

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

Ehem. Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Karl-Walter Jauch

**Intestinale afferente Sensibilität, Permeabilität und Entzündungsreaktion
des Dünndarms während des mechanischen Ileus der Maus**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Till Moritz Macheroux
aus Frankfurt am Main

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin E. Kreis

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jens Waschke

Prof. Dr. Philip Bufler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Mario Müller

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2018

Gewidmet B. H.-M. und P. M.

Ohne Euch wäre all dies nicht möglich gewesen

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Krankheitsbild des Ileus und seine unterschiedlichen Formen	1
1.2	Aufbau des enterischen Nervensystems	4
1.2.1	Der peristaltische Reflex	4
1.2.2	Neurotransmitter	6
1.3	Die Pathophysiologie des mechanischen Ileus	10
1.4	Diagnose des mechanischen Ileus	13
1.5	Therapie des mechanischen Ileus	15
1.5.1	Konservativ	15
1.5.2	Operative Therapie	16
1.6	Prognose der Ileuskrankheit	17
1.7	Ziele und Hypothese	17
2	VERSUCHSTIERE, METHODEN UND GERÄTE.....	19
2.1	Versuchstiere.....	19
2.2	Versuchsmethoden.....	19
2.2.1	Versuchsprotokoll.....	19
2.2.2	Induktion des mechanischen Ileus	22
2.2.3	Gewebe- und Blutentnahme und Aufarbeitung	23
2.3	Nervenfaserableitung.....	24
2.3.1	Versuchsdurchführung.....	24
2.3.2	Versuchsprotokoll der elektrophysiologischen Ableitung	26
2.4	HE- Färbung.....	26
2.5	Permeabilitätsmessung	28
2.5.1	Grundlagen und Prinzip des Versuches.....	28

2.5.2	Versuchsdurchführung.....	31
2.6	Auswertung.....	32
2.6.1	Elektrophysiologie.....	32
2.6.2	HE Färbung.....	33
2.6.3	Permeabilitätsmessungen.....	34
2.7	Statistik.....	36
2.8	Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen.....	36
2.8.1	Geräte und Chemikalien.....	36
2.8.2	Lösungen.....	39
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	Makroskopische Gewebeveränderungen.....	41
3.2	Elektrophysiologische Ableitungen.....	42
3.3	Histologische Gewebeveränderungen.....	50
3.4	Permeabilitätsmessung.....	52
4	DISKUSSION.....	56
4.1	Das Tiermodell.....	56
4.2	Elektrophysiologie.....	57
4.2.1	Diskussion der elektrophysiologischen Ergebnisse.....	57
4.3	HE Färbung.....	61
4.3.1	Diskussion der Methodik.....	61
4.3.2	Diskussion der Ergebnisse.....	62
4.4	Permeabilitätsmessung.....	63
4.4.1	Diskussion der Methodik.....	63
4.4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	64
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	66
6	ABKÜRZUNGEN.....	69

7	ABBILDUNGEN UND TABELLENVERZEICHNIS	70
7.1	Abbildungen.....	70
7.2	Tabellen.....	71
8	DANKSAGUNG	72
9	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	73
10	LITERATUR	74

1 Einleitung

1.1 Krankheitsbild des Ileus und seine unterschiedlichen Formen

Definition

Das Wort Ileus ist die lateinisierte Form des griechischen Wortes „eilein“, welches mit „einzwängen“ übersetzt werden kann ⁽¹⁾. Der Ileus ist definiert als eine Störung der Darmpassage durch einen Darmverschluss oder anderweitige Motilitätsstörung des Darms. Folge eines Ileus ist immer der ungenügende Transport des Darminhaltes. Besteht eine Passagehinderung über einen längeren Zeitraum, so kommt es als Folge davon zu pathophysiologischen Veränderungen, die mit dem Begriff „Ileuskrankheit“ zusammengefasst werden. Diese ist charakterisiert durch Entgleisung des Elektrolythaushaltes, Volumenmangel und Durchwanderungsperitonitis ⁽²⁾.

Formen:

Das Krankheitsbild des Ileus ist genau betrachtet keine eigenständige Diagnose, sondern muss viel eher als ein Folgezustand einiger verschiedener zugrunde liegender Erkrankungen gesehen werden. Ein Ileus kann nach verschiedenen Gesichtspunkten beschrieben werden: Er kann eingeteilt werden nach dem Ausmaß der Passagestörung. Der Ileus wird dann differenziert in einen kompletten Ileus und einen inkompletten Ileus. Beim kompletten Ileus ist die Passage des Darminhaltes vollständig aufgehoben, wohingegen beim inkompletten Ileus der Weitertransport des Darminhaltes lediglich gestört aber nicht komplett aufgehoben ist.

Ein Ileus wird des Weiteren beschrieben durch den klinischen Verlauf: Es lässt sich hier unterscheiden zwischen einem akuten, subakuten, chronischen oder rezidivierenden chronischen Ileus.

Die anatomische Lokalisation ist ein zusätzliches Kriterium, welches für die Diagnosefindung eine große Rolle spielt: Ein Dickdarmileus liegt bei 20- 25% aller Darmverschlüsse vor, ein Dünndarmileus dahingegen in 75- 80% aller Fälle ⁽³⁾.

Die Unterteilung in den mechanischen und den paralytischen Ileus spielt im klinischen Alltag die wichtigste Rolle. Ein mechanischer Ileus ist durch die Verlegung des Darmlumens gekennzeichnet und wird deshalb als Obstruktionsileus bezeichnet, wohingegen beim paralytischen Ileus eine Lähmung der Peristaltik des Darmes zugrunde liegt, welche ihrerseits multiple Ursachen haben kann ⁽⁴⁾.

Für die Entstehung eines mechanischen Ileus können verschiedenste Auslöser in Betracht kommen. Die Lokalisation der Obstruktion lässt eine grobe Einteilung zu:

Intramural

Eine intramurale Ursache ist beispielsweise ein Tumor der Darmwand. Tumoren des Dünndarms sind insgesamt betrachtet sehr selten und machen lediglich 1% aller Tumoren des Gastrointestinaltraktes aus, wohingegen Tumoren des Dickdarms wesentlich häufiger sind.

Des Weiteren können durch akute oder chronische Entzündungsprozesse Strikturen entstehen, welche das Darmlumen einengen oder gar verschließen. Solche Entzündungsprozesse können beispielsweise ausgelöst werden durch chronische entzündliche Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn, oder im Zuge einer Bestrahlungstherapie ⁽⁵⁾. Des Weiteren verursacht der Morbus Hirschsprung in den meisten Fällen einen Subileus oder Ileus mit galligem Erbrechen. Die Ursache ist hier die funktionelle Obstruktion eines aganglionären Darmteils mit Erweiterung der proximalen Darmteile ⁽⁶⁾.

Intraluminal

Intraluminale Ursachen für einen Ileus sind Bezoare, Fremdkörper oder Gallensteine. Ein Gallensteinileus wird auch als Bouveret Syndrom bezeichnet ⁽⁷⁾. Durch Fistelverbindungen zwischen dem Ductus choledochus und dem Duodenum bzw. zwischen der Gallenblase und dem Duodenum können Gallensteine in den Dünndarm gelangen und dort eine Obstruktion auslösen. In der Pädiatrie wird ein Ileus häufig beobachtet bei Darminvagination oder zähem Mekonium. Ein Mekoniumileus tritt überwiegend bei Patienten mit zystischer Fibrose auf ⁽⁶⁾.

Extraluminal

Briden, Hernien bzw. Adhäsionen bilden zusammen die häufigsten Ursachen für einen mechanischen Ileus des Dünndarms ⁽⁸⁾. Ein Bridenileus entsteht in der Regel nach einem intraabdominellen Eingriff und kann Wochen bis Monate nach der Operation entstehen und symptomatisch werden. Ein Volvulus oder eine Malrotation stellen ebenfalls extraluminale Ursachen eines Ileus dar.

Beim paralytischen Ileus steht eine neuromuskuläre Funktionseinschränkung der glatten Darmwandmuskulatur im Vordergrund, welche eine Motilitätsstörung des Darmes hervorruft. Dem paralytischen Ileus liegt ebenso wie dem mechanischen Ileus eine Vielzahl an Ursachen zu Grunde. Intraperitoneale Entzündungsprozesse wie Peritonitis, Appendizitis, Pankreatitis

u.a. spielen bei der Entstehung der Paralyse häufig eine entscheidende Rolle ⁽⁹⁾. Eine Sonderstellung nimmt der postoperative Ileus ein. Hier hat sich der Kenntnisstand in den letzten Jahren sehr stark erweitert. Durch die intraoperative Darmmanipulation, vor allem nach offenen abdominalchirurgischen Eingriffen, kommt es zu einer Störung der Darmperistaltik. Ist diese prolongiert (> 48- 72 h) spricht man vom postoperativen Ileus. In experimentellen Modellen sind in den letzten Jahren folgende pathophysiologische Faktoren ermittelt worden: Eine sympathische Hyperreaktivität nach einem operativen Eingriff spielt ebenso eine Rolle wie die Wirkung endogener Opiode, inflammatorischer Zytokine und die perioperative Verabreichung von Anästhetika und Opioidagonisten zur Schmerzbehandlung ⁽¹⁰⁾.

Als weitere mögliche Ursachen für einen paralytischen Ileus sind metabolische Entgleisungen im Rahmen einer diabetischen Ketoazidose bekannt sowie vaskuläre Ursachen (Mesenterialinfarkt oder Angina abdominalis).

Eine relevante Differentialdiagnose zur Ileuskrankheit stellt die Pseudoobstruktion dar. Hierbei handelt es sich um ein seltenes Krankheitsbild, welches sich durch wiederkehrende Episoden einer unzureichenden Dünndarmmotilität auszeichnet ohne dass dafür eine mechanische Obstruktion nachgewiesen werden kann ^(11, 12). Auf pathophysiologischer Ebene lässt sich eine Beeinträchtigung der neuronalen Kontrolle des Darms oder direkt eine Beeinträchtigung der Darmmuskulatur beschreiben ^(11, 13).

Die Ursachen für die intestinale Pseudoobstruktion können sehr vielseitig sein: neben der primären Form sind auch sekundäre Formen im Zuge einer muskulären, neurologischen, metabolischen, postinfektiösen, postoperativen, postradiogenen oder endokrinologischen Schädigung beschrieben ⁽¹⁴⁾.

Die Symptome sind denen eines mechanischen Ileus nicht unähnlich: beschrieben werden häufig Bauchschmerzen, Bauchblähungen, Übelkeit, Durchfall und Verstopfung ^(15, 16).

Wichtige Bestandteile der Diagnostik umfassen die radiologische und endoskopische Darstellung des Gastrointestinaltraktes, die gastroduodenojejunale Manometrie sowie die histopathologische Untersuchung der Darmwand ⁽¹⁷⁾.

Im Vordergrund der therapeutischen Bemühungen steht neben einer adäquaten Ernährung mit kleinen, fettarmen, ballaststoffarmen Mahlzeiten die Linderung der abdominalen Beschwerden. Prokinetische Therapieansätze mit Prucaloprid, Metoclopramid, Domperidon und Erythromycin werden in der Literatur beschrieben, zeigen jedoch sehr unterschiedliche Ansprechraten und nur begrenzten Erfolg ⁽¹⁷⁾.

1.2 Aufbau des enterischen Nervensystems

Das Intestinum verfügt über ein eigenes Nervensystem, welches als enterisches Nervensystem oder intrinsisches Nervensystem bezeichnet wird. Als intrinsisch wird es deshalb bezeichnet, weil es unabhängig vom zentralen Nervensystem arbeitet und auch nur für dieses zuständig ist, d.h. keine neuronalen Befehle an andere Organsysteme aussendet. Es reguliert die basalen Aktivitäten wie den Flüssigkeits- und Elektrolytaustausch über die Darmwand, den peristaltischen Reflex oder auch die intestinale Durchblutung^(18, 19).

Um diese vielfältigen Aufgaben zu erfüllen, verfügt das enterische Nervensystem über eine Fülle von unterschiedlichen Neuronen, welche größtenteils im Plexus myentericus Auerbach und dem Plexus submucosus Meissner lokalisiert sind. Der Plexus myentericus befindet sich in der Lamina muscularis der Darmwand zwischen der longitudinalen und der circulären Muskelschicht.

Die absolute Zahl aller myenterischen Neurone beträgt im Dünndarm der Maus in etwa 400.000, und weist eine der höchsten Neuronendichte aller Säugetiere auf⁽²⁰⁾.

1.2.1 Der peristaltische Reflex

Der Weitertransport von Nahrung geschieht ohne Beteiligung des ZNS.

Sensorische Nervenzellen uni- oder bipolaren Charakters im Plexus submucosus Meissner bilden mit ihren Axonen Synapsen an multipolaren Ganglionzellen des Plexus myentericus Auerbach, welche die motorische Aktivität der glatten Darmmuskulatur modulieren. Eine vermehrte Füllung eines Darmabschnittes bewirkt eine prompte peristaltische Welle an genau diesem Darmabschnitt⁽²¹⁾.

Es existieren außerdem weitere Nervenzellen in der Darmwand, ohne einem der beiden Plexus zugehörig zu sein. Von größter Bedeutung sind hier die Interstitiellen Zellen von Cajal (interstitial cells of cajal = ICC). Diese Zellen liegen im Interstitium zwischen den beiden Muskelschichten verteilt und dienen als Schrittmacherzellen für die basale Darmmotilität⁽²²⁾.

Es wird vermutet, dass die ICC über elektrische Erregungsausbreitung via gap junctions für eine basale elektrische Aktivität sorgen, welche allerdings nur in variablen Zuständen zu Kontraktionen der Darmmuskulatur führt. Diese unterschwelligeren Depolarisationen zeigen je nach Darmabschnitt eine andere Frequenz, und betragen im Jejunum beispielsweise 12/min, im Jejunum 9/min und im Kolon 3-6/min⁽¹⁹⁾. Wie wichtig die ICCs für die Darmmotilität

sind, demonstriert eine Arbeit von Zhou et al., wonach eine akute Pankreatitis zum Funktionsausfall der ICC führte, was seinerseits einen paralytischen Ileus nach sich zog⁽²³⁾.

Das ZNS ist durchaus in der Lage, durch Nervenfasern des Sympathikus und Parasympathikus das Enterische Nervensystem mit zu beeinflussen. Diese „extrinsische“ Innervation des Darmes wird durch den Nervus splanchnicus als Teil des Sympathikus und durch den Nervus vagus als Teil des Parasympathikus geleistet⁽²⁴⁾. Da die sympathische Innervation des Darmes über das Rückenmark verschaltet wird, spricht man auch von spinalen Fasern.

Die spinale Reizweiterleitung hat ihren Ursprung in den dorsalen Nervenwurzeln des thorakalen und lumbalen Rückenmarks. Nervenfasern von dort ziehen zu para- und prävertebralen Ganglien und werden dort auf das zweite Neuron umgeschaltet, welches mit seinem Axon in das Effektororgan zieht und auf diese Weise Signale aus dem Darm in das ZNS vermitteln kann. Als Beispiel sei genannt, dass afferente Nervenendigungen des N. splanchnicus, welche in der Darmserosa endigen, eine erhöhte Sensibilität für den Neurotransmitter 5-HT aufweisen, wenn der Darm in einen entzündlichen Prozess einbezogen ist. Über diesen Mechanismus lässt sich erklären, warum bei einer Entzündung des Darmes Schmerzsymptome entstehen können, wo doch der Darm ansonsten keine Präsenz in unserer Wahrnehmung hat⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾.

Der Nervus vagus bildet den parasympathischen Teil der extrinsischen Innervation des Darmes. Sein Innervationsgebiet erstreckt sich vom distalen Ösophagus bis zum oberen Drittel des Rektums. Die Umschaltung vom präganglionären auf das postganglionäre Neuron geschieht im Gegensatz zu den sympathischen Fasern organisch, d.h. in den Ganglien, welche im Bindegewebe der Endorgane lokalisiert sind⁽¹⁹⁾.

Es wurde im Allgemeinen angenommen, dass die spinalen Fasern hauptsächlich für die viszerale Schmerzvermittlung verantwortlich sind, wohingegen die vagalen, parasympathischen Fasern neben Übelkeit auch das Hunger- und Völlegefühl vermitteln⁽²⁷⁾.

Anderen Erkenntnissen zufolge sind die vagalen Fasern auch an der Schmerzwahrnehmung beteiligt, indem sie über inhibitorische Faserqualitäten die viszerale Schmerzwahrnehmung modulieren^(28,29).

Neben den spinalen und vagalen afferenten Nervenfasern, die beide mechanische Stimuli in das ZNS weiterleiten, existieren noch die intestinofugalen afferenten Neurone (IFAN). Hierbei handelt es sich um nicotinerge afferente Nervenfasern, die im mesenterialen

Nervenbündel verlaufen und von Nervenzellen der Darmwand ausgehen. Deren Axone kommunizieren mit postganglionären, sympathischen Nervenzellen und reagieren auch auf Änderung der Darmdistension ^(30,59). Eine relevante Rolle in der Übertragung von Nervensignalen an das ZNS im Rahmen einer Darmdistension ist allerdings nach Booth et al. auszuschließen, da nach deren Hemmung durch Hexamethonium kein messbarer Abfall der mesenterialen Nervenableitung auftrat ⁽⁵⁹⁾. Die Rolle dieser IFANs für die mesenteriale Nervenfaserableitung wurde deshalb in vorliegender Arbeit vernachlässigt.

Aufgrund der Komplexität des enteralen Nervensystems, seiner unterschiedlichen Neurone und deren Verknüpfungen, hat sich der Begriff des „zweiten Gehirns“ eingebürgert ⁽³¹⁾.

1.2.2 Neurotransmitter

Die Erforschung des enteralen Nervensystems und der Kommunikation zwischen ihm und dem zentralen Nervensystem hat eine lange Geschichte und nimmt ihren Anfang im Jahre 1921 durch die Entdeckung des autonomen Nervensystems durch den britischen Physiologen J.N. Langley. Seither wurden zahlreiche Methoden entwickelt, um das enterale Nervensystem mit seinen ca. 100 Millionen Neuronen genauer zu verstehen.

Die in vorliegender Arbeit verwendete Technik der Ableitung afferenter Mesenterialnerven birgt grundsätzlich die Möglichkeit, die gesamte nervale Nachrichtenübermittlung vom Darm in das ZNS nachzuweisen ⁽³²⁾. In der Vergangenheit wurde diese Methode benutzt, um die Pathomechanismen verschiedenster Erkrankungen näher zu verstehen, wie beispielsweise dem Reizdarmsyndrom oder der intestinalen Ischämie ⁽³³⁾⁽³⁴⁾.

Der große Nutzen der Methodik der Nervenfaserableitung liegt in der Möglichkeit, die mesenterialen Afferenzen durch verschiedene Reize zu aktivieren, um zu testen, inwieweit deren Sensibilität in verschiedenen Krankheitsprozessen verändert ist.

5-HT:

Serotonin ist ein wichtiger Neurotransmitter im enteralen Nervensystem und wird hauptsächlich von den Enterochromaffinen Zellen (ECCs) produziert ⁽³⁵⁾ ⁽³⁶⁾. Die Ausschüttung von Serotonin aus den ECCs erfolgt z.B. nach mechanischer Reizung des Darmes, wie bei Darmdistension oder durch entzündliche Reaktionen. Die Funktion des Serotonins wurde von Gershon auf die zweischneidige Formulierung reduziert, „Schwert und

Schild des Darms“ zu sein ⁽³⁷⁾. Das durch die EC Zellen ausgeschüttete Serotonin dient demnach dazu, eine Entzündungsreaktion in der Darmmukosa hervorzurufen, welche hauptsächlich gegen das Eindringen und Durchwandern von pathogenen Bakterien gerichtet ist. Andererseits kann eine überschießende Entzündungsreaktion Schäden an der Mukosa provozieren, insbesondere an den neuronalen Strukturen ⁽³⁸⁾. Aus diesem Grund fungiert das durch die Neurone des ENS bereitgestellte Serotonin als protektiver Faktor, indem es, vorwiegend über 5-HT₄- Rezeptoren vermittelt, Neurogenese in der Mukosa bewirken kann ⁽³⁹⁾. Diese scheinbar widersprüchliche Wirkweise ein und desselben Botenstoffes ist in Wahrheit ein synergistischer Balanceakt und demonstriert eindrücklich die hohe Komplexität der serotoninabhängigen neuronalen Schaltkreise im Darm:

Serotonin vermittelt über 5-HT_{1p} Rezeptoren eine Aktivierung der intrinsischen sensorischen Nerven, welche ihrerseits sekretorisch- motorische Nerven im Darm aktivieren. Diese Tatsache ist ein wesentlicher Grund für das Vorhandensein des peristaltischen Reflexes.

Serotonin stellt des Weiteren ein Wachstumsfaktor für das enterale Nervensystem dar. So wird beispielsweise über 5-HT_{2b} Rezeptoren die Proliferation von ICCs und deren Netzwerke gefördert.

Auf der anderen Seite führt die Aktivierung von 5-HT₃- und 5-HT₄- Rezeptoren auf extrinsischen sensorischen Nervenfasern zu einer Übermittlung elektrischer Impulse in das ZNS. Diese Impulse werden durch parasympathische Nervenfasern übermittelt, welche eine langsame Leitungsgeschwindigkeit von 1 m/s aufweisen. Reaktionen wie Übelkeit und Erbrechen werden auf diese Art vermittelt.

Daneben finden sich Serotoninrezeptoren auch auf spinalen mesenterialen Afferenzen. Dabei handelt es sich um 5-HT- Rezeptoren. Ihre Aktivierung vermittelt einen antinozizeptiven Effekt.

Die Ausschüttung von Serotonin kann allerdings auch per se krankhaft erhöht sein und stellt einen Baustein in der Pathophysiologie des Reizdarmsyndroms dar ⁽⁴⁰⁾.

Diverse Studien konnten beweisen, dass Serotoninrezeptoren auch in spinalen Afferenzen eingebaut werden ^(41,42) und dass die Sensibilität dieser spinalen Afferenzen für Serotonin während einer intestinalen Entzündungsreaktion erhöht ist, wobei sowohl die Zahl der rekrutierten spinalen Afferenzen als auch die Reizantwort der einzelnen Nervenfasern mit der Stärke der Entzündungsreaktion korrelieren ⁽⁴³⁾. Die früher oft postulierte Annahme, man könne durch Applikation von Serotonin gezielt die vagalen Nervenfasern eines Darmnerven

ansteuern und somit Rückschlüsse auf die Sensibilität vagaler Fasern schließen, gerät durch diese Tatsache ins Wanken.

Nach einer Studie von Coldwell et al. wird die erhöhte Sensibilität der spinalen Afferenzen auf 5-HT über die Dauer des Entzündungsreizes aufrechterhalten. Mit Blick auf diese Tatsache wäre es interessant herauszufinden, wie sich die Sensibilität intestinaler Afferenzen, spinaler und vagaler, nach Beendigung eines mechanischen Ileus, verhalten würde. Ein Tierversuchsmodell, welches die Beseitigung eines zuvor induzierten mechanischen Ileus beinhaltet, wäre für diese Fragestellung geeignet, wobei sowohl Dauer des Ileus als auch die Zeitspanne zwischen Beseitigung des Ileus und Probengewinnung berücksichtigt werden müssen.

Darmdistension:

Die Distension des gewonnenen Darmabschnittes wurde als Reiz verwendet, um die Aktivität der mechanosensitiven Neurone des poststenotischen Abschnitts zu untersuchen.

Die Grundlage dieser Methodik beruht auf der Beobachtung, dass die Darmwand von vagalen Afferenzen innerviert wird, wobei hier insbesondere auf die Lamina muscularis der Darmwand das Augenmerk liegt. Die anatomische Beschaffenheit dieser Afferenzen gliedert sich in drei Subtypen: Den IGLE (interganglionic laminar ending), welche mit myenterischen Ganglien interferieren und 90 % der Afferenzen ausmachen, den IMA (intramuscular array) und Mischtypen aus den beiden vorigen ⁽⁴⁴⁾.

Die Innervation der Muskularis mit vagalen mechanosensitiven Afferenzen erfüllt im Wesentlichen drei Aufgaben: Neben einer dynamischen Antwort auf eine Darmdistension existieren auch eine statische Antwort sowie eine Nervengrundaktivität ⁽²³⁾.

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass mechanosensitive Neurone im Plexus myentericus sowohl auf die Änderung als auch die konstante Beibehaltung einer Deformation reagieren ⁽⁴⁵⁾. Die Autoren gingen dabei von der Existenz so genannter RAMEN aus (rapidly adapting mechanosensitive enteric neuron), welche 22% der enterischen Neurone in ilealen Ganglien ausmachen. Diese Nerven reagieren proportional auf den Grad einer Deformation mit einer erhöhten Entladungsfrequenz.

Eine Beteiligung afferenter mechanosensitiver Reize an der viszeralen Schmerzentstehung wird angenommen, wofür die Existenz unterschiedlicher Afferenzen als Erklärung herangezogen wird. Low-threshold Afferenzen sind demnach für die Detektierung physiologischer Stimuli verantwortlich, was für den peristaltischen Reflex unabdingbar ist,

währenddessen high- threshold Afferenzen für die Detektion und Weiterleitung potentiell schädlicher Einflüsse auf den Darm verantwortlich sind ^(46,47).

Um den Einfluss der Darmdistension auf die afferente Entladungsfrequenz genauer verstehen zu können, haben Yang et al. die Auswirkungen der Darmdistension auf die Darmwand in „Stress“ (Stress) und „Strain“ (Belastung) unterteilt. Der Stress demnach wird als Kraft definiert, welche auf einen festgelegten Bereich der Darmwand wirkt, während die Belastung als Ausmaß der Deformation der Darmwand verglichen mit ihrem ursprünglichen Durchmesser gesehen wird. Interessanterweise zeigten die LT Afferenzen eine lineare Aktivitätszunahme auf die Belastung, während die HT Afferenzen auf den Stress eine lineare Aktivitätszunahme zeigten ⁽⁴⁸⁾.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Geschwindigkeit der Darmdistension einen Einfluss auf die Nervenaktivität hat. Demnach reagieren Afferenzen bei einer schnelleren Darmdistension mit einer umso höheren Aktivität ⁽²⁵⁾.

Bradykinin:

Bradykinin ist biologisch gesehen ein Gewebshormon, welches zusammen mit anderen Kininen wie Kallidin und T-kinin an der neuronalen Kontrolle von Schmerz beteiligt ist.

Pesquero et al. konnten zeigen, dass der Bradykinin Rezeptor 1 besonders dann exprimiert wird, wenn eine Entzündungsreaktion etwa durch Lipopolysaccharide oder Interleukine ausgelöst wird. Bradykinin Rezeptor 1 defiziente Knockout Mäuse zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren ein vermindertes Schmerzempfinden. Ein Grund hierfür war auch die der abgeschwächte spinale nozizeptive Reflex, der von Bradykininrezeptoren gebahnt wird ⁽⁴⁹⁾.

Bradykinin fördert demnach die Schmerzwahrnehmung bei entzündlichem Geschehen, weshalb eine Blockade des Bradykininrezeptor 1 als günstig in der Behandlung viszeraler und somatischer Schmerzen gesehen wird ⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾.

Bradykinin erfüllt neben der Regulierung der Schmerzwahrnehmung über das Rückenmark weitere physiologische Funktionen: Es ist an der Erregung primärer sensorischer Neurone im ZNS beteiligt, erhöht im Rahmen einer Immunreaktion die Gefäßpermeabilität und bewirkt die Produktion von IL-1 und TNF α ⁽⁵²⁾.

Durch Stimulation der Darmafferenzen sollte untersucht werden, inwieweit die Nerven durch Hochregulierung von BK- Rezeptoren für Bradykinin sensibilisiert wurden.

