

Aus der Klinik für Allgemeine-, Viszeral-, Transplantations-,  
Gefäß- und Thoraxchirurgie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Karl-Walter Jauch

**Intestinale afferente Sensibilität und Entzündungsreaktion  
des Dünndarms bei mechanischem Ileus der Maus**

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

vorgelegt von

Xue Zhao

aus

Shaanxi, Yan'an / China

2013



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin E. Kreis  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Storr  
Prof. Dr. med. Philip Bufler  
Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Mario Müller  
  
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACP, FRCP  
  
Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2013



## **Meinen Eltern**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>    1.1. Das Krankheitsbild des Ileus .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Ätiologie und Epidemiologie.....	1
1.1.2. Pathophysiologie.....	3
1.1.3. Diagnostik .....	7
1.1.4. Therapie.....	8
1.1.5. Prognose.....	10
<b>    1.2. Ziele und Hypothesen.....</b>	<b>10</b>
<b>2. VERSUCHSTIERE, METHODEN UND GERÄTE .....</b>	<b>12</b>
<b>    2.1. Versuchstiere.....</b>	<b>12</b>
<b>    2.2. Versuchsmethoden .....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Versuchsprotokoll .....	12
2.2.2. Induktion des mechanischen Ileus .....	13
2.2.3. Gewebeentnahme und Aufbereitung .....	14
<b>    2.3. Nervenfaserableitung und intraluminale Druckmessung .....</b>	<b>18</b>
<b>    2.4. Versuchsprotokoll der elektrophysiologischen Ableitungen.....</b>	<b>20</b>
<b>    2.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....</b>	<b>21</b>
<b>    2.6. Myeloperoxidase-Färbung (MPO-Färbung) .....</b>	<b>22</b>
2.6.1. Grundlagen.....	22
2.6.2. Versuchsdurchführung.....	23
<b>    2.7. Zytokin-Analyse mittels quantitativer Real-Time PCR .....</b>	<b>24</b>
2.7.1. RNA-Isolierung.....	24

2.7.2. Reverse Transkription .....	25
2.7.3. Quantitative RT-PCR .....	26
<b>2.8. Auswertung .....</b>	<b>28</b>
2.8.1. Elektrophysiologie .....	28
2.8.2. HE-Färbung .....	29
2.8.3. Myeloperoxidase-Färbungen .....	30
2.8.4. Zytokin-Analyse .....	30
<b>2.9. Statistik .....</b>	<b>31</b>
<b>2.10. Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen .....</b>	<b>31</b>
2.10.1. Chemikalien .....	31
2.10.2. Lösungen .....	33
2.10.3. Geräte und Labormaterialien .....	34
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Einführungen .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2. Makroskopische Veränderungen des Darms nach Darmobstruktion.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3. Intestinale afferente Nervenaktivität .....</b>	<b>39</b>
3.3.1. Intestinale afferente Nervenaktivität nach Gabe von 5-HT .....	39
3.3.2. Intestinale afferente Nervenaktivität während mechanischer Stimulation.....	41
3.3.3. Intestinale afferente Nervenaktivität nach Braykinin .....	45
<b>3.4. Histologische Auswertung mittels HE-Färbung.....</b>	<b>48</b>
<b>3.5. Myeloperoxidase-Färbung .....</b>	<b>53</b>
<b>3.6. Zytokin-Analyse.....</b>	<b>56</b>
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>59</b>

<b>4.1. Diskussion der Methoden des Versuchs .....</b>	<b>59</b>
4.1.1. Tiermodell .....	59
4.1.2. Grundlagen des intestinalen Nervensystems des Dünndarms.....	60
4.1.3. Elektrophysiologie .....	61
4.1.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Myeloperoxidase-Färbung .....	64
4.1.5. Zytokin-Analyse .....	64
<b>4.2. Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
4.2.1. Elektrophysiologie .....	65
4.2.2. HE-Färbung und MPO-Färbung.....	68
4.2.3. Zytokin-Analyse .....	70
<b>4.3. Klinische Relevanz .....</b>	<b>71</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>72</b>
<b>6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>74</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>76</b>
<b>8. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>77</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
<b>10. DANKSAGUNG.....</b>	<b>89</b>



## 1. Einleitung

### 1.1. Das Krankheitsbild des Ileus

Ein Ileus ist ein Verschluss des Darms, der zur teilweisen oder kompletten Aufhebung der Darmpassage führt<sup>(1)</sup>. Das Krankheitsbild ist lebensbedrohlich und bedarf im Allgemein einer sofortigen Krankenhauseinweisung und häufig einer chirurgischen Behandlung<sup>(2)</sup>. Im klinischen Bereich findet sich eine ganze Reihe verschiedener Einteilungen des Ileus. So wird nach Obstruktionszeit zwischen akuten, subakuten und chronischen Verlaufsformen unterschieden; des Weiteren wird er nach Ursachen in mechanische und paralytische Ileusformen unterteilt. Ferner wird die Lokalisation der Obstruktion, ob Dünndarm oder Dickdarm, oft als Unterteilung des mechanischen Ileus erwähnt<sup>(3)</sup>. Unbehandelt führen alle Ileusformen potenziell zur Darmwandnekrose mit Darmperforation und Peritonitis, weiterhin zur Multiorganversagen, und schlussendlich zum Tod<sup>(3)</sup>.

#### 1.1.1. Ätiologie und Epidemiologie

Der mechanische Ileus ist die häufigste Ileusform (80% der Fälle)<sup>(4)</sup> und die Ursachen davon sind vielfältig. Generell werden klinisch drei Unterformen des mechanischen Ileus beschrieben<sup>(5)</sup>:

- Darmlumenverlegung von innen (durch z. B. Tumor, Fremdkörper oder Gallensteine) oder von außen (z. B. Adhäsionen, Briden etc.) ohne Durchblutungsstörung.
- Mesenteriale Durchblutungsstörung verschiedenster Genese (z. B. Inkarnation, Torsion, Invagination). Dies führt zu Darmwandgangrän und Peritonitis.
- Kombination von Obstruktion und Kompression mit Durchblutungsstörung, die typischerweise bei großen irreponiblen Hernien auftritt.

Im klinischen Alltag steht die mechanische Ileusform ohne Durchblutungsstörung im Vordergrund, die im Krankheitsverlauf durch Flüssigkeitsverschiebung, Darmdistension

und Translokation von Mikroorganismen aus den Darm in die Bauchhöhle bzw. in die systemische Zirkulation charakterisiert ist<sup>(6)</sup>.

Ein mechanischer Darmverschluss findet sich etwa 2/3 im Dünndarm und 1/3 im Dickdarm<sup>(7)</sup>. Ätiologisch finden sich am Dünndarm als Ursache in 54% der Fälle Adhäsionen, in 30% inkarzierte Hernien, in 4% Fremdkörper, in 3% ein Volvulus, in 2% Gallensteine und in 1% chronisch-entzündliche Darmerkrankungen<sup>(8)</sup>. In etwa 10% der Fälle liegt eine Strangulation vor<sup>(7)</sup>. Infolge der intraperitonealen Lage und damit verbundenen hohen Mobilität des gesamten Darms mit ca. 5-6 m in der Länge kommt es im Bereich des Dünndarms häufiger zur Strangulation und Torsion mit Gefäßbeteiligung<sup>(3)</sup>. Dagegen ist der Dickdarm im Abdomen relativ fixiert und weniger beweglich, sodass die häufigsten Ursachen des mechanischen Ileus in 80% der Fälle von Adhäsionen, Hernien sowie Tumorstenosen zu sehen sind<sup>(9)(10)</sup>. Die divertikulitische Stenose eben sowie Hernien, Koprostase und Stenose durch Morbus Crohn sind relativ seltener als im Dünndarm<sup>(7)</sup>.

Von einem paralytischen Ileus spricht man eine primäre Beeinträchtigung der muskulären Funktion der Darmwand und damit eine aufgehobene Motilität ohne mechanische Obstruktion<sup>(3)</sup>. Ein paralytischer Ileus entsteht in den meisten Fällen im Rahmen intraperitonealer Entzündungen durch Peritonitis verschiedener Genesen<sup>(7)</sup>. Seltener treten Darmparalysen bei metabolischen (z. B. diabetischer Azidose, Urämie) oder hormonellen (z. B. Schwangerschaft) Veränderungen auf. Ferner kann reflektorisch im Rahmen anderer Erkrankungen (z. B. Nieren- oder Gallenkoliken, Blasenüberdehnungen), vaskulärer Ursachen (z. B. arterielle Embolien) oder im Rahmen von Medikamenten (z. B. Opate, Antidepressiva, Parkinsonmedikamente) ein paralytischer Ileus induziert werden<sup>(11)</sup>.

Als Kardinalsymptom zeigt sich gleich zu Beginn eine primäre Lähmung der glatten Darmwandmuskulatur, die für den Transport des Darminhalts verantwortlich ist. Es kommt zur Hemmung und dann Aufhebung der Darmperistaltik und schließlich ebenfalls zum Ileus mit potenziell letalem Ausgang<sup>(12)</sup>.

Eine Sonderform des paralytischen Ileus ist der postoperative Ileus, eine typische Komplikation nach abdominalen Eingriffen. Als Ursachen des postoperativen Ileus werden in den letzten Jahren chirurgisch induzierte mechanische Traumata, der Einfluss der perioperativen Medikamente sowie die Schmerztherapie diskutiert<sup>(13)</sup>. Die genaue Bedeutung der einzelnen Faktoren in der Pathogenese der postoperativen Darmatonie wurde bislang noch nicht komplett erforscht.

### **1.1.2. Pathophysiologie**

#### **– Pathologische Gemeinsamkeiten aller Ileusformen**

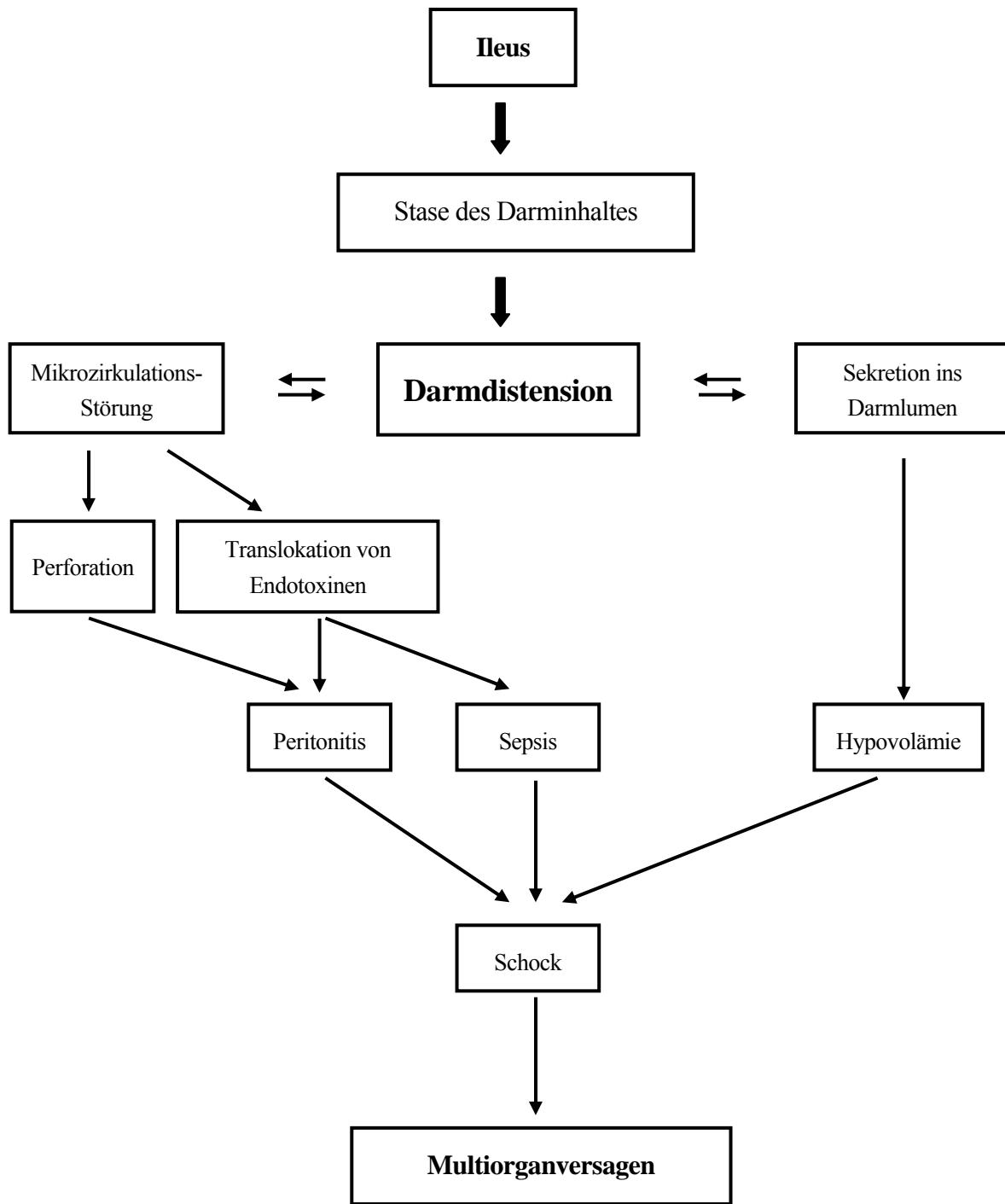
Die genauen pathophysiologischen Veränderungen während des Ileus sind bisher nicht vollständig geklärt.

Feifel hat im Jahr 1985 beschrieben, dass „*die grundlegende Veränderung des obstruierten Darms in der Distension der Darmwand besteht*“<sup>(14)</sup>. Unabhängig von der Ursache des Ileus ist bereits am Beginn der Erkrankung eine Stase des Darminhalts zu verzeichnen<sup>(3)</sup>. Aufgrund der Darmpassagestörung kommt es zur Akkumulation von Stuhl, Gas sowie Flüssigkeit im Darmlumen. Der dadurch entstehende prästenotische Dehnungsreiz führt zuerst zu einer Hyperperistaltik, die durch vagotone Gegenregulation verstärkt wird<sup>(2)</sup>. Unbehandelt führt dies aufgrund der Überdehnung der Darmwand zum Verlust der Kontraktionsfähigkeit, sodass eine Hypoperistaltik im Vordergrund steht<sup>(2)</sup>.

Der Darm oberhalb des Hindernisses füllt sich zunehmend mit Flüssigkeit und Gas, der intraluminale Druck ansteigt, sodass die Darmwand immer mehr distendiert wird<sup>(15)</sup>. Der intraluminale Druck beträgt physiologisch zwischen 2 und 4 cm H<sub>2</sub>O. Bei der Ileuskrankheit kann er auf 8-10 cm H<sub>2</sub>O steigen und im Rahmen einer peristaltischen Welle sogar 30-60 cm H<sub>2</sub>O erreichen<sup>(16,17)</sup>. Eine Beeinträchtigung der Mikrozirkulation der Darmwand ist bei einer Druckerhöhung auf 40 cm H<sub>2</sub>O zu erwarten<sup>(18,19)</sup>. Dies führt dann zur Hypoxie der Darmwand mit der Folge von Sequestration großer Flüssigkeitsmengen<sup>(20,21)</sup>. Diese verstärkt weiterhin die Darmwandspannung und die

Hypoxie, die Darmwand verliert ihre Barrierefunktion und schwilzt im weiteren Verlauf zunehmend ödematos an, wodurch es zu einem massiven venösen Rückflusstau kommt. Daraus resultiert eine aktive Sekretion von Plasma. Der Flüssigkeitsverlust verschlimmert sich dadurch weiter und führt schließlich zu einem hämorrhagischen Blutaustritt in das Darmlumen<sup>(11)</sup>.

Außerdem werden aus der Darmflora Endotoxine freigesetzt, die ins Blut und Peritoneum austreten und initial zu einer lokalen Entzündung (Peritonitis) und im weiteren Verlauf zu einer lebensbedrohlichen Sepsis führen<sup>(22)</sup>. Ein Circulus vitiosus entsteht nun in den betroffenen Darmsegmenten, der letztlich zum Vollbild der Ileuskrankheit mit Hypovolämie, Sepsis, Schock, Multiorganversagen und schließlich zum Tod führt<sup>(3)</sup> (siehe **Abb. 1**).



*Abb. 1 Schematische Darstellung der wichtigsten pathophysiologischen Mechanismen bei Ileus*

- **Pathophysiologische Besonderheiten des mechanischen Ileus im Dünndarm**

Unser Verständnis der Pathophysiologie bei akuter intestinalen Obstruktion bzw. Ileus beruht im Wesentlichen auf Arbeiten aus der 60er Jahren des letzten Jahrhunderts und ist somit begrenzt. Folgende Veränderungen finden beim mechanischen Dünndarmileus statt:

- Bei Menschen können intraluminale Drücke bei massiver Distension des Dickdarms bis ca. 60 cm H<sub>2</sub>O auftreten<sup>(17)</sup>. Bei Mäusen und Ratten steigen diese Drücke jedoch offenbar nicht über 8 cm H<sub>2</sub>O an<sup>(22,23)</sup>.
- Die chronische Obstruktion des Darmlumens löst im Dünndarm eine Ausbreitung der Darmflora aus, die physiologischerweise den Dünndarm nur sehr schwach besiedelt<sup>(24,25,26)</sup>.
- Die bakterielle Überwucherung mit nachfolgender Freisetzung von entzündlichen Mediatoren scheint eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des mechanischen Dünndarmileus zu spielen<sup>(27,28,29)</sup>. Zur Unterstützung dieser Vermutung wurde bereits schon in 1959 in einer Studie belegt, dass durch Gabe von Antibiotika das Überleben der Tiere mit Ileus verbessert wurde. Die besten Ergebnisse konnten durch Therapie mit Antibiotika und Peritoneallavage erhalten werden<sup>(30)</sup>.
- Eine Durchblutungsstörung der Darmwand ist sowohl licht-mikroskopisch<sup>(31,32)</sup> als auch mikroangiographisch<sup>(33,34)</sup> nicht zu finden. Dagegen wurde es in einem Tierexperiment nachgewiesen, dass die Durchblutung der Ileusdarmwand im Lauf der Zeit vermehrt war<sup>(35)</sup>.
- Darüber hinaus konnte klinisch und tierexperimentell gezeigt werden, dass eine Ausschüttung von Prostaglandinen sowie Bakterienendotoxinen für das Auslösen der Ileuskrankheit eine wichtige Rolle spielen<sup>(36)</sup>. Die Aktivierung des Prostaglandin-Systems verursacht eine Steigerung der gesamten intestinalen Durchblutung. Nach längerer Dauer der Darmverlegung oder chirurgischer Manipulation des Darms treten die Prostaglandine ins Blut ein, woraus eine kardiopulmonale Dekompensation resultieren kann<sup>(36)</sup>.

- Die Bakterienendotoxine translozieren im Verlauf des Ileus ebenfalls durch die Darmwand und strömen ins Blut ein. Dies allein kann ebenfalls eine lebensbedrohliche Sepsis und einen septischen Schock auslösen<sup>(36)</sup>.

Hypovolämie, Sepsis, septischer Schock sowie Zirkulationsstörung infolge der kardiopulmonalen Dekompensation sind die wichtigsten Folgeerscheinungen des mechanischen Dünndarmileus und diese führen zusammen zum Multiorganversagen und potenziell zum Tod des Organismus.

### **1.1.3. Diagnostik**

Die klinischen Symptome aller Ileusformen bestehen in unterschiedlicher Ausprägung aus Übelkeit, Erbrechen, abdominalen Schmerzen, Meteorismus sowie Wind- und Stuhlverhalt, die je nach Höhe der Okklusionsstelle im GI-Trakt mehr oder weniger ausgeprägt sind<sup>(3)</sup>. Zur Diagnose der Ileuskrankheit und ihrer Lokalisation spielt die klinische Untersuchung eine wichtige Rolle. Bei der Inspektion wird der allgemeine Zustand und Ernährungszustand des Patienten ermittelt. Besonders können trockene Haut und Schleimhäute auf Flüssigkeitsverschiebungen ins Darmlumen hindeuten. Weiterhin werden mit Hilfe von Palpation und Perkussion Meteorismus, Peritonismus sowie tastbare Resistenzen nachgewiesen. Durch Auskultation lässt sich die Ausprägung des Ileus abschätzen. Eine digitale rektale Untersuchung ist ebenso wichtig, um tief sitzende Tumore oder Blutabgang z. B. auch bei mesenterialer Durchblutungsstörung zu diagnostizieren<sup>(3)</sup>. Laborchemisch kann ein erhöhtes Laktat auf eine arterielle Durchblutungsstörung hinweisen<sup>(37)</sup>. Renzulli und Mitarbeiter wiesen nach, dass lediglich bei 64% der Patienten mit Ileus eine Leukozytose und Temperaturen > 37,8 °C bestanden, bei 65% eine Tachykardie (> 96/min) und bei 71% eine lokalisierte Druckdolenz. Interessanterweise waren selbst beim Auftreten einer Darmnekrose in nur 26% der Fälle eine Leukozytose und erhöhte Temperaturen, bei 35% eine Tachykardie und bei 29% ein lokalisierter Druckschmerz nachweisbar<sup>(38)</sup>. Die radiologische Bildgebung mittels Abdomen-Leeraufnahme im Stehen<sup>( 39 )</sup>, Kolonkontrastmitteleinlauf sowie

Computertomographie dienen der Diagnosesicherung<sup>(3)</sup>. Letztlich ist der Ileus aber vor allem eine klinische Diagnose und auch die Ausprägung kann in der Regel durch die klinischen Untersuchungen am besten abgeschätzt werden.

#### **1.1.4. Therapie**

##### **– Konservative Therapie**

Die Domäne der konservativen Therapie ist der paralytische Ileus, während beim mechanischen Ileus diese oft fehlschlägt und dann operativ behandelt werden muss, da in der Regel andere Grunderkrankungen (z. B. Adhäsionen, Hernien, Stenosen bei M. Crohn etc.) vorliegen, die nur durch operative Intervention behandelt werden können<sup>(40)</sup>. Das Ziel der konservativen Therapie besteht aber nicht nur darin, den Ileus zu behandeln, sondern auch den Allgemeinzustand des Patienten zu verbessern und eine günstigere Ausgangssituation für die chirurgische Intervention zu erreichen<sup>(11)</sup>. Aufgrund des begrenzten Verständnisses der pathologischen Vorgänge beim mechanischen Ileus stehen klinisch dabei nur wenige Behandlungsmodalitäten zur Verfügung:

- Dekompression des GI-Traktes mittels z. B. Magensonde, gastrointestinaler Dekompressionssonde oder koloskopischer Absaugung. Ersteres erfolgt vor allem auch, um eine Aspiration von Erbrochenem zu vermeiden<sup>(11)(41)(42)</sup>.
- Infusionstherapie zur Bilanzierung des Flüssigkeit- und Elektrolytenhaushaltes<sup>(2)(42)</sup>.
- Bei ansteigenden Entzündungsparametern in den Laboruntersuchungen kann eine prophylaktische Gabe von Breitspektrumantibiotika mit Abdeckung von Anaerobiern erfolgen, um die durch die Bakterientranslokation und Bakterienendotoxine verursachte systemische inflammatorische Entzündungsreaktion (SIRS) rechtzeitig zu behandeln<sup>(42)(43)(44)</sup>.
- Gegebenenfalls Therapie der Grund- oder Begleiterkrankungen (z. B. bei M. Crohn, Colitis ulcerosa durch eine Akutphasentherapie)<sup>(11)</sup>.

Demgegenüber wird bei paralytischem Ileus, insbesondere bei postoperativem paralytischem Ileus in der Regel konservativ behandelt. Nur bei Verdacht auf eine zusätzliche zugrundeliegende Pathologie (z. B. Darmwandnekrose infolge von langzeitiger Überdehnung, Anastomoseninsuffizienz etc.) wird ggf. eine Laparotomie durchgeführt<sup>(3)</sup>. Neben den oben genannten konservativen Therapien spielt die medikamentöse Therapie mit z. B. Prokinetika, Cholinergika, Laxantien, Serotonin-, Motilin- und Dopamin-Agonisten eine gewisse wichtige Rolle<sup>(45)(46)(47)</sup>. Die Darmwandmuskulatur wird mittels dieser Medikation aktiviert, wodurch die atonische Darmlähmung aufgehoben und die normale Nahrungspassage wiederhergestellt wird<sup>(48)</sup>.

### **– Operative Therapie**

Während der paralytische Ileus, sofern der nicht sekundär durch eine andere Pathologie bedingt ist (z. B. Peritonitis, Abszess, Organperforation), durch eine Operation nicht kausal therapierbar ist und deswegen konservativ behandelt werden sollte, besteht beim mechanischen Ileus die einzige kausale Therapiemöglichkeit in einer operativen Beseitigung des Passagehindernisses<sup>(42)</sup>. Insbesondere bei Bestehen eines Strangulationsileus sowie bei bereits beginnender Ileuskrankheit ist eine chirurgische Notfallintervention notwendig<sup>(9)</sup>. Das operative Vorgehen richtet sich nach der Ileusursache<sup>(42)</sup>:

- Bei Adhäsionen werden meist Verwachsungen gelöst (Adhäsolyse)<sup>(42)</sup>.
- Beim Strangulationsileus ist mitunter eine Darmteilresektion erforderlich, sofern ein Darmabschnitt nekrotisch wurde<sup>(42)</sup>.
- Bei Stenose z. B. durch einen Tumor erfolgt entweder eine Resektion mit primärer Anastomose oder Stoma. Alternativ kann insbesondere bei Irresekabilität eine Umgehungsoperation (Bypassoperation) durchgeführt oder ausschließlich ein entlastendes Stoma angelegt werden<sup>(42)</sup>.

