

Aus der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Transplantations-, Gefäß-, und  
Thoraxchirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

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

**Afferente Sensibilität und morphologische Charakterisierung  
des Dünndarms in der Frühphase des postoperativen Ileus  
bei der Maus**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Martina Brandlhuber, geb. Karpitschka

aus

Hof

2015

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Helmut Bartels  
Priv. Doz. Dr. Martin Storr  
Prof. Dr. Thomas Mussack  
Prof. Dr. Jens Waschke

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.2015



---

Meinem liebsten Bernhard

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
<b>1.1</b>	<b>DAS KRANKHEITSBILD DES POSTOPERATIVEN ILEUS UND SEINE KLINISCHE RELEVANZ</b>	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>ANATOMISCHE GRUNDLAGEN</b>	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>DAS ENTERISCHE NERVENSYSTEM (ENS)</b>	<b>16</b>
1.3.1	ORGANISATION DES ENTERISCHEN NERVENSYSTEMS (ENS)	16
1.3.1.1	Allgemeine Merkmale	16
1.3.1.2	Neuronale Morphologie	18
1.3.2	MORPHOLOGISCHE UND NEUROCHEMISCHE CHARAKTERISTIKA DER ENS-NEURONE	20
1.3.2.1	Musculomotorische Neurone (MMN)	23
1.3.2.2	Intrinsische sensorische Neurone	24
1.3.2.3	Interneurone	26
1.3.3	NEUROPHYSIOLOGIE ENTERISCHER NEURONE	28
1.3.3.1	Enterische AH- und S-Neurone	28
1.3.3.2	Synaptische Übertragung	31
1.3.4	ENS UND IMMUNABWEHR	34
1.3.5	DIE ORGANISATION ENTERISCHER REGELKREISE: MOTILITÄT VS. SEKRETION	35
<b>1.4</b>	<b>DIE INNERVATION DURCH SPINALE UND VAGALE AFFERENTE NERVEN</b>	<b>39</b>
1.4.1	ANATOMIE DER AFFERENTEN INNERVATION	39
1.4.1.1	Anatomie peripherer Nervenendigungen	39
1.4.1.2	Anatomie zentraler Nervenendigungen	45
1.4.2	STRUKTUR-FUNKTIONS-BEZIEHUNGEN UND IHRE PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG	46
1.4.2.1	Mucosale afferente Nervenendigungen	46
1.4.2.2	Muskuläre afferente Nervenendigungen	47
1.4.2.3	Serosale und mesenteriale afferente Nervenendigungen	50
1.4.2.4	Mechanisch insensitive afferente Nervenfasern	52
1.4.3	PERIPHERE GANGLIEN, VISZERALE AFFERENTE NEURONE UND REFLEXE	53
1.4.3.1	Periphere Ganglien	53
1.4.3.2	Afferente viszerale Neurone	54
1.4.3.3	Reflexe über periphere Ganglien	59
1.4.4	DIE WEITERVERARBEITUNG SENSORISCHER SIGNALE IM GEHIRN	60
<b>1.5</b>	<b>ÜBERBLICK ÜBER DIE NEUROGENEN MECHANISMEN DES POI</b>	<b>64</b>
<b>1.6</b>	<b>INFLAMMATORISCHE MECHANISMEN DES POI</b>	<b>65</b>

---

1.6.1	LEUKOZYTEN DER INTESTINALEN MUSCULARIS .....	66
1.6.2	DIE AUSWIRKUNG DER ENTZÜNDUNG AUF DIE INTESTINALE FUNKTIONSFÄHIGKEIT.....	68
1.6.2.1	ICCs .....	68
1.6.2.2	Plexus myentericus.....	69
1.6.3	SPINALE AFFERENTE NERVENFASERN .....	71
1.6.4	CHOLINERGIC ANTI-INFLAMMATORY PATHWAY .....	72
<b>1.7</b>	<b>PHARMAKOLOGISCHE MECHANISMEN DES POI .....</b>	<b>73</b>
1.7.1	DIE WIRKUNG VON ANÄSTHETIKA.....	73
1.7.2	DIE WIRKUNG VON ENDOGENEN UND EXOGENEN OPIOIDEN .....	73
<b>1.8</b>	<b>HYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....</b>	<b>74</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>76</b>
<b>2.1</b>	<b>VERSUCHSTIERE .....</b>	<b>76</b>
<b>2.2</b>	<b>VERSUCHSDURCHFÜHRUNG .....</b>	<b>76</b>
2.2.1	ÜBERSICHT .....	76
2.2.2	AUSLÖSEN DES POSTOPERATIVEN ILEUS .....	76
2.2.3	GEWEBEENTNAHME UND GEWEBEAUFBEREITUNG.....	78
2.2.3.1	Entnahme des Jejunums für MPO-Färbung und Nervenfaserableitung .....	78
2.2.3.2	Fixierung des Versuchstiers und Entnahme des Gehirns .....	80
<b>2.3</b>	<b>NERVENFASERABLEITUNG UND INTRALUMINALE DRUCKMESSUNG .....</b>	<b>82</b>
<b>2.4</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES FOS-PROTEINS .....</b>	<b>84</b>
2.4.1	IMMUNHISTOCHEMIE ZUR BESTIMMUNG DER NEURONALEN AKTIVITÄT .....	84
2.4.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE AUFBEREITUNG DES GEHIRNPRÄPARATES .....	85
2.4.3	FOS-PROTEIN-KONTROLLEN .....	88
<b>2.5</b>	<b>MYELOPEROXIDASE-FÄRBUNG .....</b>	<b>88</b>
2.5.1	LPS-KONTROLLEN.....	89
<b>2.6</b>	<b>VERSUCHSPROTOKOLL ELEKTROPHYSIOLOGIE .....</b>	<b>91</b>
<b>2.7</b>	<b>AUSWERTUNG.....</b>	<b>92</b>
2.7.1	ELEKTROPHYSIOLOGIE UND MOTILITÄTSMESSUNGEN .....	92
2.7.1.1	Ruhephase.....	92
2.7.1.2	Distensionsexperiment.....	92
2.7.1.3	Chemische Stimulation.....	92
2.7.1.4	Motilität.....	93
2.7.2	MYELOPEROXIDASE.....	95

---

2.7.3	FOS-PROTEIN-IMMUNHISTOCHEMIE .....	95
<b>2.8</b>	<b>STATISTIK.....</b>	<b>96</b>
2.8.1	GERÄTE UND LABORMATERIALIEN.....	97
2.8.2	CHEMIKALIEN .....	97
2.8.3	LÖSUNGEN .....	97
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>98</b>
<b>3.1</b>	<b>ALLGEMEINE VORBEMERKUNGEN.....</b>	<b>98</b>
<b>3.2</b>	<b>DARMMOTILITÄT .....</b>	<b>98</b>
3.2.1	VERGLEICH DER KONTROLLGRUPPEN .....	98
3.2.1.1	Amplitude (Peak).....	98
3.2.1.2	Fläche unter der Kurve (AUC).....	100
3.2.1.3	Amplitudenanzahl („Frequenz“)......	100
3.2.2	VERGLEICH DER ILEUSGRUPPEN .....	101
3.2.2.1	Amplitude (Peak).....	103
3.2.2.2	Fläche unter der Kurve (AUC).....	103
3.2.2.3	Amplitudenanzahl („Frequenz“)......	104
3.2.3	VERGLEICH DER ILEUS- UND KONTROLLGRUPPEN.....	104
3.2.3.1	Amplitude (Peak).....	104
3.2.3.2	Fläche unter der Kurve (AUC).....	107
3.2.3.3	Amplitudenanzahl („Frequenz“)......	108
<b>3.3</b>	<b>INTESTINALE AFFERENTE NERVENFASERAKTIVITÄT .....</b>	<b>109</b>
3.3.1	RUHENERVENFASERAKTIVITÄT.....	109
3.3.1.1	Vergleich der Kontrollgruppen.....	109
3.3.1.2	Vergleich der Ileusgruppen .....	110
3.3.1.3	Vergleich der Ileus- und Kontrollgruppen .....	110
3.3.2	MECHANISCHE STIMULATION – DISTENSION .....	110
3.3.2.1	Vergleich der Kontrollgruppen.....	112
3.3.2.2	Vergleich der Ileusgruppen .....	113
3.3.2.3	Vergleich der Ileus- und Kontrollgruppen .....	114
3.3.3	CHEMISCHE STIMULATION.....	117
3.3.3.1	Vergleich der Kontrollgruppen.....	118
3.3.3.2	Vergleich der Ileusgruppen .....	118
3.3.3.3	Vergleich der Ileus- und Kontrollgruppen .....	119