1.3 Die Pathophysiologie des mechanischen Ileus

Bei der Pathophysiologie des Ileus spielt die **Stase** des Darminhaltes eine entscheidende Rolle⁽³⁾. Durch den Stau von flüssigen und festen Nahrungsbestandteilen sowie verschluckter Luft entsteht vor der Obstruktion eine **Distension** des Darmes. Die Distension hat eine geminderte Mikrozirkulation der Darmmukosa zur Folge. Dadurch entsteht eine Hypoxie der Mukosa^(73,53). Die minderversorgte Darmmukosa ist dann immer weniger in der Lage, die im Darmlumen angesammelte Flüssigkeit zu resorbieren, wodurch die Flüssigkeitsmenge im Darm weiter zunimmt^(54,55). Des Weiteren führt die Distension vor einer Passagebehinderung zu einer Sekretion von Flüssigkeit ins Darmlumen⁽⁵⁾, da die Physiologie des Darmes darauf ausgerichtet ist, durch diese Sekretion den Darminhalt zu verdünnen, so dass mögliche Engstellen dennoch überwunden werden können. Dies führt jedoch auch zu einem vermehrten Druck im Darmlumen.

Der durch die Darmdistension entstehende **intraluminale Druck** unterliegt bemerkenswerten Schwankungen. Der normale intraluminale Druck in einem Darmabschnitt liegt ca. bei 2- 4 cm H₂O und kann infolge einer peristaltischen Bewegung auf 30-60 cm H₂O ansteigen^(56,57). Bei einem Ileus des *Dickdarms* konnten im Tierversuch Drücke von bis zu 100 mm Hg gemessen werden⁽⁵⁸⁾, wohingegen die im obstruierten *Dünndarm* gemessenen Drücke lediglich bei 8 cm H₂O lagen (entspricht etwa 5,9 mm Hg)⁽⁵⁹⁾. Hingegen konnten in einer Arbeit von Shikata et al. (1983) an obstruierten Hundedickdärmen bei einem über mehrere Tage bestehendem Ileus intraluminale Drücke von bis zu 95 mm Hg gemessen werden⁽⁶⁰⁾. Ruf et al. (1980) konnten zusätzlich zeigen, dass die Mikrozirkulation des Dünndarms wesentlich empfindlicher als die des Dickdarms auf eine intraluminale Druckerhöhung reagiert⁽⁶¹⁾. Die Einschränkung der Mikrozirkulation ist im Dünndarm bei niedrigen Druckverhältnissen im Vergleich zum Dickdarm deutlich erniedrigt; bei einem Druck von 60 mm Hg sinkt die Mikrozirkulation in beiden Abschnitten auf nur noch ca. ¼ der normalen Werte, weil die im Tierversuch erzeugten Druckverhältnisse künstlich erzeugt und nicht den realen Druckverhältnissen bei einem Ileus entsprechen, müssen neben der Darmdistension durch die intraluminale Druckerhöhung noch andere Faktoren an der Pathophysiologie der Ileuskrankheit beteiligt sein.

Konzept der bakteriellen Fehlbesiedlung

Die Konzentration an Aerobiern im oberen und mittleren Darmtrakt ist beim Gesunden in der Regel gering und beträgt in etwa $10^4/\text{ml}$ ⁽⁶²⁾. Als Folge einer Ileuskrankheit können im Dünndarm Bakterienkonzentrationen von bis zu ca. $10^7/\text{ml}$ beobachtet werden ⁽⁶³⁾. Dies geht einher mit einem starken Anstieg bakterieller Zerfallsprodukte und Endotoxine, welche die Mukosa schädigen. Die Mukosa ist dann nicht mehr in der Lage ihrer Barrierefunktion gerecht zu werden und wird durchlässig für Bakterien und deren Zerfallsprodukte.

Die Translokation von Bakterien und Bakterientoxinen in das umliegende Gewebe, in die Bauchhöhle und in den systemischen Kreislauf kann zu Sepsis und Multiorganversagen führen ^(64,65). Deitch et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass schon 4 h nach Induktion eines mechanischen Ileus Bakterien aus den mesenterialen Lymphknoten anzüchtbar waren, wobei auffiel, dass die bakterielle Translokation ausgeprägter war in den Mäusen, deren Darm proximal der Ileozökalklappe ligiert wurde ⁽⁶⁶⁾. Die in den Bakterienkulturen am häufigsten angezüchteten Spezies waren *E. coli* (39,4 %), gefolgt von *Klebsiella* sp. (21.1 %), *Proteus mirabilis* (14,5 %) und *Enterococcus* sP. (7.9 %). Bakterielle Translokation konnte in einer Studie von Sagar PM et al. auch in Patienten beobachtet werden, die wegen einer Obstruktion behandelt werden mussten ⁽⁶⁷⁾.

Der intravasale **Flüssigkeitsverlust** stellt einen zusätzlichen Faktor in der Pathophysiologie der Ileuskrankheit dar. Flüssigkeit wird beim Ileus verloren:

- durch mangelnde Flüssigkeitsaufnahme infolge der hypoxischen Mukosa
- durch vermehrtes Erbrechen bei Vorliegen eines hohen Ileus ⁽⁴⁾.
- Durch vermehrte mukosale Hypersekretion als Folge bakterieller Fehlbesiedlung bei einem tiefen Dünndarmileus ⁽⁶⁸⁾.

Unbehandelt führt der Flüssigkeitsverlust zur Exsikkose mit konsekutiven Multiorganversagen. Außerdem kann durch die abdominelle Distension ein Zwerchfellhochstand resultieren, der eine respiratorische Insuffizienz zur Folge haben kann ⁽³⁾.

Einen Überblick über das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren gibt Abbildung 1.

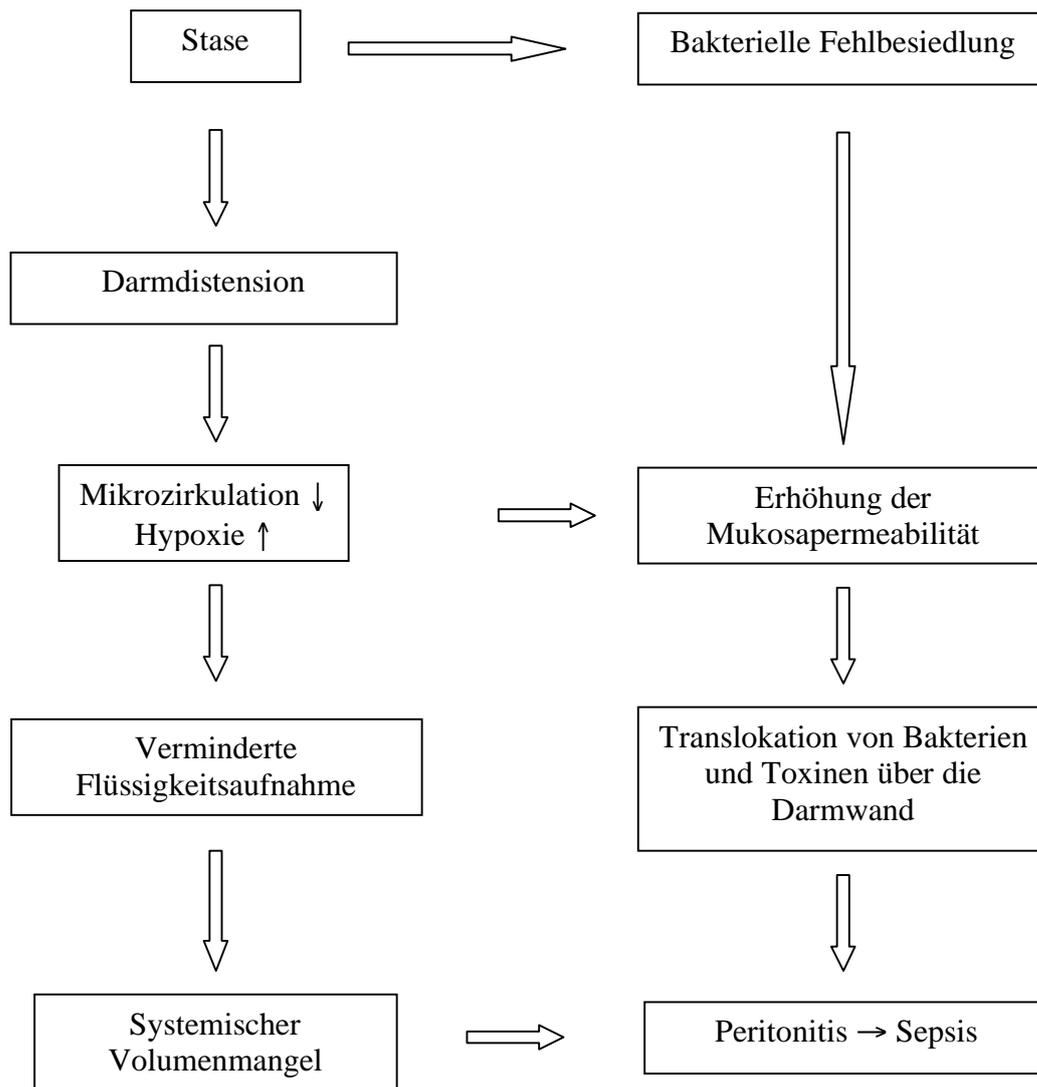


Abbildung 1: Übersicht der Pathophysiologie der Ileuskrankheit; \Rightarrow = führt zu; \uparrow = erhöht; \downarrow = erniedrigt

1.4 Diagnose des mechanischen Ileus

Unabdingbar zur Diagnosestellung ist die Erhebung der Anamnese. In die Anamnese sollten die Ernährungsgewohnheiten des Patienten mit einbezogen werden. Des Weiteren ist die Erhebung von Voroperationen ein wichtiger Baustein in der Anamnese, da das Risiko eines Ileus nach vorangegangenen abdominalen Eingriffen erhöht ist ⁽⁶⁹⁾. Gemäß einer Arbeit von Renzulli et al. von 1998 waren 77% der Ileuspatienten voroperiert. Appendektomien, gynäkologische Eingriffe und Oberbauchoperationen stellten zusammen ca. $\frac{3}{4}$ aller Voroperationen ⁽⁷⁰⁾.

Die Anamnese sollte außerdem das Vorliegen maligner Erkrankungen erfassen. Kolorektale oder ovarielle Malignitätsentitäten sind die häufigsten Ursachen für einen tumorbedingten Ileus und führen in der Regel erst in fortgeschrittenen Stadien zu einem Darmverschluss ⁽⁷¹⁾.

Die Symptomatik des Patienten ist oft recht unspezifisch. Im Vordergrund stehen meist starke, kolikartige Bauchschmerzen als Ausdruck eines subakuten bis akuten Abdomens (89,3% aller Patienten) mit einer Begleitsymptomatik aus Übelkeit, Erbrechen (71% der Patienten), Meteorismus (54% d.P.), Stuhl- und Windverhalt (29% d.P.) ⁽⁷⁰⁾. Diese Symptome, d. h. Übelkeit, Erbrechen und Stuhlverhalt, sollten deshalb unbedingt gezielt abgefragt werden.

Bei einem hohen Ileus ist Erbrechen ein häufiges Symptom bei anfangs noch erhaltenem Stuhlgang. Befindet sich die Stase im Jejunum oder in einem proximalen Anteil des Ileums, so resultiert meist Erbrechen, welches zu schwerwiegenden Wasser- und Elektrolytverlusten führen kann. Ein tiefer Ileus zeichnet sich hingegen durch meist fehlendes Erbrechen aus, gepaart mit Stuhlverhalt. Im Spätstadium eines tief- sitzenden Ileus kann außerdem Miserere (4,4% d. P.) als Symptom in Erscheinung treten ^{(5) (14)}. Befindet sich die Stase eher in einem distaleren Anteil des Darmes (distales Ileum, Kolon), so kann sie darüber hinaus eine bakterielle Fehlbesiedlung des dortigen Darmabschnittes bewirken ⁽⁴⁾.

Untersuchung

Die Inspektion des Patienten kann bereits wertvolle diagnostische Hinweise zur Diagnose eines Ileus liefern. Eine Zunahme des Bauchumfanges durch die Blähung ist oft zu beobachten. Die luftgefüllten Darmschlingen ergeben bei der Perkussion ein hohles Geräusch.

Häufig gibt der Patient einen diffusen Druckschmerz an. Ein Peritonismus liegt im initialen Krankheitsstadium selten vor; bei einem lang anhaltenden Ileus stellt ein Peritonismus jedoch ein Warnzeichen dar, weil eine Darmperforation mit beginnender Peritonitis als wahrscheinlich anzunehmen ist ⁽³⁾. Bei Verdachtsdiagnose auf ein Ileusgeschehen muss das Vorliegen einer Hernie immer ausgeschlossen werden. Hernien sind in 2 % der Fälle für die Entstehung eines Ileus verantwortlich, weshalb die typischen Bruchpforten an der Leiste und am Bauchnabel abgetastet werden müssen ⁽⁸⁾.

Zusätzlich kann die digitale rektale Untersuchung Hinweise auf einen Ileus liefern. Schmerzen bei der Palpation des Douglas Raumes können ebenso präsent sein wie Blutspuren am tastenden Finger ⁽²⁶⁾ oder gar die direkte Palpation eines stenosierenden Rektumtumors. Da beim Ileus eine in nicht unerheblichem Maße auftretende Flüssigkeitsverschiebung in das Darmlumen vorliegt, gehört die Untersuchung der Exsikkosezeichen zum Standardprogramm der körperlichen Untersuchung ⁽⁷²⁾. Die Inspektion der Zunge sowie die Beurteilung des Hautturgors können dem Untersucher weitere Hinweise auf einen Ileus liefern.

Durch Auskultation des Abdomens können Rückschlüsse auf das Stadium der Ileuskrankheit geschlossen werden. Überwiegen zu Beginn eines mechanischen Ileus eher hochklingende Darmgeräusche, so tritt bei Krankheitsfortschritt eine sogenannte Totenstille ein. Die Ursache für diese unterschiedlichen Auskultationsergebnisse liegt in der Darmperistaltik begründet. Der zu Beginn der Ileuskrankheit noch weitgehende intakte Darm versucht durch eine Intensivierung der Peristaltik das Obstruktionshindernis zu überwinden. Gelingt dem Darm dies nicht, ermüdet er nach einiger Zeit und imponiert durch eine Hypoperistaltik, die sich als „Totenstille“ in der Auskultation widerspiegelt ⁽³⁾. Zu beachten ist daher, dass jeder mechanische Ileus, vorausgesetzt er besteht ausreichend lange, in einen paralytischen Ileus übergehen kann.

Die Laboruntersuchung stellt einen weiteren Pfeiler zur Diagnose eines Ileus bzw. dessen Folgen dar. Zur besseren Beurteilung des Flüssigkeitsverlustes mit konsekutiven Nierenfunktionseinschränkung sollte immer die Bestimmung des Hämatokrits, des Kreatininwertes, des Harnstoffes, der Elektrolyte und des Säure-Base-Haushaltes erfolgen ⁽⁷³⁾. Ein spezifischer Laborparameter, der in der Frühphase einer Ileuskrankheit diagnostische Sicherheit geben könnte, existiert leider nicht. Die Bestimmung der LDH und des Laktatspiegels wird nichtsdestotrotz empfohlen und kann eine Darmischämie infolge einer

Minderperfusion eines Darmsegmentes anzeigen, ist aber recht unspezifisch ⁽³⁾. Die Leukozytenbestimmung im Blut stellt laut Renzulli und Mitarbeiter ebenfalls kein sicheres Zeichen einer Darmnekrose dar.

Apparativ

Der durch den klinischen Befund erhobene Verdacht auf einen Ileus kann durch bildgebende Verfahren erheblich gestützt werden. Die Röntgenleeraufnahme kann die Unterscheidung zwischen einem Dünndarm- und einem Dickdarmileus vereinfachen und zusätzlich durch den Nachweis freier Luft im Abdomen eine Darmwandperforation nachweisen ⁽⁷⁴⁾. Durch verschiedene Methoden der Kontrastmittelanwendung (Kontrastmittelpassage, Kolonkontrasteinlauf) ist eine Unterscheidung in einen mechanischen und paralytischen Ileus möglich ⁽³⁾. Computertomographische Verfahren eignen sich ebenfalls zur Diagnosesicherung eines Ileus ⁽⁷⁵⁾, sollten aber aufgrund der Strahlenbelastung zurückhaltend angewendet werden.

1.5 Therapie des mechanischen Ileus

1.5.1 Konservativ

Die Möglichkeit einer konservativen Behandlung richtet sich nach Art und Schweregrad des Ileus. Die konservative Therapie findet in der Behandlung eines paralytischen Ileus immer Anwendung, da dieser chirurgisch nur äußerst zurückhaltend angegangen werden sollte und dann meist nur mit einem Stoma zu bessern ist. Beim mechanischen Ileus dagegen werden konservative Methoden initial und supportiv eingesetzt, jedoch sind diese häufig nicht erfolgreich, so dass dann eine chirurgische Ursachenbeseitigung beim mechanischen unvermeidbar ist ⁽⁹⁾.

Im Vordergrund der konservativen Behandlung steht die Dekompression des Darmes, um das Ausmaß der Darmdistension zu verringern und die Stase des Darminhaltes zu reduzieren. Zu diesem Zweck wird transnasal eine Magensonde gelegt oder über Darmrohr bzw. endoskopisch platzierte Dekompressionssonden rektal eine Entlastung geschaffen. Die Stabilisierung der Vitalparameter sowie die Verbesserung des Allgemeinzustandes des Patienten ist ein weiteres Ziel der konservativen Behandlung. Zu diesem Zweck wird die intravenöse Flüssigkeits- und Elektrolytbilanzierung empfohlen, idealerweise über einen

zentralvenösen Katheter (ZVK). Ergänzend kann versucht werden, durch prokinetische Medikamente die Darmaktivität anzuregen. Dabei gilt zu beachten, dass ein mechanischer Ileus hierfür eine Kontraindikation darstellt, da sich die Gefahr einer Darmperforation vor der Obstruktion durch die gesteigerte Peristaltik erhöht. In der klinischen Routine haben sich eine ganze Reihe von Medikamenten bewährt wie Metoclopramid, welches über Dopaminrezeptoren wirkt oder Cholinesterasehemmer wie Pyridostigmin, Neostigmin und Pantothenensäure⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾. Des Weiteren wird das Absetzen peristaltikhemmender Medikamente empfohlen. Dazu müssen unter anderem Opioide gezählt werden, die häufig im postoperativen Management zur Analgesie eingesetzt werden, wobei auf diese meist nicht ganz verzichtet werden kann.

1.5.2 Operative Therapie

Die operative Therapie hat ihre zentrale Bedeutung bei der Therapie des mechanischen Ileus und bedingt auch des paralytischen Ileus, der ungenügend auf konservative Behandlungsmaßnahmen anspricht. Da die häufigsten Ursachen eines mechanischen Ileus postoperative Adhäsionen (54-75%), Hernien (8-25%) und obstruierende Tumore (5-10%) darstellen, ist deren Beseitigung das primäre Ziel der Operation⁽⁷⁸⁾. Laparoskopische Verfahren haben in den letzten Jahren bei der Behandlung eines Ileus an Bedeutung gewonnen⁽⁷⁹⁾.

Einer operativen Sanierung sollte immer eine konservative Behandlung vorausgehen, welche die Entlastung der Darmdistension durch eine nasogastrale Sonde und die Volumen- und Elektrolytsubstitution umfassen sollte. Diese konservative Therapie kann auch dann erfolgen, wenn gleich bei der initialen Präsentation des Patienten die OP-Indikation gestellt wird.

Eine sofortige operative Indikation liegt allerdings vor beim Auftreten klinischer Zeichen von Dünndarmischämie, Peritonitis, arterieller Hypotension, Laktatazidose und radiologischen Hinweisen auf Ileus mit interstinaler Pneumatosis und Luft in der Pfortader⁽³⁵⁾. Jegliches Hinauszögern operativer Maßnahmen sollte in diesen Fällen unbedingt vermieden werden, um das Risiko für Komplikationen und die Letalität nicht zu erhöhen.

So konnten zum Beispiel in einer Studie von Bickell et al. demonstriert werden, dass durch das Hinauszögern operativer Maßnahmen bei einem kompletten Ileus das Risiko für eine Darmteilresektion drastisch erhöht wird⁽⁸⁰⁾.

1.6 Prognose der Ileuskrankheit

Die Prognose eines vollständigen mechanischen Ileus verschlechtert sich mit der zeitlichen Dauer der bestehenden Symptomatik: Beim mechanischen Ileus steigt mit jeder Stunde der Verzögerung die Letalität um 1% an ⁽⁷²⁾. Für den Dünndarmileus liegt die Mortalität bei ca. 10%, für den Dickdarmileus dagegen bei 20% ⁽³¹⁾. Bei Vorliegen eines Strangulationsileus steigt die Mortalitätsrate auf 20 % bis 75,5 % an ⁽⁸¹⁾. Der Ileus ist für ca. 20% aller Vorstellungen von Patienten mit einem akuten Abdomen in chirurgischen Kliniken verantwortlich ⁽⁸²⁾. Unbehandelt ist ein kompletter Darmverschluss annähernd immer tödlich, weshalb eine solche Diagnose eine Indikation zur Operation darstellt.

1.7 Ziele und Hypothese

Das klinische Krankheitsbild des mechanischen Ileus ist hinreichend bekannt und in Übersichtsarbeiten und Lehrbüchern detailliert charakterisiert ^(2, 3, 4). Die pathophysiologischen Veränderungen auf mikroskopischer, molekularer und funktioneller Ebene sind hingegen wenig untersucht und kaum verstanden. Durch die Arbeit von X. Zhao konnten bereits Erkenntnisse zu pathophysiologischen Veränderungen des prästenotischen Darmabschnittes gewonnen werden ⁽⁸³⁾. Dabei wurde gezeigt, dass die prästenotischen Abschnitte eines mechanischen Ileus massive Veränderungen der Darmwand in Richtung einer Entzündung aufweisen und dass es zudem zu Veränderungen der Sensibilität von intestinalen afferenten Nervenfasern auf chemische und mechanische Reize kommt.

Koscielny et al. konnten zeigen, dass die mechanische Manipulation eines Darmabschnittes über den Chemokin- Rezeptor CCR7 eine Entzündung des gesamten Intestinums auslösen kann (gastrointestinal field effect) ⁽⁸⁴⁾. Dieser field effect (FE) spielt vornehmlich in der Pathogenese eines postoperativen Ileus eine Rolle. Die Manipulation des Darmes bewirkt eine vermehrte Ausschüttung von IL-6, TNF sowie nitric oxide und Prostaglandinen, welche eine Leukozytenmigration in die Darmwand und eine Hemmung der Darmkontraktilität nach sich ziehen ⁽⁸⁵⁾.

Dieser beobachtete FE scheint auch beim mechanischen Ileus eine Rolle zu spielen. Sollte dies der Fall sein, ist es gut möglich, dass die Entzündungsreaktion der Darmwand auch auf das poststenotische Darmsegment übertritt. Dadurch sollte auch die intestinale afferente

Nervensensibilität in gleicher Weise verändert sein wie im prästenotischen Darmabschnitt bereits beschrieben.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Barrierefunktion der Darmschleimhaut. Im klinischen Alltag beobachten wir häufig, dass es durch die mechanische Obstruktion zu einer Translokation von Bakterien und ihren Zerfallsprodukten in das umliegende Gewebe, der Peritonealhöhle und die Blutbahn kommt. Dies mündet, falls nicht rechtzeitig behandelt, in einer Sepsis und stellt eine ernst zu nehmende Komplikation eines Darmverschlusses dar. Der genaue pathophysiologische Mechanismus ist unklar. In Sepsismodellen und Modellen wo ein thermischer Schaden induziert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Darmwandpermeabilität für kleine Makromoleküle im Falle einer Entzündungsreaktion erhöht ist ^(44,86,87). Dies könnte auch ein möglicher Erklärungsansatz bei Vorliegen eines mechanischen Ileus sein. Man könnte sich vorstellen, dass sich die Durchlässigkeit der Darmwand für Makromoleküle bei Obstruktionspatienten durch die zunehmende Stase und Darmdistension im Laufe der Zeit erhöht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, im poststenotischen Darmabschnitt beim mechanischen Ileus die afferente intestinale Nervensensibilität, morphologische Veränderungen der Darmwand und deren Permeabilität zu untersuchen.

Konkret sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Wie veränderte sich die intestinale afferente Nervenübertragung im poststenotischen Darmabschnitt im Vergleich zum prästenotischen Abschnitt in X. Zhaos Arbeit?
- Wie veränderte sich die mikroskopische und makroskopische Darmmorphologie des poststenotischen Darmabschnittes im Verlauf des mechanischen Ileus?
- Wie veränderte sich die Darmwandpermeabilität im Laufe eines mechanischen Ileus?
- Welche Schlussfolgerungen lassen sich aus den Vergleichen der Ergebnisse beider Arbeiten auf den pathophysiologischen Mechanismus in seiner Gesamtheit schließen?

2 Versuchstiere, Methoden und Geräte

2.1 Versuchstiere

Zur Durchführung der Versuche wurden männliche C57 Black 6 Mäuse verwendet. Die Mäuse waren zwischen 6 und 8 Wochen alt und ausschließlich männlichen Geschlechts und wogen in der Regel zwischen 20 und 30 g.

Die Mäuse befanden sich vor und nach den Operationen in einem Tierstall, wo ein 12-stündiger Licht/Dunkel- Rhythmus herrschte. Die Laborkost aus Trockenfutter entsprach den Standards, die bei der Haltung von Versuchsmäusen vorherrschten. Die Tierversuche waren durch die Regierung von Oberbayern gemäß des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) genehmigt.

Vor Inzision der unten genannten Operationen erhielten die Versuchstiere zur Analgesie Lidocain s.c. (2%-ig in einer Dosierung von 1 ml/4 kg KG). Die post-operative Analgesie erfolgte alle 4-6 h mittels Metamizol p.o. in einer Dosierung von 200 mg/kg. Auf die Anwendung von NSAR wurde bewusst verzichtet, da die antiphlogistische Wirkung die Ergebnisse der intestinalen Entzündungsreaktion verfälscht hätte.

2.2 Versuchsmethoden

2.2.1 Versuchsprotokoll

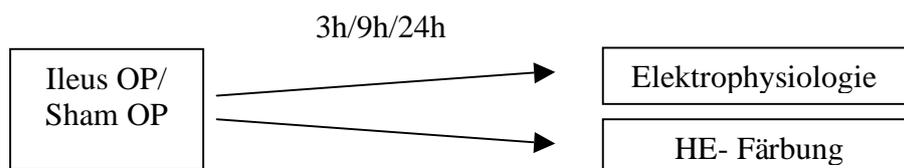
Elektrophysiologie und H&E Färbung

Nach Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte entweder die Induktion eines kompletten Ileus durch Ligatur des Dünndarms ca. 5 cm proximal der Ileozökalklappe oder eine Scheinoperation (im Folgenden als Shamoperation bezeichnet). Die scheinoperierten Mäuse galten als Kontrollgruppe.

Das Versuchsprotokoll für die Elektrophysiologie und die H&E Färbung sah sechs Versuchsgruppen mit jeweils 6 Mäusen vor. Der Versuch wurde bei der jeweiligen Gruppe nach 3, 9 und 24 Stunden beendet. Für jede Ileus- Gruppe war eine Kontrollgruppe vorgesehen. Nach Beendigung des Versuches erfolgte die Entnahme der Gewebeproben, welche der H&E Färbung und dem elektrophysiologischen Versuchsaufbau zugeführt wurden (siehe Tabelle 1 und Abbildung 2)

Tabelle 1: Übersicht über die Versuchsgruppen für die Elektrophysiologie und HE Färbung

Versuchsgruppen	Shamoperation	Ileusoperation
Versuchsdauer	3 h (n=6)	3 h (n=6)
	9 h (n=6)	9 h (n=6)
	24 h (n=6)	24 h (n=6)

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Elektrophysiologie und HE Färbung

Permeabilitätsmessung

Wie oben beschrieben, erforderte auch dieses Protokoll bei jeder Maus die Eröffnung der Bauchhöhle. Anschließend wurde entweder ein Ileus induziert oder eine Shamoperation durchgeführt.