### 1.1.5. Prognose

Die Letalität beim Ileus wird mit bis zu 10-25% angegeben und ist stark abhängig von der Dauer zwischen seinem Beginn und dem Einleiten einer entsprechenden Behandlung<sup>(49)</sup>. Außerdem spielt die Ursache des Ileus in seiner Prognose ebenfalls eine wichtige Rolle. Während die Letalität einer reinen Okklusion des Dünndarms ohne Strangulation zwischen 5 und 8% beträgt, steigt sie beim Vorhandensein einer Strangulation auf 20 bis 75% an<sup>(49)</sup>. Prinzipiell ist jeder Ileus eine potenziell lebensbedrohliche Erkrankung, die adäquates und zeitnahe Handeln erfordert<sup>(50)</sup>.

## 1.2. Ziele und Hypothesen

Es ist offensichtlich, dass die zentrale Therapie beim mechanischen Ileus die Aufhebung des mechanischen Hindernisses darstellt. Aufgrund des begrenzten Wissens der pathophysiologischen Vorgänge beim mechanischen Dünndarmileus gibt es aber annähernd keine Anhaltspunkte, wie supportiv bzw. bei konservativen Therapieversuchen behandelt werden kann, um lokal die Wiederherstellung der Homöostase im Darm zu unterstützen. Die bislang eingesetzten Substanzen bezüglich ihrer Erfolge basieren nur auf ärztlichen Erfahrungen, aber deren Wirksamkeit konnte bislang nicht eindeutig durch valide Studien belegt werden<sup>(51)</sup>.

Ziele der Arbeit waren, die pathophysiologischen Veränderungen im Dünndarm bei akutem mechanischem Ileus zu charakterisieren, Ansatzpunkte für eine perioperative Begleittherapie bzw. bei konservativem Vorgehen zu identifizieren.

Die spezifischen Hypothesen waren:

- Intestinale afferente Nerven Sensibilität, d. h. die Übertragung von Signalen über neuronale Bahnen nach zentral verändert sich beim mechanischen Dünndarmileus innerhalb der ersten 24 Stunden.
- Die Dünndarmmorphologie verändert sich während des Krankheitsverlaufs.

- Unspezifische, inflammatorische Veränderungen mit Aktivierung der residenten Makrophagen in der Tunica muscularis werden ausgelöst.
- Die proinflammatorische Zytokinexpression von TNF- $\alpha$  und IL-6 ist erhöht infolge von lokaler Entzündungsreaktion innerhalb der Darmwand.

## 2. Versuchstiere, Methoden und Geräte

### 2.1. Versuchstiere

In allen Versuchen wurden männliche C57/BL6 Mäuse verwendet, deren Gewicht ca. 20g betrug. Die Mäuse wurden mit einem 12 Stunden Licht/Dunkel-Zyklus gehalten und erhielten normale Labordiät vor und während des Experiments.

Vor dem Versuchsbeginn wurden die Tierversuche unter der Projektnummer 129/09 durch die Regierung von Oberbayern gemäß des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) genehmigt.

### 2.2. Versuchsmethoden

#### 2.2.1. Versuchspfotokoll

Es erfolgte über eine Mini-Laparotomie entweder eine Ileusinduktion oder eine Schein-Operation. Anschließend in separaten Untergruppen nach 3, 9 bzw. 24h nach Auslösen des Ileus oder nach Scheinoperation wurde Gewebe für elektrophysiologische Ableitungen, Histologie, Immunhistochemie sowie Zytokin-Analyse entnommen (siehe Abb. 2).

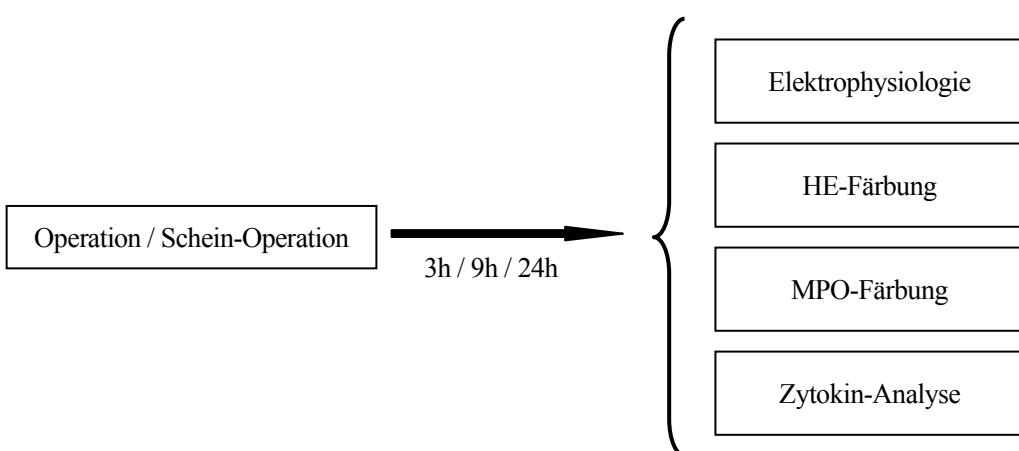


Abb. 2 Überblick des Versuchsablaufs

Im Experiment wurden 3 Versuchsgruppen im Rahmen der Obstruktionszeit und 3 entsprechenden Kontrollgruppen eingeteilt. In jeder Gruppe wurden 6 Mäuse für die Versuche angewendet.

### **2.2.2. Induktion des mechanischen Ileus**

Vor der Operation wurde der Arbeitsplatz und alle Operationsinstrumente mit 96% Ethanol gründlich desinfiziert. Daraufhin wurde die jeweilige Maus durch Inhalation des volatilen Anästhetikums von Isofluran tief narkotisiert. Die Maus war bis zum Ende der Operation (ca. 15 bis 20 Minuten) in Narkose. Das Abdomen der Maus wurde entlang der Linea alba in der Mitte zwischen dem Xyphoid und dem Anus ca. 1 cm lang geöffnet. Der Appendix und das distale Ileum (ca. 12 cm) wurden sorgfältig mit zwei sterilen Wattestäbchen aus ihren anatomischen Lagen disloziert und auf einer feuchten Mullkomresse außerhalb der Bauchhöhle gelegt.

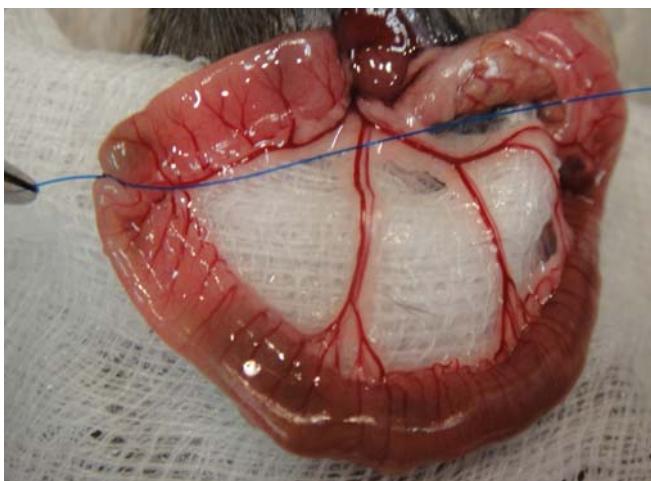
Als nächsten Schritt erfolgte die Ligatur des distalen Ileums. 5 cm proximal der ileozökalen Klappe wurde der Darm mit atraumatischem 6-0 Prolene Faden unterbunden, ohne dabei die mesenterialen Gefäßen und Nerven zu ligieren (siehe **Abb. 3**). Zum Schutz vor Austrocknung wurde der Darm während der Operation mehrmals mit 0,9% NaCl-Lösung feucht gehalten. Eine ähnliche Operationstechnik wurde bereits mehrfach für das Kolon bei Hunden durchgeführt und publiziert<sup>(52)(53)</sup>.

Zum Schluss wurde der Darm reponiert und das Abdomen schichtweise mit fortlaufender Naht verschlossen.

Um den Einfluss des postoperativen Ileus zu minimieren, wurde sehr vorsichtig und sorgfältig vorgegangen. Der Darm und die anderen intraabdominalen Organe mussten sehr sanft und vorsichtig mit den Operationsinstrumenten berührt werden. Das Berühren des Darms mit den Fingern wurde vollständig unterlassen.

In den schein-operierten Gruppen wurde bei den Mäusen nur eine Mini-Laparotomie durchgeführt, ohne dabei eine Ligatur um das distale Ileum zu setzen.

Alle Mäuse wurden nach der Operation kurz auf einer 37 °C Wärmeplatte zum Schutz vor postoperativer Auskühlung überwacht, bevor sie sich vollständig von der Narkose erholt haben und wieder zurück in die Käfige gebracht wurden. Die Mäuse begannen postoperativ innerhalb einer halben Stunde wiederum zu essen und trinken. Dabei waren keine offensichtlichen Unterschiede bezüglich der Nahrungsaufnahme zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen beobachtbar.



*Nach dem Öffnen des Abdomens erfolgte das Unterbinden des distalen Ileum ca. 5 cm proximal der ileozökalen Klappe. Während der gesamten Intervention wurde der Darm nur mit zwei sterilen Wattestäben berührt, um den postoperativen Ileus zu minimieren.*

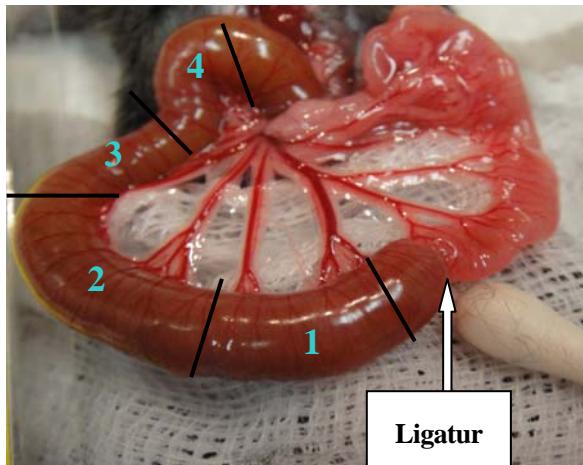
*Abb. 3 Induktion des mechanischen Ileus mit Ligatur*

### 2.2.3. Gewebeentnahme und Aufbereitung

#### – Entnahme des Darmsegmentes für die Nervenfaserableitung

3 Stunden, 9 Stunden sowie 24 Stunden nach der Operation wurden die Mäuse durch Überdosierung mittels inhalativer Applikation von Isofluran getötet. Das Abdomen wurde erneut durch einen medianen Längsschnitt geöffnet und der gesamte Dünndarm zum Probengewinn auf Mullkompressen dargestellt. 1,5 cm proximal der Ligatur (entsprach 6,5 cm proximal der Ileozökalen Klappe) wurde ein 2 cm langes Ileumsegment (Segment 2) mit dem entsprechenden neurovaskulären Bündel entnommen (siehe Abb. 4). Anschließend wurden das Darmsegment mit Hilfe einer in das Darmlumen eingebrachten Kanüle mit Kreb's-Lösung gespült und von Darminhalt gereinigt (siehe Abb. 5). Zuletzt

wurde das Ileumsegment in die eiskalte und mit Mischung aus O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%) voroxygениerte Kreb's-Lösung eingebracht, und hier maximal 2 Stunden aufbewahrt, bis der elektrophysiologische Versuch durchgeführt werden konnte. Bei den Mäusen in den Shamgruppen wurde gleichfalls ein 2 cm langes Darmsegment entnommen, das sich 6,5 cm proximal der ileozökalen Klappe befand und zur Untersuchung vorbreitet.



**Darmschnitt 1:** 1 cm lang, vor der Ligatur

zur MPO-Färbung.

**Darmschnitt 2:** 2 cm lang, Darmgewebe zur elektrophysiologischen Ableitung.

**Darmschnitt 3:** 1 cm lang, vor der Ligatur zur HE-Färbung.

**Darmschnitt 4:** 0,5 cm lang, vor der Ligatur zur Zytokin-Analyse.

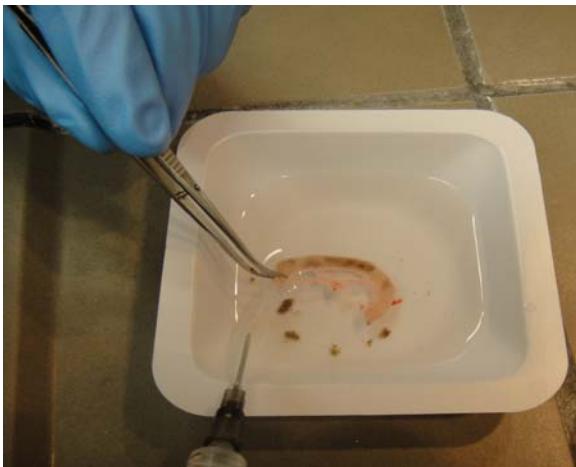
**Abb. 4** Repräsentative Darstellung der Darmsegmente  
zur elektrophysiologischen und histologischen Anwendung  
sowie zur Zytokin-Analyse 24h nach Auslösen des Ileus

#### – Gewebeentnahme und Fixierung für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach Entnahme der Darmprobe für die elektrophysiologische Untersuchung wurde ein ca. 1cm langes weiteres Darmsegment entnommen, das gleich proximal der Darmprobe für die Elektrophysiologie lag (Segment 3, siehe **Abb. 4**). Es befand sich 3,5 cm vor der Ligatur beim Ileusdarm und entsprach 8,5 cm proximal der ileozökalen Klappe beim Kontrolldarm.

Im Rahmen der Vorbereitung der Darmprobe zur HE-Färbung wurde nun das Darmlumen mit Kreb's-Lösung gereinigt und das mesenteriale Fett- und Bindegewebe entfernt. Danach wurde das Darmsegment auf der mesenterialen Seite mittels Längsschnitt geöffnet, auf einem Korkplättchen aufgespannt und zum Schluss mit Kanülenpritzen befestigt. Zur Fixierung des Gewebes wurde die Darmprobe zuerst in 4% neutral gepufferte

Formaldehydlösung für 24 Stunden gelagert, dann 3 Mal im Leitungswasser jeweils für 20 Minuten gewässert und zuletzt zur Fixierung in 70% Ethanol konserviert, bis die Einbettung des Gewebes durchgeführt wurde.



*Bei der Reinigung des Darmlumens durften nur die beiden Enden mit Pinzette berührt werden, damit das Versuchsegment für die Elektrophysiologie intakt bleiben und die Dardistension problemlos durchgeführt werden konnte.*

**Abb. 5 Reinigung eines Ileumsegmentes von Darminhalt**

*vor dem elektrophysiologischen Versuch*

Die wie oben beschrieben angefertigten Proben wurden zunächst mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Dazu wurden die Proben jeweils für 60 Minuten in 50%, 70%, 96% und 3 Mal in 100% Ethanol gegeben, anschließend dann für 90 Minuten in Xylol-Lösung, und zum Schluss noch für 90 Minuten in Paraplast. Nach der Entwässerung folgte die Einbettung in Paraffin. Nach Abkühlen und Aushärten der Paraffinblöckchen wurden aus diesen mit Hilfe eines Schlittenmikrotomes 4 µm dünne Serienschnitte angefertigt. Diese wurden im 35 °C warmen Wasserbad gestreckt, und anschließend auf Objektträger aufgezogen sowie im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet.

**– Gewebeentnahme und Aufbreitung für die Immunhistochemische Färbung:**

**Myeloperoxidase (MPO)**

Nachdem das Gewebe für die HE-Färbung entnommen worden war, erfolgte die Entnahme und Präparation von Darmgewebe für die MPO-Färbung. Dabei wurde ein etwa 1 cm langer Darmschnitt zur Färbung angewendet (Segment 1), der sich bei

Ileusmaus etwa 0,5 cm vor der Ligatur (siehe **Abb. 4**) und bei Shammaus etwa 5,5 cm proximal der ileozökalen Klappe befand. Danach wurde er sofort in ein mit eiskalter Kreb's-Lösung gefülltes Becherglas gegeben. Die Probe blieb längstens 4 Stunden im Kühlschrank bei 4 °C, bevor die Färbung durchgeführt wurde.

Vor jeder Färbung erfolgte zunächst die Vorbereitung und Präparation des Darms. Die Darmprobe wurde in eine silikonbeschichtete Schale eingebracht, welche schon mit Kreb's-Lösung gefüllt war. Dann wurden die beiden Enden des Darms mit Kanülenpritzen fixiert. Nachdem das mesenteriale Fett- und Bindegewebe entfernt worden war, erfolgte das Eröffnen des Darmlumens auf der mesenterialen Seite mittels Längsschnitt. Das Darmsegment wurde anschließend dann auf 150% der Länge und 250% der Breite gedehnt, aufgespannt und auf allen Seiten mit Kanülenpritzen befestigt. Die Mucosa und Submucosa wurden dann sorgfältig unter einem Präparationsmikroskop von der Muskularis abgetrennt und verworfen<sup>(54)</sup>. Die verbleibende Tunica muskularis wurde dann in 0,05 M Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) bei 4 °C bis zur weiteren Färbung gelagert.

#### – **Gewebeentnahme und Aufbewahren für die Zytokin-Analyse**

Als letzter Schritt erfolgte die Gewebeentnahme für die Zytokin-Analyse. Ein ca. 0,5 cm langes Darmsegment (Segment 4), das sich 4,5 cm vor der Ligatur beim Ileusdarm und korrespondierend 9,5 cm proximal der ileozökalen Klappe beim Kontrolldarm befand (siehe **Abb. 4**), wurde abgeschnitten, anschließend in ein kleines Eppendorf-Gefäß gegeben und sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Darmgewebe bei –80 °C aufbewahrt.

Zur Vermeidung einer Kontamination der Proben durch fremdes Material war bei der Gewebeentnahme eine hygienische Arbeit des Versuchers erforderlich.

## 2.3. Nervenfaserableitung und intraluminale Druckmessung

Das wie im Kapitel 2.2.3 beschrieben vorbereitete Darmsegment wurde nun zum elektrophysiologischen Versuch in ein Zweikammerorganbad eingebracht, wobei der Darm sich in der davor mit Kreb's-Lösung gefüllten Kammer befand und sein in der Mitte liegendes Mesenterium durch eine kleine Öffnung in die zweite Kammer, die direkt hinter der ersten Kammer stand, gezogen. Das distale Ende des Mesenterium wurde nun mit einer Spitzkanüle auf dem Boden der Kammer fixiert, anschließend die kleine Öffnung mit Silikon-Hochvakuumfett zur Trennung der beiden Kammern verschlossen. Das Organbad lag auf einer Thermoplatte, die die Temperatur im Organbad konstant auf 32 °C aufrechterhielt.

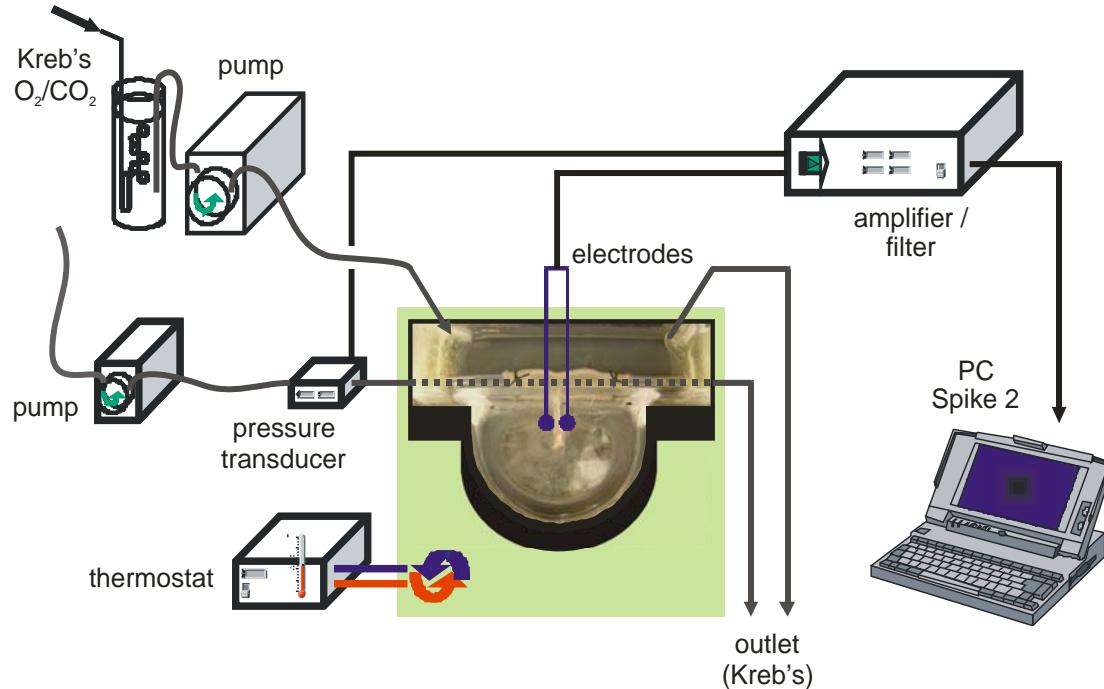
Die erste Kammer, worin sich das Darmsegment befand, wurde dann mit Kreb's-Lösung perfundiert. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug konstant 7 ml/min. Um der pH-Wert in der Kammer ständig auf 7,4 zu halten, wurde die Kreb's-Lösung während dem ganzen Versuch ca. 45 Minuten mit O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%) oxygeniert.

Nun wurde auf beiden Seiten des zu untersuchenden Darmsegments je ein Perfusionskatheter in das Darmlumen eingebracht und der Darm beidseits an diesen Kathetern mittels Ligatur fixiert. Unmittelbar danach erfolgte die Perfusion des Darms mit Kreb's-Lösung mit Hilfe von einer Perfusionspumpe. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug hier konstant 10 ml/h gemäß der Geschwindigkeit der physiologischen Nahrungspassage im Dünndarm. Um die Perfusionsrichtung des Darms wie bei dem physiologischen Nahrungspassage von oral nach aboral aufrecht zu halten, wurde der proximale Perfusionskatheter direkt mit der Perfusionspumpe verbunden (IVAC 711). Im Vergleich dazu blieb der distale Katheter für den Abfluss der Perfusionsflüssigkeit offen und konnte während der Darmdistension zugeklemmt werden. Der zuführende Schenkel des Perfusionssystems war mit einem Druckaufnehmer verbunden, der eine permanente Messung des intaluminalen Drucks im Darm ermöglichte.

Die zweite Kammer des Organbades, in der das Mesenterium lag, wurde nun zur elektrischen Isolation mit flüssigem Mineralöl gefüllt. Anschließend wurden unter dem

Mikroskop die mesenterialen Gefäße und Nervenfaser präpariert und freigelegt, bevor die elektrophysiologische Ableitung durchgeführt wurde.

Zu Ableitung der Nervenimpulse wurde nun eine bipolare Platin-Elektrode in die zweite Kammer eingebracht. Der freigelegte Nerv wurde dann auf einen Schenkel der Elektrode gewickelt, während der andere Schenkel mit einem Stück von Bindegewebe verbunden wurde. Die Elektrode wurde anschließend an einen CED 1902 Verstärker und Filter (Cambridge Electronic Design (CED), Cambridge, UK) angeschlossen, womit die 10.000fache Verstärkung der Signale und deren Filterung mit einer Bandbreite von 100 Hz bis 1 kHz ermöglichte. Parallel wurden die Signale aus dem Druckaufnehmer an einen weiteren CED 1902 Verstärker und Filter geleitet. Die Signale der elektrophysiologischen Nervenfaserableitung wurden ebenso wie die des Druckaufnehmers einem AD-Wandler 1401 (CED) zugeleitet. Dort wurden sie weiterverarbeitet und in ein Computersystem mit zugehöriger Software (Spike 2 Software, Version 4.01, CED) eingespeist<sup>(55)</sup> (siehe Abb. 6).



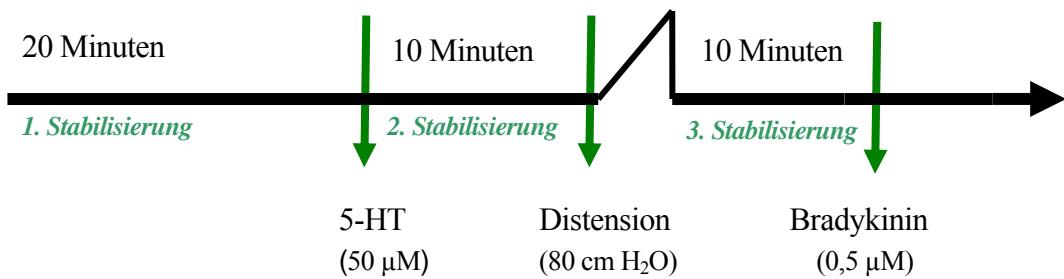
**Abb. 6** Versuchsaufbau zur elektrophysiologischen Ableitung

## 2.4. Versuchsprotokoll der elektrophysiologischen Ableitungen

Die elektrophysiologische Ableitung begann mit einer Stabilisierungsphase von mindestens 20 Minuten, damit eine stabile Aufzeichnung der Nervenfaserimpulse gesichert wurde. Dann erfolgte die erste chemische Stimulation des Versuchsnervs durch serosa-seitige Applikation von 5-HT. Zu diesem Zweck wurde die Perfusionspumpe des Organbades ausgeschaltet, bevor  $50 \mu\text{M}$  5-HT mittels einer Pipette ins Organbad gegeben wurde. Nach 2 Minuten wurde die Perfusionspumpe wieder eingeschaltet, so dass die Wirkung von 5-HT nachließ, bis schließlich wieder eine stabile Ruhenervenfaserimpulse erreichen konnten.

Nach der erneuten Stabilisierungsphase von mindestens 10 Minuten wurde eine mechanische Stimulation des Darms durchgeführt, bei welcher der intraluminale Druck im Darm vom Ausgangswert bis auf ca.  $80 \text{ cm H}_2\text{O}$  gesteigert wurde. Der abführende Katheter wurde nun zu diesem Zweck zugeklemmt, wobei gleichzeitig die Perfusion des Darms mit Kreb's-Lösung kontinuierlich fortgeführt wurde, bis schließlich der intraluminale Druck auf  $80 \text{ cm H}_2\text{O}$  erreicht war. Unmittelbar danach wurde der abführende Katheter wieder geöffnet, die im Darmlumen angestaute Kreb's-Lösung konnte abfließen.

