

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von PPAR γ und TFF-3 im Enterokolitis-Tiermodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Konrad Klinghammer

aus Karl-Marx-Stadt (jetzt Chemnitz)

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. F. Guthmann
 2. Prof. Dr. med. W. Barthlen
 3. Prof. Dr. med. M. Rüdiger

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Epidemiologie	5
1.2	Ätiologie	6
1.2.1	Ischämische Schädigung der Mukosa	7
1.2.2	Darmbesiedlung mit Bakterien	7
1.2.3	Orale Ernährung als metabolisches Substrat	8
1.3	Pathologie der NEC	9
1.5	Therapie	10
1.6	Prävention	11
1.7	PPAR γ	12
1.8	Trefoil factor 3 (TFF-3)	15
1.8.1	Zusammenhang von TFF und NEC	16
1.9	Caspase-3, eine essentielle Protease in der Kaskade der Apoptose	17
1.10	Induzierbare NO-Synthase (iNOS) ist ein Marker der Inflammation in Enterozyten bei NEC	18
1.11	Fragestellung	20
2.	Material und Methoden	21
2.1	Geräte	21
2.2	Kits	21
2.3	Methoden	22
2.3.1	Tierversuch	22
2.3.2	Hypoxie/Reoxygenierung (H/R)	23
2.3.3	Intraperitoneale Gabe von Ciglitazon	23
2.3.4	Probengewinnung	23
2.3.5	Proteinextraktion zum Nachweis von TFF-3	23
2.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	24
2.3.7	SDS PAGE	24
2.3.8	Western Blot	25
2.3.9	Antikörperinkubation	26
2.3.10	Entwicklung	26
2.3.11	Densitometrie	26
2.3.12	Permeabilitätsmessung	27
2.3.13	Hemmung von PPAR γ	27
2.3.14	Caspase-3 Kolorimetrischer Assay	27
2.3.15	RNA Extraktion	28
2.3.16	cDNA Synthese	29
2.3.17	Primer Design	29
2.3.18	Primersequenzen	30
2.3.19	Quantitative Real-time PCR (RT-PCR)	30
2.3.20	Agarosegel-Elektrophorese	31
2.3.21	Statistische Auswertung und Grafiken	32
3.	Ergebnisse	33
3.1	Darmbarrierestörung	33
3.2	Die pränatale Gabe von Pioglitazon ist assoziiert mit geringerer Apoptose nach Induktion einer Enterokolitis	35
3.3	Pioglitazon hemmt H/R-vermittelte Expression von iNOS	36
3.4	TFF-3 wird in Abhängigkeit vom Gestationsalter exprimiert	37

3.6	Hypoxie/Reoxygenierung	40
3.7	Intraperitoneale Gabe von PPAR γ -Agonisten führt postnatal zu vermehrter TFF-3-Expression	41
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	44
4.	Diskussion	46
4.1	Induktion einer NEC im Tiermodell	46
4.2	PPAR γ	47
4.3	TFF-3	48
4.4.	NF κ B als ein möglicher Link zwischen PPAR γ und TFF-3	49
4.5	Können Glitazone in der Schwangerschaft oder bei frühgeborenen Kindern eingesetzt werden?	51
4.6	Fazit	51
5.	Zusammenfassung	52
6.	Literaturverzeichnis	53
7.	Abkürzungsverzeichnis	58
8.	Lebenslauf	60
9.	Erklärung	61
10.	Danksagung	62

1. Einleitung

Die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist eine Erkrankung des frühgeborenen Kindes, die den häufigsten gastrointestinalen Notfall auf neonatologischen Intensivstationen darstellt. Sie geht mit einer erheblichen Mortalität einher. In der Vergangenheit wurden unterschiedliche Erklärungsmodelle zu den Ursachen der NEC entwickelt. Die Pathophysiologie ist jedoch nach wie vor unklar. Als gesichert gilt, dass die Frühgeburtlichkeit und die damit verbundene Unreife den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer NEC darstellen.

1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der nekrotisierenden Enterokolitis wird unterschiedlich mit 0,3-2,4 Fällen auf 1000 Lebendgeborene angegeben. Frühgeborene Kinder mit einem niedrigen Geburtsgewicht weisen im Vergleich zu schwereren Kindern eine höhere Inzidenz auf [1]. Mit zunehmendem Geburtsgewicht und Schwangerschaftsdauer nimmt die Häufigkeit der Erkrankung ab. Tabelle 1 und Abbildung 1 stellen diese Abhängigkeiten dar. Vereinzelt treten auch Fälle von NEC bei reifgeborenen Säuglingen auf [2, 3]. Die Häufigkeit der Erkrankung variiert im zeitlichen Verlauf sehr stark zwischen verschiedenen Kliniken, aber auch innerhalb einer neonatologischen Abteilung. Fallberichte beschreiben, dass zeitweise 13-32 % aller aufgenommenen Kinder an einer NEC erkrankten [4, 5].

Schwangerschaftswoche bei Geburt	Mittleres Alter bei Erkrankungsbeginn [d]
<28	22
28-32	13
32-36	4
>36	2

Tabelle 1: Erkrankungszeitpunkt in Abhängigkeit vom Schwangerschaftsalter, Vermont-Oxford-Network

Einige Studien verweisen auf einen Anstieg der Erkrankung in den letzten Jahren. Dies ist auf eine verbesserte perinatale Versorgung und den damit verbundenen Anstieg überlebender Frühgeborener zurückzuführen [1].

Die Datenlage zur Letalität der NEC ist sehr heterogen. Während in älteren Studien eine Letalität von bis zu 78 % angegeben wird, zeigt sich in neueren Datenerhebungen eine große Varianz in der angegebenen Letalität (4-50 %) [6-9].

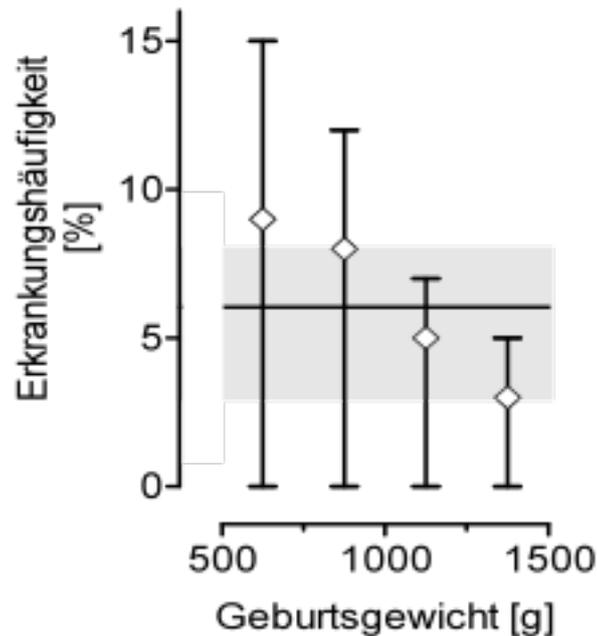


Abbildung 1: Erkrankungshäufigkeit in Abhängigkeit vom Geburtsgewicht, Vermont-Oxford-Network

1.2 Ätiologie

Seit der Erstbeschreibung der NEC wurden mehrere Risikofaktoren für die Entstehung einer NEC identifiziert. Als gesichert gelten u.a. Frühgeburtlichkeit, niedriges Geburtsgewicht, ein persistierender Ductus arteriosus nach der Geburt, Formula-Ernährung, Eklampsie und ein Drogenmissbrauch der Mutter [10-15]. Abgesehen von der Frühgeburtlichkeit und der damit verbundenen Unreife des Kindes herrscht Uneinigkeit über die Relevanz der verschiedenen Risikofaktoren.

Zahlreiche Erklärungsmodelle mit unterschiedlichen Ansätzen für das Entstehen einer NEC wurden in den vergangenen Jahren entwickelt. Santulli et al. haben 1975 erstmals ein Modell einer multifaktoriellen Genese beschrieben [14]. Die von der Arbeitsgruppe formulierte Trias umfasst:

1. Ischämische Schädigung der Mukosa
2. Darmbesiedlung mit Bakterien
3. Orale Ernährung als metabolisches Substrat.

Neben der Frühgeburtlichkeit scheinen nach heutiger Ansicht die genannten Faktoren für die Erkrankung zu prädisponieren. Auf die Trias wird in den folgenden Abschnitten im Einzelnen eingegangen.

1.2.1 Ischämische Schädigung der Mukosa

Frühgeborene sind anfälliger gegenüber Hypoxie und intestinaler Ischämie, da die Fähigkeit zur Regulation des Gefäßwiderstandes nur unzureichend entwickelt ist [16]. Kommt es prä-, peri- oder postnatal zu einer Asphyxie oder Hypoxämie, haben Kinder unter diesen Umständen ein erhöhtes Risiko, eine NEC zu entwickeln. Die möglichen Ursachen der Asphyxie/Hypoxämie sind zahlreich. Angeborene Herzfehler, offener Ductus Botalli, Atemnotsyndrom, Apnoephasen, Geburtskomplikationen, wiederholte diagnostische Blutentnahmen mit daraus folgender Anämie oder Gefäßspasmen, die durch Umbilikalkatheter induziert werden, sind nur einige Ursachen, die zu mesenterialen Perfusionsschwankungen führen können. Kommt es zu einer Unterversorgung der Mukosa mit Sauerstoff, kann dies zu Mukosaschäden führen [17].

Die Behauptung, dass Hypoxie zu Mukosaschäden führt, konnte in tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden. Bei neonatalen Welpen konnten Barlow et al. nach zwei Stunden Hypoxie bei 10 % Sauerstoff Mukosaschäden nachweisen. In einem weiteren Versuchsansatz führte Hypoxie bei neugeborenen Ratten zu intestinalen Nekrosen [18].

Inwiefern die Hypoxie bzw. ischämische Schädigung als primärer Auslöser der NEC eine Rolle spielt oder aber die Folge einer anderen Noxe ist, gilt zum gegenwärtigen Zeitpunkt als umstritten. Es wird diskutiert, dass die initiale Mukosaschädigung nur die Basis für eine erhöhte Permeabilität der Schleimhaut ist und damit die Invasion von Bakterien und anderen intraluminalen Bestandteilen wie Nahrung oder Medikamenten erleichtert.

1.2.2 Darmbesiedlung mit Bakterien

Der Darm des gesunden Neugeborenen wird innerhalb der ersten Lebenswoche mit aeroben und anaeroben Bakterien kolonisiert. Bei frühgeborenen Kindern lässt sich im Unterschied zu Reifgeborenen eine abweichende intestinale Flora mit überwiegend gramnegativen Aerobiern und wenigen Anaerobiern nachweisen. Bei diesen Kindern fehlt die Besiedlung mit Laktobazillen und Bifidobakterien, wie sie bei

gestillten, reif geborenen Kindern stattfindet [4]. Verschiedene Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen der gastrointestinalen Fehlbesiedlung und der Entwicklung einer NEC. Bell et al. zeigten, dass Kinder mit einer NEC häufiger mit gramnegativen Organismen gastral und intestinal kolonisiert waren als andere, nicht an NEC erkrankte Kinder [19]. Bei kranken Kindern ist der physiologische Prozess der bakteriellen Besiedlung häufig aufgrund der Applikation von Antibiotika, aufgeschobener oraler Nahrungszufuhr und verminderter Peristaltik verzögert. Darüber hinaus scheint der Entbindungsmodus (Kaiserschnitt vs. vaginale Entbindung) einen Einfluss auf die bakterielle Kolonisation des Darms zu haben [20]. Weniger Magensäure und weniger sezernierte Proteasen begünstigen bakterielles Wachstum. Dies kann eine Fehlbesiedlung begünstigen [21].

Die Hypothese, dass der NEC eine infektiöse Genese zugrunde liegt, wird durch mehrere Beobachtungen gestützt: Oral applizierte, schwer resorbierbare Antibiotika erwiesen sich als schützend [22] und in der Muttermilch enthaltene antiinflammatorische Bestandteile, wie Interleukin 10, Immunglobuline (IgG und IgA) und immunkompetente T- und B-Lymphozyten, scheinen eine protektive Wirkung zu haben [23].

Bislang ist es nicht gelungen, einen NEC-spezifischen Erreger zu identifizieren. Sowohl Standortflora als auch pathogene Keime konnten in mehreren Untersuchungen bei erkrankten Säuglingen isoliert werden. Die isolierten Keime umfassen *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. und *Enterococcus* spp. Die Blutkulturen sind nur in 30-35 % der an NEC erkrankten Säuglinge positiv, wobei *Klebsiella* spp. und *Escherichia coli* die am häufigsten isolierten Bakterien sind [24]. Offen bleibt, ob die bakterielle Translokation in die Submukosa eine Bedingung für die Krankheitsentstehung darstellt oder ob Endotoxine und andere bakterielle Produkte zu Entzündungen und auf diesem Weg zur mukosalen Schädigung führen, die in der Folge die bakterielle Translokation begünstigt [17].

1.2.3 Orale Ernährung als metabolisches Substrat

Es besteht eine Assoziation zwischen dem Auftreten der NEC und oraler Nahrungszufuhr. Bei der Mehrzahl aller an NEC erkrankten Kinder wurde vor Erkrankungsbeginn die orale Nahrungszufuhr initiiert [25]. Die pathophysiologischen Zusammenhänge sind bislang nur unvollständig geklärt.

Gesteigerte Milchzufuhr erhöht die Anforderung an den Gastrointestinaltrakt, diese zu verstoffwechseln. Das ist nur möglich, wenn der mesenteriale Blutfluss gesteigert werden kann. Ist dies nicht möglich, kann es zu Hypoxie kommen [26].

Wesentlich ist die Art der Ernährung. Kinder, die mit Muttermilch ernährt werden, haben ein vier- bis sechsfach geringeres Risiko an NEC zu erkranken im Vergleich zu Kindern die mit Formulanahrung ernährt werden [23, 27-29]. Die in der Muttermilch enthaltenen immunkompetenten Zellen wie Leukozyten, Immunglobulin A, Lysozym, Zytokine, Lactoferrin, Wachstumsfaktoren, Oligosaccharide und probiotische Keime besitzt die Formulanahrung nicht. Diese Bestandteile führen zu mukosalem Schutz und neutralisieren inflammatorisch wirksame Zytokine und Phospholipide [28]. Der Epidermal Growth Factor, als ein in der Muttermilch enthaltener Wachstumsfaktor, führt direkt zur Entwicklung des Intestinaltrakts [30].

1.3 Pathologie der NEC

Die häufigste Lokalisation der NEC ist im Colon ascendens und im terminalen Ileum. In schweren Fällen kann der gesamte Intestinaltrakt einschließlich Ösophagus, Magen, Duodenum und Rektum befallen sein [11, 14]. Zu den typischen makroskopisch-pathologischen Befunden der NEC gehören intramurale Blutungen, Gangrän des betroffenen Darmabschnitts, Peritonitis und submuköse Gasansammlungen.

Mikroskopisch handelt es sich um ischämisch aussehende Koagulationsnekrosen mit Ödemen und Blutungen in der Mukosa. Teilweise kommen pseudomembranöse Beläge auf nekrotisch ulzerierter Schleimhaut vor, die aus Zelldetritus, fibrinösem Exsudat und Leukozyten bestehen [14, 31].

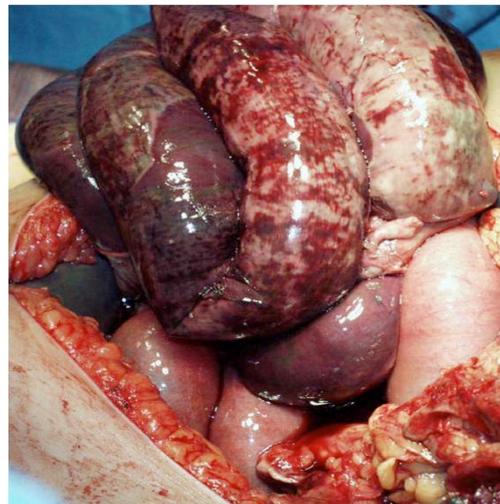


Abbildung 2: Operationssitus eines an NEC erkrankten Kindes

1.4 Klinik

Die NEC zeigt ein weites Spektrum von klinischen Symptomen. Initial kommt es zu einer unspezifischen Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes. Unruhe oder Lethargie, wechselnde Temperaturen, Nahrungsverweigerung, Apnoe-Episoden, Brady- oder Tachykardien, periphere Durchblutungsstörungen und metabolische

Störungen im Sinne einer Azidose gehen der gastrointestinalen Symptomatik häufig voraus. Bei fortgeschrittener Erkrankung kommen zusätzlich Zeichen eines septischen Schocks, respiratorischer Insuffizienz, Blutdruckabfall, Blutzuckerentgleisung und Gerinnungsstörungen in Form einer Verbrauchskoagulopathie hinzu.

Zur abdominalen Symptomatik zählen Druckschmerz, geblähtes Abdomen und Obstipation oder Diarrhoe. Im weiteren Verlauf kann es zu okkulten Blutungen oder sichtbar blutigen und schleimigen Stühlen, galligem oder blutigem Erbrechen, druckempfindlicher Bauchdecke und Zeichen eines Ileus kommen. Hinweise auf eine Darmperforation und eine damit verbundene Peritonitis sind das Bauchdeckenerythem und tastbare Resistenzen. Typische Laborbefunde umfassen verminderte Werte für Natrium, einen Thrombozytenabfall und erhöhte Entzündungsparameter wie CRP und IL-6. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Spektrum der allgemeinen und gastrointestinalen Symptome unspezifisch und sehr variabel ist. Dies erfordert eine wiederholte klinische Beurteilung des Patienten. Um den Schweregrad der NEC einzustufen, entwickelten Bell et al. 1978 eine Stadieneinteilung, die sich nach klinischen, gastrointestinalen und radiologischen Symptomen richtet. Seitdem hat sich das Patientenkollektiv auf den neonatologischen Intensivstationen allerdings verändert: Geburtsgewicht und Gestationsalter der Kinder sind erheblich gesunken. Die Symptome, wie sie Bell beschrieben hat, sind relativ unspezifisch und treten auch bei anderen Entitäten wie viralen Enteritiden, Mekoniumobstruktionen oder fokal-intestinalen Perforationen auf. In jüngster Zeit wird die Einteilung nach Bell deshalb kritisch diskutiert [32-38].

