

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Abteilung V
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Fuchs**

**Der protektive Einfluss des TNF- α -Antikörpers
auf die Pathogenese der
nekrotisierenden Enterocolitis**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Monika Maria Weng
aus Hechingen**

2007

| | |
|----------------------|--------------------------------|
| Dekan: | Professor Dr. I. B. Autenrieth |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. J. Fuchs |
| 2. Berichterstatter: | Professor Dr. C. F. Poets |

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| 1 Einleitung | 7 |
| 1.1 Nekrotisierende Enterocolitis | 7 |
| 1.1.1 Zytokineinfluss auf die Pathogenese der nekrotisierenden Enterocolitis | 9 |
| 1.1.2 Einfluss des Tumornekrosefaktors- α auf den intestinalen Gewebeschaden..... | 9 |
| 1.1.3 Einfluss des Tumornekrosefaktors- α auf die Apoptoseinduktion | 10 |
| 1.2 Fragestellung dieser Studie | 11 |
| 2 Material und Methodik | 12 |
| 2.1 Versuchsprotokoll..... | 12 |
| 2.2 Versuchstiere | 13 |
| 2.3 Methodisches Vorgehen | 13 |
| 2.3.1 Induktion der nekrotisierenden Enterocolitis | 13 |
| 2.3.2 Modulation des Immunsystems | 14 |
| 2.4 Entnahme und histologische Aufarbeitung der Darmpräparate | 15 |
| 2.4.1 Gewebeentnahme und Fixierung..... | 15 |
| 2.4.2 Gewebeschnitte..... | 16 |
| 2.4.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) | 16 |
| 2.4.4 Immunhistochemische Färbung..... | 17 |
| 2.4.4.1 Grundlagen der Avidin-Biotin-Methode | 17 |
| 2.4.4.2 Versuchsdurchführung | 19 |
| 2.4.4.3 Kontrollen | 21 |
| 2.4.5. Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)-Test und Diamidino-2-phenylindole (DAPI)- Färbung..... | 21 |
| 2.4.5.2 Versuchsdurchführung | 21 |
| 2.4.5.3 Kontrollen | 22 |
| 2.4.6. Auswertung der Präparate..... | 23 |
| 2.4.6.1 HE-Färbungen..... | 23 |
| 2.4.6.2 Immunhistochemische Färbung: Myeloperoxidase (MPO)..... | 24 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.4.6.3 | TUNEL-Untersuchung | 24 |
| 2.4.7 | Statistische Verfahren | 24 |
| 2.5 | Materialien | 26 |
| 2.5.1 | Zusammensetzung der Reagenzien..... | 26 |
| 2.5.2 | Geräte | 27 |
| 2.5.3 | Gefäße, Instrumente und Verbrauchsmaterialien | 27 |
| 2.5.4 | Chemikalien..... | 28 |
| 2.5.5 | Reagenzien | 29 |
| 2.5.6 | Fixierlösung: | 29 |
| 2.5.7 | Pufferlösungen | 30 |
| 2.5.8 | Versuchstiere, Nahrung und Antikörper..... | 30 |
| 3. | Ergebnisse | 31 |
| 3.1 | Tiermodell | 31 |
| 3.2 | Morphologie | 31 |
| 3.3 | Myeloperoxidase-Färbung | 35 |
| 3.4 | TUNEL-Test | 37 |
| 4. | Diskussion | 40 |
| 4.1 | Allgemeine Diskussion | 40 |
| 4.2 | Methoden und Ergebnisse | 43 |
| 4.2.1 | Relevanz des Tiermodells | 43 |
| 4.2.2 | Relevanz der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und der immunhistochemischen Myeloperoxidase-Färbung..... | 46 |
| 4.2.3 | Stellenwert der Apoptose | 51 |
| 4.3 | Klinische Relevanz..... | 54 |
| 4.5 | Schlussfolgerung | 55 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 56 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 58 |
| 7. | Danksagung..... | 70 |
| 8. | Lebenslauf | 71 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| Abb | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| DAB | Diaminobenzidintetrahydrochlorid |
| DAPI | Diamidino-2-phenylindole |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor |
| FC | Fragment crystalline (des Antikörpers) |
| FCS | Fetal calf serum |
| GOT | Glutamat-Oxalacetat-Transaminase |
| h | hora(e), Stunde(n) |
| HE | Haematoxylin-Eosin |
| ICAM | cell adhesion molecule des Immunsystems |
| IFN | Interferon |
| IgA | Immunglobulin A |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL | Interleukin |
| INOS | Inducible nitric oxide synthase (iNOS) |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| Min | Minute(n) |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| MPO | Myeloperoxidase |
| MW | Mittelwert |
| NBF | Normal buffered Formalin |
| NEC | nekrotisierende Enterocolitis |
| NO | Stickstoffmonoxid, Nitritoxid |
| OT | Objektträger |
| PAF | Platelet-activating-factor |
| PAP | Peroxidase-Antiperoxidase |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| RT | Raumtemperatur |
| Sec | Sekunde(n) |
| SEM | standard error of the mean |
| Tab | Tabelle |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| TNF-R | Tumornekrosefaktor-Rezeptor |
| TRAIL | TNF-related apoptosis inducing ligand |
| TUNEL | Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling |

1 Einleitung

1.1 Nekrotisierende Enterocolitis

Die nekrotisierende Enterocolitis (NEC) ist die häufigste erworbene lebensbedrohliche Erkrankung des Gastrointestinaltraktes bei Früh- und Neugeborenen (65). Die genaue Ätiologie der NEC ist bis heute nicht vollständig geklärt und scheint multifaktoriell bedingt zu sein. Bekannte Risikofaktoren sind Frühgeburtlichkeit (59), ein geringes Geburtsgewicht (125), überschießende bakterielle Kolonisation (7,18,26,28), Geburtsasphyxie (14), postnatale Hypoxie (14), intestinale Ischämie (59,91,104), sowie Ersatznahrung und Hypothermie (44,60,74,119). Eine präventive Wirkung konnte für die Gabe von Muttermilch, speziell für das in ihr enthaltene IgA (35) nachgewiesen werden (4,31,44,74).

Epidemiologische Studien zeigen, dass insbesondere neonatologische Intensivpatienten unabhängig vom Geschlecht mit einer Inzidenz von insgesamt 1-5% betroffen sind (59). Bei extrem kleinen Frühgeborenen (Geburtsgewicht unter 1500 g (Very-low-birth-weight)) steigt die Inzidenz sogar auf 11% (125). Der Zeitpunkt der Erkrankung ist abhängig von der Schwangerschaftsdauer. Bei Kindern, die nach der 31. Schwangerschaftswoche geboren werden, liegt das mittlere Erkrankungsalter bei elf Tagen. Bei einer Schwangerschaftsdauer von unter 26 Wochen liegt der Zeitpunkt des Ausbruchs dagegen im Durchschnitt bei 23 Tagen (125).

Das klinische Erscheinungsbild ist vielfältig: Zu den Leitsymptomen zählen abdominelle Distension, galliges Erbrechen, galliger oder blutiger Mageninhalt, blutiger Stuhl, Ödeme der Labien bzw. des Skrotums sowie eine Thrombozytopenie. Bei etwa 50% der Patienten findet sich eine sog. Pneumatosis intestinalis (60). Diese luminalen oder intramuralen Gasansammlungen entstehen durch die Fermentation und H₂-Exkretion von Bakterienkolonien in der Darmwand (3,36). Die nekrotisierende Entzündung kann auf die Mukosa beschränkt bleiben, bei schwereren Verläufen werden

jedoch auch tiefere Wandschichten infiltriert. Gefürchtet sind Komplikationen wie Darmperforation, Hämorrhagien, Aszites und Peritonitis (3,61,107).

Die Diagnose wird anhand der klinischen Symptomatik und bildgebenden Verfahren gestellt. Kliegman (60) modifizierte die 1978 von Bell erstellte Klassifikation (6), die die Erkrankung nach systemischen und radiologischen Kriterien in drei verschiedene Stadien einteilt (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Klassifikation der nekrotisierenden Enterocolitis (NEC) nach Bell, adaptiert von Kliegman (60)

| Stadien | Klinik | Gastrointestinaltrakt | Radiologie |
|--|---|--|--|
| I Verdacht auf NEC | Nicht spezifisch: Apnoe, Bradykardie, Lethargie, thermische Instabilität | Magenrest, Nachweis von Blut im Stuhl | Normal oder unspezifisch |
| IIA leichte NEC | Wie Stadium I | Gebälhtes Abdomen evtl. mit Druckschmerz, fehlende Darmgeräusche, Blut im Stuhl | Ileus mit dilatierten Darmschlingen und Pneumatose |
| IIB mäßige NEC | Leichte Azidose und Thrombozytopenie | Ödem der Darmwand, Druckschmerz bei Palpation | Prominente Pneumatose und Aszites |
| IIIA fortgeschrittene NEC | Respiratorische und metabolische Azidose, schwere Apnoe, Hypotension, Anurie, disseminierte intravasale Gerinnungsstörungen | Diffuses Ödem, Rötung und Induration des Abdomens | Ausgeprägter Aszites, persistierend stehende Darmschlingen ohne Perforation |
| IIIB fortgeschrittene NEC | Verschlechterung der Vitalzeichen, Schock und Elektrolytstörungen | Wie oben, zusätzlich Perforationszeichen | Wie oben, zusätzlich Pneumoperitoneum |

Die Behandlung erfolgt in Abhängigkeit des Stadiums grundsätzlich konservativ und symptomatisch durch Entlastung des Gastrointestinaltrakts mittels Nahrungskarenz, Magensonde und Antibiotikatherapie. Die Indikation zur

operativen Intervention richtet sich nach dem klinischen Bild und ergibt sich aus drohenden Komplikationen wie Peritonitis, Perforation oder Ileus und erfolgt äußerst zurückhaltend (61,64).

Der Mangel an evidence basierten Daten zur chirurgischen Therapie führt zu sehr unterschiedlichen, teils kontroversen Behandlungsstrategien mit Peritonealdainage, Resektion nekrotischer Darmabschnitte und Anlage eines Anus praeter (10,47,97).

1.1.1 Zytokineinfluss auf die Pathogenese der nekrotisierenden Enterocolitis

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass Entzündungsmediatoren und Zytokine an der Pathogenese der NEC beteiligt sind, darunter u.a. NO (38), IL-6 (52,128), IL-8 (23,53), IL-11 (88), IL-12 (48,87), IL-18 (48), PAF (37) sowie IFN- γ (38).

Vor allem TNF- α wird in der Pathogenese der NEC Bedeutung zugemessen (13,55). TNF- α wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert und ist ein zentraler Mediator der nicht-adaptiven Immunantwort. Eine Vielzahl regulatorischer wie auch pathophysiologischer Funktionen werden ihm je nach Konzentration zugeschrieben, darunter bei der Gewebeschädigung und -regeneration, bei der Kachexie sowie beim septischen Schock (124). Erhöhte TNF- α -Werte fanden sich sowohl in Blutproben wie auch im Gewebe intestinaler Resektionspräparate von NEC-Patienten (13,38). Auch tierexperimentelle Studien lassen auf eine proinflammatorische TNF- α -Wirkung schließen (14,55). Klinisch erwies sich die TNF-Bestimmung im Plasma als Indikator für Ausmaß oder Prognose der NEC jedoch als ungeeignet (85).

1.1.2 Einfluss des Tumornekrosefaktors- α auf den intestinalen Gewebeschaden

Hsueh et al. untersuchten in einer experimentellen Studie die Interaktion von TNF- α , PAF und LPS bei der NEC. Dabei fanden sie eine synergistische proinflammatorische Wirkung der drei Zytokine bei der Aktivierung von Makrophagen, Leukozyten und dem Komplementsystem (55). Der Theorie von

Hsueh et al. zufolge wird durch Ersatznahrung die Darmmukosa geschädigt und stellt damit eine Eintrittspforte für LPS dar (55). Im Darmgewebe induziert LPS die endogene TNF- und PAF-Produktion und erzeugt auf diese Weise eine lokale Entzündungsreaktion. Im Ergebnis dessen wird die Darmmucosa geschädigt, so dass weiter Bakterien und LPS in den Kreislauf gelangen. Als Folge der Endotoxämie kommt es zur systemischen Reaktion, die in einer intestinalen Nekrose resultiert (55).

1.1.3 Einfluss des Tumornekrosefaktors- α auf die Apoptoseinduktion

In den Darmpräparaten von NEC-Patienten fanden Ford et al. eine deutlich gesteigerte Apoptoserate in den apikalen Villi der Enterozyten (38). TNF- α ist in der Pathophysiologie der NEC ein wichtiger Mediator aufgrund seiner Fähigkeit zur Induktion der Apoptose (13,81). Im Tierexperiment wurde festgestellt, dass bereits reichlich Apoptose stattfindet, noch bevor durch den progredienten Entzündungsprozess die Morphologie des Gewebes stark geschädigt ist (58).

Die Apoptose ist primär ein physiologischer Vorgang und beinhaltet den „programmierten Zelltod“. Dieser besitzt eine wichtige regulatorische Funktion in der Embryogenese, der Kontrolle des Immunsystems sowie der Geweberegeneration und Zellerneuerung (9). Exogene Einflüsse wie ionisierende Strahlung, Zytostatika, Hyperthermie oder Zytokine können ebenfalls den aktiven Zelltod auslösen (78,132). Die apoptotische Zelle schrumpft und löst sich aus dem umgebenden Zellverband (78). Im weiteren Verlauf verdichtet sich das Chromatin und die DNA wird durch Endonucleasen in Fragmente bestimmter Größe gespalten. Ausstülpungen („membrane blebbing“) und Abschnürungen der Plasmamembran führen zur Bildung sog. apoptotischer Körperchen („apoptotic bodies“), die von Makrophagen phagozytiert werden (78,131). Durch die bestehende Integrität der Plasmamembran bleiben die benachbarten Zellen von dem Vorgang unbeschädigt (78).

Die Nekrose hingegen ist die passive Form des Zelluntergangs und wird durch pathologische Bedingungen wie Ischämie, starke Hyper- oder Hypothermie oder durch Toxine ausgelöst (98). Nach dem morphologischen Erscheinungsbild unterscheidet man die Koagulations- und die Kolliquationsnekrose sowie einige Sonderformen (103). In den nekrotischen Zellen erfolgen physiochemische und autolytische Vorgänge, die zu morphologisch sichtbaren Strukturveränderungen führen (98,103). Durch eine Gewebsansäuerung im Nekrosegebiet kommt es zur Eiweißdenaturierung, die die Integrität der Zellmembran beeinträchtigt (98). Lichtmikroskopisch imponiert die Nekrose durch Zellkernveränderungen (Kernpyknose, Karyorrhesis, Karyolyse) sowie eine verstärkte Eosinophilie des Zytoplasmas (98,103). In Folge der Zellmembranschädigung wird der Zellinhalt freigesetzt, darunter Fettsäuren, Proteolysate sowie Enzyme (z.B. GOT, LDH), die sich klinisch-chemisch im Serum nachweisen lassen (98). Dies führt zu einer Entzündungsreaktion, bei der auch benachbarte Zellen geschädigt werden (98).

1.2 Fragestellung dieser Studie

Klinische und experimentelle Studien weisen darauf hin, dass TNF- α bei der nekrotisierenden Enterocolitis eine wichtige Rolle spielt. Unklar ist bislang auf welchem Weg das Zytokin Einfluss auf den Entzündungsverlauf der Erkrankung hat. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es daher, die Bedeutung von TNF- α auf die Pathogenese der nekrotisierenden Enterocolitis zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurde geprüft, ob durch den Einsatz eines selektiven TNF- α -Antikörpers eine Hemmung der Entzündungsreaktion des Darms vermittelt und dadurch ein gemilderter Verlauf der Erkrankung erzielt werden kann.

2 Material und Methodik

2.1 Versuchsprotokoll

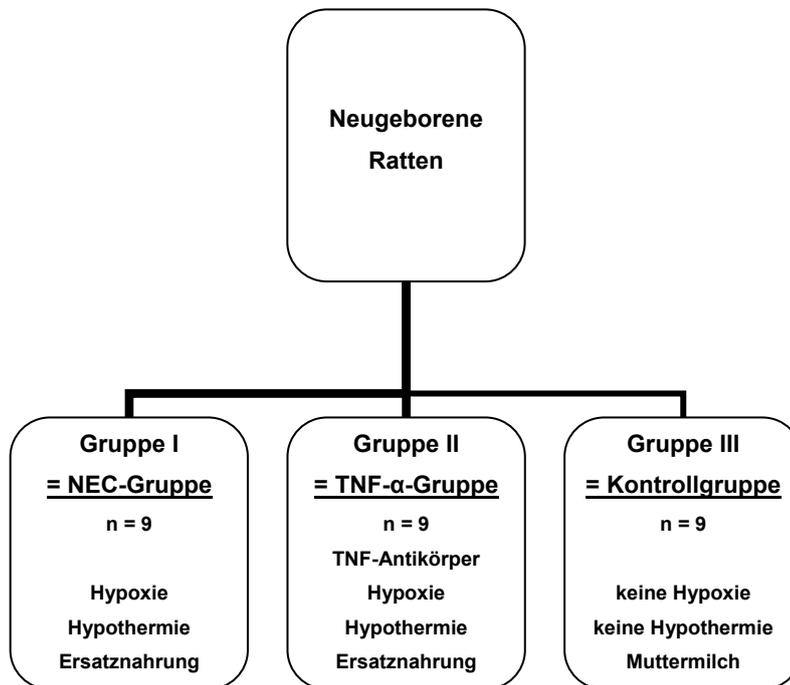
Neugeborene Sprague-Dawley-Ratten wurden in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt. Basierend auf einem von Caplan et al. beschriebenen Modell wurde bei den Tieren der Gruppe I durch NEC-begünstigende Faktoren wie Ersatznahrung, Asphyxie und Hypothermie eine NEC induziert (14). Die Tiere wurden unmittelbar postpartal von der Mutter getrennt und in einem Inkubator (Inkubator Draeger, Isolette, Fa. Draeger, Lübeck, BRD) bei 37°C untergebracht. Die Ernährung erfolgte mittels einer Sonde.