Nachdem die Nervenimpulse für 10 Minuten wieder eine konstante Ruheaktivität zeigten, erfolgte die zweite chemische Stimulation mittels Bradykinin. Die Perfusionspumpe wurde nun für zwei Minuten ausgeschaltet, um serosale Applikation von  $0,5 \mu\text{M}$  Bradykinin mit einer Einwirkungszeit von zwei Minuten zu ermöglichen. Die schematische Darstellung des Versuchsprotokolls für die Elektrophysiologie zeigt **Abb. 7**.



*Abb. 7 Versuchsprotokoll für die Elektrophysiologie*

## 2.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (abgekürzt HE-Färbung) stellt eine Routinefärbung für morphologische Untersuchungen in der konventionellen Histologie dar. Anhand von zwei verschiedenen Einzelfärbungen werden die verschiedenen Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild angefärbt und sich dadurch voneinander unterscheiden. Hämalaun färbt basophile Strukturen insbesondere Zellkerne in blauer Farbe, dagegen werden alle eosinophilen Strukturen von Eosin rot angefärbt, vor allem die Zytosplasmproteine werden in verschiedenen Rottönen dargestellt.

Zur Durchführung der HE-Färbung erfolgte zunächst das Entparaffinieren der im Kapitel 2.2.3 beschriebenen vorbereiteten Gewebepräparate in der absteigenden Alkoholreihe. Dieser Schnitt dauerte ca. 45 Minuten. Dann wurden die Präparate in Hämalaun nach Mayer zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten getränkt, anschließend mit fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gespült. Danach erfolgte die Anfärbung mittels Eosin, was nun kurz 30 Sekunden bis 1 Minute dauerte. Im Anschluss folgte wieder die Spülung unter fließendem Leitungswasser für 3 Minuten. Die Präparate wurden nun in der aufsteigenden Alkoholreihe fixieren und zum Schluss permanent in Eukitt eingedeckt. Der gesamte Ablauf der HE-Färbung betrug ca. 120 Minuten im vorliegenden Versuch. Ein Überblick des Färbeprotokolls wird folgend dargestellt (siehe **Tab. 1**).

**Tab. I** Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten

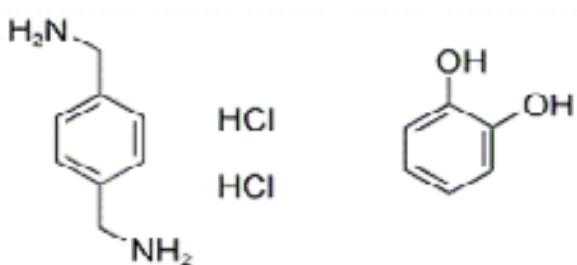
Arbeitsablauf	Substanz		Dauer
Entparaffinieren in der absteigenden Alkoholreihe	1.	Xylol I	15 min.
	2.	Xylol II	15 min.
	3.	100% Ethanol	5 min.
	4.	96% Ethanol	5 min.
	5.	70% Ethanol	5 min.
	6.	Aqua dest.	1 min.
HE-Färbung mit aufsteigender Alkoholreihe	7.	Hämalaun nach Mayer	30 sec. – 5 min.
	8.	fließend wässern	10 min.
	9.	Eosin	30 sec. – 1 min.
	10.	fließend wässern	3 min.
	11.	70% Ethanol	3 min.
	12.	96% Ethanol	3 min.
	13.	100% Ethanol	5 min.
	14.	Xylol I	10 min.
	15.	Xylol II	10 min.
	16.	eindeckeln in Eukitt	

## 2.6. Myeloperoxidase-Färbung (MPO-Färbung)

### 2.6.1. Grundlagen

Die Anreicherung von neutrophiler Granulozyten in der Darmwandmuskulatur ist als Zeichen der Entzündungsreaktion gesehen. Dies kann mittels der Myeloperoxidase-Färbung erfasst werden. Myeloperoxidase (MPO) ist ein Häm-Protein, die sich in polymorphkernigen Leukozyten (Neutrophile) anhäufen und während ihre Aktivierung beim Entzündungsprozess sezerniert. Sie wird mittels spezieller

Färbungsmethode blauschwarz gefärbt und die Anhäufung von neutrophiler Granulozyten ist unter dem Mikroskop zu erkennen.



Beim zytochemischen Nachweis von Myeloperoxidase (MPO) wurde Benzidin oder Diaminobenzidin in den klassischen Methoden zur Verfügung gestellt. Im Jahr 1977 beschrieben

Hanker et al. zum ersten Mal die Verwendung von p-Phenyldiamin und Katechol, um injizierte Horseradish-Peroxidase nachzuweisen<sup>(56)</sup>, was nun als Grundlage zur Lokalisierung der Myeloperoxidase positiven Zellen im Gewebe angewendet wird, sodass auch als Hager-Yates-Reaktion genannt ist.

## 2.6.2. Versuchsdurchführung

Hierzu wurden die im Kapitel 2.2.3 beschrieben vorbereiteten Gewebeproben zuerst in 100% Ethanol für 10 Minuten fixiert, dann zweimal jeweils für 5 Minuten in PBS-Lösung gewaschen. Unmittelbar danach wurde 10 mg Hager-Yates Reagenz, 10 ml Kreb's-Lösung sowie 100 µl 3% Hydrogen Peroxidase zusammen gemischt, und die Mischung 1: 10 in Kreb's-Lösung verdünnt. Die Gewebeproben wurden nun in der verdünnten Lösung unter Sichtkontrolle inkubiert. In der Regel reicht die Inkubation von ca. 1 Minute. Vor allem bei entzündetem Gewebe ist das frühzeitige Stoppen wichtig, da die einzelnen Zellen sonst wegen der deutlichen Hintergrundfärbung nicht mehr erkannt werden können. Sobald keine weiteren Zellen angefärbt wurden (spätestens nach 10 Minuten), sollte die Reaktion sofort mit Kalter PBS-Lösung gestoppt werden. Die Gewebeproben wurden nun auf Objektträger positioniert, mit Eukitt bedecken und letztendlich mit Deckglässchen verschlossen. Eine Übersicht über das Färbeprotokoll wird nun gegeben (siehe **Tab. 2**).

**Tab. 2** MPO Färbeprotokoll mit Hanker-Yates Reagenz

1.	Darm entlang des Mesenteriums öffnen
2.	- Mukosa und Submukosa entfernen - Muskularis in der Länge um 150%, in der Breite um 250% dehnen
3.	Muskularis in 100% Ethanol fixieren, 10 min.
4.	2 x 5 min. in PBS (pH 7,4) waschen
5.	- 10 mg Hanker-Yates Reagenz, 10 ml Kreb's-Lösung, und 100 µl 3% Hydrogen Peroxidase unmittelbar vorher mischen, 1:10 in Kreb's-Lösung verdünnen - Gewebeprobe unter Sichtkontrolle darin inkubieren (maximal 10 min.)
6.	Reaktion mit kaltem PBS (pH 7,4) stoppen
7.	Gewebeprobe auf Objektträger positionieren, mit Eukitt bedecken und mit Deckgläschchen verschließen
8.	Myeloperoxidase positive Zellen unter Mikroskop auszählen (15 Gesichtsfelder pro Objektträger)

## 2.7. Zytokin-Analyse mittels quantitativer Real-Time PCR

### 2.7.1. RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde das RNeasy® kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zunächst wurden 400 µl des Zell-Lyse-Puffers auf das gefrorene Gewebe gegeben und anschließend das Gewebe mit Hilfe von einem sanften MACS Dissoziator (Miltenyi Biotec) in drei Stücken aufgeschnitten. Nach Angabe des Herstellers wurden die Proben nun wie folgend behandelt (siehe **Tab. 3**). Das isolierte RNA Pellet wurde dann von seinem Gehalt und seiner Reinheit mit Hilfe von OD260- und OD280-Messungen im Photometer bestimmt. Zum Schluss wurden die Proben in sterilen 0,5 ml Mikroreaktionsgefäßern kurz in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei –85 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

**Tab. 3** Versuchsprotokoll der RNA-Isolierung

1. Homogenization:	a. Gewebeprobe in ein Eppendorf-Gefäß überführen, mit 0,5 ml TRI REAGENT® versetzen und sofort wieder in den flüssigen Stickstoff geben. b. Gewebeprobe während des Auftauens mit einer Pipette homogenisieren.
2. Separation:	a. 0,2 ml Chloroform in das Gemisch zusetzen und für ca. 30 Sekunden schütteln. b. Das Gemisch für 15 Minuten bei 4 °C und 12000 g zentrifugieren.
3. RNA Präzipitation:	a. Der wässrige Überstand des Gemischs in ein neues Eppendorf-Gefäß überführen und mit 0,5 ml 40%igem Isopropanal versetzen. b. Das Gemisch kurz schütteln und danach bei Raumtemperatur für ca. 10 Minuten inkubieren. c. Anschließend es noch mal für 15 Minuten bei 4 °C und 12000 g zentrifugieren.
4. RNA Elution:	a. Das entstandene RNA Pellet in 0,1 ml RNase-freiem Wasser lösen. b. Das Gemisch für 5 Minuten bei 4 °C und 7000 g zentrifugieren.

### 2.7.2. Reverse Transkription

Zur reversen Transkription wurde im Versuch das „Promega Reverse Transcription System“ (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Pro Ansatz wurden 1 µg totale RNA in complementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Alle Arbeiten für die Reverse Transkriptase Reaktion erfolgten auf Eis. Das Versuchsprotokoll wird folgend gegeben (siehe **Tab. 4**). Die entstandenen Proben wurden nun in einem Thermocycler bei 42 °C für

15 Minuten inkubiert. Dann wurden sie auf 95 °C für 5 Minuten geheizt und unmittelbar danach bei 0–5 °C für 5 Minuten inkubiert. Dies wirkte zur Denaturierung der Reverse Transkriptase und verhinderte deren Bindung an den cDNA. Das cDNA-Produkt wurde zuletzt bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

**Tab. 4** Protokoll für das Umschreiben von mRNA in cDNA

Reagenzien	Ausgangskonzentration	Volumen	Endkonzentration
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4 µl	5 mM
RT-PCR-Puffer	10 x	2 µl	1 x
dNTP-Lösung	10 mM	2 µl	1 mM
RNAse-Inhibitor	10 U/µl	0.5 µl	1 U/µl
Reverse Transkriptase	15 U/µg	15 U	15 U/µg
Oligo dT Primer	20 mM	0.5 µg	1 mM
RNA		1 µg	50 ng/µl
RNase-freies Wasser		...ad 20 µl	

### 2.7.3. Quantitative RT-PCR

Um die relative Menge der vorliegenden mRNA eines zu untersuchenden Gens genau zu bestimmen, wurde die Real-Time PCR Methode angewendet<sup>(57,58,59)</sup>. Als fluoreszierendes Molekül (Fluorophore) wurde das interkalierende doppelstrang-spezifische SYBRGreen I eingesetzt, welches an Doppelstrang-DNA bindet und dadurch zum Anstieg der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Produktbildung führt. Des Weiteren wurde bei jeder Reaktion die mRNA-Menge des „housekeeping-Gen“ GAPDH mitbestimmt. Das Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein ubiquitäres Enzym aus dem Kohlenhydratstoffwechsel der Zellen, das stabil exprimiert wird und dessen Expression als wenig reguliert gilt. Sie ist eines der am häufigsten verwendeten Housekeeping-Gen<sup>(60)</sup> und dient als Referenz-RNA-Moleküle zur Normalisierung der RNA-Gehalte der individuellen Proben.

Die quantitative Analyse der mRNA des TNF- $\alpha$  sowie IL-6 wurde unter Anwendung von Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt. Zur Detektierung der zu untersuchenden Gene wurden folgende Reaktionsreagenzien verwendet:

- TaqMan® Gene Expression Assays - mouse TNF- $\alpha$  (Exon 3-4) - Mm99999068\_m1
- TaqMan® Gene Expression Assays - mouse IL-6 (GEA 250ul) - Mm00446190\_m1

Die Sequenz der Oligonukleotide für GAPDH lag dem Hersteller vor (ABI). Die Reaktionen wurden in dreifacher Anfertigung mit Hilfe vom ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität während der 40 Zyklen Amplifikation wurde unter Anwendung der Sequenz-Detektor-Software (Version 2.1 SDS) detektiert und kalkuliert. Das Versuchsprotokoll der RT-PCR wird folgend in der **Tab. 5** gegeben.

**Tab. 5** Versuchsprotokoll der RT-PCR

1.	Aktivierung der TaqMan® -Polymerase	2 Min.	95 °C
2.	Denaturierung	30 Sec.	94 °C
3.	Annealing	45 Sec.	60 °C
4.	Elongation	1 Min.	72 °C
5.	finale Elongation	5 Min.	72 °C
6.	Kühlung des PCR-Produktes	--	4 °C
7.	Vorgang 2 bis 4: 40 Zyklen Amplifikation		

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde eine Schmelzkurvenanalyse im Temperaturbereich zwischen 60 °C und 95 °C durchgeführt, wobei es durch kontinuierlichen Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der PCR-Produkte kam. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturierte der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Während dieses Prozesses wurde ein Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und dadurch eine Fluoreszenzabnahme aufgezeichnet.

Eine Unterscheidung zwischen verschiedenen DNA-Produkten sowie zwischen spezifischen PCR-Produkten und unspezifisch entstehenden Primerdimeren ist somit möglich.

## 2.8. Auswertung

### 2.8.1. Elektrophysiologie

Zur Auswertung der elektrophysiologischen Daten wurde zunächst die Ruhenervenfaserimpulse (Baseline, imp/sec) gemessen. Dies wurde definiert als maximale Impulsrate über einem Zeiraum von 120 Sekunden direkt vor der jeweiligen Stimulation.

Anschließend wurde die Impulsrate des afferenten Nervs nach der ersten chemischen Stimulation mit 5-HT ausgewertet. Dazu wurde die höchste Impulsrate innerhalb von 120 Sekunden unmittelbar nach der Gabe der Substanz für die Auswertung genommen. Bei der Auswertung wurde jede abgelesene Baseline willkürlich auf „1“ normalisiert und die entsprechende Anzahl afferenter Nervenimpulse nach der jeweiligen Stimulation dann auf diesen bezogen. Die Reizantwort wurde als normalisierte Anstiegsrate genannt und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{normalisierte Anstiegsrate} = \frac{\text{maximale Impulsrate nach Stimulation}}{\text{Baseline}}$$

Ebenso wurde anhand von derselben Formel die Reizantwort nach der zweiten chemischen Stimulation mit Bradykinin kalkuliert. Zuletzt erfolgte die Auswertung der Reizantwort während der mechanischen Darmdistension. Die Baseline sollte wie oben beschrieben von der Versuchsabbildung abgelesen werden, dann folgte die Messung des maximalen Anstiegs der Impulsrate bei intraluminalem Druckanstieg um 10 cm H<sub>2</sub>O, 20 cm H<sub>2</sub>O..., bis um 80 cm H<sub>2</sub>O (der Druckanstieg wurde in Abschnitte von je 10 cm H<sub>2</sub>O

unterteilt). Zum Schluss wurden die ermittelten Daten wieder in die Formel gegeben, sodass die Reizantwort der Nervenimpulse bei jeweiligem zugeordnetem intraluminalen Druck ausgerechnet werden konnte.

### 2.8.2. HE-Färbung

M. Hausmann und Ihre Mitarbeiter haben im Jahr 2007 einen mikroskopischen Score für die Beurteilung der HE-Färbungspräparate des Dickdarms entwickelt<sup>(61)</sup>, die später auch für Dünndarmpräparate in Anwendung gesetzt wurde<sup>(62)</sup>. Die histologische Auswertung im Experiment erfolgt unter Mikroskop bei 10facher, 40facher sowie 63facher Vergrößerung nach diesem mikroskopischen Score, in dem die Epithelmorphologie der Mukosa sowie die Leukozyteninfiltrationstiefe in der Bewertung eingeschlossen wurden (siehe **Tab. 6**).

**Tab. 6** Mikroskopischer Score für die histologische Beurteilung des Entzündungsgrades

<b>Epithelium</b>	
Normale Morphologie	0
Verlust von Becherzellen	1
Becherzellenverlust in großem Areal	2
Verlust von Krypten	3
Kryptenverlust in großem Areal	4
<b>Infiltration</b>	
Keine Infiltraten	0
Infiltraten um die Kryptenbasis	1
Infiltraten erreichen die L. muscularis mucosae	2
Ausgedehnte Infiltration erreicht die L. muscularis mucosae; Verdickung der Mukosa mit schwerem Mukosaödem	3
Infiltraten in der L. muscularis mucosae	4

Der gesamte histologische Score besteht aus der Summe der beiden Kriterien und somit sie im Bereich von 0 bis 8 beträgt (gesamter Score = E + I).

### **2.8.3. Myeloperoxidase-Färbungen**

Die Auswertung der Myeloperoxidase positiven neutrophilen Granulozyten erfolgte unter dem Mikroskop bei 200facher Vergrößerung. Bei der Auswertung wurden 15 Gesichtsfelder pro Präparat ausgezählt und die Zellzahlen pro Präparat wurden dann in Zellzahlen pro mm<sup>2</sup> umgerechnet.

### **2.8.4. Zytokin-Analyse**

Die Auswertung der Ergebnisse der RT-PCR erfolgte nach der ddCt Methode<sup>(63,64)</sup>. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde ein Schwellenwert für die Fluoreszenz festgelegt und für jede Probe die Anzahl der Zyklen bestimmt, bei der dieser Schwellenwert erreicht war. Der Schwellenwert wurde so definiert, dass alle analysierten Proben in der exponentiellen Phase der Amplifikation ausgewertet werden konnten. Der Zyklus, in dem die zu untersuchende Probe einen berechneten Fluoreszenzschwellenwert signifikant überschritt, wurde als Schwellenwertzyklus (kurz: Ct) der jeweiligen Probe bezeichnet. Mittels dieser Schwellenwertzyklen wurde die Menge des Ausgangsproduktes bestimmt. Je niedriger die Ct-Werte waren, desto stärker war demnach das PCR-Signal. Der ermittelte Ct-Wert der jeweiligen Probe wurde nun mit dem analog ermittelten Ct-Wert der GAPDH verglichen: dCt = Ct (Gen) – Ct (GAPDH). Zum Schluss wurde zum Vergleich zweier Proben die Differenz der CT-Werte gebildet: ddCt = dCt (Probe) – dCt (Kontrolle). Hierbei wurde die Versuchsprobe 2a (ein prästenotisches Darmgewebe aus der 3h Ileusgruppe) manuell als Kontrolle festgesetzt, deren Ct-Wert mit anderen Versuchsproben verglichen wurde. Da in jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung stattfand, betrug der Unterschied zwischen zwei Proben:  $x = 2^{-ddCt}$ .

## 2.9. Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurde mit Hilfe von one-way ANOVA Test, post-hoc Holm-Sidak Test sowie Dunn's Test durchgeführt, und erfolgte mit Hilfe des Statistik-Programms Sigma-Stat (Version 3.0).

Alle Daten wurden als MW ± SEM dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde stets ein  $p < 0,05$  vorausgesetzt. Die zu vergleichenden Gruppen verfügten über einen gleich großen Stichprobenumfang. Die Elektrophysiologie, die HE-Färbung sowie die Zytokin-Analyse wurden mit  $n=6$  durchgeführt, während die MPO-Färbung mit  $n=4$  untersucht wurde.

## 2.10. Geräte, Materialien, Chemikalien und Lösungen

### 2.10.1. Chemikalien

1.	<b>ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System</b>	Applied Biosystems; Darmstadt; Deutschland
2.	<b>Aqua dest.</b>	B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland
3.	<b>Bradykinin</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
4.	<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
5.	<b>Eosin 2%</b>	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
6.	<b>Ethanol</b>	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
7.	<b>Hämalaun</b>	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
8.	<b>Hanker-Yates Reagenz</b>	Polysciences INC.; Eppelheim; Deutschland
9.	<b>Hydrogen Peroxidase 3%</b>	Polysciences INC.; Eppelheim; Deutschland
10.	<b>Isofluran</b>	Abbott GmbH & Co KG; Wiesbaden; Deutschland
11.	<b>KCl</b>	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
12.	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland

13.	<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
14.	<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
15.	<b>NaCl</b>	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
16.	<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Merck KGaA; Darmstadt; Deutschland
17.	<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
18.	<b>Natriumchloridlösung</b>	B. Braun Melsungen AG; Melsungen; Deutschland
19.	<b>PBS Buffer (pH 7,4) 10x</b>	Life Technologies GmbH; Darmstadt; Deutschland
20.	<b>Promega Reverse Transcription System</b>	Promega GmbH; Madison, WI; USA
21.	<b>RNeasy® kit</b>	Qiagen GmbH; Hilden; Deutschland
22.	<b>Serotonin (5-HT)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Steinheim; Deutschland
23.	<b>SYBRGreen® I</b>	Qiagen GmbH; Hilden; Deutschland
24.	<b>TaqMan® Gene Expression Assays: Mm00446190_m1</b>	Applied Biosystems; Darmstadt; Deutschland
25.	<b>TaqMan® Gene Expression Assays: Mm99999068_m1</b>	Applied Biosystems; Darmstadt; Deutschland
26.	<b>TRI REAGENT®</b>	Qiagen GmbH; Hilden; Deutschland
27.	<b>Wasserstoffperoxid 30%</b>	Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe; Deutschland
28.	<b>Xylol</b>	Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe; Deutschland

## 2.10.2. Lösungen

Die im Experiment verwendeten Lösungen und ihren Zusammensetzung werden nachfolgend gegeben (siehe **Tab. 7 – Tab. 9**).

**Tab. 7 Zusammensetzung der 10x Kreb's-Lösung**

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

**Tab. 8 Zusammensetzung der Kreb's-Lösung**

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

**Tab. 9 Zusammensetzung der 0,5 M PBS-Lösung (pH 7,4)**

1.	Aqua dest.	700 ml
2.	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	103,74 g
3.	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15,59 g
4.	Aqua dest.	Auffüllen auf 1 L
5.	Filtern	
6.	pH-Einstellung auf pH 7,4	
7.	Aufbewahrung bei Raumtemperatur	

### 2.10.3. Geräte und Labormaterialien

1.	<b>AD-Wandler 1401</b>	CED; Cambridge Electronic Design; England
2.	<b>Agilent 2100 Bioanalyzer</b>	Agilent Technologies Deutschland GmbH; Böblingen; Deutschland
3.	<b>Carbogengas</b>	Linde AG; Höllriegelskreuth; Deutschland
4.	<b>Computer</b>	Fujitsu Siemens Computers GmbH; München; Deutschland
5.	<b>Digitalkamera</b>	Olympus C3040 - ADU; Olympus Imaging America Inc.; USA
6.	<b>Druckaufnehmer (Neurolog pressure amplifier NL 108)</b>	Digitimer Ltd.; Hertfordshire; England
7.	<b>Einmalspritzen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml</b>	BD Becton Dickinson GmbH; Heidelberg; Deutschland
8.	<b>Eppendorfgefäß</b>	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Wesseling-Berzdorf; Deutschland
9.	<b>Eukitt</b>	O. Kindler GmbH & Co; Freiburg im Breisgau; Deutschland
10.	<b>Filter und Verstärker 1902</b>	CED; Cambridge Electronic Design; England
11.	<b>Handschuh</b>	Semperit Technische Produkte GmbH; Wien; Österreich
12.	<b>Knopfkanüle Ø 1,5 x 60 mm gerade</b>	Mercateo AG; Köthen; Deutschland
13.	<b>MACS Dissoziator</b>	Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach; Deutschland
14.	<b>Mikroreaktionsgefäß</b>	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Wesseling-Berzdorf; Deutschland

15.	<b>Mikroskop</b>	Olympus COVER - 018; Olympus Imaging America Inc.; USA
16.	<b>Mineralöl</b>	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Deisenhofen; Deutschland
17.	<b>Mullkompressen</b>	NOBA Verbandmittel Danz GmbH; Wetter; Deutschland
18.	<b>Nahtmaterial</b>	Ethicon Johnson & Johnson GmbH; Norderstedt; Deutschland
19.	<b>Perfusionspumpe (IVAC 711)</b>	IVAC Corporation; San Diego; USA
20.	<b>Peristaltische Pumpen (Minipuls 3)</b>	Gilson Inc.; Middleton; USA
21.	<b>Pipetten</b>	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Wesseling-Berzdorf; Deutschland
22.	<b>Platinumdraht</b>	Goodfellow GmbH; Bad Nauheim; Deutschland
23.	<b>Präparationspinzetten</b>	Fine Science Tools GmbH; Heidelberg; Deutschland
24.	<b>Roti-Histokitt</b>	Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe; Deutschland
25.	<b>Sequenz-Detektor-Software (Version 2.1 SDS)</b>	Applied Biosystems; Darmstadt; Deutschland
26.	<b>Silikon-Hochvakuumfett</b>	DRAWIN Vertriebs-GmbH; Ottobrunn; Deutschland
27.	<b>Software Spike 2</b>	CED; Cambridge Electronic Design; England
28.	<b>Spectrophotometer: Infinite F 200 TECAN</b>	Tecan Group Ltd.; Männedorf; Deutschland
29.	<b>Sylgard</b>	DOW Corning GmbH Wiesbaden; Wiesbaden; Deutschland
30.	<b>Thermocycler „PTC-200“</b>	MJ Research Inc.; Watertown, Ma; USA

31.	<b>Versuchstiere</b>	Charles River GmbH; Sulzfeld; Deutschland
32.	<b>Wattestäbchen</b>	NOBA Verbandmittel Danz GmbH; Wetter / Ruhr; Deutschland
33.	<b>Zentrifuge</b>	Thermo Scientific; Karlsruhe; Deutschland