1.5 Therapie

Die Therapie richtet sich nach dem Stadium der Erkrankung. Anfangs steht die konservative Behandlung im Vordergrund. Der Darm wird durch Nahrungskarenz und das Anlegen einer Magensonde entlastet. Eine Antibiotikatherapie aus einer Kombination verschiedener Antibiotikagruppen wird eingeleitet. Zum Einsatz kommen dabei z.B. Metronidazol, Gentamicin, und Cefotaxim [39]. Zudem ist ein Elektrolyt- und Flüssigkeitsausgleich sicherzustellen. In regelmäßigen Abständen wird der Zustand des Kindes und dabei insbesondere der des Abdomens beurteilt. Radiologische Kontrollen (Röntgen und Ultraschall) und Laborkontrollen (CRP, IL-6, Blutbild, Blutkulturen, Blutgasanalysen, Elektrolyte, Glucose, ggf. Prothrombin, und PTT) helfen, eine Einschätzung vorzunehmen.

Kommt es zur Besserung der Symptomatik, wird die Nahrungskarenz für weitere 10 bis 14 Tage fortgeführt. Verschlechtert sich der Zustand des Kindes im Sinne eines Stadiums II bis III, ist eine intensivmedizinische Versorgung erforderlich [40, 41].

Die NEC erfordert eine enge Kooperation zwischen Neonatologen und Kinderchirurgen. Der beste Zeitpunkt, an dem ein Kind operiert werden sollte, ist nicht belegt. Daher sollte bereits bei Verdacht auf eine NEC ein Kinderchirurg hinzugezogen werden. Pneumoperitoneum, Peritonitis, Perforation, Darmnekrosen, Aszites, Bauchhauemphysem und eine Verschlechterung des klinischen Zustandes gelten als Indikationen für eine Operation. Umstritten ist die Therapie in Form des Anlegens einer Peritonealdrainage [40, 42, 43].

Ziel der operativen Therapie ist die Resektion nekrotischer Darmteile, wobei so viel vitales Gewebe wie möglich erhalten bleiben sollte. Außerdem wird der Darm durch die Operation entlastet; Stuhl und Eiter sowie nekrotische Ablagerungen werden entfernt. Eine primäre Anastomose nach Resektion wird angestrebt, wenn nur ein sehr kleiner Teil des Darms reseziert werden muss. Die Standardmethode ist jedoch das Anlegen zweier Stomata, um damit den Darm zu entlasten. Entzündete Darmabschnitte werden dadurch von der Nahrungspassage ausgeschlossen und ein Abklingen der Entzündung wird ermöglicht. Den Darm weitestgehend zu erhalten, ist essentiell für das Wachstum und die Entwicklung des Kindes. Nach Resektion nekrotischer Darmabschnitte kommt es klinisch meist zu einer Besserung. Vitalparameter, ausgeglichener Flüssigkeitshaushalt, steigende Thrombozyten, fallende Leukozytenzahl sowie die Vitalität des Stomas sind Indikatoren für den Heilungsprozess [40, 43].

1.6 Prävention

Die beste Methode der Prävention wäre die Inzidenz von Frühgeburten zu senken. Eine Verlängerung der Schwangerschaft bei drohender Frühgeburt führt zu einer Reduktion der Inzidenz des NEC. Da dies nicht immer möglich ist, hat man versucht das Risiko für die Entstehung einer NEC zu verringern. In der Literatur finden sich viele Ansätze zur Prävention der NEC, von denen lediglich die orale Nahrungszufuhr, die Ernährung mit Muttermilch, pränataler Einsatz von Steroiden, die enterale Gabe von schwer resorbierbaren Antibiotika, Flüssigkeitsrestriktion [44] und der Einsatz von Probiotika als evidenzbasiert gelten können. Darüberhinaus sprechen einige Daten für den Einsatz oraler Immunglobuline [45], die Gabe von L-Arginin [46], die

Ansäuerung der Milch [47], den Einsatz von Wachstumsfaktoren [48] und Erythropoetin [49]. Allerdings können diese Ansätze aufgrund mangelnder Evidenz nicht generell empfohlen werden. Auf die Rolle der Muttermilch und den Einsatz von Antibiotika wurde bereits in Kapitel 1.2. eingegangen, so dass in diesem Abschnitt die Rolle von Probiotika, die enterale Nahrungszufuhr und der pränatale Einsatz von Steroiden ergänzend erläutert werden.

Mehrere Studien befürworten die Gabe von Probiotika zur Risikoreduktion der NEC. Zwei jüngst erschienene Metaanalysen dieser Studien kommen zu dem Schluss, dass durch die Gabe von Probiotika das NEC-Risiko abnimmt und die Mortalität gesenkt werden kann [50, 51]. Lactobazillen und Bifidobakterien sind die am häufigsten eingesetzten probiotischen Mikroorganismen. Ob in Kombination oder als Monotherapie verwendet und welches davon das optimale Probiotikum ist, ist bislang im direkten Vergleich nicht untersucht worden [52].

Wie unter 1.2. erwähnt, besteht ein Zusammenhang zwischen der Steigerung der Nahrungszufuhr und dem Auftreten der NEC [53]. Unter standardisierten Ernährungsprotokollen in Form von Handlungsanweisungen konnte die Inzidenz um 87 % gesenkt werden. Parenterale Ernährung, kombiniert mit kleinen Mengen oraler Nahrung, schützt Risikokinder vor der Entwicklung einer NEC [54].

Der pränatale Einsatz von Steroiden führt u.a. zu gastrointestinaler Reifung, verminderter Inflammation und geringerer bakterieller Translokation [55]. Mehrere randomisierte Studien konnten eine signifikante Reduktion der NEC durch den pränatalen Einsatz von Steroiden belegen [56, 57].

1.7 PPAR γ

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ist ein durch Liganden aktivierbarer Rezeptor, der im Zellkern seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausübt. PPAR γ reguliert die Expression verschiedener Gene durch Bindung an einen Retinoid-X-Rezeptor und konsekutive Anlagerung an eine spezifische Sequenz in der Promotorregion, das sogenannte PPAR – Response-Element (PPRE).

Bislang wurden drei Subtypen von PPARs charakterisiert, PPAR α , PPAR δ und PPAR γ . PPAR α lässt sich in der Leber, den Nieren sowie dem Herz- und Skelettmuskel nachweisen; PPAR δ wird ubiquitär exprimiert; PPAR γ ist insbesondere in Adipozyten und Zellen des Immunsystems, wie T- und B-Zellen, sowie Monozyten/Makrophagen nachweisbar. Für PPAR γ konnten Fettsäuren und

Eicosanoide als natürliche Liganden identifiziert werden, woraufhin dem Rezeptor eine Funktion im Glucose- und Fettstoffwechsel zugeschrieben wurde. Das Prostaglandin-D₂ und sein Derivat 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin-J₂ sind ebenfalls Liganden am PPAR γ , allerdings mit unterschiedlichen biologischen Effekten wie Vasodilatation, Inhibition der Plättchenaggregation und verminderter Entzündungsreaktion [58]. In der Folge wurde gezeigt, dass potente Thiazolidinedione (sogenannte Insulinsensitizer) Agonisten am PPAR γ sind und eine glucoseregulierende Wirkung haben. Diese Eigenschaft führte 1997 zur Zulassung mehrerer Thiazolidinedione zur Behandlung von Dyslipidämie und Diabetes mellitus Typ 2. Nach schweren Nebenwirkungen bei dem Präparat Troglitazon werden heute Rosi- und Pioglitazon weiter eingesetzt, da diese über eine minimal veränderte chemische Struktur verfügen und auf diese Weise die bei Troglitazon beobachteten toxischen Metabolite nicht entstehen.

Der Wirkmechanismus ist in Abbildung 3 dargestellt. Nach der Ligandenbindung erfolgt die Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) oder NF κ B. Im Fall einer Bindung an den RXR bilden diese gemeinsam mit weiteren Co-Aktivatoren einen aktiven Transkriptionskomplex. Der Komplex bindet sequenzspezifisch an PPRES in der Promoterregion von Zielgenen und führt zu deren Transkription [59].

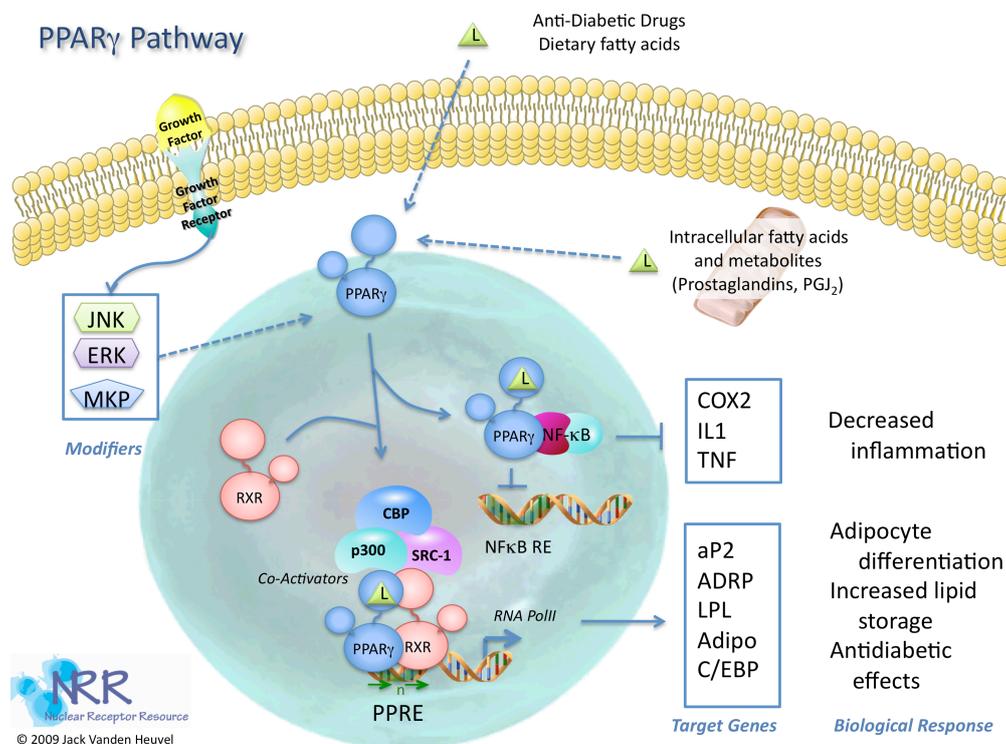


Abbildung 3: Nach Ligandenbindung erfolgt die Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor. Gemeinsam bilden diese mit weiteren Co-Aktivatoren einen aktiven Transkriptionskomplex. Der Komplex bindet sequenzspezifisch an response

elements (PPREs) in Zielgenen. Alternativ kommt es direkt nach Aktivierung zur Heterodimerisierung mit NF κ B und Bindung an ein NF κ B-Response-Element. Quelle: <http://ppar.cas.psu.edu/>

Die Zahl der identifizierten „response elements“ wächst stetig. Eine aktuelle Übersicht ist in Tabelle 2 gezeigt. Erfolgt die Bindung an NF κ B, führt diese zu einer verminderten Transkription von COX-2, IL-1 und TNF.

In den vergangenen Jahren ist die Bedeutung von Thiazolidinedionen durch neue Forschungsergebnisse stetig gewachsen. Neben der glucoseregulierenden Wirkung erwies sich PPAR γ und der Einsatz von PPAR γ -Liganden als antiinflammatorisch. Su et al. zeigten in vitro, dass Darmzellen, die mit proinflammatorischen Zytokinen und PPAR γ -Agonisten co-kultiviert werden, eine geringere Entzündungsantwort hervorrufen als ohne PPAR γ -Agonisten. Die Wirkung wird mit einer verminderten Aktivierung von NF κ B von der Arbeitsgruppe begründet [60]. Imamoto konnten einen weiteren Mechanismus belegen, der die Inflammation abschwächt, indem PPAR γ -Liganden zur verminderten Expression von CD11b/CD18 auf Leukozyten führen und VCAM-1 auf Endothelzellen vermindert exprimiert wird. Die Folge ist eine verminderte Bindung zwischen Monozyten und Endothelzellen und eine geringere Infiltration von Granulozyten in entzündetes Gewebe [61]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Gabe von PPAR γ -Liganden zu verminderter Kolitis im Tiermodell führt [62]. Bassaganya-Riera et al. zeigten in einem PPAR γ -Knock-out-Mausmodell, dass PPAR γ -defiziente Tiere eine signifikant schwerere Kolitis entwickeln, wenn diese experimentell induziert wird. Tiere mit intakter PPAR γ -Funktion und -Aktivierung durch Liganden wiesen eine verminderte TNF α -Expression und NF κ B-Aktivierung sowie eine vermehrte Expression von immunregulatorischen TGF β ₁ auf [63]. Von besonderem Interesse sind neuere Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass mit Rosiglitazon behandelte Mäuse eine geringere intestinale Organschädigung nach Ischämie/Reperfusion (I/R) aufweisen. Die Autoren führen diesen Effekt ebenfalls auf die Hemmung von NF κ B und der verminderten Bildung von TNF α und ICAM-1 zurück [59, 64-66]. Der im Tierversuch wiederholte Nachweis einer geringeren intestinalen Schädigung nach Gabe von Rosiglitazon in einem Kolitis-Modell führte zu einer Studie an einem kleinen Patientenkollektiv, in der der Effekt von Rosiglitazon auf den Krankheitsverlauf einer therapierefraktären Colitis ulcerosa gemessen wurde. Der

Einsatz führte bei einem Viertel der Studienpopulation zur Krankheitsremission. Diese Daten könnten Anlass sein, eine randomisierte Studie mit einer größeren Patientenzahl zu initiieren [67]. Die antiinflammatorische Wirkung ist für die Therapie der NEC von besonderem Interesse, insbesondere da eine hohe Expression von PPAR γ in Kolonepithelien nachgewiesen werden konnte. Randomisierte Studien zum Einsatz der TZD bei Kolitis fehlen trotz der vielversprechenden Daten bislang, so dass ein Einsatz dieser Medikamente nicht empfohlen werden kann.

Gen	PPRE	Funktion des Gens
Konsensus	TGACCTnTGACCT	
Acyl-CoA Oxidase (ACO)	TGACCTtTGTCCT TGACCTtCTACCT	beta-Oxidation im Peroxisom
Bifunctional protein (enoyl-CoA hydratase)	TGAACTaTTACCT	beta-Oxidation im Peroxisom
Acyl-CoA Synthetase	TGACTGaTGCCCT	Bildung von Acyl-CoA Ester
Cytochrome P450IVA6 (CYP4A6)	TCACTTtTGCCCT TGGCCTtTGTCCT TGACCTtTGCCCA	Omega Oxidation von Fettsäuren
HMG-CoA Synthetase	AGACCTtTGGCCC	Ketogenese
L-fatty acid binding protein (L-FABP)	TGACCTaTGGCCT	Fetttransporter
Adipocyte fatty acid binding protein (aP2)	TGAACTcTGATCC	Fetttransporter
Lipoprotein Lipase (LPL)	TGCCCTtTCCCCC	Hydrolyse von Triglyceriden
apoA-I	TGACCCcTGCCCCT	Bestandteil von HDL
apoA-II	CAACCTtTACCCT	Bestandteil von HDL

Tabelle 2: PPAR γ response elements mit entsprechendem Zielgen; aktivierte PPAR γ erkennt AGGTCA oder TGACCT und führt zur Bindung und konsekutiven Transkription. Quelle: <http://ppar.cas.psu.edu/>

1.8 Trefoil factor 3 (TFF-3)

Trefoil (Kleeblatt)-Peptide sind eine Klasse regulatorischer Proteine, deren Funktion der Schutz und die Reparatur der Mukosa im Gastrointestinaltrakt ist.

Bislang wurden drei Formen von TFFs identifiziert: TFF-1 (vorher pS2), TFF-2 (vorher spasmolytic peptide) und TFF-3 (vorher Intestinal Trefoil Factor). Allen gemeinsam ist die Genlokalisierung auf Chromosom 21q22.3 auf einem 50kb-Abschnitt. Darüber hinaus weisen diese Proteine die sogenannten Kleeblatt-Domänen in der Faltungsstruktur auf, die eine außerordentliche Resistenz

gegenüber proteolytischen Enzymen gewährleistet. Diese Resistenz wird durch Disulfid-Cysteinbrücken vermittelt [68].

Im gesunden Organismus wird TFF-1 und -2 vorwiegend im Magen exprimiert. Im Gegensatz dazu findet man TFF-3 überwiegend im Dün- und Dickdarm. Für alle drei Formen ist die vermehrte Expression bei entzündlichen Erkrankungen wie M. Crohn oder Magenerkrankungen beschrieben. Über die Regulation von TFF-3 ist nur wenig bekannt. Ebenfalls ist bislang unbekannt, über welche Rezeptoren und Signalwege die Funktionen von TFF vermittelt werden. Als gesichert gilt, dass TFF-3 in Becherzellen gebildet wird und einer basalen Transkription unterliegt. Kommt es zur Entzündung steigt die Expression rasch an [69]. Als expressionssteigernder Faktor ist HIF-1 identifiziert. Furuta et al. haben gezeigt, dass es durch die Bindung von HIF-1 an die Promotorregion von TFF-3 in Zelllinien unter Hypoxie zur gesteigerten Expression von TFF-3 kommt [70].

1.8.1 Zusammenhang von TFF und NEC

Für TFF-3 konnte ein protektiver Effekt auf die Mukosa nachgewiesen werden. In einem Tiermodell an Mäusen wurde Kolitis durch orale Gabe von Dextran Sodium Sulfat induziert. Bei TFF-3-Knock-out-Mäusen entwickelten 60 % der Tiere blutige Diarrhoen und verstarben, während in der Kontrollgruppe lediglich 10 % der Tiere Krankheitssymptome zeigten. Die histologische Aufarbeitung zeigte das erwartete Bild einer ulzerierenden Kolitis in der Versuchsgruppe und konnte beweisen, dass keine Restitution stattgefunden hatte [71]. Unter Restitution versteht man den Prozess der Zellmigration von Epithelzellen zum Verschluss oberflächlicher Defekte an der Schleimhaut, ein Prozess der offensichtlich durch TFF-3 beeinflusst wird [72, 73].