Auch für die Permeabilitätsmessung wurden drei Versuchsgruppen je Obstruktionszeit gebildet. Für jede Versuchsgruppe gab es eine entsprechende Kontrollgruppe (N=4) (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Shamoperation	Ileusoperation
Versuchsdauer	3 h (n=4)	3 h (n=4)
	9 h (n=4)	9 h (n=4)
	24 h (n=4)	24 h (n=4)

Im Rahmen der Kurzzeitnarkose wurde allen Mäusen kurz vor der Operation sowohl HRP als auch FITC-dextran mittels einer Gavage in den Magen zugeführt. Die beiden Marker befanden sich in einem Applikationsvolumen von 20ml/kg auf der Basis einer phosphat-

gepufferten NaCl Lösung mit einem pH von 7,4. Das Gemisch enthielt FITC- dextran in einer Konzentration von 22mg/ml und Horseradish peroxidase in einer Konzentration von 1mg/ml. Fluorescein isothiocyanate konjugiertes Dextran (FITC-dextran) hatte ein Molekulargewicht von 4,4 kD; Horseradish Peroxidase (HRP) ein Molekulargewicht von 40 kD. Vor der intragastralen Substanzgabe wurde das Gewicht der Versuchstiere korrekt gemessen und die Menge der zugegebenen Lösung berechnet. Eine Tabelle über die Substanzzusammensetzung für die Gavage-Lösung wird im Folgenden gegeben (Tabelle 3).

Tabelle 3: Bestandteil der Gavage-Lösung

Phosphat-gepuffertes NaCl (PH 7.4)	20ml/kg
FITC-dextran, molecular mass 4.4 kDa	22mg/ml
HRP, molecular mass 40kDa	1mg/ml

Vor der Sondierung wurde die Maus ebenfalls mit Inhalation von Isofluran tief anästhesiert. Ihr Kopf wurde dabei leicht nach hinten überstreckt und dann eine 6 cm lange gerade Knopfkanüle über die Schnauze in den Magen eingeführt wurde, wodurch die Gavage-Lösung direkt im Magen des Tieres eingespritzt werden konnten. Alle Versuchsmäuse wachten innerhalb von 2 Minuten aus der Narkose auf. Störungen der Nahrungsaufnahme nach dem Gavage waren nicht zu beobachten. Eine Stunde nach der Sondierung erfolgte die Operation zur Induktion des mechanischen Ileus. Nach Gabe der Testmarker und Operation erfolgte nach verschiedenen Zeitpunkten die Konzentrationsbestimmung der Marker im Serum mittels Spectrophotofluorometrie (Infinite F 200 TECAN). Ein Überblick des Versuchsablaufs ist nachfolgend dargestellt (Abbildung 3):

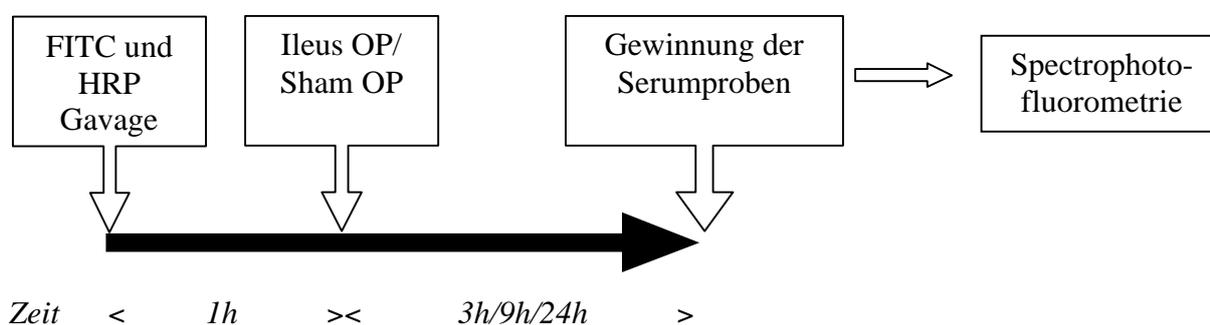


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Permeabilitätsmessung

2.2.2 Induktion des mechanischen Ileus

Vor Beginn der Operation wurde das Operationsbesteck, bestehend aus einer feinen Gewebeschere, einer feinen anatomischen Pinzette und einem Nadelhalter, gründlich mit Ethanol desinfiziert und anschließend an der Luft getrocknet.

Bei Operation befanden sich die Mäuse in einer Isofluran Kurznaarkose. Zur Einleitung der Naarkose wurden die Mäuse in ein Glas gesetzt, an dessen Boden sich eine mit 1ml Isofluran befeuchtete Kompresse befand. Nach 20 bis 30 Sekunden wurden die betäubten Mäuse aus dem Glas entnommen und mit Tesafilm auf einer Korkmatte fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Naarkose bekamen die Mäuse wieder Isofluran per inhalationem, wozu eine mit Watte ausgestopfte 5 ml Spritze diente, die den Mäusen auf die Schnauze aufgesetzt wurde.

Vor Inzision erfolgte zur Analgesie per Injektion mit Lidocain s.c. im Bereich der Bauchwand. Zur Einleitung eines mechanischen Ileus wurden die Mäuse nun längslaparotomiert. Es folgte zunächst die Eröffnung der Haut mit einer Schere, anschließend wurde das Peritoneum parietale ebenfalls längs eröffnet. Mit Hilfe zweier Wattestäbchen wurde das Zökum aufgesucht und dann außerhalb der Bauchhöhle auf eine feuchte Kompresse gelegt. Nun wurde das gesamte Intestinum exponiert bis zu einem Punkt, der sich ca. 5 cm proximal der Ileozökalklappe befand. Der gesamte Darm wurde während der Operation mit Krebslösung feucht gehalten. Um Druckschädigungen des Darmes zu vermeiden, wurde der Darm so wenig wie möglich manipuliert; der direkte Kontakt der Finger mit dem Darm wurde stets unterlassen. Im Abstand von ca. 4-5 cm von der Ileozökalklappe wurde bei den Ileusmäusen mit einem 4-0 Prolenefaden eine Ligatur zum Verschluss des Darmlumens gesetzt, während die Sham operierten Mäusen (Shammäuse) keine Ligatur erhielten.

Bei allen Versuchsgruppen wurde der Darm reponiert. Der Wundverschluss wurde mit 5-0 Prolene Nahtmaterial getätigt. Die Naht erfolgte schichtweise und fortlaufend.

Postoperativ wurden die Versuchstiere auf einer ca. 37 °C warmen Platte überwacht, um eine postoperative Hypothermie zu vermeiden.

Zur post-operativen Analgesie erhielten die Tiere alle 4-6 h Metamizol, welches mittels Mikropipette oral eingegeben wurde.

2.2.3 Gewebe- und Blutentnahme und Aufarbeitung

Entnahme des Darmsegmentes für die elektrophysiologische Ableitung

Zur Probeentnahme wurden die Mäuse aller Gruppen wie schon bei der ersten Operation mit Isofluran sediert. Es erfolgte die Wiedereröffnung der Bauchhöhle. Anschließend wurde der Darm exponiert. Bei den Mäusen der Ileus- Gruppen wurde der poststenotische Darmabschnitt entfernt, welcher typischerweise zwischen 3 und 4 cm lang war. Die Durchtrennung des Darmes erfolgte auf der proximalen Seite ca. einen halben cm von der Ligatur und auf der distalen Seite ca. 1,5 bis 2 cm von der Ileozökalklappe entfernt. Bei den Mäusen der Shamgruppen wurde das Darmstück entnommen, welches sich anatomisch betrachtet an der gleichen Stelle wie der poststenotische Darmabschnitt bei den Mäusen der Ileus- Gruppen befand. Die entnommenen Darmabschnitte wurden mitsamt ihrem Mesenterium entfernt und direkt im Anschluss in einer Krebslösung mit Raumtemperatur aufbewahrt. Mit einer Braunüle wurden die Darmstücke sondiert und mit Krebs- Lösung durchgespült. Dabei galt es zu beachten, dass der entnommene Darmabschnitt nur an seinen Enden mit der Pinzette festgehalten wurde, um eine Druckschädigung der Darmwand und der Darmnerven zu vermeiden.

Entnahme des Darmsegments für die H&E Färbung:

Nach der Entnahme der Darmstücke für die Elektrophysiologie wurde ein weiteres Darmstück für die histologische Aufarbeitung entnommen. Die Darmstücke waren im Schnitt 0,5- 1 cm lang. Die Darmdurchtrennung befand sich auf proximaler Seite ca. 3-3,5 cm von der Ligatur entfernt. Auf der distalen Seite wurde ein Abstand von ca. 0,5 cm zur Ileozökalklappe gewahrt. Das 0,5- 1 cm lange Darmsegment wurde im Gegensatz zum Darmsegment für die elektrophysiologische Untersuchung vom seinem Darmmesenterium und dem anhängenden Bindegewebe getrennt. Die Darmstücke wurden mit Krebs-Lösung gespült, um den im Darm befindlichen Kot und das Darmsekret zu entfernen. Anschließend wurden die Darmstücke mit einer feinen Schere der Länge nach aufgeschnitten und mit Metallspänen auf einem runden Korkmättchen einen cm Durchmesser aufgespannt. Die Mukosa zeigt beim Aufspannen nach oben.

Gewinnung der Serumproben für die FITC und HRP Messung

Die Blutabnahme erfolgte kurz vor der Tötung der Mäuse nach 3, 9 und 24 Stunden durch Punktion der Vena cava inferior oder des Herzens mithilfe einer dünnen Kanüle in tiefer Narkose. Zunächst musste der Thorax eröffnet werden, um anschließend das Mediastinum inklusive des Herzens frei zu präparieren. Mit einer dünnen Kanüle, die mit einer 1 ml Spritze verbunden war, wurde abwechselnd direkt eine der beiden Herzkammern oder die Vena cava inferior punktiert. Für die Blutuntersuchungen wurden ca. 0,7 ml Vollblut benötigt. Das Vollblut wurde in ein kleines Eppendorf-Gefäß gegeben und unter Raumtemperatur ca. 45 bis 60 Minuten belassen. Das Vollblut wurde daraufhin bei 4 Grad Celsius für 20 min mit 3.000 rpm zentrifugiert. Das dadurch entstehende Serum (ca. 0,4 ml) wurde anschließend abpipettiert, wobei sorgfältig darauf geachtet wurde, dass das Plasma nicht mit zellulären Bestandteilen kontaminiert wurde. Das Plasma wurde im nächsten Schritt in 50 µl Phosphat gepufferter Natriumchlorid Lösung (pH=7,4) gelöst. Bis zur Durchführung der Spectrophotofluorometrie wurde es bei -20°C konserviert.

2.3 Nervenfaserableitung

2.3.1 Versuchsdurchführung

Der Versuchsaufbau für die elektrophysiologische Ableitung bestand aus einem Organbad bestehend aus zwei Kammern: eine 1 x 5 cm länglichen Kammer, in welche an beiden Enden zwei dünne Plastikrohre mündeten, und eine halbrunde Kammer mit einem Radius von 2 cm. Beide Kammern waren voneinander getrennt; lediglich eine kleine Einkerbung an der Oberseite der separierenden Wand stellte eine Verbindung der beiden Kammern dar und ermöglichte das Durchziehen des Darmmesenteriums von der länglichen Kammer in die runde Kammer. Der Darmabschnitt wurde mit seinen beiden Enden auf die zwei Plastikrohrenden mit einem Durchmesser von einem Millimeter gestülpt und mit gewöhnlichem Bindfaden festgebunden.

Die längliche Organkammer wurde durchweg mit Krebs'scher Lösung gespült. Der pH Sollwert war mit 7.4 eingestellt, weshalb die Lösung konstant mit O₂/CO₂ (95%/5%) oxygeniert wurde. Das Darmsegment wurde während der gesamten Versuchsdauer durch das zuführende Plastikrohr mit Krebslösung gespült. Die Geschwindigkeit der Spüllösung wurde durch eine Pumpe mit 10 ml/h reguliert. Dies simulierte die physiologische Nahrungspassage

bei Mäusen. Daher war es beim Einbringen des Darmsegmentes in das Organbad von Bedeutung, dass der orale Schenkel mit dem zuführenden Plastikschlauch verbunden wurde, damit eine orthograde Nahrungspassage *in vitro* simuliert werden konnte. Das abführende Plastikrohr war mit einem Silikonschlauch verbunden, welcher offen endete und sich mit einem Nadelhalter o.ä. abklemmen ließ, um den intraluminalen Druck zu erhöhen. Das Mesenterium wurde nun in die halbrunde Kammer gezogen und mit feinen Nadeln auf einer Silikonunterschicht aufgespannt und fixiert. Bei diesem Vorgang wurde sorgfältig darauf geachtet, dass nicht zu viel Zugspannung auf das Mesenterium ausgeübt wurde, da dies nervenschädigende Auswirkungen nach sich hätte ziehen können. Zur elektrischen Isolierung des Mesenteriums wurde die halbrunde Kammer mit Mineralöl aufgefüllt. Um einem Übertreten der Perfusionflüssigkeit aus der länglichen Kammer vorzubeugen, wurde an der Einkerbung, durch welche das Mesenterium verlief, ein Silikontropfen aufgebracht (Abbildung 4).

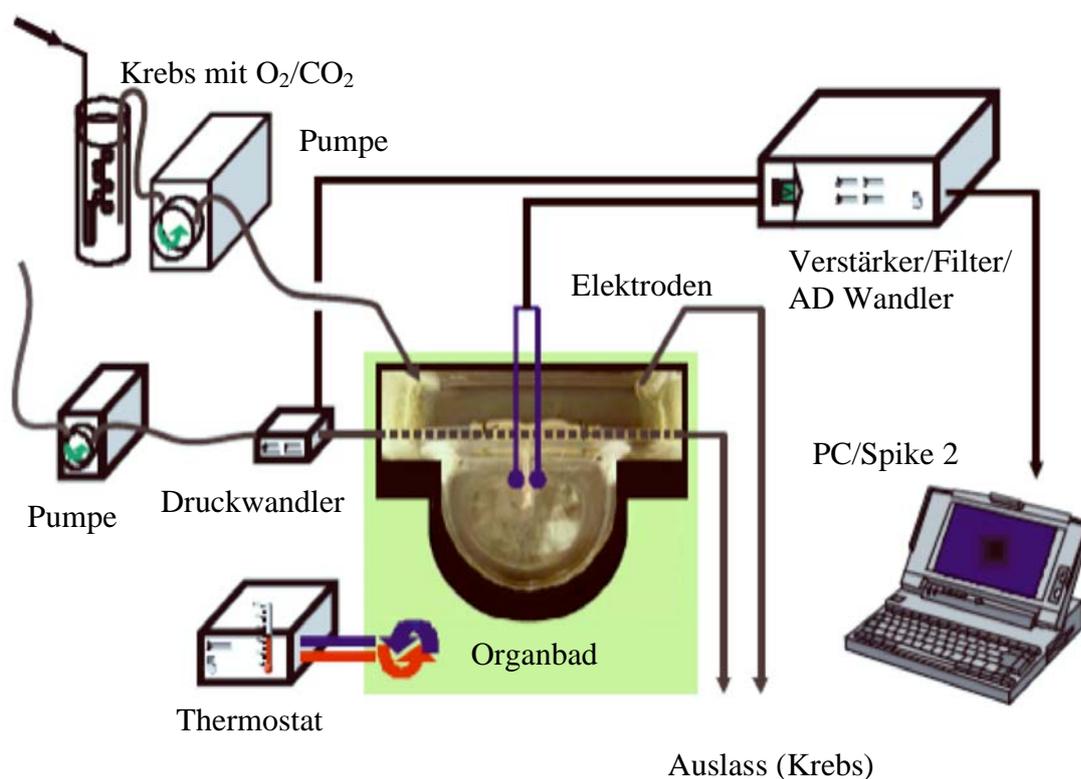


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Organbads für die elektrophysiologische Ableitung; mit freundlicher Genehmigung von X. Zhao

2.3.2 Versuchsprotokoll der elektrophysiologischen Ableitung

Sobald der Darmabschnitt und das Mesenterium in das Zweikammerbad eingefügt waren, wurde mit der Feinpräparation am Mesenterium begonnen. Hierfür war eine optische Vergrößerung mittels eines Auflichtmikroskopes vonnöten.

Die Zielsetzung war, einen geeigneten afferenten Nerv für die elektrophysiologische Ableitung zu finden. Dazu wurde das Mesenterium mit mehreren sehr dünnen Nadeln aufgespannt, bis die Mesenterialvene und -arterie zu erkennen waren.

Der Mesenterialnerv verläuft direkt in unmittelbarer in Nachbarschaft zur Arterie.

Das Gefäß/Nervenbündel wurde darum mit feinen Pinzetten aufgetrennt, bis Vene und Arterie voneinander getrennt waren. Nun erfolgte die Lösung des Nerven aus dem umliegenden Bindegewebe, wozu äußerste Vorsicht geboten war, um den Nerv nicht durch Zug zu verletzen.

Der freipräparierte Nerv konnte nun um den Schenkel einer doppelschenkligen Platinelektrode gewickelt werden, während der andere Schenkel mit einem Stück Bindegewebes des Mesenteriums verbunden wurde. Die Elektrode war direkt mit dem Signalverstärker und Signalfilter des Modells CED 1902 (Cambridge Electronic Design) verbunden. Dieser bewirkte eine 10.000fache Verstärkung des Nervensignals in einer Bandbreite von 100Hz - 1 kHz.

Ein weiterer CED 1902 Signalverstärker und Filter diente dazu, die Signale aus dem Druckabnehmer des zuführenden Perfusionsschenkels weiterzuleiten. Die Signale aus beiden Verstärkern wurden einem AD- Wandler 1401 (CED) zugeführt. Anschließend wurden die Signale an einen PC weitergeleitet, wo sie mit der Software Spike 2, Version 4.01, aufgezeichnet wurden.

2.4 HE- Färbung

Zur Untersuchung der intramuralen Entzündungsreaktion im Dünndarm wurden poststenotische Darmstücke entnommen und einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen.

Die HE Färbung ist eine der meist angewandten Färbemethode, um histopathologische Geschehen zu beurteilen. Durch die zweifache Färbung mit Hämalaun und Eosin können sowohl basophile als auch eosinophile Zell- und Gewebestrukturen dargestellt werden⁽⁸⁸⁾.

Nach Befestigung des entnommen Darmsegmentes auf dem Korkplättchen wurde der

Darmabschnitt in 4%iger, gepufferten Formaldehydlösung für 24 Stunden eingelegt. Danach wurde die Gewebeprobe dreimal aufeinander folgend mit normalem Leitungswasser gespült. Abschließend wurde das Gewebestück in 70%iger Ethanollösung konserviert.

An die Fixierung in Ethanollösung schloss sich das Einbetten der Proben in Paraffin an. Dafür mussten die Proben mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert werden. Die Proben wurden nacheinander für 60 min zuerst in 50%iger, dann in 70%iger, 96%iger und abschließend 3-mal in 100%iger Ethanollösung und abschließend 90 min in Xylol Lösung und 90 min in Paraplast eingelegt. Dann konnten die Gewebeproben in Paraffinblöcke eingebettet werden, welche nach Aushärtung mit einem Schlittenmikrotom in 4µm dünne Schichten geschnitten wurden.

In 35 Grad warmem Wasser wurden die Schnitte auf Objektträger gezogen und anschließend bei 37 Grad getrocknet.

Um die Schnitte auf die Färbung vorzubereiten, wurden sie zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Dieser Schritt dauerte insgesamt 45 min und bestand wie aus der Tabelle zu entnehmen aus sechs Einzelschritten.

Im Anschluss konnte mit der Färbung begonnen werden, die mit dem Benetzen der Probe für 30 s mit Hämalaun eingeleitet wurde. Im Anschluss wurde die Probe 10 min lang mit Leitungswasser gewässert, was einen Farbumschlag des Hämalauns von braun-rot zu blau durch die im Leitungswasser enthaltenen Spurenelemente verursachte. Die darauf folgende Färbung mit Eosin dauerte zwischen 30 s und einer Minute. Zum Schluss erfolgte unter Verwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe die Fixierung der Probe (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: *Aufbereitung der Darmsegmente für die HE Färbung*

Arbeitsschritte	Verwendete Chemikalien	Dauer der Prozedur
Konservierung	4%ige Formaldehydlösung	24 h
Spülung	Wasser	3 x 20 min
Enwässerung	Ethanol 50%	60 min
	Ethanol 70%	60 min
	Ethanol 96 %	60 min
	Ethanol 100%	3 x 60 min
	Xylol	90 min
	Paraplast	90 min
Einbettung in Paraffin und Aushärtung	Paraffin	5min

Entparaffinieren in der absteigenden Alkoholreihe	Xylol 1	15 min
	Xylol 2	15 min
	Ethanol 100%	5 min
	Ethanol 96%	5 min
	Ethanol 70 %	5 min
	Aqua dest.	10 sec
Färbung mit Hämalaun und Eosin	Hämalaun	30 sec
	Leitungswasser	10 min
	Eosin	10 min
	Leitungswasser	3 min
Fixierung in der aufsteigenden Alkoholreihe	Ethanol 70%	3 min
	Ethanol 96%	3 min
	Ethanol 100%	5 min
	Xylol 1	10 min
	Xylol 2	10 min

2.5 Permeabilitätsmessung

2.5.1 Grundlagen und Prinzip des Versuches

Die Permeabilitätsmessung ist eine Methode, um die Barrierefunktion der Dünndarmschleimhaut in vivo zu untersuchen. Zur Überprüfung der intestinalen Permeabilität diente der Nachweis von horseradish peroxidase (HRP) und fluorescein isothiocyanat conjugated dextran (FITC- dextran) im Blut der Versuchstiere, nachdem diese die Marker zuvor per os per Gavage aufgenommen hatten. Normalerweise werden die beiden oben genannten Substanzen nicht über die Darmwand transportiert. Kommt es jedoch zu einer Permeabilitätsstörung der Darmwand infolge von Darmwandnekrosen, Darmwandödemen o.ä., dann treten diese Substanzen in das Blut der Versuchstiere über und lassen sich aus diesem bestimmen. Der Grad der Anreicherung der beiden Substanzen im Blut gibt gleichzeitig Auskunft darüber, wie groß die Menge der aufgenommenen Substanz ist. Zusätzlich ist es möglich, durch mehrere Versuchsgruppen eine zeitliche Dynamik des Aufnahmevorgangs festzustellen, um dadurch den Grad der Darmwandschädigung im zeitlichen Verlauf darzustellen.

Prinzip des Versuchs

Dem Versuch liegt die Annahme zu Grunde, dass die Permeabilität der Darmschleimhaut für Moleküle unterschiedlicher Größe infolge einer Schädigung der Darmmukosa zunimmt. Um einen Darmwandschaden infolge von Obstruktion des Darmlumens zu entdecken und zu bestimmen, wurde im Versuch die Translokation zweier Testmarker vom Darm ins Blut mittels direkter Immunoassay-Verfahren untersucht.

Bei dem Immunoassay war eine Mikroplatte mit hochspezifischen Antikörpern beschichtet (anti goat antibodies). Diese Antikörper sind gegen das Enzym horseradish peroxidase gerichtet. Zunächst wurde die Konzentration des in das Blut übergetretenen FITC- dextran mittels spectrophotometrischer Anregung gemessen. Je mehr FITC- dextran in das Blut übergegangen war, desto stärker war die Lichtemission nach Anregung des FITC- dextran mit einer bestimmten Wellenlänge. Anschließend wurde das FITC- dextran entfernt, um die Menge des im Blut enthaltenen HPs zu bestimmen. Je mehr Antigen, in unserem Fall HRP, in der Probelösung vorhanden war, desto mehr wurde an den Antikörpern gebunden. Ein farbloses Substrat (Farbstoff + Peroxid) wurde hinzugefügt, das durch Katalyse des antikörpergebundenen Enzyms (HRP) zu einem blauen Farbstoff reagiert. Nach Stoppen der Farbreaktion mit Säure schlug die Farbe von blau nach gelb um, und die Farbintensität (Absorption) wurde bei 450-550 nm mit einem ELISA-Reader gemessen⁽⁸⁹⁾. Die schematische Darstellung des experimentalen Prinzips wird nachfolgend gegeben (Abbildung 5):

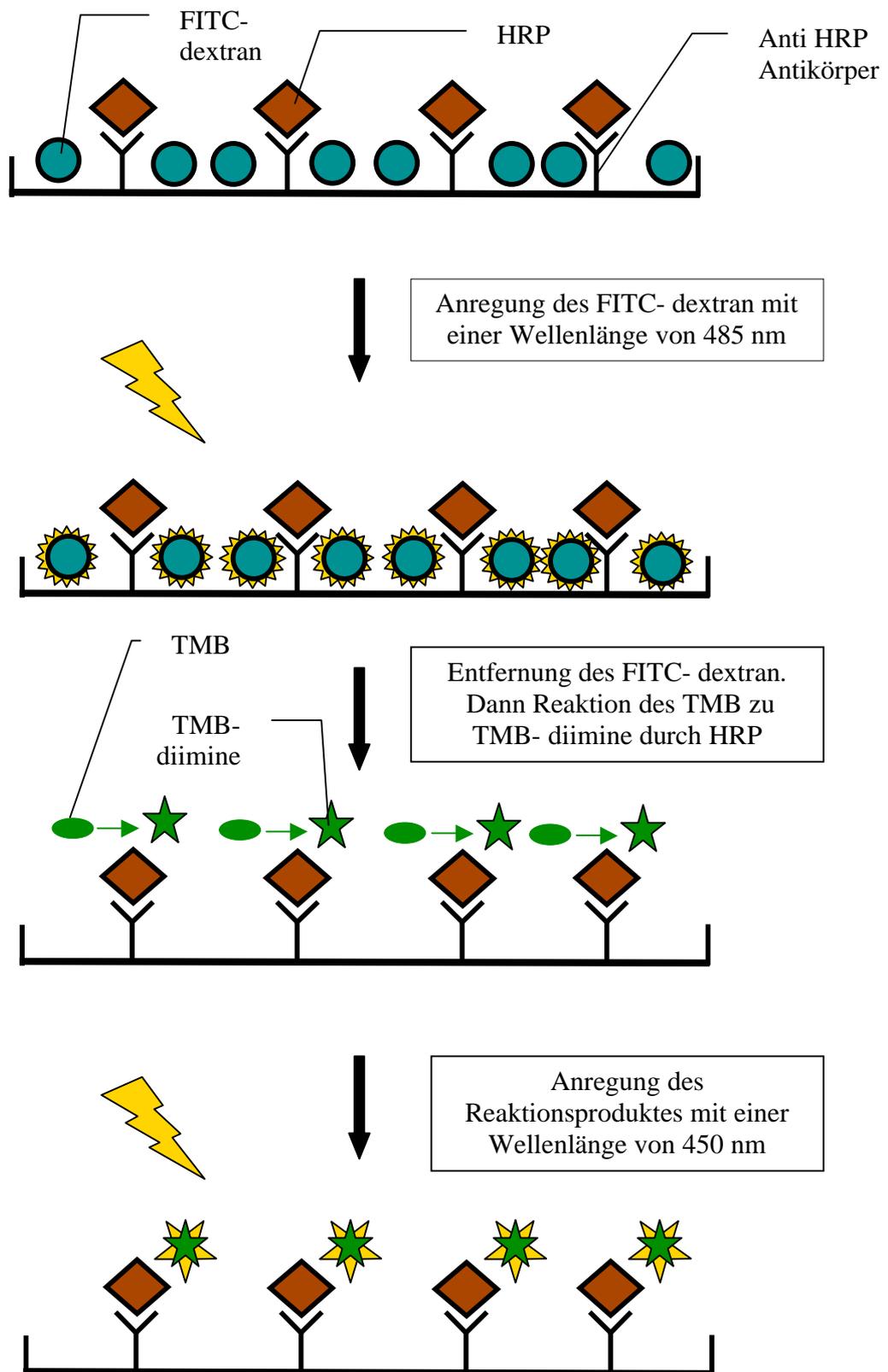


Abbildung 5: Schematische Darstellung des experimentalen Prinzips des Immunoessays