### 3. Ergebnisse

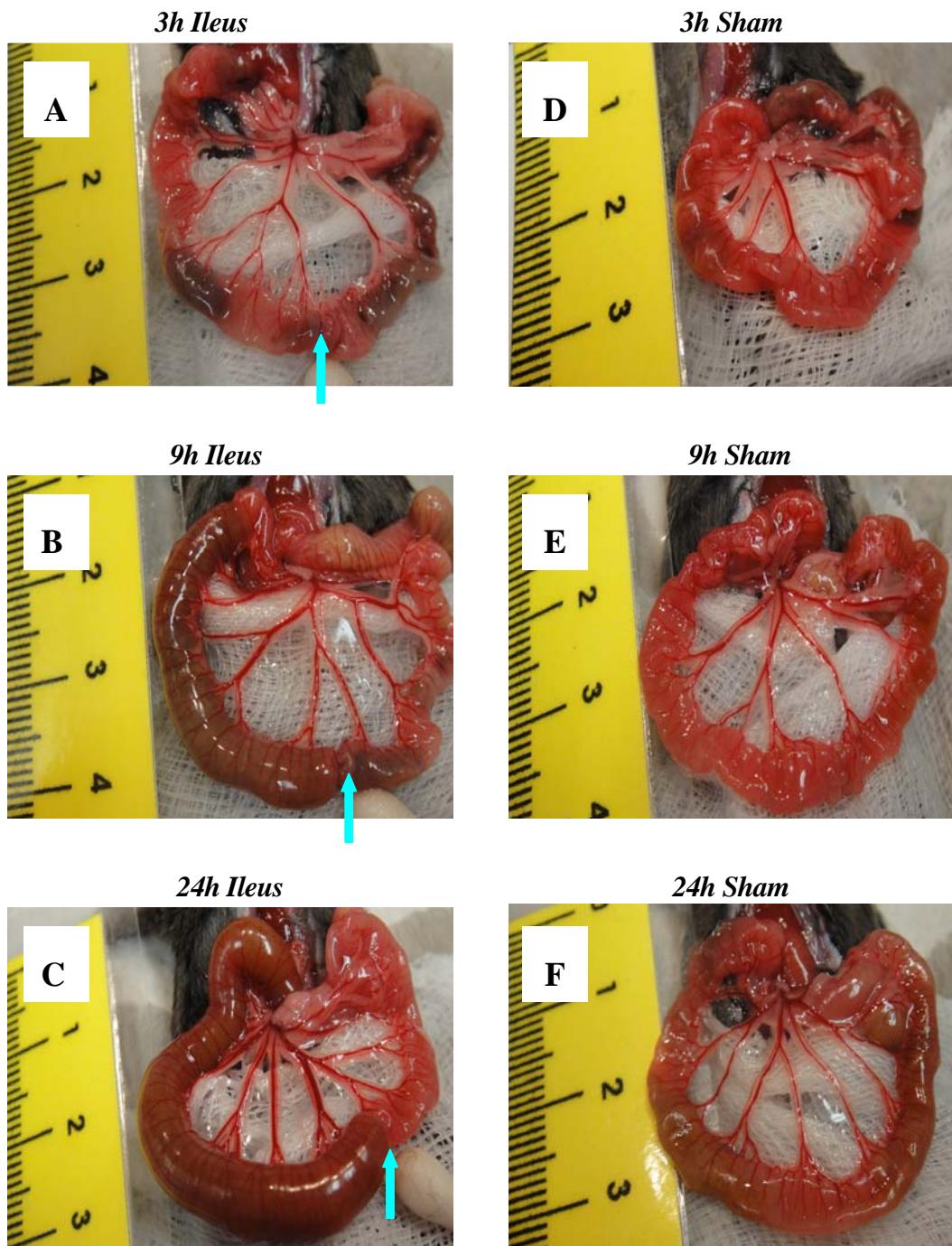
#### 3.1. Einführungen

Die im nachfolgenden Text verwendeten Begriffe „3h/9h/24h Ileus (-Gruppe)“ und „3h/9h/24h Sham (-Gruppe)“ beziehen sich auf die im Experiment eingeteilten 6 Versuchsgruppen. Bei allen Tieren in den Ileusgruppen wurde chirurgisch mechanischer Ileus induziert, während die Tiere in den Shamgruppen zur Kontrolle nur eine Laparotomie bekamen. Mit den Bezeichnungen „proximal“ sowie „distal“ wurden die Darmsegmente bezeichnet, die sich vor sowie hinter der Ligatur befanden.

#### 3.2. Makroskopische Veränderungen des Darms nach Darmobstruktion

Das makroskopische Aussehen des Darms bei allen Versuchstieren nach ihrer betreffenden chirurgischen Manipulation wurde im Experiment photographisch dokumentiert. Während sich die proximalen obstruierten Darmsegmente in den Ileusgruppen postoperativ in unterschiedlichem Ausmaß dilatiert und die zugehörigen mesenterialen Durchblutungen vor den Ligaturen sichtbar vermehrt haben, zeigten sich die Darmsegmente hinter den Ligaturen normal kalibriert und durchblutet. In der 3h Ileusgruppe war eine Dilatation und Hyperämie des obstruktiven Darmsegmentes diskret erkennbar und die Anstauung von Darminhalten konnte dabei kaum beobachtet werden, wohingegen in der 9h/24h Ileusgruppe immer mehr Flüssigkeit und Kot sich im Darmlumen stauten. Dies führte zur deutlichen Dilatation des Darms sowie einer makroskopischen erkennbaren Steigerung der mesenterialen Durchblutung (siehe **Abb. 8 A–C**).

Im Vergleich zu Ileusdarm zeigte der Darm in den Gruppen „Sham“ keine Kaliberschwankungen oder Durchblutungsveränderungen (siehe **Abb. 8 D–E**). Typische Erscheinungen des Darms in Bezug auf die Veränderungen bei postoperativem Ileus waren in keiner Shamgruppe zu beobachten<sup>(55)</sup>.



*Abb. 8 Repräsentative Beispiele der Darmsegmente 3h/9h/24h nach Ileusinduktion bzw. Shamoperation.*

*Die blauen Pfeile in der Abbildung zeigen die Positionen der Ligaturen.*

### 3.3. Intestinale afferente Nervenaktivität

#### 3.3.1. Intestinale afferente Nervenaktivität nach Gabe von 5-HT

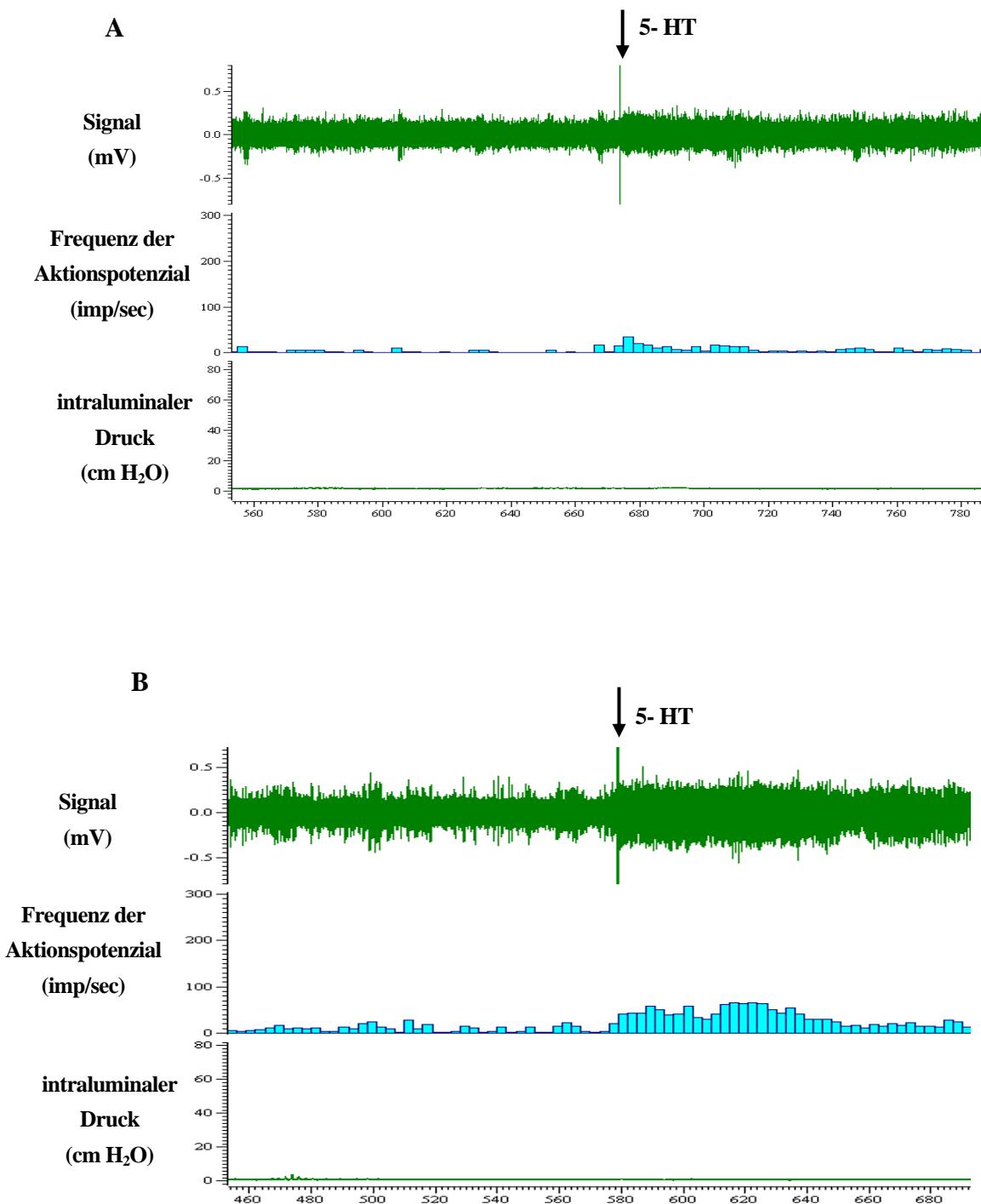
Die afferente Nervenfaseraktivität zeigte in allen Versuchsgruppen einen Impulsanstieg durch die erste chemische Stimulation mittels serosaler Applikation von 50 µM 5-HT ins Organbad (siehe **Abb. 9**). Einen Überblick über die erreichten Werte in den einzelnen Versuchsgruppen wird in **Tab. 10** gezeigt.

**Tab. 10** Nervenfaseraktivität (imp/sec) 120s nach Stimulation mit 5-HT. MW ± SEM; n = 6.

	3h	9h	24h
Sham	10,2 ± 0,8	20,6 ± 2,2	12,8 ± 1,7
Ileus	30,2 ± 2,7	15,6 ± 2,5	21,4 ± 3,4

Da die Baseline beim Versuch nicht auf gleicher Höhe aufrechterhalten konnte und zwischen Versuchstieren variierte, wurde bei der Auswertung der Versuchsergebnisse jede Baseline willkürlich auf „1“ normalisiert und die Reizantwort nach der Stimulation dann auf diesen Wert bezogen. Die dadurch resultierenden Ergebnisse werden im Text als „normalisierte Anstiegsrate“ bezeichnet.

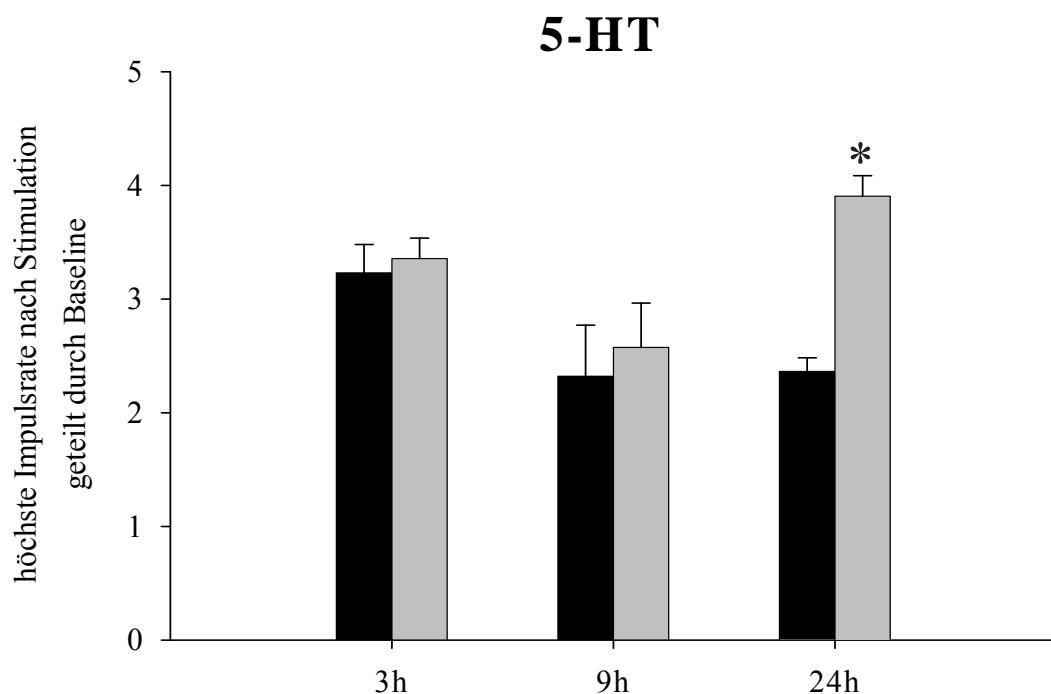
In der 3h oder 9h Versuchsgruppe wurde kein Unterschied der normalisierten Anstiegsrate nach der Stimulation zwischen den Shamgruppen und Ileusgruppen beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der Nervenfaseraktivität in der 24h Ileusgruppe gegenüber ihrer Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p < 0,01$ ; vgl. **Tab. 11** und **Abb. 10**).



*Abb. 9 Repräsentative Aufnahmen der afferenten Nervenfaserableitung vor und nach chemischer Stimulation mit 5-HT. Abbildung A stellt fortlaufend die Impulsrate eines Segmentes der 24h Shamgruppe dar. Abbildung B zeigt die Impulsrate eines Segmentes der 24h Ileusgruppe.*

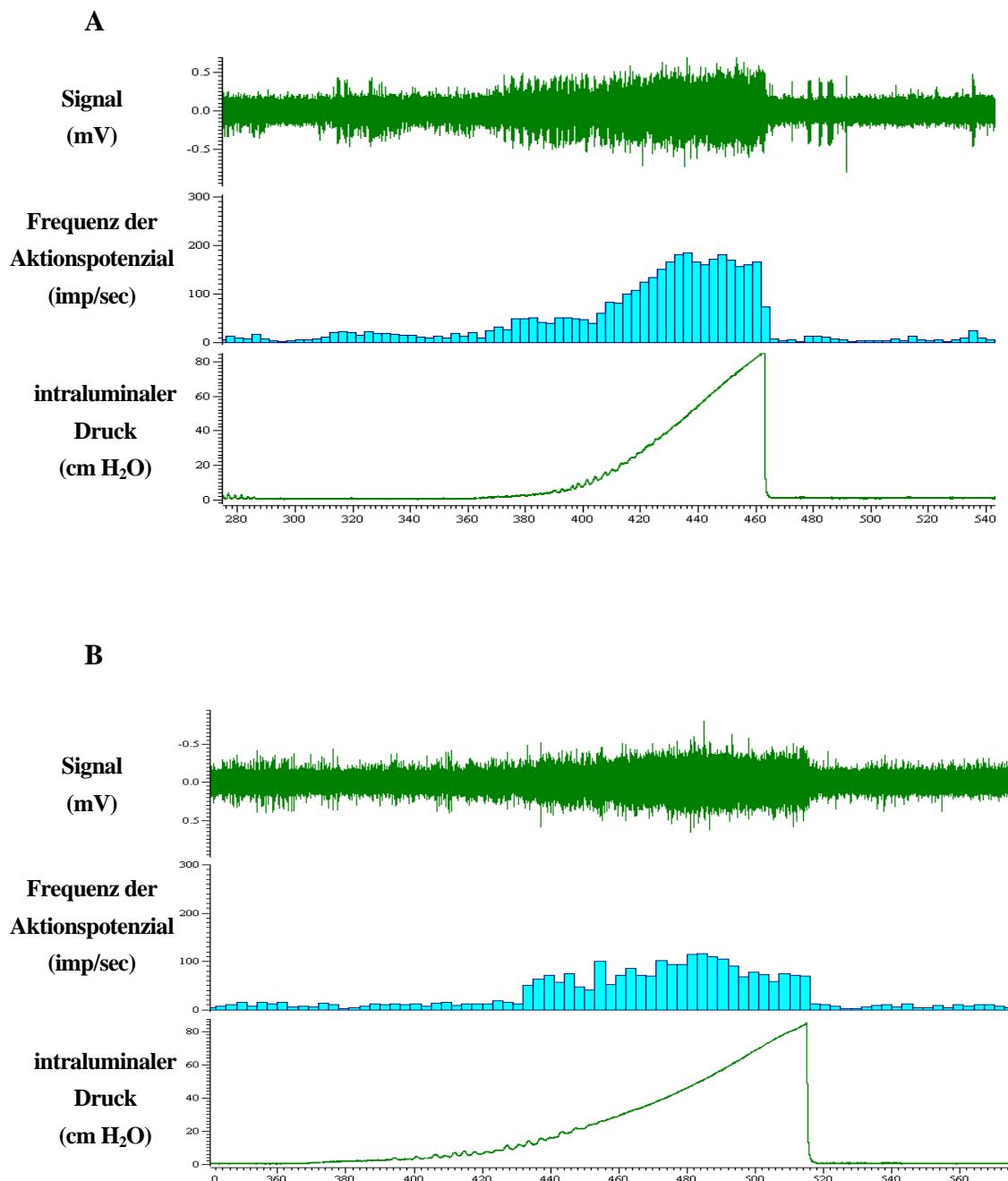
**Tab. 11** Normalisierte Anstiegsrate der nervalen Impulsrate nach Stimulation mit 5-HT.Darstellung als MW  $\pm$  SEM; \* $p < 0,01$ , n = 6.

	3h	9h	24h
Sham	3,2 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,1
Ileus	3,4 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,4	3,9 $\pm$ 0,2 *

**Abb. 10** Normalisierte Anstiegsrate der afferenten nervalen Impulsrate nach Stimulation mittels 5-HT (50  $\mu$ M). ■ Shamtiere; □ Ileustiere; MW  $\pm$  SEM; \* $p < 0,01$ , n = 6.

### 3.3.2. Intestinale afferente Nervenaktivität während mechanischer Stimulation

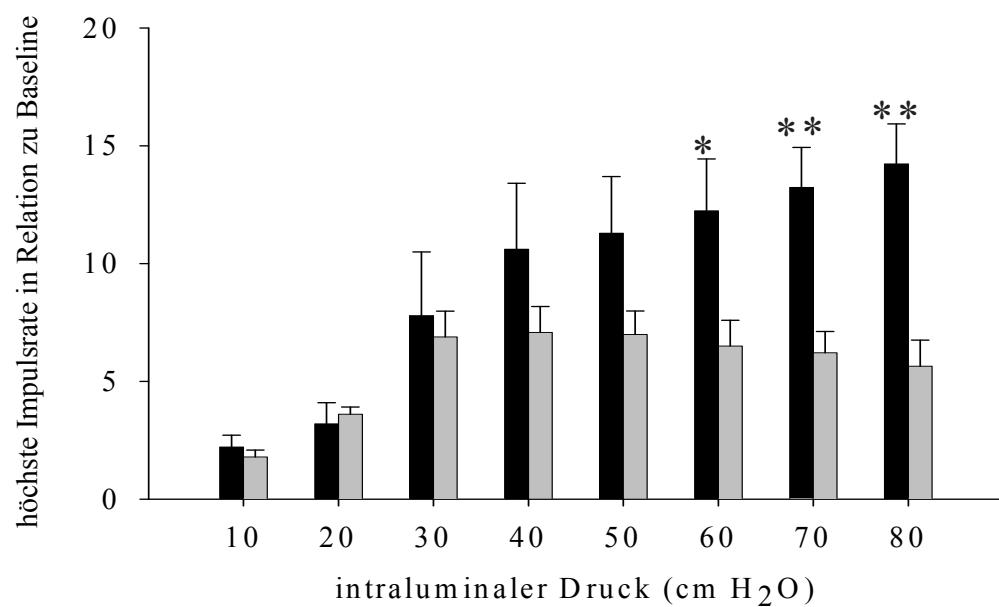
Bei der Durchführung der mechanischen Stimulation mittels Darmdistension war zu beobachten, dass die Steigerung der afferenten nervalen Impulsrate mit intraluminalem Druck in Beziehung stand: Je höher der intraluminale Druck war, desto höher war die Impulsrate. Beim maximalen intraluminalen Druck von 80 cm H<sub>2</sub>O konnten deswegen die höchste Impulsrate des afferenten Nervs beobachtet werden (siehe **Abb. 11**).



**Abb. 11** Repräsentative Aufnahmen der afferenten Nervenfaserableitung während der mechanischen Stimulation durch Darmdistension. Abbildung A stellt die nervale Impulsrate eines Segmentes der 3h Shamgruppe im Verlauf der Distension dar. Zum Vergleich zeigt Abbildung B die nervale Impulsrate eines Segmentes der 3h Ileusgruppe.

In den 3h Versuchsgruppen wurde kein Unterschied zwischen Sham- und Ileusgruppe bei intraluminalem Druck unter 50 cm H<sub>2</sub>O gezeigt, dagegen war die Impulsrate in der Shamgruppe statistisch signifikant höher als in der Ileusgruppe beim intraluminalen Druck von 60 cm H<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ). Ab 70 cm H<sub>2</sub>O zeigte in der Shamgruppe noch einen deutlicheren Effekt durch der Rampendistension im Vergleich zur Ileusgruppe. Hier wurde die maximale Steigerung der Impulsrate in der 3h Shamgruppe mit dem Wert von  $14,2 \pm 1,7$  (normalisierte Anstiegsrate) erreicht. Zum Vergleich betrug der entsprechende Wert in der 3h Ileusgruppe nur  $5,6 \pm 1,1$  ( $p < 0,01$ ) (siehe **Abb. 12**).

### 3h Gruppe



**Abb. 12** Normalisierte Anstiegsrate der afferenten nervalen Impulsraten während der Rampendistension innerhalb der 3h Gruppen. Die Werte der Reizantwort sind in der 3h Shamgruppe statistisch signifikant höher ab dem Druck von 60 cm H<sub>2</sub>O.

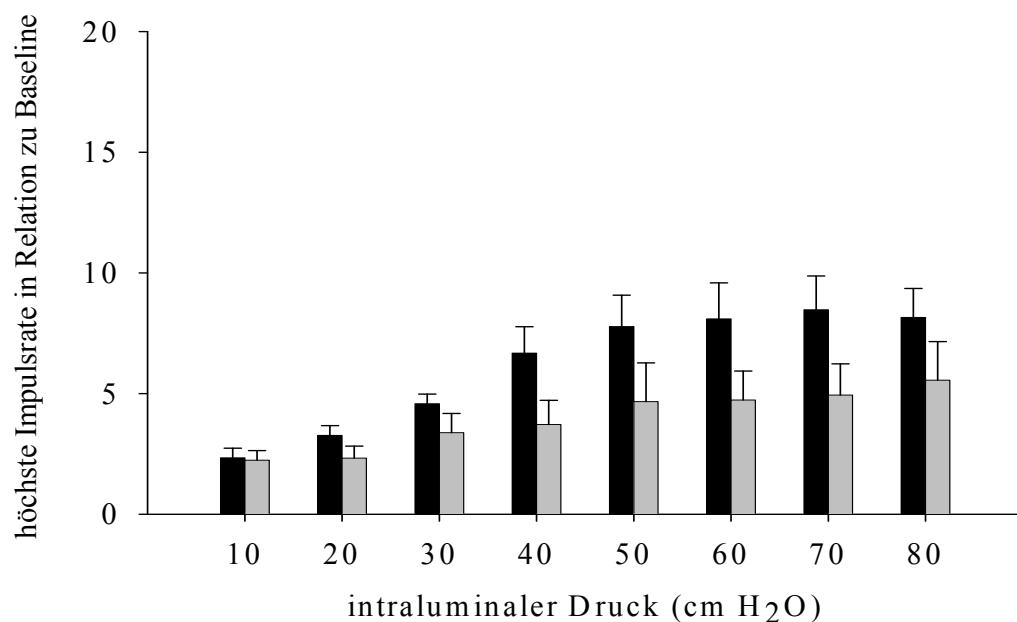
■ Shamtiere; ■ Ileustiere; MW ± SEM; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 6$ .

Innerhalb der 9h Versuchsgruppen wurde im Verlauf der Rampendistension kein statistisch signifikanter Unterschied der afferenten nervalen Impulsrate zwischen den Sham- und Ileusgruppen bei allen Drucken beobachtet (siehe **Abb. 13**).

Eine ähnliche Situation lag für die 24h Versuchsgruppen vor, jedoch war die Reizantwort nach Rampendistension insgesamt schwächer als diese in den 3h und 9h Versuchsgruppen (siehe **Abb. 14**).

Zusammengefasst konnte es im Experiment aufgewiesen werden, dass sich die maximal erreichte Impulsrate von der Operationszeit abhängig war. In der 3h Shamgruppe ergab die höchste Anstiegsrate der Impulsrate von  $14,2 \pm 1,7$ , während der niedrigste Wert von  $4,8 \pm 0,4$  in der 24h Ileusgruppe aufgefunden wurde (siehe **Abb. 12 – Abb. 14**).