Auf die gleiche Weise wurden die Tiere der Gruppe II behandelt, zusätzlich wurde bei ihnen intraperitoneal ein TNF- α -Antikörper appliziert. Die TNF-Antikörper wurden noch vor der Induktion der NEC verabreicht, da die intraperitoneale Applikation nach Ausbruch der Erkrankung unter standardisierten Bedingungen kaum durchführbar wäre.

Die Tiere der Gruppe III bildeten die Kontrollgruppe. Hier wurde keine NEC induziert, die Ernährung erfolgte mit Muttermilch (s. Abb. 1).

Die Tiere wurden bei drohendem Tod sofort, sonst spätestens nach 96 Stunden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden sie nach medianer Laparatomie auf makroskopisch sichtbare Anzeichen einer NEC wie intestinale Hämorrhagie, Distension und Perforation sowie weitere Krankheitsanzeichen untersucht.

Abb. 1: **Schematische Darstellung der Versuchsgruppen**



2.2 Versuchstiere

Es wurden neugeborene Sprague-Dawley-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borchon, BRD) verwendet. Das Geburtsgewicht lag bei ca. 6 bis 8 g. Die Haltung der Tiere erfolgte bei künstlichem Licht in einem Zwölf-Stunden-Tag-/Nacht-Rhythmus von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr mit Unterbrechungen zur Fütterung in der Nacht. Die Versuchsdurchführung erfolgte mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen (Versuchs-Nr. C 5/02).

2.3 Methodisches Vorgehen

2.3.1 Induktion der nekrotisierenden Enterocolitis

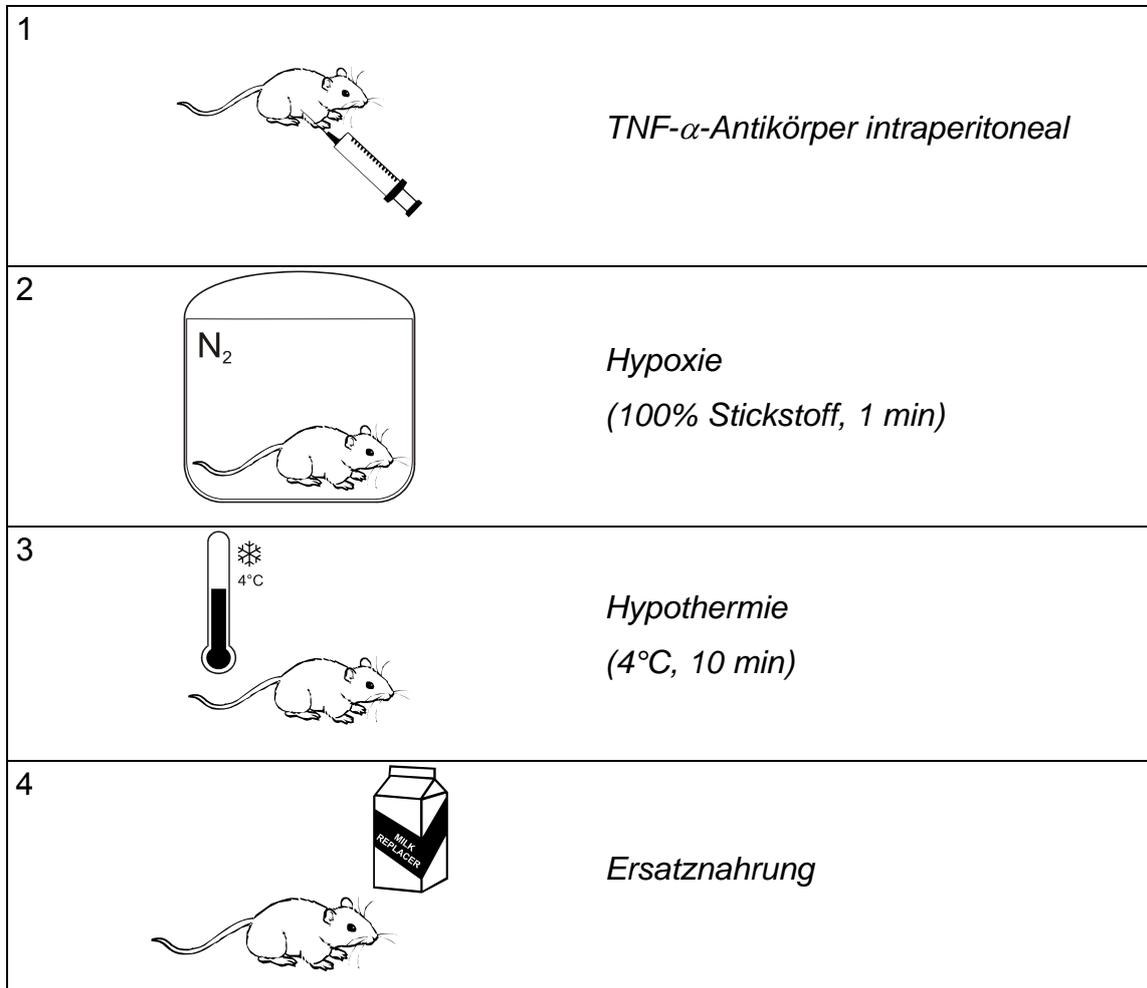
Die Tiere der Gruppen I und II (jeweils n = 9) wurden alle 3 h mit einem Rattenmilchersatz (150 kcal / ml, Esbilac powder, Pet-AG, Hampshire, IL, USA) mittels einer Knopfsonde (tierärztlicher Dienst, Universität Tübingen) von Hand gefüttert. Beginnend am ersten Tag mit 0,1 ml, wurden die Portionen bis zum vierten Tag auf 0,4 ml gesteigert. Zwei mal täglich wurden die Ratten einer 60-

sekündigen Hypoxie mit 100 % Stickstoff (Fa. Draeger, Lübeck) und anschließender 10 minütiger Hypothermie bei 4°C ausgesetzt. Die Tiere in der Kontrollgruppe (n = 9) erhielten Muttermilch, sie wurden keiner Hypoxie oder Hypothermie unterzogen.

2.3.2 Modulation des Immunsystems

Für die Immunmodulation erhielten die Tiere der Gruppe II (n = 9) einen anti-mouse TNF- α -Antikörper i.p. (0,05 mg / kg Körpergewicht, Sigma-Aldrich, Steinheim, BRD) (s. Abb. 2). Die Modulation erfolgte immer 10 Minuten vor der Hypoxie und Hypothermie. Um die Trägerlösung (Ethanol) der TNF- α -Antikörper als reaktionsauslösend auszuschließen, wurde bei einigen zusätzlichen Tieren mit NEC nur die Trägerlösung ohne Antikörper verabreicht. Alle Tiere wurden nach 96 h durch Dekapitation getötet, diejenigen mit schweren Krankheitsanzeichen früher. Es wurden nur Tiere eingeschlossen, bei denen eine NEC induziert werden konnte.

Abb. 2 **Schematische Darstellung zur Induktion der NEC und Immunmodulation mit TNF- α -Antikörpern bei den Tieren der Versuchsgruppe II**



2.4 Entnahme und histologische Aufarbeitung der Darmpräparate

2.4.1 Gewebeentnahme und Fixierung

Das Abdomen wurde durch mediane Laparotomie eröffnet. Danach erfolgte die Darstellung des Situs und die Präparation von Magen und Duodenum. Das Treitz'sche Band wurde aufgesucht und anschließend das Dünndarmmesenterium dargestellt. Jejunum und Colon wurden jeweils getrennt entnommen. Distal des Treitz'schen Bandes konnte das Dünndarpaket bis zum ileocaecalen Übergang reseziert werden. Nach Präparation des

Dickdarmmesenteriums wurde auch das Dickdarmpaket bis zum colorektalen Übergang abgesetzt.

Das Gewebe wurde für 12 h in NBF (10 % normal buffered formalin) fixiert. Anschließend wurden die Darmabschnitte in beschrifteten Einbettkassetten (Universal-Einbettkassetten, Fa. Langebrinck, Emmendingen, BRD) durch einen automatischen Gewebsaufbereiter (Histokinette Leica TP 1050 Vacuum tissue processor, Fa. Leica, Nussloch, BRD) in folgenden Lösungen weiterbehandelt:

- Ethanol 70 % (Universitätsapotheke Tübingen, BRD) für 2,5 h bei 37°C
- Ethanol 96 % (Universitätsapotheke Tübingen, BRD) für 2,5 h bei 37°C
- Ethanol 99,9 % (Universitätsapotheke Tübingen, BRD) für 3,5 h bei 37°C
- Xylol (Fa. Merck, Darmstadt, BRD) für 3,5 h bei 37°C
- Paraffinwachs (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD) für 4,5 h bei 60°C

Zuletzt wurden die Präparate mit Hilfe eines halbautomatischen Einbettgerätes (Leica Histo Embedder, Fa. Leica, Nussloch, BRD) in flüssiges Paraffinwachs eingebettet und auf einer integrierten Kühlplatte bei –4°C ausgehärtet.

2.4.2 Gewebeschnitte

Mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2155, Fa. Leica, Nussloch, BRD) wurde von jedem der in Paraffin eingebetteten Darmabschnitte 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Zur Streckung und Entfaltung wurden die Schnitte in ein warmes Wasserbad (38°C) gesetzt und dann auf Spezialobjektträger für die Immunhistochemie (SuperFrostPlus, Fa. Langenbrinck, Emmendingen, BRD) aufgezogen. Anschließend wurden sie auf einer Heizplatte (40°C, Leica HI 1220, Fa. Leica, Nussloch, BRD) getrocknet.

2.4.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur Beurteilung des Gewebes und des Entzündungsmaßes mittels NEC-Score wurde von jedem Präparat eine HE-Färbung angefertigt. Nach folgendem Schema wurden die Gewebeschnitte zunächst in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert:

- Xylol (Fa. Merck, Darmstadt, BRD) 3x5 min
- 100 % Ethanol (Universitätsapotheke Tübingen, BRD) 2x10 min
- 96 % Ethanol (Universitätsapotheke Tübingen, BRD) 2x10 min
- 70 % Ethanol (Universitätsapotheke Tübingen, BRD) 1x10 min
- Aqua dest., schütteln 5 min

Anschließend wurde mit Hämatoxylin (Mayer's Hämalaunlösung 1:5 mit aqua dest. verdünnt, Fa. Merck, Darmstadt, BRD) für 5 min eine Kernfärbung durchgeführt. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte 10 min lang gewässert und 1 min in 0,1%iger Eosinlösung (Eosin G, Fa. Merck, Darmstadt, BRD) gegengefärbt. Nach einer weiteren Minute in Aqua dest. erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (3x 70 % Ethanol, 5x 96 % Ethanol jeweils kurz eintauchen, 100 % Ethanol 2x5 min, Xylol 2x5 min). Zum Schluss wurden die Präparate in DePeX (Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, BRD) eingebettet.

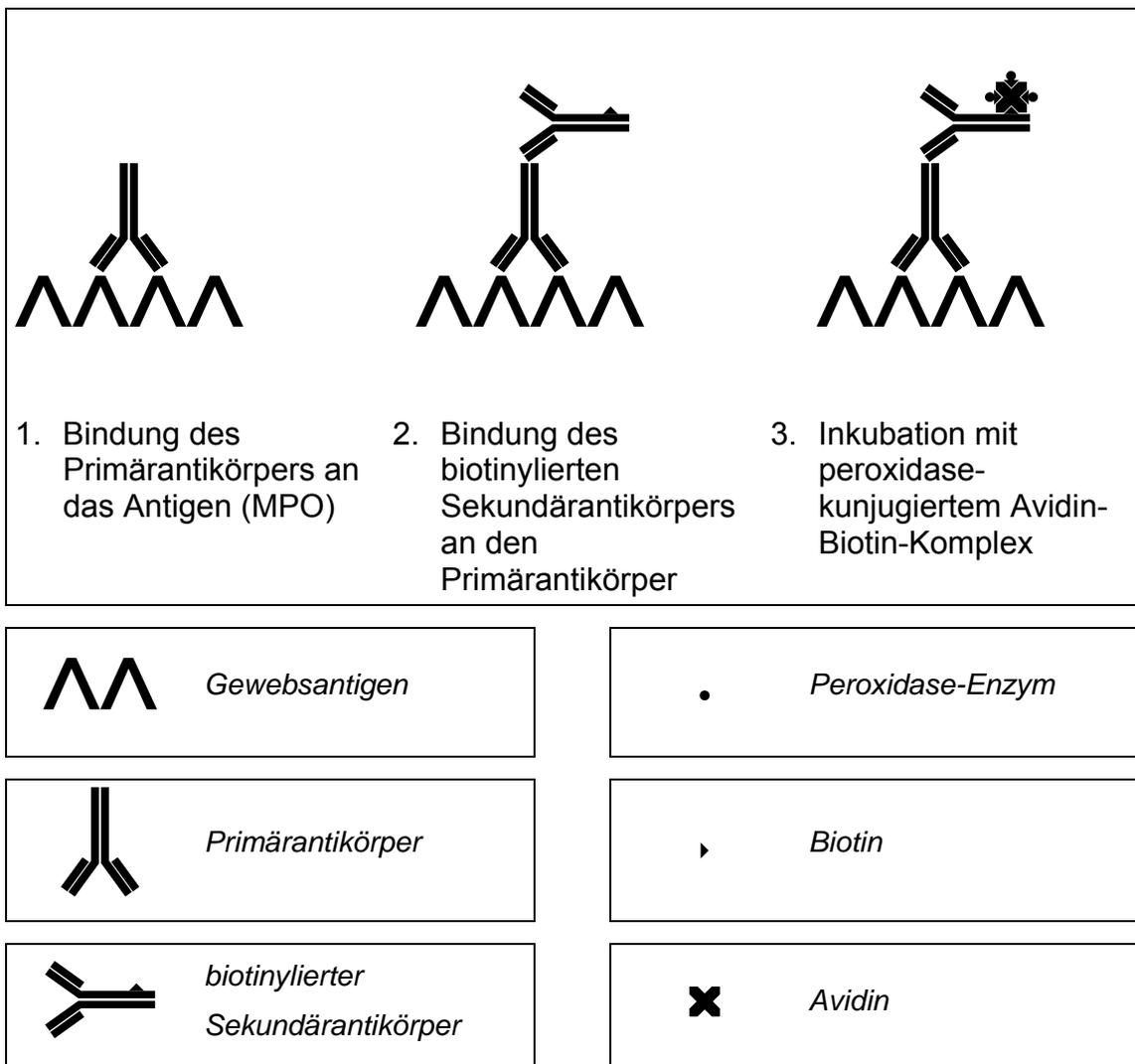
2.4.4 Immunhistochemische Färbung

2.4.4.1 Grundlagen der Avidin-Biotin-Methode

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die sog. Avidin-Biotin-Methode angewandt. Dazu sind drei Reagenzien notwendig. Zuerst bindet ein spezifischer, aber unkonjugierter Primärantikörper (in unserer Untersuchung Anti-MPO rabbit polyclonal antibody, Fa. Dianova, Hamburg, BRD) an das Antigen (Myeloperoxidase). Anschließend wird ein zweiter Antikörper (hier: goat-anti-rabbit IgG-B, biotin conjugated, Fa. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) aufgetragen, der spezifisch gegen das FC-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist (s. Abb. 3). Da der Primärantikörper vom Kaninchen stammt, muss der Sekundärantikörper gegen Kaninchen-Immunglobuline gerichtet sein. Im weiteren Verlauf bedient man sich der Fähigkeit des Avidins, vier Moleküle Biotin zu binden. Der zweite Antikörper ist mit einem Biotin-Molekül konjugiert (= biotinyliert).

Als drittes Reagenz wird ein peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex (hier: Avidin-Biotin Vectastain ABC Standard Kit, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA) hinzugefügt. Die freien Bindungsstellen des Avidins binden dann an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Peroxidase-Enzym, und damit indirekt das gesuchte Antigen, wird nun mit einem geeigneten, Chromogen, in der vorliegenden Arbeit dem 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), sichtbar gemacht.

Abb. 3 *Immunhistochemische Färbung mit der Avidin-Biotin-Methode*



2.4.4.2 Versuchsdurchführung

Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgte nach dem bei der HE-Färbung oben angeführten Schema. Da bei der Formalinfixierung des Gewebes häufig Proteinvernetzungen durch Aldehyde entstehen, wurde zunächst eine Antigendemaskierung im Autoklaven (SANOclav, Fa. Wolf, Geislingen, BRD) durchgeführt. Die Objektträger wurden dafür in Färbetrögen (Fa. Roth GmbH, Karlsruhe, BRD) mit 10 mM Citratpuffer plaziert und für 10 Minuten bei 1 bar Druck autoklaviert. Dies entspricht einer Temperatur von etwa 110 – 120°C. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Autoklav belüftet und die erhitzten Schnitte kühlten für 15 min bei Raumtemperatur ab.

Die Präparate wurden nun mit Aqua dest. gespült und 5 Minuten lang in PBS-Pufferlösung (Fa. Merck, Darmstadt, BRD) gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 10 Minuten in 0,3 % H₂O₂ in PBS (2ml H₂O₂ 30 % + 198ml PBS) belassen. Es folgten zwei weitere 5minütige Waschschrte mit PBS. Das Gewebe wurde mit einem Fettstift (DAKO-Pen for Immunhistochemistry, Fa. Dako, Glostrup, DK) umrandet, um die Auftragsfläche für die weiteren Substrate einzugrenzen.

Bei den nun folgenden Schritten erfolgte die Inkubation der Präparate immer in einer feuchten Kammer.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und Hintergrundfärbungen wurden die Schnitte zunächst in 1,5 % blocking serum in PBS (s. Tabelle 4) für 1h bei RT inkubiert. Pro Präparat wurden immer 150 µl aufpipettiert. Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit von den OT abgeklopft, so dass eine dünne Schicht auf dem Gewebe bestehen blieb.