Ergebnisse von Tierversuchen unterschiedlicher Arbeitsgruppen lassen eine Rolle von TFF-3 in der Pathogenese der NEC vermuten. Furuta et al. zeigten, dass die Zugabe von Anti-TFF-3-Antikörpern in einem Verlust der Barrierefunktion in Epithelzellen des Darms nach Hypoxie resultiert [70]. Eine andere Studie von Lin et al. konnte zeigen, dass unreife neugeborene Ratten einen Mangel an TFF-3 aufweisen und dass dieser reifeabhängig gebildet wird [74]. Dass der Mangel an TFF-3 bei unreifen oder neugeborenen Tieren eine Rolle spielt, wurde in zwei weiteren NEC-Modellen im Tierversuch belegt: Carrasco et al. haben bei 18 Tage alten Ratten in einem I/R-Modell gezeigt, dass TFF-3 vor ischämischen Schäden

schützt und zu einer zügigeren Heilung führt [75]. Zhang et al. induzierten im Tiermodell eine NEC bei unreifen Ratten und konnten den protektiven Effekt, die verminderte Entzündung, die rasche Restitution und die Verhinderung von Apoptose nach Gabe von rekombinanten TFF-3 ebenfalls belegen [76].

Vestergaard et al. untersuchten inwiefern sich TFF in der Muttermilch von stillenden Müttern Frühgeborener und reif geborener Kinder nachweisen lässt. Für TFF-1 konnte kein Unterschied hinsichtlich der Serumkonzentration stillender und nicht stillender Mütter gemessen werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Konzentration von TFF-3 in Muttermilch nach der Geburt etwa zehnfach höher ist als im Serum nicht stillender Individuen. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die Konzentration von TFF-3 wenige Tage nach der Geburt drastisch abnimmt [77]. Gerade in der Zeit der höchsten Vulnerabilität des kindlichen Darms ist die Konzentration von TFF-3 in der Muttermilch am höchsten.

1.9 Caspase-3, eine essentielle Protease in der Kaskade der Apoptose

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche untersuchten wir den protektiven Effekt von PPAR γ -Agonisten auf den Darm. Ein Maß für den erfolgreichen Schutz ist die verminderte Aktivierung der Apoptosekaskade, die mittels der Aktivität der Caspase-3 gemessen wurde.

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod durch das allmähliche Erlöschen einzelner Zellfunktionen. Apoptose ist ein stark regulierter Prozess und unterscheidet sich von der Nekrose, einer anderen Form des Zelltodes, bei der es zu unkontrollierter Zellyse kommt. Die Abbildung 4 zeigt den extrinsischen und intrinsischen Weg, die gemeinsam zur Aktivierung der Apoptose führen.

Bei dem im linken Bildteil dargestellten Weg, der auch als extrinsischer bzw. Rezeptor aktivierter Signalweg bezeichneten Kaskade, kommt es durch CD95-Liganden am Fas-Rezeptor zur Rekrutierung der Procaspase-8. Die proteolytische Spaltung der Procaspase-8 führt zur aktiven Caspase-8, die dann wiederum die Caspase-3 aktiviert.

Die Einleitung der Apoptosekaskade kann alternativ über den sogenannten mitochondrialen Signalweg erfolgen. Kommt es zu Schäden an der DNA, die durch zelleigene Reparaturmechanismen nicht behoben werden können, induziert die

beschädigte DNA die Apoptose. Über eine Reihe komplexer mitochondrialer Prozesse kommt es über die Aktivierung von Cytochrom c zur Bildung des Apoptosoms. Das Apoptosom spaltet dann die Procaspase-3 zur Caspase-3. Extrinsischer und mitochondrialer Signalweg münden also mit der Aktivierung der Caspase-3 in der gemeinsamen Endstrecke des programmierten Zelltodes. Als Folge der Aktivierung wird die Schrumpfung der Kerne, der Verlust der Zellmembran und die Fragmentierung der DNA in Nukleosomen nachweisbar [78-80].

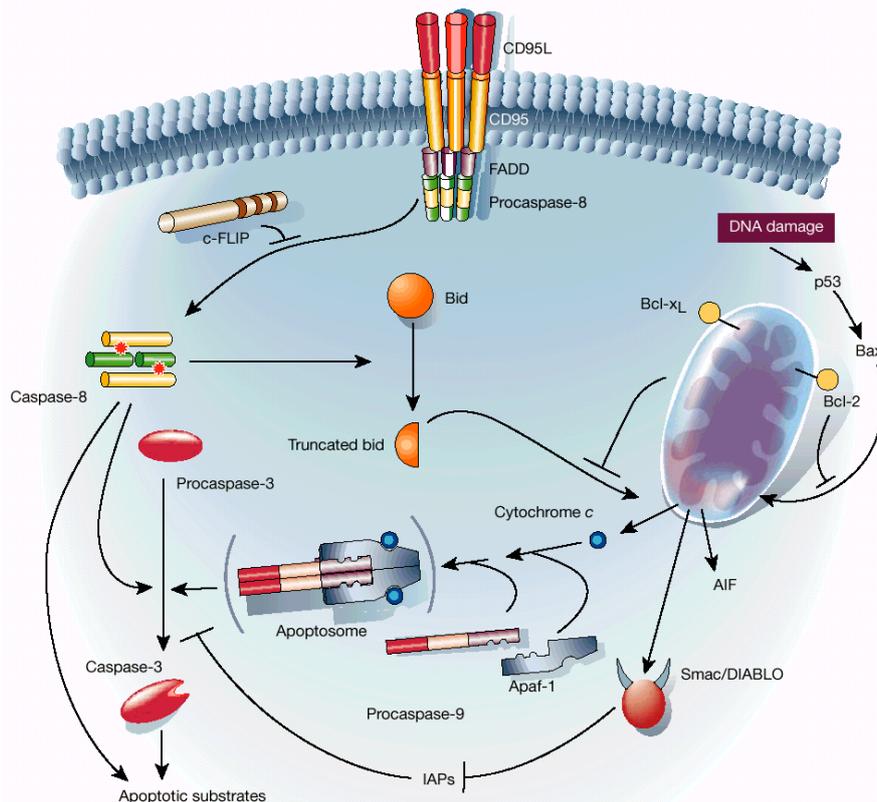


Abbildung 4: Darstellung der beiden Wege, die zu Apoptose in menschlichen Zellen führen. Gemeinsame Endstrecke der Kaskaden ist die Spaltung von Procaspase-3 zu Caspase-3 [81].

1.10 Induzierbare NO-Synthase (iNOS) ist ein Marker der Inflammation in Enterozyten bei NEC

Drei Isoformen der NO-Synthasen sind bekannt. Die konstitutive Form (cNOS) gibt es in neuronalem (nNOS) oder in endothelialem Gewebe (eNOS). Eine dritte Form wird nach Induktion durch bestimmte Zytokine, Mikroben und bakterielle Produkte exprimiert und wird induzierbare NO-Synthase (iNOS) genannt [82]. Allen gemeinsam ist die Synthese von NO. Bei der Oxidation des terminalen Stickstoffs von L-Arginin entsteht NO und, als Nebenprodukt, Citrullin.

Die NO-Synthase durch cNOS ist im Vergleich zu iNOS gering und schützt vor experimentell induzierter Enterokolitis, indem die intestinale Perfusion durch kleine

Mengen NO aufrechterhalten wird. Experimentell konnte gezeigt werden, dass cNOS durch L-Arginin und L-Carnitin stimuliert wird und auf diese Weise NO freigesetzt wird [83]. Im Gegensatz dazu ist eine kontinuierliche vermehrte Expression von NO durch erhöhte iNOS-Expression bei intestinalen Entzündungsprozessen schädlich. Nach Behandlung von Darmzellen mit dem Oxidans Peroxynitrit kommt es zur Aktivierung der Caspase-3 [84].

Umgekehrt konnte in Darmpräparaten von NEC-Patienten eine gesteigerte iNOS-Expression nachgewiesen werden. Eine erhöhte iNOS-Expression geht mit Apoptose in Enterozyten und nitrierten Proteinen in intestinalen Villi einher [85].

1.11 Fragestellung

Die Unreife als Hauptrisikofaktor einer nekrotisierenden Enterokolitis ist bislang nur unvollständig verstanden. Entwickeln Neugeborene eine NEC, kommt es zur Entzündung in den betroffenen Darmabschnitten. Inwieweit die Unterdrückung der Entzündung zu einem günstigeren Krankheitsverlauf führen kann und welche molekularen Mechanismen dabei eine Rolle spielen, ist unklar.

Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass PPAR γ -Agonisten neben der glucoseregulierenden Wirkung eine entzündungshemmende Wirkung haben.

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die pränatale Gabe von PPAR γ -Agonisten vor experimentell induzierter Enterokolitis bei Neugeborenen im Tiermodell schützt und einen Zusammenhang zwischen der Expression von TFF-3 und der Gabe von PPAR γ -Agonisten besteht. Dazu wurde die Integrität der Darmbarriere und die Apoptose von Enterozyten frühgeborener Ratten nach Induktion einer Enterokolitis als Maß für die Schädigung gemessen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

- Ultraschallgerät, Sonoplus HD60, Bandelin, Berlin, Deutschland
- Zentrifuge MR 1822, Jouan, Basingstoke, UK
- Thermomixer 5436, Eppendorf, Deutschland
- pH Meter 761, Calimatic, Knick, Berlin, Deutschland
- Photometer UV-160A, Shimadzu, Duisburg, Deutschland
- Elektrophoresekammer Mighty Small, Höfer, Novodirect GmbH, Kehl, Deutschland
- Elektrophoresestromgerät PowerPac300, Höfer, Kehl, Deutschland
- Tankkammer TE 22, Höfer, Novodirect GmbH, Kehl, Deutschland
- Stromgerät EPS 2A200, Höfer, Novodirect GmbH, Kehl, Deutschland
- Entwicklungsmaschine X-OMAT Multiloader 300 plus, Kodak, Rochester, USA
- Hyperfilm, Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
- GS-710 Calibrated Imaging Densitometer, Bio Rad, Hercules, USA
- Thermocycler Mastercycler 5330, Eppendorf, Deutschland
- ABI Prism 7000, Applied Biosystems, Foster City, USA
- Elektrophoresekammer Agagel Mini, Biometra, Göttingen, Deutschland
- UV Solo, Biometra, Göttingen, Deutschland

2.2 Kits

- Colorimetric Assay Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA
- Rneasy, Qiagen, Hilden, Deutschland
- RT-Kit, Ambion, Foster City, USA
- RT-PCR-Kit, Eurogentec, Seraing, Belgien

Software Quantity One, Bio Rad, Hercules, USA

Graphpad Prism 4, GraphPad Software, LaJolla, USA

EndNote X2, Thomson, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Tierversuch

Die Tierversuche wurden nach einem Protokoll durchgeführt, das vom Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit Berlin (LaGetSi) genehmigt wurde (G0175/05).

Wistar-Ratten wurden aus der Züchtung der Charité bezogen.

Tragende Ratten wurden ab dem 13 Tag mit Standardfutter oder mit Futter, dass 250 mg Pioglitazon/ kg enthielt ad libitum gefüttert (Sniff-Spezialdiäten GmbH, Soest).

Schwangere Ratten wurden am 18., 19. und 20. Schwangerschaftstag in Ethernarkose nach zervikaler Dislokation entbunden und sofort getötet oder es wurde die spontane Geburt, die in der Regel nach 21-22 Tagen Schwangerschaft stattfindet, abgewartet.

Nomenklatur und Anzahl der Tiere in den jeweiligen Versuchsgruppen

Vorzeitig entbundene Tiere werden mit dem Tag der Schwangerschaftsdauer bezeichnet, d.h. d20 steht für ein Feten der am Tag 20 der Schwangerschaft entbunden wurde.

d18 4 Tiere

d19 7 Tiere

d20 10 Tiere

d20+Pio 11 Tiere

Spontan geborene Tiere wurden mit „G“ und den Lebtagen bis zur Tötung bezeichnet. G2 steht für ein Tier, dass spontan geboren wurde und 2 Tage nach der Geburt getötet wurde. H/R steht für die Tiere die dem Hypoxie/Reoxygenierungsversuch unterzogen worden (siehe 2.3.2). Pio steht für Tiere deren Mütter in der Schwangerschaft Pioglitazon erhielten.

G2 Kontrolle 23 Tiere

G2 + Pio 10 Tiere

G2 H/R 14 Tiere

G2 H/R +Pio 15 Tiere

G2 H/R +Pio +T007 7 Tiere

G7 Kontrolle 4 Tiere

G7 Ciglitazon 5 Tiere

Erwachsene Kontrolle 10 Tiere

Erwachsene H/R 12 Tiere

2.3.2 Hypoxie/Reoxygenierung (H/R)

Bei neugeborenen Ratten wurde eine nekrotisierende Enterokolitis nach dem von Okur et al. entwickelten Protokoll induziert. Dazu wurden die Tiere am ersten Lebenstag 5 Minuten in eine mit 100 % CO₂ geflutete Kammer gesetzt. Nach dieser Zeit erscheinen die Tiere zyanotisch und dyspnoisch. Im Anschluss daran wurde die Kammer für 5 Minuten mit 100 % O₂ geflutet. Die Versuche fanden bei Raumtemperatur statt. Nach dem Versuch wurden die Tiere zurück zu ihrer Mutter gesetzt.

2.3.3 Intraperitoneale Gabe von Ciglitazon

Spontan geborenen Ratten wurde am 6. Lebenstag der PPAR_γ-Agonist Ciglitazon (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) intraperitoneal gespritzt. Die verwendete Dosis betrug 10 mg/kg. 24 Stunden später erfolgte die Tötung und Probengewinnung.

2.3.4 Probengewinnung

Die Tötung der Tiere erfolgte 24 und 48 Stunden nach dem H/R Versuch. Nach inhalativ verabreichter Narkose mit Diethylether erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Für die Versuche wurde Gewebe aus dem distalen Ileum entnommen. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80 °C konserviert.

2.3.5 Proteinextraktion zum Nachweis von TFF-3

Darmabschnitte von 5 cm Länge wurden in 300 µl destilliertem Wasser, versetzt mit Proteinase-Inhibitoren, aufgenommen. Um den Darm zu homogenisieren, wurde dieser mit einer Schere zerkleinert und anschließend mittels Kanülen absteigender Größe (18-21-23 G) wiederholt aufgezogen („needle-and pestle“-Lyse). Das entstandene Homogenat wurde mit 5 Ultraschallzyklen behandelt, um die letzten Zellverbände zu lösen und die Zellen aufzuschließen und anschließend 5 min lang bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen und die Proteinkonzentration nach Bradford bei 595 λ bestimmt. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden durch Verdünnung

angeglichen, um einen Vergleich zwischen den Proben nach dem Denaturieren zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurden die Proteine 5 min bei 100 °C gekocht und anschließend 5 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Man nutzt dabei die Hitzestabilität von TFF-3, die nicht wie bei anderen Proteinen ausfällt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Proteinase-Inhibitoren für 1 ml destilliertes H₂O

10 µl Aprotinin 10 µg/µl ICN Biomedicals, Frankfurt, Deutschland

10 µl Leupeptin 10 mM, Sigma, Taufkirchen, Deutschland

5 µl NEM Sigma, Taufkirchen, Deutschland

2,5 µl PMSF Sigma, Taufkirchen, Deutschland

2.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 10 µl Probe mit 490 µl NaCl 0,9 % und 500 µl Bradford Reagenz versetzt und anhand einer zuvor angefertigten Standardkurve bei einer Wellenlänge von 595 λ nach 5 Minuten Inkubation vermessen.

Bradford Reagenz Sigma, Taufkirchen, Deutschland

2.3.7 SDS PAGE

In der Gelelektrophorese nach Lämmli werden denaturierte Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Ladung der Proteine wird zuvor durch die Zugabe von anionischen Detergens SDS neutralisiert. Zur Trennung der Proteine bei angestrebtem TFF-3-Nachweis wurde ein 15%iges Trenngel und ein 5%iges Sammelgel verwendet. Die Proteinlösung wurde auf Eis schonend getaut, mit 4-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt, anschließend bei 95 °C für 5 min gekocht und danach 10 µg Protein pro Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte unter folgenden Bedingungen:

1. 30 min bei 20 mA. In dieser Zeit bildeten die Proteine eine einheitliche Lauffront im Sammelgel.
2. 65 min bei 30 mA bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hat.

Trenngel 15 % 15 ml Monomer (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1) Fluka
10 ml Resolving Gel Buffer
0,4 ml 10 % SDS
14,4 ml Aqua dest.
20 µl Temed Sigma, Taufkirchen, Deutschland
0,2 ml 10 % APS

Sammelgel 4,5 % 2,01 ml Monomer (Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1)
5 ml Stacking Gel Buffer
0,2 ml 10 % SDS
12,67 ml Aqua dest.
8 µl Temed
0,1 ml 10 % APS

2.3.8 Western Blot

Als Referenzprobe führten wir in jedem Western Blot die gleiche Kontrollprobe mit. Für den Proteintransfer wurde die PVDF-Membran 30 sec in Methanol inaktiviert, dann 2 min in destilliertem Wasser gewaschen und weitere 5 min in Tankpuffer equilibriert. Gleichzeitig wurde das Trenngel 5 min in Tankpuffer gelegt, um dieses vor dem Austrocknen zu schützen. Das Whatman-Papier wurde ebenfalls mit Tankpuffer getränkt. Bei der Zusammenstellung des *Sandwichs* wurden darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen Gel und PVDF-Membran liegen.

Blotbedingungen: 300 mA für 2 Stunden.

Nach dem Blotten wurden die Membranen über Nacht in 5%iger Magermilch bei 4 °C geblockt.

Tankpuffer:

300 ml Methanol J.T. Baker, Phillipsburg, USA
150 ml 10x Lämmli Puffer
1050 ml destilliertes H₂O

10x Lämmli Puffer (pH 8,3 bis 8,8)

30,3 g (0,025 M) Tris-base Sigma, Taufkirchen, Deutschland

144,2 g (0,192 M) Glycin

Serva, Heidelberg, Deutschland

10 g 10 % SDS

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

mit destillierten H₂O auf 1 l aufgefüllt

Magermilch

2,5 g Magermilchpulver Roth, Karlsruhe, Germany

50 ml t-TBS

t-TBS pH 7,5

10 mM Tris-base

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

100 mM NaCl

Fresenius, Bad Homburg, Deutschland

0,1 % Tween 20

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

2.3.9 Antikörperinkubation

Zum Nachweis von TFF-3 wurde der polyklonale Antikörper der Firma Santa Cruz, USA, a-ITF (sc18272) verwendet. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 in 1 % Magermilch angesetzt. Die über Nacht geblockte Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Antikörper inkubiert. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 4-mal 15 min in t-TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase Conjugated Affinity Purified Anti-GOAT IgG (H&L) (Donkey) Rockland) in 3 % Magermilch in einer Verdünnung von 1:2000. Danach wurde die Membran für 4-mal 15 min in t-TBS gewaschen.

