Auflösung der Entzündung mit konsensueller Verbesserung der Regeneration der Epithelschicht sowie weiterer Schichten der Darmwand erreicht werden. Mäuse, welche eine DSS-induzierte Kolitis aufwiesen, zeigten eine verbesserte intestinale Wundheilung unter der perioperativen Behandlung mit Ac2-26 beladenen Nanopartikeln. Eine verbesserte mikroskopische Wundheilung der Anastomosen sowie verbesserte Ergebnisse in der koloskopischen Evaluation, verminderte Krankheitsaktivität und weniger intraabdominelle Adhäsionen standen im Sinne dieser verbesserten Heilung. Hingegen konnten Berstungsdruck und Gewichtsverläufe keine signifikanten Verbesserungen zeigen. Kumuliert deuten diese Ergebnisse aber auf einen positiven lokalen, jedoch nicht systematischen Effekt der Behandlung hin. Weitere Forschung zum Thema könnte wegweisende Erkenntnisse auf die tatsächliche Verteilung des Ac2-26, transportiert durch die beschichteten Nanopartikel, liefern und somit deren Nutzen spezifizieren.

10 LITERATURVERZEICHNIS

- Aberra, F. N., Lewis, J. D., Hass, D., Rombeau, J. L., Osborne, B., & Lichtenstein, G. R. (2003). Corticosteroids and immunomodulators: postoperative infectious complication risk in inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology*, *125*(2), 320-327. doi:10.1016/s0016-5085(03)00883-7
- Agren, M. S., Andersen, T. L., Andersen, L., Schiodt, C. B., Surve, V., Andreassen, T. T., . . . Jorgensen, L. N. (2011). Nonselective matrix metalloproteinase but not tumor necrosis factor-alpha inhibition effectively preserves the early critical colon anastomotic integrity. *Int J Colorectal Dis*, *26*(3), 329-337. doi:10.1007/s00384-010-1106-3
- Agren, M. S., Andersen, T. L., Mirastschijski, U., Syk, I., Schiodt, C. B., Surve, V., . . . Delaisse, J. M. (2006). Action of matrix metalloproteinases at restricted sites in colon anastomosis repair: an immunohistochemical and biochemical study. *Surgery*, *140*(1), 72-82. doi:10.1016/j.surg.2005.12.013
- Agren, M. S., Jorgensen, L. N., & Delaisse, J. M. (2004). Matrix metalloproteinases and colon anastomosis repair: a new indication for pharmacological inhibition? *Mini Rev Med Chem*, *4*(7), 769-778. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15379644>
- Amidon, S., Brown, J. E., & Dave, V. S. (2015). Colon-targeted oral drug delivery systems: design trends and approaches. *AAPS PharmSciTech*, *16*(4), 731-741. doi:10.1208/s12249-015-0350-9
- Arita, M., Yoshida, M., Hong, S., Tjonahen, E., Glickman, J. N., Petasis, N. A., . . . 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(21), 7671-7676. doi:10.1073/pnas.0409271102
- Aslan, A., Temiz, M., Hakverdi, S., Polat, G., Tumer, C., Temiz, A., & Canbolant, E. (2008). Effect of mesalamine on healing in experimental colon anastomosis: a randomised experimental study. *Int J Surg*, *6*(1), 40-44. doi:10.1016/j.ijssu.2007.09.003
- Atyabi, F., Majzoob, S., Iman, M., Salehi, M., & Dorkoosh, F. (2005). In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan, as a multi-particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon. *Carbohydrate Polymers*, *61*(1), 39-51. doi:10.1016/j.carbpol.2005.02.005
- Babbin, B. A., Laukoetter, M. G., Nava, P., Koch, S., Lee, W. Y., Capaldo, C. T., . . . Nusrat, A. (2008). Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. *J Immunol*, *181*(7), 5035-5044. doi:10.4049/jimmunol.181.7.5035
- Babbin, B. A., Lee, W. Y., Parkos, C. A., Winfree, L. M., Akyildiz, A., Perretti, M., & Nusrat, A. (2006). Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling through formyl peptide receptors. *J Biol Chem*, *281*(28), 19588-19599. doi:10.1074/jbc.M513025200
- Babickova, J., Tothova, L., Lengyelova, E., Bartonova, A., Hodosy, J., Gardlik, R., & Celec, P. (2015). Sex Differences in Experimentally Induced Colitis in Mice: a Role for Estrogens. *Inflammation*, *38*(5), 1996-2006. doi:10.1007/s10753-015-0180-7
- Baca, B., Ozben, V., Boler, D. E., Onur, E., Hamzaoglu, I., Karahasanoglu, T., . . . Dirican, A. (2010). Effect of corticosteroid dose and duration of administration on colonic anastomosis. *Inflamm Bowel Dis*, *16*(12), 2162-2167. doi:10.1002/ibd.21331
- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol*, *13*(1), 238-252. doi:10.1016/s0022-2836(65)80093-6
- Bannenberg, G. L., Chiang, N., Ariel, A., Arita, M., Tjonahen, E., Gotlinger, K. H., . . . Serhan, C. N. (2005). Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J Immunol*, *174*(7), 4345-4355. doi:10.4049/jimmunol.174.7.4345

- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, *16*(5), 585-601. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
- Bento, A. F., Claudino, R. F., Dutra, R. C., Marcon, R., & Calixto, J. B. (2011). Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosaheptaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol*, *187*(4), 1957-1969. doi:10.4049/jimmunol.1101305
- Bettenworth, D., Lenz, P., Krausewitz, P., Bruckner, M., Ketelhut, S., Domagk, D., & Kemper, B. (2014). Quantitative stain-free and continuous multimodal monitoring of wound healing in vitro with digital holographic microscopy. *PLoS One*, *9*(9), e107317. doi:10.1371/journal.pone.0107317
- Binnebosel, M., Schuler, T., Klink, C. D., Busch, D., Schob, D. S., von Trotha, K. T., . . . Junge, K. (2014). Influence of CD68+ macrophages and neutrophils on anastomotic healing following laparoscopic sigmoid resection due to diverticulitis. *Int J Colorectal Dis*, *29*(6), 681-688. doi:10.1007/s00384-014-1855-5
- Boudko, S. P., Danyelych, N., Hudson, B. G., & Pedchenko, V. K. (2018). Basement membrane collagen IV: Isolation of functional domains. *Methods Cell Biol*, *143*, 171-185. doi:10.1016/bs.mcb.2017.08.010
- Brasken, P. (1991). Healing of experimental colon anastomosis. *Eur J Surg Suppl*(566), 1-51. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1725603>
- Brasken, P., Lehto, M., & Renvall, S. (1989). Changes in the connective tissue composition of the submucosal layer of colonic anastomosis. An immunohistologic study in rats. *Acta Chir Scand*, *155*(8), 413-419. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2596249>
- Brasken, P., Lehto, M., & Renvall, S. (1990). Fibronectin, laminin, and collagen types I, III, IV and V in the healing rat colon anastomosis. *Ann Chir Gynaecol*, *79*(2), 65-71. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1696798>
- Browder, W., Williams, D., Lucore, P., Pretus, H., Jones, E., & McNamee, R. (1988). Effect of enhanced macrophage function on early wound healing. *Surgery*, *104*(2), 224-230. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3261048>
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*, *104*, Unit 15 25. doi:10.1002/0471142735.im1525s104
- Chowcat, N. L., Savage, F. J., Hembry, R. M., & Boulos, P. B. (1988). Role of collagenase in colonic anastomoses: a reappraisal. *Br J Surg*, *75*(4), 330-334. doi:10.1002/bjs.1800750412
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., & Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*, *69*(2), 238-249. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8350599>
- Croxtall, J. D., & Flower, R. J. (1992). Lipocortin 1 mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(8), 3571-3575. doi:10.1073/pnas.89.8.3571
- da Rocha, G. H. O., de Paula-Silva, M., Broering, M. F., Scharf, P., Matsuyama, L., Maria-Engler, S. S., & Farsky, S. H. P. (2020). Pioglitazone-Mediated Attenuation of Experimental Colitis Relies on Cleaving of Annexin A1 Released by Macrophages. *Front Pharmacol*, *11*, 591561. doi:10.3389/fphar.2020.591561
- Dalli, J., Norling, L. V., Renshaw, D., Cooper, D., Leung, K. Y., & Perretti, M. (2008). Annexin 1 mediates the rapid anti-inflammatory effects of neutrophil-derived microparticles. *Blood*, *112*(6), 2512-2519. doi:10.1182/blood-2008-02-140533
- Damazo, A. S., Yona, S., D'Acquisto, F., Flower, R. J., Oliani, S. M., & Perretti, M. (2005). Critical protective role for annexin 1 gene expression in the endotoxemic murine microcirculation. *Am J Pathol*, *166*(6), 1607-1617. doi:10.1016/S0002-9440(10)62471-6
- Damazo, A. S., Yona, S., Flower, R. J., Perretti, M., & Oliani, S. M. (2006). Spatial and temporal profiles for anti-inflammatory gene expression in leukocytes during a resolving model of peritonitis. *J Immunol*, *176*(7), 4410-4418. doi:10.4049/jimmunol.176.7.4410