Nach folgendem Schema erfolgte nun die weitere Inkubation mit den jeweiligen Reagenzien. (Verdünnungen siehe Tabelle 4)

| | | |
|--|--|----------------------------------|
| 1 Primärantikörper | Anti-MPO rabbit polyclonal antibody (Dianova, Hamburg, BRD) | 150 µl pro Schnitt 1 h RT |
| 2 Waschen in PBS | | 3x5 min |
| 3 Biotinylierter Sekundärantikörper | (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) | 150 µl pro Schnitt 30 min, RT |
| 4 Waschen in PBS | | 3x5 min |
| 5 Avidin-Biotin-Enzym-Reagenz | (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) | 150 µl pro Schnitt 30 min, RT |
| 6 Waschen in PBS | | 3x5 min |

Das DAB-Chromogen (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) wurde aufgetragen und nach 5 Minuten Einwirkzeit die Farbreaktion mikroskopisch kontrolliert.

Die Präparate wurden dann 5 Minuten lang in Aqua dest. gegeben. Es folgte für 30 Sekunden die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Mayers Hämalaun, Fa. Merck, Darmstadt, BRD). Dieses wurde 2 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgespült und die Präparate anschließend noch einmal in Aqua dest. gestellt.

Abschließend wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert (95 % Ethanol für 2x10 sec, 100 % Ethanol für 2x10 sec, Xylol für 3x10 sec) und die Präparate sofort in DePeX eingedeckt.

2.4.4.3 Kontrollen

Die Qualitätssicherung erfolgte mit Hilfe eines bekannt positiven Lebergewebepräparates (sog. Positivkontrolle), das bei jeder immunhistochemischen Färbeserie mitgeführt wurde.

Zur Sicherstellung der spezifischen Reaktion des Primärantikörpers wurde für sämtliche Präparate stets eine Kontrolle mitgeführt, bei der der Primärantikörper weggelassen wurde (sog. Negativkontrolle). Stattdessen erhielten diese wieder wie im vorhergehenden Arbeitsschritt 1,5 % blocking-serum in PBS. Alle Kontrollen wurden ansonsten gleich behandelt wie die zu untersuchenden Gewebeschnitte.

2.4.5. Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)-Test und Diamidino-2-phenylindole (DAPI)-Färbung

Der TUNEL-Test dient dem Nachweis des apoptotischen Zelltods. TUNEL steht als Abkürzung für „Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling. Durch diese Technik werden Einzelstrangbrüche in der genomischen DNA detektiert. Diese entstehen durch die Aktivität von Nucleasen. Durch den Einbau modifizierter, fluoreszenz-markierter Nucleotide mit Hilfe eines Enzyms (Terminale Desoxyribosyl-Transferase) an die freien 3'OH-Enden werden die DNA-Strangbrüche nachgewiesen.

Für die Gegenfärbung wurde DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD) verwendet. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff und dient der Zellkernfärbung. Es bindet direkt an doppelsträngige DNA, insbesondere an die Basen Adenin und Thymin.

2.4.5.2 Versuchsdurchführung

Für die Färbung wurden die Paraffinschnitte nach dem oben bereits angeführten Schema entparaffiniert. Die Antigen-Demaskierung erfolgte mit 0,1 mM Citratpuffer (pH 6) für 1 min in der Mikrowelle. Durch Hinzufügen von

80 ml Aqua dest. wurden die Präparate dann rasch auf Eis abgekühlt. Nach einem 5-minütigen Waschschrift in PBS und Umrandung der Präparate mit einem Fettstift (Dako Pen, Fa. Dako, Glostrup, DK), wurde die Positiv-Kontrolle für 15 min mit der DNase I-Lösung (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD, Verdünnungen s. Tab. 5) bei Raumtemperatur inkubiert. Die übrigen OT wurden währenddessen in der PBS-Lösung belassen.

Anschließend erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 3 % BSA (Bovine Albumin Fraction V, Fa. Life-Technologies, Rockville, MD, USA) und 20 % FCS (Foetal-Calf-Serum, Fa. Biochrom, Berlin, BRD) in PBS (30 min, RT). Nach zwei weiteren Waschschriften in PBS wurden die Präparate für 1 h bei 37°C mit dem Reagenz aus TUNEL-Enzymen (Terminale Transferase) und TUNEL-Labellösung inkubiert (je 50 µl, In situ Death Detection Kit, Fluorescein, Fa. Roche, Mannheim, BRD). Die Negativ-Kontrolle wurde stattdessen mit nur 50 µl TUNEL-Labellösung ohne Terminale Transferase aufpipettiert.

Es folgten drei weitere Waschschriften mit PBS für je 5 min.

Für die Gegenfärbung wurde DAPI (Fa. Sigma, Steinheim, BRD) in einer mit Aqua dest. 1:10.000 verdünnten Lösung für 15 sec auf die OT aufgetragen. Nochmals folgten drei 5-minütige Waschschriften in PBS. Zuletzt wurden die Präparate mit Mounting Medium (Fa. Dako, Glostrup, DK) eingedeckt.

2.4.5.3 Kontrollen

In den Versuchsabläufen wurden bei jeder Farbe-Serie eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitgeführt.

Ein Präparat ohne NEC und mit intakter Zellmorphologie diene als Positiv-Kontrolle. Dieses wurde mit DNase I (Fa. Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, BRD) inkubiert. DNase I ist eine aus Rinderpankreas gewonnene Doppelstrang-spezifische Endonuclease. Mit Hilfe dieses Enzyms wurden DNA-

Strangbrüche „künstlich“ induziert, die dann im TUNEL-Test positiv nachgewiesen werden.

Ein Präparat mit starker NEC und bekannt hoher Apoptoserate wurde als Negativ-Kontrolle verwendet. Dieses wurde mit der TUNEL-Labellösung (aus: In situ Death Detection Kit, Fluorescein, Fa. Roche, Mannheim, BRD) ohne Terminale Transferase inkubiert. Dadurch konnte die Spezifität der Tests gesichert werden.

2.4.6. Auswertung der Präparate

Die Auswertung der Schnitte erfolgte verblindet durch zwei unabhängige Untersucher.

2.4.6.1 HE-Färbungen

Die histologische Einteilung der Präparate in den Grad der NEC wurde an den HE-Färbungen vorgenommen und orientierte sich an den bei Halpern et al. (48) beschriebenen Beurteilungskriterien (s. Tab. 2 und Abb. 4).

Tabelle 2: NEC-Score nach Halpern et al. (48)

| NEC Score | Beschreibung |
|------------------|---|
| 0 | normales unbeschädigtes Darmgewebe |
| 1 | leichte Trennung der Submucosa und / oder Lamina propria |
| 2 | mäßige Trennung der Submucosa und / oder Lamina propria, und/oder Ödeme in der Submucosa oder Muscularis |
| 3 | starke Trennung der Submucosa und / oder Lamina propria, und / oder Ödeme in der Submucosa oder Muscularis, beginnende Zottenablösung |
| 4 | Nekrose mit Verlust der Zotten |

2.4.6.2 Immunhistochemische Färbung: Myeloperoxidase (MPO)

Bei der Auswertung wurden 20 Gesichtsfelder pro Präparat ausgezählt. Es wurden nur diejenigen immunhistochemisch angefärbten MPO-Zellen gezählt, die sich in den Zotten des Darmgewebes befanden. Nicht mitgezählt wurden dabei Zellen in Blut- oder Lymphgefäßen sowie Zellen im Bindegewebe.

Die Präparate wurden jeweils drei Mal gezählt und anschließend der arithmetische Mittelwert berechnet (s. Abb. 6).

2.4.6.3 TUNEL-Untersuchung

Zur Auswertung bediente man sich eines von Jilling et al. (58) beschriebenen Schemas. Dabei wird der Grad der Apoptose in Scores eingeteilt (s. Tab. 3 und Abb. 8).

Tabelle 3: Apoptose-Score nach Jilling et al. (58)

| Apoptose-Score | Beschreibung |
|-----------------------|--|
| 0 | regelmäßige Struktur der Darmzotten, höchstens vereinzelt TUNEL-positive Kerne vorhanden |
| 1 | leichte Zellschäden und TUNEL-positive Zellkerne ausschließlich an den Zottenspitzen |
| 2 | Zotten mittelmäßig geschädigt und übersät mit apoptotischen Zellkernen, Krypten unauffällig |
| 3 | Krypten auch betroffen, ansonsten wie Score 2 |
| 4 | keine Zottenstruktur mehr vorhanden, apoptotische Zellkerne auch in den weiteren Wandschichten vorhanden |

2.4.7 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung wurde bei normalverteilten Daten mit dem Student-t-Test durchgeführt, bei nicht normalverteilten Daten erfolgte die Auswertung mit dem U-Rang-Test für unverbundene Stichproben nach Mann, Whitney und

Wilcoxon. Die zu vergleichenden Gruppen verfügten über einen gleich großen Stichprobenumfang.

Als Signifikanzniveau wurde stets ein $p < 0,05$ vorausgesetzt. Die Werte werden immer als $MW \pm SEM$ angegeben.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistik-Programms Sigma-Stat (Version 2.03).

2.5 Materialien

2.5.1 Zusammensetzung der Reagenzien

Tabelle 4: *Verdünnungen der Reagenzien für die Immunhistochemie (nach den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller)*

| | |
|-----------------------|--|
| Blocking serum | 150 µl normal blocking serum (Fa. Dako, Glostrup, DK) + 10 ml PBS |
| Primärantikörper | Verdünnung 1:100 in 1,5 % blocking serum in PBS: 1485 µl blocking serum in PBS + 15 µl Anti-MPO vom Kaninchen (Fa. Dianova, Hamburg, BRD) |
| Sekundärantikörper | Verdünnung 1:300: 5 ml blocking in PBS + 15 µl goat-anti-rabbit IgG (Fa. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) |
| Avidin-Biotin-Reagenz | 5 ml PBS + 2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B (Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) |

Tabelle 5: *Reagenzien für den TUNEL-Test (nach den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller)*

| | |
|-------------------------------|---|
| DNase I für Positiv-Kontrolle | 500 µl DNase I (Fa. Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, BRD) + 4500 µl PBS |
| TUNEL-Reaktionsmix | 50 µl TUNEL-Enzym-Lösung (Terminale Transferase) + 450 µl nucleotid mixture (Labellösung) in reaction buffer für Negativ-Kontrolle 50 µl Labellösung unverdünnt (In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Fa. Roche, Mannheim, BRD) |
| DAPI | Verdünnung 1:10 000 10 µl Aqua dest. + 1 µl DAPI (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD) |

2.5.2 Geräte

- Heizplatte HI 1220, Fa. Leica Microsystems, Nussloch, BRD
- Inkubator Draeger, Isolette, Fa. Draeger, Lübeck, BRD
- Kleinautoklav SANOclav, Fa. Wolf, Geislingen, BRD
- Kühlschrank, Fa. Liebherr, Biberach, BRD
- Leica Histo Embedder, Leica Instruments GmbH, Nussloch, BRD
- Leica TP 1050, Vacuum tissue processor, Leica Instruments GmbH, Nussloch, BRD
- Lichtmikroskop Zeiss Axioskop 40, Fa. Zeiss, Jena, BRD
- Magnetrührer + Rührfisch KAMAG RH, Fa. Janke & Kunkel, Staufen, BRD
- Microtom (Rotationsmicrotom) RM 2155, Fa. Leica Microsystems, Nussloch, BRD
- Pipetten, Fa. Eppendorf, Hamburg, BRD
- Präzisionswaage Sartorius analytic, Fa. Sartorius AG, Göttingen, BRD
- Schüttler Logic Shaker, Fa. Neo Lab Migge, Heidelberg, BRD
- Wasserbad HI 1210, Fa. Leica Microsystems, Nussloch, BRD

2.5.3 Gefäße, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

- DAKO-Pen for Immunhistochemistry, Fa. Dako, Glostrup, DK
- Deckgläser 18x18 mm, Fa. Langenbrinck, Emmendingen, BRD
- DePeX, Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, BRD
- Disposable Microtome Blades, DB 80L, Low Profile, Fa. Leica, Nussloch, BRD
- Einmalskalpelle Cutfix, Fa. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, BRD
- Eppendorf cups 2,0 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg, BRD
- Färbetröge, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
- Feuchte Kammer, eigene Konstruktion aus feuchten Tüchern in Metallkästen
- Gewindeflaschen, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD

- Glaskästen für Färbegestell, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
- Latex-Handschuhe, Fa. Kimberly-Clark, Roswell, USA
- Messzylinder, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
- Objektträger SuperFrostPlus, Fa. Langenbrinck, Emmendingen, BRD
- Pasteur-Pipetten Fortuna 150 mm, Fa. Hilgenberg GmbH, Malsfeld, BRD
- Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nürnberg, BRD
- Präzisionstücher, Fa. Kimberly-Clark, Roswell, USA
- Universal-Einbettkassetten, Fa. Langebrinck, Emmendingen, BRD
- Rotiplast, Gewebereinbettmittel für histol. Zwecke, Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD

2.5.4 Chemikalien

- Citronensäure-Monohydrat, Fa. Merck, Darmstadt, BRD
- Eosin G (gelblich) für die Mikroskopie, Fa. Merck, Darmstadt, BRD
- Ethanol 100 %, Universitätsapotheke der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, BRD
- Mayers Hämalunlösung für Immunhistochemie, Fa. Merck, Darmstadt, BRD
- PBS (phosphate buffered saline) Tabletten, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD
- Stickstoff 100 %, Fa. Dräger, Lübeck, BRD
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Rotipuran p.a., Fa. Carl Roth GmbH, BRD
- Wasserstoffperoxid 30 % H₂O₂ (Perhydrol), Fa. Merck, Darmstadt, BRD
- Xylol, Fa. Merck, Darmstadt, BRD

2.5.5 Reagenzien

Immunhistochemie

- 1. Antikörper: Myeloperoxidase MPO Ab-1 Rabbit Polyclonal Antikörper, Fa. Dianova GmbH, Hamburg, BRD
- 2. Antikörper: Goat-anti-rabbit IgG-B, biotin conjugated, entnommen aus dem Kit „goat ABC-Staining System“, Fa. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
- DAB Peroxidase Substrate Kit, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
- Goat Serum (Normal), Fa. Dako, Glostrup, DK
- Vectastain ABC Standard Kit Avidin-Biotin, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

TUNEL-Test

- DNase I (Desoxyribonuclease I) aus Rinderpankreas, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BRD
- In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Fa. Roche, Mannheim, BRD
enthält: - Enzyme solution (TdT)
 - Label solution (fluorescein-dUTP)
- 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride Hydrate (DAPI), Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD
- DAKO Fluorescent Mounting Medium, Fa. DAKO, Glostrup, DK
- Bovine Albumin Fraction V (BSA), Fa. Life-Technologies, Rockville, MD, USA
- Foetal-Calf-Serum (FCS), Fa. Biochrom, Berlin, BRD

2.5.6 Fixierlösung:

NBF (10 % neutral buffered formalin, pH 7,0): Formaldehyd 37 % (111 ml/l),
Aqua dest. (889 ml/l), Natriumdihydrogenphosphat (3,5 g/l),
Dinatriumhydrogenphosphat (6,5 g/l)

2.5.7 Pufferlösungen

- Citratpuffer 10 mM

Stock A

4,2 g Citronensäure-Monohydrat in 200 ml Aqua dest.

Stock B

14,7 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 500 ml Aqua dest.

Working solution:

Stock A 9 ml

Stock B 41 ml

Mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen und bei ca. 4 - 8°C lagern

- PBS Phosphatpuffer 0,01 mM

200 ml Aqua dest. auf 1 Tablette

2.5.8 Versuchstiere, Nahrung und Antikörper

- Sprague-Dawley-Ratten, Fa. Harlan-Winkelmann, Borchon, BRD
- Esbilac Milk Replacer Powder Food Supplement for Dogs and Small Animals, Pet-AG, Hampshire, IL, USA
- Monoklonal Anti-Tumor Necrosis Factor- α antibody produced in mouse, Purified immunoglobulin, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD

3. Ergebnisse

3.1 Tiermodell

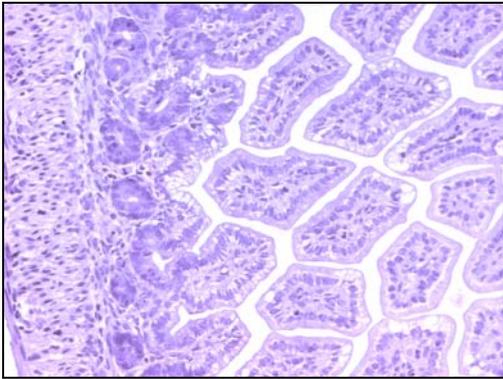
Bei rund 85 % der Tiere konnte nach Stimulation mit Hypoxie, Hypothermie und Ersatznahrung eine NEC induziert werden. Die Tiere, bei denen trotz Stimulation keine NEC-Anzeichen auftraten, wurden aus der Versuchsgruppe entfernt und in den Ergebnissen nicht mitberücksichtigt.

3.2 Morphologie

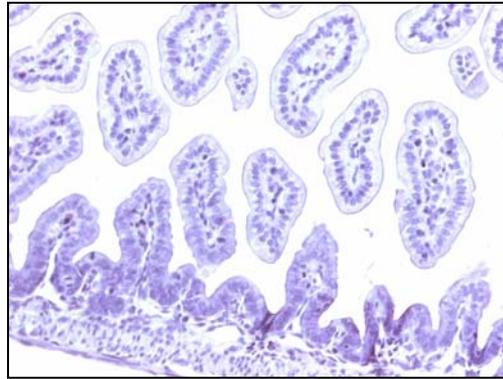
Die Morphologie der Dünn- und Dickdarmpräparate wurde anhand der HE-Färbung beurteilt und anschließend histologisch nach dem oben angeführten Schema von Halpern et al. (48) in NEC Scores eingeteilt (s. Abb. 4 A-E).