---

<b>3.4</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES FOS-PROTEINS</b>	<b>121</b>
3.4.1	VERGLEICH DER KONTROLLGRUPPEN	121
3.4.1.1	NTS der Kontrollgruppen	121
3.4.1.2	Area postrema der Kontrollgruppen	122
3.4.2	VERGLEICH DER ILEUSGRUPPEN	122
3.4.2.1	NTS der Ileusgruppen	122
3.4.2.2	Area postrema der Ileusgruppen	122
3.4.3	VERGLEICH DER ILEUS- UND KONTROLLGRUPPEN	122
3.4.3.1	NTS im Vergleich zwischen Ileus und Kontrolle	124
3.4.3.2	Area postrema im Vergleich zwischen Ileus und Kontrolle	124
<b>3.5</b>	<b>MYELOPEROXIDASEFÄRBUNG</b>	<b>125</b>
3.5.1	VERGLEICH DER KONTROLLGRUPPEN	125
3.5.2	VERGLEICH DER ILEUSGRUPPEN	126
3.5.3	VERGLEICH DER ILEUS- UND KONTROLLGRUPPEN	126
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>128</b>
<b>4.1</b>	<b>ALLGEMEINE DISKUSSION</b>	<b>128</b>
<b>4.2</b>	<b>SPEZIELLE DISKUSSION</b>	<b>130</b>
4.2.1	DARMMOTILITÄT	130
4.2.1.1	Motilität der Kontrollgruppen	132
4.2.1.2	Motilität der Ileusgruppen	133
4.2.1.3	Vergleich der Motilität zwischen Ileus- und Kontrollgruppen	137
4.2.2	AFFERENTE NERVENFASERAKTIVITÄT	138
4.2.2.1	Ruhenervenfaseraktivität	138
4.2.2.2	Nervenfaseraktivität unter Stimulation	141
4.2.3	MPO-POSITIVE ZELLEN	155
4.2.3.1	Vergleich der MPO-positiven Zellen innerhalb der Kontroll-Gruppe	155
4.2.3.2	Vergleich der MPO-positiven Zellen innerhalb der Ileus-Gruppe	156
4.2.3.3	MPO-positive Zellen: Ileus vs. Kontrolle	158
4.2.4	ZENTRALE NEURONALE AKTIVIERUNG BEIM POI	159
4.2.4.1	C-Fos: Vergleich der Kontroll-Gruppen	161
4.2.4.2	C-Fos: Vergleich der Ileus-Gruppen	161
4.2.4.3	C-Fos: Ileus vs. Kontrolle	162

---

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>165</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>172</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>174</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>176</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS (ONLINE VERFÜGBAR) .....</b>	<b>177</b>
<b>10</b>	<b>ERGÄNZENDE LITERATUR .....</b>	<b>197</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>199</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Krankheitsbild des postoperativen Ileus und seine klinische Relevanz

Der Begriff des Ileus oder Darmverschlusses bezeichnet generell eine Störung der Darmpassage und umfasst eine ganze Reihe unterschiedlicher Diagnosen, die allesamt zu Transportstörungen in Teilen des Darms oder auch im gesamten Gastrointestinaltrakt führen [Livingston and Passaro (1990); Resnick, Greenwald, and Brandt (1997)]. Unabhängig von der Ursache kann die Darmlähmung sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm lokalisiert sein [Livingston and Passaro (1990)]. Je nach Lokalisation wird entweder von einem hohen, im Dünndarm auftretenden Ileus oder von einem tiefen, das Kolon betreffenden Ileus gesprochen [Livingston and Passaro (1990)]. Die Unterbrechung der Darmpassage kann entweder durch einen mechanischen Verschluss – dann als *mechanischer* Ileus bezeichnet – oder funktionell durch eine „Darmlähmung“ bedingt sein [Livingston and Passaro (1990)]. Letzteres wird im klinischen Sprachgebrauch auch mit dem Begriff des *paralytischen* oder *funktionellen* Ileus beschrieben [Livingston and Passaro (1990); Resnick et al. (1997); Lowman (1971)]. Der mechanische Ileus stellt die Folge einer Verlegung des Darmlumens dar, entweder von innen als Obstruktionsileus (beispielsweise durch Tumoren oder Fremdkörper) oder von außen als Kompressionsileus, häufig hervorgerufen durch Briden, Inkarzerationen oder einen Volvulus [Livingston and Passaro (1990)]. Im Gegensatz dazu finden sich beim paralytischen Ileus die verschiedensten ätiologischen Umstände, von infektiös-toxischen Auslösern über metabolische Veränderungen bis hin zu vaskulären oder neural-motorischen Ursachen [Livingston and Passaro (1990); Prasad and Matthews (1999)].

Eine Sonderform der funktionellen Darmlähmung stellt der postoperative Ileus (POI) dar. Nach abdominalchirurgischen Eingriffen kommt es häufig zu Störungen der gastrointestinalen Motilität – dieser Zustand wird als postoperativer Ileus (POI) bezeichnet [Livingston and Passaro (1990); Resnick et al. (1997)]. Pathophysiologisch handelt es sich dabei um eine Darmparalyse mit Reduktion des Darmtonus und der Darmperistaltik [Livingston and Passaro (1990)]. Die postoperative Beeinträchtigung der Magen-Darm-Funktion kann verschiedene

Ausmaße annehmen [Livingston and Passaro (1990)]; ist eine spärliche Peristaltik vorhanden und der Patient lediglich nicht in der Lage, ausreichend Stuhl abzusetzen, spricht man zunächst von Koprostase und postoperativer Darmatonie [Livingston and Passaro (1990); Prasad and Matthews (1999)]. Livingston und Passaro definieren dieses Ausmaß der Erkrankung als unkomplizierten POI, der regelmäßig nach abdominalchirurgischen Eingriffen auftritt, seine stärkste Ausprägung im Kolon aufweist und normalerweise innerhalb von zwei bis drei Tagen spontan abklingt [Livingston and Passaro (1990)]. Gelegentlich findet sich aber auch eine prolongierte, über den genannten Zeitraum hinaus andauernde Hemmung der Motilität, welche als postoperativer paralytischer Ileus bezeichnet wird und meist die gesamte Länge des Darmes betrifft [Livingston and Passaro (1990)]. Bei der Entwicklung dieses länger andauernden POI lässt sich ein stadienhafter Verlauf erkennen, dessen pathogenetischer Ausgangspunkt die Stase des Darminhaltes ist [Bauer and Boeckxstaens (2004)].