2.3.10 Entwicklung

Die Membran wurde in handelsüblicher Frischhaltefolie und für 5 min mit Chemiluminescent Substrat (je 1 ml Perox. Solution + 1 ml Enhancer Solution der Firma Pierce) inkubiert. Anschließend wurde sämtliche Flüssigkeit entfernt und die Membran für 5 Minuten auf einen Röntgenfilm gepresst. Der so belichtete Film wurde anschließend entwickelt.

2.3.11 Densitometrie

Die Banden von TFF3 wurden densitometrisch am GS-710 Calibrated Imaging Densitometer der Firma Bio Rad gemessen und mit Quantity One der Firma Bio Rad ausgewertet.

2.3.12 Permeabilitätsmessung

Die Integrität und damit die Barrierefunktion der Darmwand wurde nach Tagesson et al. bestimmt [70, 86]. Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Nach einer Nüchternperiode von 4 Stunden wurde Gruppe eins 24 Stunden und Gruppe zwei 48 Stunden nach Hypoxie/Reoxygenierung FITC-Dextran 4 kDa (60 mg pro 100g Körpergewicht) über die Magensonde verabreicht. Gruppe drei diente als Kontrollgruppe ohne H/R-Versuch. Nach 4 Stunden erfolgte die Tötung der Tiere und Blut wurde zur weiteren Untersuchung entnommen. Das Blut wurde anschließend 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Pro Probe wurden 50 µl Serum eingesetzt. Die fluoreszenzspektrometrische Messung erfolgte als Doppelbestimmung bei 485 nm und 535 nm. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Standardreihe für FD-4-Fluoreszenz.

2.3.13 Hemmung von PPAR γ

Versuchstiere, deren Mütter während der Tragzeit mit Pioglitazon gefüttert wurden, wurden vor Hypoxie/Reoxygenierung in zwei Gruppen aufgeteilt. Bei einer Gruppe erfolgte die Hemmung der Pioglitazonwirkung durch T007, die andere Gruppe diente als Kontrollgruppe.

T007 ist ein PPAR γ -Antagonist, der wie folgt gelöst wurde:

2-Chloro-5-nitro-N-(4-pyridyl)benzamide gelöst in DMSO (5 mg/0,667 ml), im Verhältnis 1:5 in Cremophor (BASF, Ludwigshafen, Deutschland) gelöst und anschließend im Verhältnis 1:10 in PBS verdünnt. Davon wurden 100 µl/10 g Körpergewicht eine Stunde vor Hypoxie/ Reoxygenierung intraperitoneal gespritzt.

2.3.14 Caspase-3 Kolorimetrischer Assay

Caspase-3 ist eine intrazellulär vorliegende Cystein-Protease, die als Proenzym vorliegt. Aktiviert wird das Enzym während der Kaskade, die letztendlich zur Apoptose führt. Die Caspase-3 gilt als ein essentielles Enzym zur Vollendung der Apoptose. Ein Test-Kit der Firma R&D Systems, Wiesbaden, ermöglicht die Aktivitätsbestimmung der Caspase-3 anhand einer Farbreaktion.

Prinzip des Verfahrens

Ein Caspase-3-spezifisches Protein, an das p-nitroaniline (pNA) gebunden ist, wird in die zu bestimmende Lösung gebracht. In Abhängigkeit von der Aktivität der Caspase-3 wird unterschiedlich viel pNA abgespalten und damit freigesetzt. pNA

wird anschließend bei einer Wellenlänge von 405 nm im Fluoreszenzphotometer vermessen. Die Aktivität der Caspase-3 ist direkt proportional zur bestimmten Extinktion.

Versuchsablauf

Rattendarm-Proben, die bei -80 °C gefroren worden sind, wurden schonend auf Eis getaut und mit Rooney Puffer versetzt. Die getauten Proben wurden anschließend mit einer Schere zerkleinert, mittels needle-and-pestle Lyse homogenisiert und im Ultraschallgerät jeweils 2-mal mit je 5 Zyklen beschallt. Das entstandene Homogenat wurde 10 min bei 4000 g zentrifugiert und die Überstände nach Bradford vermessen.

Rooney Puffer (plus Proteinaseinhibitoren): pH 7,5

315 mg/100 ml 20mM Tris-HCl Sigma, Taufkirchen, Deutschland

37,22 mg/100 ml 1mM EDTA Sigma, Taufkirchen, Deutschland

38,04 mg/100 ml 1mM EGTA Sigma, Taufkirchen, Deutschland

In einer 96 Well Platte wurden 50 µl Zellysat mit 50 µl 2x *Reaction Buffer 3* der Firma R&D Systems plus 0,5 µl DTT und 5 µl *Colorimetric Substrat* der Firma R&D Systems pipettiert und anschließend für 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

Am *microplate reader* wurde die Konzentration von pNA bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Das Ergebnis wurde auf die zuvor bestimmten Proteinkonzentrationen bezogen.

2.3.15 RNA Extraktion

Zur RNA-Extraktion aus dem Darmgewebe wurde das RNeasy Kit der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurden 20 mg Gewebe in 300 µl Lysepuffer aufgenommen und mit Kanülen absteigender Größe homogenisiert. Nach der Zugabe von 300 µl 70%igen Ethanols wurde die Probe auf eine Säule gegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Dabei kommt es zu einer Adsorption der RNA an eine Membran. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule mit 700 µl RLT-Puffer zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer (mit Ethanol versetzt) gewaschen. Die RNA wurde abschließend in ein steriles Eppendorf-Gefäß mit 40 µl RNase-freiem Wasser für 1 min bei 8000 g eluiert.

Vor der weiteren Verarbeitung der RNA fand ein DNA-Abbau statt, um sicher zu stellen, dass die Probe nicht mit DNA kontaminiert ist. Dazu wurden 10x DNase Buffer zu 1 µl DNase zu 40 µl RNA gegeben und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Zugabe von 5 µl DNase-Inaktivierungsreagenz. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe zentrifugiert, um die Inaktivierungsreagenz und die Probe mit RNA wieder zu trennen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, um anschließend photometrisch die Konzentration der gewonnenen RNA zu ermitteln. Die gewonnene RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.16 cDNA Synthese

Auf Eis wurde 1 µg RNA mit destilliertem H₂O auf 19,2 µl aufgefüllt. Zu diesem Gemisch wurden 29,5 µl Mastermix und 1,3 µl Reverse Transkriptase gegeben. Nach kurzer Zentrifugation erfolgte die Reverse Transkription im Thermocycler.

Programm:

1. Inkubation 25 °C für 10 min
2. RT-Reaktion bei 37 °C für 60 min
3. RT-Inaktivierung 95 °C für 5 min

Abschließend wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gefroren.

Mastermix:

<i>25 mM MgCl₂</i>	<i>11 µl</i>	<i>Ambion. Foster City, USA</i>
<i>dNTPs</i>	<i>10 µl</i>	<i>Ambion. Foster City, USA</i>
<i>10x Buffer</i>	<i>5 µl</i>	<i>Ambion. Foster City, USA</i>
<i>Random Hexamers</i>	<i>2,5 µl</i>	<i>Ambion. Foster City, USA</i>
<i>RNase Inhibitor</i>	<i>1 µl</i>	<i>Ambion. Foster City, USA</i>

2.3.17 Primer Design

Genomsequenzen der jeweiligen mRNA wurden mit Hilfe der Datenbank von EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) ermittelt. Das Primer Design erfolgte anhand der ermittelten Sequenzen unter Berücksichtigung der Annealing-Temperatur, der Länge und des GC-Gehalts mit Primer Express® der Firma Applied Biosystems, Frankfurt. Die Sequenzen wurden abschließend auf ihre Spezifität überprüft

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Die Primer wurden nach den angegebenen Sequenzen durch Metabion, Martinsried, Deutschland, hergestellt.

2.3.18 Primersequenzen

Gen	Forward Primer Reverse Primer (5' - 3')
TFF-3	CCATGGAGACCAGAGCCTTCT TGGAGATAGGCCAACAAATTCC
β-Actin	TCCACCTTCCAGCAGATGTG GCATTTGCGGTGGACGAT
iNOS	GGAGAGATTTTTTACGACACCC CCATGCATAATTTGGACTTGCA

2.3.19 Quantitative Real-time PCR (RT-PCR)

Mit diesem Verfahren (kurz RT-PCR) ist eine quantitative Aussage über die cDNA-Menge und damit ein Rückschluss auf die mRNA-Konzentration des untersuchten Gens in der Probe möglich. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus (daher der Name „Real Time“) durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Durch Zugabe spezifischer Primer wird nur der zu untersuchende Genabschnitt amplifiziert. So kann über die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, um ein bestimmtes Fluoreszenzniveau zu erreichen, auf die vorhandene Menge an cDNA des zu untersuchenden Gens rückgeschlossen werden. Die Anzahl der PCR-Zyklen, um eine bestimmte Fluoreszenz zu erreichen, wird als Threshold Cycle (CT-Wert), aus dem Englischen für Schwellenwert, bezeichnet. Der CT-Wert ist der Wert, an dem innerhalb eines PCR-Laufs die Fluoreszenz erstmalig über den Hintergrundwert ansteigt. Dieser wird für die Versuche festgelegt und beibehalten, wenn mehrere Messungen erfolgen.

Die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf β-Actin als „Housekeeping Gen“ bezogen.

Die Berechnung des Expressionsunterschieds erfolgte über die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. ΔCT errechnet sich aus den CT-Werten für TFF-3 (Zielgen) minus dem CT-Wert für β-Actin (interne Kontrolle). $\Delta\Delta\text{CT}$ ergibt sich aus dem ΔCT der Probe minus dem ΔCT

der Kontrolle. Der Faktor der Expressionsänderung zwischen Probe und Kontrolle ergibt sich aus $2^{-\Delta\Delta CT}$.

PCR-Ansatz in einer 96erWell Platte auf Eis pipettiert

Mastermix Sybr Green 12,5 μ l

Primeransatz

Forward Primer 0,75 μ l

Reverse Primer 0,75 μ l

H₂O 4,5 μ l

cDNA 1 μ l

H₂O 5,5 μ l

2.3.20 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese diente der Sichtbarmachung der PCR-Produkte. Das Prinzip der Elektrophorese ist die Wanderung der DNA-Moleküle entlang eines elektrischen Gradienten in Richtung Anode, da die Nettoladung der DNA aufgrund von Phosphatgruppen negativ ist. Die Geschwindigkeit, mit der die einzelnen DNA-Moleküle wandern, ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichts. Demzufolge kann das Molekulargewicht eines DNA-Moleküls abgeschätzt werden, indem man seine Mobilität mit einem Standard bekannter Größe vergleicht.

Wir verwendeten ein 1 % Agarosegel (Biozym), das Ethidiumbromid (0,04 μ l/ml) als fluoreszierenden Farbstoff enthielt. Ethidiumbromid interkaliert mit doppelsträngigen DNA-Molekülen und lässt sich durch UV-Licht sichtbar machen. Eine Menge von 5 μ l PCR-Produkt und 5 μ l Ladepuffer wurde gemischt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde neben dem PCR-Produkt 3 μ l eines 100 bp-Markers (Invitrogen) aufgetragen. Die Auftrennung fand in einer mit 1xTBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer bei 100 Volt für 40 Minuten statt. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit dem Videodokumentationssystem UV Solo der Firma Biometra als Banden sichtbar gemacht. Für die Dokumentation wurden sie auf Thermopapier ausgedruckt.

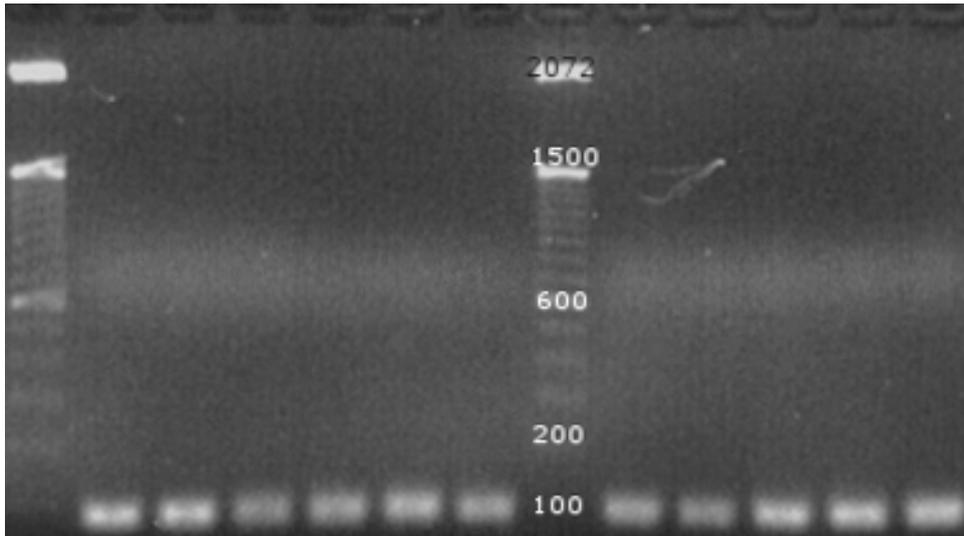


Abbildung 5: Gelelektrophorese von TFF-3 zur Kontrolle der PCR. Das Genprodukt von TFF-3 hat eine Größe von 92bp. Die Banden unterhalb der 100bp-Markierung entsprechen der Größe des TFF-3-Produktes

2.3.21 Statistische Auswertung und Grafiken

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde immer eine Referenzprobe mitgeführt, um die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen korrelieren zu können. Die Werte im Ergebnisteil sind daher in *arbitrary units* angegeben.

Die Ergebnisse wurden als mittlere Standardabweichung errechnet. Parameterfreie statistische Tests wurden mit dem Mann-Whitney-Test mittels Graphpad InStat™ v. 2.05a Software (Graphpad Software) erstellt. Zum Vergleich konsekutiver Ergebnisse wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Dunns Test wurde benutzt, wenn eine signifikante Differenz zwischen verschiedenen Gruppen auftrat. Unterschiede mit $p < 0.05$ wurden als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Darmbarrierestörung

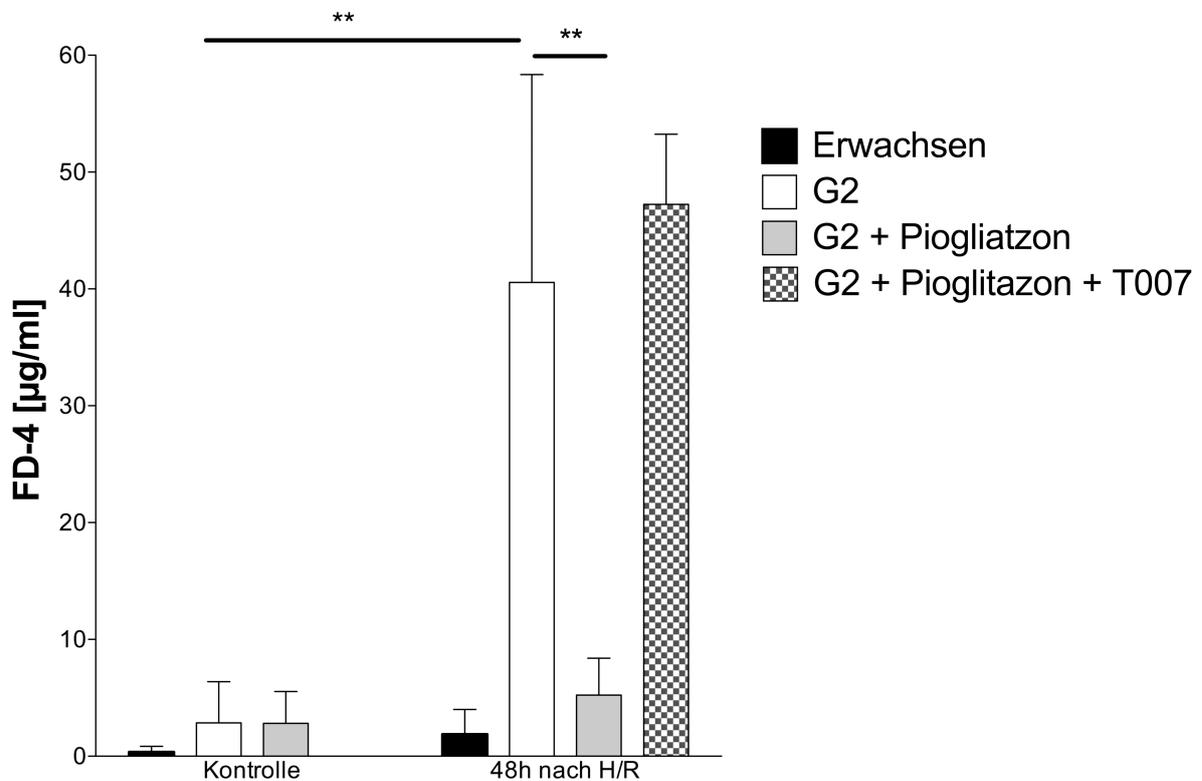


Abbildung 6: Dargestellt werden die gemessenen FD-4-Konzentrationen im Serum als Ausmaß der Barriestörung. G2 steht für Tiere, die 2 Tage nach Entbindung getötet wurden. G2 Kontrolle ohne H/R vs. G2 48h nach H/R: n=23/14, p<0,01. G2 48h nach H/R vs. G2+Pioglitazon 48h nach H/R, n=14/15, p<0,05.

In der Literatur finden sich viele Hinweise, dass PPAR γ -Aktivierung vor Kolitis schützt und zu verminderter Inflammation führt. Inwiefern die Gabe eines PPAR γ -Agonisten vor einer Darmbarrierestörung in einem Hypoxie/Reoxygenierungsmodell schützt, wurde bislang nicht untersucht.

Den Versuchstieren wurde oral FD-4 zugeführt, um im Anschluss dessen Übertritt ins Plasma zu bestimmen. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Tiere in der Kontrollgruppe wurden nicht dem H/R-Versuch unterzogen, während die Tiere der Versuchsgruppe am Tag der Geburt mit H/R-Versuch gestresst und 48 Stunden nach dem Versuch getötet wurden. Zu diesem Zeitpunkt wurde Blut der Tiere gewonnen und anschließend die FD-4-Konzentration bestimmt. Bei erwachsenen Tieren (n=12) zeigt sich 48 Stunden nach dem H/R-Versuch kein signifikanter

Unterschied zu den Kontrolltieren (n=10) hinsichtlich der gemessenen FD-4-Konzentrationen, so dass keine relevante Darmbarrierestörung nachweisbar ist. Bei unreifen Tieren zeigt sich ein signifikanter Anstieg der FD-4-Konzentration in der Versuchsgruppe (Kontrolle G2 n=23, Versuchstiere G2 n=14). Unreife Tiere der Kontrollgruppe weisen auch ohne H/R-Versuch eine höhere Konzentration von FD-4 im Serum auf als reife Tiere. Die These, dass PPAR γ -Aktivierung vor einer Darmbarrierestörung schützt, konnte mit diesem Versuch belegt werden. Versuchstiere, deren Mütter in der Schwangerschaft PPAR γ -Agonisten erhalten hatten, haben einen signifikant geringeren FD-4-Serumspiegel nach H/R als Tiere der Versuchsgruppe, die nicht mit Pioglitazon behandelt wurden (G2+Pioglitazon H/R n=15, G2 H/R-Versuch n=14).