Abb. 4

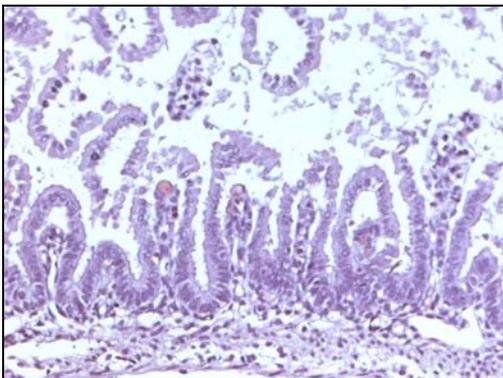
A-E Beispiele der HE-Färbungen für verschiedene NEC-Scores: (A): intakte Morphologie Grad 0, (B): leichte Trennung der Submucosa bei Grad 1, (C): deutliche Trennung der Submucosa bei Grad 2, (D): beginnende Zottenablösung bei Grad 3, (E) Destruktion der Mucosa und Zottenstruktur bei Grad 4, Vergrößerung A – E x20



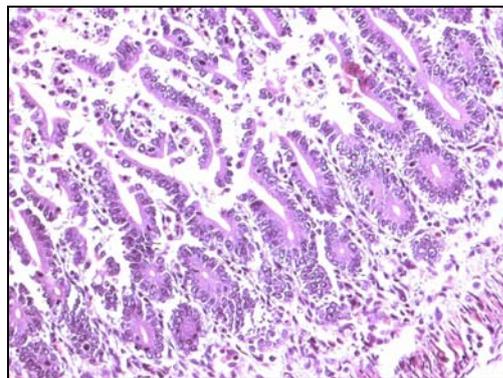
A



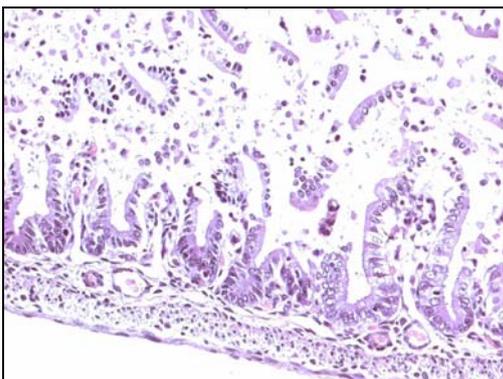
B



C



D



E

In der NEC-Gruppe ohne Modulation (Gruppe I) wies die überwiegende Anzahl der Präparate, sowohl im Jejunum als auch im Colon, deutliche histologische NEC-Anzeichen auf. Die entzündlichen Läsionen waren bei beiden Darmabschnitten gleichermaßen fortgeschritten. Die Morphologie des Jejunums der NEC-Tiere aus Gruppe I war gekennzeichnet durch Ablösung der einzelnen Gewebeschichten, Ödeme und Zottenverlust (NEC-Score MW $3,33 \pm 0,24$). In fast allen Präparaten fanden sich auch nekrotische Areale. Ebenso deutlich ausgeprägt war die Destruktion im Colon. Der mittlere NEC-Score lag hier bei $3,55 \pm 0,24$.

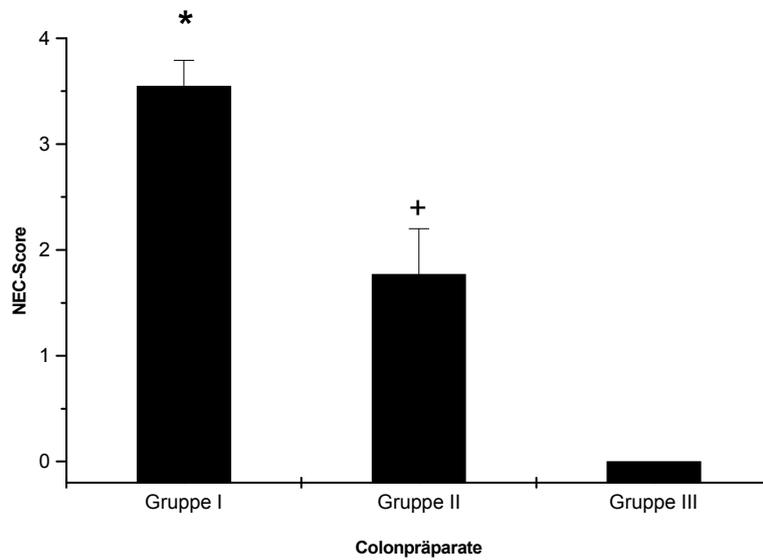
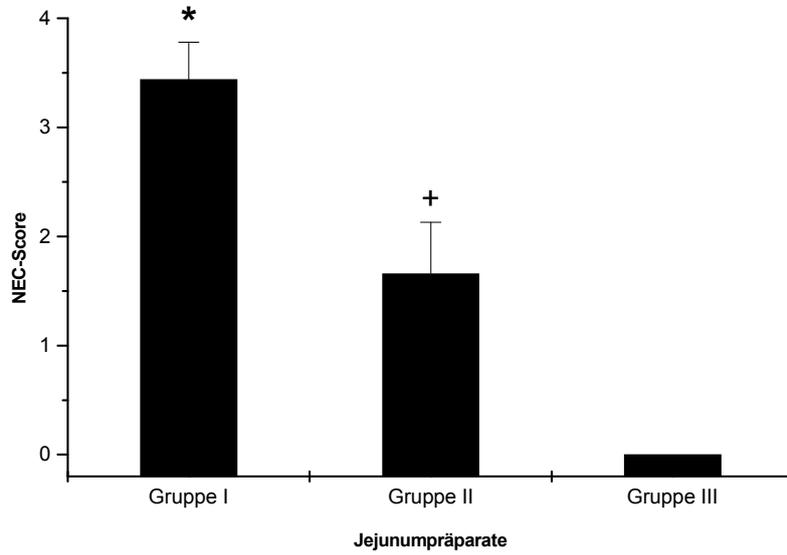
Verglichen mit der NEC-Gruppe ohne Modulation war der NEC-Score beim Jejunumgewebe der mit TNF- α -Antikörper behandelten Tiere signifikant geringer (1.66 ± 0.47 , $p < 0,05$). Die strukturellen Veränderungen beschränkten sich zumeist auf Ödeme und ein leichtes Auseinanderweichen der Gewebeschichten. Die Ablösung von Zotten war nur selten zu beobachten, es waren dabei überwiegend nur die Spitzen und weniger die Zottenbasis betroffen, wie dies in der NEC-Gruppe der Fall war.

Auch bei den Colonpräparaten (1.77 ± 0.43) war die Struktur des Darmgewebes der Tiere aus Gruppe II deutlich besser erhalten als bei den NEC-Tieren ohne Antikörper. Es konnte auch hier ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Gruppe I ohne Modulation festgestellt werden ($p < 0,05$).

Einige der Tiere aus der Kontrollgruppe hatten ebenfalls einen TNF- α -Antikörper erhalten. Die Präparate dieser Tiere wurden alle dem NEC Score 1 zugeordnet (MW $1,00 \pm 0,00$).

Abb. 5:

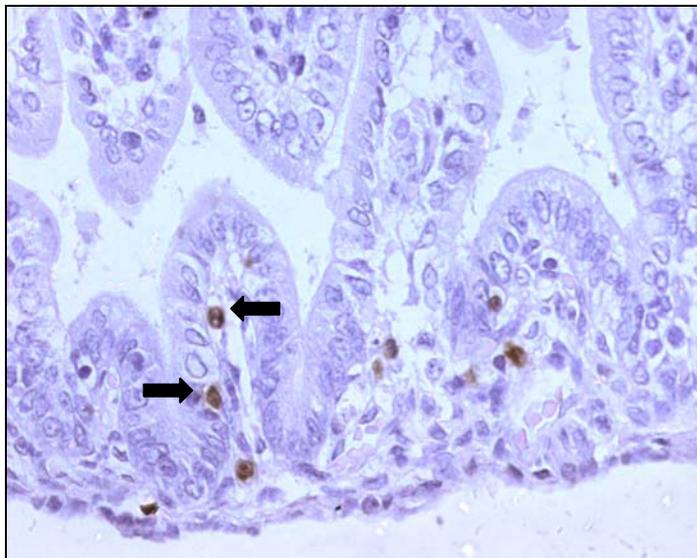
Vergleich der NEC Scores von Jejunum- und Colonpräparaten zwischen NEC-Tieren ohne Antikörper, NEC-Tieren mit TNF- α Antikörper und der Kontrollgruppe (* $p < 0,05$ vs. Gruppe III; + $p < 0,05$ vs. Gruppe I)



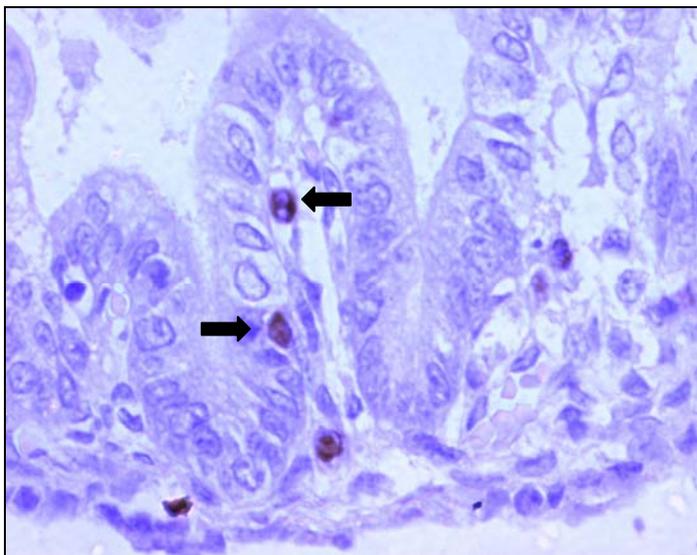
3.3 Myeloperoxidase-Färbung

Mit dieser immunhistochemischen Zellfärbung lassen sich MPO-haltige Zellen (insbesondere neutrophile und eosinophile Granulozyten) im Gewebe darstellen. Die Veränderung der MPO-positiven Zellzahl / 20 Gesichtsfelder in den einzelnen Versuchsgruppen dient als weiterer Parameter für das Ausmaß der Entzündung im Darmgewebe (s. Abb. 6 A u. B).

Abb. 6 *Immunhistochemische MPO-Färbung: die Pfeile markieren die MPO-positiven Entzündungszellen (A): Vergrößerung x40, (B): Vergrößerung x63.*



A



B

In den Jejunumpräparaten der NEC-Tiere ohne Antikörper fanden sich deutlich mehr MPO-positive Zellen (65,58 / 20 Gesichtsfelder \pm 8,02) im Vergleich zu den Antikörper-behandelten Tieren (33,16 / 20 Gesichtsfelder \pm 5,92, $p < 0,05$). Dieser Unterschied war auch bei den Colonpräparaten gegeben. Während in den Präparaten der NEC-Gruppe ohne Modulation zahlreiche MPO-gefärbte Zellen vorhanden waren (59,83 / 20 Gesichtsfelder \pm 8,58), zeigte sich bei den Tieren mit TNF- α -Antikörper eine deutlich geringere Anzahl (19,16 / 20 Gesichtsfelder \pm 5,50, $p < 0,05$).

In der Kontrollgruppe traten sowohl beim Jejunum (14,27 / 20 Gesichtsfelder \pm 3,89) wie auch beim Colon (8,22 / 20 Gesichtsfelder \pm 1,80) nur vereinzelt MPO-positiv gefärbte Zellen auf. Die Anzahl war bei beiden Darmabschnitten deutlich geringer im Vergleich mit der NEC-Gruppe ohne Modulation ($p < 0,05$).

Abb. 7 a *Vergleich der Anzahl MPO-positiver Zellen zwischen der NEC-Gruppe ohne Modulation, der NEC-Gruppe mit TNF- α -Antikörper und der Kontrollgruppe beim Jejunum (* $p < 0,05$ vs. Gruppe III)*

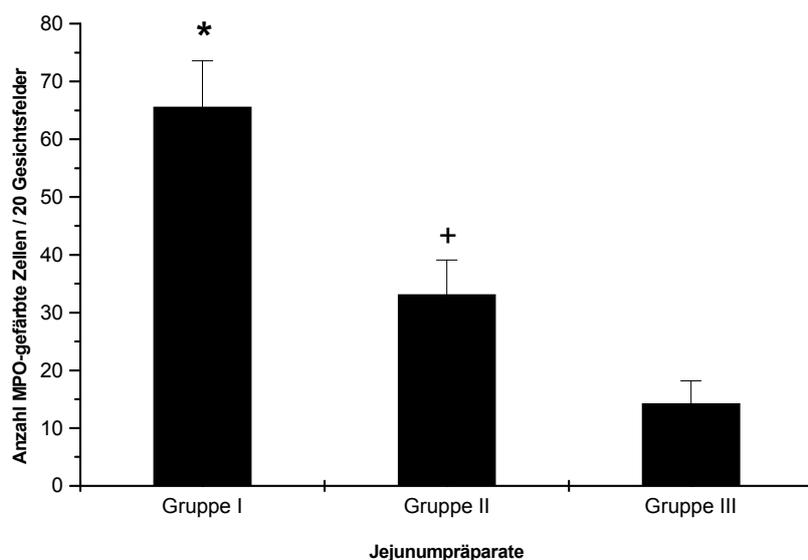
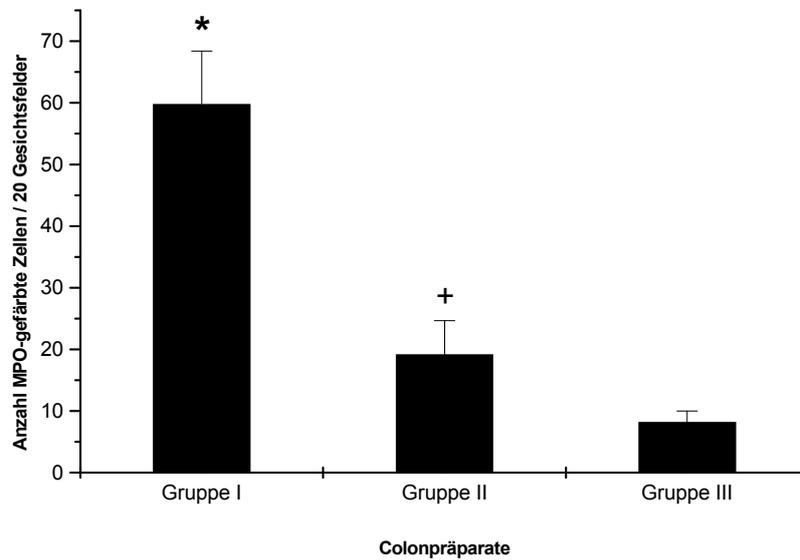


Abb. 7 b

**Vergleich der Anzahl MPO-positiver Zellen zwischen der NEC-Gruppe ohne Modulation, der NEC-Gruppe mit TNF- α -Antikörper und der Kontrollgruppe beim Colon
(+ $p < 0,05$ vs. Gruppe I)**



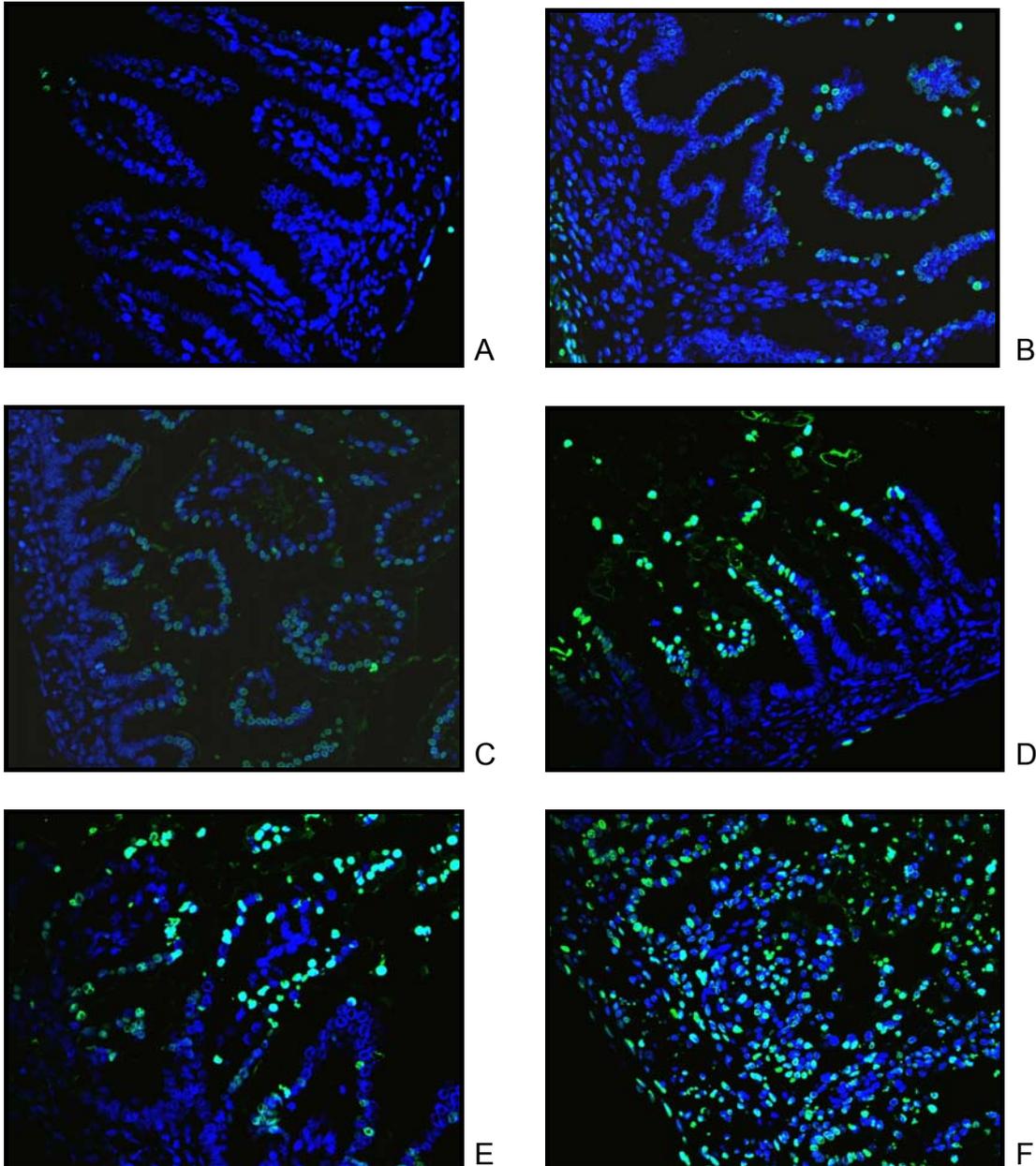
3.4 TUNEL-Test

Mit dem TUNEL-Test können apoptotische Einzelzellen dargestellt werden - unabhängig von der Phase, in der sie sich befinden. Auch sehr frühe Phasen des Gewebeuntergangs werden durch diese Technik sichtbar.