2.5.2 Versuchsdurchführung

Ziel der Permeabilitätsmessung war die Bestimmung der Konzentration von FITC-dextran und HRP im Serum des Versuchstieres. Dazu wurde eine 96-Well-Mikroplatte mit goat anti-HRP Antikörper (1: 1000) beschichtet und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Vor Durchführung des ELISA erfolgte zuerst das Auftauen der Plasmaproben. Dann wurden das Versuchsplasma (50 µl) in 50 µl phosphat gepuffertem NaCl (PBS pH 7.4) gelöst und in die Kammern der 96-Well-Mikroplatte pipettiert. Die Mikroplatte wurde nun direkt in einem Spectrophotofluometer platziert, damit die Aktivität von Fluorescein im Versuchsserum bei einer Anregungswellenlänge auf 485 nm (20 nm Bandbreite) und einer Emissionswellenlänge auf 530 nm (25 nm Bandbreite) quantifiziert werden konnte. Parallel wurden zur Erzeugung einer Standardkurve Lösungen mit bekannter Konzentration von FITC-dextran und HRP (Antigen) aufgetragen. Unmittelbar danach wurde die Mikroplatte mit Proben der zu bestimmenden Sera bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die ungebundenen Antigene von der Platte dreimal mit Tris-buffered saline (TBS pH 7.6) und 0.2% Tween® 20 gewaschen, während die an die Antikörper gebundenen HRP Moleküle in den Wells haften blieben. Im letzten Schritt wurde 100µl Reagenz von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB One-Step Substrate System) in die Wells pipettiert. Das an den Nachweisantikörper gekoppelte Enzym (HRP) setzt das Substrat in ein farbiges Produkt umsetzte (Farbreaktion). Das TMB wurde bei dieser Reaktion zu 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine diimine oxidiert und nahm einen blauen Farbton an. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde die Umsetzung des Substrats durch die Zugabe von 100µl 2N H₂SO₄ gestoppt (pH-abhängige Enzymreaktion)⁽⁹⁰⁾, wodurch das TMB eine gelbliche Farbe annahm. Die bis dahin umgesetzte Menge von Substrat zu Farbstoff war proportional zu der Menge der am Antikörper gebundenen HRP. Spectrophotometrisch wurde nun die Farbintensität der einzelnen Proben bei Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

Anhand der Proben mit bekannter FITC-dextran- sowie HRP-Konzentration wurden die Standardkurven erstellt. Mit Hilfe dieser Standardkurven wurden die Konzentrationen von FITC-dextran und HRP in den einzelnen Proben ermittelt. Ein Überblick über das Versuchsprotokoll des Immunoassays liefert Tabelle 5:

Tabelle 5: *Versuchsprotokoll des Immunoassays*

1.	96-Well-Mikroplatte mit goat anti-HRP Antikörper (1: 1000) beschichten
2.	Serumproben auftauen
3.	Proben (50 µl) mit 50 µl PBS (pH 7.4) lösen und in die Platte pipettieren.
4.	Quantifizieren der Konzentration von Fluoresceins mittels Spectrophotometrie bei einer Anregungswellenlänge auf 485 nm (20 nm Bandbreite) und einer Emissionswellenlänge auf 530 nm (25 nm Bandbreite)
5.	Inkubation der Mikroplatten bei 37°C für 2 Stunden
6.	- TBS (pH 7.6) mit 0.2% Tween® 20 mischen - Die Wells 3x mit der Mischung Waschen zur Beseitigung der ungebundenen FITC- Moleküle
7.	- 100µl von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in die Wells pipettieren - Die Mikroplatte für 15 Minuten bei 37°C inkubieren
8.	Reaktion mit 100µl 2N H ₂ SO ₄ stoppen
9.	Farbintensität der einzelnen Proben Spectrophotometrisch bei Wellenlänge von 450 nm bestimmen
10.	Konzentrationen von FTIC-dextran und HRP mittels der Standardkurven berechnen

2.6 Auswertung

2.6.1 Elektrophysiologie

Die Auswertung erforderte die Bestimmung der Nervenfaserruheaktivität (auch Baseline genannt, ausgedrückt in imp/sec) vor dem Setzen eines Reizes sowie die Bestimmung des maximalen Reizimpulses nach Setzen eines Reizes.

In jedem elektrophysiologischen Versuch wurden drei Reize gesetzt: Zu allererst erfolgte die Gabe von Serotonin (50 µM) in das Organbad. Nach 10 min Restabilisierungsphase der Nervenaktivität wurde die Darmdistension durchgeführt. Zuletzt erfolgte, wieder nach 10 min Pause, die Gabe von Bradykinin (0,5 µM). Die Nervenfaserruheaktivität war definiert als die höchste Impulsrate innerhalb der letzten 120 s vor Setzen eines Reizes. Der Zeitraum von 120

s war deshalb so gewählt, weil in dieser Zeitspanne die Perfusion des Organbads unterbrochen wurde, um eine mögliche Störung der Nervenfaserableitung zu vermeiden. In diesem Zeitraum von 120 s nach Setzen eines Reizes wurde auch die höchste Impulsrate bestimmt. Nach Serotonin- und Bradykinin- Gabe wurde deshalb jeweils ein Wert gemessen.

Bei der Darmdistension wurde hingegen pro Steigerung des intraluminalen Drucks um 10 cm H₂O die höchste Reizantwort gemessen. Aus dem höchsten Wert der Baseline und der maximalen Reizantwort wurde daraufhin ein Quotient gebildet, welcher im Weiteren als normalisierte Anstiegsrate bezeichnet wird.

Normalisierte Anstiegsrate = maximale Impulsrate nach Reiz/Baseline

Einen Überblick über das Versuchsprotokoll gibt Abbildung 6:

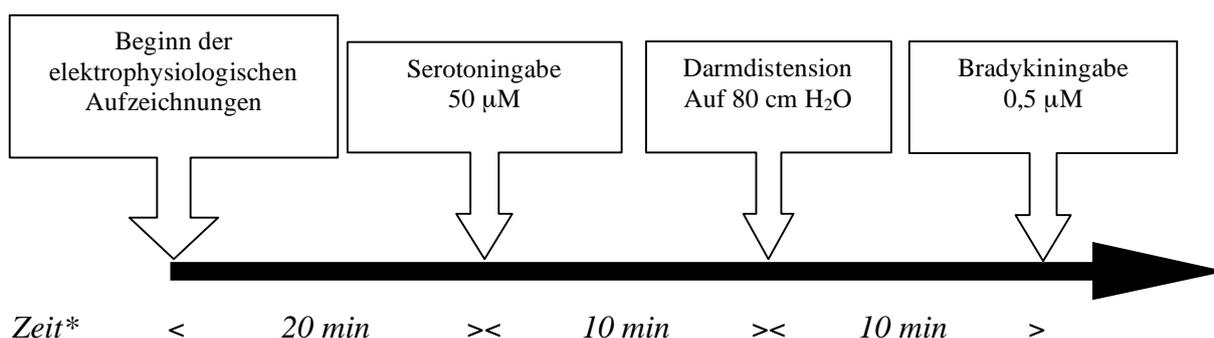


Abbildung 6: Versuchsprotokoll für die Elektrophysiologie (* Die Dauer zwischen den Gaben der verschiedenen Stoffe wurde so gewählt, bis sich die „Baseline“, die elektrische Grundaktivität des Nerven, wieder stabilisiert hatte)

2.6.2 HE Färbung

Die Beurteilung der histologischen Färbung erfolgte anhand eines von Hausmann et al. erstellten Scoring Systems⁽⁹¹⁾ (siehe Tabelle 6). Dieses beurteilt Epithelveränderungen am Grad des Becherzellverlustes und der Kryptenarchitektur sowie die Darmwandinfiltration durch Leukozyten. Das Scoring System wurde bereits in einer anderen Arbeit zur Beurteilung inflammatorischer Reaktionen am murinen Dünndarm herangezogen⁽⁹²⁾.

Der Gesamtscore wurde aus den Einzelscores beider Kategorien berechnet. Der maximal zu erreichende Scoring Wert betrug somit 8, der niedrigste 0.

Die histologischen Präparate wurden unter einem Mikroskop beurteilt. Die Auswertung erfolgte bei 10- facher, 20- facher und 40- facher Vergrößerung.

Tabelle 6: *Histologischer Score zur Bestimmung des Entzündungsgrades nach Hausmann et al.*

Epithel	Scoring Wert
Normale physiologische Morphologie	0
Verlust der Becherzellen an wenigen Stellen	1
Weitreichender Verlust der Becherzellen in den meisten Darmsektionen	2
Verlust der Krypten	3
Weitreichender Verlust der Krypten in den meisten Darmsektionen	4
Infiltration	
Kein Infiltrat	0
Infiltration im Bereich der Kryptenbasis	1
Infiltration bis in die Lamina muscularis mucosae	2
Weitreichende Infiltration bis in die Lamina muscularis mucosae und Verdickung der Mukosa mit schwerem Mukosaödem	3
Infiltration der Lamina submucosa	4

2.6.3 Permeabilitätsmessungen

Für die Auswertung der Testergebnisse wurde zunächst eine Eichkurve erstellt, damit die Konzentrationen von FITC-dextran und HRP in den Versuchsproben in ng/ml ermittelt werden konnte. Mittels der spectrophotometrisch abgelesenen OD-Werte und ihrer entsprechenden bekannten Antigenkonzentrationen wurden nun die Standardkurven für FITC-dextran und HRP erstellt und nachfolgend dargestellt (Y-Achse: OD; X-Achse: Antigenkonzentration in den einzelnen Verdünnungsstufen; siehe Abb 7 und 8).

Nach der Erstellung der Eichkurven wurde automatisch eine Trendlinie durch die Messpunkte gezogen und das Bestimmtheitsmaß wurde als Formel im Diagramm dargestellt. Mit Hilfe dieser Formel konnten letztendlich alle Daten von Farbeintensität nach Konzentration umgerechnet werden.

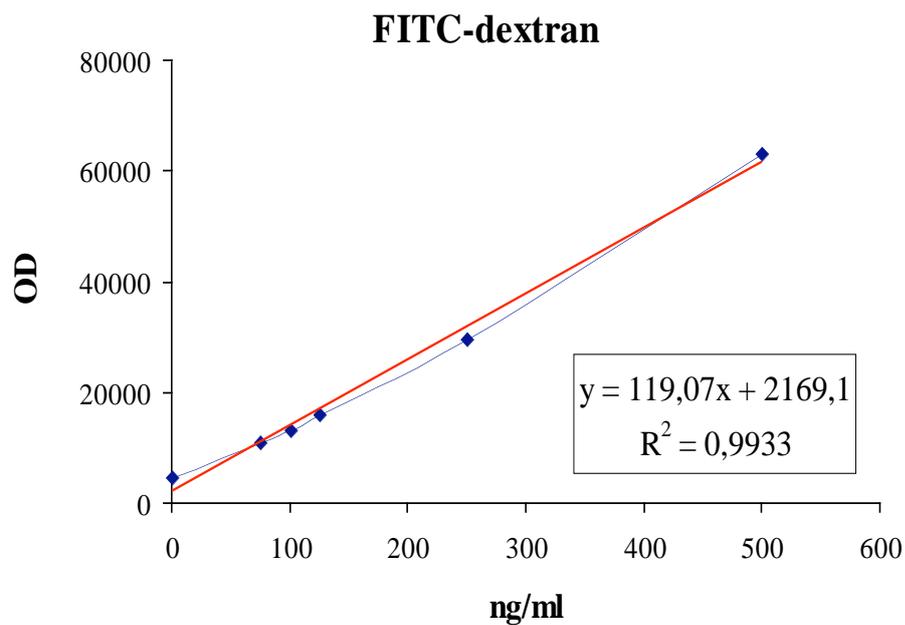


Abbildung 7: Standardkurve für FITC-dextran, OD: „optical density“ = $\log(I_0/I)$

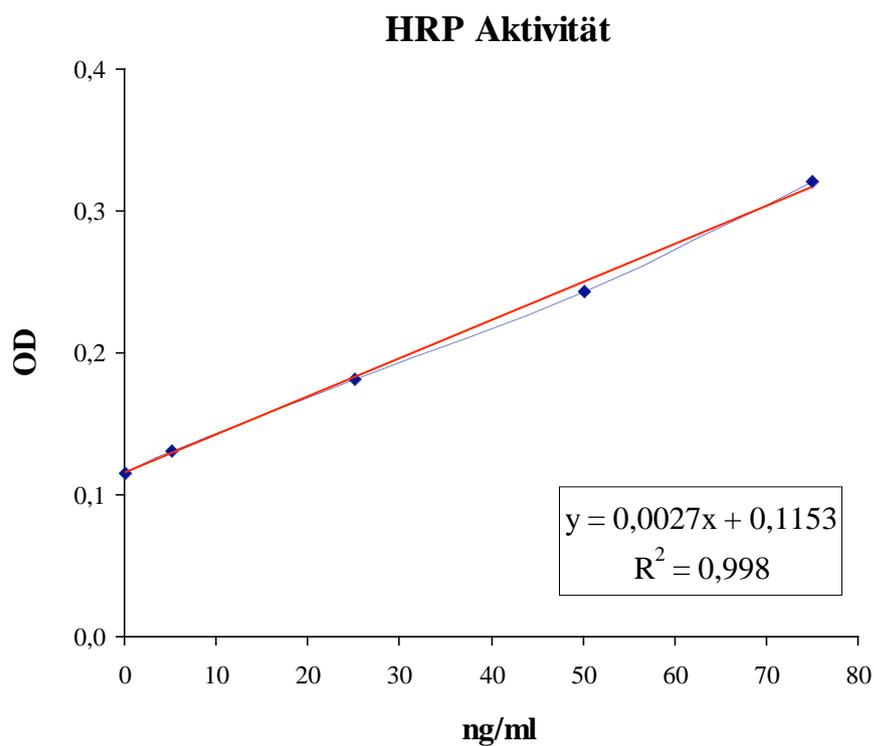


Abbildung 8: Standardkurve für HRP, OD: „optical density“ = $\log(I_0/I)$

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit Hilfe von one-way ANOVA, post-hoc Holm Sidak Test und Dunn`s Test. Hierfür wurde das Statistik-Programm Sigma-Stat (Version 3.0) verwendet. Für alle Ergebnisse wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Die Ergebnisse der Ileusgruppen und Kontrollgruppen wurden immer auf Signifikanz untersucht, wobei als Signifikanzunterschied p kleiner 0,05 vorausgesetzt wurde und die Fallzahl in den zu vergleichenden Gruppen gleich war.

2.8 Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen

2.8.1 Geräte und Chemikalien

Tabelle 7: Geräte

1.	96-Well-Mikroplatte	STRSTEDT Inc.; Newton; USA
2.	AD-Wandler 1401	CED; Cambridge Electronic Design; England
3.	Carbogengas	Linde AG; Höllriegelskreuth; Deutschland
4.	Computer	Fujitsu Siemens Computers GmbH; München; Deutschland
5.	Druckaufnehmer (Neurolog pressure amplifier NL 108)	Digitimer Ltd.; Hertfordshire; England
6.	Einmalspritzen 50 μ l, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml	BD Becton Dickinson GmbH; Heidelberg; Deutschland
7.	Eppendorfgefäßen	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Wesseling-Berzdorf; Deutschland
8.	Filter und Verstärker 1902	CED; Cambridge Electronic Design; England
9.	Glaspipetten	BRAND GmbH & Co KG; Wertheim; Deutschland
10.	Handschuhen	Semperit Technische Produkte GmbH; Wien; Österreich
11.	Infinite F 200 TECAN;	Tecan Group Ltd.; Männedorf; Deutschland

12.	Knopfkanüle Ø 1,5 x 60 mm - gerade	Mercateo AG; Köthen; Deutschland
13.	Mineralöl	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen; Deutschland
14.	Mullkompressen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH; Wetter; Deutschland
15.	Nahtmaterial	Ethicon Johnson & Johnson GmbH; Norderstedt; Deutschland
16.	Perfusionspumpe (IVAC 711)	IVAC Corporation; San Diego; USA
17.	Peristaltische Pumpen (Minipuls 3)	Gilson Inc.; Middleton; USA
18.	Pipetten	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Wesseling-Berzdorf; Deutschland
19.	Platinumdraht	Goodfellow GmbH; Bad Nauheim; Deutschland
20.	Präparationspinzetten	Fine Science Tools GmbH; Heidelberg; Deutschland
21.	Roti-Histokitt	Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe; Deutschland
22.	Silikon-Hochvakuumfett	DRAWIN Vertriebs-GmbH; Ottobrunn; Deutschland
23.	Software Spike 2	CED; Cambridge Electronic Design; England
24.	Sylgard	DOW Corning GmbH Wiesbaden; Wiesbaden; Deutschland
25.	Versuchstiere	Charles River GmbH; Sulzfeld; Deutschland
26.	Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH; Wetter / Ruhr; Deutschland
26.	Zentrifuge	Thermo Scientific; Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 8: Chemikalien

1.	Aceton	
2.	Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland

3.	Anti-Goat IgG antibody	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen bei München
4.	Bradykinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
5.	CaCl ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
6.	Eosin 2%	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
7.	Ethanol	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
8.	FITC-dextran (4,4 kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen bei München
9.	Hämalaun	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
10.	Horseradish Peroxidase (40 kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen bei München
11.	Isofluran	Abbott GmbH & Co KG; Wiesbaden; Deutschland
12.	KCl	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
13.	KH ₂ PO ₄	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
14.	Lidocainhydrochlorid 2 %	Bela-pharm GmbH & Co. KG
15.	MgSO ₄	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
16.	Metamizol Lösung. 500 mg/ml	Vetalgin ® 500 mg/ml MSD Animal Health
17.	Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
18.	NaCl	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
19.	NaH ₂ PO ₄	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
20.	NaHCO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
21.	Natriumchloridlösung	B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland
22.	PBS Buffer (pH 7,4) 10x	Life Technologies GmbH; Darmstadt, Deutschland
23.	Serotonin (5-HT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
24.	100% Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
25.	3,3,5,5-Tetramethyl-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH;

	benzidine	Taufkirchen bei München
26.	TRIS HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
27.	TRIS NaOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
28.	Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
29.	Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe; Deutschland
30.	Xylol	Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe; Deutschland

2.8.2 Lösungen

Tabelle 9: Zusammensetzung der 10x Kreb's-Lösung

1.	Aqua dest.	2725 ml
2.	CaCl ₂	9,15 g
3.	KCl	11,5 g
4.	KH ₂ PO ₄	5,275 g
5.	MgSO ₄	9,55 g
6.	NaCl	225 g

Tabelle 10: Zusammensetzung der Kreb's-Lösung

1.	10x Stock Solution	200 ml
2.	Aqua dest.	2185 ml
3.	Glucose	3,6 g
4.	NaHCO ₃	5,15 g

Tabelle 11: Zusammensetzung der TBS-Lösung (pH 7,6)

1.	Aqua dest.	700 ml
2.	TRIS HCl	66,1 g
3.	TRIS NaOH	9,7 g

4.	Aqua dest.	Auffüllen auf 1 L
5.	Filtern	
6.	pH-Einstellung auf pH 7,6	
7.	Aufbewahrung bei Raumtemperatur	

3 Ergebnisse

3.1 Makroskopische Gewebeeränderungen

Makroskopische Veränderungen des Darmes ließen sich am prä- und poststenotischen Abschnitt beobachten. Die Dauer des mechanischen Ileus spielte die größte Rolle für die beobachteten Veränderungen.

Nach 3h ließ sich der operierte Darm weder prä- noch poststenotisch von den Därfen der Kontrollmäuse unterscheiden. Der Darm hatte in beiden Gruppen einen normal erscheinenden Durchmesser, zeigte makroskopisch keine Nekrosen oder Veränderung der Durchblutung und ließ intermittierend motorische Aktivität in Form von peristaltischen Wellen erkennen. Lediglich der prästenotische Darm beim mechanischen Ileus zeigte stärkere Distension als der nicht operierte Darm.

Ein anderes Bild zeigte der Darm der 9h Mäuse: Der prästenotische Darm der operierten Mäuse war massiv mit Stuhl gefüllt und im Durchmesser wesentlich größer als der Darm der Kontrolltiere. Er erschien gerötet und ödematös (siehe Abbildung 9). Peristaltische Wellen waren nur noch vereinzelt zu sehen.

Der poststenotische Darm war im Gegensatz dazu selten mit Stuhl gefüllt und auch nicht dilatiert. Der Darm war makroskopisch gegenüber den Kontrollgruppen nicht vermehrt durchblutet. Der poststenotische Darm war hingegen äußerlich atroph und minderdurchblutet. Auch zeigte der poststenotische Darm kaum motorische Aktivität.

Bei den 24h Mäusen zeigte sich ein ausgeprägteres Bild als bei den 9h Mäusen. Der prästenotische Darm war noch mehr dilatiert, neben dem Stuhlinhalt war er zusätzlich mit Gas gefüllt. Der Darm war nun paralytisch und zeigte keine motorische Aktivität mehr. Der poststenotische Darm war hingegen leer, wirkte eingefallen und minderperfundiert. Peristaltische Wellen konnten nicht beobachtet werden.



Abbildung 9: Darstellung des Ileum 9h nach Anbringen einer Ligatur, um den mechanischen Ileus auszulösen. Gut zu erkennen ist die dilatierte Darmschlinge vor der Ligatur sowie die leere Darmschlinge nach der Ligatur, welche in das Kolon übergeht.

3.2 Elektrophysiologische Ableitungen

Intestinale afferente Nervenaktivität nach 5-HT Gabe:

In allen Gruppen konnte ein Anstieg der Impulsrate nach Zugabe von 50 μM Serotonin in das Organbad verzeichnet werden. Unten stehende Graphiken (Abbildungen 10 und 11) demonstriert die jeweiligen Anstiegsraten der Nervenfasernaktivität nach Serotoningabe. In keiner der drei Versuchsgruppen konnte ein Unterschied zwischen den Ileus- und den Kontrollmäusen festgestellt werden (Abbildung 12).

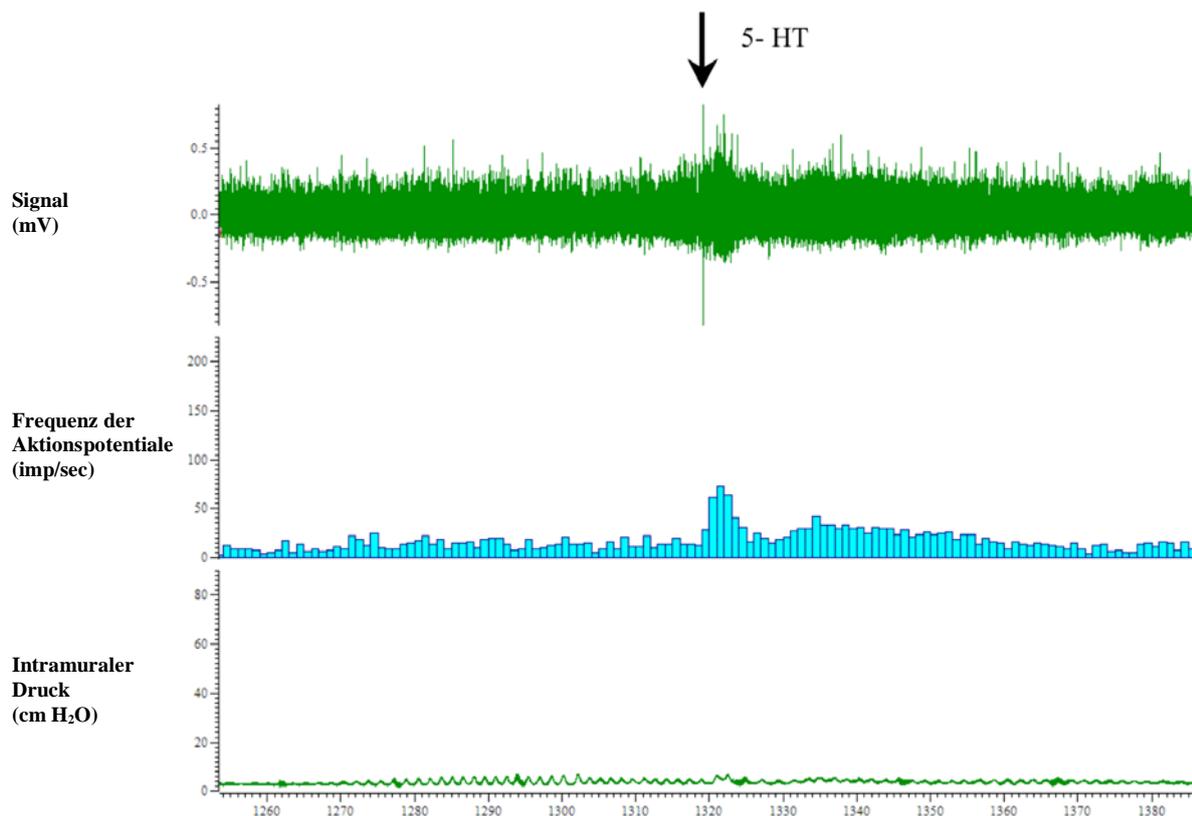


Abbildung 10: Nervenfaserableitung vor und nach Serotonin- Gabe. Gezeigt ist die Impulsratensteigerung einer 9h Sham- operierten Maus

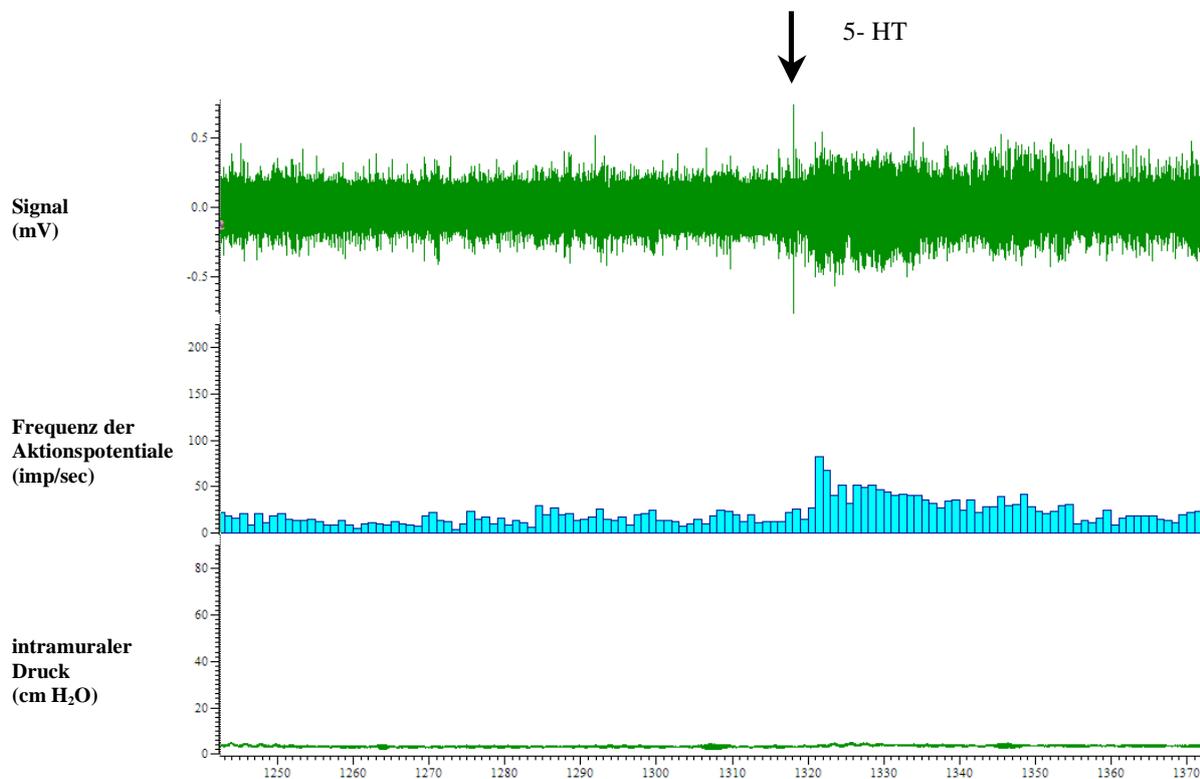


Abbildung 11: Nervenfaserableitung vor und nach Serotonin- Gabe. Gezeigt ist die Steigerung der Impulsrate in einem Segment einer 9- h- Ileus- Maus

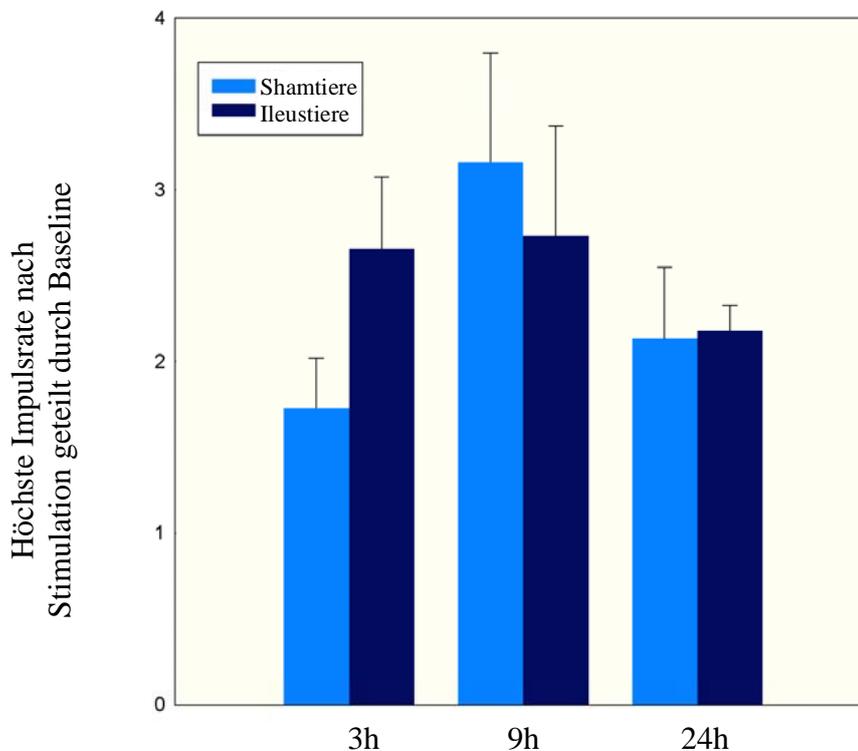


Abbildung 12: Histogrammische Darstellung der normalisierten Anstiegsraten der nervalen Impulse durch Serotonin-Gabe nach 3, 9 und 24 h post OP. $MW \pm SEM$; $p < 0,05$; $n = 6$. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Intestinale afferente Nervenaktivität nach Bradykinin Gabe:

Auch nach Zugabe von $0,5 \mu\text{M}$ Bradykinin in das Organbad konnte eine Steigerung der Nervenfasernaktivität verzeichnet werden (Abbildung 15).