Die Stase des Darminhaltes ruft eine pathologische Dehnung (Distension) der Darmwand hervor, die im Mittelpunkt des Ileus steht [Lowman (1971)]. Sie führt einerseits zum Einstrom großer Flüssigkeitsmengen in das Darmlumen mit konsekutiver Hypovolämie, Hypalbuminämie, Hämokonzentration und Störung des Elektrolythaushalts [Lowman (1971)]; andererseits bewirkt die Distension eine Hypoxie der Darmwand mit folgender Mikrozirkulationsstörung, durch welche die Entstehung von Darmwandnekrosen mit Perforation und Peritonitis begünstigt wird [Lowman (1971)]. Die gleichzeitige Störung der Mucosabarriere führt zur Translokation von Bakterien und damit zur Einschwemmung von Endotoxinen, was letztendlich zum Bild eines SIRS (systemic inflammatory response syndrome) führt [Lowman (1971)]. Im Endstadium des unbehandelten Ileus resultiert im schlimmsten Fall eine Störung aller Organsysteme – das sogenannte Multiorganversagen, mit Kreislaufschock, Lungenfunktionsstörung sowie Nieren- und Leberversagen [Lowman (1971)]. Diese Dekompensation des unbehandelten Ileus bedingt die unverändert hohe Letalität der Erkrankung von 15 – 40% [Prasad and Matthews (1999)].

Beim postoperativen Ileus (POI) als Sonderfall der funktionellen Darmlähmung wird das klinische Bild durch die zunehmende Distension des Darmes geprägt, wobei erst im Verlauf der Erkrankung der Abdominalbefund (geblähtes Abdomen) in den

Vordergrund tritt [Bauer and Boeckxstaens (2004)]. Die betroffenen Patienten klagen über Unwohlsein und berichten oftmals über erhebliche Schmerzen [Bauer and Boeckxstaens (2004)]. Neben Anamnese und körperlicher Untersuchung dient die radiologische Bildgebung der Diagnosesicherung. In der Abdomenübersichtsaufnahme finden sich neben distendierten Darmschlingen die für den Ileus typischen Spiegelbildungen und „stehenden“ Schlingen [Bauer and Boeckxstaens (2004)]. Anschließend kann eine Durchleuchtungsuntersuchung mit wasserlöslichem Kontrastmittel zur weiteren differenzialdiagnostischen Abklärung dienen. Bei bestehendem Subileus – einem nur unvollständigen Darmverschluss – ist diese Maßnahme durch ihre laxierende Wirkung häufig auch therapeutisch wirksam [Bauer and Boeckxstaens (2004)]. Die orale Nahrungsaufnahme gestaltet sich meist schwierig oder ist gar unmöglich, oft mit der Konsequenz einer verlängerten parenteralen Ernährung [Prasad and Matthews (1999)]. So führt – selbst ohne das Auftreten der weiter oben beschriebenen schwerwiegenden Komplikationen – der POI zu einer gesteigerten postoperativen Morbidität, hat meist einen verlängerten Krankenhausaufenthalt zur Folge und führt zu einem nicht unerheblichen Anstieg der Behandlungskosten [Prasad and Matthews (1999)]. Insgesamt ergibt sich die Notwendigkeit, den POI frühzeitig zu behandeln oder möglichst ganz zu vermeiden.

Die Remission des POI erfolgt bei leichtem Verlauf (unkomplizierter POI) spontan innerhalb von zwei bis drei Tagen und beinhaltet die Wiederherstellung und Normalisierung der physiologischen gastrointestinalen Peristaltik, die sich häufig durch das Auftreten von Darmgeräuschen bzw. Flatulenz ankündigt und durch die Toleranz oraler Nahrungszufuhr gekennzeichnet ist [Prasad and Matthews (1999); Bauer and Boeckxstaens (2004)]. Die Erholung der gastrointestinalen Motilität folgt dabei einem relativ gut vorhersagbaren zeitlichen Muster [Prasad and Matthews (1999)]: Die Wiederherstellung der Dünndarmfunktion erfolgt am schnellsten und durchschnittlich bereits fünf bis zehn Stunden nach dem chirurgischen Eingriff [Wattwil (1989)]. Im Gegensatz dazu erholt sich die Funktion des Magens erst nach 24 bis 48 Stunden [Clevers, Smout, van der Schee, and Akkermans (1991)]. Der Dickdarm schließlich ist erst nach drei bis vier Tagen wieder vollständig funktionsfähig [Tolleson, Cassuto, and Rimback (1992)]. Die Wiederherstellung der Dickdarmmotilität stellt somit den limitierenden Faktor innerhalb der Remission des postoperativen Ileus dar. Ergibt sich die Erholung der Magen-Darm-Funktion nicht

spontan, sondern zeigen sich im Gegenteil Symptome, die einen schweren paralytischen Verlauf des POI vermuten lassen, müssen weitergehende therapeutische Konsequenzen ergriffen werden.

Neben der postoperativ standardmäßig durchgeführten Schmerztherapie kommt der Dekompression des Magen-Darm-Traktes eine besondere Bedeutung zu [Clevers et al. (1991)]. Bei fortgeschrittener Darmatonie bzw. bei länger bestehendem postoperativen Ileus mit Übelkeit und Erbrechen erfolgt das Legen einer Magensonde, um eine Entlastung des Magens und Dünndarms zu erreichen und weitere Komplikationen (z.B. Aspiration) zu vermeiden [Clevers et al. (1991)]. Eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr und der Ausgleich evtl. auftretender Elektrolytimbalancen stehen nach wie vor an erster Stelle der Therapie; darüber hinaus können Prokinetika und Abführmaßnahmen eingesetzt werden [Clevers et al. (1991)]. Bei den beschriebenen Behandlungsmethoden handelt es sich hauptsächlich um symptomatische Therapiemaßnahmen, eine Ursachen-orientierte Behandlung ist nach wie vor schwierig. Diese Tatsache liegt darin begründet, dass auch heutzutage nur ein unvollkommenes Verständnis des Krankheitsbildes existiert – sowohl hinsichtlich der einzelnen pathophysiologischen Mechanismen, die bei der Entstehung des postoperativen Ileus eine Rolle spielen, als auch hinsichtlich deren jeweiligen Gewichtung im zeitlichen Verlauf der Erkrankung.

In den letzten Jahren wurden viele mögliche Ursachen für die Entstehung des postoperativen Ileus (POI) identifiziert. Neben der Beteiligung sympathisch vermittelter Reflexe wurde die Wirkung inhibitorischer humoraler Substanzen sowie die Freisetzung von Noradrenalin aus der Darmwand diskutiert. Gleichfalls nimmt man an, dass sowohl die zur Anästhesie eingesetzten Medikamente als auch die im Rahmen des POI auftretenden Entzündungsvorgänge eine Rolle spielen.

Seit der Einführung laparoskopischer Techniken erscheinen vermehrt Berichte, welche eine Verbindung zwischen minimal invasiven Techniken und einer verkürzten postoperativen Darmatonie aufzeigen [Bohm, Milsom, and Fazio (1995); Dubois, Icard, Berthelot, and Levard (1990); Garcia-Caballero and Vara-Thorbeck (1993); Ludwig, Frantzides, Carlson, and Grade (1993); Schippers, Ottinger, Anurov, Polivoda, and Schumpelick (1993)]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der operative Eingriff *per se* wie auch die nachfolgende Schmerzmedikation eine wichtige Rolle bei der Verursachung des POI spielen [Bohm et al. (1995); Dubois et al. (1990);

Garcia-Caballero and Vara-Thorbeck (1993); Ludwig et al. (1993); Schippers et al. (1993)]. **Drei** hauptsächliche Mechanismen werden im Rahmen der Entstehung des POI als ursächlich beteiligt angesehen und diskutiert – **neurogene, inflammatorische** und **pharmakologische Mechanismen** [Bauer and Boeckxstaens (2004)].