Die Auswertung orientierte sich an dem bereits oben angeführten Schema von Jilling und Caplan (58) (s. Abb. 8). Die Präparate wurden von zwei unabhängigen Personen verblindet beurteilt.

Abb. 8

A-E Beispiele der TUNEL-Färbung für verschiedene NEC-Scores: (A): höchstens vereinzelt TUNEL-positive Kerne bei Grad 0, (B): bei Grad 1 sind ausschließlich die Zottenspitzen betroffen, (C): die Zotten sind übersät mit apoptotischen Kernen bei Grad 2, (D+E): bei Grad 3 sind auch die Krypten betroffen, (F) bei Grad 4 ist keine Zottenstruktur mehr vorhanden, alle Wandschichten sind von der Apoptose betroffen, Vergrößerung x20 (grün = DNA-Strangbrüche, blau = Zellkerne)

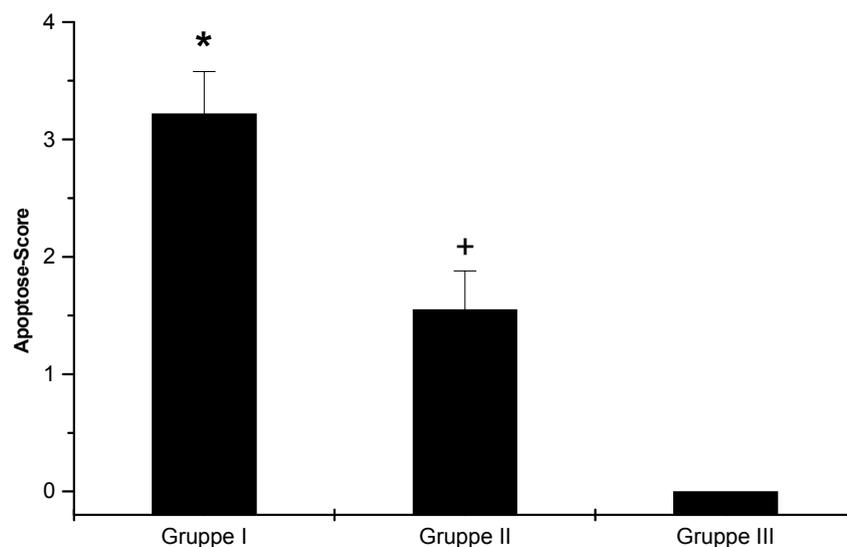


Bei den Präparaten der NEC-Gruppe ohne Modulation ($3,22 \pm 0,36$) war die Apoptoserate deutlich höher ($p < 0,05$) als in der Kontrollgruppe ($MW 0 \pm 0$). Es zeigten sich zahlreiche apoptotische Kerne und die Zottenstruktur war bei der überwiegenden Anzahl der Darmabschnitte stark beschädigt. Apoptotische Einzelzellen fanden sich zumeist auch in den Krypten. 77 % der Präparate wurden dem Apoptose Grad 3 und 4 zugeordnet.

In der Kontrollgruppe waren nur vereinzelt apoptotische Zellkerne im Gewebe erkennbar. Alle Präparate wurden nach dem von Jilling und Caplan (58) definierten Schema dem Apoptose-Grad 0 zugeordnet ($MW 0 \pm 0$).

In der TNF- α -Antikörper-Gruppe ($MW 1,55 \pm 0,33$) waren weniger TUNEL-positive Zellkerne sichtbar ($p < 0,05$) als in der NEC-Gruppe ohne Modulation. Häufig waren nur an den Zottenspitzen apoptotische Zellen zu erkennen. Die Krypten zeigten sich unauffällig.

Abb.9: *Vergleich des mittleren Apoptose-Grades der verschiedenen Versuchsgruppen*
(* $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; + $p < 0,05$ vs. Gruppe I)



4. Diskussion

4.1 Allgemeine Diskussion

Der Begriff „Enterocolitis ulcerosa necroticans“ wurde erstmals 1952 in einer Publikation von K.O. Schmid und K. Quaiser verwendet, einem Pathologen und einem Kinderarzt an der Universität Graz (105). Trotz zahlreicher Studien ist die Pathogenese bis heute unklar. Unterschiedliche Risikofaktoren werden als Ursache diskutiert oder scheinen die Erkrankung zu begünstigen.

Unter diesen ist vor allem die Ernährung des Kindes hervorzuheben. In epidemiologischen Studien zeigt sich eine höhere Inzidenz der Erkrankung bei Neugeborenen, die Ersatznahrung anstelle von Muttermilch erhalten (44,62,74). Die Ersatznahrung erweist sich auch in den tierexperimentellen Untersuchungen als bedeutender Risikofaktor (4,104). Bei dem von Barlow et al. durchgeführten Modell konnte bei den neugeborenen Ratten, die Muttermilch erhalten hatten, nach Stimulation mit Hypoxie keine NEC induziert werden (4). Bei den Tieren mit Ersatznahrung kam es hingegen zur Atrophie der Villi und Schädigung der Darmwand bis hin zu Nekrosen (4).

Als weiteres wesentliches Risiko für eine NEC wird die Unreife des Organismus betrachtet (57), die bei Frühgeborenen ausgeprägter ist als bei Neugeborenen mit normaler Schwangerschaftsdauer. Die Unreife bezieht sich sowohl auf die mukosale Integrität und Permeabilität (5,57), wie auch auf die Regulation des intestinalen Blutflusses (25), Motilität (8,100) und Enzymfunktion (57). Nanthakumar et al. (90) untersuchten die Reaktion fetaler Enterozyten auf eine Stimulation mit IL-1 β und bakteriellen Enterotoxinen (LPS). Dabei zeigte sich, dass fetale Zellen des Dünndarmepithels auf luminale inflammatorische Stimuli mit einer weitaus stärkeren Zytokinproduktion reagieren als die intestinalen Epithelzellen des Kleinkindes (90).

Zudem werden ischämische Ereignisse des Intestinaltraktes als wichtige Ursache der NEC diskutiert (19,60). In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass ein verminderter diastolischer Blutfluss in der Mesenterialarterie von Neugeborenen mit einer erhöhten NEC-Inzidenz einhergeht (79). Auch die histologischen Befunde, die überwiegend Koagulationsnekrosen, Ödeme und Hämorrhagien in den NEC-Präparaten beschreiben, weisen auf eine ischämische Genese hin (3).

Vielfach wird eine infektiöse Beteiligung in der Pathogenese der NEC vermutet (7,18,26,28). Die bakterielle Besiedelung des Darmes beginnt sofort nach der Geburt. Physiologisch dominierend sind dabei gram-positive Bifidobakterien (134). Die Anwesenheit der speziellen Darmflora ist für die Metabolisierung von Kohlenhydraten notwendig (120). Gramnegative Bakterien fermentieren Lactose in H_2 , Kohlendioxid und organische Säuren, was zur Distension, intraluminalen Druckerhöhung und verminderter Durchblutung des Darms führt (61).

Weitere Risikofaktoren stellen die Hypoxie und Hypothermie dar. Auch experimentell wurde gezeigt, dass wiederholte Hypoxie-Perioden mit einer steigenden Inzidenz der NEC einhergehen. Dies ist auch bei wiederholter Hypothermie der Fall (4,88,119).

Gegenwärtig wird vermutet, dass die Kombination mehrerer Risikofaktoren eine Entzündungskaskade auslöst, die in der Pathologie der NEC mündet (60). Durch die Unreife der intestinalen Barriere sowie eine Dysregulation in der Antigenerkennung und der lokalen Immunantwort kommt es zur Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine.

In klinischen Untersuchungen konnte bei NEC-Patienten eine gesteigerte Produktion IL-6 (52,128), IL-8 (33), IL-12 (48,87), IL-18 (48) sowie IFN- γ (38) und PAF (37) nachgewiesen werden. IL-8 wirkt als chemotaktischer Faktor auf neutrophile Granulozyten (30,56,67). IL-18 nimmt ebenfalls Einfluss auf Zellen

des Immunsystems und gilt als wichtigster Stimulus für die T-Zellproliferation (29, 93). In einer experimentellen NEC-Studie von Halpern et al. korrelierte die vermehrte Produktion von IL-18 und IL-12 mit dem Ausmaß des Gewebeschadens (48).

Signifikant erhöhte TNF- α -Werte in Darmpräparaten und Blutproben von Kindern mit NEC deuten darauf hin, dass der Tumornekrosefaktor- α in der Pathogenese der NEC eine Schlüsselfunktion einnimmt. Verschiedene Studien u. a. von Caplan et al. (13) hatten zum Ziel, in der TNF- α -Plasma-Konzentration einen Parameter für Schwere und Prognose der NEC oder einen Anhaltspunkt für die chirurgische Intervention zu finden (13,52,85). Die erhöhten TNF- α -Werte zeigten allerdings eine breite individuelle Streuung und korrelierten weder mit der Krankheitsaktivität noch mit dem intestinalen Gewebeschaden (13,52,85).

Es ist noch nicht abschließend geklärt, wo TNF- α ausgeschüttet wird. In einer NEC-Studie von Tan et al. stellten sich bei gesunden Studienteilnehmern die Paneth-Körnerzellen als Hauptproduktionsort für TNF- α dar (117). Bei NEC-Patienten war zum einen die Transkriptionsrate in den Paneth-Zellen deutlich gesteigert, zum anderen wurde das Zytokin zusätzlich von Makrophagen und eosinophilen Granulozyten produziert (117). Das Wirkspektrum von TNF- α umfasst eine Vielzahl an Funktionen, es ist unter anderem beteiligt an Entzündungsvorgängen (9), Sepsis (122), Wundheilung (9), Blutbildung und Immunabwehr (124) sowie der Apoptoseinduktion (13,81).

In der Pathophysiologie der NEC sind unterschiedliche Wirkungsmechanismen von TNF- α denkbar. Zum einen konnte in zahlreichen Studien seine Mitwirkung an der Gewebedestruktion bei Darmentzündungen nachgewiesen werden (13,115,122). Desweiteren ist TNF- α an der Induktion der Apoptose beteiligt, die im Darmgewebe bei klinischen wie auch experimentellen Untersuchungen zur NEC vorgefunden wurde (13,38,58,81). Darüber hinaus stimuliert es die epitheliale IL-8-Sekretion und kann auf diese Weise eine

Leukozytenrekrutierung in Gang setzen (23). Ebert zeigte außerdem, dass durch TNF- α die intraepitheliale Lymphozytenproliferation im Darmgewebe gesteigert wird (32). Dieses wird auch in den Studien zur NEC beobachtet: Halpern et al. fanden in ihrem Tiermodell eine vermehrte Anzahl Makrophagen und T-Zellen im Darmgewebe der NEC-Tiere (48). Die Abwehrzellen in ihrer Vielzahl reagieren mit einer weiteren Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, was vermutlich den Entzündungsprozess bei der NEC perpetuiert.

4.2 Methoden und Ergebnisse

4.2.1 Relevanz des Tiermodells

In der Vergangenheit wurden sehr unterschiedliche Tiermodelle zur Untersuchung der NEC entwickelt, u.a. mit Schweinen (25,37,42,63,109), Ratten (14,15,16,21,31,48,76,87), Kaninchen (22,84), Hunden (43,51), Ziegen (27) oder Mäusen (66). Am häufigsten eingesetzt wird ein Tiermodell mit neugeborenen Ratten (14,16,48), da sich diese Tiere aufgrund ihrer Organentwicklung und -reifung zur experimentellen Untersuchung der NEC als besonders geeignet erwiesen haben (94). Daher wurde dieses Modell auch für die vorliegende Arbeit ausgewählt.

Entsprechend der multifaktoriellen Ätiologie der NEC (59,60,125) war zu beachten, dass auch im Tiermodell möglichst viele Risikofaktoren abgebildet werden.

Da die Unreife des Darmes, die bei den häufig betroffenen Frühgeborenen besonders ausgeprägt ist, in der Pathogenese der NEC eine entscheidende Rolle spielt, muss diese Tatsache auch bei der Auswahl der Tiere berücksichtigt werden (57,102,126). Bei Säugetieren mit langer Tragzeit, z.B. Schweinen (ca. 114 Tage) oder Schafen (ca. 148 Tage), findet die Reifung und Entwicklung des Intestinaltraktes - wie auch beim Menschen - zum größten Teil bereits in utero statt. Bei Säugetieren mit kurzer Trächtigkeitsdauer wie bei Ratten und Mäusen (beide 21 - 23 Tage) entwickeln sich hingegen zahlreiche Funktionen des Intestinaltraktes erst in der postnatalen Periode (94).

Hinsichtlich seines unreifen Entwicklungszustandes ist der Darm eines frühgeborenen Kindes daher eher vergleichbar mit dem Intestinaltrakt neugeborener Ratten (94) als mit dem ausgereiften Darm neugeborener Schweine.

In der vorliegenden Studie wurde mittels der Risikofaktoren Hypoxie, Hypothermie sowie Ersatznahrung bei über 80 % der Tiere eine NEC induziert. Vergleichbare Zahlen für dieses Tiermodell sind auch von anderen Autoren bekannt. Halpern et al. erzielten ebenfalls bei über 80 % der Tiere eine NEC-Induktion (48), Caplan et al. beschrieben rund 75 % (17). Auch die klinischen Anzeichen wie Hämorrhagien und abdominelle Distension glichen den bei Caplan et al. angeführten Symptomen (17).

Die bei den Tieren hervorgerufenen klinischen wie auch histologischen Veränderungen sind vergleichbar mit den Anzeichen, die bei neugeborenen Kindern mit NEC auftreten: Hämorrhagien, Aszites, abdominelle Distension, nekrotisierende Entzündung der Mukosa, meistens auch der tieferen Wandschichten (60).

Bei denjenigen Tieren, die einen TNF- α -Antikörper erhalten hatten, fanden sich weniger klinische Zeichen der NEC als in der Gruppe ohne Antikörper. Sie hatten außerdem im Vergleich eine längere Lebensdauer. Die Ergebnisse können daher ein Hinweis darauf sein, dass der TNF- α -Antikörper den klinischen Verlauf der Erkrankung mildert.

Wichtigstes Argument für das hier verwendete Modell ist, wie oben bereits erläutert, die Einbindung mehrerer Risikofaktoren gleichzeitig (15). In dieser Kombination weist es sowohl eine große pathophysiologische wie auch klinische Ähnlichkeit mit der Erkrankung bei Kindern auf.

Zeitlich und labortechnisch ist das vorliegende Modell sehr aufwendig, da die neugeborenen Ratten mehrfach täglich von Hand gefüttert und in einem Inkubator untergebracht werden müssen. Hierbei ist zu beachten, dass die Tiere ohne Mutter nicht saugen und mittels einer Sonde ernährt werden müssen. Dabei besteht die Gefahr von Ösophagusperforationen. Da jedoch bei den nachfolgend angeführten alternativen Modellen die Ätiologie nur in Teilen berücksichtigt oder ganz außer Acht gelassen wird, kamen sie für diese Studie nicht in Frage.

Ein mehrfach beschriebenes alternatives Modell beruht auf der Abklemmung der Mesenterialarterien (22,66,109). Auf diese Weise wird ein Ischämie-Reperfusionsgeschehen reproduziert, das zwar ein NEC-ähnliches Bild mit Mukosaablösung, Hämorrhagien, Nekrosen und Infiltrationen in der Darmmorphologie hervorruft (22,66,109), aber die typischen Risikofaktoren wie Unreife oder Ersatznahrung außer Acht lässt. Auch entspricht die Abklemmung von Gefäßen nicht der Pathogenese der NEC.

Ein weiteres Modell wurde von Clark et al. beschrieben (22). Dabei wurden zunächst der pH-Wert und die intraluminalen Faktoren im Darm von Neugeborenen mit NEC untersucht und diese anschließend in einem Tiermodell mit Kaninchen getestet. Durch Propionsäure und Proteine stellten sie eine entsprechende Lösung her, deren intraluminale Injektion NEC-artige Hämorrhagien und Nekrosen des Darms verursachte (22). Auch Koivusalo et al. gingen auf diese Weise vor: sie induzierten eine NEC durch die Injektion einer Rinder-Casein-Lösung in das terminale Ileum von Schweinen (63). Vorteilhaft bei diesen Modellen ist die gute Reproduzierbarkeit. Allerdings entstehen die Nekrosen dabei durch eine direkte chemische Schädigung und entwickeln sich nicht unter dem Einfluss des Entzündungsvorgangs, wie dies bei der NEC der Fall ist. Der unreife Entwicklungszustand des Darmes, der in der Pathogenese der NEC große Bedeutung einnimmt, wird in diesen Modellen ebenfalls nicht berücksichtigt.

4.2.2 Relevanz der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und der immunhistochemischen Myeloperoxidase-Färbung

Die HE-Übersichtsfärbung diente zur Beurteilung der Präparate und ihrer Einteilung in die von Halpern et al. (48) beschriebenen NEC-Scores. Diese Klassifikation (s. Tab. 2 und Abb. 4) ist eine häufig angewandte Methode zur Auswertung von NEC-Präparaten (13,16,31,48). Sie hat sich auch in der vorliegenden Studie als zweckmäßige Methode zur Bewertung des Schädigungsgrades der Gewebedestruktion erwiesen.

Bei den Präparaten der Tiere ohne TNF- α -Antikörper zeigte sich eine massive Gewebedestruktion. Der NEC-Score lag dabei signifikant höher verglichen mit den Tieren mit TNF-Antikörper und der Kontrollgruppe. Bei den Tieren, die mit TNF- α -Antikörper behandelt worden waren, zeigte sich der Gewebeschaden durch die NEC weit weniger ausgeprägt, das Darmgewebe der Kontrollgruppe war morphologisch vollkommen intakt.