Ähnlich wie nach Serotoningabe ließ sich zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen 3, 9 und 24 h kein Unterschied in der normalisierten Anstiegsrate feststellen. Allerdings ließ sich eine tendenziell höhere Zunahme der Reizantwort der Ileus-Darmsegmente im Vergleich zu Sham-operierten Darmsegmenten in den 9- h- und 24- h- Gruppen feststellen.

Exemplarische Anstiegsraten in der Ableitung werden in Abbildung 13 und 14 dargestellt.

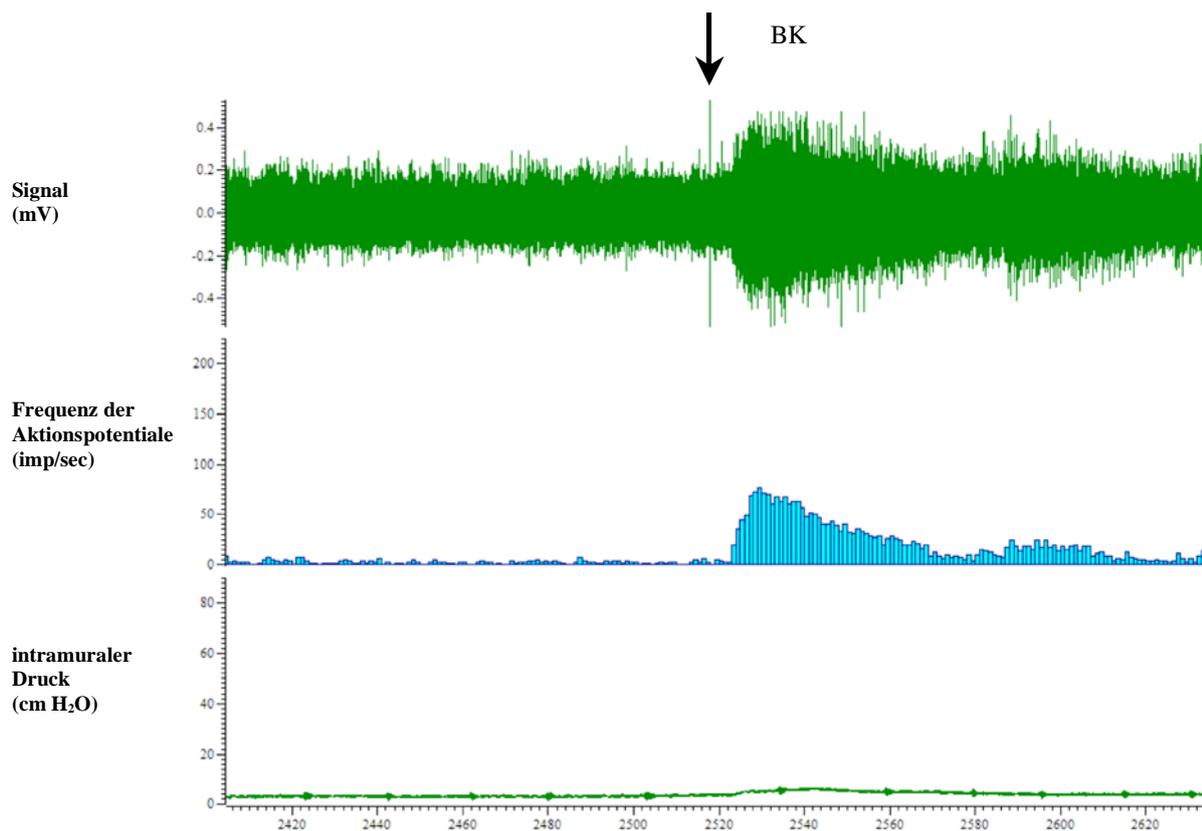


Abbildung 13: Nervenfaserableitung vor und nach Bradykinin Gabe. Gezeigt ist die Impulsrate einer intestinalen Afferenz eines 24 h Sham- operierten Segmentes.

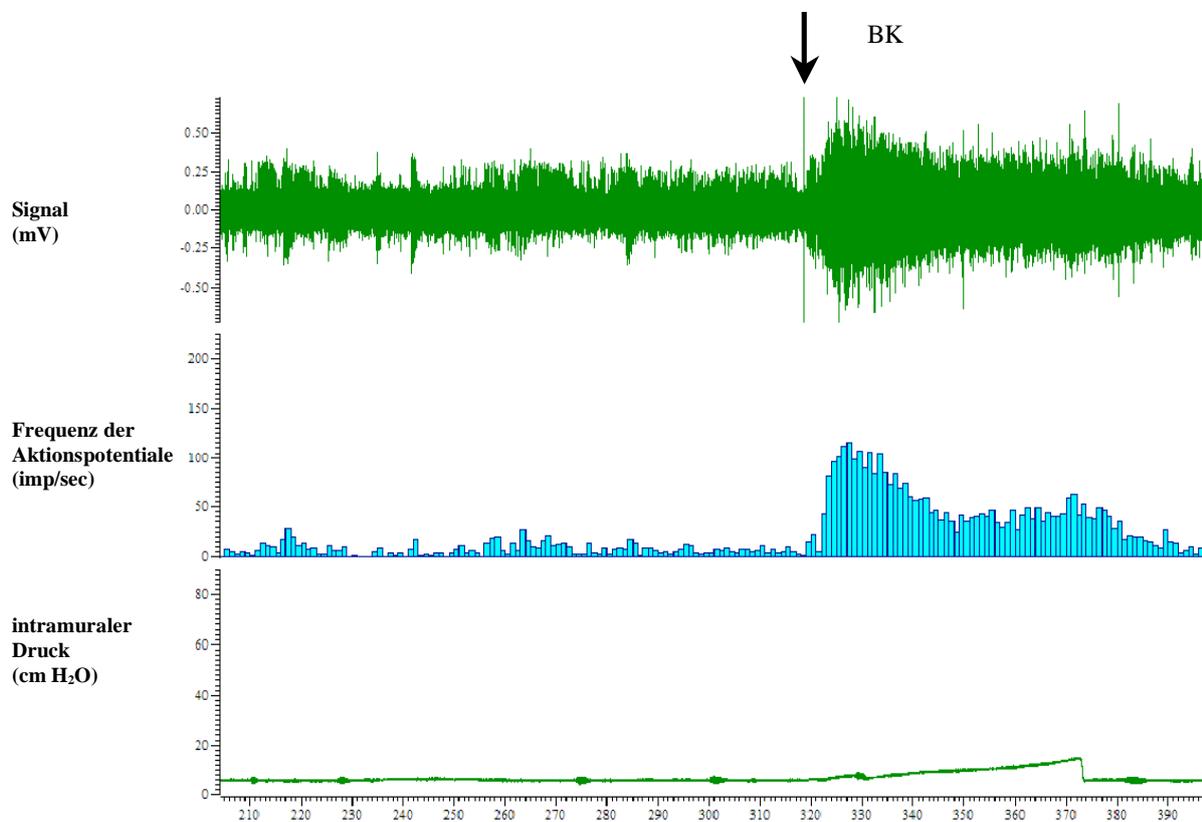


Abbildung 14: Nervenfaserableitung vor und nach Bradykinin Gabe. Gezeigt ist die Impulsrate einer Reizantwort des mesenterialen Nerven eines 24 Ileus Segmentes.

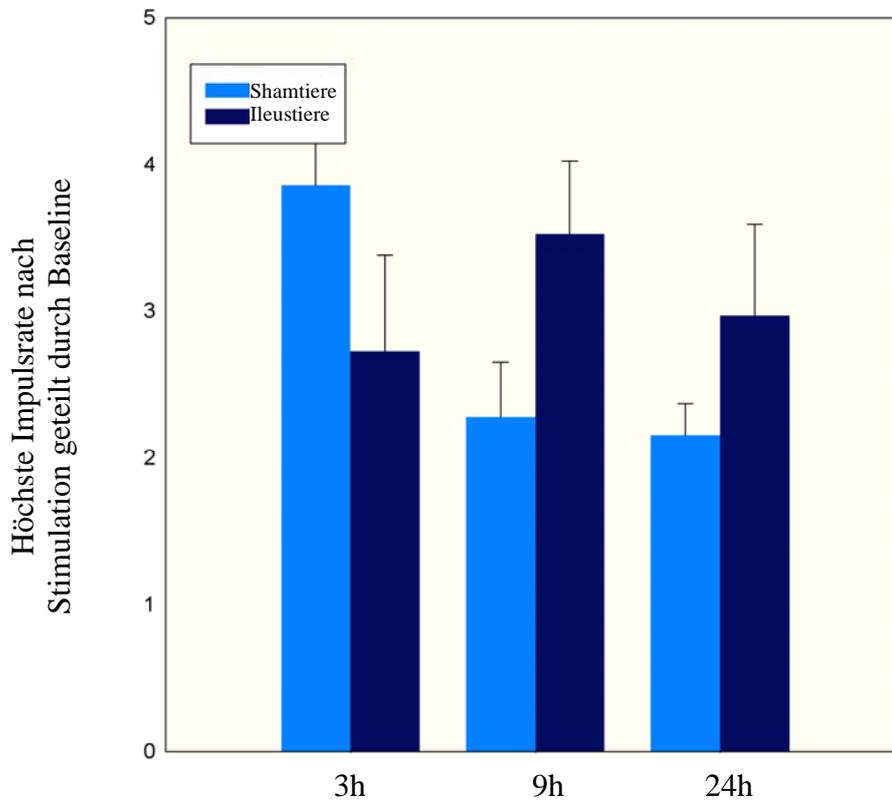


Abbildung 15: Histogrammische Darstellung der normalisierten Anstiegsraten der nervalen Impulse durch Bradykinin nach 3, 9 und 24 h post OP. MW \pm SEM; $p < 0,05$; $n = 6$. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Intestinale afferente Nervenfaseraktivität während mechanischer Stimulation:

Der intraluminale Druck wurde um maximal 80 cmH₂O im Vergleich zum Ruhedruck erhöht. In allen Gruppen konnte beobachtet werden dass die afferente Nervenfaseraktivität bei steigendem intraluminalen Druck zunahm (Abbildung 18, 19 und 20).

Die Zunahme der Nervenfaseraktivität im mesenterialen Nervenbündel war bei den 9h Ileusdärmen genauso hoch wie in den Vergleichsgruppen.

Ähnlich verhielt es sich zwischen den 24h Ileusmäusen und deren Vergleichsgruppen: auch hier war eine konstante Steigerung der mesenterialen Nervenfaseraktivität zu verzeichnen, wobei zwischen den Ileus- und Kontrolldärmen kein signifikanter Unterschied zu irgendeinem Zeitpunkt aufgetreten war.

Bei den 3h Gruppen konnte hingegen eine tendenziell höhere Nervenfaserableitung bei den Kontrolldärmen im Vergleich zu den Ileusdärmen erzielt werden. Diese Tendenz war erst ab einem intraluminalen Druck von 30 cm H₂O zu bemerken. In Abbildung 16 und 17 sind exemplarisch zwei Nervenfaserableitungen aus den 24- h- Gruppen (Sham und Ileus) gezeigt.

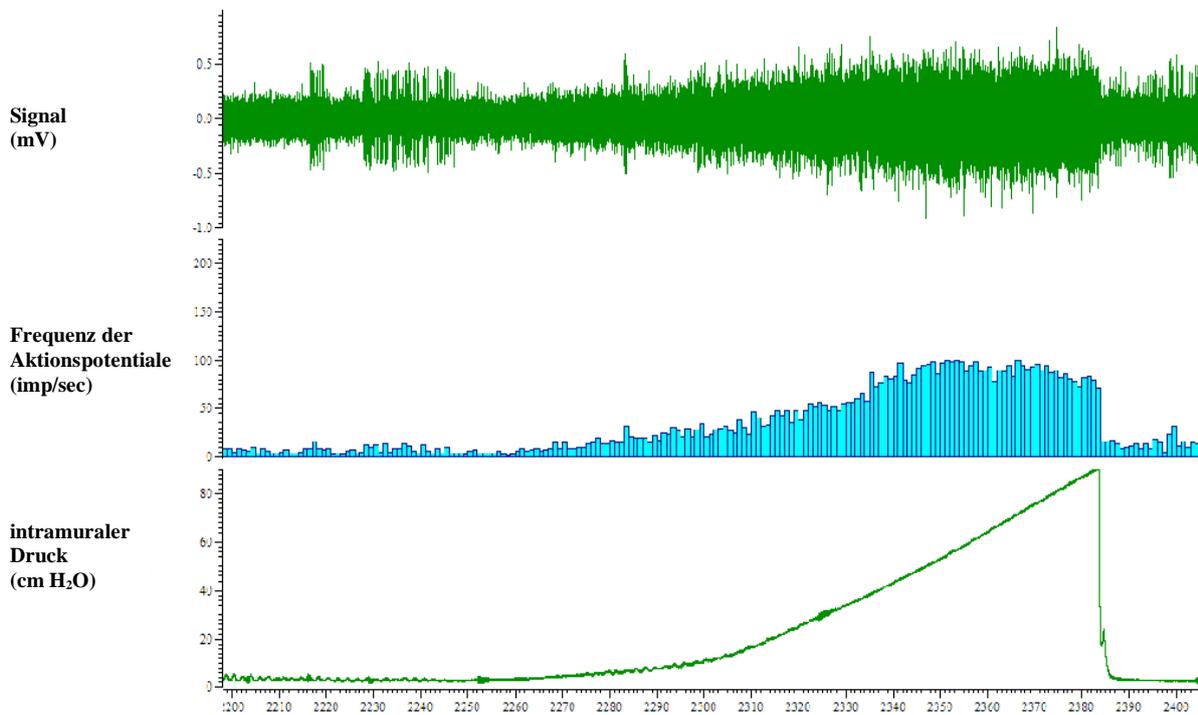


Abbildung 16: Nervenfaserableitung vor und nach Darmdistension. Gezeigt ist die Impulsrate einer intestinalen Affferenz eines 24h Shamsegments

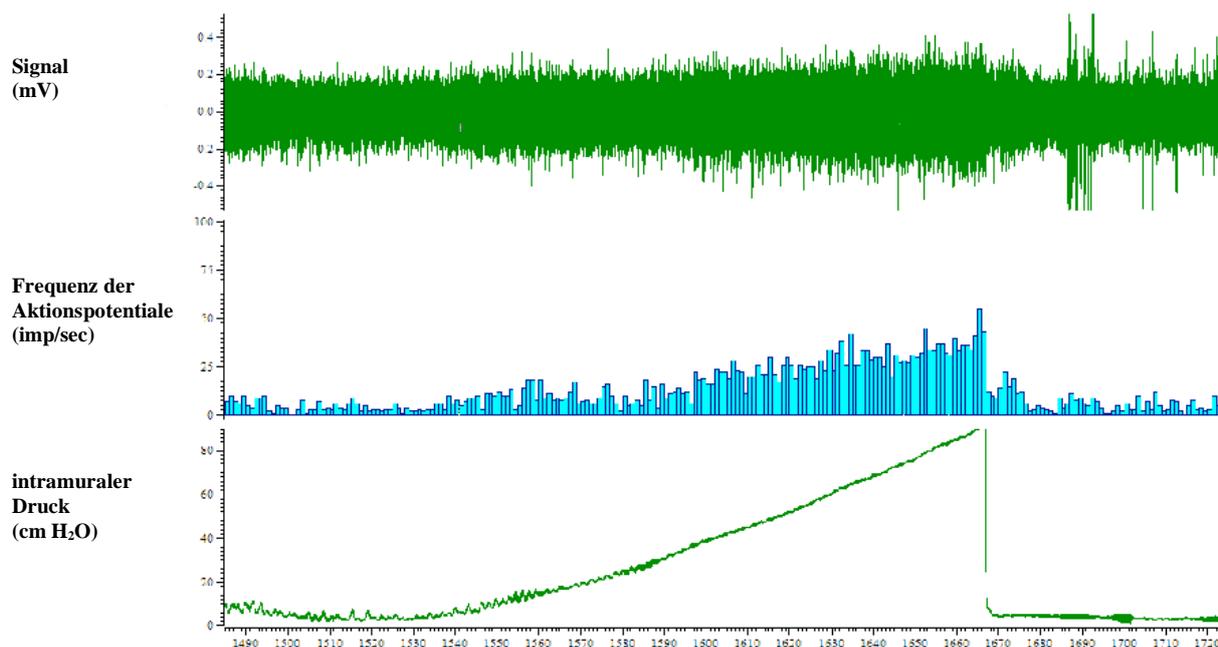


Abbildung 17: Nervenfaseraktivität vor und nach Darmdistension. Gezeigt ist die Impulsrate einer intestinalen Afferenz eines 24h Ileusegments

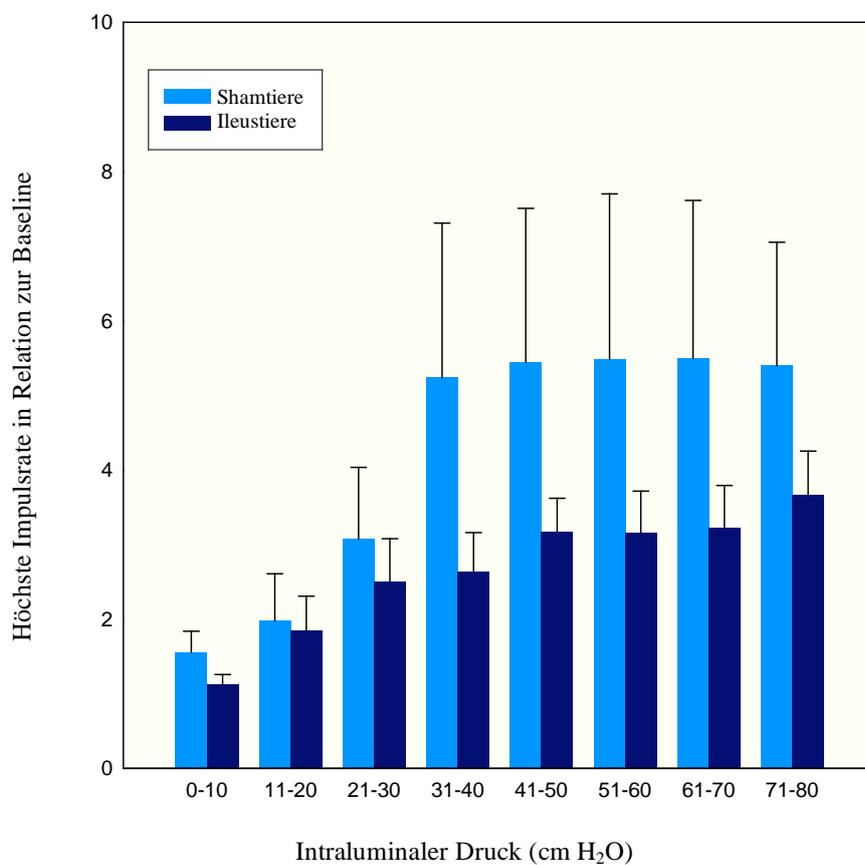


Abbildung 18: Histogrammische Darstellung der normalisierten Anstiegsrate der afferenten Nervenimpulse der 3h Gruppe. MW \pm SEM; $p < 0,05$; $n = 6$. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

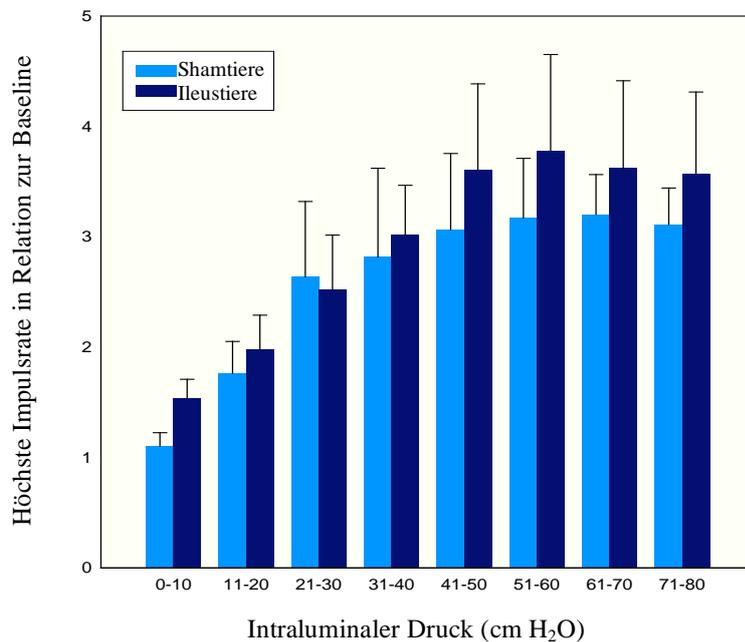


Abbildung 19: Histogrammische Darstellung der normalisierten Anstiegsrate der afferenten Nervenimpulse der 9h Gruppe. $MW \pm SEM$; $p < 0,05$; $n = 6$. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

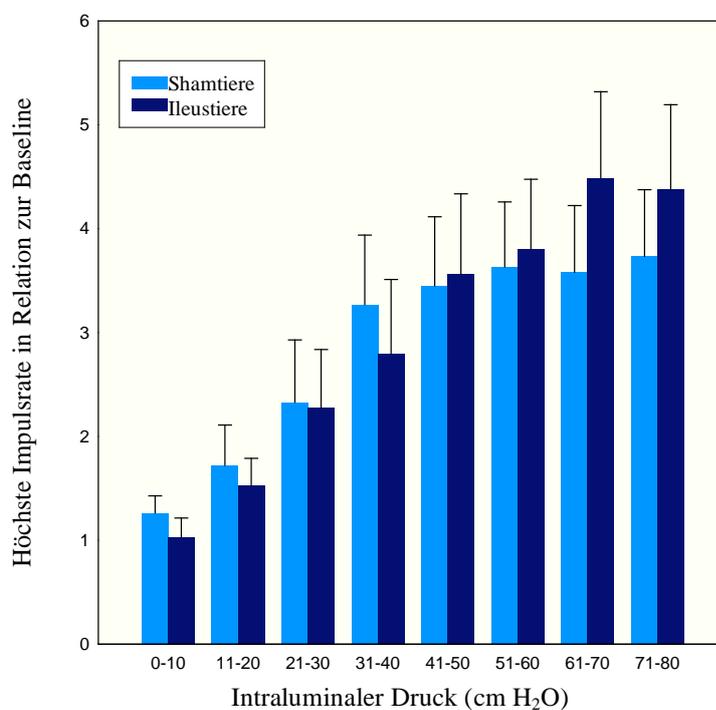


Abbildung 20: Histogrammische Darstellung der normalisierten Anstiegsrate der afferenten Nervenimpulse der 24h Gruppe. $MW \pm SEM$; $p < 0,05$; $n = 6$. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3.3 Histologische Gewebeveränderungen

Zur Auswertung der HE-Färbungen wurde der histologische Score von Hausmann et al. herangezogen. Dieser berücksichtigt die morphologischen Veränderungen des Epithels und das Ausmaß der Leukozyteninfiltrationen des zu untersuchenden Gewebes (siehe 2.6.2).

Die HE Präparate der 3h- Shamgruppe zeigte eine weitgehend unauffällige Morphologie. Es traten lediglich vereinzelt Becherzellverluste auf. Die Kryptenarchitektur war in allen Präparaten im Vergleich zum gesunden Darm unverändert und es zeigte sich nur bei einer Probe eine leichte Infiltration der Kryptenbasis. Der morphologische Score betrug $0,5 \pm 0,3$.

Im Vergleich dazu lag der Score in der 3h- Ileusgruppe etwas höher bei $1,8 \pm 0,3$. Nach statistischer Auswertung konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p = 0,68$). Bei einigen Proben konnte eine Infiltration von Leukozyten bis in die Lamina muscularis mucosae beobachtet werden. Wie auch in der Kontrollgruppe wurde ein dezenter Verlust an Becherzellen bemerkt (Abbildung 21).