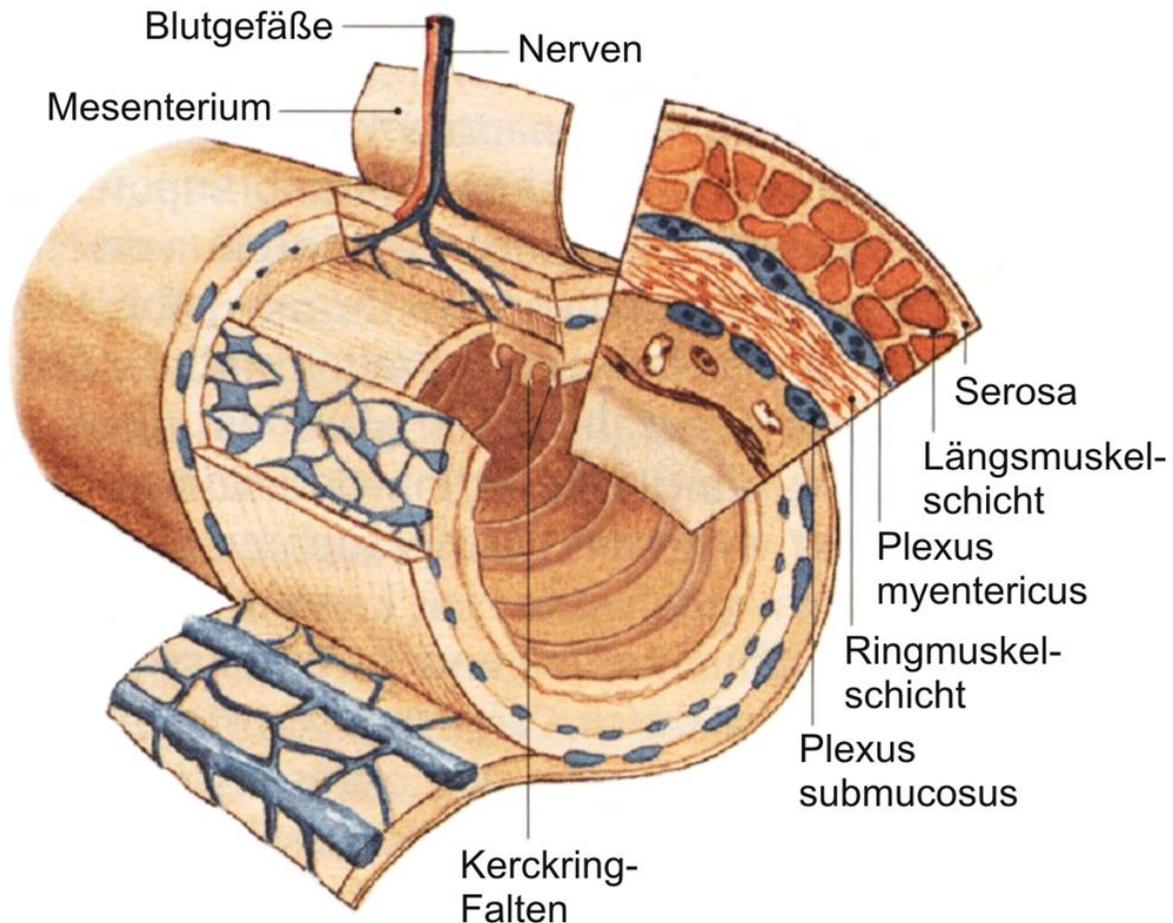
In den ersten Stunden nach dem operativen Eingriff – der sogenannten *Frühphase* des POI – scheint vor allem die Aktivierung spinaler wie auch supraspinaler adrenerger und non-adrenerger Signalwege eine Rolle zu spielen (*neurogene Mechanismen*) [Bauer and Boeckxstaens (2004)]. In kürzlich veröffentlichten Studien konnte gezeigt werden, dass die ausgedehnte *Spätphase* des Ileus durch eine molekulare Entzündungsreaktion innerhalb der Darmwand charakterisiert ist (*inflammatorische Mechanismen*), in deren Zentrum die Rekrutierung von Leukozyten in die Tunica muscularis der betroffenen Darmsegmente steht [Kalff, Buchholz, et al. (1999); Kalff, Carlos, et al. (1999); Kalff, Schraut, Simmons, and Bauer (1998)]. Diese Entzündungsreaktion wiederum stört die intestinale neuromuskuläre Interaktion (Ineinandergreifen *neurogener* und *inflammatorischer* Mechanismen), was schließlich die Motilität des gesamten Gastrointestinaltraktes beeinträchtigt [Kalff, Buchholz, et al. (1999); Kalff, Carlos, et al. (1999); Kalff, Schraut, et al. (1998)]. Die Anwendung von Opioiden zur postoperativen Schmerzkontrolle bewirkt eine weitere Verminderung der propulsiven gastrointestinalen Motilität (*pharmakologische Mechanismen*).

Die verschiedenen Mechanismen können nicht als unabhängig voneinander betrachtet werden; vielmehr besteht eine enge Interaktion zwischen ihnen, wobei die Gewichtung eines jeden einzelnen Faktors im Verlauf der Erkrankung variiert und eine beträchtliche Überlappung der einzelnen Faktoren besteht.

Um die dem POI zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge einordnen zu können, ist es erforderlich, die Funktionsweise des Magendarmtraktes sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen zu verstehen. Hierbei ist neben grundlegendem anatomischem Wissen ein Verständnis für die komplexe nervale Kontrolle (beispielsweise durch enterisches und vegetatives Nervensystem) der verschiedenen Darmfunktionen von Bedeutung. Im Folgenden sollen zunächst diese Grundlagen dargestellt werden, gefolgt von ihren pathologischen Veränderungen im Rahmen des POI.

## 1.2 Anatomische Grundlagen

Die Darmwand setzt sich aus verschiedenen Gewebeschichten zusammen [J. D. Wood (1981)], siehe **Abb.1**.



**Abbildung 1. Aufbau der Darmwand.**

Unter der *Lamina epithelialis mucosae* (kurz „Epithel“) befindet sich die *Lamina propria mucosae* (sog. „Propria“), gefolgt von der *Lamina muscularis mucosae* (kurz „Muscularis mucosae“); zwischen dieser dreischichtigen Schleimhaut (Mucosa) und der Muskelschicht (Tunica muscularis, „Muscularis“) liegt eine dünne Bindegewebsschicht, die *Tela submucosa* („Submucosa“), welche neben Blut- und Lymphgefäßen auch Drüsen und Nervenzellen enthält. Die *Tunica muscularis* besteht aus zwei Schichten, einer außen gelegenen Schicht longitudinal angeordneter Muskelzellen (Stratum longitudinale) und einer inneren Ringmuskelschicht (Stratum circulare). Zuäußerst schließlich findet sich als umhüllende Bindegewebsschicht die Tunica adventitia (kurz „Adventitia“).

aus: Klinke R, Silbernagl S. Lehrbuch der Physiologie, 4.Auflage. Stuttgart: Thieme 2003:395.