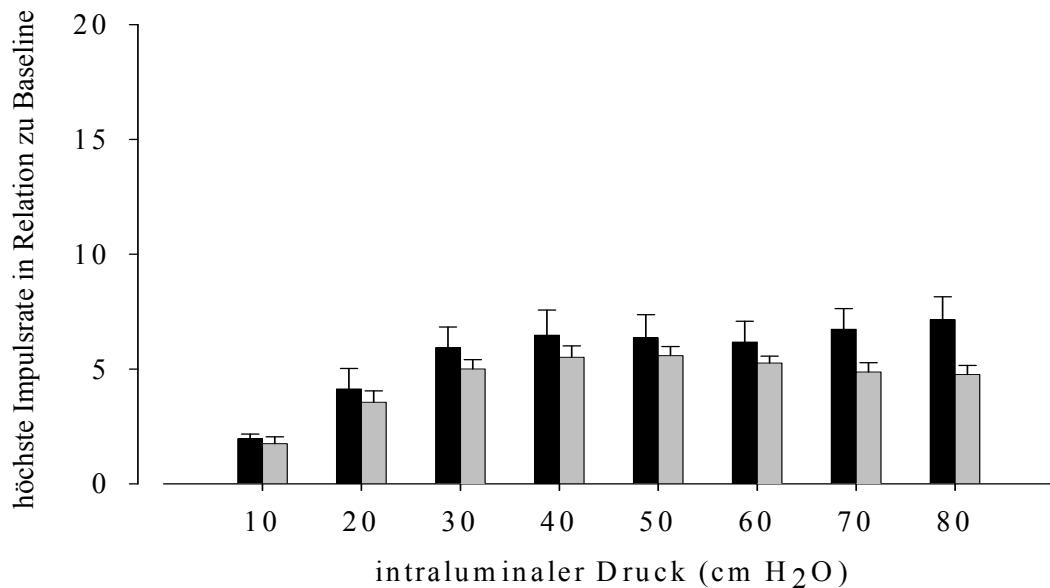
## 9h Gruppe



**Abb. 13** Normalisierte Anstiegsrate der afferenten nervalen Impulsraten während der Rampendistension innerhalb der 9h Gruppen.

■ Shamtiere; ■ Ileustiere; MW ± SEM; n = 6.

## 24h Gruppe



**Abb. 14** Normalisierte Anstiegsrate der afferenten nervalen Impulsraten während der Rampendistension innerhalb der 24h Gruppen.

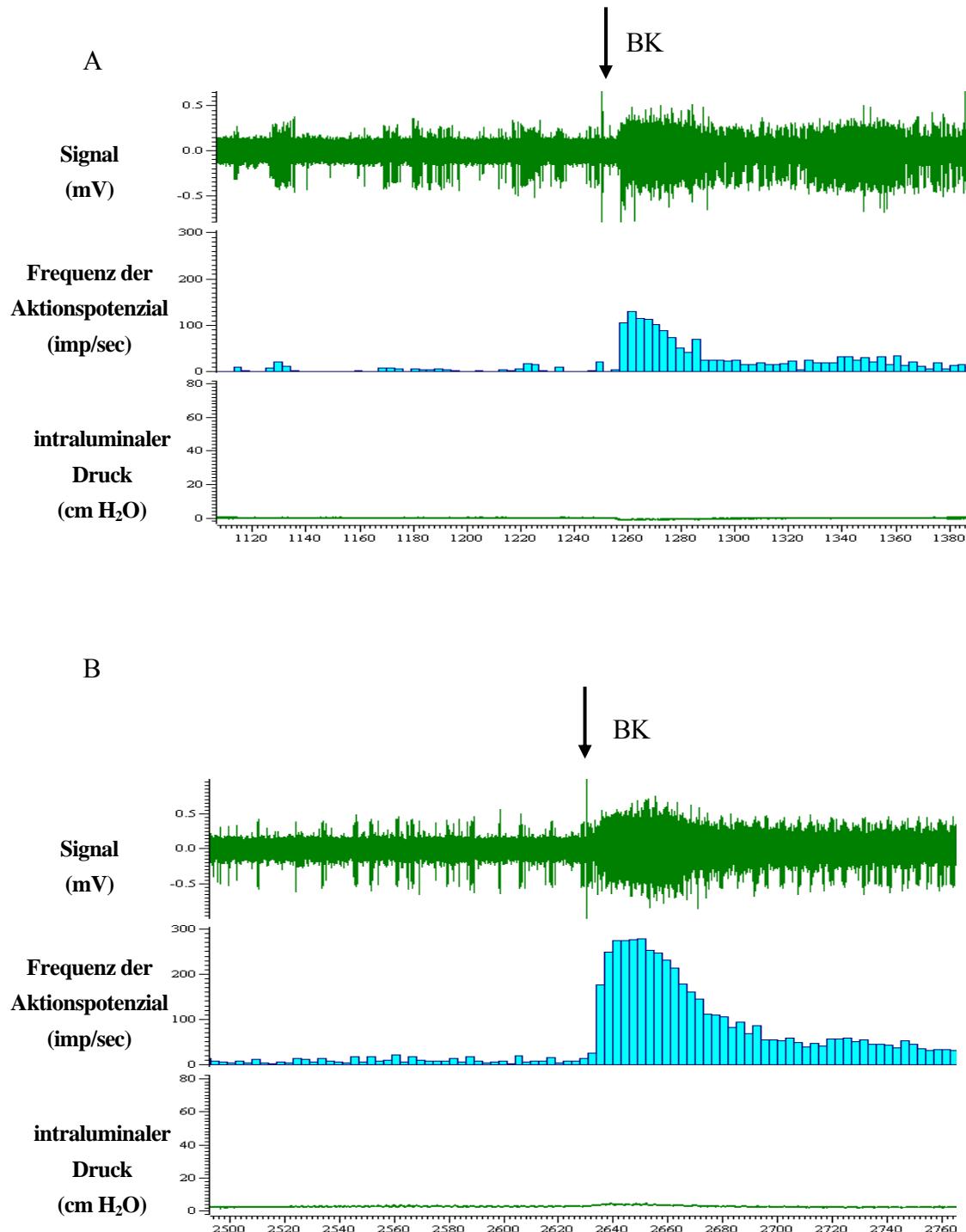
■ Shamiere; ■ Ileustiere; MW ± SEM; n = 6.

### 3.3.3. Intestinale afferente Nervenaktivität nach Bradykinin

Die chemische Stimulation mittels serosaler Applikation von 0,5 µM Bradykinin führte zu einer massiven Reizantwort der untersuchten mesenterialen afferenten Nerven (siehe **Abb. 15**). Die erreichten Impulsraten in den einzelnen Versuchsgruppen werden nun im Folgenden dargestellt (siehe **Tab. 12**).

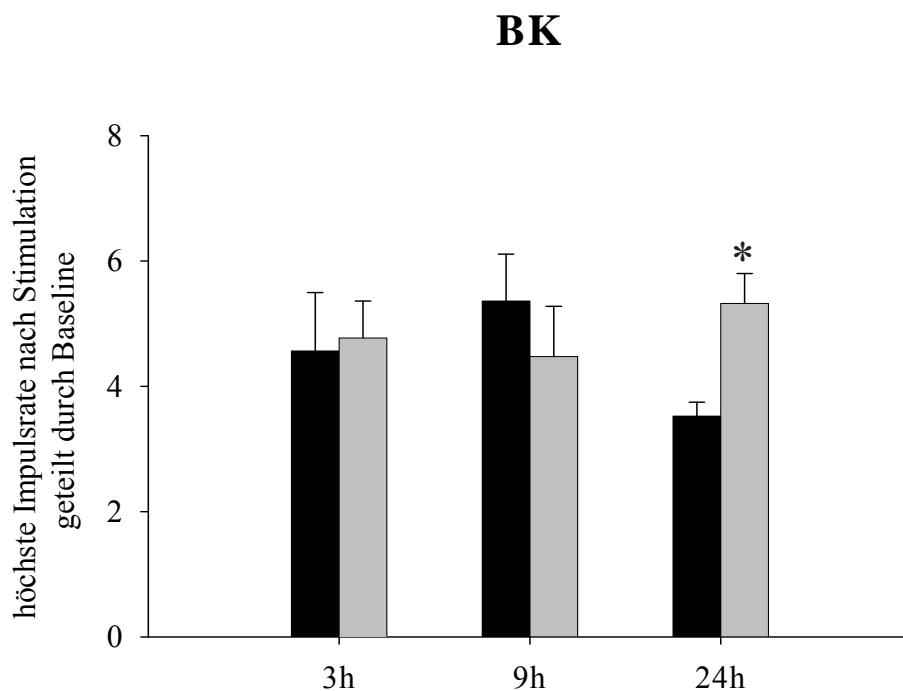
**Tab. 12** Nervenfaseraktivität (imp/sec) 120s nach Stimulation mit Bradykinin. MW ± SEM; n = 6.

	3h	9h	24h
Sham	26,3 ± 3,9	26,2 ± 3,6	42,1 ± 2,1
Ileus	17,0 ± 2,5	15,5 ± 2,8	32,0 ± 3,8



**Abb. 15** Repräsentative Aufnahmen der afferenten Nervenfaserableitung vor und nach der zweiten chemischen Stimulation mit BK. Abbildung A stellt die Impulsrate eines Segmentes der 24h Shamgruppe dar. Abbildung B zeigt die Impulsrate eines Segmentes der 24h Ileusgruppe.

Nach Normalisierung der Baseline zeigten sich hier ähnliche Ergebnisse wie nach der ersten Stimulation mit 5-HT. Es wurde kein Unterschied der nervalen Impulsrate in den 3h sowie 9h Versuchsgruppen zwischen den Sham und Ileus festgestellt. In der 24h Ileusgruppe wurde dagegen gezeigt, dass die afferenten Nerven viel mehr auf die Stimulation reagierten als die Nerven aus der 24h Shamgruppe. Die maximale Impulsrate in Relation zur Baseline (normalisierte Anstiegsrate) in der Ileusgruppe ergab hier  $5,3 \pm 0,5$ , während der Wert ihrer Kontrollgruppe nur  $3,5 \pm 0,2$  erreicht wurde. Damit konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Faktoren bewiesen werden ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 16** Normalisierte Anstiegsrate der afferenten nervalen Impulsrate nach Stimulation mittels BK ( $0,5 \mu\text{M}$ ). ■ Shamtiere; □ Ileustiere; MW  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

Die normalisierte Anstiegsrate der afferenten Nervenfaseraktivität nach Gabe von Bradykinin in den verschiedenen Untergruppen wird nun in **Tab. 13** dargestellt. Die gesamten Ergebnisse nach dem letzten chemischen Reiz werden nun als Histogramm nachfolgend gegeben (siehe **Abb. 16**).

**Tab. 13** Normalisierte Anstiegsrate der nervalen Impulsrate nach Stimulation mit BK.

Darstellung als MW  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

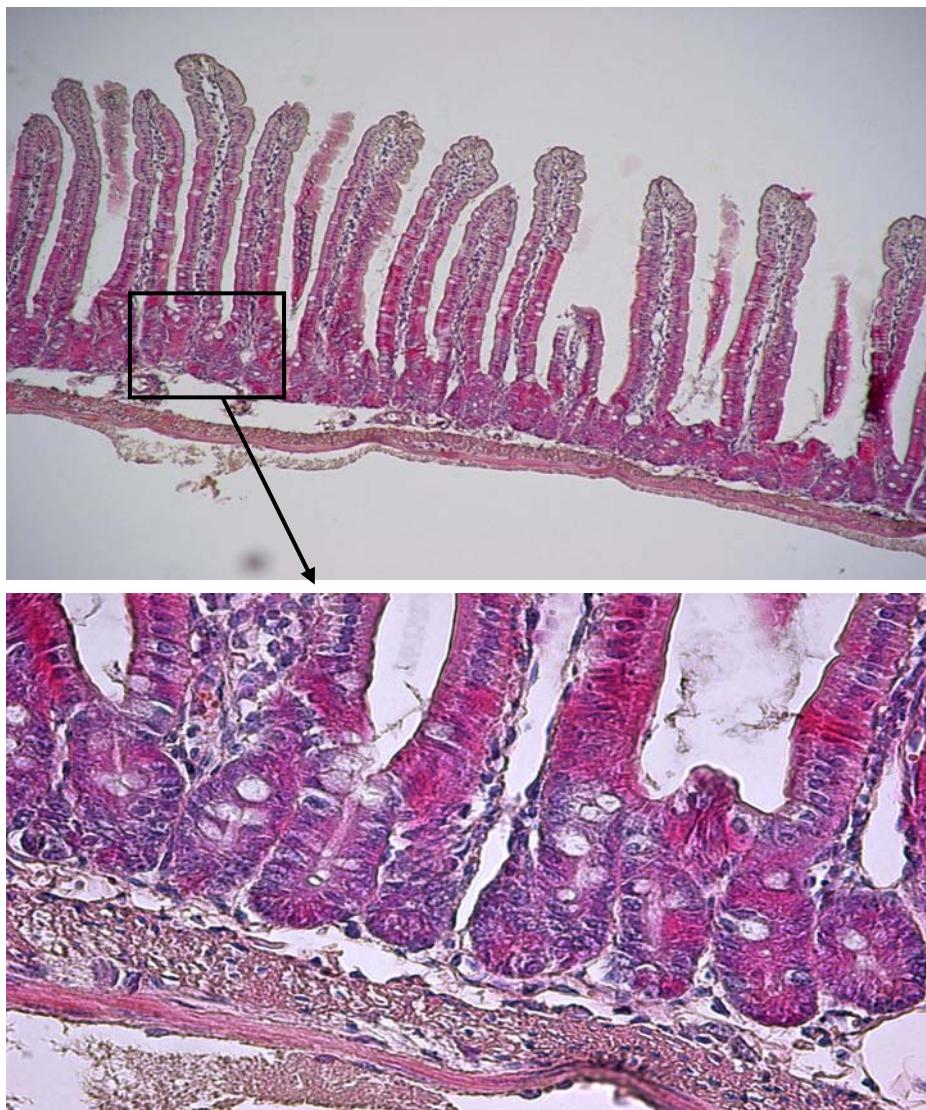
	3h	9h	24h
Sham	$4,6 \pm 0,9$	$5,4 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,2$
Ileus	$4,8 \pm 0,6$	$4,5 \pm 0,8$	$5,3 \pm 0,5 *$

### 3.4. Histologische Auswertung mittels HE-Färbung

Zur Auswertung der HE-Präparaten der untersuchten Darmabschnitte wurden morphologische Veränderungen des Epitheliums sowie Infiltrationen von Leukozyten bewertet und nach Hausmann' Score berechnet.

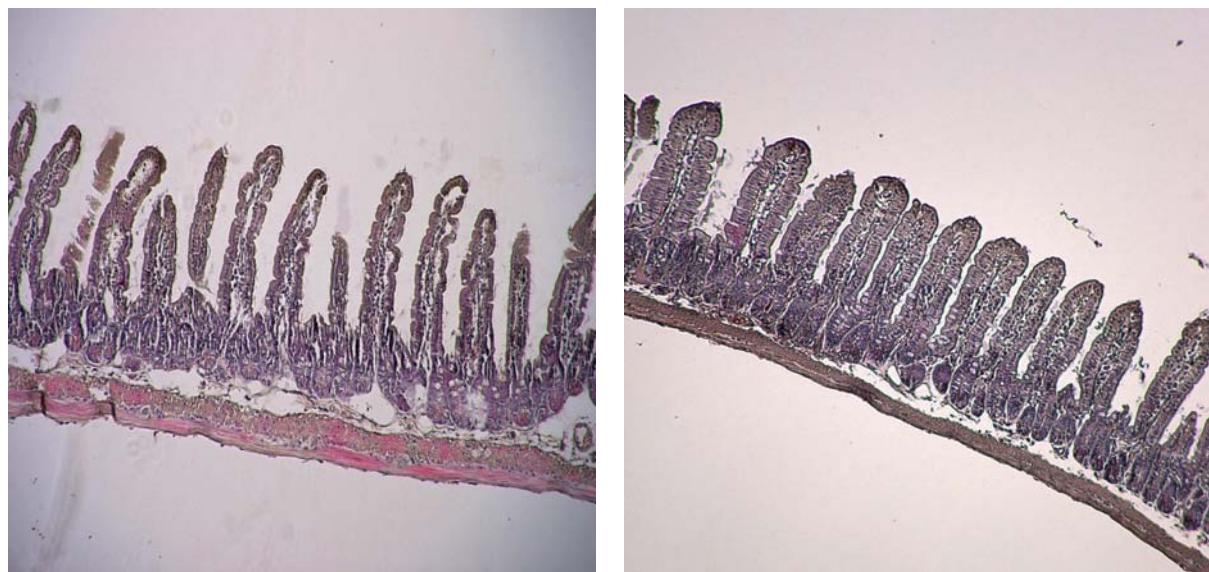
HE-Präparaten aus der 3h Ileus Gruppe zeigten eine unauffällige Morphologie mit gesunden Zotten, Krypten, sowie normalem Zotten-Krpten-Verhältnis. Dabei wurde kein Becherzellverlust beziehungsweise Kryptenverlust gezeigt. Auf einigen Präparaten zeigten sich vereinzelte Leukozyteninfiltrationen um die Kryptenbasis (siehe Abb. 17). Der mikroskopische Score in dieser Gruppe betrug  $0,6 \pm 0,3$  (MW  $\pm$  SEM). Sehr ähnliche morphologische Veränderungen wurden aus den Darmabschnitten in der 3h Shamgruppe ermittelt mit der gesamten Scoresumme von  $0,5 \pm 0,3$ . Es bestand somit keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (siehe Tab. 14 / Abb. 21).

Bei der Auswertung der 9h Ileus Darmsegmente wurde beobachtet, dass sich die Zottenarchitektur veränderte. Die Zotten waren auf allen untersuchten Präparaten verdünnt, vermindert und deformiert. In großen Arealen wurde Becherzellverlust beobachtet, vereinzelt sogar Kryptenverlust mit destruktiver, nicht sicher erkennbarer Kryptenstruktur. Leichte Zottenatrophie sowie Schleimhauterosionen waren ebenfalls zu sehen. Um die Kryptenbasis reicherten neutrophile Granulozyten an bis zur Lamina muscularis mucosae, aber sie war jedoch nicht überschritten. Die Lamina submucosae war auf den meisten Präparaten verdichtet (siehe Abb. 18).



**Abb. 17** HE-Präparate der 3h Ileusgruppe (Oben: 10fach vergrößert; Unten: 40fach vergrößert; Querschnitt). Erkennbar ist normale Kryptenarchitektur. Es sind kaum Apoptosen und kein signifikantes Infiltrat in der Mucosa oder Submucosa vorhanden.

Der mikroskopische Score in dieser Gruppe betrug  $3,2 \pm 0,8$ , und damit höher als dieser in der 3h Ileus Gruppe. Es wurde beobachtet, dass die Darmsegmente aus der 9h Kontrollgruppe eine normale Morphologie zeigten. Sehr wenige Leukozyten infiltrierten die Kryptenbasis (jedoch sichtbar mehr als diese in der 3h Kontrollgruppe) und die Mukosa haftete fest an der Submukosa. Es wurde eine Scoresumme von  $0,6 \pm 0,3$  ermittelt, sodass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen 9h Ileus und Sham Gruppe bestand ( $p < 0,05$ ) (siehe **Tab. 14 / Abb. 21**).

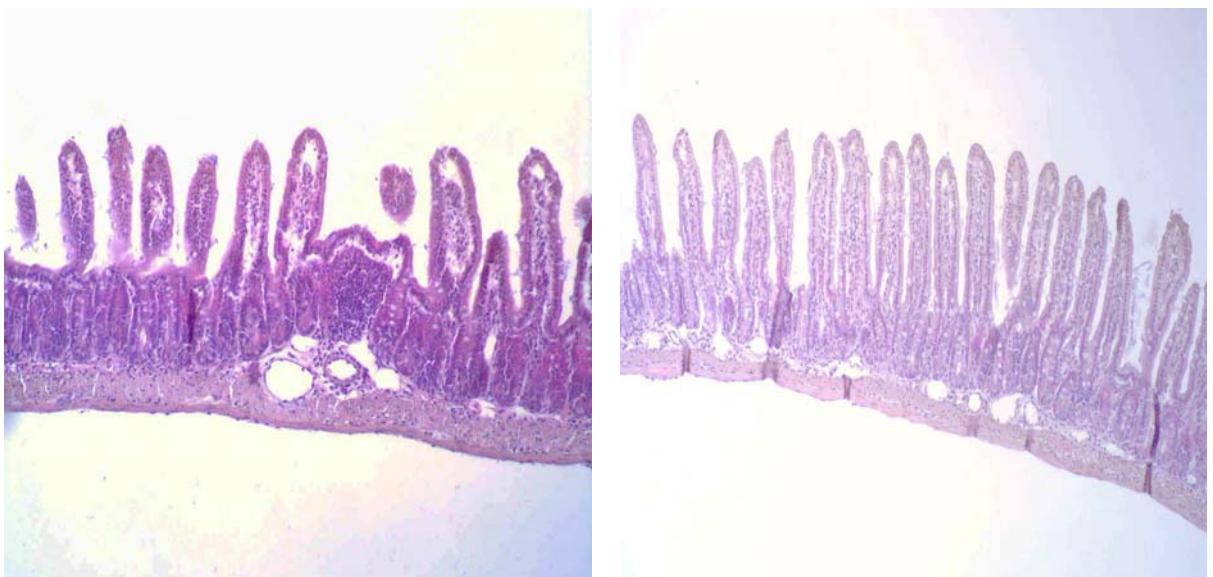


**Abb. 18** HE-Präparate der 9h Versuchsgruppe (Links: 9h Ileusdarm, 10fach vergrößert; Rechts: 9h Shamdarm 10fach vergrößert; Querschnitt). Im Vergleich zu dem 9h Kontrolldarm zeigen sich hier verdünnte Zottenstruktur, Becherzellverlust, Kryptendestruktion sowie teilweise Ablösung der Mukosa von der Tunica Muscularis des Darms.



**Abb. 19** Repräsentative histologische Darstellung bei einem 24h Ileusdarm (HE, Querschnitt; 10fach vergrößert). Deutliches Infiltrat der Mucosa, Submucosa sowie T. muscularis mit neutrophilen Granulozyten. Zottenspitzenödem (rote Pfeil), gestörte Kryptenarchitektur sowie erodierte Schleimhaut können gleichzeitig beobachtet werden.

24 Stunden nach der mechanischen Obstruktion wurde beobachtet, dass das Darmsegment proximal der Ligatur makroskopisch dilatiert war (siehe **Abb. 8C**); die Darmwand war verdünnt und hat ihre Elastizität verloren. Histologisch mittels HE-Färbung war erkennbar, dass die Zottenstruktur des obstruierten Darms prall, abgeflacht, sowie an manchen Stellen atrophiert und die Schleimhaut teilweise erodiert war. Die Mucosa war dabei deutlich mit neutrophilen Granulozyten infiltriert; auf allen Präparaten war die Lamina submucosa sowie kleine Gefäße auch betroffen bis sogar zur Tunica muscularis externa (siehe **Abb. 19**).

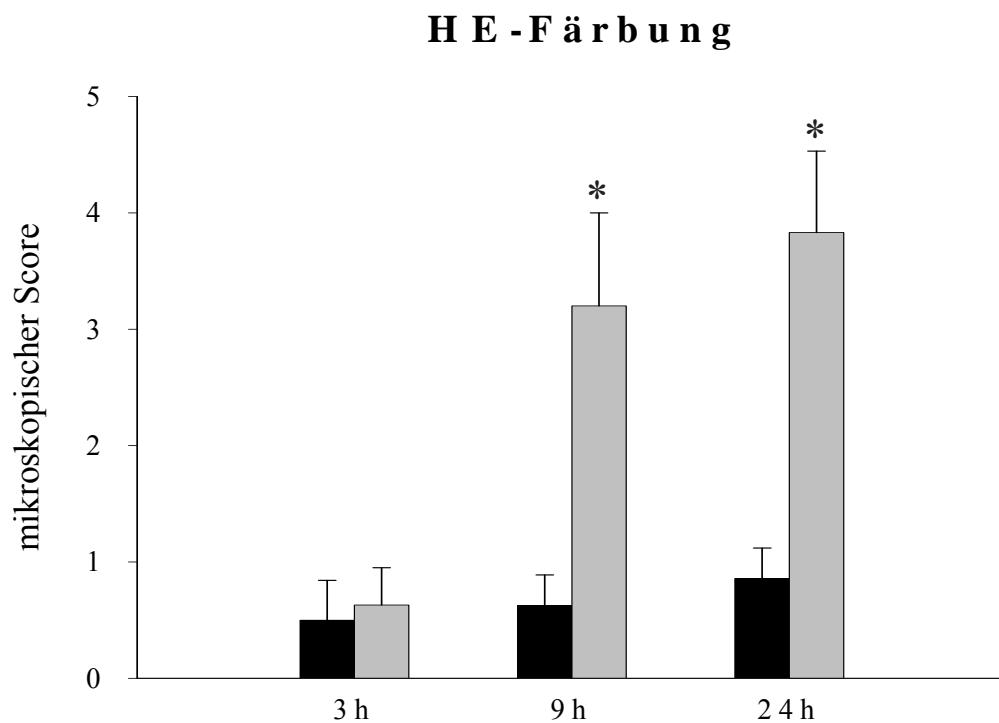


**Abb. 20** Repräsentative Präparate der 24h Ileusgruppe sowie 24h Shamgruppe (Links: 24h Ileusdarm, 10fach vergrößert; Rechts: 24h Shamdarm 10fach vergrößert.). Der 24h Shamdarm zeigt eine normale Verteilung der Becherzellen und Kryptenarchitektur; es sind nur minimale Infiltrate in der Mucosa oder Submucosa vorhanden.

Bei der Auswertung des mikroskopischen Scores in dieser Gruppe wurde MW  $\pm$  SEM mit  $3,8 \pm 0,7$  ermittelt, höher als dies in der 9h Ileusgruppe. Dagegen zeigten die Präparate in der 24 Shamgruppe nur minimale Veränderungen mit leicht entzündlichem Infiltrat um die Kryptbasis. Becherzellenverlust, Zottenödem sowie Kryptendestruktion konnten auf keinem Präparat beobachtet werden (siehe **Abb. 20 / Abb. 21 / Tab. 14**).

**Tab. 14** Summe des mikroskopischen Scores zur Evaluation der Entzündungsreaktion (=E+I).Darstellung als MW  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ , n = 6.

	3h	9h	24h
Sham	0,5 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,3
Ileus	0,6 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,8 *	3,8 $\pm$ 0,7 *

**Abb. 21** Histogrammatische Darstellung des Entzündungsgrades aller untersuchten Darmproben

anhand des Hausmann's mikroskopischen Scores.

■ Shamtiere; ■ Ileustiere; MW  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ , n = 6.