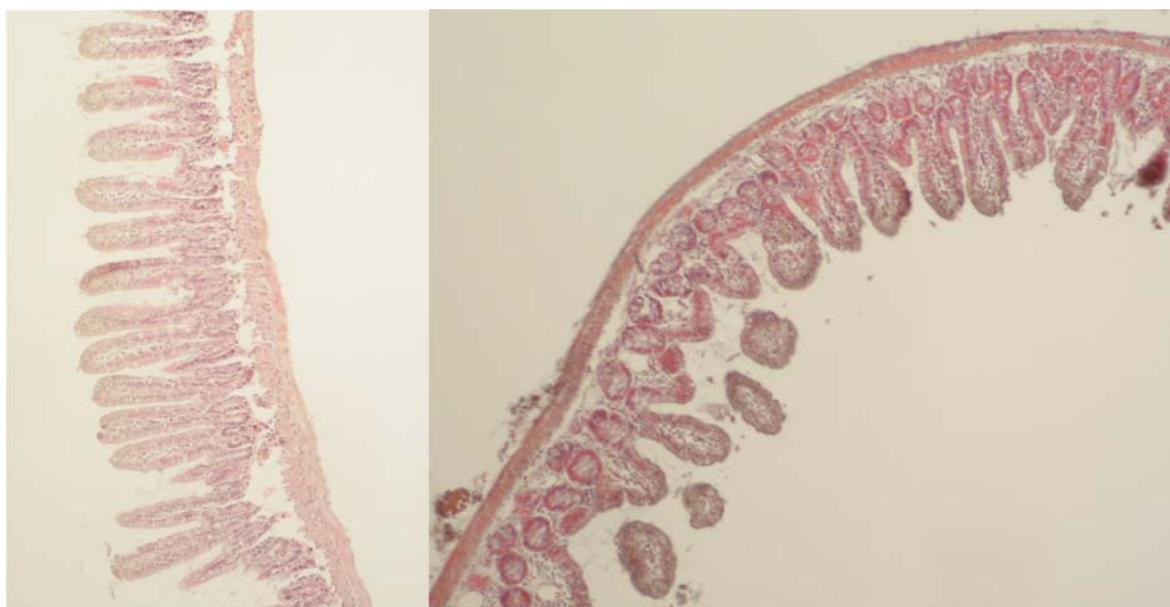


Abbildung 21: Links: 3h OP, 10- fache Vergrößerung, rechts: 3h Sham, 10- fache Vergrößerung

Die histologischen Veränderungen der 9h- Shamgruppe ergaben einen Score von $0,7 \pm 0,3$ und lagen damit nicht höher als der Scores der 3h- Shamgruppe. Die Veränderungen betrafen auch in dieser Gruppe der Verlust einiger Becherzellen, wobei die Kryptenarchitektur und Zottenstruktur unverändert war. Infiltrationen der Darmwände mit Leukozyten wurden nicht gefunden.

Die Präparate der 9h- Ileusgruppe ergaben einen Score von $1,8 \pm 0,4$ Punkte, welcher etwas über dem Score der Kontrollgruppe lag, nach statistischer Auswertung aber keinen

Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte ($p = 0,07$). Bei einigen Präparaten waren Becherzellverluste in großen Areale zu sehen: Außerdem waren Infiltrate um die Kryptenbasis zu erkennen (Abbildung 22).

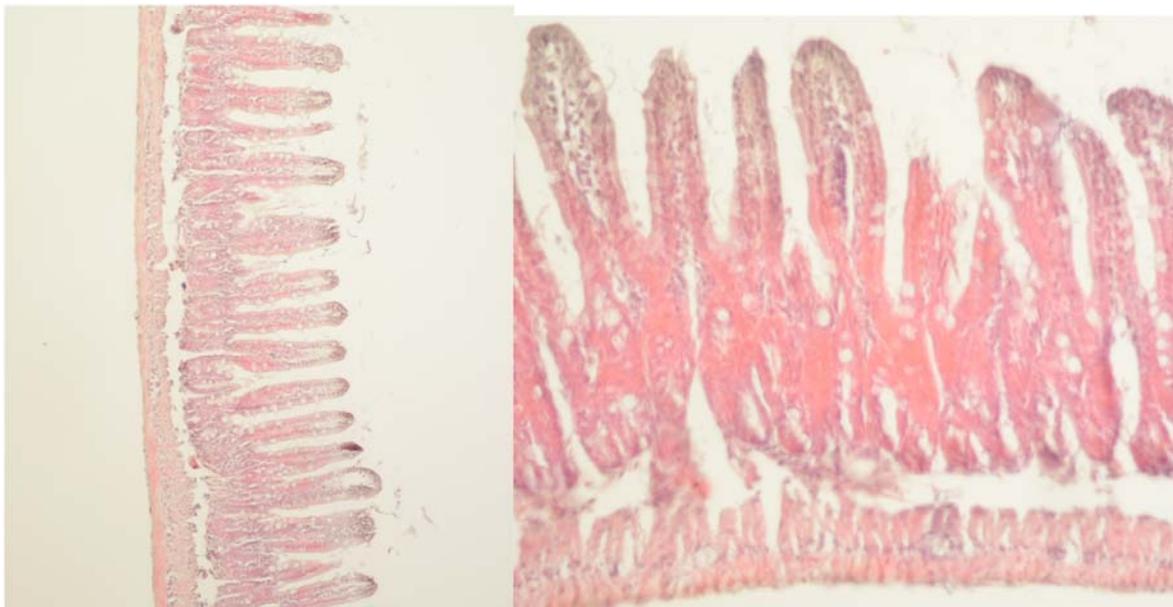


Abbildung 22: Links: 9h Shamdarm in 10- facher Vergrößerung, Rechts: 9h OP in 10- facher Vergrößerung

Die histopathologischen Veränderung der 24h- Shamgruppe waren ebenso gering ausgeprägt wie in den 3h- und 9h- Shamgruppen. Der Score von $0,5 \pm 0,2$ kam durch den geringen Verlust von Becherzellen in etwa der Hälfte der Präparate zustande, während die Darmwand ansonsten nicht krankhaft verändert war.

Die Präparate der 24h- Ileusgruppe ergaben einen Score von $1,3 \pm 0,5$. Hierfür waren neben dem weit reichenden Verlust von Becherzellen auch einige Infiltrationen um die Kryptenbasis verantwortlich.

Bei allen 24h Präparaten konnte im Vergleich zu den anderen Gruppen ein vergrößerter Abstand zwischen den Zotten beobachtet werden (Abbildung 23).

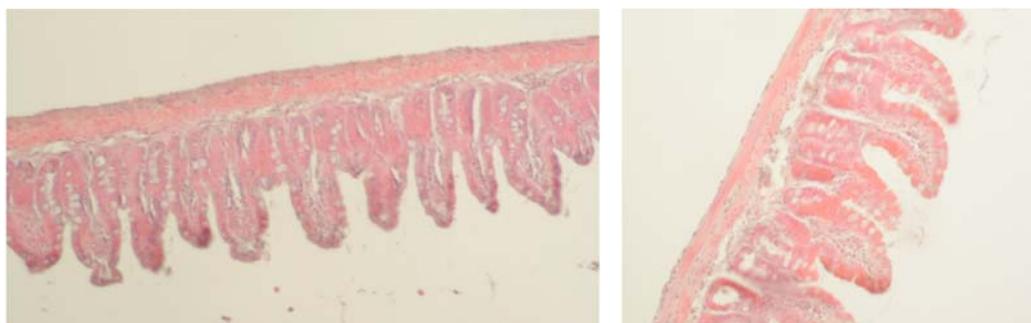


Abbildung 23: Links: 24h OP, 10- fache Vergrößerung. Rechts: 24h Sham, 20- fache Vergrößerung

Die beobachteten mikroskopischen Veränderungen wurden nach dem Hausmann Score ausgewertet. Zwischen den einzelnen Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,19$).

Die Auswertung der histologischen Proben nach dem von Hausmann et al. entwickelten Score ergab folgende Ergebnisse (Abbildung 24):

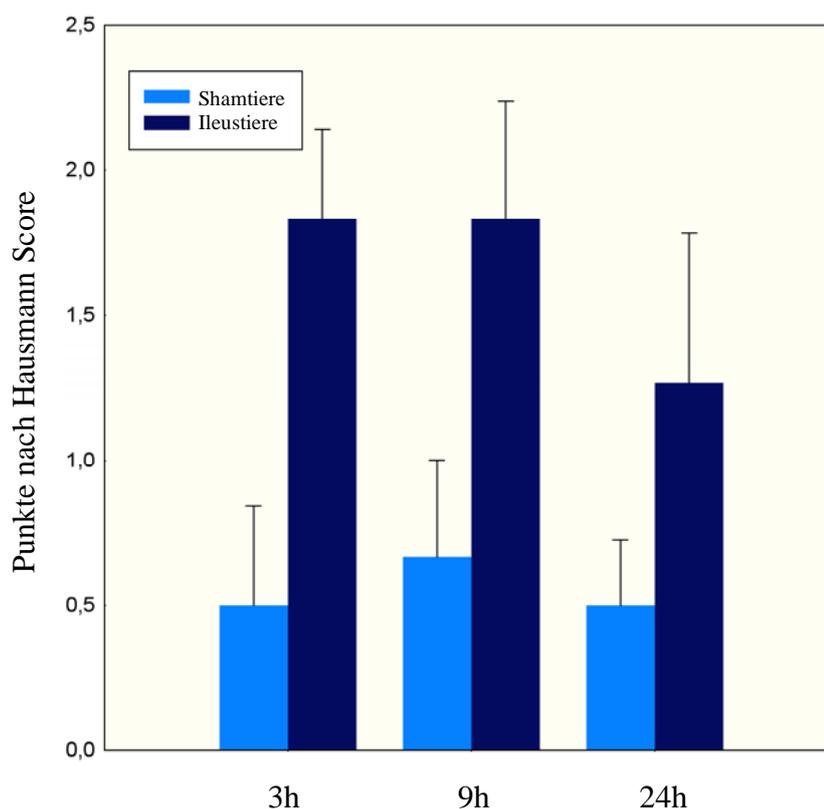


Abbildung 24: Histogrammische Darstellung des Entzündungsscores nach Hausmann; $MW \pm SEM$; $p < 0,05$; $n = 4$; X- Achse: Zeitpunkt der Probeentnahme nach Induktion des mechanischen Ileus; Y- Achse: Score zur Bewertung der histologischen Veränderung. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3.4 Permeabilitätsmessung

Anhand der bei der Auswertung hergestellten Eichkurven wurden die Konzentration von FITC- dextran und HRP in den Versuchssera ermittelt. In den Proben der 3 h Ileusgruppe wurde FITC- dextran durchschnittlich $187,63 \pm 7,85$ (ng/ml) ermittelt. Im Vergleich dazu betrug der Mittelwert der Konzentration der 3h Shamgruppe von $147,47 \pm 8,11$ (ng/ml) einen geringeren Wert als den der Vergleichsgruppe. Es bestand somit ein statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,05$) (siehe Tabelle 12).

In den 9 h Versuchsgruppen wurde beobachtet, dass die Konzentration von FITC- dextran deutlich geringer war als in den 3 h Gruppen. Der Mittelwert in der 9 h Ileusgruppe betrug hier $86,77 \pm 8,88$ (ng/ml), während der Mittelwert der 9 h Shamgruppe nur $62,00 \pm 0,82$ betrug, sodass auch hier eine statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden konnte ($p < 0,05$) (siehe Tabelle 12).

In den 24 h Versuchsgruppen zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den vorherigen Gruppen: der Mittelwert für die 24 h Shamgruppe wurde mit $53,19 \pm 2,91$ (ng/ml) ermittelt, während der Wert für die 24 h Ileusgruppe bei $70,95 \pm 9,16$ (ng/ml) lag. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Werten lag jedoch nicht vor.

Tabelle 12: Konzentration von FITC-dextran in ng/ml. Darstellung als Mean \pm SEM; * $p < 0,05$, $n = 4$

FITC-dextran (FD 4,4)			
	3h	9h	24h
Sham	$147,47 \pm 8,11$	$62,00 \pm 0,82$	$53,19 \pm 2,91$
Ileus	$187,63 \pm 7,85$ *	$86,77 \pm 8,88$ *	$70,95 \pm 9,16$

Mit Hilfe der Eichkurve wurde der Mittelwert von HRP in der 3h Ileusgruppe mit $5,55 \pm 3,62$ (ng/ml) bestimmt. In der Vergleichsgruppe betrug der Mittelwert $4,14 \pm 1,64$ (ng/ml). Anhand von dieser Werte konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,74$) (siehe Tabelle 13). 9 Stunden nach den Manipulationen war mehr Testsubstanz durch die Darmwand ins Blut gelangt. Die Serumkonzentration der 9 h Ileusgruppe betrug durchschnittlich $23,03 \pm 4,31$ (ng/ml), dagegen war der Mittelwert der 9h Shamgruppe erhöht und betrug $9,00 \pm 3,13$ (ng/ml). Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde in den beiden Gruppen beobachtet ($p < 0,05$) (siehe Tabelle 13).

Der Mittelwert der 24 h Ileusgruppe ergab $382,17 \pm 30,54$ (ng/ml), während für die 24 h Shamgruppe ein Mittelwert von $314,49 \pm 48,44$ (ng/ml) ermittelt wurde. Ein signifikanter Unterschied ließ sich in der 24 h Versuchsgruppe nicht feststellen.

Tabelle 13: Konzentration von HRP in ng/ml. Darstellung als Mean \pm SEM; * $p < 0,05$, $n = 4$

HRP			
	3h	9h	24h
Sham	$4,14 \pm 1,64$	$9,00 \pm 3,13$	$314,49 \pm 48,44$
Ileus	$5,55 \pm 3,62$	$23,03 \pm 4,31$ *	$382,17 \pm 30,54$

Histogrammische Darstellungen der Konzentration der beiden Testsubstanzen im Serum werden nun nachfolgend gegeben (Abbildung 25 und 26):

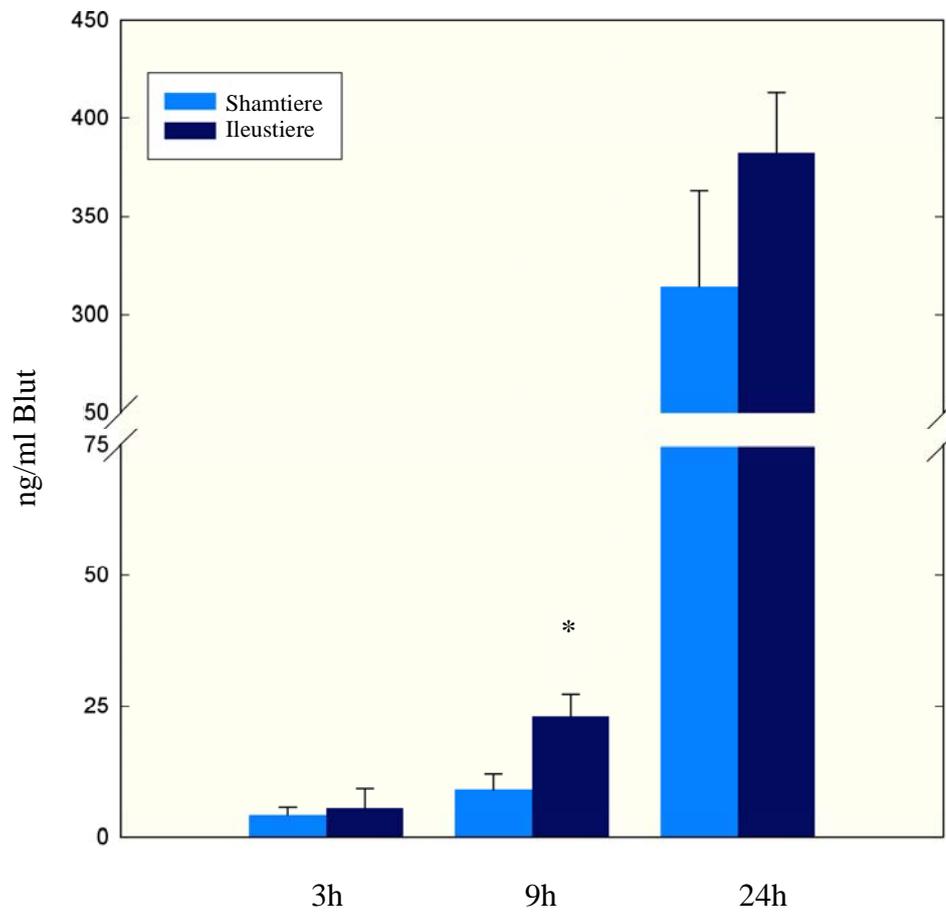


Abbildung 25: Konzentration von HRP im Blut (ng/ml); $MW \pm SEM$, $p < 0,05$, $n = 4$; X- Achse: Zeitpunkt der Probeentnahme nach Induktion des mechanischen Ileus; Y- Achse: Konzentration von HRP in ng/ml

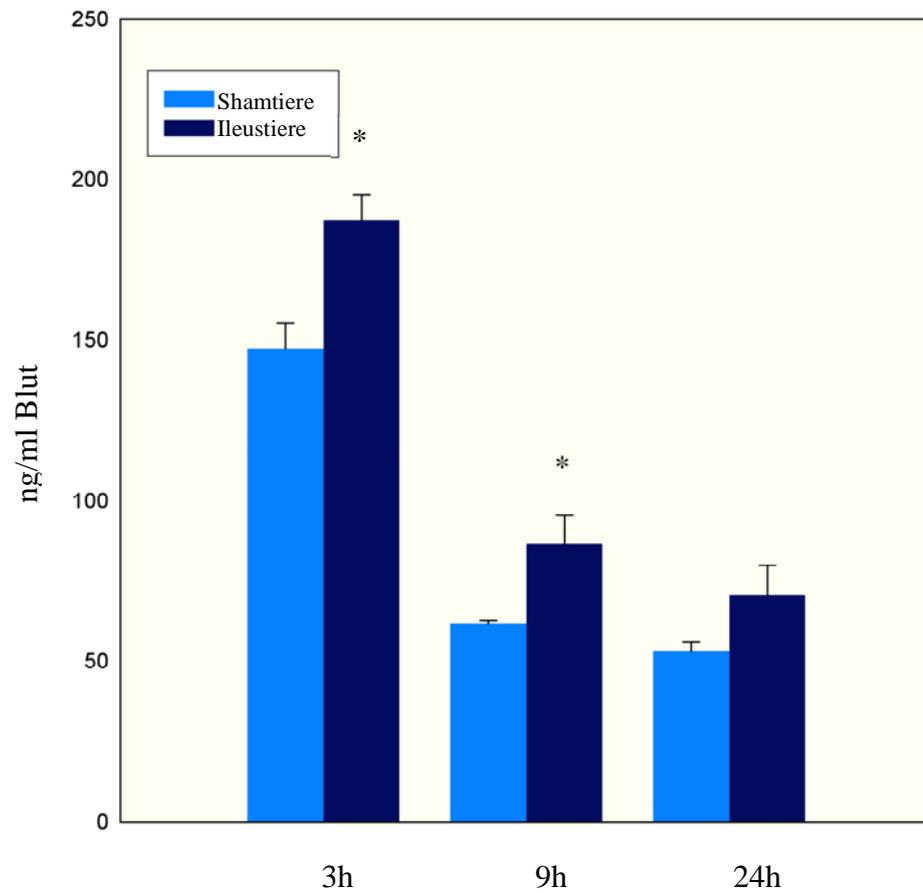


Abbildung 26: Konzentration von FITC im Blut (ng/ml) $MW \pm SEM$, $p < 0,05$, $n = 4$; X- Achse: Zeitpunkt der Probeentnahme nach Induktion des mechanischen Ileus; Y- Achse: Konzentration von FITC in ng/ml

4 Diskussion

4.1 Das Tiermodell

In der vorliegenden Arbeit wurden am Mausmodell die Auswirkungen eines mechanischen Ileus auf die Sensibilität afferenter Darmnerven untersucht. Der Fokus der elektrophysiologischen Untersuchungen lag dabei auf dem Darmabschnitt, welcher hinter der Obstruktion lag.

Zur Erforschung der Pathogenese des mechanischen Ileus wurden in der Vergangenheit Kaninchen, Hunde und Ratten in Tierversuche einbezogen, wobei hauptsächlich die Auswirkungen der Darmdistension auf die lokale Perfusion und die Darmmotilität in Augenschein genommen wurden ^(93,94,95).

Von großem Vorteil kann gewertet werden, dass die Maus, wie auch der Mensch, als Allesfresser gilt und die Maus einen vergleichbaren Aufbau des Verdauungssystems im Vergleich zum Menschen hat.

Ein Vorteil der *in vitro* stattfindenden elektrophysiologischen Untersuchung ist die Beseitigung möglicher störender Einflüsse, z.B. durch den Blutkreislauf oder auch das Fehlen von mechanischen Kräften wie sie *in vivo* zu erwarten wären (z.B. mechanischer Zug am Mesenterium und somit an den Darmnerven).

Eine Diskrepanz zwischen Tiermodell und der Situation beim Menschen könnte dagegen in der Dauer des mechanischen Ileus liegen: während bei der Maus die Dauer des mechanischen Ileus genau bekannt war, so ist die exakte Dauer eines mechanischen Ileus beim Menschen im Regelfall nicht bekannt. Mitunter ist die Vorlaufzeit zur Entwicklung eines mechanische Ileus beim Menschen länger als in vorliegendem Versuchsmodell.

Weitere Unterschiede zwischen Mensch und Maus lassen sich bei der Reaktion der Organismen auf ein von außen zugeführten Stressor finden. So konnten beispielsweise Junhee Seok et al zeigen, dass die murinen Entzündungsreaktionen auf molekulargenetischer Ebene die menschliche Reaktion nur schlecht widerspiegeln ⁽⁹⁶⁾. Die von Junhee untersuchten Stressoren waren oberflächige Verbrennung, Trauma durch Laparotomie in Kombination mit Blutentnahme und bakterielle Endotoxinapplikation, jedoch keine Manipulation am Gastrointestinaltrakt. Es lässt sich daher vermuten, dass bei der Maus die Entzündungsreaktion durch die Induktion eines mechanischen Ileus zwar ähnlich, aber dennoch anders abläuft als im menschlichen.

Ein Anhalt dafür könnte die Feststellung sein, dass immunologische Vorgänge im murinen Darm anders ablaufen als im Menschlichen. Laut einem Übersichtsartikel von Mestas und Hughes produzieren Paneth'sche Zellen in den Darmkrypten etwa 20 verschiedene Defensine, wohingegen humane Paneth'sche Zellen gerade einmal 2 unterschiedliche Defensine bilden^(97, 98). Laut Ouelette et al. könnte dieser Unterschied in der Ausprägung des immanenten (angeborenen) Immunsystems in der Tatsache begründet sein, dass Mäuse mit wesentlich mehr Umweltantigenen durch die Nahrung in Kontakt kommen⁽⁹⁸⁾.

Operationsmethodik:

Wie im Methodikteil bereits ausführlich beschrieben wurden die Versuchstiere während den operativen Vorgängen mit Isofluran betäubt. Unter Berücksichtigung einiger Forschungsergebnisse der letzten Dekaden darf der Verdacht geäußert werden, dass das applizierte Isofluran einen Einfluss auf die Darmmotilität und die Erregungsschwelle des enterischen Nervensystems haben könnte. Es ist erwiesen, dass Isofluran bei Ratten die gastrointestinale Motilität bis zu 2 Stunden nach Exposition kleiner Mengen senkt⁽⁹⁹⁾.

Die Wirkung Isoflurans auf das enterische Nervensystem wird weiterhin dadurch angedeutet, dass seine Anwendung bei Ratten einen protektiven Effekt auf des Gehirn nach zerebrale Ischämie hervorrufen konnte⁽¹⁰⁰⁾. Engelhard et al machen für diesen Effekt in erster Linie die durch Isofluran reduzierte sympathische Aktivität verantwortlich. Ob die gastrointestinalen Organe durch Isofluran ähnlich profitieren würden wie das ZNS der Ratten bei Engelhard et al., ist bisher jedoch nicht bewiesen.

Eine andere Studie konnte hingegen zeigen, dass die gastrointestinale Aktivität bei Anwendung niedrig dosierten Isoflurans unbeeinflusst blieb⁽¹⁰¹⁾.

Grundsätzlich lässt sich eine gastrointestinale Nebenwirkung des Isoflurans nicht ausschließen. Die fehlenden Unterschiede zwischen den Versuchgruppen sind durch die mögliche gastrointestinale Nebenwirkung des Isoflurans jedoch nicht zu erklären, zumal die Isofluran Narkose sowohl bei den Versuchs- als auch Kontrollgruppen zur Anwendung kam.

4.2 Elektrophysiologie

4.2.1 Diskussion der elektrophysiologischen Ergebnisse

Pro Versuchsgruppe wurden sechs mesenteriale afferente Nervenfaserbündel elektrophysiologisch abgeleitet. In allen Präparaten zeigte sich eine Nervenfaseraktivität, wobei zu bemerken ist, dass eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Messungen

auffiel. Dies kann auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass die Nervenfaserbündel der Darmsegmente per se eine unterschiedliche Intaktheit in vitro aufwiesen. Dieses Erkenntnis kann einerseits als eine Schwachstelle der Methodik betrachtet werden, andererseits kann darin auch ein Erklärungsansatz gefunden werden, warum das interindividuelle Beschwerdebild bei gastroenterologischen Erkrankungen so starken Schwankungen ausgesetzt sein kann.

Des Weiteren ist in der jüngeren Vergangenheit die Vermutung entstanden, dass die bakterielle Darmflora eine Auswirkung auf den Erregungsgrad sensorischer, myenterischer Nerven haben kann ⁽¹⁰²⁾. Inwieweit die beim mechanischen Ileus auftretenden bakterielle Fehlbesiedlung Auswirkungen auf die afferente Nervensensibilität hat, ist allerdings nicht weiter untersucht. Zukünftige Experimente, welche die afferente Nervensensibilität beim mechanischen Ileus in keimfreien Mäusen untersuchen, könnten darüber Klarheit verschaffen.

Serotonin (5-HT):

Aufgrund der großen Bedeutung des Serotonins als Neurotransmitter im Enterischen Nervensystem wurden in der Vergangenheit an diversen Tiermodellen die Wirkmechanismen des Serotonins untersucht. Die Funktion von 5-HT wurde beispielsweise untersucht bei diversen, durch Bakterien und Chemikalien induzierten intestinalen Entzündungen bei der Maus (Auslöser der Colitis/Ileitis: TNBS=trinitrobenzene sulfonic acid, DSS = dextran sulfate sodium, *Citrobacter rodentium*, *Trichinella spiralis*) ^(103,104,105,106).

Bei allen oben genannten Entzündungsreaktionen konnte eine erhöhte Dichte der EC Zellen im Darm und konsekutiv eine erhöhte Serotoninkonzentration im Darm beobachtet werden. Zudem konnte in allen Modellen eine erniedrigte Aktivität der SERT (Serotonin reuptake transporter) festgestellt werden, welche mutmaßlich in ihrer Aktivität durch die im Darm ablaufende Entzündungsreaktion gehemmt wird, wodurch die erhöhten Serotoninspiegel im Darm und im Serum zusätzlich aufrechterhalten wurden.

Berücksichtigt man diese Beobachtung, so kann über die veränderte Empfindlichkeit der Afferenzen im Darm auf die dort vorliegende Entzündungsreaktion geschlossen werden. Gesetzt den Fall, dass eine im poststenotischen Darmabschnitt ablaufende Entzündung zu einer punktuellen Erhöhung der Serotoninlevel sorgt, müssten die Nervenafferenzen, welche diesen Darmabschnitt erreichen, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Serotonin aufweisen, was sich in einer größeren Anstiegsrate der Nervenimpulse manifestieren würde.

Bei der Stimulation der Darmnerven mit Serotonin zeigte sich allerdings in keiner der Versuchsgruppen ein Unterschied der Nervensensibilität zwischen den Ileus- operierten und den Sham- operierten Mäusen.

Die gleichartige Empfindlichkeit der afferenten Nervenfasern für Serotonin - sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe - lässt am Ehesten vermuten, dass ein mechanischer Ileus auf die Sensibilität der poststenotischen Darmnerven für 5-HT keinen Einfluss nimmt.

Dies lässt vermuten, dass während eines mechanischen Ileus im poststenotischen Darmabschnitt keine relevante Entzündungsreaktion vorliegt, um die Serotoninausschüttung der EC Zellen zu steigern. Wäre die Serotoninausschüttung während des Ileus erhöht gewesen, dann hätte eine verstärkte Stimulierung der afferenten Darmnerven stattfinden müssen. Diese hätte sich mit einer erhöhten Reizantwort der abgeleiteten Darmnerven manifestieren müssen.