Unter einer durch Zotten und Mikrovilli stark vergrößerten resorptiven Oberfläche, der *Lamina epithelialis mucosae* (kurz „Epithel“) befindet sich die *Lamina propria mucosae* (sog. „Propria“), gefolgt von der *Lamina muscularis mucosae* (kurz „Muscularis mucosae“); zwischen dieser dreischichtigen Schleimhaut (Mucosa) und der Muskelschicht (Tunica muscularis, „Muscularis“) liegt eine dünne Bindegewebsschicht, die *Tela submucosa* („Submucosa“), welche neben Blut- und Lymphgefäßen auch Drüsen und Nervenzellen enthält [J. D. Wood (1981)]. Die *Tunica muscularis* besteht aus zwei Schichten, einer weiter außen gelegenen Schicht longitudinal angeordneter Muskelzellen (Stratum longitudinale) und einer inneren Ringmuskelschicht (Stratum circulare) [J. D. Wood (1981)]. Zuäußerst schließlich findet sich als umhüllende Bindegewebsschicht die Tunica adventitia (kurz „Adventitia“).

Die glatte Muskulatur des Darmes besteht aus kleinen, spindelförmigen Zellen, die in Bündel zusammengefasst sind und Querverbindungen zu Nachbarbündeln ausbilden [J. D. Wood (1981)]. Innerhalb eines jeden Bündels sind die Zellen sowohl mechanisch als auch elektrisch miteinander verknüpft [J. D. Wood (1981)]. Aufgrund dieser elektrischen Kopplung können sich entstehende Aktionspotentiale auf das gesamte Muskelzellbündel ausbreiten, welches somit als funktionelles Synzytium fungiert – eine Tatsache, die für die Regulation der gastrointestinalen Motilität von großer Bedeutung ist [Horowitz, Ward, and Sanders (1999)].

Die gesamte nervale Kontrolle der gastrointestinalen Motilität wird durch die Interaktion mehrerer Innervationssysteme erreicht, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

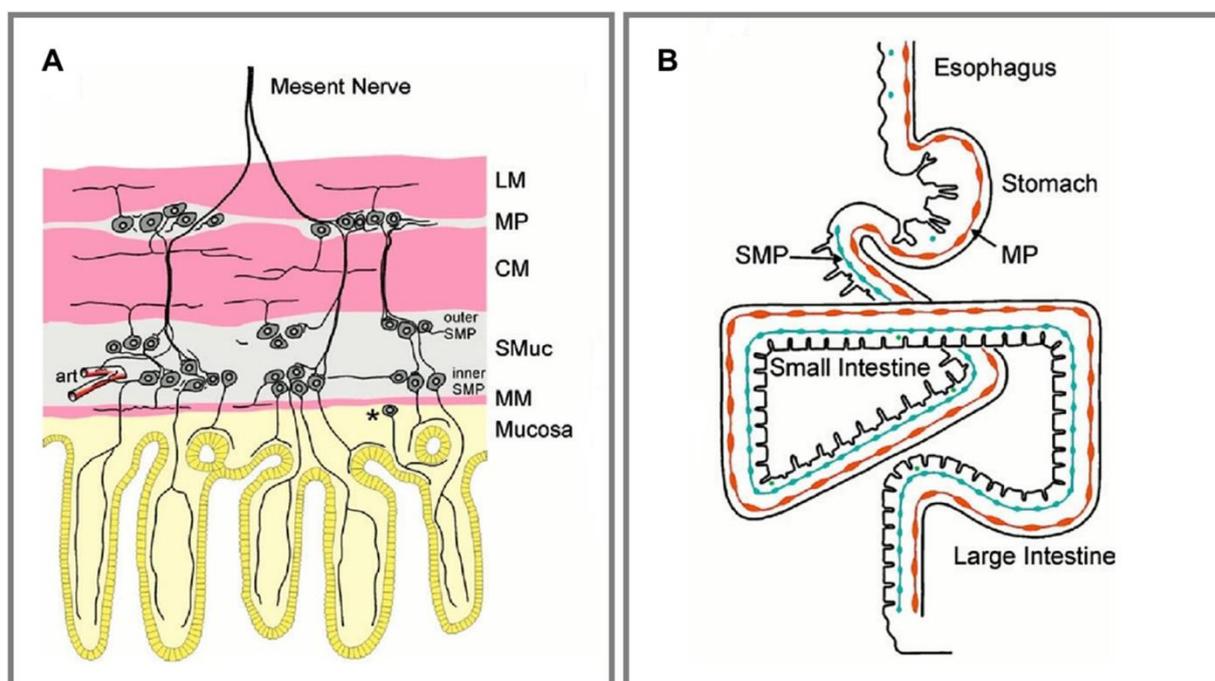
## **1.3 Das enterische Nervensystem (ENS)**

### **1.3.1 Organisation des Enterischen Nervensystems (ENS)**

#### **1.3.1.1 Allgemeine Merkmale**

Das Enterische Nervensystem (ENS) besteht aus einer Vielzahl kleiner Ganglien, die sich hauptsächlich innerhalb von zwei Nervengeflechten (Plexus) befinden – dem Plexus myentericus und dem Plexus submucosus (*siehe Abb.2a*) [Brehmer (2006)]. Der Plexus myentericus (zwischen Stratum circulare und longitudinale gelegen) bildet ein kontinuierliches Netzwerk von Ganglien und Axonbündeln, das sich vom oberen Ösophagus bis zum inneren Analsphinkter hin erstreckt. Ganglien und Faserbündel

des Plexus submucosus (zwischen Schleimhaut und Muskelschicht gelegen) finden sich hauptsächlich in Dün- und Dickdarm und nur spärlich in Ösophagus und Magen [Furness (2006)]. Die Nervengeflechte innervieren die Mucosa, die einzelnen Muskelschichten, Gefäße (intestinale Arteriolen) und andere Zielorgane (*siehe Abb.2b*). Die meisten Axone innerhalb der Plexus entspringen den Zellkörpern enterischer Ganglien; einige kommen auch von parasymphatischen oder sympathischen Leitungsbahnen und von sensorischen Ganglien (*siehe hierzu weiter unten*).



**Abbildung 2. Anordnung der Ganglien und Nervenplexus im Enterischen Nervensystem (ENS).**

**(A)** Im Dün- und Dickdarm befinden sich die Nervenzellen einerseits in Ganglien des Plexus myentericus (MP, myenteric plexus) zwischen der longitudinalen (LM, longitudinal muscle) und zirkulären (CM, circular muscle) Muskelschicht, andererseits in Ganglien der Submucosa (SMuc, submucosa); hier als Transversalschnitt durch die Darmwand dargestellt. Die Innervation der äußeren Muskelschicht erfolgt hauptsächlich durch Motoneurone, deren Zellkörper sich in myenterischen Ganglien befinden; die Innervation der inneren zirkulären Schicht hat ihren Ursprung (zumindest teilweise) in der Submucosa, die auch die Muscularis mucosae (MM) versorgt. Einige wenige Nervenzellen befinden sich auch innerhalb der Mucosa (\*), meist nahe der MM.