### 3.5. Myeloperoxidase-Färbung

In jeder Versuchsgruppe wurde die Anzahl der MPO positiven Zellen in der Tunica muscularis ermittelt.

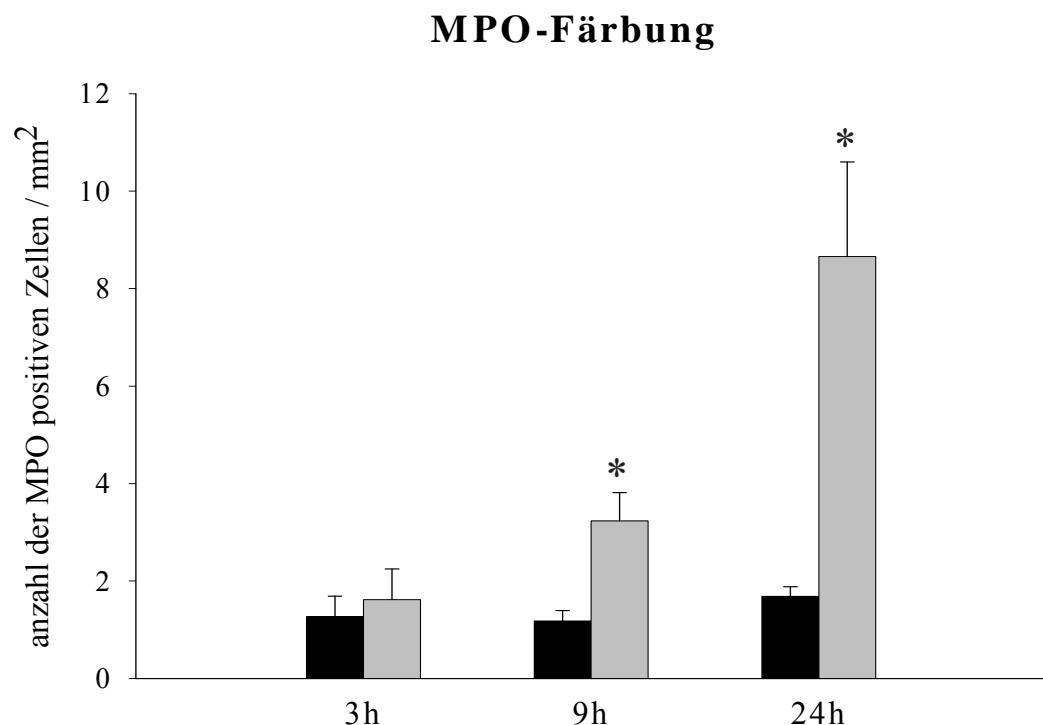
In der 3h Ileusgruppe ergab die Auswertung (Darmproben proximal der Ligatur) eine Zellzahl von  $1,6 \pm 0,6 / \text{mm}^2$  (MW  $\pm$  SEM). Die Darmsegmente aus der 3h Shamgruppe wurden bei der Untersuchung ebenfalls von Myeloperoxidase positiven Zellen infiltriert, wobei die Anzahl dieser Zellen zugunsten der Ileusgruppe fiel und in der Shamgruppe insgesamt  $1,3 \pm 0,4 / \text{mm}^2$  betrug. Ein Unterschied hinsichtlich der Entzündungsreaktion zwischen den beiden Gruppen lag zu diesem Untersuchungspunkt noch nicht vor (siehe **Tab. 15 / Abb. 22 / Abb. 23**).

Im Lauf der Ileuszeit sind die MPO positiven Zellen in Ileusdarm kontinuierlich nachgewachsen, während sie in Shamdarm relativ konstant auf niedrigem Niveau blieben. Die Anzahl dieser Zellen betrug in der 9h Ileusgruppe  $3,2 \pm 0,6 / \text{mm}^2$ ; in der 24h Ileusgruppe vermehrte sich mehr als doppelt und betrug  $8,7 \pm 1,9 / \text{mm}^2$ . Es konnte somit in den 9h und 24h Versuchsgruppen einen statistisch signifikanten Unterschied in Bezug auf der Entzündungsgrade zwischen Ileus- und Shamdarm festgestellt werden ( $p < 0,05$ ) (siehe **Tab. 15 / Abb. 22 / Abb. 23**).

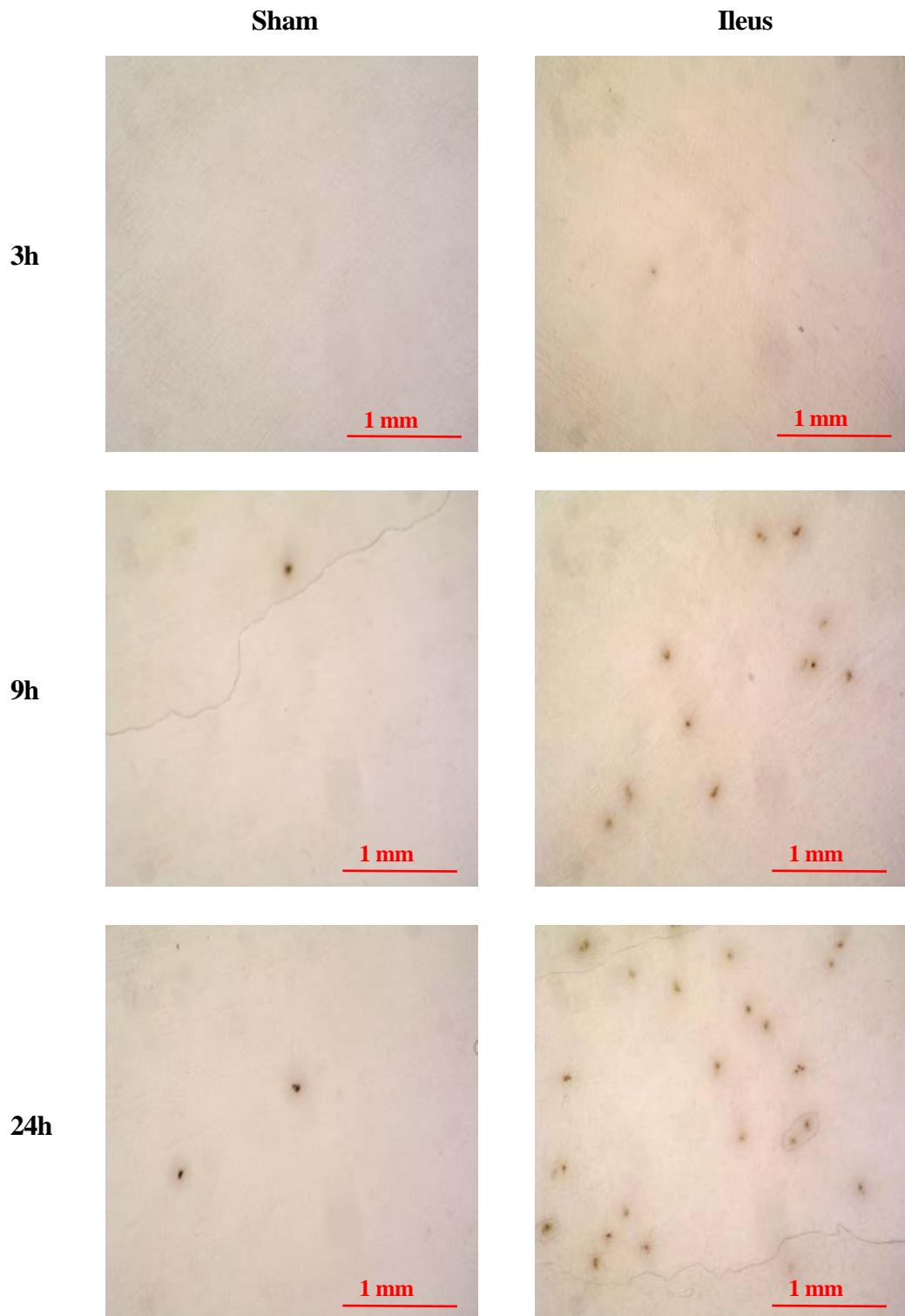
**Tab. 15** Anzahl der MPO positiven Zellen in der Tunica muscularis (pro mm<sup>2</sup>).

Darstellung als MW ± SEM; \*p &lt; 0,05, n = 4.

	3h	9h	24h
Sham	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,2
Ileus	1,6 ± 0,6	3,2 ± 0,6 *	8,7 ± 1,9 *

**Abb. 22** Anzahl der MPO positiven Zellen in der Tunica muscularis des Darms.

■ Shamtiere; ■ Ileustiere; MW ± SEM; \*p < 0,05, n = 4.



**Abb. 23** Repräsentative lichtmikroskopische Ausschnitte der Tunica muscularis des Darms nach immunhistochemischer MPO-Färbung. Sehr wenige Anzahl der MPO positiven Zellen stellen sich auf den Schnitten der Shamgruppe dar (linke Reihe), während sie auf den Schnitten der Ileusgruppe im Lauf der Ileuszeit stetig steigern (rechte Reihe).

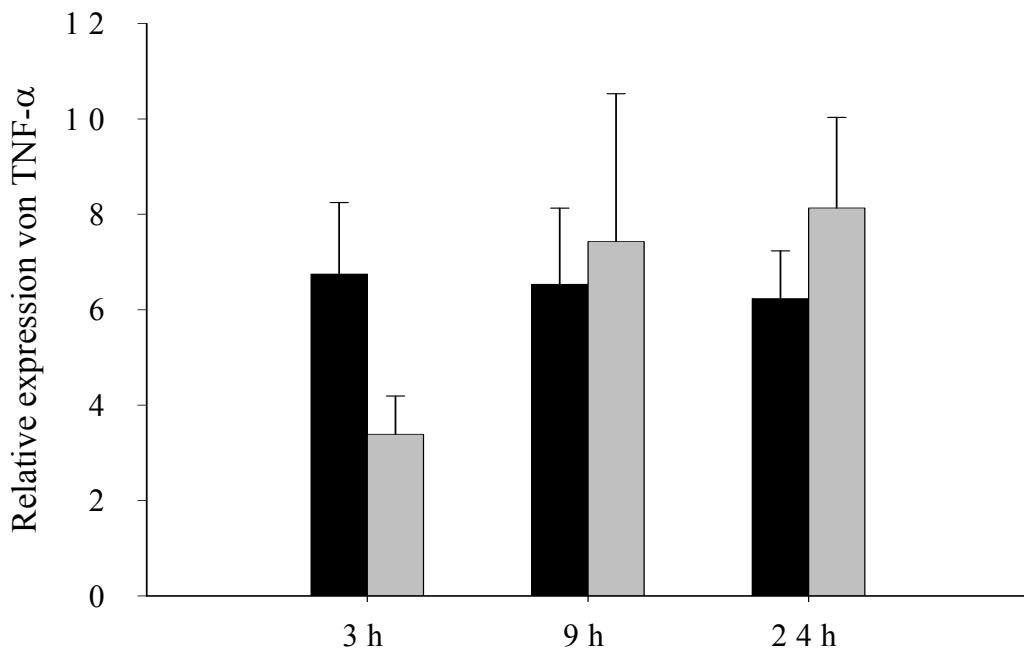
### 3.6. Zytokin-Analyse

#### – TNF- $\alpha$

Die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  sowie IL-6 in der Darmwand wurde im Versuch mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Die Ergebnisse des TNF- $\alpha$  zeigten, dass diese Werte in allen Shamgruppen sehr stabil bei ca. 6,5 blieben, dagegen steigerte die Genexpression in den Ileusgruppen stetig an. In der 3h Ileusgruppe wurde  $3,4 \pm 0,8$  von mRNA-Expression ermittelt, während diese in der 9h Ileusgruppe von  $7,4 \pm 3,1$  und in der 24h Ileusgruppe von  $8,1 \pm 1,9$  kalkuliert wurden. Es besteht sodass einen statistischen signifikanten Unterschied zwischen 3h und 24h Ileusgruppen. Allerdings wurde kein Unterschied zwischen Shamgruppen und ihren entsprechenden Ileusgruppen beobachtet (siehe **Tab. 16 / Abb. 24**).

**Tab. 16** TNF- $\alpha$  Expression in der Darmwand. Darstellung als MW  $\pm$  SEM. n = 6.

	3h	9h	24h
Sham	$6,7 \pm 1,5$	$6,5 \pm 1,6$	$6,2 \pm 1,0$
Ileus	$3,4 \pm 0,8$	$7,4 \pm 3,1$	$8,1 \pm 1,9$

**R T -P C R : T N F - $\alpha$** 

**Abb. 24** Histogrammatische Darstellung der TNF- $\alpha$  Expression in der Darmwand.

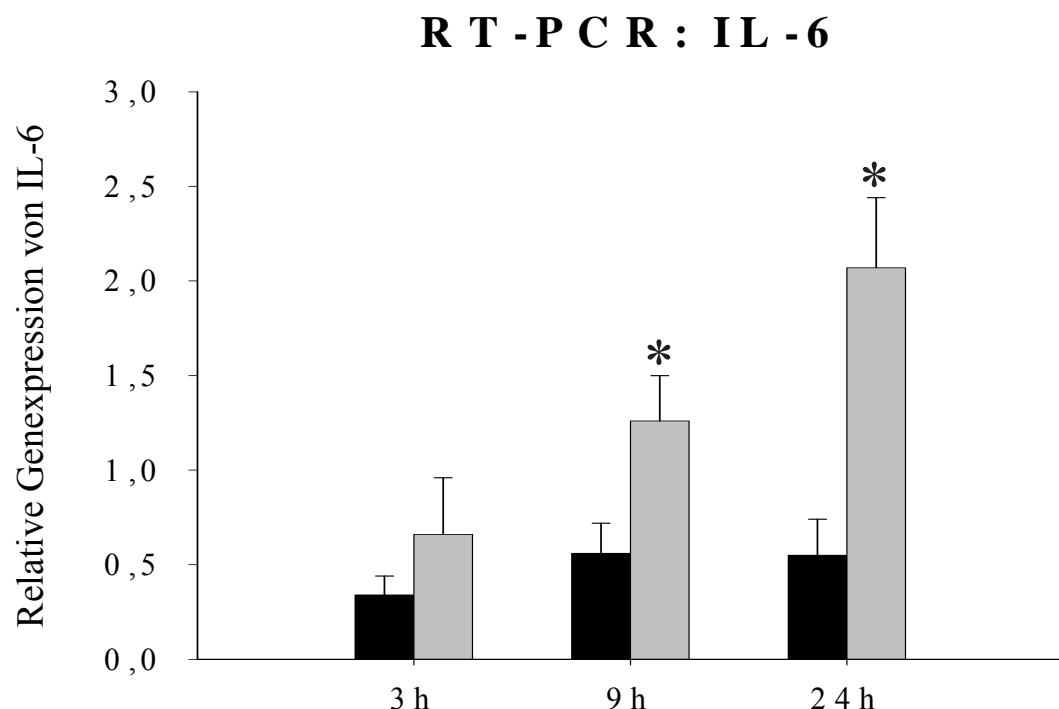
■ Shamtiere; ■ Ileustiere; MW  $\pm$  SEM; n = 6.

### – IL-6

Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls bei der relativen Genexpression von IL-6 beobachtet. Während die Werte in allen Shamgruppen relativ konstant bei 0,5 blieben, steigerten diese in den Ileusgruppen im Lauf der Ileuszeit kontinuierlich an. In der 3h Ileusgruppe wurde nur minimale mRNA des IL-6 exprimiert ( $0,7 \pm 0,3$ ), dagegen betrugen diese in der 24h Ileusgruppe von  $2,1 \pm 0,4$ , also was signifikant höher war. Ein statistischer Unterschied wurde zum Zeitpunkt 9h sowie 24 nach der jeweiligen Operation beobachtet ( $p < 0,05$ ) (siehe **Tab. 17 / Abb. 25**).

**Tab. 17** IL-6 Expression in der Darmwand. Darstellung als MW  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ , n = 6.

	3h	9h	24h
Sham	0,3 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,2
Ileus	0,7 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,2*	2,1 $\pm$ 0,4*

**Abb. 25** Histogrammatische Darstellung der IL-6 Expression in der Darmwand.

■ Shamtiere; ■ Ileustiere; MW  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ , n = 6.

## 4. Diskussion

### 4.1. Diskussion der Methoden des Versuchs

#### 4.1.1. Tiermodell

In der Vergangenheit wurden sehr unterschiedliche Tiermodelle zur Untersuchung des mechanischen Ileus entwickelt, u. a. mit Hunden<sup>(65,66,67,68)</sup>, Ratten<sup>(69,70,71,72)</sup>, oder Kaninchen<sup>(73,74)</sup>. In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit zur Untersuchung der Pathogenese während des mechanischen Ileus wurde eine neu entwickelte Operationsmethode bei Mäusen eingesetzt, durch welche eine mechanische Obstruktion im Dünndarm erreicht wurde, ohne dass dabei die mesenteriale Durchblutung unterbrochen wurde. Die Anwendung dieser Operationstechnik basiert auf den Forschungsergebnissen von Brolin und Yildiz, in welchen sehr ähnliches Operationsverfahren bei Hunden und Ratten durchgeführt wurde.

In einer Studie vom De Winter wurde gezeigt, dass allein eine Mini-laparotomie mit Durchtrennung des Peritoneums eines vorübergehenden postoperativen Ileus mit Motilitätsstörung induzieren kann<sup>(75)</sup>. Je stärker der Darm mechanisch manipuliert wird, desto schwerer wird eine Transitstörung postoperativ beobachtet. Um den Einfluss eines POI zu minimieren, wurden die Därme in den Kontrollgruppen der vorliegenden Arbeit äußerst schonend behandelt, bis auf der Platzierung der Ligatur. Darüber hinaus wird es möglich, gezielt den Effekt des mechanischen Ileus auf den Darm zu untersuchen, wie er auf die afferenten Nerven, die makroskopische und mikroskopische Morphologie des Darms sowie das intestinale Immunsystem bewirkt. Wenngleich somit ein gewisses Element des postoperativen Ileus nicht ganz zu vermeiden ist, wurde im vorliegenden Modell dennoch alles daran gesetzt, diesen Einfluss zu minimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle untersuchten Mäuse zur Anästhesie vor und während den Operationen ca. 10 Minuten mit inhalativem Isofluran behandelt, das potenziell auch eine Passagestörung des Darms auslösen konnte. Allerdings zeigte es in

einer Studie, dass niedrige Dosis von Isofluran die gastrointestinale Motilität nicht beeinflusst<sup>(76)</sup>. Nur wenn eine Dosierung über 2% wird erst die Motilitätsstörung signifikant beobachtet<sup>(76)</sup>, sodass die Wirkung des Anästhetikums für die Ileusentwicklung in der Arbeit ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren wurden alle Gruppen gleich behandelt, so dass eine Vergleichbarkeit gewährleistet war.

#### **4.1.2. Grundlagen des intestinalen Nervensystems des Dünndarms**

Der Dünndarm wird von einem intrinsischen Nervensystem (dem enterischen Nervensystem) und einem extrinsischen Nervensystem (dem autonomen Nervensystem: Parasympathikus, Sympathikus) innerviert<sup>(77, 78)</sup>. Seine Motilität und verschiedenen Funktionen werden durch Interaktion dieser Nervensysteme erreicht.

Das intrinsische Nervensystem steuert mit den Plexus submucosus und myentericus die Sekretion, Absorption sowie Durchblutung in der Dünndarmschleimhaut, und weiterhin bewirkt es mittels Peristaltik Durchmischung und Weitertransport des Chymus. Dabei kann das intrinsische Nervensystem allein peristaltische Kontraktionen ermöglichen und koordinieren<sup>(79,80)</sup>. Außerdem moduliert es Immunreaktionen sowie endokrine Funktionen im enteralen System und ist für die Regulation des Ionentransportes verantwortlich. Es ist ein eigenständiges Nervensystem und übt ihre Funktionen unabhängig von dem zentralen Nervensystem (ZNS) aus, wird deswegen auch als „little brain“ des GI-Traktes bezeichnet<sup>(81)</sup>.

Das extrinsische Nervensystem wird von der splanchnischen (spinalen) und der vagal-sakralen Nervenzellen und Fasern zusammengesetzt. Die splanchnischen Nervenfasern gehören zum sympathischen und die vagal-sakralen Nervenfasern zum parasympathischen Anteil des autonomen Nervensystems (ANS). Der proximale Ösophagus und der externe Analosphinkter enthalten hauptsächlich quergestreifte Muskulatur, werden nur sehr wenig von den intrinsischen Nervenfasern innerviert<sup>(82)</sup>. Ihre Motilität wird hier fast ausschließlich durch das extrinsische Nervensystem kontrolliert. Im Gegensatz dazu besteht der Rest des GI-Traktes aus glatter Muskulatur und wird

vorwiegend von den intrinsischen Nervenfasern in der Darmwand innerviert. Das extrinsische Nervensystem zeigt bei der Darmbewegung sowohl hemmende Wirkung durch den Sympathikus als auch stimulierende Wirkung durch den Parasympathikus. Das enterische Nervensystem ist über das autonome Nervensystem (Sympathicus und Parasympathicus) mit dem Gehirn (zentrales Nervensystem) verbunden. Diese Verbindung wird in diesem Zusammenhang auch als “extrinsische Innervation“ bezeichnet.

In diesem Versuch wurden die intestinalen afferenten Nerven aus dem Teil des extrinsischen Nervensystems untersucht.

#### **4.1.3. Elektrophysiologie**

Zur Charakterisierung der afferenten Nervenfaseraktivität beim mechanischen Ileus wurden in dieser Arbeit die afferenten Nervenfasern *in vitro* mit chemischen sowie mechanischen Stimuli gereizt und ihr Verhalten analysiert. Es existieren bisher keine Daten, die diese pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen des mechanischen Ileus beschrieben werden.

Grundsätzlich werden die intestinalen Nervenfasern in drei Klassen eingeteilt, welche Informationen vom Intestinum ins ZNS weiterleiten. Hierbei handelt es sich um vagale<sup>(83)</sup>, spinale<sup>(84)</sup> und intestinofugale afferente Neurone (IFANs)<sup>(85)</sup>. In Studien wurde es gezeigt, dass vagale und spinale Neurone auf verschiedene Stimulationsmechanismen reagiert und sie in dieser Arbeit hauptsächlich untersucht wurden, während die IFANs nicht berücksichtigt wurde. Die IFANs befinden sich im Plexus myentericus, die Informationen vom Darm in die prävertebralen Ganglien weiterleiten. Da die Anzahl dieser Neurone relativ sehr gering ist und darüber hinaus sie keine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des mechanischen Ileus spielen könnten, werden sie in dieser Arbeit nicht untersucht.

Zur Untersuchung der vagalen sowie spinalen afferenten Nervenfasern mittels chemischer Stimuli wurden in dieser Arbeit 5-hydroxytryptamine sowie Bradykinin als Standard

Anwendung festgelegt, wie bereits in vielen Studien bei der Untersuchung von POI eingesetzt und publiziert wurden<sup>(55,86,87)</sup>.

5-hydroxytryptamine (5-HT), auch Serotonin genannt, ist ein Neurotransmitter, der im Magen-Darm-Trakt hauptsächlich von den enterochromaffinen Zellen freigesetzt wird, und ihre Wirkung vorwiegend durch die Serotonin-Rezeptoren 5-HT<sub>3</sub> und 5-HT<sub>4</sub> vermittelt wird<sup>( 88 )</sup>. Bei Erhöhung des intraluminalen Drucks werden die enterochromaffinen Zellen aktiviert und unmittelbar danach Serotonin freigesetzt, das einerseits die Motoneurone des enterischen Nervensystems erregt und dadurch die Peristaltik des Darms fördert<sup>(89,90)</sup>; Andererseits führt freigesetztes Serotonin nach einer Signalweiterleitung unter Beteiligung des Nervus vagus in Form eines Reflexes auch zu Übelkeit und Erbrechen<sup>(91)</sup>. Nach serosaler Applikation vom exogenen 5-HT in bestimmter Konzentration werden die vagalen Afferenzen durch Aktivierung der Serotonin-Rezeptoren 5-HT<sub>3</sub> stimuliert, sodass ihre Sensibilität zu dem Stimulator unter verschiedenen Bedingungen separat untersucht werden kann<sup>(92,93)</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die vagale afferente Sensibilität beim mechanischen Ileus *in vitro* untersucht, in dem 50 µM 5-HT direkt ins Organbad gegeben wurde, nachdem eine Stabilisierungsphase der Nervenfaseraktivität für mindestens 20 Minuten erreicht worden war (siehe Methoden). Die verwendete Dosis wurde durch sorgfältig durchgeführte Dosis-Wirkungs-Versuche bestimmt, die 50 µM als moderate submaximale Dosis ergeben hatten.

Bradykinin ist einer der bekanntesten Entzündungs- sowie Schmerzmediatoren, das selektiv die in den Nn. splanchnici verlaufenden viszeralen Afferenzen aktiviert<sup>(94)</sup>, die Signale weiter ins Rückenmark projizieren. Diese spinalen primären Afferenzen bilden außerdem Synapsen mit Neuronen des sympathischen Nervensystems aus<sup>(95)</sup>. Die Aktivierung der sympathischen Efferenzen führt reflexorisch zur Hemmung der gastrointestinalen Motilität<sup>(96)</sup>. Grundy und Mitarbeiter haben beschrieben, dass die Sensibilität der mesenterialen afferenten Nerven nach Exposition von Bradykinin vorwiegend durch die spinalen Afferenzen vermittelt wird<sup>(97,98)</sup>. Im Gegensatz dazu zeigte es in anderen Studien, dass Bradykinin die vagalen Afferenzen ebenfalls sensibilisieren kann. Allerdings scheint

es so, dass diese Aktivierung vagaler mechanosensitiver Afferenzen durch so genannte „motor events“ verursacht wird, welche durch die Applikation von Bradykinin Peristaltik des Darm ausgelöst wird. Dazu, wie Bradykinin ausgeschüttet wird und weiterhin die spinalen Afferenzen stimuliert, existiert in der Vergangenheit nur Daten, die sich auf den POI beziehen. Im Rahmen einer mechanischen Manipulation des Darms führt es zur Degranulation der Mastzellen und zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Prostanoide und Bradykinin<sup>(99)</sup>, die unmittelbar danach auf die mesenterialen Afferenzen bewirken und sie aktivieren. Ob bei einem primär mechanischen Ileus die in der Muskularis lokalisierten Mastzellen durch irgendwelche Mechanismen ebenso aktiviert werden, bleibt bisher noch unklar.