Da Pioglitazon PPAR γ abhängige und unabhängige Wirkungen vermittelt, untersuchten wir, ob die Aktivierung von PPAR γ durch einen spezifischen PPAR γ -Inhibitor -T007 gehemmt werden kann. Der Inhibitor wurde eine Stunde vor H/R verabreicht. Nach Gabe des Inhibitors zeigt sich bei den Versuchstieren eine ähnlich starke Barrierestörung des Darms verglichen mit der Versuchsgruppe, die nicht mit PPAR γ behandelt wurde.

3.2 Die pränatale Gabe von Pioglitazon ist assoziiert mit geringerer Apoptose nach Induktion einer Enterokolitis

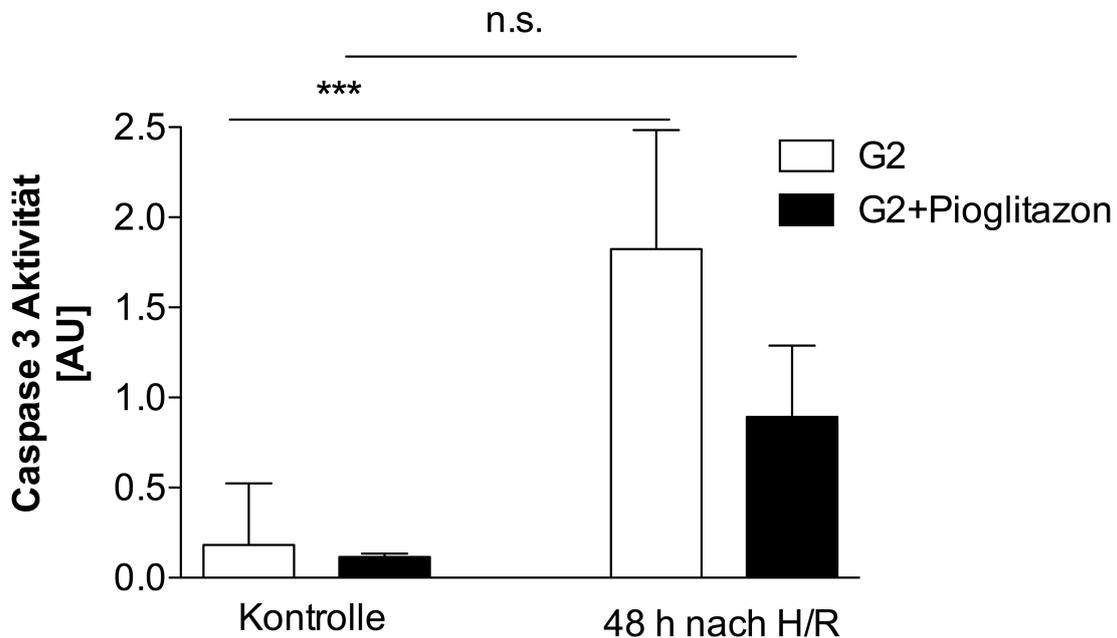


Abbildung 7: Aktivitätsmessung der Caspase-3 im kolorimetrischen Assay. 48 Stunden nach H/R kommt es zur signifikanten Aktivierung der Caspase-3 bei Tieren, die kein PPAR γ -Agonisten erhalten haben. G2 vs. G2 nach H/R, n=9/10 p<0,001. Im schwarzen Balken werden die Tiere dargestellt die mit Pioglitazon behandelt wurden. Der Anstieg der Caspase-3 Aktivität in dieser Gruppe ist nicht signifikant. G2 + Pioglitazon vs. G2 + Pioglitazon 48h nach H/R, n=3/7, p>0,05, n.s. = nicht signifikant.

In dem vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass PPAR γ Aktivierung zu geringerer Barrierestörung unter experimentellen Bedingungen führt. Wir untersuchten in der Folge, inwiefern sich dieser Schutz auf Apoptose auswirkt. Anhand der Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurde das Ausmaß der Aktivierung der Apoptosekaskade ermittelt. 48h nach Hypoxie/Reoxygenierung ist bei unreifen Ratten, die nicht mit Pioglitazon behandelt wurden, eine höhere Aktivität der Caspase-3 im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar: G2 Kontrolle vs. G2 nach H/R, n=9/10 p<0,001.

Die Tiere, deren Mütter mit Pioglitazon behandelt wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Kontrollgruppe gegenüber der Versuchsgruppe: G2 + Pioglitazon vs. G2 + Pioglitazon 48h nach H/R, $n=3/7$, $p>0,05$.

Mit dem Versuch konnte gezeigt werden, dass es 48 Stunden nach dem Versuch zu einer gesteigerten Aktivierung der Caspase-3 kommt als Ausdruck der Aktivierung der Apoptosekaskade. Die gemessene Aktivitätsunterschiede waren für Tiere die kein Pioglitazon erhalten hatten signifikant. Wurde die Tiere mit Pioglitazon behandelt zeigt sich unter gleichen Bedingungen ebenfalls eine gesteigerte Aktivität der Caspase-3. Diese ist allerdings nicht signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.3 Pioglitazon hemmt H/R-vermittelte Expression von iNOS

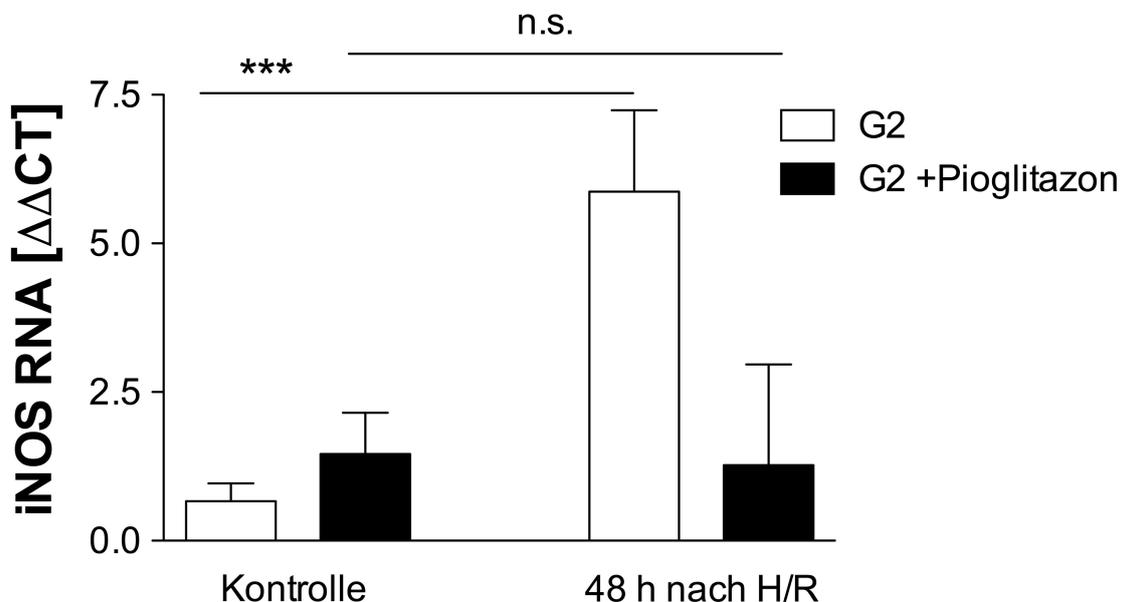


Abbildung 8: Expression von iNOS RNA 48 Stunden nach Hypoxie/Reoxygenierung und Kontrolle (ohne H/R) mit und ohne Pioglitazon. G2 Kontrolle vs. G2 48h nach H/R, $n= 8/8$, $p<0,001$. G2+Pioglitazon vs. G2+Pioglitazon 48h nach H/R, $n= 3/7$, $p>0,05$, n.s.

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Pioglitazon mit verminderter Caspase-3-Aktivierung als Marker der Apoptose assoziiert ist. Wir untersuchten nun, inwieweit eine Assoziation zwischen der Pioglitazongabe und der Expression von iNOS besteht.

48 Stunden nach Induktion einer Barrierestörung erfolgt ein statistisch signifikanter Anstieg der iNOS-RNA-Expression bei neugeborenen Ratten (G2 Kontrolle vs. G2

48h nach H/R, n= 8/8, p<0,001). Eine gesteigerte iNOS-Expression lässt sich in der Pioglitazongruppe nicht nachweisen. (G2 Kontrolle + Pioglitazon vs. G2 48 h nach H/R + Pioglitazon, n=3/7, p>0,05, n.s.). PPAR γ -Aktivierung hemmt demnach die Expression von iNOS im H/R-Enterokolitis-Tiermodell.

3.4 TFF-3 wird in Abhängigkeit vom Gestationsalter exprimiert

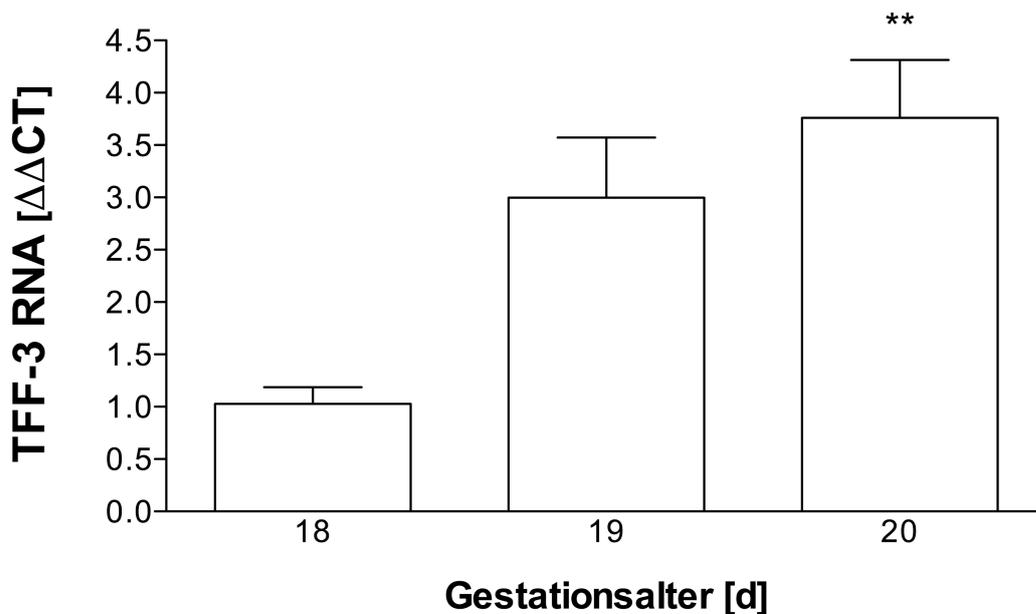


Abbildung 9: Expression von TFF-3-RNA am Tag 18 (n=4), 19 (n=7), und 20 (n=10) der Tragzeit. d18 vs. d20, p=0,004, **=p<0,01.

Die protektive Rolle von TFF-3 nach intestinaler Schädigung wurde bereits in der Einleitung dargestellt. Zunächst wurde die entwicklungsabhängige Expression von TFF-3 bei Ratten an unterschiedlich alten Darmpräparaten untersucht. Schwangere Ratten wurden vorzeitig entbunden, deren Embryos euthanasiert und Darmpräparate gewonnen.

Es zeigt sich eine steigende Expression von TFF-3-RNA im Darm mit steigendem Gestationsalter. Der Nachweis erfolgte mittels RT-PCR. Vier am Tag 18 geborene Kontrolltiere wurden mit zehn am Tag 20 entbunden Tieren hinsichtlich der TFF-3 RNA Expression verglichen.

3.5 Pioglitazon ist assoziiert mit gesteigerter Expression von TFF-3 auf RNA- und Proteinebene

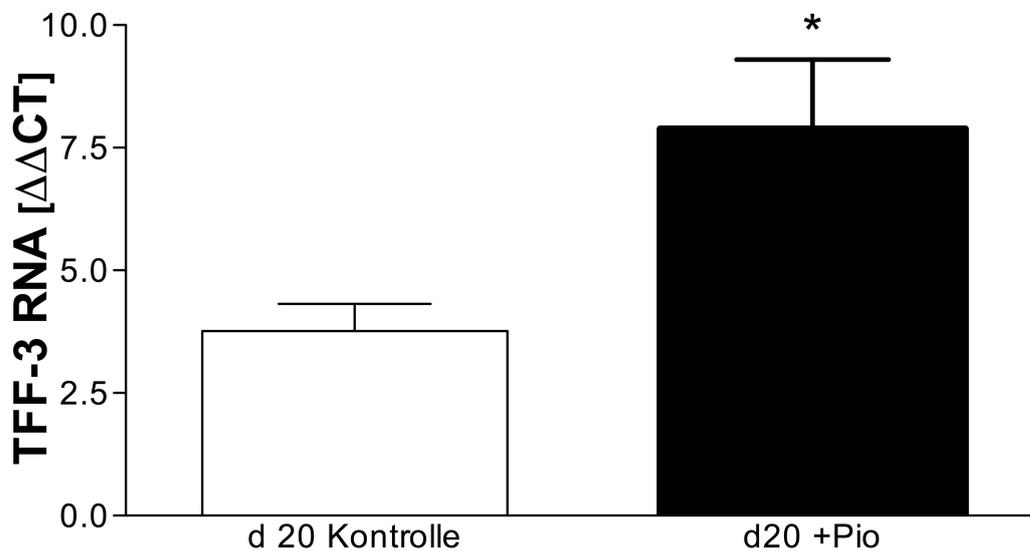


Abbildung 10: RNA-Expression für TFF-3 im Darm am Tag 20 der Tragzeit von Tieren, deren Müttern Pioglitazon ins Futter gemischt wurde (rechts) und Kontrolltieren (links). Kontrolle d20 vs. d20 + Pioglitazon, $n=10/11$, $p=0,0221$, $*=p<0,05$

Es konnte gezeigt werden, dass $\text{PPAR}\gamma$ -Aktivierung bei reif geborenen Tieren zu verminderter Darmbarrierestörung, einhergehend mit geringerer Apoptose, führt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass TFF-3 reifeabhängig gebildet wird. Die protektive Rolle von TFF-3 nach intestinaler Schädigung ist in der Literatur, wie in der Einleitung gezeigt wurde, vielfach belegt. Diese Ergebnisse führten zur Untersuchung, inwieweit $\text{PPAR}\gamma$ -Aktivierung die Expression von TFF-3 beeinflusst. Abbildung 10 zeigt die Expression von TFF-3-RNA am Tag 20 bei Tieren, deren Mütter kein $\text{PPAR}\gamma$ -Agonist in der Schwangerschaft erhielten (d20 Kontrolle), und am Tag 20 entbundenen Tieren, deren Müttern in der Tragzeit Pioglitazon dem Futter beigemischt wurde (d20 + Pio). Es zeigt sich eine vermehrte Expression von TFF-3-RNA in der Pioglitazon-Gruppe. Die Signifikanz wurde durch den Mann-Whitney-Test errechnet. Die gezeigten Ergebnisse erreichen das geforderte Signifikanzniveau.

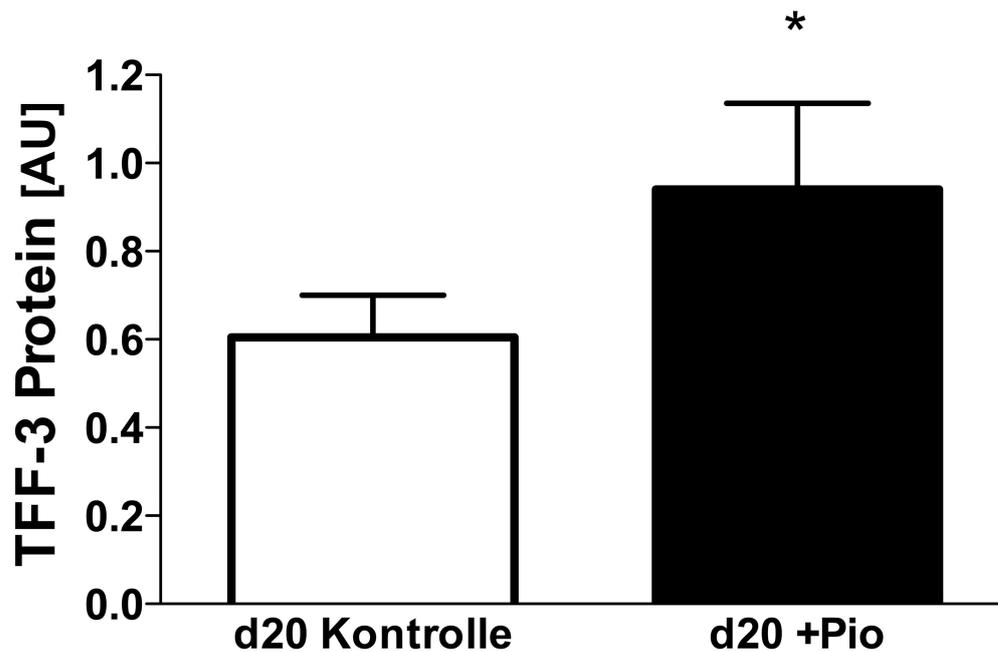


Abbildung 11: Pränatale Proteinexpression von TFF-3 im Darm am Tag 20 der Tragzeit. d20 Kontrolle vs. d20 + Pioglitazon, n=7/5, p=0,0177, *=p<0,05

Um sicher zu stellen, dass die Gabe von Pioglitazon auch zu einer vermehrten Expression des TFF-3-Proteins führt, erfolgte eine Proteinextraktion und, mittels spezifischer Antikörper im Westernblot, ein semiquantitativer Nachweis. Abbildung 11 zeigt die Expression des TFF-3-Proteins analog den Ergebnissen für die TFF-3-RNA am Tag 20 der Tragzeit in Abbildung 10. In beiden Untersuchungen ist der Gehalt von TFF-3 in der Pioglitazongruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe. Abbildung 12 zeigt einen Westernblot von TFF-3.