Um einen weiteren Parameter für die Beurteilung der Entzündung zu bekommen, wurde immunhistochemisch eine Myeloperoxidase-Färbung durchgeführt. Das Enzym Myeloperoxidase ist insbesondere in den Granula der neutrophilen Granulozyten lokalisiert, denen bei der Infektabwehr eine Schlüsselstellung zukommt (73).

Immunhistochemische Techniken werden angewandt, um antigene Komponenten in Zellen und Gewebeabschnitten nachzuweisen und zu identifizieren (11). Dies geschieht mit Hilfe spezifischer Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen, radioaktivem Material, oder, wie in der vorliegenden Studie, mit Enzymen markiert sind (11). Speziell die hier eingesetzte Myeloperoxidase-Immunhistochemie wird häufig bei der Diagnostik myeloproliferativer Erkrankungen verwendet (71), ist aber auch ein gängiger Indikator zur Beurteilung intestinaler Entzündungsreaktionen (92,116,121). Dabei werden vornehmlich Entzündungszellen, insbesondere neutrophile und eosinophile Granulozyten, markiert (92,116).

Die hier verwendete Avidin-Biotin-(ABC-)Methode zählt zu den indirekten immunhistochemischen Färbungen. Diese bietet eine höhere Sensitivität gegenüber der direkten oder anderen indirekten Färbungen, wie der PAP- und APAAP- (**A**lkalische **P**hosphatase **A**nti-**A**lkalische-**P**hosphatase) Methode (11,54). Die Anfälligkeit der Indirekten Immunhistochemie liegt in der großen Anzahl notwendiger Arbeitsschritte. Standardisierte Bedingungen waren deshalb die Voraussetzung für ein gutes Färbeergebnis.

Unspezifische Färbungen oder falsch positive Ergebnisse können bei der ABC-Methode vor allem durch zu dicke Gewebeschnitte, eine zu hohe Konzentration des Primärantikörpers oder bei unzureichender Blockierung der endogenen Peroxidase entstehen. Eine Antigendemaskierung verbessert die Darstellung der Antigene erheblich (11,70), weshalb sie auch von uns durchgeführt wurde. Zur Qualitätssicherung wurde bei jedem Durchgang eine sicher positive Kontrolle mitgeführt. Durch die Negativkontrollen wurden unspezifische Reaktionen eines Primärantikörpers aufgedeckt.

Bei der Auswertung am Mikroskop wurde die Anzahl der positiv angefärbten Entzündungszellen pro 20 Gesichtsfelder gezählt. Die Auszählung einer bestimmten Anzahl von Zotten erwies sich als ungeeignet, da bei den NEC-Präparaten die Zottenstruktur aufgehoben ist.

Im Darmgewebe der Kontrollgruppe fanden sich nur vereinzelt MPO-Zellen, wie bei einem Normalbefund zu erwarten ist. Eine massive Steigerung an Entzündungszellen konnte hingegen in der NEC-Gruppe der Tiere ohne TNF-Antikörper festgestellt werden. Die Anzahl war signifikant höher verglichen mit den Präparaten der TNF- α -Antikörper-behandelten Tiere.

Die Ergebnisse der HE- und der Myeloperoxidasefärbung weisen beide darauf hin, dass bei den Tieren durch die Kombination der Risikofaktoren (Hypoxie, Hypothermie und Ersatznahrung) histopathologische entzündliche Veränderungen im Darmgewebe hervorgerufen werden konnten, die dem

morphologischen Bild der NEC bei Neugeborenen sehr ähnlich sind. Die Applikation eines TNF- α -Antikörpers resultierte bei beiden Färbemethoden in einer deutlichen Unterdrückung der Entzündungsreaktion und Gewebedestruktion.

Der genaue Wirkmechanismus von TNF- α ist bei diesem Vorgang nicht bekannt. Unterschiedliche Theorien werden in der Literatur diskutiert.

Die massive Gewebedestruktion in der Gruppe der Tiere ohne TNF-Antikörper lässt sich möglicherweise auf die vermehrte Produktion von Matrix-Metalloproteinasen zurückführen (96). Die MMPs gehören zu einer Gruppe von Enzymen, die am Kollagenabbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind (82). Die Produktion der Kollagenasen, speziell Stromelysin-1, wird im Darm durch TNF- α gesteuert und ist bei der NEC deutlich erhöht (96). Durch die TNF- α -Antagonisierung wurde die sonst bei der Entzündungsreaktion einsetzende Stromelysin-1-Produktion möglicherweise gebremst.

Wedel et al. beschrieben Veränderungen des enterischen Nervensystems, speziell der Glia, bei der NEC (130). Dabei wurde gezeigt, dass insbesondere TNF- α neben weiteren Zytokinen die Expression der sauren Gliafaserproteine im Darm steigert und damit eine Modulation der Gewebeintegrität während des Entzündungsprozesses hervorruft (129).

In einer von Sun et al. durchgeführten NEC-Studie verursachte die kombinierte Gabe von TNF- α und LPS bei jungen Ratten massive Darmnekrosen (115). TNF- α stimuliert bei dieser Reaktion die Produktion des Platelet-activating-Faktors (12) und verursacht auf diesem Weg eine massive Schädigung des Gewebes. Durch die Vorbehandlung der Tiere mit einem PAF-Antagonisten konnte bei Sun et al. die Entzündungskaskade antagonisiert werden, so dass keine Nekrosen im Intestinaltrakt entstanden (115). Für unsere Ergebnisse könnte dies bedeuten, dass die Entzündungsreaktion zu einem früheren Zeitpunkt in der Kaskade durch den TNF- α -Antikörper gehemmt wurde und zu

einer protektiven Wirkung führte. Die Ergebnisse von Sun et al. liegen allerdings einer anderen Methode zugrunde. Diese basiert nicht auf der Kombination der Risikofaktoren wie dies in unserem Modell der Fall ist, sondern wirkt über eine direkte Manipulation (wie i.v. Applikation von LPS) der Tiere (115). Ein Vergleich kann daher nur mit Vorsicht gezogen werden.

Eine von TNF- α induzierte Permeabilitätssteigerung der intestinalen Tight-Junctions könnte ebenfalls ein gewebeschädigender Mechanismus in der Pathogenese der NEC darstellen (86). In einer in-vitro-Untersuchung von Schmitz et al. wurde festgestellt, dass TNF- α an der Regulation der intestinalen Epithelbarriere beteiligt ist (106). Dabei kommt es zu Veränderungen von Struktur und Funktion der Tight Junctions, die den epithelialen Schutzmechanismus beeinträchtigen (106). Die Studie wurde an adulten Colonzellen durchgeführt, ob die Beobachtungen auch auf die intestinalen Epithelzellen zutreffen, ist unklar. Von der Therapie des Morbus Crohn – einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung – ist bekannt, dass durch eine TNF- α -Antikörper-Behandlung die epitheliale Barriere wiederhergestellt und die Entzündung deutlich reduziert wird (114). Bei der NEC wird immer wieder eine Störung der Epithelbarriere diskutiert (57), ein Zusammenhang mit den Tight-Junctions wurde bislang allerdings nicht untersucht.

In einer Studie von Tracey et al. führte die intravenöse TNF- α -Gabe bei Ratten zur blutigen Diarrhö (122). Die dabei entstandenen histopathologischen Veränderungen des Intestinaltrakts wie ischämische und hämorrhagische Nekrosen waren dem morphologischen Bild der NEC bei Neugeborenen sehr ähnlich (122).

Bei Halpern et al. wurde eine positive Korrelation zwischen der hepatischen TNF- α -Produktion und dem Ausmaß des intestinalen Gewebes Schadens bei der NEC beschrieben (49). Die Ergebnisse der Studie wiesen darauf hin, dass während der Entwicklung einer NEC proinflammatorische Zytokine über die Pfortader zur Leber transportiert werden und dort die Kupferzellen stimulieren,

die weitere Entzündungsmediatoren wie TNF- α produzieren. Diese gelangen systemisch und über die Gallenwege in den Darm und sorgen für eine Ausdehnung der Entzündungsreaktion (49). Halpern et al. konnten durch die Hemmung der Killerzellen die TNF- α -Produktion verringern und auf diesem Weg den intestinalen Gewebeschaden reduzieren (49). Dies unterstützt unsere eigenen Beobachtungen, wonach durch eine TNF- α -Neutralisierung der Gewebeuntergang vermindert werden kann. Bei den Tieren wurde die NEC nach demselben Modell wie in unserer Studie induziert, weshalb ein Vergleich der Ergebnisse durchaus möglich ist.

Auch der Einfluss des TNF- α -Antikörpers auf die Anzahl der Entzündungszellen im Gewebe kann durch unterschiedliche Mechanismen erklärt werden.

Unter dem Einfluss chemotaktischer Faktoren wandern Leukozyten nach Adhäsion an Endothelzellen in das Gewebe ein (72). Möglicherweise führte die TNF- α -Blockade durch den Antikörper zu einer verminderten Leukozytenrekrutierung im Darmgewebe. Neben verschiedenen anderen Zytokinen wie IL-1 gehört insbesondere auch TNF- α zu denjenigen Entzündungsfaktoren, die eine verstärkte Expressierung von Adhäsionsmolekülen (wie z.B. ICAM-1) auf Endothelzellen bewirken, so dass weitere Leukozyten aus dem Blutstrom rekrutiert werden können (83).

Auch wird von TNF- α bei fetalen Enterozyten die Sekretion chemotaktischer Faktoren wie IL-8 stimuliert (23). IL-8 ist an der Migration, Adhäsion und Aktivierung neutrophiler Granulozyten bei Entzündungsreaktionen beteiligt (30,56).

Die TNF- α -Hemmung könnte somit durch eine direkte Unterdrückung oder indirekt durch eine mangelnde Sekretion chemotaktischer Reize die verminderte Anzahl der Entzündungszellen im Gewebe bewirkt haben.

Der genaue Wirkmechanismus der TNF- α -Blockade auf die Gewebedestruktion und die Anzahl der Entzündungszellen bleibt ungeklärt. Da TNF- α ein umfangreiches Spektrum an Funktionen besitzt, ist anzunehmen, dass die Entzündung und Gewebeschädigung über mehrere Wege gleichzeitig stattfindet.

Die verminderte Gewebedestruktion in den Präparaten der Antikörper-behandelten Tiere kann jedoch insbesondere in Kombination mit der kleineren Anzahl an MPO-gefärbten Zellen als Hinweis auf einen geringer ausgeprägten Entzündungsverlauf im Vergleich mit den NEC-Präparaten gewertet werden.

4.2.3 Stellenwert der Apoptose

Für den Apoptosenachweis stehen verschiedene Methoden wie z.B. Lichtmikroskopie (45), Durchflusszytometrie (127), PCR (46) oder Immunoassay (39) zur Verfügung. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie kann die Apoptose auch anhand morphologischer Veränderungen (Zellschrumpfung, Kernpyknose, Chromatinverdichtung) (45,131) dargestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die insbesondere für in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet wird, stellt der auch in dieser Studie verwendete TUNEL-Test (Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling) dar (2,41). Der Test basiert auf dem Einbau spezifischer markierter Nucleotidderivate an freie 3'OH-Enden von DNA-Strangbrüchen. Diese können unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Ein Hauptvorteil liegt darin, dass bereits in einem sehr frühen Apoptose-Stadium DNA-Strangbrüche dargestellt werden können (41). Hier ist die TUNEL-Technik der Gel-Elektrophorese überlegen, da sie eine geringere Menge an DNA-Fragmenten benötigt. TUNEL ist die einzige Methode, mit der Apoptose in jeder Phase nachgewiesen werden kann (99). Die Sensitivität der Methode gilt als sehr hoch (41) und kann durch Vorbehandlung der Präparate deutlich verbessert werden

(68). Noch bevor sich morphologische Veränderungen zeigen, sind bereits die Strangbrüche darstellbar (99).

Trotz ihrer hohen Sensitivität wird die Technik von einigen Autoren kritisiert (111,112), da der TUNEL-Test apoptotische Zellen nicht spezifisch markiert (80). DNA-Strangbrüche sind nicht nur in apoptotischen Zellen vorhanden, sondern kommen auch in nekrotischen Zellen vor (98,112). Stähelin beschrieb falsch positive Ergebnisse durch endogene Nuclease-Aktivität (112). Gavrieli et al. entkräfteten das Argument jedoch, indem sie zeigten, dass der programmierte Zelltod typischerweise ein Ereignis vereinzelter Zellen ist, auch bei Geweben mit einer hohen Zellumsatzrate (41,99). Nekrose hingegen findet in der Regel in einem umfassenderen Zellverband statt. Die TUNEL-Technik beruht außerdem auf der hohen Anzahl an Strangbrüchen, die bei der Apoptose vorkommen (41).

Die Auswertung der TUNEL-Präparate erfolgte nach einem bei Jilling et al. beschriebenen und anerkannten Schema zur Evaluation der Apoptose (58). Je nach Ausmaß der Apoptose wurden die Präparate in Scores von Grad 0 – 4 eingeteilt (s.Tab. 3 und Abb. 8).

Die Ergebnisse der Einteilung zeigen, dass bei der NEC im vorliegenden Tiermodell eine massiv gesteigerte Apoptoserate im Darmgewebe vorhanden ist. Dies passt zu den Beobachtungen, die von Ford et al. im Rahmen einer klinischen Studie gemacht wurden (38). Dabei fand sich in Darmpräparaten Neugeborener mit NEC eine erhöhte Apoptoserate in den apikalen Villi der Enterozyten (38). Experimentell wurde die hohe Apoptoserate bei der NEC in einem gleichartigen Tiermodell mit neugeborenen Ratten bereits von Jilling et al. untersucht (58). Im TUNEL-Test zeigten die NEC-Präparate eine deutlich gesteigerte Apoptosefrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe (58). Da die Versuchsdurchführung im Tiermodell und der Methodik nach einem ähnlichen Schema wie in unserer Untersuchung erfolgte, lassen sich die Ergebnisse sehr gut vergleichen.

In den Präparaten der mit TNF- α -Antikörper behandelten Tiere war die Apoptoserate signifikant niedriger im Vergleich zur NEC-Gruppe. Dies zeigt, dass durch die Vorbehandlung der Tiere mit Antikörpern die Apoptoseinduktion bei den erkrankten Tieren reduziert werden konnte.

Die Epithelzellen des Darms unterliegen einer hohen Zellumsatzrate; die Apoptose von Enterozyten ist ein physiologischer Prozess im Rahmen der Gewebemöostase (77). Mit Hilfe der Apoptose wird eine normale Morphologie und Funktion des Organs aufrechterhalten (77). Bei den Präparaten der Kontrollgruppe fanden sich extrem wenig bis gar keine apoptotischen Zellen. Dies kann auch an der kurzen Lebensdauer der Versuchstiere von nur 96 h liegen.

Jilling et al. vermuteten, dass die Apoptose ein frühzeitiges Ereignis in der Pathogenese der NEC ist, das möglicherweise dem späteren ausgedehnten Gewebeuntergang zugrunde liegt (58). Sie findet bereits statt, noch bevor die Morphologie des Gewebes wesentliche Veränderungen aufzeigt (58).

TNF- α spielt eine entscheidende Rolle bei der Einleitung der Apoptose (13,81). Die Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNF-R) umfasst zahlreiche Vertreter, darunter TNF-R1 (118), TNF-R2 (89), CD95 (Fas) (113) und die TRAIL-Rezeptoren (108), die fast alle zytotoxische Signale weiterleiten (89,108,113,118). Durch die massive Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α im Rahmen der Entzündungsreaktion wird der apoptotische Zelluntergang wahrscheinlich deutlich beschleunigt und ausgeweitet.

Jilling et al. vermuteten, dass der Zellverlust durch die vermehrte Apoptose zu einer deutlichen Steigerung der mukosalen Permeabilität führt, die Antigenen und Bakterien als Eintrittspforte dienen könnte (58). Dies würde eine Entzündung aufrechterhalten und beschleunigen. Möglicherweise führte der TNF- α -Antikörper bei den neugeborenen Ratten zu einer verminderten Apoptose des Darmepithels und konnte durch die bessere Aufrechterhaltung

der Barrierefunktion eine Ausbreitung des inflammatorischen Vorgangs verhindern.

In unserer Studie an neugeborenen Ratten zeigte die Modulation des Immunsystems mit einem TNF- α -Antikörper einen positiven Effekt. Diese Ergebnisse passen zu dem therapeutischen Erfolg der TNF-Antikörperbehandlung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

4.3 Klinische Relevanz

Die Entwicklung immunmodulierender Substanzen hat neuartige Perspektiven für die Behandlung chronischer entzündlicher Erkrankungen eröffnet (123). Selektive TNF- α -Inhibitoren finden in der Klinik schon seit einigen Jahren therapeutischen Einsatz. Aufgrund zahlreicher, teils schwerwiegender bekannter Nebenwirkungen, wird die Indikation zur Anwendung allerdings sehr streng gestellt (101). Viele Nebenwirkungen sind auf die Immunsuppression zurückzuführen. So kann es zur Tuberkulose-Reaktivierung oder schweren Infektionen mit opportunistischen Erregern kommen (110). Häufig sind akute Infusionsreaktionen mit Flush, Atembeschwerden und Pruritus (24,50). Ebenso wurde von einem erhöhten Risiko für Lymphome berichtet (1).

Neben der Behandlung der rheumatoiden Arthritis (34) kommt der TNF- α -Antikörper Infliximab insbesondere bei der schweren therapieresistenten Form von Morbus Crohn zur Anwendung (114). Infliximab ist ein monoklonaler chimärer IgG1-Antikörper, der TNF- α mit hoher Spezifität bindet. Durch die TNF-Antikörper-Therapie wird die Apoptose bei T-Helferzellen und Monozyten induziert (75), die eine wichtige Quelle für proinflammatorische Zytokine darstellen. Gleichzeitig kommt es zur deutlichen Senkung der Apoptoserate im Darmepithel (135). Auf diese Weise wird eine Entzündungshemmung im Intestinaltrakt erzielt (95) und die epitheliale Barrierefunktion wiederhergestellt (114).