- Das, S., & Ng, K. Y. (2010). Colon-specific delivery of resveratrol: optimization of multi-particulate calcium-pectinate carrier. *Int J Pharm*, 385(1-2), 20-28. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.016
- de Buck van Overstraeten, A., Eshuis, E. J., Vermeire, S., Van Assche, G., Ferrante, M., D'Haens, G. R., . . . D'Hoore, A. (2017). Short- and medium-term outcomes following primary ileocaecal resection for Crohn's disease in two specialist centres. *Br J Surg*, 104(12), 1713-1722. doi:10.1002/bjs.10595
- De Caterina, R., Sicari, R., Giannessi, D., Paggiaro, P. L., Paoletti, P., Lazzarini, G., . . . Parente, L. (1993). Macrophage-specific eicosanoid synthesis inhibition and lipocortin-1 induction by glucocorticoids. *J Appl Physiol* (1985), 75(6), 2368-2375. doi:10.1152/jappl.1993.75.6.2368
- Deshmukh, R. (2020). Bridging the Gap of Drug Delivery in Colon Cancer: The Role of Chitosan and Pectin Based Nanocarriers System. *Curr Drug Deliv*, 17(10), 911-924. doi:10.2174/1567201817666200717090623
- Dhyani, M., Joshi, N., Bemelman, W. A., Gee, M. S., Yajnik, V., D'Hoore, A., . . . Michelassi, F. (2019). Challenges in IBD Research: Novel Technologies. *Inflamm Bowel Dis*, 25(Suppl 2), S24-S30. doi:10.1093/ibd/izz077
- Dubay, D. A., & Franz, M. G. (2003). Acute wound healing: the biology of acute wound failure. *Surg Clin North Am*, 83(3), 463-481. doi:10.1016/S0039-6109(02)00196-2
- Ebbesen, P. (1971). Reticulosarcoma and amyloid development in BALB/c mice inoculated with syngeneic cells from young and old donors. *J Natl Cancer Inst*, 47(6), 1241-1245. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4941118>
- Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, 127(3), 514-525. doi:10.1038/sj.jid.5700701
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2006). Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev*, 58(14), 1456-1459. doi:10.1016/j.addr.2006.09.011
- Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano*, 3(1), 16-20. doi:10.1021/nn900002m
- Fazio, V. W., Marchetti, F., Church, M., Goldblum, J. R., Lavery, C., Hull, T. L., . . . Secic, M. (1996). Effect of resection margins on the recurrence of Crohn's disease in the small bowel. A randomized controlled trial. *Ann Surg*, 224(4), 563-571; discussion 571-563. doi:10.1097/00000658-199610000-00014
- Fredman, G., Kamaly, N., Spolitu, S., Milton, J., Ghorpade, D., Chiasson, R., . . . Tabas, I. (2015). Targeted nanoparticles containing the proresolving peptide Ac2-26 protect against advanced atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Sci Transl Med*, 7(275), 275ra220. doi:10.1126/scitranslmed.aaa1065
- Friedman, D. J., Kunzli, B. M., Yi, A. R., Sevigny, J., Berberat, P. O., Enyoji, K., . . . Robson, S. C. (2009). From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(39), 16788-16793. doi:10.1073/pnas.0902869106
- Galindo-Rodriguez, S. A., Allemann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (2005). Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 22(5), 419-464. doi:10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v22.i5.10
- Garcia-Hernandez, V., Neumann, P. A., Koch, S., Lyons, R., Nusrat, A., & Parkos, C. A. (2021). Systematic Scoring Analysis for Intestinal Inflammation in a Murine Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis Model. *J Vis Exp*(168). doi:10.3791/62135
- Getting, S. J., Flower, R. J., & Perretti, M. (1997). Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br J Pharmacol*, 120(6), 1075-1082. doi:10.1038/sj.bjp.0701029
- Gewirtz, A. T., Collier-Hyams, L. S., Young, A. N., Kucharzik, T., Guilford, W. J., Parkinson, J. F., . . . Madara, J. L. (2002). Lipoxin a4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Immunol*, 168(10), 5260-5267. doi:10.4049/jimmunol.168.10.5260
- Gilroy, D., & De Maeyer, R. (2015). New insights into the resolution of inflammation. *Semin Immunol*, 27(3), 161-168. doi:10.1016/j.smim.2015.05.003

- Gonzalez, D. O., & Nwomeh, B. C. (2017). Complications in children with ulcerative colitis undergoing ileal pouch-anal anastomosis. *Semin Pediatr Surg*, *26*(6), 384-390. doi:10.1053/j.sempedsurg.2017.10.008
- Hannon, R., Croxtall, J. D., Getting, S. J., Roviezzo, F., Yona, S., Paul-Clark, M. J., . . . Flower, R. J. (2003). Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *FASEB J*, *17*(2), 253-255. doi:10.1096/fj.02-0239fje
- Harada, K., Ohira, S., Isse, K., Ozaki, S., Zen, Y., Sato, Y., & Nakanuma, Y. (2003). Lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through toll-like receptors and related molecules in cultured biliary epithelial cells. *Lab Invest*, *83*(11), 1657-1667. doi:10.1097/01.lab.0000097190.56734.fe
- Harms, B. A., Myers, G. A., Rosenfeld, D. J., & Starling, J. R. (1994). Management of fulminant ulcerative colitis by primary restorative proctocolectomy. *Dis Colon Rectum*, *37*(10), 971-978. doi:10.1007/BF02049307
- Hart, A. L., Al-Hassi, H. O., Rigby, R. J., Bell, S. J., Emmanuel, A. V., Knight, S. C., . . . Stagg, A. J. (2005). Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, *129*(1), 50-65. doi:10.1053/j.gastro.2005.05.013
- Hawley, P. R., Faulk, W. P., Hunt, T. K., & Dunphy, J. E. (1970). Collagenase activity in the gastro-intestinal tract. *Br J Surg*, *57*(12), 896-900. doi:10.1002/bjs.1800571206
- Heazlewood, C. K., Cook, M. C., Eri, R., Price, G. R., Tauro, S. B., Taupin, D., . . . McGuckin, M. A. (2008). Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med*, *5*(3), e54. doi:10.1371/journal.pmed.0050054
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., . . . Schulzke, J. D. (2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, *129*(2), 550-564. doi:10.1016/j.gastro.2005.05.002
- Heller, F., Fromm, A., Gitter, A. H., Mankertz, J., & Schulzke, J. D. (2008). Epithelial apoptosis is a prominent feature of the epithelial barrier disturbance in intestinal inflammation: effect of pro-inflammatory interleukin-13 on epithelial cell function. *Mucosal Immunol*, *1 Suppl 1*, S58-61. doi:10.1038/mi.2008.46
- Hoang, C. M., Maykel, J. A., Davids, J. S., Crawford, A. S., Sturrock, P. R., & Alavi, K. (2020). Distribution of Elective Ileal Pouch-Anal Anastomosis Cases for Ulcerative Colitis: a Study Utilizing the University Health System Consortium Database. *J Gastrointest Surg*, *24*(11), 2613-2619. doi:10.1007/s11605-019-04443-2
- Hoffmann, M., Schwertassek, U., Seydel, A., Weber, K., Falk, W., Hauschildt, S., & Lehmann, J. (2018). A refined and translationally relevant model of chronic DSS colitis in BALB/c mice. *Lab Anim*, *52*(3), 240-252. doi:10.1177/0023677217742681
- Hohenberger, W., Merkel, S., & Hermanek, P. (2013). Volume and outcome in rectal cancer surgery: the importance of quality management. *Int J Colorectal Dis*, *28*(2), 197-206. doi:10.1007/s00384-012-1596-2
- Hoshyar, N., Gray, S., Han, H., & Bao, G. (2016). The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (London, England)*, *11*(6), 673-692. doi:10.2217/nnm.16.5
- Houdart, R., Lavergne, A., Valleur, P., Villet, R., & Hautefeuille, P. (1985). Vascular evolution of single-layer end-on colonic anastomosis. A microangiographic study of 180 anastomoses in the rat from two to 180 days. *Dis Colon Rectum*, *28*(7), 475-480. doi:10.1007/BF02554087
- Hyman, N., Manchester, T. L., Osler, T., Burns, B., & Cataldo, P. A. (2007). Anastomotic leaks after intestinal anastomosis: it's later than you think. *Ann Surg*, *245*(2), 254-258. doi:10.1097/01.sla.0000225083.27182.85
- Ibrahim, A., Kamel, W. H., & Soliman, M. (2022). Efficacy of gelatin sponge in the prevention of post-surgical intra-abdominal adhesion in a rat model. *Res Vet Sci*, *152*, 26-33. doi:10.1016/j.rvsc.2022.07.018