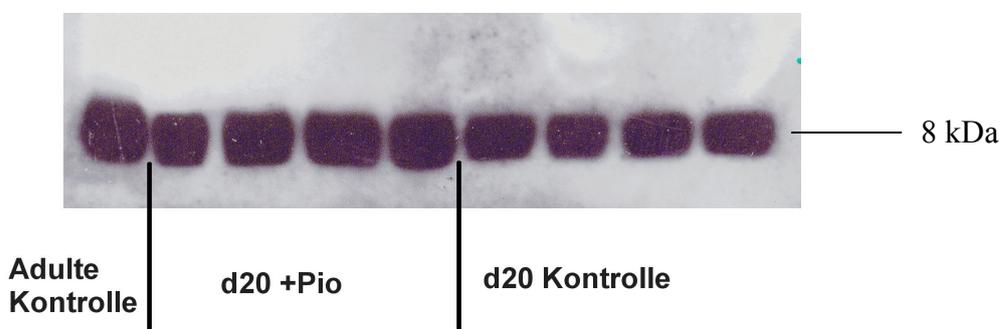


Abbildung 12: Westernblot d20 Kontrolle im Vergleich zu d20+Pioglitazon

3.6 Hypoxie/Reoxygenierung

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PPAR γ -Agonisten die Expression von TFF-3 induzieren. Welche Rolle die pränatale Gabe von Pioglitazon hat, wurde anschließend im Enterokolitismodell nach dem Protokoll von Okur et al. untersucht.

Für die weiteren Versuche wurde die spontane Geburt der Ratten abgewartet. Am Tag 23 der Tragzeit erfolgte die Geburt. Am gleichen Tag wurde eine Enterokolitis mittels Hypoxie/Reoxygenierung (H/R) induziert. Die Versuchstiere wurden in der Folge 2 Tage nach H/R in Ethernarkose getötet.

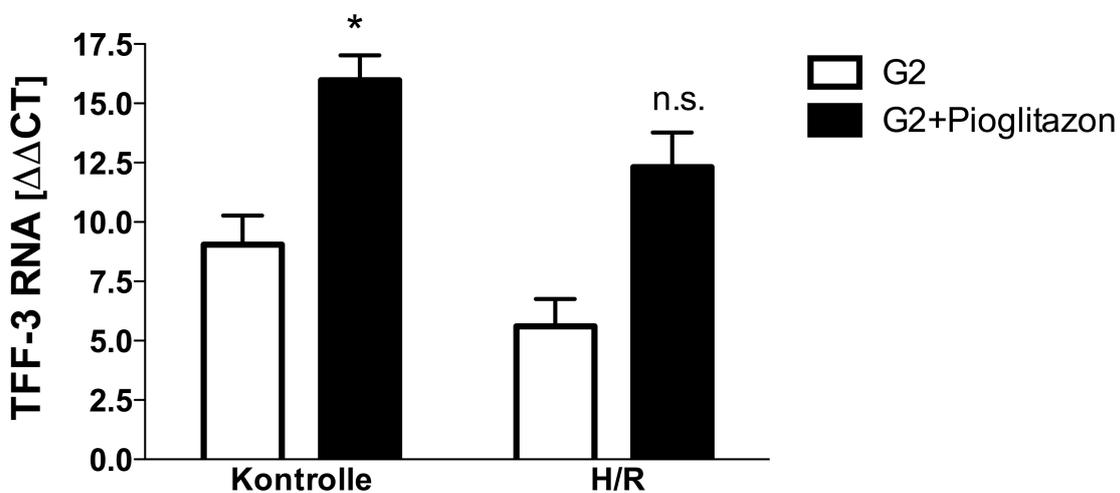


Abbildung 13: Links: Tiere, bei denen keine Enterokolitis induziert wurde; rechts: Tiere, die dem Hypoxie/Reoxygenierungsversuch unterzogen wurden. Gemessen wurde die TFF-3-Expression mittels RT-PCR.

Ohne H/R: G2 Kontrolle vs. G2 Pioglitazon, n=4/4, p= 0,0286, p<0,05. H/R Kontrolle G2 vs. H/R Pioglitazon G2, n=4/4, p=0,0571, p=n.s.

Wie bereits bei den unreifen, am d20 entbundenen Tieren zeigt sich eine vermehrte Expression von TFF-3 bei Tieren, deren Mütter mit PPAR γ -Agonisten gefüttert wurden. Bei den Tieren, die als Kontrolle galten und bei denen keine Enterokolitis induziert wurde (links in der Abbildung 13) ist der Unterschied der TFF-3 Expression statistisch signifikant. In der H/R-Gruppe zeigt sich ein Trend zur vermehrten TFF-3-RNA Expression im Darm der Ratten. Dieser Unterschied erreicht jedoch nicht das geforderte Signifikanzniveau.

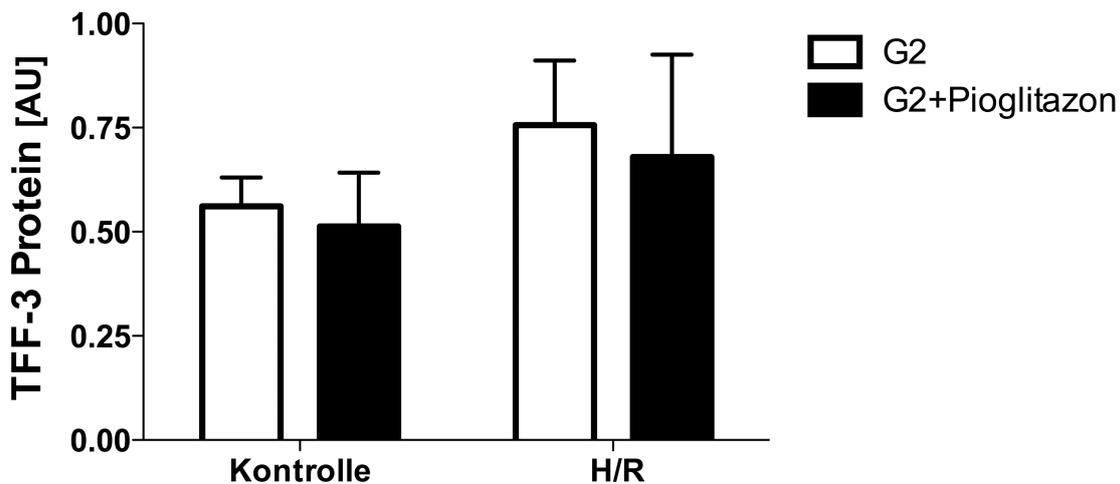


Abbildung 14: Links: Tiere in der Kontrollgruppe ohne Induktion einer Enterokolitis; rechts: Tiere, die dem H/R-Versuch unterzogen wurden. Gruppe ohne H/R: Kontrolle G2 vs. Pioglitazon G2: n=6/8, p=0,58, p=n.s., Gruppe mit H/R Kontrolle G2 vs. Pioglitazon G2: n=6/6 p=0,58, p=n.s.

Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression von TFF-3 zwei Tage nach H/R untersucht. Es finden sich keine Unterschiede hinsichtlich der Expression von TFF-3 am Tag 2 nach der Geburt, unabhängig davon, ob die Muttertiere zuvor mit PPAR γ -Agonisten gefüttert wurden oder Kontrollfutter erhalten hatten. Es zeigt sich ein geringer Trend zu vermehrter Expression von TFF-3 bei Tieren, die dem H/R-Versuch unterzogen wurden.

Der am Tag 20 der Tragzeit (Abbildung 11) gemessene Unterschied in der Proteinexpression von TFF-3 ist am zweiten Tag nach der Geburt nicht mehr nachweisbar. Zusammenfassend sind die Ergebnisse hinsichtlich RNA- und Proteinkonzentration zwei Tage nach der Geburt nicht konform.

3.7 Intraperitoneale Gabe von PPAR γ -Agonisten führt postnatal zu vermehrter TFF-3-Expression

Die zuvor bestimmten Proteinkonzentrationen von TFF-3 zwei Tage nach einer Spontangeburt führten uns zu der Überlegung, dass Pioglitazon möglicherweise nicht in die Muttermilch der Tiere gelangt oder von den neugeborenen Ratten nicht resorbiert wird.

Um die orale Aufnahme zu umgehen, wurde neugeborenen Ratten am sechsten Lebenstag 10 mg/kg KG Ciglitazon intraperitoneal gespritzt.

Am siebten Lebenstag wurden die Tiere getötet und der TFF-3-Gehalt in der RT-PCR sowie die Proteinkonzentration im Westernblot bestimmt. Dabei zeigte sich, dass es 24 Stunden nach Gabe des PPAR γ -Agonisten zu einer Expressionssteigerung auf RNA- sowie Proteinebene von TFF-3 kommt.

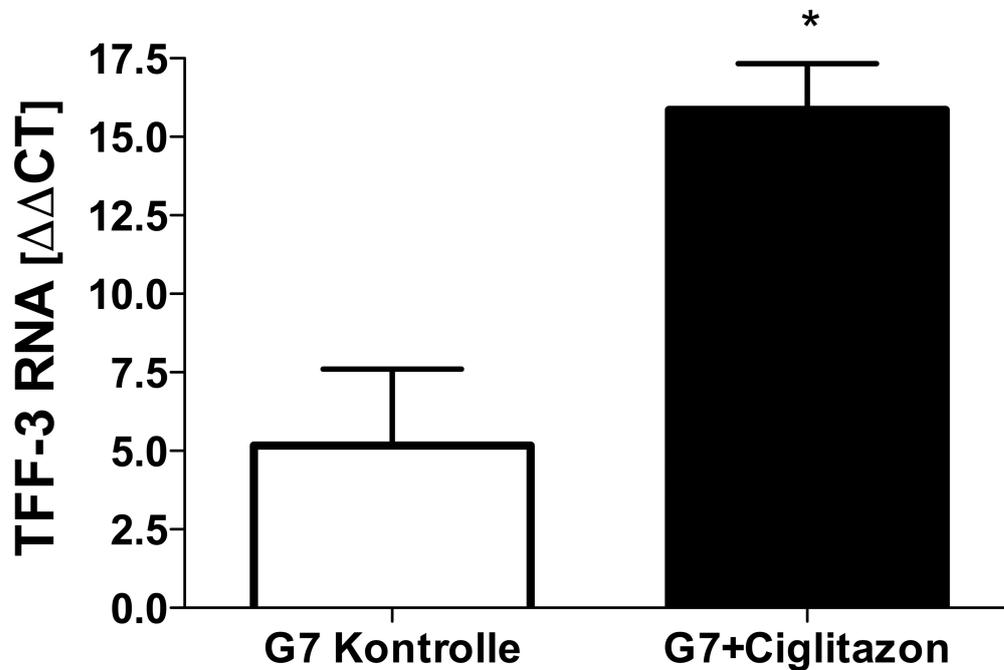


Abbildung 15: TFF-3-RNA-Expression nach intraperitonealer Gabe von PPAR γ -Agonisten. G7 steht für Tiere, die 7 Tage nach Spontangeburt getötet wurden. Kontrolle vs. Ciglitazon n=4/5, p=0,0159,

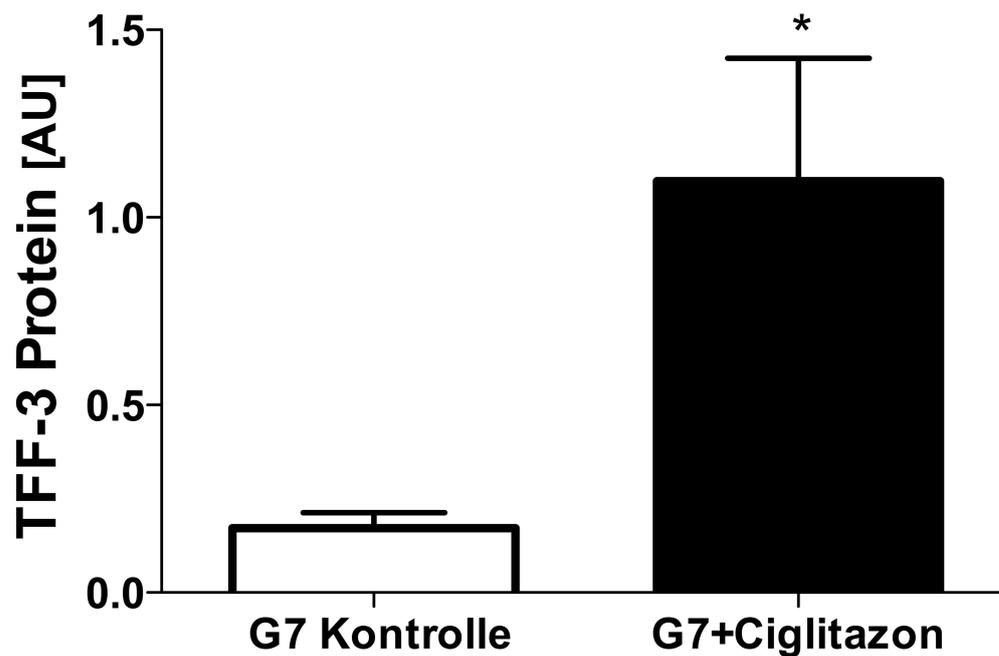


Abbildung 16: TFF-3-Protein-Expression nach intraperitonealer Gabe von PPAR γ -Agonist Ciglitazon. Kontrolle vs. Ciglitazon n=4/5, p=0,0286

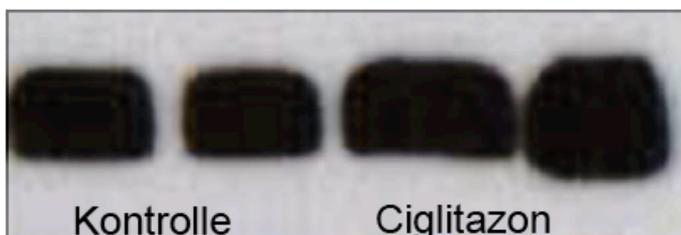


Abbildung 17: Repräsentativer Westernblot G7 Kontrolle vs. Ciglitazon

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die intraperitoneale Gabe eines PPAR γ -Agonisten zu vermehrter Translation und Transkription von TFF-3 führt.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von PPAR γ -Agonisten auf die Integrität der Darmbarriere im Enterokolitismodell bei neugeborenen Ratten zu untersuchen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass es im Enterokolitismodell nach Gabe von PPAR γ -Agonisten zu einer signifikant geringeren Barrierestörung als in der Kontrollgruppe kam. Dass es sich dabei um einen PPAR γ -vermittelten Effekt handelt, konnte anhand der Hemmung von PPAR γ mit T007 gezeigt werden.

Im Caspase-3-Assay wurde eine Assoziation zwischen verminderter Apoptoseaktivierung und der Gabe von PPAR γ -Agonisten im Enterokolitismodell gezeigt. Wird bei Kontrolltieren eine Enterokolitis induziert, so zeigt sich 48 Stunden nach dem Tierversuch eine signifikante Erhöhung der Caspase-3 Aktivität als Ausdruck der Apoptose. Im Vergleich dazu kommt es bei Tieren deren Mütter Pioglitazon in der Schwangerschaft erhalten zwar ebenfalls zur gesteigerten Caspase-3 Aktivität nach Induktion einer Enterokolitis, die Unterschiede zu nicht gestressten Tieren sind jedoch nicht signifikant.

Abschließend untersuchten wir den Zusammenhang zwischen PPAR γ -Aktivierung und iNOS Expression, als Maß der intestinalen Inflammation. In der RNA-Expressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass es im Vergleich zur Kontrollgruppe 48h nach Hypoxie/Reoxygenierung unter der pränatalen Gabe von Thiazolidinedionen zu einer signifikant niedrigeren iNOS-Expression kommt.

Aus welchen molekularen Mechanismen die verbesserte intestinale Integrität und verminderte Apoptose resultiert, war Gegenstand der weiteren Untersuchungen. Zunächst untersuchten wir die Expression von TFF-3 in Abhängigkeit des Gestationsalters. Dabei zeigt sich eine reifeabhängige Expression. Umso früher ein Tier entbunden wurde, desto geringer zeigte sich die Expression von TFF-3. Diese Expressionsanalysen erfolgten mittels RT-PCR.

In der Folge konnte erstmals gezeigt werden, dass durch PPAR γ -Aktivierung die pränatale Expression von TFF-3 steigt. Dies konnte mittels RT PCR und semiquantitativ im Westernblot nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde die Expression von TFF-3 nach der Spontangeburt und im Enterokolitismodell untersucht. Dabei zeigt sich ein Trend zu höheren TFF-3 RNA Expression in der Tiergruppe der Pioglitazon gefüttert wurde. Die gemessenen Unterschiede hinsichtlich der TFF-3 Expression mit und ohne Pioglitazon erreichten jedoch nicht das geforderte Signifikanzniveau. Unterlegt werden die RNA Expressionsanalysen durch die Proteinexpressionsdaten. In diesen zeigt sich kein Unterschied für die Tiere, die mit Pioglitazon behandelt wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Es erfolgte daraufhin die intraperitoneale Gabe von PPAR γ -Agonisten. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die TFF-3 Expression auf RNA und Proteinebene erneut signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ansteigt, wenn die enterale Gabe umgangen wird.

4. Diskussion

Die nekrotisierende Enterokolitis ist in den letzten Jahren durch die verbesserte neonatale Versorgung und die dadurch verbesserte Überlebenschance von Frühgeborenen zum häufigsten gastrointestinalen Notfall auf neonatologischen Intensivstationen geworden. Die Erkrankung geht nach wie vor mit einer hohen Mortalität und Morbidität einher. Bislang ist die Ursache der NEC nur unvollständig verstanden. Neben äußeren Risikofaktoren wie Frühgeburtlichkeit, niedriges Geburtsgewicht und Formula-Ernährung scheint die Unreife des Darms die wichtigste, wenngleich am wenigsten verstandene Ursache zu sein.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde der Einfluss der PPAR γ -Aktivierung auf den Darmbarriereverlust im Enterokolitismodell der neugeborenen Ratte untersucht. Darüber hinaus wurden molekulare Mechanismen, die mit der PPAR γ -Aktivierung in Zusammenhang stehen, untersucht.

Diese Arbeit soll zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der NEC beitragen.