**(B)** Anordnung der Ganglien des Plexus submucosus (SMP, submucosal plexus, blau) und des Plexus myentericus (MP, myenteric plexus, rot) entlang des gesamten Verdauungstraktes.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

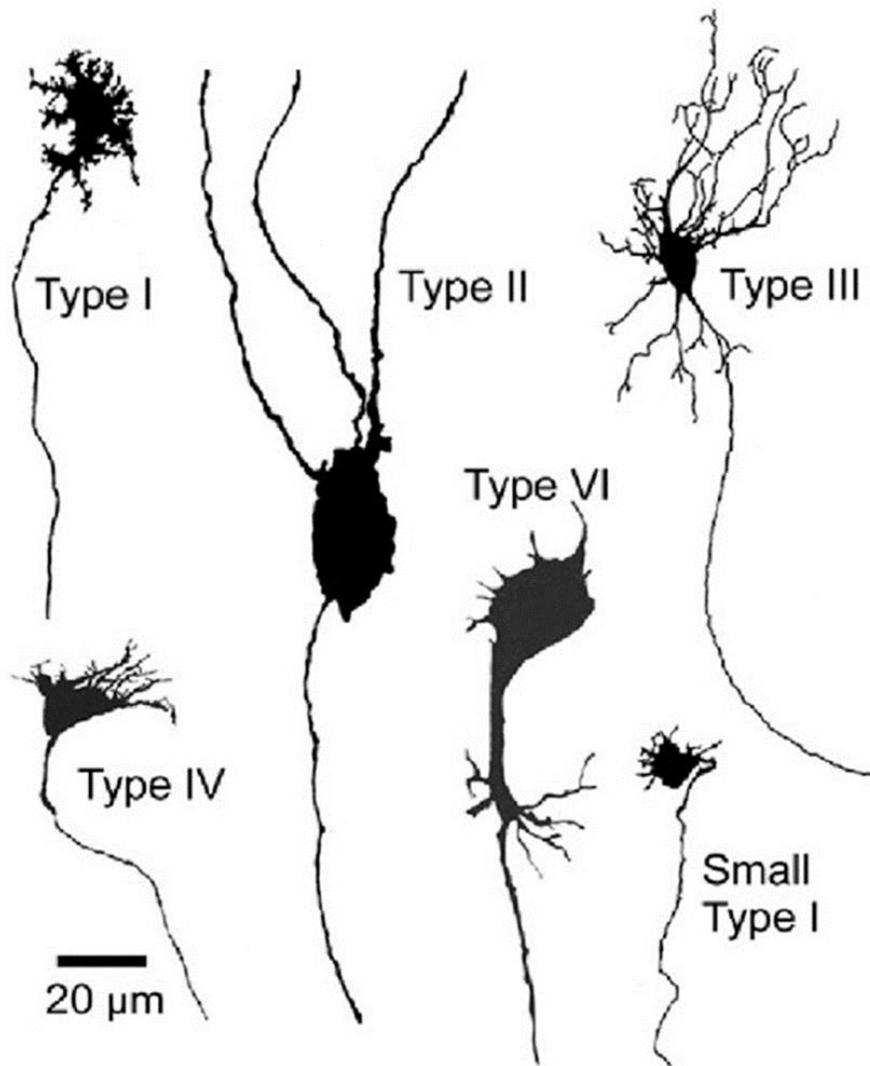
### 1.3.1.2 Neuronale Morphologie

Die Zellkörper enterischer Neurone wurden anhand ihrer Form 1890 von Dogiel und La Villa klassifiziert [Dogiel (1898); La Villa (1898)]. Die von Dogiel entwickelte Nomenklatur Typ I – III konnte sich allgemein durchsetzen und wurde später ergänzt um die Typen IV – VII [Brehmer (2006)].

Innerhalb der Neurone des ENS sind die am meisten verbreiteten Typen *Dogiel Typ I* und *II* (siehe **Abb.3**); diese beiden Typen sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.

**Typ I-Neurone** besitzen ein einzelnes Axon, sind anhand ihrer kurzen stummeligen Dendriten zu erkennen und werden allgemein als „*lamellär*“ bezeichnet, da sie ein platt gedrücktes Erscheinungsbild aufweisen (insbesondere in aufgespannten *whole-mount* Präparaten, an denen sie meist untersucht werden). Ausdehnung und Komplexität der Dendriten von *Typ I-Neuronen* nehmen mit der Größe des Säugetieres zu; bei der Maus (dem Modelltier dieser Dissertation) sind sie sehr klein und nur schwer zu identifizieren [Nurgali, Stebbing, and Furness (2004)]. Neurone unterschiedlicher funktioneller Gruppen zeigen *Typ I-Morphologie* (beispielsweise exzitatorische und inhibitorische Motoneurone zur Muskulatur sowie einige Klassen von Interneuronen).

**Typ II-Neurone** können durch ihre Form sehr leicht erkannt werden (siehe **Abb.3**). In der Lichtmikroskopie erkennt man ihre Zellkörper als runde bzw. ovale Strukturen mit glatter Oberfläche; bei hoher Auflösung und auf elektronenmikroskopischem Level erscheint ihre Oberfläche (bedingt durch vorbeiziehende Axonbündel) jedoch eher gerillt [Timmermans, Adriaensen, Cornelissen, and Scheuermann (1997)]. Generell entspringen von ihren Zellkörpern mehrere lange Fortsätze, die funktionell als Axone zu betrachten sind. Die Anzahl dieser Fortsätze variiert meist von zwei bis sechs [Bornstein, Hendriks, Furness, and Trussell (1991)]. Einige der *Typ II-Neurone* besitzen nur einen Fortsatz, dieser jedoch verzweigt sich nahezu immer nahe am Zellkörper und gibt den Neuronen ein pseudounipolares Erscheinungsbild, ähnlich der Neuronen der Hinterwurzelganglien.



**Abbildung 3. Erscheinungsbild enterischer Neurone.**

*Typ I-Neurone* besitzen kurze, verzweigte lamelläre Dendriten und nur ein einzelnes Axon. Die meisten Motoneurone und einige Interneurone besitzen *Typ I-Morphologie*. *Typ II-Neurone* erkennt man an ihren großen ovalen Zellkörpern mit multiplen Axonen, über die sie andere Neurone erreichen; sie bilden untereinander netzwerkartige Verbindungen aus.