Die Anwendung eines TNF- α -Antikörpers bei Neugeborenen ist nicht unbedenklich. Die umfangreichen und teils schwerwiegenden Nebenwirkungen des Medikaments, die insbesondere das Immunsystem betreffen, müssen dabei in Betracht gezogen werden. Auf der anderen Seite ist die Prognose der NEC schwierig. In der Literatur wird von einer hohen Mortalitätsrate zwischen 20 bis 40% berichtet (97).

Im Rahmen der Morbus-Crohn-Behandlung wurde Infliximab auch bereits bei Kindern eingesetzt (40,69). Hier wird von einer guten Verträglichkeit berichtet, die Sofortreaktionen waren insgesamt milde (40,69). Bislang wird die NEC mit Antibiotika, Magenablaufsonde, Infusionen und parenterale Ernährung, gegebenenfalls auch operativ behandelt. Die Anwendung des TNF- α -Antikörpers zielt darauf ab, die Entzündung des Darms einzudämmen und Nekrosen vorzubeugen.

In der vorliegenden Studie wurde der TNF- α -Antikörper bei den Tieren präventiv eingesetzt. Klinisch müsste der ideale Therapiezeitpunkt unter den genannten Gesichtspunkten erst untersucht werden. In Anbetracht der Wirkungsweise des Antikörpers liegt dieser wahrscheinlich unmittelbar nach Diagnosestellung.

Die Modulation des Immunsystems durch einen TNF- α -Antikörper wäre ein neuer therapeutischer Ansatz im Behandlungsschema der NEC, der bereits bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auf Erfolge verweisen kann.

4.5 Schlussfolgerung

Im Rahmen unserer Studie gab das Tiermodell Hinweise auf eine protektive Wirkung des TNF- α -Antikörpers bei der NEC. In weiteren Studien wäre zu klären, ob der Einsatz eines TNF- α -Antikörpers bei Neugeborenen mit dieser Erkrankung in Anbetracht der Nebenwirkungen eine tatsächliche Option zur Ergänzung des derzeitigen Vorgehens bei der NEC darstellt.

5. Zusammenfassung

Die nekrotisierende Enterocolitis (NEC) ist die häufigste erworbene lebensbedrohliche Erkrankung des Gastrointestinaltraktes bei Neugeborenen. Es wird angenommen, dass TNF- α bei der Pathogenese der NEC eine wichtige Rolle als proinflammatorischer Mediator spielt. In der vorliegenden Arbeit wurde am Tiermodell die Wirkung einer selektiven TNF- α -Blockade auf den Entzündungsverlauf und die Schwere der Erkrankung untersucht.

Neugeborene Sprague-Dawley-Ratten wurden in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt. In der Gruppe I (n = 9) wurde durch Hypoxie, Hypothermie und Ersatznahrung eine NEC induziert. Dieselbe Behandlung erfuhren die Tiere der Gruppe II (n = 9), vorab wurde ihnen i.p. allerdings ein selektiver TNF- α -Antikörper verabreicht. Die Tiere der Gruppe III (Kontrollgruppe, n = 9) erhielten Muttermilch. Die Tiere wurden in Abhängigkeit ihres Allgemeinzustandes oder spätestens nach 96 h getötet. Nach Resektion wurden die Dünn- und Dickdarmsegmente in Paraffinschnitten durch verschiedene Färbemethoden untersucht.

Die histologische Einteilung in NEC-Scores erfolgte an HE-gefärbten Präparaten. Mithilfe der MPO-Färbung wurde die Anzahl der Entzündungszellen ermittelt. Die TUNEL-Technik diente zur Darstellung der Apoptose in den Darmpräparaten.

In der Gruppe I zeigten die Tiere eine massive Zerstörung der Gewebestruktur und eine deutlich erhöhte Anzahl an MPO-positiven Zellen. Die Tiere, die mit dem TNF- α -Antikörper behandelt worden waren (Gruppe II), hatten hingegen überwiegend nur milde Anzeichen einer NEC. In der Kontrollgruppe (Gruppe III) wurde keine NEC induziert.

Der verminderte Gewebeschaden lässt vermuten, dass durch die TNF- α -Blockade eine Entzündungshemmung stattgefunden hat. Die niedrigeren MPO-gefärbten Zellen in der Gruppe II könnten durch eine verminderte Migration von Entzündungszellen durch die Blockade zusätzlicher chemotaktischer Faktoren erklärt werden.

Durch den TUNEL-Test wurde bei den Präparaten der Gruppe I eine deutlich vermehrte Anzahl an apoptotischen Zellen nachgewiesen. Die Apoptoserate war bei den mit TNF-Antikörper behandelten Tieren deutlich geringer. TNF- α gilt als einer der Hauptmediatoren zur Induktion der Apoptose. Durch den TNF-Antikörper könnte möglicherweise eine Hemmung des Apoptosesignals bewirkt werden.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass TNF- α in der Pathogenese der NEC eine wichtige Rolle spielt. In unserer Studie konnte durch die Applikation eines TNF- α -Antikörpers bei neugeborenen Ratten eine protektive Wirkung bei der NEC erzielt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams, A.E., Zwicker, J., Curisi, C., Kadin, M.E., Falchuk, K.R., Drews, R., Kupper, T.S., 2004. Aggressive cutaneous T-cell lymphomas after TNFalpha blockade. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 51 (4): 660 – 2
2. Ansari, B., Coates, P.J., Greenstein, B.D., Hall, P.A. 1993. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J. Pathol.*, 170: 1 – 8
3. Balance, W.A., Dahms, B.B., Shenker, N., Kliegman, R.M., 1990. Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis: A ten-year experience. *J. Pediatr. (suppl.)*, 117: S6 – S13
4. Barlow, B., Santulli, T.V., Heird, W.C., Pitt, J., Blanc, W.A., Schullinger, J.N., 1974. An experimental study of acute Necrotizing Enterocolitis – the importance of breast milk. *J. Pediatr. Surg.*, 9: 587 – 595
5. Beach, R.C., Menzies, I.S., Clayden, G.S., Scopes, J.W., 1982. Gastrointestinal permeability changes in the preterm neonate. *Arch. Dis. Child*, 57 (2): 141 – 5
6. Bell, M.J., Ternberg, J.L., Feigin, R.D., Keating, J.P., Marshall, R., Barton, L., Brotherton, T., 1978. Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg.*, 187 (1): 1 - 7
7. Bell, M.J., Shackelford, P., Feigin, R.D., Ternberg, J.L., Brotherton, T., 1979. Epidemiologic and bacteriologic evaluation of neonatal necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.*, 13: 1 – 4
8. Berseth, C.L., 1994. Gut motility and the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Clin. Perinatol.*, 21 (2): 263 – 70
9. Beutler, B.A., Milsark, I.W., Cerami, A., 1985. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J. Immunol.*, 135 (6): 3972 – 7
10. Blakely, M.L., Tyson, J.E., Lally, K.P., McDonald, S., Stoll, B.J., Stevenson, D.K., Poole, W.K., Jobe, A.H., Wright, L.L., Higgins, R.D., 2006. Laparotomy versus peritoneal drainage for necrotizing enterocolitis or isolated intestinal perforation in extremely low birth weight infants : outcomes through 18 months adjusted age. *Pediatrics*, 117 : 680 – 687

11. Bourne, J.A., 1983. Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden, Immunochemistry Laboratory, DAKO Corporation, Californien, USA
12. Camussi, G., Bussolino, F., Salvidio, G., Baglioni, C. 1987. Tumor necrosis factor / cachectin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J. Exp. Med.*, 166: 1390 – 1404
13. Caplan, M.S., Sun, X.M., Hsueh, W., Hagemann, J.R. 1990. Role of Platelet activating factor and TNF-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr.*, 116: 960 – 964
14. Caplan, M.S., Kelly, A., Hsueh, W., 1992. Endotoxin and hypoxia-induced intestinal necrosis in rats: the role of platelet activating factor. *Pediatr. Res.*, 31 (5): 428 – 34
15. Caplan, M.S., Hedlund, E., Adler, L., et al., 1994. Role of asphyxia and feeding in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr. Pathol.*, 14: 1017 – 1028
16. Caplan, M.S., Miller-Catchpole, R., Kaup, S., Russell T., Lickerman, M., Amer, M., Xiao, Y., Thomson, R., 1999. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology*, 117: 127 – 135
17. Caplan, M.S., Russell, T., Xiao, Y., Amer, M., Kaup, S., Jilling, T., 2001. Effect of Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Supplementation on Intestinal Inflammation and Necrotizing Enterocolitis (NEC) in a Neonatal Rat Model. *Pediatr. Res.*, 49: 647 – 652
18. Carbonaro, C.A., Clark, D.A., Elseviers, D.1988. A bacterial pathogenecity determinant associated with necrotizing enterocolitis. *Microb. Pathog.*, 5 (6): 427 – 436
19. Chan, K.L., Hui, C.W., Chan, K.W., Fung, P.C., Wo, J.Y., Tipoe, G., Tam, P.K., 2002. Revisiting ischemia and reperfusion injury as a possible cause of necrotizing enterocolitis: Role of nitric oxide and superoxide dismutase. *J. Pediatr. Surg.*, 37 (6): 828 – 34
20. Chan, K.L., Ng, S.P., Chan, K.W., Wo, Y.H., Tam, P.K., 2003. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis: a study of the role of intraluminal pressure, age and bacterial concentration. *Pediatr. Surg. Int.*, 19 (8): 573 – 577
21. Ciftci, I., Dilsiz, A., Aktan, T.M., Gurbilek, M., Duman, S., 2004. Effects of nitric oxide synthase inhibition on intestinal damage in rats with

- experimental necrotizing enterocolitis. *Eur. J. Pediatr. Surg.*, 4 (6): 398 – 403
22. Clark, D.A., Fornabaio, D.M. Mc Neill, et al. 1985. Necrotizing enterocolitis: Intraluminal biochemistry in human neonate and a rabbit model. *Pediatr. Res.*, 19: 919 – 921
 23. Claud, E.C., Savidge, T., Walker, W.A., 2003. Modulation of Human Intestinal Epithelial Cell IL-8 Secretion by Human Milk Factors. *Pediatr. Res.*, 53: 419 – 425
 24. Colombel, J.F., Loftus, E.V. Jr, Tremaine, W.J., Egan, L.J., Harmsen, W.S., Schleck, C.D., Zinsmeister, A.R., Sandborn, W.S., 2004. The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: The Mayo clinic experience in 500 patients. *Gastroenterology*, 126: 19 – 31
 25. Crissinger, K.D., Burney, D.L., Velasquez, O.R., et al., 1994. An animal model of necrotizing enterocolitis induced by infant formula and ischemia in developing piglets. *Gastroenterology*, 106 (5): 1215-1222
 26. De la Cochetière, M.F., Piloquet, H., Des Robert, C., Darmaun, d., Galmiche, J.P., Rozé, J.C., 2004. Early intestinal bacterial colonization and Necrotizing Enterocolitis in premature infants: the putative role of Clostridium. *Pediatr. Res.*, 56 (3): 366 – 70
 27. De Lemos, R.A., Rogers, J.H., Mc Laughlin, G.W., 1974. Experimental production of necrotizing enterocolitis in newborn goats (abstr.). *Pediatr. Res.*, 8: 380
 28. Deitch, E.A., 1994. Role of bacterial translocation in necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr. Suppl.*, 396: 33 – 6
 29. Dinarello, C.A., 2000. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Euro. Cytokine Netw.* 11(3): 483 – 6
 30. Djeu, J.Y., Matsushima, K., Oppenheim, J.J., Shiotsuki, K., Blanchard, D.K., 1990. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor / IL-8. *J. Immunol.*, 144: 2205 – 2210
 31. Dvorak, B., Halpern, M.D., Holubec, H., Dvorakova, K., Dominguez, J.A., et al., 2003. Maternal milk reduces severity of Necrotizing Enterocolitis and Increases Intestinal IL-10 in a Neonatal Rat Model. *Ped. Res.*, 53: 426 - 433
 32. Ebert, E.C., 1998. Tumor necrosis factor-alpha enhances intraepithelial lymphocyte proliferation and migration. *Gut*, 42 (5): 650 – 5

33. Edelson, M.B., Bagwell, C.E., Rozycki, H.J., 1999. Circulation pro- and counter-inflammatory cytokine levels and severity in Necrotizing Enterocolitis. *Pediatrics*, 103: 776 – 771
34. Edrees, A.F., Misra, S.N., Abdou, N.I., 2005. Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serum level with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 23 (4): 469 – 74
35. Eibl, M.M., Wolf, H.M., Furnkranz, H., Rosenkranz, A., 1988. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by IgA-IgG-feeding. *N. Engl. J. Med.*, 319: 1 – 7
36. Engel, R.R., Virnig, N.W., Hunt, C.E., 1973. Origin of mural gas in Necrotizing Enterocolitis. *Ped. Res.*, 7: 292 – 292
37. Ewer, A.K., Al-Salti, W., Coney, A.M., Marshall, J.M., Ramani, P., Booth, I.W., 2004. The role of Platelet Activating Factor in a neonatal piglet model of Necrotizing Enterocolitis. *Gut*, 53 (2): 207-13
38. Ford, H., Watkins, S., 1997. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.*, 32: pp275 – 282
39. Frankfurt, O.S., 2004. Immunoassay for single-stranded DNA in apoptotic cells. *Methods Mol. Biol.*, 282: 85 – 101
40. Friesen, C.A., Calabro, C., Christenson, K., Carpenter, E., Welchert, E., Daniel, J.F., Haslag, S., Roberts, C.C., 2004. Safety of infliximab treatment in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 39 (3): 265 – 9
41. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119 (3): 493-501
42. Gellen, B., Kovacs, J., Nemeth, L., Nemeth, P., Vagvolgyi, J., Bari, F., Megyeri, P., Pinter, S., Temesvari, P., Deli, M.A., Vecsernves, M., Szilvassy, Z., Koltai, M., Abraham, C.S., 2003. Vascular changes play a role in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis in asphyxiated newborn pigs. *Pediatr. Surg. Int.*, 19 (5): 380 – 4
43. Goldblum, O.M. Holzmann, I.R., Fischer, S.E., 1981. Intra-gastric feeding in the neonatal dog. Its effect on intestinal osmolality. *Am. J. Dis. Child.*, 135: 631-633

44. Goldman A.S., Thrope L.W., Goldblum R.M., Hanson, L.A., 1986: Anti-inflammatory properties of human milk. *Acta Paediatr. Scand.*, 75: 689-695
45. Goping, G., Wood, K.A., Sei, Y., Pollard, H.B., 1999. Detection of fragmented DNA in apoptotic cells embedded in LR white: A combined histochemical (LM) and ultrastructural (EM) study. *J. Histochem. Cytochem.*, 47 (4): 561 – 8
46. Gullicksen, P.S., Dean, R.G., Baile, C.A., 2004. Detection of DNA fragmentation and apoptotic proteins, and quantification of uncoupling protein expression by real-time RT-PCR in adipose tissue. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 58 (1): 1 – 13
47. Hall, N.J., Curry, J., Drake, D.P., Spitz, L., Kiely, E.M., Pierro, A., 2005. Resection and primary anastomosis is a valid surgical option for infants with necrotizing enterocolitis who weigh less than 1000 g. *Arch. Surg.*, 140: 1149 – 1151
48. Halpern, M.D., Holubec, H., Dominguez, J.A., Williams, C.S., Meza, Y.G., et al., 2002. Up-Regulation of IL-18 and IL-12 in the Ileum of Neonatal Rats with Necrotizing Enterocolitis. *Ped. Res.*, 51: 733 – 739
49. Halpern, M.D., Holubec, H., Dominguez, J.A., Meza, J.G., Williams, C.S., Ruth, M.C., McCuskey, R.S., Dvorak, B., 2003. Hepatic inflammatory mediators contribute to intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 284: G695 - G702
50. Hanauer, S.B., Feagan, B.G., Lichtenstein, G.R., Mayer, L.F., Schreiber, S., Colombel, J.F., Rachmilewitz, D., Wolf, D.C., Olson, A., Bao, W., Rutgeerts, P., 2002. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*, 359: 1541 – 1549
51. Hansbrough, F., Priebe, C.J., Falterman, K.W., Bornside, G.H., Welsh, R.A., 1983. Pathogenesis of early necrotizing enterocolitis in the hypoxic neonatal dog. *Am. J. Surg.*, 145: 169 – 175
52. Harris, M.C., Costarino, A.T., Sullivan, J.S., Dulkerian, S., McCawley, L., Corcoran, L., Butler, S., Kilpatrick, L., 1994. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr.*, 124: 105 – 111
53. Harris, M. C., D'Ángio C.T., Gallagher, P.R., Kaufman, D., Evans, J., Kilpatrick, L., 2005. Cytokine elaboration in critically ill infants with bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis, or sepsis syndrome: correlation with clinical parameters of inflammation and mortality. *J. Pediatr.* 2005, 147: 462 – 468

54. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H., 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29 (4): 577 – 80
55. Hsueh, W., Caplan, M.S., Sun, X., Pflieger, A., Gonzalez-Crussi, F., 1992. Pathogenetic lessons from experimental models of necrotizing enterocolitis. *Pediatr. Surg. Int.*, 7: 415 – 420
56. Huber, A.R., Kunkle, S.L., Todd, R.F., Weiss, S.J., 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science*, 254: 99 – 102
57. Israel, E.J., 1994. Neonatal necrotizing enterocolitis, a disease of the immature intestinal mucosal barrier. *Acta Paediatr. Suppl.*, 396: 27 – 32
58. Jilling, T., Lu, J., Jackson, M., Caplan, M.S., 2004. Intestinal Epithelial Apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental model of neonatal necrotizing enterocolitis. *Ped. Res.*, 55: 1 – 8
59. Kliegmann, R.M., Faranoff, A.A., 1984. Necrotizing enterocolitis. *N. Engl. J. Med.*, 310: 1093 – 1103
60. Kliegman, R.M., 1990. Models of the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. (suppl.)*, 117: S2 – S5
61. Kliegman, R.M., 1993. Neonatal Necrotizing Enterocolitis, 788-798, In: Wyllie, R., Hyams, J.S., *Pediatric Gastrointestinal Disease*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA
62. Kliegman, R., 2003. The relationship of neonatal feeding practices and the pathogenesis and prevention of necrotizing enterocolitis (Commentaries). *Pediatrics*, 111: 671 – 672
63. Koivusalo, A., Kauppinen, H., Anttila, A., Rautelin, H., Jusufovic, J., Lindahl, H., Rintala, R., 2002. Intraluminal casein model of necrotizing enterocolitis for assessment of mucosal destruction, bacterial translocation, and the effects of allopurinol and N-acetylcysteine. *Pediatr. Surg. Int.*, 18 (8): 712-7
64. Koletzko, Berthold, Von Harnack, Gustaf-Adolf, 2003, *Kinderheilkunde*, 12. Auflage, Springer-Verlag, Berlin
65. Koloske, A.M., 1994. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr. suppl.*, 396: 2 – 7
66. Krasna, I.H., Howell, C., Vega, A., et al., 1986. A mouse model for the study of Necrotizing Enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.*, 21: 21-26