- Ishida, T., Yoshida, M., Arita, M., Nishitani, Y., Nishiumi, S., Masuda, A., . . . Azuma, T. (2010). Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*, *16*(1), 87-95. doi:10.1002/ibd.21029
- Jiang, X., Chen, X., Dong, R., Wang, J., Pan, Y., & Cao, Y. (2023). Establishment of a mouse model of inflammatory bowel disease using dextran sulfate sodium. *Adv Clin Exp Med*, *32*(5), 563-573. doi:10.17219/acem/156647
- Jonsson, K., Jiborn, H., & Zederfeldt, B. (1983). Breaking strength of small intestinal anastomoses. *Am J Surg*, *145*(6), 800-803. doi:10.1016/0002-9610(83)90144-7
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, *3*(6), 422-433. doi:10.1038/nrc1094
- Kamaly, N., Fredman, G., Subramanian, M., Gadde, S., Pesic, A., Cheung, L., . . . Farokhzad, O. C. (2013). Development and in vivo efficacy of targeted polymeric inflammation-resolving nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(16), 6506-6511. doi:10.1073/pnas.1303377110
- Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., & Farokhzad, O. C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chem Soc Rev*, *41*(7), 2971-3010. doi:10.1039/c2cs15344k
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev*, *116*(4), 2602-2663. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346
- Katsuno, A., Aimoto, T., Uchida, E., Tabata, Y., Miyamoto, M., & Tajiri, T. (2011). The controlled release of basic fibroblast growth factor promotes a rapid healing of pancreaticojejunal anastomosis with potent angiogenesis and accelerates apoptosis in granulation tissue. *J Surg Res*, *167*(1), 166-172. doi:10.1016/j.jss.2009.05.042
- Kim, S. M., Ha, S. E., Vetrivel, P., Kim, H. H., Bhosale, P. B., Park, J. E., . . . Kim, G. S. (2020). Cellular Function of Annexin A1 Protein Mimetic Peptide Ac2-26 in Human Skin Keratinocytes HaCaT and Fibroblast Detroit 551 Cells. *Nutrients*, *12*(11). doi:10.3390/nu12113261
- Krarpup, P. M., Eld, M., Heinemeier, K., Jorgensen, L. N., Hansen, M. B., & Agren, M. S. (2013). Expression and inhibition of matrix metalloproteinase (MMP)-8, MMP-9 and MMP-12 in early colonic anastomotic repair. *Int J Colorectal Dis*, *28*(8), 1151-1159. doi:10.1007/s00384-013-1697-6
- Langer, R., & Folkman, J. (1976). Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature*, *263*(5580), 797-800. doi:10.1038/263797a0
- Lee, J. H., Reischl, S., Walter, R. L., Vieregge, V., Weber, M.-C., Xu, R., . . . Kamaly, N. (2024). Orally delivered biodegradable targeted inflammation resolving pectin-coated nanoparticles induce anastomotic healing post intestinal surgery. *bioRxiv*, 2024.2001.2001.569918. doi:10.1101/2024.01.01.569918
- Leibovich, S. J., & Ross, R. (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*, *78*(1), 71-100. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1109560>
- Leoni, G., Alam, A., Neumann, P. A., Lambeth, J. D., Cheng, G., McCoy, J., . . . Nusrat, A. (2013). Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair. *J Clin Invest*, *123*(1), 443-454. doi:10.1172/JCI65831
- Leoni, G., Neumann, P. A., Kamaly, N., Quiros, M., Nishio, H., Jones, H. R., . . . Nusrat, A. (2015). Annexin A1-containing extracellular vesicles and polymeric nanoparticles promote epithelial wound repair. *J Clin Invest*, *125*(3), 1215-1227. doi:10.1172/JCI76693
- Leoni, G., Neumann, P. A., Sumagin, R., Denning, T. L., & Nusrat, A. (2015). Wound repair: role of immune-epithelial interactions. *Mucosal Immunol*, *8*(5), 959-968. doi:10.1038/mi.2015.63
- Li, C., Zhao, Y., Cheng, J., Guo, J., Zhang, Q., Zhang, X., . . . Zhang, J. (2019). A Proresolving Peptide Nanotherapy for Site-Specific Treatment of Inflammatory Bowel Disease by Regulating Proinflammatory Microenvironment and Gut Microbiota. *Adv Sci (Weinh)*, *6*(18), 1900610. doi:10.1002/advs.201900610