4.1 Induktion einer NEC im Tiermodell

Das H/R-Modell der neugeborenen Ratte wird von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Untersuchung der Pathogenese der NEC verwendet [87-89]. Zur Induktion einer nekrotisierenden Enterokolitis sind in der Literatur verschiedene Tiermodelle beschrieben. Wir verwendeten das von Okur et al. publizierte Modell. Ratten gehören zu den „Nesthockern“, werden nach einer kurzen Gestationszeit (23 Tage) blind und taub geboren, können ihre Körpertemperatur noch nicht selbst regulieren und sind ohne die Mutter nicht zur Defäkation fähig. In der postnatalen Zeit erfolgen bei der neugeborenen Ratte noch erhebliche Reifungsschritte, die die Nahrungsaufnahme, die gastrointestinale Funktion, Lebermetabolismus, Gehirnstruktur und -funktion betreffen [90]. Deshalb scheint dieses Modell für funktionelle Untersuchungen am unreifen Darm besonders geeignet.

Die Kombination von Hyperkapnie und darauf folgender Hyperoxie in der Reoxygenierungsperiode ist typisch für die klinische Situation der an NEC erkrankten Kinder. Der Gewebeschaden resultiert aus der Periode der Azidose mit reduzierter intestinaler Perfusion, gefolgt von der Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale, der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, dem proinflammatorischen

Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interleukin-1 β . So spielt Hypoxie gefolgt von Reoxygenierung (H/R) eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Darmbarrierestörung [18, 91-93].

Der Gastrointestinaltrakt von Ratten ist während der ersten beiden Lebenswochen funktionell unreif. Die Fähigkeit, Nahrung zu verdauen, nimmt erst mit der dritten Lebenswoche zu und gilt am Ende der vierten Lebenswoche als abgeschlossen. Wir haben uns daher bewusst für das einzige publizierte Modell entschieden, bei dem die Tiere analog zur Situation der Frühgeborenen mit Muttermilch gestillt werden und bis auf die kurze Phase des H/R-Versuchs bei der Mutter verbleiben. Andere Faktoren wie der Entzug von Muttermilch, längere Phasen von Kälte, Bakterien, Stress oder Trennung von der Mutter, wie sie in anderen Modellen vorkommen, scheiden weitgehend aus. Das von uns verwendete Modell bleibt nahe an der klinischen Situation von Frühgeborenen und stellt unserer Meinung nach das beste Modell zur Untersuchung der Stressantwort im unreifen Darm dar.

4.2 PPAR γ

Die Auswirkungen von PPAR γ -Agonisten sind vielfältig. Über die regulierende Wirkung im Glucose- und Fettstoffwechsel hinaus wurde für die Substanzen unlängst ein entzündungshemmender Effekt nachgewiesen. Ein Gewebedefekt führt zur Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B, AP-1, NFAT und STAT-3. Diese Aktivierung bewirkt wiederum die Bildung von pro-inflammatorisch wirksamen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die gemeinsam eine Entzündungsreaktion hervorrufen [59].

Die bekannten entzündungshemmenden Eigenschaften von PPAR γ -Agonisten ließen vermuten, dass eine Aktivierung des PPAR γ -Rezeptors zu einer geringeren intestinalen Schädigung im Neugeborenen-Enterokolitismodell führen könnte.

In den Tierversuchen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, beobachteten wir bei Neugeborenen, deren Mütter in der Schwangerschaft mit Pioglitazon behandelt wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere intestinale Schädigung, gemessen als Verlust der Barrierefunktion. Dass es sich dabei um einen PPAR γ -abhängigen Effekt des Pioglitazons handelt, wurde durch die Hemmung von PPAR γ belegt. Das Ausmaß der intestinalen Schädigung wurde im

FITC-Dextran-Assay bestimmt. Um die Ergebnisse zu untermauern, bestimmten wir das Ausmaß der Apoptoseaktivierung. Die Apoptosekaskade hat eine gemeinsame Endstrecke, nämlich die Aktivierung der Caspase-3. Eine Aktivierung der Caspase-3 geht einher mit stetiger Apoptose. In den von uns durchgeführten Untersuchungen zeigte sich bei den Tieren, die mit PPAR γ -Agonisten behandelt wurden, eine verminderte Caspase-3-Aktivierung 48 Stunden nach Hypoxie/Reoxygenierung.

Weiterhin sahen wir bei Tieren, deren Mütter während der Tragzeit PPAR γ -Agonisten erhielten, eine signifikant geringere Expression von iNOS-RNA bei H/R-gestressten Tieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir durch die PPAR γ -Aktivierung eine verminderte Barrierestörung, eine verminderte Apoptoseaktivierung und eine verminderte Expression von proinflammatorischen iNOS nachweisen konnten.

4.3 TFF-3

In der Vergangenheit konnte von verschiedenen Autoren bereits der protektive Effekt von Trefoil-Faktoren nachgewiesen werden. Funktionell kommt den Trefoil-Faktoren, und dabei insbesondere dem TFF-3, die Restitution nach Läsionen der Mukosa zu. TFF-3 hat demnach eine schützende Funktion für das Epithel. Fehlender oder verminderter Schutz vor Apoptose resultiert in Zelltod und konsekutiver Entzündungsreaktion, um das tote Gewebe zu beseitigen. Ein Mangel an TFF-3 könnte demnach zu einem Erkrankungsbild wie dem der nekrotisierenden Enterokolitis führen.

Wir zeigten eine reifeabhängige Expression von TFF-3 im Darm frühgeborener Ratten. Dabei ist eine steigende Expression von TFF-3 mit steigendem Gestationsalter zwischen Tag 18 und Tag 20 nachweisbar. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den von Lin et al. gezeigten Untersuchungen. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass das TFF-3-Protein erstmals am Tag 20 der Gestationsperiode mittels Westernblot nachweisbar ist. Am Tag 17 besteht eine nur schwache Expression der mRNA für TFF-3, jedoch noch keine nachweisbare Proteinsynthese. Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass ab Tag 18 der Gestationsperiode das TFF-3-Protein im Rattendarm nachweisbar ist.

Bislang ist keine medikamentöse Therapie bekannt, die zur Expressionssteigerung von TFF-3 führt. Wir konnten in dieser Arbeit erstmals zeigen, dass die Gabe des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon in der Schwangerschaft zu einer vermehrten Transkription und Translation von TFF-3 in ungeborenen führt.

Diejenigen Versuchstiere, deren Mütter in der Schwangerschaft mit PPAR γ -Agonisten gefüttert wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe, deren Mütter Futter ohne PPAR γ -Agonisten erhalten hatten, signifikant höhere RNA- und Proteinkonzentrationen von TFF-3 auf. Dieser Unterschied war besonders deutlich bei Tieren, die vor dem regulären Geburtstermin entbunden wurden.

Bei Tieren, die 2 Tage nach Spontangeburt auf TFF-3-Expression im Darm untersucht wurden, konnte der zuvor bei Frühgeborenen beobachtete Unterschied nicht mehr festgestellt werden. Auf RNA-Ebene ist zwar noch ein Trend zur höheren TFF-3-Expression, auf der Proteinebene ist allerdings kein Unterschied mehr nachweisbar.

Inwieweit PPAR γ -Agonisten in die Muttermilch sezerniert werden und im unreifen Gastrointestinaltrakt der neugeborenen Ratte resorbiert werden, ist unklar. Die Umstellung der Ernährung, die nach der Geburt über die Muttermilch erfolgt, ist ein möglicher Erklärungsansatz für den nicht mehr nachweisbaren Effekt von Pioglitazon auf die TFF-3 Expression. Darüber hinaus ist nicht belegt, ob PPAR γ -Agonisten gleich hohe Plasmaspiegel wie auf intrauterinem Wege erreichen, wenn die Aufnahme per os über die Muttermilch der Ratte erfolgt. Wir untersuchten daraufhin, inwieweit TFF-3 durch intraperitoneale Gabe von PPAR γ -Agonisten nach der Geburt induzierbar ist. Sieben Tage nach der Geburt kommt es nach intraperitonealer Gabe von PPAR γ -Agonisten zu einer signifikant höheren Expression von TFF-3-Protein und -RNA analog den Ergebnissen bei frühgeborenen Ratten am Tag 20.

4.4. NF κ B als ein möglicher Link zwischen PPAR γ und TFF-3

Gegenwärtig ist die Regulation von TFF-3 lediglich in Grundzügen geklärt. Bei Hypoxie wird vermehrt HIF-1 gebildet, was zu einer vermehrten Bildung von TFF-3 führt [70]. Darüber hinaus sind bislang keine weiteren expressionssteigernden Faktoren bekannt. Es konnten eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die zur Hemmung von TFF-3 führen. Dazu zählen IL-6, IL-1 β , NF κ B und C/EBP β [69]. NF κ B hat eine hemmende Wirkung von auf die Bildung von TNF α , der einen hemmenden Einfluss auf die Expression von TFF-3 hat [94].

In der vorliegenden Arbeit führte Pioglitazon zu einer Expressionssteigerung von TFF-3. Pioglitazon führt zu einer Aktivierung von PPAR γ und dadurch hypothetisch zur verminderten Bildung von NF κ B. NF κ B hemmt die Bildung von TFF-3. Denkbar wäre demnach eine Hemmung von NF κ B, die zu einer vermehrten Bildung von TFF-3 führt. Ob es sich dabei um eine direkte Wirkung von NF κ B handelt oder um eine Wirkung vermindert gebildeter Zytokine wie IL-6, IL-1 β , oder TNF α , die der Regulation von NF κ B unterliegen bleibt unklar.

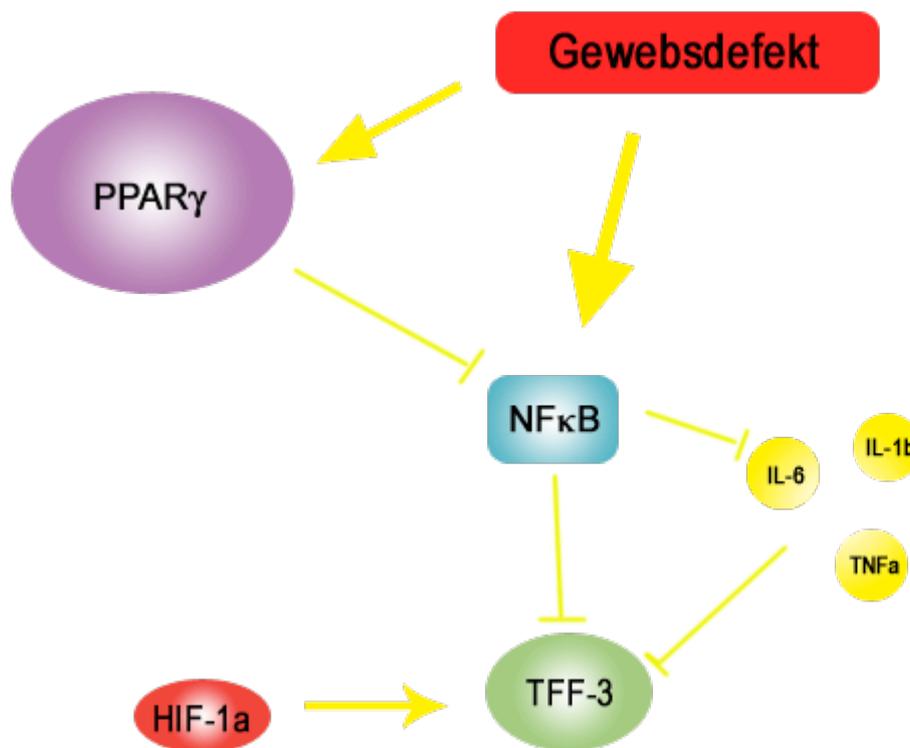


Abbildung 18: Schematische Darstellung der möglichen Regulation von TFF-3. Erläuterungen im Text.

Eine weitere mögliche Regulation könnte durch die Induktion der Transkription von TFF-3 durch einen PPAR γ -Agonisten erfolgen. Inwieweit ein PPAR γ -Response-Element in dem transkriptionsregulierenden Abschnitt von TFF-3 zu finden ist, bleibt gegenwärtig ebenfalls unklar.

4.5 Können Glitazone in der Schwangerschaft oder bei frühgeborenen Kindern eingesetzt werden?

Pioglitazon ist in Deutschland ausschließlich zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 bei Erwachsenen zugelassen. Insulinresistenz ist als grundlegende Störung des Typ-2-Diabetes häufig bereits Jahre vor der Manifestation der Erkrankung nachweisbar. Aus pathophysiologischer Sicht scheint daher eine frühe Behandlung mit einem Insulinsensitizer sinnvoll, um der Entwicklung diabetischer Folgeschäden vorzubeugen. Die Wirksamkeit und Sicherheit einer Monotherapie mit Pioglitazon wurde in mehreren klinischen Studien bei Typ-2-Diabetikern untersucht. Dabei senkte Pioglitazon signifikant die Werte für Nüchternblutglukose und HbA1c. Zusätzlich wurde das Lipidprofil verbessert.

Kontraindikationen für den Einsatz von Pioglitazon ergeben sich aus den möglichen Nebenwirkungen der Substanz. Diese umfassen eine bestehende Herzinsuffizienz NYHA I-IV, eine eingeschränkte Leberfunktion und eine diabetische Ketoazidose.

Bislang liegen keine Erfahrungen über die Anwendung von Insulinsensitizern bei Schwangeren vor. Im Tierversuch war Pioglitazon nicht teratogen, selbst bei hohen oralen Dosen (ca. das 17- bzw. 40-fache der für Menschen empfohlenen maximalen oralen Dosis bezogen auf mg/m^2). Allerdings wurde bei Ratten-Föten unter oralen Dosen von 40 $\text{mg}/\text{kg}/\text{Tag}$ und darüber (ca. das 10-fache der für Menschen empfohlenen maximalen oralen Dosis bezogen auf mg/m^2) ein verzögertes Wachstum beobachtet. Dieses war darauf zurückzuführen, dass Pioglitazon die in der Gestation entstehende Hyperinsulinämie und erhöhte Insulinresistenz des Muttertieres vermindert und dadurch die Verfügbarkeit der metabolischen Substrate für das fötale Wachstum verringert. Die Bedeutung dieses Mechanismus für den Menschen ist unklar. (Zitat: <http://www.takeda.de>)

Es ist nicht bekannt, ob Glitazone bei Menschen in die Muttermilch sezerniert werden. Es sollte deshalb laut Hersteller nicht während der Schwangerschaft oder Stillzeit eingenommen werden. Ein klinischer Einsatz bei Schwangeren oder frühgeborenen Kindern ist daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht gerechtfertigt.

4.6 Fazit

Unsere Daten leisten aus unserer Sicht einen weiteren Beitrag zur Klärung der Pathophysiologie der NEC. Das Ziel zukünftiger Forschungsprojekte sollte ein weiteres Verständnis der molekularen Prozesse, die bei der Krankheitsentstehung

eine Rolle spielen, sein, um letztendlich dem Kliniker eine Prophylaxe an die Hand zu geben.

5. Zusammenfassung

Die nekrotisierende Enterokolitis ist einer der häufigsten gastrointestinalen Notfälle auf neonatologischen Intensivstationen. Unreife ist der wesentliche Risikofaktor für die Entwicklung einer NEC. Für PPAR γ -Agonisten (Glitazone) konnte bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine entzündungshemmende Wirkung gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Glitazone die H/R-induzierte Darmbarrierestörung im Enterokolitismodell der neugeborenen Ratte vermindert. Insbesondere untersuchten wir die Rolle von TFF-3, einem Peptid, das sich in verschiedenen Modellen als protektiv erwiesen hat.

Schwangere Ratten erhielten während der Tragzeit p.o. Glitazone. Die so behandelten Feten wurden reif oder vorzeitig geboren und dienten als Versuchstiere. Wir verwendeten ein Tiermodell, in dem die Schädigung des Darms durch Hyperkapnie/Reoxygenierung (H/R) hervorgerufen wird. Die intestinale Barrierestörung wurde mittels FITC-Dextran Assay, die Entzündungsantwort als iNOS-Expression und die Apoptose als Caspase 3-Aktivierung gemessen.

Wir konnten zeigen, dass Glitazone die H/R-induzierte intestinale Barrierestörung, Entzündungsantwort und Apoptose signifikant vermindern. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Glitazone die fetale, und nach intraperitonealer Gabe auch die neonatale Expression des protektiv wirksamen TFF-3 steigern. Möglicherweise vermittelt die gesteigerte TFF-3-Expression den von uns beobachteten protektiven Effekt der Glitazone im H/R-Tiermodell.

Die Arbeit trägt zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der NEC bei. Erstmals wurde gezeigt, dass Glitazone die Expression von TFF-3 induzieren. Ob sie darüberhinaus zur Prävention der NEC eingesetzt werden können, bleibt offen.

6. Literaturverzeichnis

1. Llanos, A.R., M.E. Moss, M.C. Pinzon, T. Dye, R.A. Sinkin and J.W. Kendig, Epidemiology of neonatal necrotising enterocolitis: a population-based study, in *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2002. p. 342-9.
2. de Gamarra, E., P. Helardot, G. Moriette, I. Murat and J.P. Relier, Necrotizing enterocolitis in full-term newborns. *Biol Neonate*, 1983. 44(3): p. 185-92.
3. Kliegman, R.M. and A.A. Fanaroff, Neonatal necrotizing enterocolitis: a nine-year experience. *Am J Dis Child*, 1981. 135(7): p. 603-7.
4. Hoy, C.M., C.M. Wood, P.M. Hawkey and J.W. Puntis, Duodenal microflora in very-low-birth-weight neonates and relation to necrotizing enterocolitis. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(12): p. 4539-47.
5. Powell, J., M.A. Bureau, C. Pare, M.L. Gaidry, D. Cabana and H. Patriquin, Necrotizing enterocolitis. Epidemic following an outbreak of *Enterobacter cloacae* type 3305573 in a neonatal intensive care unit. *Am J Dis Child*, 1980. 134(12): p. 1152-4.
6. Boccia, D., I. Stolfi, S. Lana and M.L. Moro, Nosocomial necrotising enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures. *Eur J Pediatr*, 2001. 160(6): p. 385-91.
7. Kamitsuka, M.D., M.K. Horton and M.A. Williams, The incidence of necrotizing enterocolitis after introducing standardized feeding schedules for infants between 1250 and 2500 grams and less than 35 weeks of gestation. *Pediatrics*, 2000. 105(2): p. 379-84.
8. Holman, R.C., J.K. Stehr-Green and M.T. Zelasky, Necrotizing enterocolitis mortality in the United States, 1979-85. *Am J Public Health*, 1989. 79(8): p. 987-9.
9. Polin, R.A., P.F. Pollack, B. Barlow, H.J. Wigger, T.L. Slovis, T.V. Santulli and W.C. Heird, Necrotizing enterocolitis in term infants. *J Pediatr*, 1976. 89(3): p. 460-2.
10. Guillet, R., B.J. Stoll, C.M. Cotten, M. Gantz, S. McDonald, W.K. Poole and D.L. Phelps, Association of H2-blocker therapy and higher incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*, 2006. 117(2): p. e137-42.
11. Frisch, H., J.P. Guggenbichler and G. Menardi, [Neonatal necrotizing enterocolitis]. *Monatsschr Kinderheilkd*, 1979. 127(11): p. 675-81.
12. Kanto, W.P., Jr., R. Wilson, G.L. Breart, S. Zierler, D.M. Purohit, G.J. Peckham and R.C. Ellison, Perinatal events and necrotizing enterocolitis in premature infants. *Am J Dis Child*, 1987. 141(2): p. 167-9.
13. Powell, R.W., D.L. Dyess, A. Luterman, N.P. Simon and M.L. Ramenofsky, Necrotizing enterocolitis in multiple-birth infants. *J Pediatr Surg*, 1990. 25(3): p. 319-21.
14. Santulli, T.V., J.N. Schullinger, W.C. Heird, R.D. Gongaware, J. Wigger, B. Barlow, W.A. Blanc and W.E. Berdon, Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. *Pediatrics*, 1975. 55(3): p. 376-87.
15. Barlow, B., T.V. Santulli, W.C. Heird, J. Pitt, W.A. Blanc and J.N. Schullinger, An experimental study of acute neonatal enterocolitis--the importance of breast milk. *J Pediatr Surg*, 1974. 9(5): p. 587-95.