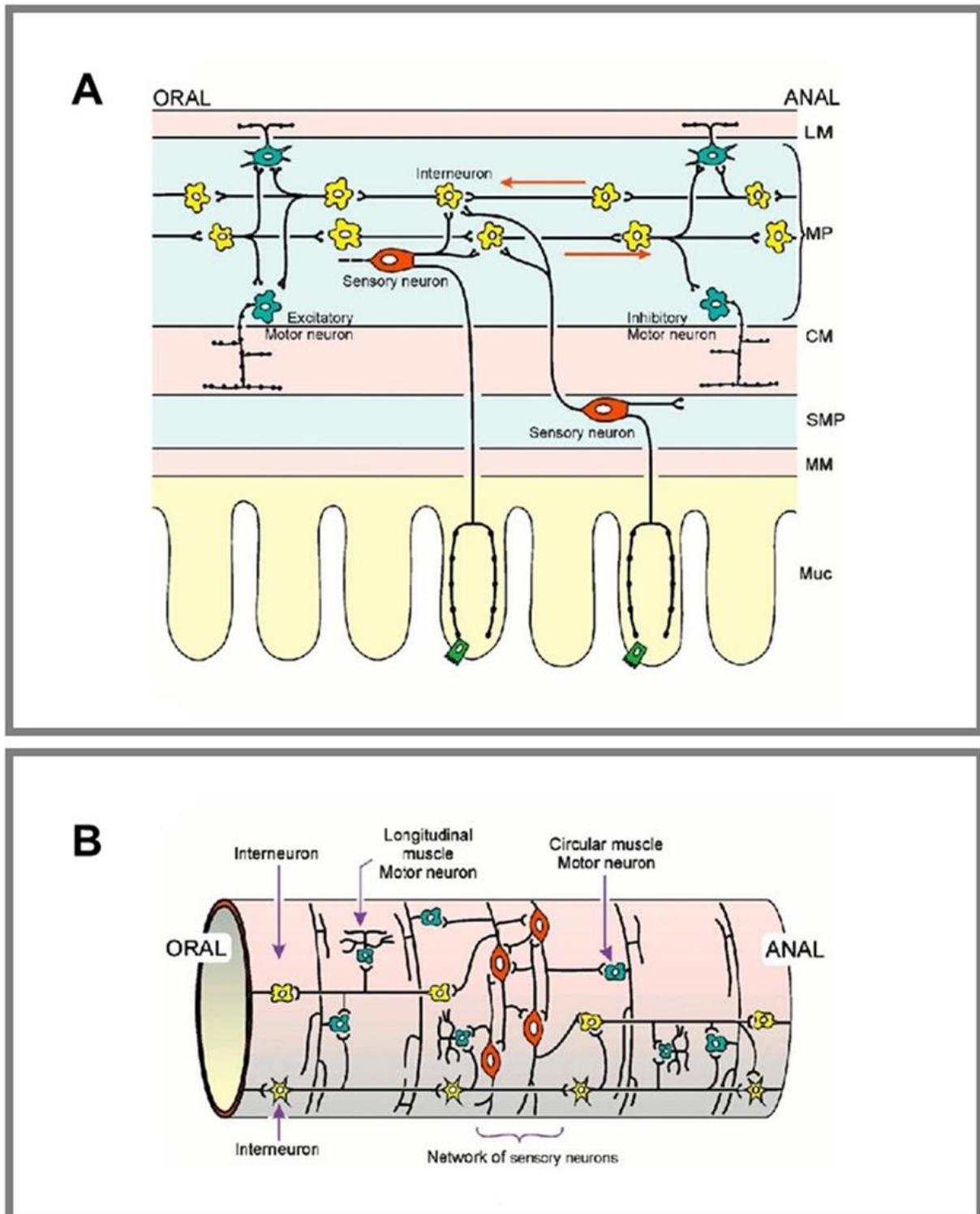
aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

Bereits Dogiel hatte erkannt [Dogiel (1899)], dass einzelne *Typ II-Neurone* ihre Fortsätze Richtung Mucosa oder zu benachbarten enterischen Ganglien entsenden (*siehe Abb.4*). Diese Beobachtung bestätigen neuere Studien, in denen Fortsätze vereinzelt bis zur Mucosa verfolgt werden konnten (Fortsätze sowohl von myenterischen als auch von mucosalen *Typ II-Neuronen*) [Bornstein et al. (1991); Hens, Vanderwinden, De Laet, Scheuermann, and Timmermans (2001); Furness, Robbins, Xiao, Stebbing, and Nurgali (2004)]. Die meisten Fortsätze verzweigen sich ausgedehnt in submucosalen und myenterischen Ganglien und bilden synaptische Kontakte mit einer Vielzahl anderer Neurone [Pompolo and Furness (1988); Bornstein et al. (1991); Furness, Trussell, Pompolo, Bornstein, and Smith (1990); Furness, Alex, Clark, and Lal (2003)].

Die langen Axone enterischer Neurone sind nicht myelinisiert. In ihren proximalen Anteilen weisen sie häufig Dornen (sog. „spines“) auf (*siehe Abb.3*), welche als Orte des synaptischen Inputs gelten [Pompolo and Furness (1990)]. Sie erstrecken sich meist über beträchtliche Distanzen und verzweigen sich ausgiebig auf dem Weg zu ihren Zielstrukturen. Ihre Nervenendigungen (sog. „Terminalen“) sind varikös und bilden mit ihren Zielzellen spezialisierte synaptische oder Synapsen-ähnliche Verbindungen [Gabella (1972); Klemm (1995)]. Die Axone enterischer Neurone können jedoch auch relativ kurz sein; in diesem Fall vermischen sie sich mit zahllosen anderen Axonen enterischen Ursprungs, aber auch mit sympathischen, vagal / pelvin efferenten Axonen und mit Axonen von Hinterwurzel- oder vagal sensorischen Ganglien.

### **1.3.2 Morphologische und neurochemische Charakteristika der ENS-Neurone**

Die myenterischen Neurone im Dünndarm von Meerschweinchen und Maus konnten bis dato zu beinahe 100% hinsichtlich Neurochemie, Form und Funktion charakterisiert werden (*vergleiche Tabelle 1*).



**Abbildung 4. Motorische Reflexkreise im Gastrointestinaltrakt.**

(A) Darstellung der neuronalen Verbindungen zur Kontrolle der Motilität (Transversalschnitt). Motorische Reflexe werden sowohl durch myenterische als auch durch submucosale sensorische Neurone initiiert. Diese erreichen einerseits Interneurone des Plexus myentericus, andererseits Motoneurone (vergleiche Abb.4b).

(B) Neuronale Reflexwege eines kurzen Darmsegments; beachte insbesondere die zirkumferentiellen Projektionen der intrinsischen sensorischen Neurone.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

Neuron Type	Guinea Pig Small Intestine			Mouse Small Intestine			Human Small Intestine		
	Code	Shape	Proportion	Code	Shape	Proportion	Code	Shape	Proportion
Intrinsic sensory neuron	ACh/NF/TK/ NeuNcyt/IB4, 80% calbindin	Type II	26%	ACh/NF/GRP/ calbindin ± calretinin	Type II	26%	ACh/NF/TK/SOM	Type II	10%
Inhibitory circular muscle motor neuron	NOSMIP	Type I	16%	NOSVIP ± NPY	Type I	23%	NOS ± VIP ± NPY	Type I	30%
Inhibitory longitudinal muscle motor neuron	NOSMIP	Small Type I	2%	NOSVIP	Small, no obvious dendrites	3%	NOS ± VIP ± NPY	Small Type I	Unknown
Excitatory circular muscle motor neuron	ACh/TK	Medium Type I	12%	ACh/TK ± calretinin	Small/medium, no obvious dendrites	21%	ACh/TK ± ENK	Type I	30%
Excitatory longitudinal muscle motor neuron	ACh/calretinin/TK	Small Type I	25%	ACh/calretinin ± TK	Small, no obvious dendrites	13%	ACh/TK ± ENK	Small Type I	Unknown
Descending interneurons	ACh/NOSMIP	Type I	5%	ACh/NOS	Type I	3%	ACh/NOSVIP	Type I	3%
Descending interneurons	ACh/5-HT	Type I	2%	ACh/5-HT	Type I	1%	Not yet definitively identified in human.		
Descending interneurons	ACh/SOM	Type III/ filamentous	4%	ACh/SOM/calretinin	Filamentous	4%	Not yet definitively identified in human.		
Ascending interneurons	ACh/TK/calretinin	Type I	5%	ACh/TK ± calretinin	Type I	4% (est.)	ACh ± TK	Type I	Unknown
Intestinoanal neurons	ACh plus a range of peptides	Type I	<1%	ACh	Not known	Not known	Shown to be present, but chemical coding and shapes not determined.		

**Tabelle 1. Eigenschaften myenterischer Neurone.**

Abkürzungen: ACh – acetylcholine; CGRP – calcitonin gene-related peptide; 5-HT – 5-hydroxytryptamine; IB4 – isolectin 4; NeuNcyt – cytoplasmic NeuN; NF – neurofilament; NOS – nitric oxide synthase; NPY – neuropeptide Y; SOM – somatostatin; TK – tachykinin; VIP – vasoactive intestinal peptide aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5. Auflage. Elsevier 2012.