67. Kucharzik, T., Hudson, J.T., Lugering, A., Abbas, J.A., Bettini, M., Lake, J.G., Evans, M., Ziegler, T.R., Merlin, D., Madara, J.L., Williams, I.R., 2005. Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. *Gut*, 54 (11): 1565 - 72
68. Labat-Moleur, F., Guillermet, C., Lorimier, P., Robert, C., Lantuejoul, S., Brambilla, E., Negoescu, A., 1998. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.*, 46 (3): 327 – 24
69. Lamireau, T., Cezard, J.P., Dabadie, A., Goulet, O., Lachaux, A., Turck, D., Maurage, C., Morali, A., Sokal, E., Belli, D., Stoller, J., Cadranet, S., Ginies, J.L., Viola, S., Huet, F., Langeuepin, J., Lenaerts, C., Bury, F., Sarles, J., French-Speaking Group for Pediatric Gastroenterology Nutrition, 2004. Efficacy and tolerance of infliximab in children and adolescents with Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, 10 (6): 745 – 50
70. Leong, A.S.Y., 1992. Diagnostic immunohistochemistry-problems and solutions. *Pathology*, 24 (1): 1-4
71. Lepelley, P., Preudhomme, C., Sartiaux, C., Thevaert, C., Lai, J.L., Iaru, T., Fenaux, P., Cosson, A., 1993. Immunological detection of myeloperoxidase in poorly differentiated acute leukemia. *Eur. J. Haematol.*, 50 (3): 155 – 9
72. Ley, K., 1996. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc. Res.*, 32: 733 – 742
73. Löffler, G., Petrides, P., 1998. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin
74. Lucas, A., Cole, T.J., 1990. Breast milk and neonatal Necrotizing enterocolitis. *Lancet*, 336: 1519 – 1523
75. Lugering, a., Schmidt, M., Lugering, N., Pauels, H.G., Domschke, W., Kucharzik, T., 2001. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn’s disease by using a caspase-depent pathway. *Gastroenterology*, 121 (5): 1145 – 57
76. Luo, C.C., Shih, H.H., Chiu, C.H., Ma, W.C., Chung, H.Y., 2004. Reduced apoptosis in newborn compared to adult rat intestine after ischemia-reperfusion injury. *Biol. Neonate.*, 85 (2): 90 – 3
77. Madesh, A.R.M., Balasubramanian, K.A., 2000. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15 (2): 109 – 120

78. Majno, G., Joris, I., 1995. Apoptosis, Oncosis and Necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146: 3-14
79. Malcolm, G., Ellwood, D., Devonald, K., Beilby, R., Henderson-Smart, D., 1991. Absent or reversed end diastolic flow velocity in the umbilical artery and necrotizing enterocolitis. *Arch. Dis. Child*, 66: 805 – 7
80. Mangili, F., Cigala, C., Santambrogio, G., 1999. Staining apoptosis in paraffin sections. Advantages and limits. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 21 (3): 273 – 6
81. Marini, M., Bamias, G., Rivera-Nieves, J., Moskaluk, C.A., Hoang, S.B., Ross, W.G., Pizarro, T.T., Cominelli, F., 2003. TNF- α neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 100 (14): 8366 – 71
82. Massova, I., Kotra, L.P., Fridman, R., Mobashery, S., 1998. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J.*, 12 (12): 1075 – 95
83. Meager, A., 1999. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 10 (1): 27 – 39
84. Miller, M.J.S., Mc Neill, H., Mullane, K.M., Caravella, S.J., Clark, D.A., 1988. SOD prevents damage and attenuates eicosanoid release in a rabbit model of necrotizing enterocolitis. *Am. J. Physiol.*, 255 (5): G556 – 65
85. Morecroft, J.A., Spitz, L., Hamilton, P.A., Holmes, S.J., 1994. Plasma interleukin-6 and TNF levels as predictors of disease severity and outcome in Necrotizing Enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.*, 29 (6): 798 – 800
86. Mullin, J.M., Snock, K.V., 1990. Effect of tumor necrosis factor on epithelial tight junctions and transepithelial permeability. *Cancer. Res.*, 50 (7): 2172 – 2176
87. Nadler, E.P., Dickinson, E., Knisely, A., Zhang, X.R., Boyle, P., Beer-Stolz, D., Watkins, S.C., Ford, H.R., 2000. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Interleukin-12 in Experimental Necrotizing Enterocolitis. *J. Surg.Res.*, 92 (1): 71-77
88. Nadler, E.P., Stanford, A., Zhang, X.R., Schall, L.C., Alber, S.M., Watkins, S.C., Ford, H.R., 2001. Intestinal cytokine gene expression in infants with acute necrotizing enterocolitis : interleukin-11 mRNA expression inversely correlates with extent of disease. *J. Pediatr. Surg.*, 36 (8) : 1122 – 9

89. Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88 (3), 355 – 365
90. Nanthakumar, N.N., Fusunyan, R.D., Sanderson, I., Walker, W.A., 2000. Inflammation in the developing human intestine: A possible pathophysiologic contribution to necrotizing enterocolitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97 (11): 6043 - 8
91. Nowicki, P., 1990. Intestinal ischemia and necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Suppl.*, 117: S14 – S19
92. Ohtsuka, Y., Sanderson, I.R., 2003. Dextran Sulfate Sodium-Induced inflammation is enhanced by intestinal epithelial cell chemokine expression in mice. *Ped. Res.*, 53: 143 – 147
93. Okamura, H., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Nakanishi, K., 1998. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr. Opin. Immunol.* 10 (3): 259 – 64
94. Pacha, J., 2000. Development of intestinal transport functions in mammals. *Physiol. Rev.*, 80: 1633-1667
95. Papadakis, K.A., Targan, S.R., 2000. Role of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Med.*, 51: 289 – 298
96. Pender, S.L.F., Braegger, C., Günther, U., Monteleone, G., Meuli, M., Schuppan, D., MacDonald, T.T., 2003. Matrix Metalloproteinases in Necrotising Enterocolitis. *Pediatr. Res.*, 54: 160 – 164
97. Pierro, A., Hall, N., 2003. Surgical treatments of infants with necrotizing enterocolitis. *Semin. Neonatol.*, 8 (3): 223 – 32
98. Riede, U.N., Schaefer, H.E., 2001. *Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage*, Thieme-Verlag, Stuttgart
99. Rojo, M.C., Gonzalez, M.E., 1998. In situ detection of apoptotic cells by TUNEL in the gill epithelium of the developing brown trout (*Salmo trutta*). *J. Anat.*, 193: 391 – 8
100. Ruckebusch, Y., 1986. Development of digestive motor patterns during perinatal life: mechanism and significance. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 5(4): 523 – 36
101. Sandborn, W.J., Loftus, E.V., 2004. Balancing the risks and benefits of infliximab in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gut*, 53: 780 – 782

102. Sanderson, I.R., 1999. The physiochemical environment of the neonatal intestine. *Am. J. Clin. Nutr. Suppl.*, 69: 1028S - 34S
103. Sandritter, W., Beneke, G., 1974. *Allgemeine Pathologie*. Schattauer Verlag, Stuttgart
104. Santulli, T.V., Schullinger, J.N., Heird, W.C., Gongaware, R.D., Wigger, J., Barlow, B., Blanc, W.A., Berdon, W.E., 1975. Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. *Pediatrics*, 55: 376 – 387
105. Schmid, K.O., Quaiser, K., 1952. A specially severe form of enteritis in newborn, enterocolitis ulcerosa necroticans. I. Pathological anatomy. *Z. Kinderheilkd.*, 8 (2): 114 - 35
106. Schmitz, H., Fromm, M., Bentzel, C.J., Scholz, P., Detjen, K., Mankertz, J., Bode, H., Epple, H.J., Riecken, E.O., Schulzke, J.D., 1999. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J. Cell Sci.*, 112 (Pt 1): 137 – 46
107. Schober, P.H., Nassiri, J., 1994. Risk factors and severity indices in necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr. Suppl.*, 396: 49 – 52
108. Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., Goddard, A.D., Godowski, P., Ashkenazi, A., 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signalling and decoy receptors. *Science*, 277: 818 – 21
109. Sibbons, P.D., Spitz, L., 1992. Necrotizing enterocolitis induced by local circulatory interruption in the ileum of neonatal piglets. *Pediatr. Pathol.*, 12: 1 – 14
110. Slifman, N.R., Gershon, S.K., Lee, J.H., Edwards, E.T., Braun, M.M., 2003. *Listeria monocytogenes* infection as a complication of treatment with tumor necrosis factor alpha-neutralizing agents. *Arthritis Rheum.*, 48 (2): 319 – 24
111. Sloop, G.D., Roa, J.C., Delgado, A.G., Balart, J.T., Hines, M.O., Hill, J.M., 1999. Histologic sectioning produces TUNEL reactivity. A potential cause of false-positive staining. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 123 (6): 529 – 32
112. Stähelin, B.J., Marti, U., Solioz, M., Zimmermann, H., Reichen, J., 1998. False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Mol. Pathol.*, 51(4): 204 – 208

113. Sträter, J., Möller, P., 2003. CD95 (Fas/APO-1)/CD95L in the gastrointestinal tract: fictions and facts. *Virchows Arch.*, 442: 218 – 225
114. Suenart, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Van Assche, G., Geboes, K., Ceuppens, J.L., Rutgeerts, P., 2002. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 97 (8): 1867 – 8
115. Sun, X. Hsueh, W., 1988. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating-factor. *J. Clin. Invest.*, 81: 1328 – 33
116. Takeuchi, K., Miyazawa, T., Tanaka, A., Kato, S., Kunikata, T., 2002. Pathogenetic importance of intestinal hypermotility in NSAID-induced small intestinal damage in rats. *Digestion*, 66 (1): 30 – 41
117. Tan, X., Hsueh, W., Gonzalez-Crussi, F., 1993. Cellular localization of tumor necrosis factor (TNF)-alpha transcripts in normal bowel and in necrotizing enterocolitis. TNF gene expression by Paneth cells, intestinal eosinophils, and macrophages. *Am. J. Pathol.*, 142 (6). 1858 – 65
118. Tartaglia, L.A., Rothe, M., Hu, Y.F., Goeddel, D.V., 1993. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF-receptor. *Cell*, 73 (2): 213 – 6
119. Thomas, C., Krishnan, L., 1997. Neonatal necrotizing enterocolitis. *Indian Pediatr.*, 34(1): 47 – 51
120. Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281 (5381): 1312 – 6
121. Tomatusuri, N., Yoshida, N., Takagi, T., Katada, K., Isozaki, Y., Imamoto, E., Uchiyama, K., Kokura, S., Ichikawa, H., Naito, Y., et al., 2004. Edaravone, a newly developed radical scavenger, protects against ischemia-reperfusion injury of the small intestine in rats. *Int. J. Mol. Med.*, 13 (1): 105 – 9
122. Tracey, K.J., Beutler, B., Lowry, S.F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I.W., Hariri, R.J., Fahey, T.J., Zentella, A., Albert, J.D., 1986. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science*, 234: 470 – 4
123. Tracey, K.J., Fong, Y., Hesse, D.G., Manogue, K.R., Lee, A.T., Kuo, G.C., Lowry, S.F., Cerami, A., 1987. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*, 330: 662 - 4

124. Tracey, K.J., Cerami, A., Vlassara, H., 1989. Cachectin / Tumour Necrosis Factor. *Lancet*, 1: 1122 - 26
125. Uauy, R.D., Faranoff, A.A., Korones, S.B. et al. 1991. Necrotizing enterocolitis in very low birth infants: biodermographic and clinical correlates. *J. Pediatr.*, 119: 630 – 638
126. Udall, J.N. Jr., 1990. Gastrointestinal host defense and necrotizing enterocolitis: an update. *J. Pediatr.*, 117: S33 - 43
127. van den Eijnde, S.M., Luijsterburg, A.J.M., Boshart, L., De Zeeuw, C.I., van Dierendonck, J.H., Reutelingsperger, C.P.M., Vermeij-Keers, C., 1997. In situ detection of apoptosis during embryogenesis with annexin V: from whole mount to ultrastructure. *Cytometry*, 29: 313 – 320
128. Viscardi, R.M., Lyon, N.H., Sun, C.C., Hebel, J.R., Hasday, J.D., 1997. Inflammatory cytokine mRNAs in surgical specimens of necrotizing enterocolitis and normal newborn intestine. *Pediatr. Pathol. Lab. Med.*, 17 (4): 547 – 59
129. Von Boyen, G.B.T., Steinkamp, M., Reinshagen, M., Schäfer, K.-H., Adler, G., Kirsch, J., 2004. Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. *Gut*, 53: 222 – 228
130. Wedel, T., Krammer, H.J., Kuhnel, W., Sigge, W., 1998. Alterations of the enteric nervous system in neonatal necrotizing enterocolitis revealed by whole-mount immunohistochemistry. *Pediatr. Pathol. Lab. Med.*, 18: 57 – 70
131. Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Curryie, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, 68: 251 – 306
132. Wyllie, A.H., 1987. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J. Pathol.*, 153 (4): p 313 - 6
133. Yamamoto, S., Tanabe, M., Wakabayashi, G., Shimazu, M., Matsumoto, K., Kitajima, M., 2001. The Role of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β in Ischemia-Reperfusion Injury of the Rat Small Intestine. *J. Surg. Res.*, 99: 134 – 141
134. Yoshioka, H., Ideki, K., Fujita, K., 1983. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics*, 72: 317 – 321
135. Zeissig, S., Bojarski, C., Buergel, N., Mankertz, J., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.D., 2004. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut*, 53 (11): 1295 – 302

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Jörg Fuchs danke ich für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung und der Erstellung des Manuskripts.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Guido Seitz, der diese Arbeit hervorragend betreut und mit großem Engagement unterstützt hat.

Ich danke den Mitarbeiterinnen des Labors der Abteilung Kinderchirurgie, insbesondere Frau Heike Heitmann, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Der Konrad-Adenauer-Stiftung danke ich für die langjährige Förderung meines Studiums.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie sowie Florian Weller für die hilfreiche Unterstützung während des Studiums und bei der Erstellung dieser Arbeit.

8. Lebenslauf

Name Monika Maria Weng
Geburtsdatum 12. März 1981
Geburtsort Hechingen

Schulbildung

1991 – 2000 Abitur am Gymnasium Hechingen

Studium

Oktober 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
August 2002 Physikum
August 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Januar 2004 Beginn der Dissertation
April 2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30. Mai 2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

März 2002 Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Universität Tübingen
März 2003 Allgemeine Chirurgie, Kreisklinik Hechingen
August 2004 Allgemeine Chirurgie, KH St. Elisabeth, Ravensburg
März 2005 Dermatologie, Hautklinik der Universität Tübingen
April 2005 Innere Medizin, Kreisklinik Hechingen
August 2005 Pädiatrie, Kinderarztpraxis Dr. v. Puttkamer, Tübingen
September 2005 Pädiatrie, Klinikum am Steinenberg, Reutlingen

Abstract

Ziel: Die NEC ist die häufigste erworbene lebensbedrohliche Erkrankung des Gastrointestinaltraktes bei Früh- und Neugeborenen. Es wird angenommen, dass die vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine, insbesondere TNF- α , an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt ist. In dieser Studie wurde die Auswirkung einer selektiven TNF- α -Blockade auf die Entzündungsreaktion des Darmes untersucht.

Methodik: Neugeborene Sprague-Dawley-Ratten wurden in 3 verschiedene Gruppen aufgeteilt: bei den Tieren der Gruppe I wurde durch Hypoxie, Hypothermie sowie Ersatznahrung eine NEC induziert. Die Tiere der Gruppe II wurden auf die gleiche Weise behandelt, zusätzlich erhielten sie einen TNF- α -Antikörper. Bei den Tieren der Gruppe III wurde keine NEC induziert (Kontrollgruppe), die Ernährung erfolgte mit Muttermilch. Die Tiere wurden bei drohendem Tod sofort, sonst spätestens nach 96 Stunden dekaptiert. Jejunum und Colon wurden getrennt entnommen und für histologische (HE-Färbung) sowie immunhistochemische (MPO-Färbung) Untersuchungen weiterverarbeitet. Mit Hilfe der TUNEL-Färbung wurde die Apoptose dargestellt.

Ergebnis: Die Tiere der Gruppe I zeigten morphologisch eine ausgeprägte NEC (MW NEC-Score: $3,33 \pm 0,24$, MW MPO: $65,58 / 20$ Gesichtsfelder $\pm 8,02$) sowie eine massiv erhöhte Apoptoserate (MW TUNEL-Score $3,22 \pm 0,36$). In der Gruppe II waren Anzeichen einer milden NEC vorhanden, die Apoptoserate war mäßig gesteigert (MW NEC-Score $1,66 \pm 0,47$, MW MPO: $33,16 / 20$ Gesichtsfelder $\pm 5,92$). Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde keine NEC induziert, vereinzelt fanden sich apoptotische Zellen (MW NEC-Score 0.0 ± 0 , MW MPO: $14,27 \pm 3,89$).

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der TNF- α -Antikörper wahrscheinlich eine hemmende Wirkung auf den Entzündungsverlauf der experimentellen NEC bei neugeborenen Ratten hat.