- Liao, W. I., Wu, S. Y., Wu, G. C., Pao, H. P., Tang, S. E., Huang, K. L., & Chu, S. J. (2017). Ac2-26, an Annexin A1 Peptide, Attenuates Ischemia-Reperfusion-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci*, *18*(8). doi:10.3390/ijms18081771
- Lightner, A. L. (2020). Surgery for Inflammatory Bowel Disease in the Era of Biologics. *J Gastrointest Surg*, *24*(6), 1430-1435. doi:10.1007/s11605-020-04563-0
- Loftus, E. V., Jr., & Sandborn, W. J. (2002). Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*, *31*(1), 1-20. doi:10.1016/s0889-8553(01)00002-4
- Lopez-Serrano, P., Perez-Calle, J. L., Perez-Fernandez, M. T., Fernandez-Font, J. M., Boixeda de Miguel, D., & Fernandez-Rodriguez, C. M. (2010). Environmental risk factors in inflammatory bowel diseases. Investigating the hygiene hypothesis: a Spanish case-control study. *Scand J Gastroenterol*, *45*(12), 1464-1471. doi:10.3109/00365521.2010.510575
- Maestrelli, F., Cirri, M., Corti, G., Mennini, N., & Mura, P. (2008). Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, *69*(2), 508-518. doi:10.1016/j.ejpb.2007.12.004
- Majno, G., & Joris, I. (2004). *Cells, tissues, and disease: principles of general pathology*: Oxford University Press.
- Mantzoros, I., Kanellos, I., Demetriades, H., Christoforidis, E., Kanellos, D., Pramateftakis, M. G., . . . Betsis, D. (2004). Effects of steroid on the healing of colonic anastomoses in the rat. *Tech Coloproctol*, *8 Suppl 1*, s180-183. doi:10.1007/s10151-004-0150-9
- Marjanovic, G., & Hopt, U. T. (2011). [Physiology of anastomotic healing]. *Chirurg*, *82*(1), 41-47. doi:10.1007/s00104-010-1898-2
- McDermott, F. D., Heeney, A., Kelly, M. E., Steele, R. J., Carlson, G. L., & Winter, D. C. (2015). Systematic review of preoperative, intraoperative and postoperative risk factors for colorectal anastomotic leaks. *Br J Surg*, *102*(5), 462-479. doi:10.1002/bjs.9697
- Melgar, S., Karlsson, A., & Michaelsson, E. (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *288*(6), G1328-1338. doi:10.1152/ajpgi.00467.2004
- Migaly, J., Lieberman, J., Long, W., Fisher, C., & Rolandelli, R. H. (2004). Effect of adenoviral-mediated transfer of transforming growth factor-beta1 on colonic anastomotic healing. *Dis Colon Rectum*, *47*(10), 1699-1705. doi:10.1007/s10350-004-0647-3
- Miltschitzky, J. R. E., Clees, Z., Weber, M. C., Vierregge, V., Walter, R. L., Friess, H., . . . Neumann, P. A. (2021). Intestinal anastomotic healing models during experimental colitis. *Int J Colorectal Dis*, *36*(10), 2247-2259. doi:10.1007/s00384-021-04014-5
- Mizuno, H., Uemura, K., Moriyama, A., Wada, Y., Asai, K., Kimura, S., & Kato, T. (1997). Glucocorticoid induced the expression of mRNA and the secretion of lipocortin 1 in rat astrocytoma cells. *Brain Res*, *746*(1-2), 256-264. doi:10.1016/s0006-8993(96)01259-0
- Monsen, U., Brostrom, O., Nordenvall, B., Sorstad, J., & Hellers, G. (1987). Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*, *22*(2), 214-218. doi:10.3109/00365528708991882
- Mukhopadhyay, S., & Aich, P. (2020). Comparative severity analysis of colitis in C57BL/6 than BALB/c mice: A novel and rapid model of DSS induced colitis. *bioRxiv*, 2020.2005.2007.082669. doi:10.1101/2020.05.07.082669
- Myrelid, P., Salim, S. Y., Darby, T., Almer, S., Melgar, S., Andersson, P., & Soderholm, J. D. (2015). Effects of anti-inflammatory therapy on bursting pressure of colonic anastomosis in murine dextran sulfate sodium induced colitis. *Scand J Gastroenterol*, *50*(8), 991-1001. doi:10.3109/00365521.2014.964760
- Naeem, M., Awan, U. A., Subhan, F., Cao, J., Hlaing, S. P., Lee, J., . . . Yoo, J. W. (2020). Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. *Arch Pharm Res*, *43*(1), 153-169. doi:10.1007/s12272-020-01219-0
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., . . . Kaplan, G. G. (2018). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a