16. Reber, K.M., C.A. Nankervis and P.T. Nowicki, Newborn intestinal circulation. Physiology and pathophysiology. Clin Perinatol, 2002. 29(1): p. 23-39.
17. Schnabl, K.L., J.E. Van Aerde, A.B. Thomson and M.T. Clandinin, Necrotizing enterocolitis: a multifactorial disease with no cure. World J Gastroenterol, 2008. 14(14): p. 2142-61.
18. Barlow, B. and T.V. Santulli, Importance of multiple episodes of hypoxia or cold stress on the development of enterocolitis in an animal model. Surgery, 1975. 77(5): p. 687-90.
19. Bell, M.J., R.D. Feigin, J.L. Ternberg and T. Brotherton, Evaluation of gastrointestinal microflora in necrotizing enterocolitis. J Pediatr, 1978. 92(4): p. 589-92.
20. Mshvildadze, M., J. Neu and V. Mai, Intestinal microbiota development in the premature neonate: establishment of a lasting commensal relationship? Nutr Rev, 2008. 66(11): p. 658-63.
21. Kleinhaus, S., G. Weinberg and M.B. Gregor, Necrotizing enterocolitis in infancy. Surg Clin North Am, 1992. 72(1): p. 261-76.
22. Bury, R.G. and D. Tudehope, Enteral antibiotics for preventing necrotizing enterocolitis in low birthweight or preterm infants. Cochrane Database Syst Rev, 2001(1): p. CD000405.
23. Caplan, M.S., M. Amer and T. Jilling, The role of human milk in necrotizing enterocolitis. Adv Exp Med Biol, 2002. 503: p. 83-90.
24. Tlaskalova-Hogenova, H., R. Stepankova, T. Hudcovic, L. Tuckova, B. Cukrowska, R. Lodinova-Zadnikova, H. Kozakova, P. Rossmann, J. Bartova, D. Sokol, D.P. Funda, D. Borovska, Z. Rehakova, J. Sinkora, J. Hofman, P. Drastich and A. Kokesova, Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. Immunol Lett, 2004. 93(2-3): p. 97-108.
25. Boyd, C.A., M.A. Quigley and P. Brocklehurst, Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: systematic review and meta-analysis. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2007. 92(3): p. F169-75.
26. Horton, K.K., Pathophysiology and current management of necrotizing enterocolitis. Neonatal Netw, 2005. 24(1): p. 37-46.
27. Guthmann, F., Rüdiger, M., Prävention der nekrotisierenden Enterokolitis, in Evidenz-basierte Pädiatrie. 2003, Bassler, Forster, Antes. p. 1-17.
28. Donovan, S., Role of human milk components in gastrointestinal development: Current knowledge and future needs. J Pediatr, 2006.
29. Sisk, P.M., C.A. Lovelady, R.G. Dillard, K.J. Gruber and T.M. O'Shea, Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. J Perinatol, 2007. 27(7): p. 428-33.
30. Feng, J., O.N. El-Assal and G.E. Besner, Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) and necrotizing enterocolitis. Semin Pediatr Surg, 2005. 14(3): p. 167-74.
31. Böcker, D., Heitz, Pathologie. Vol. 2. Auflage. 2000: Urban & Fischer. 896-897.
32. Gordon, P.V., J.R. Swanson, J.T. Attridge and R. Clark, Emerging trends in acquired neonatal intestinal disease: is it time to abandon Bell's criteria? J Perinatol, 2007. 27(11): p. 661-71.
33. Kanto, W.P., Jr., J.E. Hunter and B.J. Stoll, Recognition and medical management of necrotizing enterocolitis. Clin Perinatol, 1994. 21(2): p. 335-46.

34. Pohlandt, F., [Prevention and treatment of necrotizing enterocolitis in the newborn infant from the pediatric point of view]. *Z Kinderchir*, 1990. 45(5): p. 267-72.
35. Bell, M.J., J.L. Ternberg, R.D. Feigin, J.P. Keating, R. Marshall, L. Barton and T. Brotherton, Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging. *Ann Surg*, 1978. 187(1): p. 1-7.
36. Kliegman, R.M. and A.A. Fanaroff, Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med*, 1984. 310(17): p. 1093-103.
37. Walsh, M.C. and R.M. Kliegman, Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am*, 1986. 33(1): p. 179-201.
38. Koletzko, B., C.P. Speer and U. Wahn, *Kinderheilkunde und Jugendmedizin*. Vol. 12. Auflage. 2004. 91-92, 77.
39. Obladen, M., *Neugeborenenintensivmedizin: Evidenz und Erfahrung*. Vol. 7. Auflage. 2006, Heidelberg: Springer.
40. Stoll, B.J., Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol*, 1994. 21(2): p. 205-18.
41. Coit, A.K., Necrotizing enterocolitis. *J Perinat Neonatal Nurs*, 1999. 12(4): p. 53-66; quiz 88-9.
42. Butter, A., H. Flageole and J.M. Laberge, The changing face of surgical indications for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*, 2002. 37(3): p. 496-9.
43. Ricketts, R.R., Surgical treatment of necrotizing enterocolitis and the short bowel syndrome. *Clin Perinatol*, 1994. 21(2): p. 365-87.
44. Bell, E.F. and M.J. Acarregui, Restricted versus liberal water intake for preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008(1): p. CD000503.
45. Foster, J. and M. Cole, Oral immunoglobulin for preventing necrotizing enterocolitis in preterm and low birth-weight neonates. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004(1): p. CD001816.
46. Shah, P. and V. Shah, Arginine supplementation for prevention of necrotising enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(3): p. CD004339.
47. Carrion, V. and E.A. Egan, Prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1990. 11(3): p. 317-23.
48. Clark, J.A., S.M. Doelle, M.D. Halpern, T.A. Saunders, H. Holubec, K. Dvorak, S.A. Boitano and B. Dvorak, Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. 291(5): p. G938-49.
49. Ledbetter, D.J. and S.E. Juul, Erythropoietin and the incidence of necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *J Pediatr Surg*, 2000. 35(2): p. 178-81; discussion 182.
50. Deshpande, G., S. Rao, S. Patole and M. Bulsara, Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics*. 125(5): p. 921-30.
51. Guthmann, F., C. Kluthe and C. Bühner, Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis: an updated meta-analysis. *Klin Padiatr*. 222(5): p. 284-90.
52. Deshpande, G., S. Rao and S. Patole, Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet*, 2007. 369(9573): p. 1614-20.
53. Brown, E.G. and A.Y. Sweet, Preventing necrotizing enterocolitis in neonates. *JAMA*, 1978. 240(22): p. 2452-4.

54. Patole, S.K. and N. de Klerk, Impact of standardised feeding regimens on incidence of neonatal necrotising enterocolitis: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2005. 90(2): p. F147-51.
55. Israel, E.J., E.J. Schiffrin, E.A. Carter, E. Freiberg and W.A. Walker, Prevention of necrotizing enterocolitis in the rat with prenatal cortisone. *Gastroenterology*, 1990. 99(5): p. 1333-8.
56. Bauer, C.R., J.C. Morrison, W.K. Poole, S.B. Korones, J.J. Boehm, H. Rigatto and R.D. Zachman, A decreased incidence of necrotizing enterocolitis after prenatal glucocorticoid therapy. *Pediatrics*, 1984. 73(5): p. 682-8.
57. Crowley, P., I. Chalmers and M.J. Keirse, The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol*, 1990. 97(1): p. 11-25.
58. Jozkowicz, A., A. Nigisch, J. Wegrzyn, G. Weigel, I. Huk and J. Dulak, Opposite effects of prostaglandin-J2 on VEGF in normoxia and hypoxia: role of HIF-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 314(1): p. 31-8.
59. Abdelrahman, M., A. Sivarajah and C. Thiemermann, Beneficial effects of PPAR-gamma ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock. *Cardiovasc Res*, 2005. 65(4): p. 772-81.
60. Su, C.G., X. Wen, S.T. Bailey, W. Jiang, S.M. Rangwala, S.A. Keilbaugh, A. Flanigan, S. Murthy, M.A. Lazar and G.D. Wu, A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest*, 1999. 104(4): p. 383-9.
61. Imamoto, E., N. Yoshida, K. Uchiyama, M. Kuroda, S. Kokura, H. Ichikawa, Y. Naito, T. Tanigawa and T. Yoshikawa, Inhibitory effect of pioglitazone on expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. *Biofactors*, 2004. 20(1): p. 37-47.
62. Adachi, M., R. Kurotani, K. Morimura, Y. Shah, M. Sanford, B.B. Madison, D.L. Gumucio, H.E. Marin, J.M. Peters, H.A. Young and F.J. Gonzalez, Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut*, 2006. 55(8): p. 1104-13.
63. Bassaganya-Riera, J., K. Reynolds, S. Martino-Catt, Y. Cui, L. Hennighausen, F. Gonzalez, J. Rohrer, A.U. Benninghoff and R. Hontecillas, Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2004. 127(3): p. 777-91.
64. Nakajima, A., K. Wada, H. Miki, N. Kubota, N. Nakajima, Y. Terauchi, S. Ohnishi, L.J. Saubermann, T. Kadowaki, R.S. Blumberg, R. Nagai and N. Matsushashi, Endogenous PPAR gamma mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology*, 2001. 120(2): p. 460-9.
65. Naito, Y., T. Takagi, K. Uchiyama, O. Handa, N. Tomatsuri, E. Imamoto, S. Kokura, H. Ichikawa, N. Yoshida and T. Yoshikawa, Suppression of intestinal ischemia-reperfusion injury by a specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, pioglitazone, in rats. *Redox Rep*, 2002. 7(5): p. 294-9.
66. Naito, Y. and T. Yoshikawa, Thiazolidinediones: a new class of drugs for the therapy of ischemia-reperfusion injury. *Drugs Today (Barc)*, 2004. 40(5): p. 423-30.
67. Lewis, J.D., G.R. Lichtenstein, R.B. Stein, J.J. Deren, T.A. Judge, F. Fogt, E.E. Furth, E.J. Demissie, L.B. Hurd, C.G. Su, S.A. Keilbaugh, M.A. Lazar and

- G.D. Wu, An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 2001. 96(12): p. 3323-8.
68. Thim, L. and F.E. May, Structure of mammalian trefoil factors and functional insights. *Cell Mol Life Sci*, 2005. 62(24): p. 2956-73.
 69. Dossinger, V., T. Kayademir, N. Blin and P. Gott, Down-regulation of TFF expression in gastrointestinal cell lines by cytokines and nuclear factors. *Cell Physiol Biochem*, 2002. 12(4): p. 197-206.
 70. Furuta, G.T., J.R. Turner, C.T. Taylor, R.M. Hershberg, K. Comerford, S. Narravula, D.K. Podolsky and S.P. Colgan, Hypoxia-inducible factor 1-dependent induction of intestinal trefoil factor protects barrier function during hypoxia. *J Exp Med*, 2001. 193(9): p. 1027-34.
 71. Mashimo, H., D.C. Wu, D.K. Podolsky and M.C. Fishman, Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*, 1996. 274(5285): p. 262-5.
 72. Taupin, D. and D.K. Podolsky, Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(9): p. 721-32.
 73. Vieten, D., A. Corfield, D. Carroll, P. Ramani and R. Spicer, Impaired mucosal regeneration in neonatal necrotising enterocolitis. *Pediatr Surg Int*, 2005. 21(3): p. 153-60.
 74. Lin, J., I.R. Holzman, P. Jiang and M.W. Babyatsky, Expression of intestinal trefoil factor in developing rat intestine. *Biol Neonate*, 1999. 76(2): p. 92-7.
 75. Carrasco, R., M. Pera, F.E. May, B.R. Westley, A. Martinez and L. Morales, Trefoil factor family peptide 3 prevents the development and promotes healing of ischemia-reperfusion injury in weanling rats. *J Pediatr Surg*, 2004. 39(11): p. 1693-700.
 76. Zhang, B.H., H.G. Yu, Z.X. Sheng, H.S. Luo and J.P. Yu, The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat. *Regul Pept*, 2003. 116(1-3): p. 53-60.
 77. Vestergaard, E.M., E. Nexø, A. Wendt and F. Guthmann, Trefoil factors in human milk. *Early Hum Dev*, 2008. 84(10): p. 631-5.
 78. Dash, P. Apoptosis. [Review] 2007 [cited 2007; Available from: www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash].
 79. Porter, A.G. and R.U. Janicke, Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 1999. 6(2): p. 99-104.
 80. Villa, P., S.H. Kaufmann and W.C. Earnshaw, Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci*, 1997. 22(10): p. 388-93.
 81. Hengartner, M.O., The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000. 407(6805): p. 770-6.
 82. Knowles, R.G. and S. Moncada, Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 1994. 298 (Pt 2): p. 249-58.
 83. Akisu, M., D. Ozmen, M. Baka, S. Habif, M. Yalaz, S. Arslanoglu, N. Kultursay and O. Bayindir, Protective effect of dietary supplementation with L-arginine and L-carnitine on hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Biol Neonate*, 2002. 81(4): p. 260-5.
 84. Nadler, E.P., J.S. Upperman, E.C. Dickinson and H.R. Ford, Nitric oxide and intestinal barrier failure. *Semin Pediatr Surg*, 1999. 8(3): p. 148-54.
 85. Ford, H.R., Mechanism of nitric oxide-mediated intestinal barrier failure: insight into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*, 2006. 41(2): p. 294-9.

86. Tagesson, C. and R. Sjodahl, Passage of molecules through the wall of the gastrointestinal tract. Intestinal permeability to polyethylene glycols in the 414- to 1,074-dalton range. *Eur Surg Res*, 1984. 16(5): p. 274-81.
87. Canpolat, F.E., M. Yurdakok, S. Ozsoy, R. Hazirolu and A. Korkmaz, Protective effects of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int*, 2006. 22(9): p. 719-23.
88. Okur, H., M. Kucukaydin, K. Kose, O. Kontas, P. Dogam and A. Kazez, Hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg*, 1995. 30(10): p. 1416-9.
89. Ozdemir, O.M., H. Ergin, C. Yenisey, N.S. Turk and N.G. Simsek, Protective effects of clarithromycin in rats with hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *J Pediatr Surg*. 45(11): p. 2169-74.
90. Henning, S.J., Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism. *Am J Physiol*, 1981. 241(3): p. G199-214.
91. Czyrko, C., C. Steigman, D.L. Turley, H.R. Drott and M.M. Ziegler, The role of reperfusion injury in occlusive intestinal ischemia of the neonate: malonaldehyde-derived fluorescent products and correlation of histology. *J Surg Res*, 1991. 51(1): p. 1-4.
92. Cazals, V., E. Nabeyrat, S. Corroyer, Y. de Keyzer and A. Clement, Role for NF-kappa B in mediating the effects of hyperoxia on IGF-binding protein 2 promoter activity in lung alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1448(3): p. 349-62.
93. D'Angio, C.T., M.B. LoMonaco, S.A. Chaudhry, A. Paxhia and R.M. Ryan, Discordant pulmonary proinflammatory cytokine expression during acute hyperoxia in the newborn rabbit. *Exp Lung Res*, 1999. 25(5): p. 443-65.
94. Loncar, M.B., E.D. Al-azze, P.S. Sommer, M. Marinovic, K. Schmehl, M. Kruschewski, N. Blin, R. Stohwasser, P. Gott and T. Kayademir, Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. *Gut*, 2003. 52(9): p. 1297-303.

7. Abkürzungsverzeichnis

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
a-ITF	anti-intestinal trefoil factor
APS	Ammonium Persulfat
C ₂ H ₅	Diethylether
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	Capsid reaktives Protein
CT	Threshold Cycle
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

DSS	Dextran Sodium Sulfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FD-4	Fluorescein dextran 4
FITC	Fluorescein
H/R	Hypoxie/Reoxygenierung
HbA1c	Glykohämoglobin
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
NaCl	Natriumchlorid
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NEM	N-Ethylmaleinimid
NFAT	Nukleärer Faktor der aktivierten T-Zellen
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Proteinaseinhibitoren
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	p-Nitroaniline
PPAR	Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	Retinoid X Rezeptor
SDS	Natrim Dodecyl Sulfat
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TFF	Trefoil Faktor
TGF β	Transforming Growth Factor β
TNF	Tumornekrosefaktor
TZD	Thiazolidione
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLBW	Very Low Birth Weight

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Erklärung

„Ich, Konrad Klinghammer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Die Rolle von PPAR γ und TFF-3 im Enterokolitis-Tiermodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

10. Danksagung

Ich danke Herrn **PD Dr. Florian Guthmann** für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit,

Herrn **Dr. Christoph Kluthe** und Frau **Ruth Hermann** für die kompetente und immer freundliche Unterstützung bei wichtigen Teilen der experimentellen Phasen dieser Arbeit,

und ich danke meiner Familie, besonders meiner Freundin **Cynthia Göschel**, die mir stets zur Seite stand und meinen Eltern, die mir das Studium der Medizin und damit die Promotion erst ermöglicht haben.