Bradykinin:

Die Sensibilität mesenterialer Afferenzen für Bradykinin kann durch verschiedene Mediatoren verstärkt oder auch verringert werden. Sowohl Histamin, welches von den Mastzellen im Darmgewebe ausgeschüttet wird, als auch Adenosin und Prostaglandin E sind in der Lage die afferente Sensibilität für BK zu verstärken ⁽¹⁰⁷⁾. Um die Effekte dieser verschiedenen Entzündungsmediatoren auf die Bradykininsensibilität zu beseitigen, wurde in vergangenen Arbeiten die Mukosa entfernt, um den Ursprungsort der Entzündungsmediatoren zu eliminieren ⁽¹¹⁷⁾. Es ist also nicht sicher auszuschließen, dass die vorliegenden Ergebnisse nach Bradykiningabe durch die Wirkung von oben genannten Entzündungsmediatoren beeinflusst wurden. Allerdings wurde hier bewusst auf eine Mukosektomie des Darmpräparates verzichtet, da man sich erhoffte, die Bradykininsensibilität des mesenterialen Nervenbündels würde eine Aussage über den Grad der Darmwandschädigung und deren Entzündungsreaktion möglich machen.

Die Ergebnisse der Nervenfaserableitung lassen in der 9h- und 24h- Gruppe eine Tendenz hin zu einer höheren Bradykininsensibilität bei den Ileusmäusen erkennen, während in der 3h- Gruppe eine etwas höhere Bradykininreaktion bei den Shammäusen im Vergleich zu den Ileusmäusen zu verzeichnen war. Insgesamt ließ sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen zeigen, weshalb davon ausgegangen werden muss dass keine Sensibilisierung der spinalen Fasern erfolgt ist.

Mechanische Darmdistension:

Während den elektrophysiologischen Ableitungen war die glatte Muskulatur der Darmwand zu keinem Zeitpunkt relaxiert. Im Gegenteil zeigte der Darm in den meisten Fällen eine rege Aktivität. Dies stellt einerseits ein Indiz für die Intaktheit des Darmes *in vitro* dar, andererseits trägt der Darm durch seine motorische Eigenaktivität zur Deformierung der Darmwand bei. Laut einer Arbeit von Iggo et al. ist aber nicht davon auszugehen dass solche Muskelkontraktionen in der Lage sind, eine Steigerung der vagalen afferenten Nervenaktivität hervorzurufen^(108,109). Gegen diese Befürchtung, die Deformation könne die Nervenaktivität während der Versuche relevant stören, spricht insbesondere, dass die Grundaktivität der Afferenzen bei spontanen Kontraktionen des Darmes kaum verändert wurde. Aus diesem Grunde wurde auch in früheren Arbeiten mit der gleichen Technik⁽¹¹⁰⁾ auf eine Hemmung der glatten Darmmuskulatur verzichtet, ohne die Ergebnisse der afferenten Nervenfaserableitungen bei Darmdistension als verfälscht betrachten zu müssen⁽²⁵⁾. Darüber hinaus entsteht das Problem, dass Hemmstoffe der Peristaltik selbst auch wieder die afferente Nervenfaserveraktivität stören können.

Wie oben beschrieben kann die Auswirkung einer Darmdistension mit verschiedenen physikalischen Modellen erklärt werden (stress vs strain). Darüber hinaus existieren in der Lamina muscularis der Darmwand verschiedene Mechanorezeptoren, welche sowohl physiologische als auch pathologische Stimuli in Nervensignale umwandeln können. In vorliegender Arbeit wurde auf diese Unterschiede keine Rücksicht genommen. Stattdessen wurde die Nervenfaserveraktivität der gesamten Darmnerven abgeleitet, da das primäre Ziel des Versuches nicht in der genauen Charakterisierung der Faserqualitäten lag. Vielmehr galt es herauszufinden, ob zwischen den Ileus- operierten Mäusen und den Sham- operierten Mäusen eine unterschiedliche Aktivierung der mechanisch sensiblen Nervenfasern bestand.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass lediglich in der 3h Gruppe eine tendenzielle Abweichung zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen war, jedoch ohne statistischen Unterschied. Bei einer schrittweisen Erhöhung des intraluminalen Druckes zwischen 30 und 80 cm H₂O konnte bei den mesenterialen Nerven der Kontrolldärme höhere Aktivitäten verzeichnet werden, welche statistisch allerdings nicht signifikant waren. Da bei den 9h und 24 h Gruppen keinerlei Aktivitätsunterschied des Darmnerven auf die Darmdistension beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass der poststenotische Darm bei einem mechanischen Ileus keine Sensibilisierung der spinalen Afferenzen aufweist.

Der Effekt der antinozizeptiven Desensibilisierung afferenter Darmnerven bei einem distendierten Darm war in X. Zhao Arbeit diskutiert worden, um die unterschiedliche Nervensensibilität der prästenotischen Nervenfaserableitungen zwischen den Versuchs- und Kontrollgruppen zum Zeitpunkt 3 h zu erklären ⁽⁸³⁾.

Wendet man diese Überlegung auf vorliegende Versuchsergebnisse an, so kann vermutet werden, dass zu keinem Zeitpunkt der poststenotische Darm der Ileus- operierten Mäuse in dem Maße dilatiert war, als dass eine starke, zu desensibilisierenden Reflexmechanismen führende Schmerz Wahrnehmung entstehen konnte. Dies würde die Vermutung nahe legen, dass der antinozizeptive Effekt neural begrenzt stattfindet und keine anderen Darmabschnitte beeinflusst.

Zusammenfassend kann aus den elektrophysiologischen Untersuchungsergebnissen geschlussfolgert werden, dass sowohl die Sensibilisierung der spinalen als auch der vagalen mesenterialen Nervenfasern nach Induktion eines Ileus für die poststenotischen Darmnerven für den untersuchten Zeitraum bis 24 h nach Operation keine Bedeutung hat.

In anderen Versuchsmodellen hingegen zeigte sich eine vermehrte mesenteriale afferente Sensibilisierung, wie beispielsweise beim postoperativen Ileus oder bei prästenotischen mesenterialen Nervenfasern nach Ileusinduktion ^(83, 111).

4.3 HE Färbung

4.3.1 Diskussion der Methodik

Die HE Färbung ist eine gängige Methode, um das Ausmaß einer Entzündungsreaktion auf die Darmschleimhaut zu bewerten. Der in vorliegender Arbeit angewendete Score wurde bereits verwendet, um Entzündungsreaktionen des Kolons zu charakterisieren ^(112,113).

Die Darmmukosa enthält ca. 75% aller antikörperproduzierenden Immunozyten des gesamten Organismus und hat eine große immunologische Bedeutung, da einerseits die Abwehr pathogener Mikroorganismen von ihr bewerkstelligt werden muss, andererseits aber überschießende Immunreaktionen vermieden werden sollten, da sonst Nahrungsmittelallergien drohen. Die Immunozyten befinden sich teils in den Peyer- Plaques, teils auch im gesamten Geweben der Darmschleimhaut beidseits der Basalmembran. Die

Aktivierung von B- und T- Lymphozyten in den Peyer- Plaques lässt diese Zellen über Blut- und Lymphbahnen in das umliegende Gewebe einwandern⁽⁹³⁾.

In der Vergangenheit sind vielfältige Wechselwirkungen zwischen der intestinalen Entzündungssituation und der neuronalen Aktivierung des Darmes beschrieben worden. So konnte von Borovikova et al. gezeigt werden, dass intestinale Entzündungsprozesse durch neuronale Signalwege reguliert werden können⁽¹¹⁴⁾. Demnach kann durch die Ausschüttung von Acetylcholin aus efferenten vagalen Fasern die Aktivierung von Gewebsmakrophagen im Darm abmildern sowie die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren durch diese abgeschwächt werden^(71,115).

Auf der anderen Seite führt eine Entzündungsreaktion im Darm- etwa im Rahmen eines postoperativen Ileus durch Darmmanipulation oder durch Darmischämie- zu einer Aktivierung afferenter Nervenfasern, vornehmlich splanchnischer Fasern⁽¹¹⁶⁾. Verantwortlich für diesen Mechanismus sind die durch Gewebsmakrophagen in hohen Mengen ausgeschütteten Superoxide, Peroxynitrit oder Peroxid, sowie Prostaglandin E₂⁽¹¹⁷⁾.

Weil sich inflammatorische Prozesse der Darmwand und die afferente Nervenaktivität gegenseitig beeinflussen, wurde in vorliegender Arbeit die Entzündungsreaktion des Darmes mittels HE Färbung charakterisiert und mit den Ergebnissen der elektrophysiologischen Ableitungen verglichen.

4.3.2 Diskussion der Ergebnisse

Die ermittelten Scores der untersuchten Darmabschnitte ergaben zwischen den Ileus-operierten Mäusen und den Sham- operierten Mäusen aller Gruppen keinen Unterschied. Die histologischen Scores der poststenotischen Abschnitte waren im Vergleich zu prästenotischen Abschnitten, welche von X. Zhao untersucht wurden, erniedrigt⁽⁸³⁾.

Bei prästenotischen Darmsegmenten wurden sowohl prä- als auch poststenotisch zu einem frühen Zeitpunkt (3h nach Ileus Operation) lokale Entzündungsreaktionen in der Darmwand festgestellt, welche poststenotisch, im Gegensatz zum prästenotischen Abschnitt, keine Progredienz nach 9 und 24 h zeigen⁽⁸³⁾. Dass die Entzündungsintensität im prästenotischen Darm höher ist, kann auf den erhöhten intraluminalen Druck im prästenotischen Darm zurückgeführt werden, welcher zu einem größeren Schaden führte als es im poststenotischen Darm möglich wäre, weil dort aufgrund des fehlenden Kotstaus keine massive Darmdistension eintreten konnte.

Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die im poststenotischen Darm auftretende Entzündungsreaktion im Rahmen der allgemeinen Entzündungsreaktion bei nicht steriler Eröffnung des Bauchraums gesehen werden muss. Die Vermutung, die poststenotische Entzündungsreaktion sei im Sinne eines „field effects“ aufgetreten, lässt sich mit den gewonnenen Daten nicht stützen, da der Entzündungsscore des poststenotischen Abschnitts im Vergleich zu Sham- operierten Mäusen nicht erhöht ist. Außerdem zeigt der Entzündungsscore im Vergleich zu prästenotischen Abschnitten keine morphologische Ähnlichkeit, was bei einem vorliegendem „field effect“ eigentlich zu erwarten wäre.

4.4 Permeabilitätsmessung

4.4.1 Diskussion der Methodik

Die Oberfläche der menschlichen Darmschleimhaut beträgt schätzungsweise 400 bis 500 m² und muss neben der Aufnahme von Nährstoffen für den Körper auch eine Barrierefunktion gegen Krankheitserreger und deren Produkte erfüllen. Verschiedene Traumen, welche lokal auf die Darmwand begrenzt oder auch systemischer Art sein können, sind in der Lage, die Barrierefunktion der Darmschleimhaut gegen Krankheitserreger zu schwächen, wie beispielsweise Sepsis, Verbrennungen, Immunsuppression, Bestrahlungsschäden oder hämorrhagisches Schockgeschehen^(87,86).

Um die Barrierefunktion der Darmschleimhaut zu testen, ist die Permeabilitätsmessung eine beliebte Methode⁽¹¹⁸⁾. Eine weitere Methode, um die Barrierefunktion des Darmes zu charakterisieren, bietet der Nachweis bakterieller Translokation. Dabei ermöglicht die Anzüchtung von Bakterienkulturen aus peritonealer Flüssigkeit oder dem Darm benachbarten Organen wie Leber, Milz und mesenteriale Lymphknoten sowie die Anfertigung von Blutkulturen den Nachweis bakterieller Translokation über die Darmwand.

In vorliegender Arbeit wurde lediglich die Methode der Permeabilitätsmessung angewandt. Dafür wurden die zwei Substanzen FITC- dextran und HRP als Marker herangezogen, um die intestinale Permeabilität der Darmmukosa zu bestimmen. Wang et al. wendeten diese Methode bereits an, um zu zeigen, dass die Permeabilität des Dünndarms durch IL- 6 und IL- 10 reguliert wird⁽¹¹⁹⁾.

Interessant ist, dass eine Permeabilitätsänderungen der Darmmukosa auch schon beobachtet werden konnten bei Schädigung anderer Organe als dem Darm selbst: Verbrennungsverletzungen, Polytrauma, Sepsis und hämorrhagischer Schock waren in verschiedenen Studien mit einer Erhöhung der Darmwandpermeabilität assoziiert (86,120,121,122,123).

In vorliegender Arbeit wurde am Mausmodell untersucht, welche Auswirkungen auf die Permeabilität die Induktion eines mechanischen Ileus haben würde. Zum Zeitpunkt der Versuche lagen dazu noch kaum Daten aus tierexperimentellen Studien vor.

Es konnte allerdings schon gezeigt werden, dass beispielsweise Citrullin und Glutamin bei mechanischem Ileus einen protektiven Effekt auf die Darmwand zeigen, indem sie die Darmpermeabilität verringern (124,125).

Einer Patientenstudie von Deitch et al. zufolge waren bei Patienten mit einem mechanischen Ileus in 59% der Fälle positive Bakterienkulturen aus mesenterialen Lymphknoten nachweisbar, wohingegen sich bei anderweitig operierten Patienten lediglich in 4% der Fälle Bakterienkulturen aus mesenterialen Lymphknoten anzüchten ließen (126).

Deitch et al. konnten außerdem zeigen, dass es bei einem mechanischem Ileus zu einem 100- bis 1.000- fachen Anstieg der Bakterienpopulationen im Darm kommt und zudem die bakterielle Fehlbesiedlung besonders im Ileum am höchsten ausfällt (66). Diese Tatsache liefert einen weiteren Grund, die Permeabilität der Dünndarmmarmwand für Moleküle verschiedener Molekülmasse zu untersuchen. Grund dafür ist, dass die Entstehung einer Sepsis durch Übergang bakteriellen Endo- und Exotoxinen in die Blutbahn eine ernst zu nehmende Komplikation des Ileus darstellt. Bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharide haben im Schnitt ein Molekulargewicht von 10 kD, während das Molekulargewicht bakterielle Exotoxine stark zwischen 50 und 1.000kD variiert (127).

Des Weiteren ist laut einer Studie von Buchholz et al davon auszugehen, dass bakterielle Endotoxine selbst eine verlängerte Magen-Darm-Passage bis hin zum Ileus hervorrufen können mittels Aktivierung des TLR4- Rezeptors auf nicht-hämatopoetischen Zellen (128), was zu einem Circulus vitiosus in der Entstehung eines Ileus führen könnte.

4.4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Permeabilitätsmessung konnte zeigen, dass die Permeabilität der Darmmukosa für große Moleküle in der zeitlichen Entwicklung des Ileus zunimmt.

Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass bei Erhöhung der Darmpermeabilität bei gleichzeitiger

Stase das Darminhaltes Bakterientoxine in die Blutbahn gelangen und auf diese Weise zu einer systemischen Infektion führen.

Auffällig war, dass die Konzentration des HRP im zeitlichen Verlauf anstieg, während die Konzentration des FITC im zeitlichen Verlauf eine abfallende Tendenz zeigte. Dies liegt womöglich darin begründet, dass HRP ein größeres molekulares Gewicht als FITC besitzt (HRP = 40 kD; FITC = 4,4 kD).

Dieser Unterschied im Molekulargewicht bewirkt wahrscheinlich eine langsamere Aufnahme des HRP über die Darmmukosa. Da die Ausscheidung des HRP über die Leber vermutlich langsamer geschieht als seine Aufnahme ⁽¹²⁹⁾, konnte es bei länger dauerndem Vorliegen des mechanischen Ileus im Blut akkumulieren.

Dagegen konnte FITC wahrscheinlich aufgrund seines wesentlich geringeren Molekulargewichtes schneller über die Darmwand aufgenommen werden, weshalb es in der Anfangsphase des mechanischen Ileus rasch im Blut akkumuliert. Die niedrigeren Werte in den 9h- und 24h- Gruppen sind vermutlich dadurch bedingt, dass die Metabolisation und Ausscheidung schneller als die Aufnahme ablief.

5 Zusammenfassung

Der mechanische Ileus ist eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung, häufig nach chirurgischen Eingriffen erworben und ist durch ein Passagehindernis des Gastrointestinaltraktes gekennzeichnet. Die Therapie eines mechanischen Ileus ist in der Regel ursachenorientiert und hat die Beseitigung der Obstruktion zum Ziel.

Obwohl der mechanische Darmverschluss ein häufig vorkommendes Krankheitsbild darstellt, sind in den letzten Jahren wenige Anstrengungen unternommen worden, um die pathophysiologischen Prozessen hinter dem Krankheitsgeschehen zu beleuchten.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die mesenteriale afferente Nervenfaserveraktivität, lokale Gewebsveränderungen der Darmschleimhaut sowie die Permeabilität der Darmschleimhaut für verschiedene künstliche Substanzen in der Frühphase des mechanischen Ileus.

Unter Narkose mit Isofluran und Analgesie mit Lidocain und Metamizol postoperativ wurden 20-30 g schwere, männliche C57/Bl6 Mäuse einer Laparotomie unterzogen. Anschließend wurde der Dünndarm 5 cm von der Ileozökalklappe ligiert; bei den Kontrolltieren wurde das gesamte Darmpaket lediglich disloziert und hiernach reponiert.

Nach 3,9 und 24 h erfolgte die Entnahme des poststenotischen Darmabschnittes beziehungsweise des anatomisch-entsprechenden Darmabschnittes bei den Kontrolltieren. Weiterhin wurden gesonderte Darmabschnitte für die histologische Aufarbeitung mittels der H & E-Färbung entnommen. Nun erfolgte die Messung der afferenten Nervenfaserveraktivität der sechs Untergruppen (n = 6) in einem Organbad. Dabei wurde die Ruhefaserveraktivität sowie die Steigerung der Reizantwort auf 5-HT (50 μ M), Bradykinin (0,5 μ M) und Rampendistension (0-80 cm H₂O) gemessen.

Die in der Einleitung formulierte Hypothese, dass sich die intestinale afferente Nervenübertragung im poststenotischen Abschnitt während eines mechanischen Ileus ändern würde, konnte bei Betrachtung der Versuchsergebnisse nicht gestützt werden. Die verschiedenen Stimuli der Nerven durch Serotonin, Bradykinin und die Darmdistension konnten zu keinem Zeitpunkt einen Unterschied zwischen Sham-operierten und Ileus-operierten Mäusen erkennen lassen. Da die Darmabschnitte der Sham-operierten Mäuse genauso reagierten wie die entsprechenden Darmabschnitte der Ileus-operierten Mäuse, liegt die Vermutung nahe, dass sich der poststenotische Darm in seiner nervalen Sensibilität für Serotonin und Bradykinin nicht von einem nicht-obstruierten Darm unterscheidet.

Des Weiteren scheint das prästenotische Krankheitsgeschehen beim mechanischen Ileus nicht die Schmerzwahrnehmung der poststenotischen Darmabschnitte zu beeinflussen.

Die histologische Aufarbeitung der poststenotischen Darmabschnitte mithilfe der HE Färbung und die anschließende Beurteilung der stattgefundenen Darmwandentzündung anhand des Hausmann Scores lieferten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ileus- und Sham-operierten Gruppen. Die poststenotischen Darmwände der Ileus- operierten Mäuse zeigten im Durchschnitt eine nicht signifikant erhöhte Entzündungsaktivität als die Darmwände der Sham- operierten Mäuse. Dabei waren bei den Ileus- operierten Mäusen die Zottenstrukturen deformiert und mancherorts verdünnt und abgeflacht. Außerdem zeigten die Därme der Ileus- operierten Tiere eine größere Anzahl von Granulozyteninfiltraten, wohingegen in den Därmen der Sham- operierten Mäuse nur vereinzelt Becherzellverluste und fast keine infiltrierenden Entzündungszellen vorzufinden waren.

Für die Bestimmung der Permeabilitätsmessung wurde wie oben beschrieben ein mechanischer Ileus induziert, beziehungsweise eine Shamoperation durchgeführt, wobei diesmal unmittelbar vor der Operation eine Lösung, welche FITC und HRP enthielt, mittels Gavage in den Magen appliziert wurde. 3, 9 und 24 h nach der Operation wurden die Serumproben der Untergruppen (n = 4) mit Spectrophotofluorometrie auf ihre Gehalt von FITC und HRP untersucht. Dabei wurde nach 3 h und nach 9 h eine deutliche Zunahme der FITC Konzentrationen in den Ileus- operierten Mäusen gegenüber den Sham- operierten Mäusen gemessen ($187,63 \pm 7,85$ vs. $147,47 \pm 8,11$ bei 3h, $87,77 \pm 8,88$ vs. $62,00 \pm 8,82$, $p < 0,05$). Die FITC Konzentrationen der 24 h Ileusgruppe zeigte dabei nur eine leichte Erhöhung gegenüber der gemessenen FITC Konzentrationen der entsprechenden Kontrollgruppe.

Eine statistische Auswertung wurde auch nach der Messung der HRP Konzentrationen vorgenommen. Hier zeigte sich lediglich nach 9 h ein deutlicher Unterschied zwischen der Ileusgruppe und der Kontrollgruppe ($23,03 \pm 4,31$ vs. $9,00 \pm 3,13$), während bei den anderen Gruppen tendenziell eine höhere HRP Konzentration in den Ileus- operierten Tieren im Vergleich zu den Sham- operierten Tieren festgestellt werden konnte. Die anfangs formulierte Hypothese, die Darmwand würde im Verlauf eines Ileus eine erhöhte Permeabilität aufweisen als eine nicht- obstruierte Darmwand, konnte somit teilweise verifiziert werden.

Die Ergebnisse legten die Schlussfolgerung nahe, dass die Darmwand infolge der prästenotischen Darmdistension und der damit einhergehenden Mikrozirkulationsstörungen eine erhöhte Durchlässigkeit zeigte für FITC und HRP. Eine Durchwanderung der Darmwand

während eines Ileus durch Darmbakterien und deren Toxine ist somit sehr wahrscheinlich und damit konsekutiv auch eine Bakteriämie oder zumindest eine Endotoxinämie. Diese Tatsache könnte einen Anstoß geben bei der Formulierung zukünftiger Fragestellungen auf dem Gebiet des mechanischen Ileus.

Abschließend kann darauf geschlossen werden, dass die mesenterialen afferenten Nerven des poststenotischen Dünndarms beim mechanischen Ileus weder verstärkt sensibilisiert noch desensibilisiert werden.

Die vermutete Permeabilitätserhöhung durch die prästenotische Darmdistension konnte experimentell bestätigt werden. Inwiefern die Darmwandpermeabilität des poststenotischen Darmes beeinträchtigt ist, kann mit den jetzigen Versuchen nicht belegt werden, da die Substanzen oral verabreicht wurden und aufgrund der Stenose nicht in den poststenotischen Darm gelangen konnten. Ein Schwerpunkt zukünftiger Versuche könnte daher Messung der poststenotischen Darmwandpermeabilität sein, um zu überprüfen, ob die Permeabilität nur auf die hohen Distensionsdrücke zurückzuführen ist. Ebenfalls interessant wäre ein Versuchsansatz, bei dem eine herbeigeführte Stenose wieder gelöst wird, um die Zeit bis zur vollständigen Restitution der Darmwand zu ermitteln.

6 Abkürzungen

BK	Bradykinin
Da	Dalton (Atomare Masseneinheit)
DD	Darmdistension
d.P.	der Patienten
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENS	Enterisches Nervensystem
FE	field effect
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	Horseradish Peroxidase
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
ICC	interstitial cells of cajal
IGLE	interganglionic laminar ending
IL	Interleukin
IFAN	Intestinofugale afferente Nervenendigungen
MPO	Myeloperoxidase
OP	optical density
ramen	rapidly adapting mechanosensitive enteric neuron
rpm	rounds per minute
SEM	Standard error of the mean
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Abbildungen und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungen

<i>Abbildung 1: Übersicht der Pathophysiologie der Ileuskrankheit</i>	12
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Elektrophysiologie und HE Färbung</i>	20
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Permeabilitätsmessung</i>	21
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung des Organbads für die elektrophysiologische Ableitung</i>	25
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung des experimentalen Prinzips des Immunoessays</i>	30
<i>Abbildung 6: Versuchsprotokoll für die Elektrophysiologie</i>	33
<i>Abbildung 7: Standardkurve für FITC-dextran, OD: „optical density“ =log (I₀/I)</i>	35
<i>Abbildung 8: Standardkurve für HRP, OD: „optical density“ =log (I₀/I)</i>	35
<i>Abbildung 9: Darstellung des Ileum 9h nach Anbringen einer Ligatur</i>	42
<i>Abbildung 10: Nervenfaserableitung vor und nach Serotonin- Gabe</i>	43
<i>Abbildung 11: Nervenfaserableitung vor und nach Serotonin- Gabe</i>	43
<i>Abbildung 12: Histogrammische Darstellung der normalisierten Anstiegsraten der nervalen Impulse durch Serotonin- Gabe nach 3, 9 und 24 h post OP. MW ± SEM; p < 0,05; n = 6</i>	44
<i>Abbildung 13: Nervenfaserableitung vor und nach Bradykinin Gabe</i>	45
<i>Abbildung 14: Nervenfaserableitung vor und nach Bradykinin Gabe</i>	45
<i>Abbildung 15: Histogrammische Darstellung der normalisierten Anstiegsraten der nervalen Impulse durch Bradykinin nach 3, 9 und 24 h post OP. MW ± SEM; p < 0,05; n = 6</i>	46
<i>Abbildung 16: Nervenfaserableitung vor und nach Darmdistension</i>	47
<i>Abbildung 17: Nervenfaserableitung vor und nach Darmdistension</i>	48
<i>Abbildung 18: Histogrammische Darstellung der normalisierten Anstiegsrate der afferenten Nervenimpulse der 3h Gruppe. MW ± SEM; p < 0,05; n = 6</i>	48
<i>Abbildung 19: Histogrammische Darstellung der normalisierten Anstiegsrate der afferenten Nervenimpulse der 9h Gruppe. MW ± SEM; p < 0,05; n = 6</i>	49
<i>Abbildung 20: Histogrammische Darstellung der normalisierten Anstiegsrate der afferenten Nervenimpulse der 24h Gruppe. MW ± SEM; p < 0,05; n = 6</i>	49
<i>Abbildung 21: Links: 3h op, 10- fache Vergrößerung, rechts: 3h Sham, 10- fache Vergrößerung</i>	50
<i>Abbildung 22: Links: 9h Shamdarm in 10- facher Vergrößerung, Rechts: 9h OP in 10- facher Vergrößerung</i> ...	51
<i>Abbildung 23: Links: 24h op, 10- fache Vergrößerung. Rechts: 24h Sham, 20- fache Vergrößerung</i>	51
<i>Abbildung 24: Histogrammische Darstellung des Entzündungsscores nach Hausmann; MW ± SEM; p < 0,05; n = 4</i>	52
<i>Abbildung 25: Konzentration von HRP im Blut (ng/ml); MW ± SEM, p < 0,05, n = 4</i>	54
<i>Abbildung 26: Konzentration von FITC im Blut (ng/ml) MW ± SEM, p < 0,05, n = 4</i>	55

7.2 Tabellen

<i>Tabelle 1: Übersicht über die Versuchsgruppen für die Elektrophysiologie und HE Färbung</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 2: Übersicht über die Versuchsgruppen</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 3: Bestandteil der Gavage-Lösung.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 4: Aufbereitung der Darmsegmente für die HE Färbung.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 5: Versuchsprotokoll des Immunoassays</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 6: Histologischer Score zur Bestimmung des Entzündungsgrades nach Hausmann et al.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 7: Geräte</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 8: Chemikalien.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 9: Zusammensetzung der 10x Krebs'-Lösung</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 10: Zusammensetzung der Krebs'-Lösung</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 11: Zusammensetzung der TBS-Lösung (pH 7,6).....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 12: Konzentration von FITC-dextran in ng/ml. Darstellung als Mean ± SEM; * p < 0.05, n = 4.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 13: Konzentration von HRP in ng/ml. Darstellung als Mean ± SEM; * p < 0.05, n = 4.....</i>	<i>53</i>

8 Danksagung

Meinen Dank möchte ich an dieser Stelle all jenen aussprechen, die mir bei der Durchführung der Versuche und beim Schreiben der Arbeit ihre Unterstützung ausgesprochen und mich mit guten Ratschlägen unterstützt haben.

Besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Martin Kreis, der mir das Projekt in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat und mich durch seine motivierende Art zur Durchführung der Versuche ermutigt hat.

Ebenso möchte ich auch PD Dr. Mario Müller danken, der mir gerade in der Anfangsphase des Projektes wesentliche inhaltliche Anstöße gab und mich in die Feinheiten der elektrophysiologischen Versuchsmethoden einführte.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Forschungsgruppe Kreis/Müller und Kasperek, denen ich während meiner Zeit als Doktorand begegnet bin. Insbesondere Petra Benhaqi und Brigitte Görtz sind an dieser Stelle zu erwähnen, da sie mir durch ihre fachliche Kompetenz als Forscher immer wieder wertvolle Anregungen geben konnten und mir bei der Durchführung der Experimente wesentliche Unterstützung boten.

Dr. Andrei Sibaev sei an dieser Stelle gedankt für seine fachlichen Ratschläge und seine Worte zum Umgang mit tierischem Leben, die mich immer wieder daran erinnerten, die Tiere mit dem nötigen Respekt zu behandeln.

Besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle Dr. Xue Zhao zukommen lassen, die mich in die experimentellen Methoden einweihte. Durch ihre wertvollen Ratschläge und unserer gemeinsamen Diskussionen wurde diese Arbeit erst möglich gemacht.

Von tiefstem Herzen danke ich auch meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in allem, was ich mir vornahm, bestärkt haben und mich durch ihre kritischen Fragen immer wieder zum Nachdenken anregten.

Meiner Tante Marianne Macheroux und meiner Schwester Eva Pauline Macheroux danke ich für die Durchsicht des Manuskripts.

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Intestinale afferente Sensibilität, Permeabilität und Entzündungsreaktion des Dünndarms
während des mechanischen Ileus der Maus

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche
kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln
nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht
wurde.

München, 20.04.2018

Till Macheroux

10 Literatur

- 1 Dr. med. S. Said, Volumen und sanfte Chirurgie, 2006 im Internet (Stand 08.01.2013):
URL: http://www.cme-intensiv.de/cmsmedia/Modul_5.pdf
- 2 Dirst, Rohen; Bauchchirurgie, 2. Auflage 1998, Schattauer Verlag, Seite 350-361
- 3 Henne-Bruns D, Löhnert M. Aktueller Stand zur Diagnostik und nichtoperativen
Therapie des Dünndarmileus. Chirurg. 2000; 71:503-509.
- 4 Jauch, Karl-Walter und Mutschler, Wolf und Hoffmann, Johannes N. und Kanz, Karl-
Georg (Hrsg.): Chirurgie Basisweiterbildung: In 100 Schritten durch den Common
Trunk. 2. Aufl., Springer Berlin Heidelberg: 2013.
- 5 PD Dr. M. E. Kreis, Ileus aus chirurgischer Sicht, K. W. Jauch. Der Chirurg, October
2006, Volume 77, Issue 10, pp 883-888
- 6 Ania Carolina Muntau, Intensivkurs Pädiatrie, 6. Auflage, Urban und Fischer, 2011
- 7 Englert ZP, Love K, Marilley MD, Bower CE. Bouveret syndrome: gallstone ileus of
the duodenum. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech. 2012 Oct;22(5):e301-3.
- 8 Miller G, Boman J, Shrier I, Gordon PH. Etiology of small bowel obstruction. Am J
Surg. 2000 Jul;180(1):33-6.
- 9 Baumann R. Ileus. In: Karl-Heinz Reutter. Chirurgie. 5 Aufl. Thieme. 2004; S 200.
- 10 Artinyan A, Nunoo-Mensah JW, Balasubramaniam S, Gauderman J, Essani R,
Gonzalez-Ruiz C, Kaiser AM, Beart RW Jr. Prolonged postoperative ileus-definition,
risk factors, and predictors after surgery. World J Surg. 2008 Jul;32(7):1495-500.
- 11 Patel R, Christensen J. Chronic intestinal pseudo-obstruction: diagnosis and treatment.
Gastroenterologist 1995 Dec; 3(4):345-56.
- 12 Colemont LJ, Camilleri M. Chronic intestinal pseudo-obstruction: diagnosis and
treatment. Mayo Clin Proc. 1989 Jan;64(1):60-70
- 13 Stanghellini V, Corinaldesi R, Barbara L. Pseudo-obstruction syndromes. Baillieres
Clin Gastroenterol. 1988 Jan; 2(1): 225-54.
- 14 Keller J., Layer P. Chronic intestinal pseudo-obstruction: pathogenesis, diagnosis
and therapy. Z Gastroenterol. 2002 Feb;40(2):85-95
- 15 Verne GN, Sninsky CA. Chronic intestinal pseudo-obstruction. Dig Dis. 1995 May-
Jun;13(3):163-81.
- 16 Mann SD, Debinski HS, Kamm MA. Clinical characteristics of chronic idiopathic
intestinal pseudo-obstruction in adults. Gut. 1997 Nov;41(5):675-81

-
- 17 J. Keller, T. Wedel, H. Seidl, M.E. Kreis, V. Andresen, J.C. Preiß, P. Layer, I. van der Voort. S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität (DGNM) zu Definition, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie intestinaler Motilitätsstörungen. *Z Gastroenterol* 2011; 49: 374-390
- 18 Costa M, Brookes SJ. The enteric nervous system. *Am J Gastroenterol* 1994;89:129-137
- 19 Speckmann, Erwin-Josef und Hescheler, Jürgen und Köhling, Rüdiger (Hrsg.): *Physiologie*. 6. Aufl., Urban & Fischer: 2013.
- 20 Gabella G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. *Neuroscience*. 1987 Aug;22(2):737-52.
- 21 Edith Bülbring. Motility of the Intestine. *Proc R Soc Med*. 1961 September; 54(9): 773–775.
- 22 Horowitz B, Ward SM, Sanders KM. Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:19-43.
- 23 Zhou H, Liu L, Bai Y, Wu W, Li G, Li J, Zou D, Gao J, Li Z. Damage of the interstitial cells of Cajal and myenteric neurons causing ileus in acute necrotizing pancreatitis rats. *Surgery*. 2011 Feb;149(2):262-75. doi: 10.1016/j.surg.2010.04.023. Epub 2010 Jun 8.
- 24 Jänig W, McLachlan EM. Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev*. 1987 Oct;67(4):1332-404.
- 25 Coldwell JR, Phillis BD, Sutherland K, Howarth GS, Blackshaw LA. Increased responsiveness of rat colonic splanchnic afferents to 5-HT after inflammation and recovery. *J Physiol*. 2007 Feb 15;579(Pt 1):203-13.
- 26 Hicks GA, Coldwell JR, Schindler M, Ward PA, Jenkins D, Lynn PA, Humphrey PP, Blackshaw LA. Excitation of rat colonic afferent fibres by 5-HT(3) receptors. *J Physiol*. 2002 Nov 1;544(Pt 3):861-9.
- 27 Jyoti N. Sengupta. Visceral Pain: The Neurophysiological Mechanism. *Handb Exp Pharmacol*. 2009 ; (194): 31–74.
- 28 S.L.Chen, X.Y. Wu, Z.J. Cao, J. Fan, M. Wang, C. Owyang, Y. Li. Subdiaphragmatic vagal afferent nerves modulate visceral pain. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal Liver Physiology*. 2008 June; 294(6): G1441-G1449
- 29 J. M. Gschossmann, E. A. Mayer, J. C. Miller & H. E. Raybould. Subdiaphragmatic vagal afferent innervation in activation of an opioidergic antinociceptive system in response to colorectal distension in rats. *Neurogastroenterol. Mot.* (2002) 14, 403–407
- 30 Szurszewski JH, Weems WA. A study of peripheral input to and its control by post-ganglionic neurones of the inferior mesenteric ganglion. *J Physiol* 1976; 256: 541–56.

C. E. Booth et al. Neurogastroenterology and Motility

- 31 Wood JD. Intrinsic neural control of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 1981;43:33-51.
- 32 Grundy D. Signalling the state of the digestive tract. *Auton Neurosci*. 2006 Apr 30;125(1-2):76-80. Epub 2006 Feb 13.
- 33 Cremon C, Carini G, Wang B, Vasina V, Cogliandro RF, De Giorgio R, Stanghellini V, Grundy D, Tonini M, De Ponti F, Corinaldesi R, Barbara G. Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2011 Jul;106(7):1290-8. doi: 10.1038/ajg.2011.86. Epub 2011 Mar 22.
- 34 Jiang W, Kirkup AJ, Grundy D. Mast cells drive mesenteric afferent signalling during acute intestinal ischaemia. *J Physiol*. 2011 Aug 1;589(Pt 15):3867-82. doi: 10.1113/jphysiol.2011.209478. Epub 2011 Jun 13.
- 35 Doe-Young Kim MD and Michael Camilleri MD. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *The American Journal of Gastroenterology* (2000) 95, 2698–2709;
- 36 Verbeuren, TJ Interaction of 5-hydroxytryptamine with autonomic and sensory neurons. In: Fozard JR, eds. *The peripheral actions of 5-hydroxytryptamine in peripheral tissues* Oxford University Press: Oxford 1989:1–25.
- 37 Gershon MD. Serotonin is a Sword and a Shield of the Bowel: Serotonin Plays Offense and Defense. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2012;123:268-80.
- 38 Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A, McQuoid C, Blaszyk H, Sharkey KA, Mawe GM. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2005 Oct; 17(5):751-60.
- 39 Liu MT, Kuan YH, Wang J, Hen R, Gershon MD. 5-HT₄ receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci*. 2009 Aug 5; 29(31):9683-99.
- 40 Cremon C, Carini G, Wang B, Vasina V, Cogliandro RF, De Giorgio R, Stanghellini V, Grundy D, Tonini M, De Ponti F, Corinaldesi R, Barbara G. Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2011 Jul;106(7):1290-8. doi: 10.1038/ajg.2011.86. Epub 2011 Mar 22.
- 41 Kozlowski CM, Green A, Grundy D, Boissonade FM, Bountra C. The 5-HT₃ receptor antagonist alosetron inhibits the colorectal distention induced depressor response and spinal c-fos expression in the anaesthetised rat. *Gut*. 2000;46:474 - 480.
- 42 Hicks GA, et al. Excitation of rat colonic afferent fibres by 5-HT₃ receptors. *J Physiol*. 2002;544:861 - 869.

-
- 43 Coldwell JR, Phillis BD, Sutherland K, Howarth GS, Blackshaw LA. Increased responsiveness of rat colonic splanchnic afferents to 5-HT after inflammation and recovery. *J Physiol.* 2007;579:203 – 213.
- 44 Robert J. Phillips, Terry L. Powley. Tension and stretch receptors in gastrointestinal smooth muscle: re-evaluating vagal mechanoreceptor electrophysiology. *Brain Research Reviews* 34 (2000) 1–26
- 45 Mazzuoli G, Schemann M. Mechanosensitive enteric neurons in the myenteric plexus of the mouse intestine. *PLoS One.* 2012;7(7):e39887. doi: 10.1371/journal.pone.0039887. Epub 2012 Jul 2.
- 46 Zagorodnyuk VP, Kyloh M, Brookes SJ, Nicholas SJ, Spencer NJ. Firing patterns and functional roles of different classes of spinal afferents in rectal nerves during colonic migrating motor complexes in mouse colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 Aug 1;303(3):G404-11. doi: 10.1152/ajpgi.00047.2012. Epub 2012 May 24.
- 47 Booth CE, Shaw J, Hicks GA, Kirkup AJ, Winchester W, Grundy D. Influence of the pattern of jejunal distension on mesenteric afferent sensitivity in the anaesthetized rat. *Neurogastroenterol Motil.* 2008 Feb;20(2):149-58. Epub 2007 Sep 10.
- 48 J. Yang, J. Zhao, W. Jiang, T. Nakaguchi, P. Kunwald, D. Grundy and H. Gregersen response to mechanical stimulation. Neurogenic adaptation contributes to the afferent Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 302:G1025-G1034, 2012. First published 16 February 2012;
- 49 Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 5;97(14):8140-5.
- 50 Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2001 Oct 19;429(1-3):161-76.
- 51 Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev.* 1998 Sep;50(3):357-86.
- 52 Maurer M, Bader M, Bas M, Bossi F, Cicardi M, Cugno M, Howarth P, Kaplan A, Kojda G, Leeb-Lundberg F, Lötvall J, Magerl M. New topics in bradykinin research. *Allergy.* 2011 Nov;66(11):1397-406.
- 53 P. Merkle, H. Bindewald und D. Breitig. Untersuchungen zu Funktion und Stoffwechsel der Mucosa beim mechanischen Dünndarmileus der Ratte. *Langenbecks Arch. Chir.* 338, 291--297 (1975)
- 54 Shields, R. : The absorption and secretion of fluid and electrolytes by the obstructed bowel. *Brit. J. Surg.* 52, 774 (1965)
- 55 Grace, R. H.: The handling of water and electrolytes by the small bowel following the relief of intestinal obstruction. *Brit. J. Surg.* 58, 760 (1971)

-
- 56 Fazel A, Verne GN. New solutions to an old problem: acute colonic pseudo-obstruction. *J Clin Gastroenterol*. 2005 Jan;39(1):17-20.
- 57 Silen W (2005) Harrison's Principles of Internal Medicine. In: Petersdorf RG, Raymond DA, Braunwald E et al. (eds) *Acute Intestinal Obstruction*. 11th edn. McGraw-Hill, pp 1703–1705
- 58 Schmidt E, Bruch HP, Laven R (1978) Dickdarmdynamik im Ileus. *Chirurg* 49: 104
- 59 Mirkovitch V, Cobo F, Robinson JW, Menge H, Combo SZ. (1976) Morphology and function of the dog ileum after mechanical occlusion. *Clin Sci Med* 50: 123
- 60 Shikata J, Shida T, Amino K, Ishioka K. Experimental studies on the hemodynamics of the small intestine following increased intraluminal pressure. *Surg Gynecol Obstet*. 1983; 156: 155-160.
- 61 Ruf W, Suehiro GT, Suehiro A, Pressler V, McNamara JJ. Intestinal blood flow at various intraluminal pressures in the piglet with closed abdomen. *Ann Surg*. 1980; 191: 157-163.
- 62 Medica Konsult Facharztwissen; Website:<http://www.medicoconsult.de/wiki/Ileus>, vom 11.01.2013, 11:50
- 63 Roscher R, Oettinger W, Beger HG. Bacterial microflora, endogenous endotoxin, and prostaglandins in small bowel obstruction. *Am J Surg*. 1988 Feb;155(2):348-55.
- 64 Zhi-Yong S, Dong YL, Wang XH. Bacterial translocation and multiple system organ failure in bowel ischemia and reperfusion. *J Trauma*. 1992 Feb;32(2):148-53.
- 65 Henne-Bruns D, Löhnert M., Current status of diagnosis and nonoperative therapy of small bowel ileus. *Chirurg*. 2000 May;71(5):503-9.
- 66 Deitch EA, Bridges WM, Ma JW, Ma L, Berg RD, Specian RD. Obstructed intestine as a reservoir for systemic infection. *Am J Surg*. 1990 Apr;159(4):394-401.
- 67 Sagar PM, MacFie J, Sedman P, May J, Mancey-Jones B, Johnstone D. Intestinal obstruction promotes gut translocation of bacteria. *Dis Colon Rectum*. 1995 Jun;38(6):640-4.
- 68 Roscher R, Lommel K (1998) Pathophysiologie der Ileuskrankheit. *Zentralbl Chir* 123: 1328
- 69 Beck DE, Opelka FG, Bailey HR, Rauh SM, Pashos CL. Incidence of small-bowel obstruction and adhesiolysis after open colorectal and general surgery. *Dis Colon Rectum*. 1999 Feb;42(2):241-8.
- 70 Renzulli P, Krähenbühl L, Sadowski C, Al-Adili F, et al (1998) Moderne diagnostische Strategie beim Ileus. *Zentralbl Chir*. 123: 1334

-
- 71 Miller G, Boman J, Shrier I, Gordon PH. Small-bowel obstruction secondary to malignant disease: an 11-year audit. *Can J Surg*. 2000 Oct;43(5):353-8.
- 72 M. Müller und Mitarbeiter. *Chirurgie für Studium und Praxis*. 2010/2011. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach
- 73 T. Plusczyk, M. Bolli, M. Schilling. Ileuskrankheit. *Chirurg* 2006 · 77:898–903
DOI 10.1007/s00104-006-1237-9
- 74 Goldberg HI, Dodds WJ (1979) Roentgen Evaluation of small bowel obstruction. *Dig Dis Sci* 24: 245
- 75 Megibow AJ, Balthazar EJ, Cho KC, Medwid SW, et al (1991)
Bowel obstruction: evaluation with CT. *Radiology* 180: 313
- 76 Bungard TJ, Kale-Pradhan PB. Prokinetic agents for the treatment of postoperative ileus in adults: a review of the literature. *Pharmacotherapy*. 1999; 19: 416.
- 77 Kreis ME, Zittel TT, Kasperek M, Thiers G. What dose of neostigmine is effective for the treatment of postoperative colonic ileus? Lessons from colonic motility studies. In: Herbert MK, Holzer P, Roewer N. *Problems of the gastrointestinal tract in anesthesia, the perioperative period, and intensive care*. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1999; p12.
- 78 Post S., Schuster K.L. (2000). Verlassenes, bewährtes und aktuelles zur operativen Dünndarmileus Therapie. *Der Chirurg* 71:524-531
- 79 Zielinski MD, Bannon MP. Current management of small bowel obstruction. *Adv Surg*. 2011;45:1-29.
- 80 Bickell NA, Federman AD, Aufses AH Jr. Influence of time on risk of bowel resection in complete small bowel obstruction. *J Am Coll Surg*. 2005 Dec;201(6):847-54. Epub 2005 Oct 10.
- 81 Jeremy M. D. Nightingale (2003). The medical management of intestinal failure: methods to reduce the severity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, pp 703-710.
- 82 Kukor JS, Dent TL (1987) Small intestinal obstruction. In: Nelson RL, Nyhus LM (eds) *Surgery of the small intestine*. Appleton & Lange, Norwalk, p 267
- 83 Zhao, Xue (2013): Intestinale afferente Sensibilität und Entzündungsreaktion des Dünndarms bei mechanischem Ileus der Maus. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät
- 84 Koscielny A, Engel D, Maurer J, Hirner A, Kurts C, Kalff JC. Impact of CCR7 on the gastrointestinal field effect. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011 Apr;300(4):G665-75
- 85 Kalff, Jörg C. MD; Türler, Andreas MD; Schwarz, Nicolas T. MD; Schraut, Wolfgang

-
- H. MD; Lee, Kenneth K. W. MD; Tweardy, David J. MD; Billiar, Timothy R. MD; Simmons, Richard L. MD; Bauer, Anthony J. PhD. Intra-Abdominal Activation of a Local Inflammatory Response Within the Human Muscularis Externa During Laparotomy. *Annals of Surgery*: March 2003 - Volume 237 - Issue 3 - pp 301-315
- 86 Wang Q, Fang CH, Hasselgren PO. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septoc IL-6 knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 281:1013-23.
- 87 Berthiaume F, Ezzell RM, Toner M, Yarmush ML, Tompkins RG. Transport of fluorescent dextrans across the rat ileum after cutaneous thermal injury. *Crit Care Med*. 1994; 22: 455-464.
- 88 Godwin Avwioro (2011): Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review. In: *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*. Bd. 1, S. 24-34
- 89 Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008 Aug;63(8):879-84.
- 90 Gallati und Pracht: Bestimmung von Peroxidase mit H₂O₂ und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin . *J. Clin. Chem. Clin. Biochem*. Vol. 23, 1985, pp. 453-460
- 91 Hausmann M, Obermeier F, Paper DH, Balan K, Dunger N, Menzel K, Falk W, Schoelmerich J, Herfarth H, Rogler G. In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol*. 2007; 148: 373-381.
- 92 Xue B, Hausmann M, Müller MH, Pesch T, Karpitschka M, Kasperek MS, Hu WC, Sibaev A, Rogler G, Kreis ME. Afferent nerve sensitivity is decreased by an iNOS-dependent mechanism during indomethacin-induced inflammation in the murine jejunum in vitro. *Neurogastroenterol Motil*. 2009Mar;21(3):322-34.
- 93 Staib I. On the physiopathology of mechanical ileus. I. Experimental studies with special reference to blood circulation and intracellular electrolyte metabolism. *Bruns Beitr Klin Chir*. 1966 May;212(3):351-84 contd.
- 94 Enochsson L, Hellström PM, Nylander G, Johansson C. Myoelectric motility patterns during mechanical obstruction and paralysis of the small intestine in the rat. *Scand J Gastroenterol*. 1987 Oct;22(8):969-74.
- 95 Brolin RE, Reddell MT. Gastrointestinal myoelectric activity in mechanical intestinal obstruction. *J Surg Res*. 1985; 38: 515-523.
- 96 Seok J., Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 26;110(9):3507-12
- 97 Mestas JI, Hughes CC, Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):2731-8.

-
- 98 Ouellette, A. J., M. E. Selsted. 1996. Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J.* 10:1280
- 99 Torjman MC1, Joseph JI, Munsick C, Morishita M, Grunwald Z. Effects of isoflurane on gastrointestinal motility after brief exposure in rats. *Int J Pharm.* 2005 Apr 27;294(1-2):65-71.
- 100 Engelhard K1, Werner C, Reeker W, Lu H, Möllenberg O, Mielke L, Kochs E. Desflurane and isoflurane improve neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats. *Br J Anaesth.* 1999 Sep;83(3):415-21.
- 101 Anderson DL, Bartholomeusz FD, Kirkwood ID, Chatterton BE, Summersides G, Penglis S, Kuchel T, Sansom L. Liquid gastric emptying in the pig: effect of concentration of inhaled isoflurane. *J Nucl Med.* 2002 Jul; 43(7): 968-71.
- 102 K. A. McVey Neufeld, Y. K. Mao, J. Bienenstock, J. A. Foster, W. A. Kunze. The microbiome is essential for normal gut intrinsic primary afferent neuron excitability in the mouse.. *Neurogastroenterol Motil* (2013) 25, 183–e88
- 103 Linden DR, Foley KF, McQuoid C, Simpson J, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin transporter function and expression are reduced in mice with TNBS-induced colitis. *Neurogastroenterol Motil.* 2005 Aug; 17(4):565-74.
- 104 Bertrand PP, Barajas-Espinosa A, Neshat S, Bertrand RL, Lomax AE
Analysis of real-time serotonin (5-HT) availability during experimental colitis in mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010 Mar; 298(3):G446-55.
- 105 O'Hara JR, Skinn AC, MacNaughton WK, Sherman PM, Sharkey KA. Consequences of *Citrobacter rodentium* infection on enteroendocrine cells and the enteric nervous system in the mouse colon. *Cell Microbiol.* 2006 Apr; 8(4):646-60.
- 106 Wheatcroft J, Wakelin D, Smith A, Mahoney CR, Mawe G, Spiller R.
Enterochromaffin cell hyperplasia and decreased serotonin transporter in a mouse model of postinfectious bowel dysfunction. *Neurogastroenterol Motil.* 2005 Dec;17(6):863-70.
- 107 A. M. Brunsten and D. Grundy. Sensitization of visceral afferents to bradykinin in rat jejunum in vitro. *Journal of Physiology* (1999), 521.2, pp. 517—527
- 108 A. Iggo, Tension receptors in the stomach and the urinary bladder, *J. Physiol.* 128 (1955) 593–607.
- 109 A. Iggo, Gastro-intestinal tension receptors with unmyelinated afferent fibers in the vagus of the cat, *Q. J. Exp. Physiol.* 42 (1957), 130-143
- 110 Yang J, Zhao J, Jiang W, Nakaguchi T, Kunwald P, Grundy D, Gregersen H.
Neurogenic adaptation contributes to the afferent response to mechanical stimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 May 1;302(9):G1025-34.

-
- 111 M.H. Mueller, M. Karpitschka, B. Xue, M.S. Kasperek, A. Sibaevev, J. Glatzle, M.E. Kreis, Intestinal afferent nerve sensitivity is increased during the initial development of postoperative ileus in mice. *J Gastrointest Surg.* 2009; 13: 423-431.
- 112 Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W. Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol.* 1999 May;116(2):238-45.
- 113 Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science.* 2000 Aug 25;289(5483):1352-5.
- 114 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000 May 25;405(6785):458-62.
- 115 Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med.* 2004 Nov;10(11):1216-21. Epub 2004 Oct 24.
- 116 Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987;79:319–26
- 117 Maubach KA, Grundy D. The role of prostaglandins in the bradykinin-induced activation of serosal afferents of the rat jejunum in vitro. *J Physiol* 1999;515:277–85.
- 118 Fink MP. Gastrointestinal mucosal injury in experimental models of shock, trauma, and sepsis. *Crit Care Med.* 1991 May;19(5):627-41.
- 119 Wang Q, Fang CH, Hasselgren PO. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001 Sep;281(3):R1013-23.
- 120 Chen LW, Hsu CM, Cha MC, Chen JS, Chen SC. Changes in gut mucosal nitric oxide synthase (NOS) activity after thermal injury and its relation with barrier failure. *Shock.* 1999 Feb;11(2):104-10.
- 121 Deitch EA, Morrison J, Berg R, Specian RD. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats. *Crit Care Med.* 1990 May;18(5):529-36.
- 122 Wang W, Smail N, Wang P, Chaudry IH. Increased gut permeability after hemorrhage is associated with upregulation of local and systemic IL-6. *J Surg Res.* 1998 Sep;79(1):39-46.
- 123 Wang Q, Pantzar N, Jeppsson B, Weström BR, Karlsson BW. Increased intestinal marker absorption due to regional permeability changes and decreased intestinal transit during sepsis in the rat. *Scand J Gastroenterol.* 1994 Nov;29(11):1001-8.

-
- ¹²⁴ dos Santos Rd, Viana ML, Generoso SV, Arantes RE, Davisson Correia MI, Cardoso VN. Glutamine supplementation decreases intestinal permeability and preserves gut mucosa integrity in an experimental mouse model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2010 Jul-Aug;34(4):408-13.
- ¹²⁵ Batista MA, Nicoli JR, Martins Fdos S, Machado JA, Arantes RM, Quirino IE, Correia MI, Cardoso VN. Pretreatment with citrulline improves gut barrier after intestinal obstruction in mice. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012 Jan;36(1):69-76.
- ¹²⁶ Deitch EA. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch Surg.* 1989 Jun;124(6):699-701.
- ¹²⁷ Kenneth Todar, Bacterial Endotoxin, Aus Todar`s online textbook of bacteriology, <http://textbookofbacteriology.net/endotoxin.html> vom 10.01.2013
- ¹²⁸ Buchholz BM1, Chanthaphavong RS, Bauer AJ, Nonhemopoetic cell TLR4 signaling is critical in causing early lipopolysaccharide-induced ileus. *J. Immunology* 2009 Nov. 15; 183 (10):6744-53.
- ¹²⁹ Hayakawa T, Bruck R, Ng OC, Boyer JL. DBcAMP stimulates vesicle transport and HRP excretion in isolated perfused rat liver. *Am J Physiol.* 1990 Nov;259(5 Pt 1):G727-35.