- systematic review of population-based studies. *Lancet*, 390(10114), 2769-2778.
doi:10.1016/S0140-6736(17)32448-0
- Ordas, I., Eckmann, L., Talamini, M., Baumgart, D. C., & Sandborn, W. J. (2012). Ulcerative colitis. *Lancet*, 380(9853), 1606-1619. doi:10.1016/S0140-6736(12)60150-0
- Pan, X., Hui, H., Teng, X., & Wei, K. (2022). Overexpression of Annexin A1 is associated with the formation of capillaries in infantile hemangioma. *Mol Clin Oncol*, 17(3), 133.
doi:10.3892/mco.2022.2566
- Panigrahy, D., Gilligan, M. M., Serhan, C. N., & Kashfi, K. (2021). Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. *Pharmacol Ther*, 227, 107879.
doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107879
- Pantelis, D., Beissel, A., Kahl, P., Wehner, S., Vilz, T. O., & Kalff, J. C. (2010). The effect of sealing with a fixed combination of collagen matrix-bound coagulation factors on the healing of colonic anastomoses in experimental high-risk mice models. *Langenbecks Arch Surg*, 395(8), 1039-1048. doi:10.1007/s00423-010-0703-5
- Perretti, M. (1998). Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation. *Gen Pharmacol*, 31(4), 545-552.
doi:10.1016/S0306-3623(98)00039-1
- Perretti, M., Croxtall, J. D., Wheller, S. K., Goulding, N. J., Hannon, R., & Flower, R. J. (1996). Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nat Med*, 2(11), 1259-1262. doi:10.1038/nm1196-1259
- Perretti, M., & D'Acquisto, F. (2009). Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 9(1), 62-70. doi:10.1038/nri2470
- Perretti, M., & Gavins, F. N. (2003). Annexin 1: an endogenous anti-inflammatory protein. *News Physiol Sci*, 18, 60-64. doi:10.1152/nips.01424.2002
- Phillips, J. D., Kim, C. S., Fonkalsrud, E. W., Zeng, H., & Dindar, H. (1992). Effects of chronic corticosteroids and vitamin A on the healing of intestinal anastomoses. *Am J Surg*, 163(1), 71-77. doi:10.1016/0002-9610(92)90255-p
- Pommergaard, H. C., Rosenberg, J., Schumacher-Petersen, C., & Achiam, M. P. (2011). Choosing the best animal species to mimic clinical colon anastomotic leakage in humans: a qualitative systematic review. *Eur Surg Res*, 47(3), 173-181. doi:10.1159/000330748
- Post, S., Betzler, M., von Ditfurth, B., Schurmann, G., Kuppers, P., & Herfarth, C. (1991). Risks of intestinal anastomoses in Crohn's disease. *Ann Surg*, 213(1), 37-42. doi:10.1097/0000658-199101000-00007
- Powers, C. J., McLeskey, S. W., & Wellstein, A. (2000). Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer*, 7(3), 165-197. doi:10.1677/erc.0.0070165
- Prescott, D., & McKay, D. M. (2011). Aspirin-triggered lipoxin enhances macrophage phagocytosis of bacteria while inhibiting inflammatory cytokine production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 301(3), G487-497. doi:10.1152/ajpgi.00042.2011
- Quiros, M., Feier, D., Birkl, D., Agarwal, R., Zhou, D. W., Garcia, A. J., . . . Nusrat, A. (2020). Resolvin E1 is a pro-repair molecule that promotes intestinal epithelial wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(17), 9477-9482. doi:10.1073/pnas.1921335117
- Rabau, M., Eyal, A., Kluger, Y., & Dayan, D. (1998). Bursting pressure in anastomotic healing in experimentally induced colitis in rats. *Dis Colon Rectum*, 41(4), 468-472.
doi:10.1007/BF02235761
- Randhawa, P. K., Singh, K., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*, 18(4), 279-288.
doi:10.4196/kjpp.2014.18.4.279
- Raptis, D., Mantzoros, I., Pramateftakis, M. G., Despoudi, K., Zaraboukas, T., Koliakos, G., . . . Lazarides, C. (2012). The effects of tacrolimus on colonic anastomotic healing in rats. *Int J Colorectal Dis*, 27(3), 299-308. doi:10.1007/s00384-011-1337-y
- Raptis, D., Pramateftakis, M. G., & Kanellos, I. (2018). Our 20-year experience with experimental colonic anastomotic healing. *J Med Life*, 11(1), 5-14. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29696058>