Auf der Grundlage der oben genannten Forschungsergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit die Sensibilität der spinalen Afferenzen während des mechanischen Ileus untersucht, wobei  $0,5 \mu\text{M}$  Bradykinin als Stimulanz in diesem Experiment verwendet worden ist (siehe Methode). Betrachtet man nun die allen untersuchten Ableitungen der Nervenaktivitäten, so zeigten sich in keinem Versuch Darmbewegungen, nachdem Bradykinin appliziert worden war, sodass die dadurch möglicherweise entstehende „motor events“ als ein potenziell störender Faktor ausgeschlossen werden konnte. Man geht deswegen davon aus, dass die Untersuchungsergebnisse in dieser Arbeit nur auf die Sensibilität der spinalen Afferenzen beziehen.

Zur Charakterisierung der Sensibilität der mesenterialen afferenten Nerven wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich mechanische Stimulation mittels Darmdistension *in vitro* durchgeführt. Dabei wurde der intraluminale Druck des untersuchten Darms vom Ausgangsdruck auf  $80 \text{ mm H}_2\text{O}$  gesteigert (siehe Methode). Basiert auf den Forschungsergebnissen von Booth wird es aufgewiesen, dass bei einem niedrigen Druckniveau zwischen 0 und  $40 \text{ cm H}_2\text{O}$  nur die vagalen Afferenzen aktiviert werden, während bei einem hohen Druckniveau zwischen  $50$  und  $80 \text{ cm H}_2\text{O}$  lediglich die spinalen Afferenzen stimuliert werden<sup>(100)</sup>.

#### **4.1.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Myeloperoxidase-Färbung**

Die HE-Übersichtsfärbung in der vorliegenden Arbeit diente zur Beurteilung der Präparate und ihre Einteilung besteht in dem von Hausmann und Mitarbeitern beschriebenen mikroskopischen Score. Diese Klassifikation (siehe **Tab. 6**) ist eine neu entwickelte, in den letzten Jahren häufig verwendete Methode zur Auswertung von entzündlichen Darmpräparaten. Sie hat sich auch hierbei als zweckmäßige Methode zur Bewertung des Schädigungs- sowie Entzündungsgrades der Darmgewebe erwiesen.

Um einen weiteren Parameter für die Beurteilung der Entzündung zu bekommen, wurde immunhistochemisch eine Myeloperoxidase-Färbung durchgeführt. Das Enzym Myeloperoxidase ist insbesondere in den Granula der neutrophilen Granulozyten lokalisiert, denen bei der Infektabwehr eine Schlüsselstellung zukommt<sup>(101)</sup>. Die in dieser Arbeit eingesetzte Färbungsmethode nach Hanker und Yates zur Darstellung myelopositiver Zellpopulation in der Tunica muscularis des Darms ist ein gängiger Indikator zur Beurteilung intestinaler Entzündungen<sup>(56)</sup>, wobei vornehmlich Entzündungszellen, insbesondere neutrophile und eosinophile Granulozyten, markiert werden<sup>(102)</sup>. Sie ist außerdem sehr rasch durchführbar, bietet ein sehr niedriges falsch positives Ergebnis<sup>(56)</sup>, und eignet sich in dieser Arbeit für die Darstellung der Entzündungssituation in der Darmwand.

#### **4.1.5. Zytokin-Analyse**

TNF- $\alpha$  und IL-6 zählen zu den proinflammatorischen Zytokinen, welche von verschiedenen Zellen, vor allem jedoch von mononukleären Phagozyten bei Immunabwehr gebildet und freigesetzt werden<sup>(103)</sup>.

Der TNF- $\alpha$  ist eines der ersten überhaupt bekannten Zytokin, das überwiegend durch ubiquitär vorkommende Makrophagen produziert wird<sup>(104)</sup>. Bei akuten inflammatorischen Ereignissen wie beispielsweise dem postoperativen Ileus oder Endotoxin (LPS) induzierten Ileus wird der TNF- $\alpha$  vermehrt exprimiert und er trägt bei der

Ileusentwicklung bei<sup>(105)</sup>. Ebenfalls bei chronischen Entzündungsprozessen wie z. B. bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wurde eine erhöhte Dichte von TNF-exprimierenden Makrophagen mittels immunhistochemischer Methode dargestellt<sup>(106)</sup>.

Das Interleukin 6 ist ein Monomer mit einem molekularen Gewicht von 25 kDa. Als proinflammatorisches Zytokin wird es durch eine Vielzahl von Zellen wie aktivierte T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen produziert und es hat eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen<sup>(103)</sup>. In einer tierexperimentellen Studie wurde beschrieben, dass Manipulation des Dünndarms während einer abdominalen Operation die Induktion, Translation, Freisetzung sowie funktionelle Aktivierung von IL-6 in der Tunica muskularis initiieren konnte<sup>(107)</sup>.

Ob die beiden proinflammatorischen Zytokine auch bei der Frühphase des mechanischen Dünndarmileus beteiligt sind und eine lokale sowie systemische Entzündungsreaktion induzieren, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von der qRT-PCR Methode erfasst. Das ist eine etablierte Methode in der molekularen Diagnostik und bietet eine zuverlässige und exakte Möglichkeit zur Quantifizierung spezifischer mRNA und eignet sich somit gut für die Bestimmung der Zytokinexpression im Gewebe<sup>(108)</sup>.

## 4.2. Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1. Elektrophysiologie

Die Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass erst nach lang bestehender Obstruktion des Darms die vagalen Afferenzen vermehrt sensibilisiert werden konnten. Es war eine signifikante Erhöhung der Impulsrate nach der chemischen Stimulation mittels 5-HT in der 24h Ileusgruppe im vergleich zu der 24h Shamgruppe zu beobachten ( $p < 0,05$ ). Dagegen konnte kein Unterschied der Impulsrate zwischen den Ileusgruppen und den Kontrollgruppen in der frühen Phase des mechanischen Ileus drei oder neun Stunden nach Operationen gesehen werden. Es wird heute von der Existenz afferenter

Nervenfasern ausgegangen, die unter physiologischen Normalbedingungen nicht aktiv sind<sup>(109)</sup>. In Studien wurde es gezeigt, dass bereits drei Stunden nach dem POI die vagalen Afferenzen stimuliert werden konnten. Eine mögliche Erklärung für die unveränderten Impulsraten drei und neun Stunden nach der Induktion des mechanischen Ileus besteht darin, dass die vagalen Afferenzen viel sensibler sowie viel schneller auf den POI reagieren, während die Wirkung des mechanischen Ileus sich möglicherweise viel später entfaltet und erst dann ein stärkerer Effekt bei der Nervensensibilisierung zeigt. Es ist somit davon auszugehen, dass nur bei einer starken, lang bestehenden mechanischen Obstruktion die vagalen Afferenzen erst betroffen sind. Diese spielen in der Frühphase des mechanischen Ileus offenbar pathophysiologisch nur eine untergeordnete Rolle. Diese Annahme benötigt allerdings noch genauere Klärung durch weitere Untersuchungen.

Bei der Datenanalyse der Wirkung von Bradykinin auf die spinalen Afferenzen wurde ermittelt, dass eine signifikant unterschiedliche Nervensensibilität ebenfalls nur in der 24h Versuchsgruppe beobachtet wurde ( $p < 0,05$ ). Drei Stunden sowie neun Stunden nach einer mechanischen Darmverlegung war die afferente Nervensensibilität in den Ileusgruppen im Vergleich zu dieser in den entsprechenden Shamgruppen nicht erhöht. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse – sehr ähnlich wie der Effekt von 5-HT auf die vagalen Afferenzen – nehmen wir an, dass die spinalen Afferenzen beim mechanischen Ileus ebenso relativ spät auf chemische Stimulation reagieren. Denkbar wäre es, dass in der Frühphase des mechanischen Ileus innerhalb der ersten neun Stunden keine Bradykinin vermittelte Schmerzempfindung sowie Entzündungsreaktion vorhanden ist. Des Weiteren wäre es denkbar, dass der massiv angestiegene intraluminale Druck in der Spätphase des mechanischen Ileus (24 Stunden nach der Darmverlegung) zur Ausschüttung von Bradykinin führt, so dass die spinalen Afferenzen in diesem Experiment erst zu diesem Zeitpunkt sensibilisiert werden. Zur Unterstützung dieser Hypothese wurden in dieser Arbeit die morphologischen Veränderungen aller untersuchten Darmsegmente ausgewertet und festgestellt, dass in den obstruierten Därmen drei Stunden nach Operation noch gar keine Stauung sichtbar war und *in vivo* sowie *in vitro* sie eine sehr gute Beweglichkeit zeigten. Neun Stunden nach der Obstruktion war

der Darm vor der Ligatur nur leicht dilatiert, während er vierundzwanzig Stunden nach dem Ileus massiv dilatiert und voll mit Darminhalten gefüllt war.

Die Untersuchungsergebnisse in dieser Arbeit ergaben, dass bei dem Druckniveau zwischen 0 und 40 cm H<sub>2</sub>O zu keinem des untersuchten Zeitpunkts eine signifikante Steigerung der Impulsrate der Ileusgruppen gegenüber der entsprechenden Shamgruppe sich zeigte. Darüber hinaus stellten wir fest, dass innerhalb der ersten 24 Stunden nach einem mechanischen Ileus keine deutliche Sensibilisierung der vagalen Afferenzen nachgewiesen werden konnte. Bei hohem Druckniveau zwischen 50 und 80 cm H<sub>2</sub>O wurde gezeigt, dass eine statistisch signifikante Erhöhung der Impulsrate nur zu einem Zeitpunkt in der Kontrollgruppe gegenüber der entsprechenden Ileusgruppe beobachtet wurde, und zwar nur 3 Stunden nach den jeweiligen Operationen. Das heißt, dass zu diesem Zeitpunkt die spinalen afferenten Neurone in den Ileusgruppen kurz desensibilisiert wurden. Betrachtet man nun die Ergebnisse in den 9 und 24 Stunden Versuchsgruppen, so wurde nur eine erhöhte Tendenz in beiden Kontrollgruppen im Vergleich zu ihren Ileusgruppen gezeigt ohne statistischen Unterschied. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse gehen wir davon aus, dass keine Schmerzempfindung durch eine reine intraluminale Druckerhöhung während des mechanischen Ileus auslösbar ist, da die viszerale Schmerzempfindung ins ZNS geleiteten spinalen afferenten Neurone nicht sensibilisiert werden.

Aber warum während der vermutlich schmerzhaften Darmdistension<sup>(55)</sup> die mesenteriale afferente Sensibilität umgekehrt sogar erniedrigt bleibt, ist nicht geklärt. Wir vermuten, dass während dieses Vorgangs die endogene Schmerzhemmung, nämlich das antinozizeptive System gestartet wird und im Lauf der Obstruktionszeit die Wirkung dieses Mechanismus langsam nachlässt. Diese Vermutung wurde bereits in Studien beschrieben, dass der endogene antinozizeptive Effekt bei akuten viszeralen Schmerzen infolge von kolorektaler Distension aktiviert wurde<sup>(110, 111, 112)</sup>. Ebenfalls wurde bei chronisch-lebensmittel Allergie induzierten viszeralen Schmerzen dieses Phänomen beobachtet<sup>( 113 )</sup>. Dabei wurde der antinozizeptive Mechanismus durch die subdiaphragmalen vagalen afferenten Nerven übermittelt und entfaltet. Ob der gleiche Effekt tatsächlich beim mechanischen Ileus im Dünndarm eine Rolle spielt und die

Desensibilisierung der intestinalen afferenten Nerven während der Darmdistension verursacht, müssen wir weiter erforschen.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass die mesenterialen Afferenzen in der Frühphase des mechanischen Ileus durch chemische Stimulanzen mittels 5-HT und Bradykinin sowie durch mechanische Stimulanz mittels Darmdistension nicht aktiviert werden können. Die mesenteriale afferente Sensibilisierung spielt in den pathophysiologischen Vorgängen des mechanischen Ileus nur sehr spät eine Rolle. Da in der frühen Phase des mechanischen Ileus auch keine Sensibilisierung der spinalen Afferenzen beobachtet wurde, gehen wir davon aus, dass hierbei wahrscheinlich noch keine Freisetzung von Entzündungsmediatoren stattfindet. Die Tatsache, dass die Sensibilität für Bradykinin und Darmdistension im Verlauf reduziert war, könnte durch antinozeptive Mechanismen zu erklären, die möglicherweise nach Auslösen des mechanischen Ileus aktiviert werden. Aufgrund dieses möglicherweise parallel aktivierten antinozeptiven Mechanismus hat ein Individuum am Anfang des mechanischen Ileus noch kein Krankheitsgefühl. Das bestätigt die Beobachtung, dass klinisch Patienten mit mechanischem Ileus häufig erst symptomatisch werden, unter Umständen zu einem Zeitpunkt, wo der Darm schon schwer geschädigt wird. Diese Annahme erfordert im Detail jedoch weitere Untersuchungen.

#### **4.2.2. HE-Färbung und MPO-Färbung**

Drei Stunden nach einer mechanischen Darmverlegung zeigte sich der obstruierte Darm noch keinen histomorphologischen Unterschied gegenüber diesen in der entsprechenden Kontrollgruppe. Darmpräparaten in beiden Gruppen zeigten nur vereinzelten Becherzellenverlust und kaum infiltrierte Entzündungszellen. Demgegenüber waren die Darmproben in den neun und vierundzwanzig Ileusgruppen sehr schwer geschädigt und entzündet. Man sieht abgeflachte destruierte Zottenstruktur, verformte, teilweise verdünnte Kryptenstruktur sowie zahlreiche Infiltraten mit neutrophilen Granulozyten. Im

Vergleich dazu stellten die Proben in beiden Kontrollgruppen nur leichte mikroskopische Veränderungen wie diese in der drei Stunden Kontrollgruppe dar. Darüber hinaus wird es bewiesen, dass die Darmkonstruktion während des mechanischen Ileus signifikant geschädigt wird und dabei ein lokaler Entzündungsprozess frühzeitig stattfindet.

Bei der Auswertung am Mikroskop wurde die Anzahl der positiv angefärbten Entzündungszellen pro 15 Gesichtsfelder gezählt. Im Darmgewebe aller Kontrollgruppen fanden sich vereinzelte MPO-positive Zellen, wie bei einem Normalbefund zu erwarten ist<sup>(114, 115)</sup>, während die Anzahl dieser Zellen in allen Ileusgruppen im Lauf der Obstruktionszeit kontinuierlich steigerte. In der 24h Ileusgruppe zeigte sich eine massive Infiltration der MPO-positiven Zellen, die sich vorwiegend im antimesenterialen Bereich des Darms anhäuften. Die Anzahl dieser Zellen wurde in allen Ileusgruppen signifikant höher als diese in den entsprechenden Kontrollgruppen ermittelt ( $p < 0,05$ ) (siehe Ergebnisse), was signifikante Entzündungen mit Exkavation der Leukozyten von Venen in die Tunica Muscularis sowie mit möglich Degranulation von Myeloperoxidase bei Aktivierung der residenten Makrophagen infolge vom mechanischen Ileus aufwies.

Die Ergebnisse der HE- und der MPO-Färbung weisen beide darauf hin, dass bei den Tieren durch mechanischen Ileus histopathologische entzündliche Veränderungen im Darmgewebe hervorgerufen werden konnten und bereits drei Stunden nach dem operativen Ereignis nachweisbar sind. Es bleibt nun die Fragen, wie diese Entzündungsreaktion initiiert wird und welche pathophysiologischen Vorgänge hierbei die wichtigsten Rollen spielen. Aufgrund der Veränderungen der Darmwand kommt es wahrscheinlich zu einer Permeabilitätsstörung der Darmwand, so dass polymorphe Leukozyten von Gefäßen in die Darmwand einwandern würden, was sich mittels MPO-Färbung darstellen lässt. In der vorliegenden Studie wurde während der Darmobstruktion ebenfalls zunehmende Hyperämie der Darmwand sowie der entsprechenden mesenterialen Gefäße *in vitro* beobachtet (siehe Ergebnisse), die scheinbar mit dem intraluminalen Druck in Zusammenhang stand. Wir nehmen an, dass im zeitlichen Verlauf des mechanischen Ileus immer mehr Darminhalte im Lumen akkumuliert werden und der innere Druck im Darm kontinuierlich ansteigert, was zur Schwellung sowie Hyperämie der Darmwand führt und schlussendlich

Permeabilitätsstörung der Darmwand mit Exkavation von Leukozyten und Entstehung lokaler Entzündung auslöst. In der Zukunft werden wir gezielt die Permeabilitätsstörung in der Darmwand untersuchen, um diese hypothetische Schlussfolgerung zu überprüfen.

Zusammenfassend gehen wir davon aus, dass die Permeabilität der Darmwand beim mechanischen Ileus frühzeitig durch eine intraluminale Druckerhöhung sowie Darmdistension beeinflusst wird, wodurch Entzündungen in der Darmwand entstehen und in der Frühphase des Ileus die krankheitsrelevanteste Rolle spielen, während die mesenterialen afferenten Nerven ganz spät in diesem pathophysiologischen Prozess bezogen werden und ihre Sensibilisierung hierbei erst verzögert auftritt.

#### **4.2.3. Zytokin-Analyse**

Die Ergebnisse der Zytokin-Analyse zeigten, dass allein durch die Mini-Laparotomie (Shamoperation im Versuch) eine Genexpression der proinflammatorischen Zytokine von TNF- $\alpha$  sowie IL-6 auslösen kann, allerdings halten sich diese Werte kontinuierlich auf einem niedrigen Niveau und im Lauf der Versuchszeit ändern sich diese Werte nur sehr minimal. Im Gegenteil steigt die mRNA Expression der beiden Zytokine im Lauf der Versuchszeit kontinuierlich an und zu dem letzten Versuchszeitpunkt (24h) wurde der höchste Wert beobachtet. Das TNF- $\alpha$  wurde am Anfang des mechanischen Ileus (3 Stunden nach Beginn des Versuchs) viel mehr exprimiert als IL-6, aber seine Expression in der Darmwand vermehrt sich nur ca. zweifach nach 24 Stunden, hingegen wurde IL-6 am Anfang des Ileus sehr wenig exprimiert und am Ende nach 24 Stunden Ileuszeit hatte es sich um den Faktor 3 erhöht.

Wir gehen davon aus, dass in der Frühphase des mechanischen Ileus proinflammatorische Zytokine exprimiert wurden und sich in der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion beteiligen konnten. Der TNF- $\alpha$  ist ein sehr sensibler Faktor, der sehr früh detektiert werden kann, während das IL-6 als ein möglicher Indikator im Verlauf des mechanischen Ileus bei beginnender Entzündung dient.

### 4.3. Klinische Relevanz

Der mechanische Ileus ist eine der häufigsten Ileusform im klinischen Alltag mit sehr hoher Sterblichkeit bei verzögertem Therapieansatz<sup>(4)</sup>. Die genaue Pathophysiologie während des mechanischen Ileus ist wenig unbekannt und war in den letzten 30 Jahren kaum Gegenstand der Forschung. Da beim mechanischen Ileus die Ursache eine mechanische Darmverlegung ist, besteht die einzige kausale Therapiemöglichkeit in einer operativen Beseitigung des Passagehindernisses. Bei Patienten mit Operationskontraindikation oder bei Patienten mit lang dauerndem Ileus oder bei Ileuspatienten, die initial konservativ therapierbar sind, existiert neben allgemein-symptomatischen Behandlungen noch kein therapeutischer Ansatz, um Darmnekrose aufzuhalten bzw. die lokalen Folgen des mechanischen Ileus zu reduzieren und systemische inflammatorische Reaktionen zu verhindern.

In der vorliegenden Studie wurden einige pathophysiologischen Aspekte in der Frühphase des mechanischen Dünndarmileus untersucht. In Anbetracht der Untersuchungsergebnisse könnte man annehmen, dass am Anfang dieses Ileus die lokale Entzündungsreaktion in der Darmwand die zentrale Rolle in der Pathophysiologie spielt und wahrscheinlich für die spät auftretenden schwerwiegenden Symptome verantwortlich. Zukünftig könnte man in dieser Phase der Erkrankung prophylaktisch vielleicht antiinflammatorische Therapien einsetzen, bevor systemische Entzündungsreaktionen auftreten und der kranke Darm in Nekrose geht. Unsere Ergebnisse dürften zum Verständnis der pathophysiologischen Konsequenzen des mechanischen Ileus beitragen und möglicherweise eine Grundlage für zukünftige flankierende therapeutische Maßnahmen darstellen, die neben der Chirurgie den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen könnten.

## 5. Zusammenfassung

Der mechanische Ileus ist eine der häufigsten erworbenen chirurgischen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, der bei verzögertem Therapieansatz lebensbedrohlich ist. Analog zum postoperativen Ileus wird angenommen, dass die mesenteriale afferente Nervensensibilisierung sowie die lokale Entzündungsreaktion beim mechanischen Ileus wichtige Rollen spielen könnten. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb am Mausmodell diese Aspekte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion eines mechanischen Ileus untersucht.

Männliche, 20-30 g schwere C57Bl6 Mäuse wurden mit Isoflurannarkose anästhesiert. Eine Mini-Laparotomie wurde durchgeführt und der Dünndarm etwa 5 cm proximal der ileozökalen Klappe ligiert, während Kontrolltiere nur die Mini-laparotomie erhielten. Die intestinale afferente Sensibilität wurde 3, 9 und 24 Stunden nach der Operation in sechs Subgruppen untersucht (jeweils n=6). Zu diesem Zweck, wurde ein dilatiertes Darmsegment 1,5 cm proximal der Ligatur präpariert und der mesenteriale Nerv für die afferente „multi-unit“ Ableitungen präpariert. Die afferente Reizantwort auf 5-HT (50 µM), Bradykinin (0,5 µM) und luminales Rampendistension (0-80 cm H<sub>2</sub>O) wurde quantifiziert und als „normalisierte Anstiegsrate der Nervenimpulse“ ausgewertet (MW ± SEM). Drei weiteren dilatierten Darmsegmente proximal der Ligatur wurden für die histopathologischen Untersuchungen mittels HE- und MPO-Färbung sowie für die Zytokin-Analyse präpariert und vorbereitet.