- Reischl, S., Lee, J. H., Miltschitzky, J. R. E., Vieregge, V., Walter, R. L., Twardy, V., . . . Neumann, P. A. (2021). Ac2-26-Nanoparticles Induce Resolution of Intestinal Inflammation and Anastomotic Healing via Inhibition of NF-kappaB Signaling in a Model of Perioperative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. doi:10.1093/ibd/izab008
- Rijcken, E., Sachs, L., Fuchs, T., Spiegel, H. U., & Neumann, P. A. (2014). Growth factors and gastrointestinal anastomotic healing. *J Surg Res*, *187*(1), 202-210. doi:10.1016/j.jss.2013.10.013
- Rogler, G. (2017). Resolution of inflammation in inflammatory bowel disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, *2*(7), 521-530. doi:10.1016/S2468-1253(17)30031-6
- Roin, F., & Roin, J. (1989). Inflammatory bowel disease of the Faroe Islands, 1981-1988. A prospective epidemiologic study: primary report. *Scand J Gastroenterol Suppl*, *170*, 44-46; discussion 50-45. doi:10.3109/00365528909091350
- Rubin, G. P., Hungin, A. P., Kelly, P. J., & Ling, J. (2000). Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population. *Aliment Pharmacol Ther*, *14*(12), 1553-1559. doi:10.1046/j.1365-2036.2000.00886.x
- Rustgi, S. D., Kayal, M., & Shah, S. C. (2020). Sex-based differences in inflammatory bowel diseases: a review. *Therap Adv Gastroenterol*, *13*, 1756284820915043. doi:10.1177/1756284820915043
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*, *21*(1), 55-89. doi:10.1210/edrv.21.1.0389
- Sartor, R. B. (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, *3*(7), 390-407. doi:10.1038/ncpgasthep0528
- Savage, F. J., Lacombe, D. L., Boulos, P. B., & Hembry, R. M. (1997). Role of matrix metalloproteinases in healing of colonic anastomosis. *Dis Colon Rectum*, *40*(8), 962-970. doi:10.1007/BF02051206
- Seltana, A., Cloutier, G., Reyes Nicolas, V., Khalfaoui, T., Teller, I. C., Perreault, N., & Beaulieu, J. F. (2022). Fibrin(ogen) Is Constitutively Expressed by Differentiated Intestinal Epithelial Cells and Mediates Wound Healing. *Front Immunol*, *13*, 916187. doi:10.3389/fimmu.2022.916187
- Sharara, A. I., Al Awadhi, S., Alharbi, O., Al Dhahab, H., Mounir, M., Salese, L., . . . Mosli, M. (2018). Epidemiology, disease burden, and treatment challenges of ulcerative colitis in Africa and the Middle East. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, *12*(9), 883-897. doi:10.1080/17474124.2018.1503052
- Shental, O., Tulchinsky, H., Greenberg, R., Klausner, J. M., & Avital, S. (2012). Positive histological inflammatory margins are associated with increased risk for intra-abdominal septic complications in patients undergoing ileocolic resection for Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*, *55*(11), 1125-1130. doi:10.1097/DCR.0b013e318267c74c
- Shimono, N., Takatori, T., Ueda, M., Mori, M., & Nakamura, Y. (2003). Multiparticulate chitosan-dispersed system for drug delivery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, *51*(6), 620-624. doi:10.1248/cpb.51.620
- Simpson, D. M., & Ross, R. (1972). The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest*, *51*(8), 2009-2023. doi:10.1172/JCI107007
- Solito, E., de Coupade, C., Parente, L., Flower, R. J., & Russo-Marie, F. (1998). IL-6 stimulates annexin 1 expression and translocation and suggests a new biological role as class II acute phase protein. *Cytokine*, *10*(7), 514-521. doi:10.1006/cyto.1997.0325
- Taurog, J. D., Richardson, J. A., Croft, J. T., Simmons, W. A., Zhou, M., Fernandez-Sueiro, J. L., . . . Hammer, R. E. (1994). The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med*, *180*(6), 2359-2364. doi:10.1084/jem.180.6.2359
- Thia, K. T., Loftus, E. V., Jr., Sandborn, W. J., & Yang, S. K. (2008). An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol*, *103*(12), 3167-3182. doi:10.1111/j.1572-0241.2008.02158.x
- Thornton, F. J., & Barbul, A. (1997). Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am*, *77*(3), 549-573. doi:10.1016/s0039-6109(05)70568-5