Die Sensibilität der mesenterialen afferenten Nerven des Dünndarms in den drei und neun Stunden Vergleichsgruppen zeigten keine Unterschiede nach Stimulierung mit 5-HT (p > 0,05). Dagegen wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der 24h Ileusgruppe und der Shamgruppe beobachtet. Dabei wurde eine normalisierte Anstiegsrate der Nervenimpulse in der Ileusgruppe von 3,9 ± 0,2 ausgewertet, während diese in der Shamgruppe 2,4 ± 0,1 betrugen (p < 0,01). Eine gleiche statistische Auswertung wurde ebenfalls nach chemischer Stimulation mittels Bradykinin ermittelt, dass eine signifikante Erhöhung der Nervenimpulse nur in der 24h Ileusgruppe im Vergleich zu der entsprechenden

Shamgruppe beobachtet wurde ( $5,3 \pm 0,5$  vs  $3,5 \pm 0,2$ ;  $p < 0,05$ ). Kontinuierliche mechanische Rampendistension der Darmschlinge führte zu einer druckabhängigen Zunahme der Impulsraten des afferenten Nervs, die bei 3 Stunden Ileustieren statistisch signifikant niedriger waren im Vergleich zu Shamtieren bei intraluminalem Druck zwischen 50-80 cm H<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ). Die Impulsraten der afferenten Nerven in der 9 oder 24 Stunden Ileusgruppen zeigten dabei nur eine reduzierte Tendenz gegenüber ihren entsprechenden Shamgruppen. Die histologische Einteilung in einem etablierten Score an HE-gefärbten Präparaten zeigte unterschiedliche Entzündungsgrade zwischen Ileusdarm und Shamdarm 9 und 24 Stunden nach Operationen ( $p < 0,05$ ). Dagegen zeigten die Präparaten in der 3 Stunden Vergleichsgruppe gleiche Veränderungen ohne offensichtliches Entzündungszeichen. Mit Hilfe von der MPO-Färbung wurde die Anzahl der Entzündungszellen in der T. muskularis der Darmwand ermittelt. Hierbei wurde eine signifikante Vermehrung der MPO-positiven Zellen bereits drei Stunden nach dem Ileusbeginn beobachtet, die im Lauf der Ileuszeit kontinuierlich erhöht waren, sodass die maximale Anzahl dieser Zellen in der 24h Ileusgruppe ermittelt wurde. Es konnte in allen Vergleichsgruppen einen statistischen Unterschied beobachtet werden ( $p < 0,05$ ). Die Zytokin-Analyse der Darmwand wurde mittels der RT-PCR Methode durchgeführt und die Genexpression von TNF- $\alpha$  sowie IL-6 wies darauf hin, dass die Werte der beiden Zytokine im Lauf der Ileuszeit in den operierten Gruppen kontinuierlich anstiegen, während diese in den Shamgruppen relativ stabil auf niedrigem Niveau blieben.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass mesenteriale afferente Nerven des Dünndarms im dilatierten Darm bei mechanischem Ileus nur nach längerandauernder Ileuszeit sensibilisiert werden. Die reduzierte Sensibilität für schmerzhafte mechanische Distension könnte ein Hinweis für eine Aktivierung antinozizeptiver Mechanismen in der Frühphase des mechanischen Ileus sein. Allerdings lässt dieser Effekt mit zunehmender Ausbildung des Ileus nach. Die lokale Entzündungsreaktion tritt nach der Entstehung eines mechanischen Ileus sehr früh auf und bildet sich innerhalb der ersten neun Stunden nach dem Ileusbeginn bereits voll aus.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-hydroxytryptamine (serotonin)
ANS	autonomic nervous system
BK	bradykinin
cDNA	complementary desoxyribonucleid acid
Ct	threshold cycle number
DNA	desoxyribonucleid acid
ENS	enteric nervous system
GAPDH	glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GI-	gastrointestinal-
HE	hematoxylin and eosin
IL	interleukin
IPANs	intrinsic primary afferent neurons
MPO	myeloperoxidase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NO	nitric oxide
PBS	phosphate buffered saline
POI	postoperative ileus
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
SEM	standard error of the mean

SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SP	substance P
TNF	tumor necrosis factor
ZNS	central nervous system

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der wichtigsten pathophysiologischen Ereignisse bei Ileus .....	5
Abb. 2 Überblick des Versuchsablaufs .....	12
Abb. 3 Induktion des mechanischen Ileus mit Ligatur.....	14
Abb. 4 Repräsentative Darstellung der Darmsegmente.....	15
Abb. 5 Reinigung eines Ileumsegmentes von Darminhalt.....	16
Abb. 6 Versuchsaufbau zur elektrophysiologischen Ableitung .....	19
Abb. 7 Versuchsprotokoll für die Elektrophysiologie.....	21
Abb. 8 Repräsentative Beispiele der Darmsegmente 3h/9h/24h nach Ileusinduktion bzw. Shamoperation....	38
Abb. 9 Repräsentative Aufnahmen der afferenten Nervenfaserableitung vor und nach 5-HT..	40
Abb. 10 Normalisierte Anstiegsrate der afferenten nervalen Impulsrate nach Stimulation mittels 5-HT.....	41
Abb. 11 Repräsentative Aufnahmen der afferenten Nervenfaserableitung während der mechanischen Stimulation durch Darmdistension..	42
Abb. 12 Normalisierte Anstiegsrate während der Rampendistension innerhalb der 3h Gruppen.....	43
Abb. 13 Normalisierte Anstiegsrate während der Rampendistension innerhalb der 9h Gruppen.....	44
Abb. 14 Normalisierte Anstiegsrate während der Rampendistension innerhalb der 24h Gruppen.....	45
Abb. 15 Repräsentative Aufnahmen der afferenten Nervenfaserableitung vor und nach BK..	46
Abb. 16 Normalisierte Anstiegsrate der afferenten nervalen Impulsrate nach Stimulation mittels BK .....	47
Abb. 17 HE-Präparate der 3h Ileusgruppe.....	49
Abb. 18 HE-Präparate der 9h Versuchsgruppe. ....	50
Abb. 19 Repräsentative histologische Darstellung bei einem 24h Ileusdarm.....	50
Abb. 20 Repräsentative Präparate der 24h Ileusgruppe sowie 24h Shamgruppe.....	51
Abb. 21 Histogrammatische Darstellung des Entzündungsgrades aller untersuchten Darmproben .....	52
Abb. 22 Anzahl der MPO positiven Zellen in der Tunica muscularis des Darms. ....	54
Abb. 23 Repräsentative lichtmikroskopische Ausschnitte der Tunica muscularis des Darms nach immunhistochemischer MPO-Färbung..	55
Abb. 24 Histogrammatische Darstellung der TNF- $\alpha$ Expression in der Darmwand.....	57
Abb. 25 Histogrammatische Darstellung der IL-6 Expression in der Darmwand.	58

## 8. Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1 Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten .....</i>	22
<i>Tab. 2 MPO Färbeprotokoll mit Hanker-Yates Reagenz.....</i>	24
<i>Tab. 3 Versuchsprotokoll der RNA-Isolierung.....</i>	25
<i>Tab. 4 Protokoll für das Umschreiben von mRNA in cDNA.....</i>	26
<i>Tab. 5 Versuchsprotokoll der RT-PCR.....</i>	27
<i>Tab. 6 Mikroskopischer Score für die histologische Beurteilung des Entzündungsgrades.....</i>	29
<i>Tab. 7 Zusammensetzung der 10x Kreb's-Lösung .....</i>	33
<i>Tab. 8 Zusammensetzung der Kreb's-Lösung .....</i>	33
<i>Tab. 9 Zusammensetzung der 0,5 M PBS-Lösung (pH 7,4).....</i>	33
<i>Tab. 10 Nervenfaseraktivität (imp/sec) 120s nach Stimulation mit 5-HT.....</i>	39
<i>Tab. 11 Normalisierte Anstiegsrate der nervalen Impulsrate nach Stimulation mit 5-HT.....</i>	41
<i>Tab. 12 Nervenfaseraktivität (imp/sec) 120s nach Stimulation mit Bradykinin.....</i>	45
<i>Tab. 13 Normalisierte Anstiegsrate der nervalen Impulsrate nach Stimulation mit BK.....</i>	48
<i>Tab. 14 Summe des mikroskopischen Scores zur Evaluation der Entzündungsreaktion (=E+I).....</i>	52
<i>Tab. 15 Anzahl der MPO positiven Zellen in der Tunica muscularis (pro mm<sup>2</sup>).....</i>	54
<i>Tab. 16 TNF-α Expression in der Darmwand .....</i>	56
<i>Tab. 17 IL-6 Expression in der Darmwand.....</i>	58

## 9. Literaturverzeichnis

1. Turnage RH, Bergen PC. Intestinal Obstruction. In Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 7th ed. Edited by Mark Feldman et al. Philadelphia: Saunders, 2002.
2. Said S. Der Ileus: Volumen und sanfte Chirurgie. 2006. Online in Internet: URL: [http://www.cme-intensiv.de/cmsmedia/Modul\\_5.pdf](http://www.cme-intensiv.de/cmsmedia/Modul_5.pdf). (Stand 28.06.2012).
3. Plusczyk T, Bolli M, Schilling M. Ileuskrankheit. Chirurg. 2006; 77: 898-903.
4. Assalia A, Schein M, Kopelmann A. Therapeutic effect of oral Gastrografin in adhesive partial small bowel obstruction: a prospective randomized trial. Surgery et al. 1994; 115: 433-437.
5. Baumann R. Ileus. In: Karl-Heinz Reutter. Chirurgie. 5. Aufl. Thieme. 2004; S 199.
6. Plusczyk T, Bolli M, Schilling M. Folgeerscheinungen des mechanischen Ileus. Chirurgie. 2007; 78: 653-654.
7. Baumann R. Ileus. In: Karl-Heinz Reutter. Chirurgie. 5 Aufl. Thieme. 2004; S 200.
8. Fevang BT, Fevang J, Stangeland L, Soreide O, Svanes K, Viste A. Complications and death after surgical treatment of small bowel obstruction: A 35-year institutional experience. Ann Surg. 2000; 231: 529-537.
9. Child WA, Philips RB. Experience with intestinal plication and a proposed modification. Ann Surg. 1960; 152: 258-265.
10. Dayton MT. Small bowel obstruction. 8 Aufl. Elsevier. 2004; S 105.
11. Henne-Brun D, Löhnert M. Aktueller Stand zur Diagnostik und nichtoperativen Therapie des Dünndarmileus. Chirurg. 2000; 71:503-509.
12. Dubois A, Weise VK, Kopin IJ. Postoperative ileus: physiopathology, etiology and treatment. Ann Surg. 1973; 178: 781-786.

13. Livingston EH, Passaro EP, Jr. Postoperative ileus. *Dig Dis Sci.* 1990; 35:121-132.
14. Feifel G. Pathophysiology and morbidity of mechanical ileus. *Langenbecks Arch Chir.* 1985; 366: 279-284.
15. Bünte H. Klinik des akuten Bauches: Darmverschluss-Ileus. 2003. Online in Internet: URL: <http://www.med-college.hu/de/wiki/artikel.php?id=1400&lan=1>. (Stand 28.06.2012).
16. Fazel A, Verne N. New solutions to an old problem: acute colonic pseudo-obstruction. *J Clin Gastroenterol.* 2005; 39:17-20.
17. Petersdorf RG, Raymond DA, Braunwald E. Acute Intestinal Obstruction. 11. Aufl. McGraw-Hill. 2005; S 1703-1710.
18. 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.
19. 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.
20. Grund KE, Kümmerle F. Ileus: Diagnostik und Therapie. *Dtsch Med Wochenschr.* 1978; 103: 1754-1757.
21. Kümmerle F, Grund KE. Der kranke Dünndarm. Leitsymptom: Ileus. III. Hamburger Medizinisches Symposium. 1977.
22. Mirkovitch V, Cobo F, Robinson JW, Menge H, Gomba S. Morphology and function of the dog ileum after mechanical occlusion. *Clin Sci Mol Med.* 1976; 50: 123-130.
23. Shields R. The absorption and secretion of fluid and electrolytes in the obstructed bowel. *Br J Surg.* 1965; 52: 774-779.
24. Bishop RF, Allcock EA. Bacterial flora of the small intestine in acute intestinal obstruction. *Br Med J.* 1960; 1: 766-770.

25. Hicks C, Baumann FG, Enquist JF. Changes in intestinal flora in dogs with nonstrangulating intestinal obstruction. *Surgery*. 1969; 66: 580-583.
26. Sykes PA, Boulter KH, Schofield PF. Alterations in small bowel microflora in acute intestinal obstruction. *J Med Microbiol*. 1976; 9: 13-22.
27. Mirkovitch V, Cobo F, Robinson JW, Menge H, Gomba S. Morphology and function of the dog ileum after mechanical occlusion. *Clin Sci Mol Med*. 1976; 50: 123-130.
28. Öhmann U. The effects of luminal distension and obstruction on the intestinal circulation. In: Shepherd AP, Granger DN (eds) *Physiology of the intestinal circulation*. Raven Press, New York. 1984.
29. Roscher R, Beger HG. Neue Vorstellungen zur Pathophysiologie des menschlichen Dianndarmileus. In: Häring R (Hrsg) *Der Ileus*. Edition Medizin, Weinheim Deerfield Beach Basel. 1985.
30. Barnett WO, Messina AJ. The influence of massive antibiotics in experimental strangulation obstruction. *Gastroenterology*. 1959; 36: 534-536.
31. Kubrova J, Robinson JW, Mirkovitch. Function of the mucosa following an acute occlusion of the rat small intestine. *Res Exp Med*. 1973; 160: 321-325.
32. Robinson JW, Menge H, Sepulveda FV, Mirkovitch V. Functional and structural characteristics of the jejunum and ileum in the dog and the rat. *Digestion*. 1977; 15: 188-199.
33. Derblom H, Johannson H, Nylander G. Vascular pattern of intestinal villi in the obstructed small bowel of the rat. *Surgery*. 1963; 54: 780-783.
34. Merkle P, Bindewald H, Betzler M. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Absorption und Durchblutung beim mechanischen Dünndarmileus. *Langenbecks Archiv Klein Chir*. 1975; Suppl: 279-282.
35. Enochson L, Nylander G, Öhman U. Effects of intraluminal pressure on regional blood flow in obstructed and unobstructed small intestines in the rat. *Am J Surg*. 1982; 144: 558-561.

36. Roscher R, Oettinger W, Beger HG. Bacterial microflora, endogenous oxygen and prostaglandins in small bowel obstruction. *Am J Surg.* 1988; 155: 348-355.
37. Hodin RA, Jeffrey BM. Small intestine. 1 Aufl. Springer, Berlin. 2001; S 617.
38. Renzulli P, Krähenbühl L, Sadowski C, Al-Adili F. Moderne diagnostische Strategie beim Ileus. *Zentralbl Chir.* 1998; 123: 1334.
39. Goldberg HI, Dodds WJ. Roentgen evaluation of small bowel obstruction. *Dig Dis Sci.* 1979; 24: 245.
40. Decurtins M, Goti F. Postoperativer Ileus: Füh, spät oder gar nicht operieren? *Zentralbl Chir.* 1998; 123: 1355.
41. Hayanga AJ, Bass-Wilkins K, Bulkley GB. Current Management of Small Bowel Obstruction. *Surgery.* Mosby, Inc. 2005; vol 39: 1-33.
42. Baumann R. Ileus. In: Karl-Heinz Reutter. *Chirurgie.* 5 Aufl. Thieme. 2004; S 205.
43. Fabian TC, Mangiante EC, Boldreghini SJ. Prophylactic antibiotics for elective colorectal surgery or operation for obstruction of the small bowel: a comparison of cefonicid and cefoxitin. *Rev Infect Dis.* 1984; Suppl 4: 896-900.
44. Rukhliada NV. Preventive preoperative use of kanamycin and cefazolin in patients with acute intestinal obstruction. *Vestn Khir Im I I Grek.* 1986; 137: 96-98.
45. Bungard TJ, Kale-Pradhan PB. Prokinetic agents for the treatment of postoperative ileus in adults: a review of the literature. *Pharmacotherapy.* 1999; 19: 416.
46. 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.
47. Schuukres JAJ. Pharmacotherapy of gastrointestinal motor disorders. 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; p 12.

48. Roscher K, Lommel K. Pathophysiologie der Ileus-Krankheit. Zentralbl Chir. 1998; 123: 1328-1333.
49. Nightingale JM. The medical management of intestinal failure: methods to reduce the severity. Proc Nutr Soc. 2003; 62: 703-710.
50. Krämer S. Darmverschluss (Ileus). 2006. Online in Internet: URL: <http://www.eesom.com/go/QDZ65B7ZPS14FHYFAS8Y7U9LFMHGNFR2>. (Stand 28.06.2012)
51. Henne-Brunn D, Dürig M, Kremer B. Ileus. In: Duale Reihe Chirurgie. 3. Aufl. Thieme Stuttgart. 2008; S155.
52. Kaszaki J, Palasthy Z, Erczes D, Racz A, Torday C, Varga G, Vecsei L, Boros M. Kynurenic acid inhibits intestinal hypermotility and xanthine oxidase activity during experimental colon obstruction in dogs. Neurogastroenterol Motil. 2008; 20: 53-62.
53. Palasthy Z, Kaszaki J, Lazar G, Nagy S, Boros M. Intestinal nitric oxide synthase activity changes during experimental colon obstruction. Gastroenterol. 2006; 41: 910-918.
54. Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Schraut WH, Bauer AJ. Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. J Leukoc Biol. 1998; 63:683-691.
55. Mueller MH, Karpitschka M, Xue B, Kasperek MS, Sibaev A, Glatzle J, Kreis ME. Intestinal afferent nerve sensitivity is increased during the initial development of postoperative ileus in mice. J Gastrointest Surg. 2009; 13: 423-31.
56. Hanker JS, Yates PE, Metz CB, Rustioni A. A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. Histochem J. 1977; 9:789-92.
57. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Exp Hematol. 2002; 30: 503-512.
58. Bustin SA. Tenth annual nucleic acid-based technologies: time to stop and think. Washington, DC, USA, 24-26 June, 2002. Expert Rev Mol Diagn. 2002; 2: 405-408.

59. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001; 25: 386-401.
60. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005; 21: 389-395.
61. 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.
62. 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*. 2009; 21: 322-34.
63. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.
64. Scheife JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression's CT difference” formula. *J Mol Med (Berl)*. 2006; 84: 901-910.
65. Staib I. On the physiopathology of mechanical ileus. I. Experimental studies with special reference to blood circulation and intracellular electrolyte metabolism. *Brunn Beitr Klin Chir*. 1966; 212: 351-384.
66. Staib I, Herforth C. On the pathophysiology of mechanical ileus: experimental studies on the behaviour of a single substrate and enzymes. *Brunn Beitr Klin Chir*. 1966; 312: 107-125.
67. Brolin RE, Reddell MT. Gastrointestinal myoelectric activity in mechanical intestinal obstruction. *J Surg Res*. 1985; 38: 515-523.
68. Kaszaki J, Palásthý Z, Erczes D, Rácz A, Torday C, Varga G, Vécsei L, Boros M. Kynurenic acid inhibits intestinal hypermotility and xanthine oxidase activity during experimental colon obstruction in dogs. *Neurogastroenterol Motil*. 2008; 20: 53-62.

69. Merkle P, Bindewald H, Betzler M. Animal experiments on absorption and blood circulation in a mechanical ileus of the small intestine. *Langenbecks Arch Chir.* 1975; Suppl: 279-282.
70. Enochsson L, Nylander G, Ohman U. Effects of intraluminal pressure on regional blood flow in obstructed and unobstructed small intestines in the rat. *Am J Surg.* 1982; 144:558-561.
71. Yildiz H, Oncel M, Kurt N, Vural S, Gezen C, Dalkilic G, Olcay E. The relationship between the level of thirteen different substances and enzymes in blood and peritoneal fluid and the duration of mechanical intestinal obstruction: an experimental study on rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2003; 9: 183-188.
72. Kutun S, Ulucanlar H, Celik A, Cure E, Kockar MC, Cetin A. Effects of octreotide on healing of mechanical ileus in rats. *Saudi Med J.* 2008; 29: 539-543.
73. Fiedler L, Lindenmaier H, Hartung H, Köhnlein HE, Wiegend G. Behavior of intestinal motility and serum gastrin level during prostaglandin administration in acute mechanical ileus of the rabbit. *Langenbecks Arch Chir.* 1975; Suppl: 309-314.
74. Lausen M, Mang O. Electrical control activity during and after mechanical ileus: an animal experimental study on the reversibility of ileus-induced motility disorders. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe.* 1986; 19: 181-184.
75. De Winter BY, Robberecht P, Boeckxstaens GE, De Man JG, Moreels TG, Herman AG, Pelckmans PA. Role of VIP1/PACAP receptors in postoperative ileus in rats. *Br J Pharmacol.* 1998; 124: 1181-1186.
76. 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; 43: 968-971.
77. Gillis RA, Quest JA, Pagini FD, Norman WP. Control centers in the central nervous system for regulating gastrointestinal motility. In: Schultz SG, Wood JD, Rauner BB, eds. *Handbook of physiology, Section 6: The gastrointestinal system.* New York: Oxford University. 1989; 621-683.
78. Thompson DG. Extrinsic autonomic control of human gastrointestinal transit. In: Kamm MA, Lennard-Jones JE, eds. *Gastrointestinal transit: pathophysiology and pharmacology.* Petersfield, England: Wrightson Biomedical. 1991; 13-20.

79. Furness JB. The enteric nervous system. Blackwell, Oxford. 2006; p274.
80. Gershon MD. Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol.* 2005; 39: 184-193.
81. Wood JD. Intrinsic neural control of intestinal motility. *Annu Rev Physiol.* 1981; 43: 33-51.
82. Matzel KE, Schmidt RA, Tanagho EA. Neuroanatomy of the striated muscular anal continence mechanisms. Implication for the use of neurostimulation. *Dis. Colon Rectum.* 1990; 33: 666-673.
83. Zhang X, Fogel R, Renahan WE. Physiology and morphology of neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus and the nucleus of the solitary tract that are sensitive to distension of the small intestine. *J Comp Neurol.* 1992; 323: 432-448.
84. Janig W, McLachlan EM. Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev.* 1987; 67: 1332-1404.
85. Szurszewski JH, Ermilov LG, Miller SM. Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut.* 2002; 51 Suppl 1: i6-10.
86. Mueller MH, Karpitschka M, Gao Z, Mittler S, Kasparek MS, Renz B, Sibaev A, Glatzle J, Li Y, Kreis ME. Vagal innervation and early postoperative ileus in mice. *J Gastrointest Surg.* 2011; 15: 891-900.
87. Gao Z, Müller MH, Karpitschka M, Mittler S, Kasparek MS, Renz B, Sibaev A, Glatzle J, Li Y, Kreis ME. Role of the vagus nerve on the development of postoperative ileus. *Langenbecks Arch Surg.* 2010; 395: 407-411.
88. Gershon MD. Serotonin receptors and transporters: roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 20 Suppl 7: 3-14.
89. Bülbülgün E, Crema A. The release of 5-hydroxytryptamine in relation to pressure exerted on the intestinal mucosa. *J Physiol.* 1959; 146: 18-28.
90. Gershon MD. Roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999; 13 Suppl 2: 15-30.

91. Costedio MM, Hyman N, Mawe GM. Serotonin and its role in colonic function and in gastrointestinal disorders. *Dis Colon Rectum.* 2007; 50: 376-388.
92. Hillsley K, Grundy D. Sensitivity to 5-hydroxytryptamine in different afferent subpopulations within mesenteric nerves supplying the rat jejunum. *J Physiol.* 1998; 509: 717-727.
93. Hillsley K, Kirkup AJ, Grundy D. Direct and indirect actions of 5-hydroxytryptamine on the discharge of mesenteric afferent fibres innervating the rat jejunum. *J Physiol.* 1998; 506: 551-561.
94. Brierley SM, Jones RC, III, Xu L, Gebhart GF, Blackshaw LA. Activation of splanchnic and pelvic colonic afferents by bradykinin in mice. *Neurogastroenterol Motil.* 2005; 17: 854-862.
95. Dunn PM, Rang HP. Bradykinin-induced depolarization of primary afferent nerve terminals in the neonatal rat spinal cord in vitro. *Br J Pharmacol.* 1990; 100: 656-660.
96. Spiller RC. Mechanisms of postoperative intestinal motor dysfunction. *Curr Opin Gastroenterol.* 2003; 19: 103-105.
97. Brundsen AM, Grundy D. Sensitization of visceral afferents to bradykinin in rat jejunum in vitro. *J Physiol.* 1999; 521: 17–527.
98. Maubach KA, Grundy D. The role of prostaglandins in the bradykinin-induced activation of serosal afferents of the rat jejunum in vitro. *J Physiol (Lond).* 1999; 515: 277–285.
99. de Jonge WJ, The FO, van der Coelen D, Bennink RJ, Reitsma PH, van Deventer SJ, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Mast cell degranulation during abdominal surgery initiates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology.* 2004; 127: 535-545.
100. 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; 20: 149-158.
101. Löffler G, Petrides P. Biochemie und Pathobiochemie. 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin. 1998; S980.

102. Behrendt FF, Tolba RH, Overhaus M, Hirner A, Minor T, Kalf JC. Indocyanine green fluorescence measurement of intestinal transit and gut perfusion after intestinal manipulation. *Eur Surg Res.* 2004; 36: 210-218.
103. Siegenthaler W, Blum HE. Zytokine. In: Siegenthaler W, Blum HE. *Klinische Pathophysiologie*. 9. Auflage. Thieme. 2006; S 530.
104. Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. Cachectin / tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol.* 1985; 135: 3972-3977.
105. Schmidt J, Stoffels B, Savanh Chanthaphavong R, Buchholz BM, Nakao A, Bauer AJ. Cytokine. Differential molecular and cellular immune mechanisms of postoperative and LPS-induced ileus in mice and rats. *2012; 59: 49-58.*
106. Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Okazawa A, Hibi T, Oshima S, Miyata T, Nakamura T, Watanabe M. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2003; 2: 131-136.
107. Wehner S, Schwarz NT, Hundsdoerfer R, Hierholzer C, Tweardy DJ, Billiar TR, Bauer AJ, Kalf JC. Induction of IL-6 within the rodent intestinal muscularis after intestinal surgical stress. *Surgery.* 2005; 137: 436-446.
108. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. 2004; S 92-95. Online in Internet:  
URL: <http://www.gene-quantification.de/pfaffl-biospektrum-2004.pdf>  
(Stand 28.06.2012)
109. Bueno L, Fioramonti J. Effects of inflammatory mediators on gut sensitivity. *Can J Gastroenterol.* 1999; 13 Suppl A: 42A-46A.
110. Gschossmann JM, Mayer EA, Miller JC, Raybould HE. Subdiaphragmatic vagal afferent innervation in activation of an opioidergic antinociceptive system in response to colorectal distension in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2002; 14: 403-408.
111. Chen SL, Wu XY, Cao ZJ et al. Subdiaphragmatic vagal afferent nerves modulate visceral pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 294: G1441-1449.
112. Zhang LY, Dong X, Liu ZL, Mo JZ, Fang JY, Xiao SD, Li Y, Chen SL. Luminal serotonin time-dependently modulates vagal afferent driven antinociception in response to colorectal distention in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2011; 23: 62-69.

- 113.Chen S, Li J, Zhang L et al. 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate the time-dependent vagal afferent modulation of nociception during chronic food allergen sensitized visceral hyperalgesia in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2009; 21: 1222-e113.
- 114.Mikkelsen HB. Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines. *Histol Histopathol.* 1995; 10: 719-736.
- 115.Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Schraut WH, Bauer AJ. Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. *J Leukoc Biol.* 1998; 63: 683-691.

## 10. Danksagung

Die vorliegende tierexperimentelle Arbeit entstand am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin (WBEx) in der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurogastroenterologie von Prof. Dr. med. M. E. Kreis. Das Projekt wurde von Herrn PD Dr. med. M. Müller betreut und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M. E. Kreis ganz herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit danken. Durch seine nicht nachlassende, großzügige Unterstützung, sowie durch viele wertvolle Anregungen, Diskussionen und Ratschläge trug er maßgeblich zum Gelingen meiner Doktorarbeit bei. Die von ihm geprägte Atmosphäre zwischen kollegialer Zusammenarbeit und wissenschaftlichem Anspruch schuf eine fortwährende Grundlage für die tägliche Freude am kreativen Arbeiten.

Herrn PD Dr. med. M. Müller bedanke ich mich herzlich für die sorgfältige und gründliche Einarbeitung in wesentliche tierexperimentelle Techniken.

Mein besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe, deren Umgang gleichermaßen von hoher fachlicher Kompetenz wie von freundlicher Atmosphäre geprägt war. Vielen Dank an Sarah Mittler für die sorgfältige und geduldige Schulung aller experimentellen Techniken; Dem Mitdoktorand Till Macheroux für die freundliche, erfolgreiche sowie hervorragende Zusammenarbeit; Petra Benhaqi, Brigitte Götz, und der Mitstudentin Alexandra Dietrich, die mich jeder Zeit bedingungslos unterstützt haben.

Meinen tiefen Dank empfängt auch Herr PD Dr. M. Kasperek, der öfters mit mir um die Versuchsergebnisse diskutiert hat und wodurch mein wissenschaftliches Denken maßgeblich bestimmt ist.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann Bing Li und meinen Eltern Yubao Zhao und Zhiqing Ma, die mich jederzeit unterstützt haben.