- Trallori, G., Palli, D., Saieva, C., Bardazzi, G., Bonanomi, A. G., d'Albasio, G., . . . Morettini, A. (1996). A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92). *Scand J Gastroenterol*, *31*(9), 892-899. doi:10.3109/00365529609051998
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*, *9*(11), 799-809. doi:10.1038/nri2653
- Van Klinken, B. J., Van der Wal, J. W., Einerhand, A. W., Buller, H. A., & Dekker, J. (1999). Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut*, *44*(3), 387-393. doi:10.1136/gut.44.3.387
- Vergnolle, N., Coméra, C., & Buéno, L. (1995). Annexin 1 is overexpressed and specifically secreted during experimentally induced colitis in rats. *Eur J Biochem*, *232*(2), 603-610. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.tb20850.x
- Vucelic, B., Korac, B., Sentic, M., Milicic, D., Hadzic, N., Juresa, V., . . . et al. (1991). Ulcerative colitis in Zagreb, Yugoslavia: incidence and prevalence 1980-1989. *Int J Epidemiol*, *20*(4), 1043-1047. doi:10.1093/ije/20.4.1043
- Weber, K., Merkel, S., Perrakis, A., & Hohenberger, W. (2013). Is there a disadvantage to radical lymph node dissection in colon cancer? *Int J Colorectal Dis*, *28*(2), 217-226. doi:10.1007/s00384-012-1564-x
- Weber, M. C., Bauer, J., Buck, A., Clees, Z., Oertel, R., Kasajima, A., . . . Neumann, P. A. (2023). Perioperative Low-Dose Prednisolone Treatment Has Beneficial Effects on Postoperative Recovery and Anastomotic Healing in a Murine Colitis Model. *J Crohns Colitis*, *17*(6), 950-959. doi:10.1093/ecco-jcc/jjad002
- Wysocki, A. B., Staiano-Coico, L., & Grinnell, F. (1993). Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol*, *101*(1), 64-68. doi:10.1111/1523-1747.ep12359590
- Yang, Y. H., Morand, E. F., Getting, S. J., Paul-Clark, M., Liu, D. L., Yona, S., . . . Flower, R. J. (2004). Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, *50*(3), 976-984. doi:10.1002/art.20201
- Yauw, S. T., Wever, K. E., Hoesseini, A., Ritskes-Hoitinga, M., & van Goor, H. (2015). Systematic review of experimental studies on intestinal anastomosis. *Br J Surg*, *102*(7), 726-734. doi:10.1002/bjs.9776
- Ye, R. D., Boulay, F., Wang, J. M., Dahlgren, C., Gerard, C., Parmentier, M., . . . Murphy, P. M. (2009). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev*, *61*(2), 119-161. doi:10.1124/pr.109.001578
- Yu, C. S., Jung, S. W., Lee, J. L., Lim, S. B., Park, I. J., Yoon, Y. S., . . . Kim, J. C. (2019). The Influence of Preoperative Medications on Postoperative Complications in Patients After Intestinal Surgery for Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*, *25*(9), 1559-1568. doi:10.1093/ibd/izz010
- Yu, S. S., Lau, C. M., Thomas, S. N., Jerome, W. G., Maron, D. J., Dickerson, J. H., . . . Giorgio, T. D. (2012). Size- and charge-dependent non-specific uptake of PEGylated nanoparticles by macrophages. *Int J Nanomedicine*, *7*, 799-813. doi:10.2147/IJN.S28531
- Yue, Y., Yan, S., Li, H., Zong, Y., Yue, J., & Zeng, L. (2018). The role of oral fluvastatin on postoperative peritoneal adhesion formation in an experimental rat model. *Acta Chir Belg*, *118*(6), 372-379. doi:10.1080/00015458.2018.1444549

11 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Reischl S, Lee JH, Miltschitzky JRE, Vieregge V, **Walter RL**, Twardy V, Kasajima A, Friess H, Kamaly N, Neumann PA. Ac2-26-Nanoparticles Induce Resolution of Intestinal Inflammation and Anastomotic Healing via Inhibition of NF- κ B Signaling in a Model of Perioperative Kolitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2021 Aug 19;27(9):1379-1393. doi: 10.1093/ibd/izab008. PMID: 33512505.

Miltschitzky JRE, Clees Z, Weber MC, Vieregge V, **Walter RL**, Friess H, Reischl S, Neumann PA. Intestinal anastomotic healing models during experimental Kolitis. *Int J Colorectal Dis*. 2021 Oct;36(10):2247-2259. doi: 10.1007/s00384-021-04014-5. Epub 2021 Aug 28. PMID: 34455473; PMCID: PMC8426221.

Lee, J. H., Reischl, S., **Walter, R. L.**, Vieregge, V., Weber, M.-C., Xu, R., . . . Kamaly, N. (2024). Orally delivered biodegradable targeted inflammation resolving pectin-coated nanoparticles induce anastomotic healing post intestinal surgery. *bioRxiv*, 2024.2001.2001.569918. doi:10.1101/2024.01.01.569918.

Walter, R. L., V. Vieregge, S. Reischl, P.-A. Neumann, E. Miltschitzky, J. H. Lee, H. Friess and N. Kamaly (2020). "AB077. Perioperative oral delivery of anti-inflammatory Ac2-26 loaded coated nanoparticles induces anastomotic healing during Colitis." *Mesentery and Peritoneum* **4**. DOI: 10.21037/map.2020.AB077.

12 LEBENSLAUF

13 DANKSAGUNG

Mit großer Dankbarkeit schließe ich meine Doktorarbeit ab und möchte diese Gelegenheit nutzen, um all jenen zu danken, die mich auf diesem anspruchsvollen Weg begleitet und unterstützt haben.

Ich möchte mich bei Univ.-Prof. Dr. Helmut Friess für die Bereitstellung der Thematik sowie die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer und Arbeitsgruppenleiter, PD Dr. Philipp-A. Neumann. Seine fachkundige Anleitung und Geduld sowie die persönliche Betreuung und die täglichen Debriefings haben sowohl die Laborarbeit als auch das Verfassen dieser Dissertation sehr erleichtert.

Ebenso möchte ich meinem Mentor Dr. Stefan Reischl für die Einarbeitung in die Methodik sowie die fachliche Unterstützung danken. Seine Unterstützung sowie Ratschläge haben den Verlauf der Arbeit maßgeblich geprägt.

Vincent Vieregge danke ich vielmals für die engagierte Mitarbeit im Labor. Unsere Zusammenarbeit hat die Forschungsatmosphäre bereichert und zu dem Erfolg der Experimente beigetragen.

Meiner Freundin Olga danke ich für ihre unermüdliche Geduld und ihre liebevolle Unterstützung in den Höhen und Tiefen dieser Reise.

Meinen Eltern, meinen Brüdern und meiner Familie gebührt mein tiefster Dank für ihre jahrelange bedingungslose Unterstützung und Motivation. Danke für Antrieb und Rückhalt, den ich auf diesem Weg benötigt habe.