### 1.3.2.1 Musculomotorische Neurone (MMN)

Analysen der Neurotransmission enterischer Neurone zeigen, dass gastrointestinale glattmuskuläre Strukturen sowohl von exzitatorischen als auch inhibitorischen Motoneuronen erreicht werden [Furness (2006)]. Durch die pharmakologische Analyse der Neurotransmission an der Muskelzelle selbst weiß man, dass für die *exzitatorische* Übertragung neben den Tachykininen (TKs) insbesondere Acetylcholin (ACh) von Bedeutung ist; für die *inhibitorische* Neurotransmission hingegen spielen Stickstoffoxid (nitric oxide; NO), VIP (vasoactive intestinal peptide) und andere eng verwandte Peptide bzw. Nucleotide (z.B. ATP) eine Rolle. Sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Motoneurone erreichen die interstitiellen Zellen von Cajal (ICCs); diese sind spontan aktiv und koordinieren unter dem Einfluss der exzitatorischen bzw. inhibitorischen Motoneurone die basale rhythmische Aktivität der glatten Muskulatur [Sanders, Hwang, and Ward (2010)]. Inhibitorische musculomotorische Neurone (iMMN) wurden als erste der Motoneurone strukturell und neurochemisch erforscht und sollen nachfolgend als erstes dargestellt werden.

#### 1.3.2.1.1 Inhibitorische musculomotorische Neurone (iMMN)

Erste Studien [Furness and Costa (1979)] konnten zeigen, dass VIP-enthaltende Nervenfasern zur *zirkulären* Muskelschicht hauptsächlich von Nervenzellkörpern des Plexus myentericus ausgehen; viele (nicht alle) dieser Axone projizieren innerhalb des Plexus zunächst nach aboral, bevor sie in den Muskel eintreten.

Inhibitorische Neurone des ENS (sowohl zur *zirkulären* als auch zur *longitudinalen* Muskelschicht) verwenden als primären Transmitter NO; NOS-Inhibitoren hemmen effektiv die Neurotransmission dieser Neurone, blockieren sie aber nicht vollständig [Bult et al. (1990); Li and Rand (1990); Sanders and Ward (1992)]. Dies ist dadurch zu erklären, dass neben NO auch VIP als Neurotransmitter vorkommt [Fahrenkrug (1979)]. Es gibt zudem Hinweise, dass ATP [Mutafova-Yambolieva et al. (2007)] bzw. auch CO [Xue et al. (2000)] eine Rolle spielen. Weitere Studien [Furness, Li, Young, and Forstermann (1994); Bornstein, Costa, Furness, and Lang (1986)] konnten zeigen, dass es sich bei inhibitorischen Motoneuronen um Neurone mit *Typ I-Morphologie* handelt. Einige innervieren Muskelzellen, die unmittelbar angrenzend an ihr Ursprungsganglion liegen; andere entsenden ihre Axone über eine gewisse Entfernung hin nach aboral, bevor sie in die Muskelzelle eintreten [Bornstein et al.

(1986); Brookes, Steele, and Costa (1991)]. Viele Neurone weisen zudem eine überlappende Innervation auf [Bornstein et al. (1986)].

#### **1.3.2.1.2 Exzitatorische musculomotorische Neurone (eMMN)**

Die genaue Charakterisierung exzitatorischer musculomotorischer Neurone gelang verhältnismäßig spät, da ihr primärer Transmitter Acetylcholin (ACh) immunhistochemisch nur schwer nachzuweisen ist. Seine immunhistochemische Identifikation ist abhängig vom Nachweis der Cholinacetyltransferase (ChAT), dem für die Synthese von Acetylcholin erforderlichen Enzym. Zum einen entfalten die hierfür erforderlichen ChAT-Antikörper im ENS nur eine ineffektive Wirkung, zum anderen existiert eine Vielzahl anderer cholinergischer Neurone im ENS, mit denen sie verwechselt werden können. Überdies kommen die Co-Transmitter der eMMN, die Tachykinine (TK), auch bei anderen Neuronenarten vor. Läsionsstudien am Dünndarm des Meerschweinchens konnten erstmals zeigen, dass TK-immunreaktive Neurone des Plexus myentericus Projektionen zur *zirkulären* Muskelschicht weiter oralwärts gelegener Dünndarmabschnitte entsenden [Costa, Furness, Llewellyn-Smith, and Cuello (1981)]. Zudem weiß man heute, dass es sich bei lokal / oralwärts projizierenden ChAT-immunreaktiven Motoneuronen um Dogiel *Typ I-Neurone* handelt [Brookes et al. (1991)]. Übereinstimmend sind bei der muskulären Innervation aller Säugetierarten TK-immunreaktive Nervenfasern (als Marker für eMMN) zu finden. Der primäre Transmitter der eMMN ist ACh, der an muscarinergen ACh-Rezeptoren seine Wirkung entfaltet. Die ACh-vermittelte exzitatorische Neurotransmission kann nahezu vollständig durch wenig selektive Muscarinrezeptorblocker (wie beispielsweise Atropin) gehemmt werden [Harrison and McSwiney (1936)]; die verbleibende Komponente dieser exzitatorischen Neurotransmission scheint nahezu ausschließlich TK vermittelt [Holzer and Holzer-Petsche (1997); Shimizu, Matsuyama, Shiina, Takewaki, and Furness (2008)].

#### **1.3.2.2 Intrinsische sensorische Neurone**

##### **1.3.2.2.1 Sensorische Neurone in Dünn- und Dickdarm**

Bereits vor über 100 Jahren wurden im Intestinum neuronale Reflexe entdeckt, die sogar dann funktionsfähig bleiben, wenn der Darm von allen extrinsischen Signalwegen abgetrennt und extrakorporal *in vitro* untersucht wird [Furness, Kunze, Bertrand, Clerc, and Bornstein (1998)]. Dies impliziert die Existenz neuronaler

Strukturen, die direkt oder indirekt den physiologischen Zustand des Darmes registrieren. Hierbei können folgende Reize Reflexe auslösen: **(1)** mechanische Veränderungen der Muskelschichten des Darms (beispielsweise deren Länge); **(2)** mechanische Reizung der Mucosa und **(3)** Veränderungen des intraluminalen chemischen Milieus. Neurone, die direkt oder indirekt derartige Veränderungen registrieren, werden konventionsgemäß als *intrinsische primäre afferente Neurone* bezeichnet [Furness, Jones, Nurgali, and Clerc (2004)].

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass es sich bei intrinsischen sensorischen Neuronen um Neurone mit *Typ II-Morphologie* handelt. Die Aktivierung dieser Neurone in der Folge mechanischer Stimulation und Änderung des intraluminalen chemischen Milieus konnte durch synaptische Blockade nicht verhindert werden; sie sind somit keinem anderen Neuron nachgeschaltet und registrieren den Stimulus selbst („primär“) [Kirchgessner, Tamir, and Gershon (1992); Kunze, Bornstein, and Furness (1995); Kunze, Furness, Bertrand, and Bornstein (1998); Bertrand, Kunze, Bornstein, Furness, and Smith (1997); Mao, Wang, and Kunze (2006); Bayguinov, Hennig, and Smith (2010)]. Dies wurde erstmals von Dogiel erkannt [Dogiel (1899)], der diese Nervenzellen zunächst als *sensorische Neurone* bezeichnete. Neben *Typ II-Neuronen* scheinen auch andere neuronale Komponenten der enterischen Regelkreise mechanische Veränderungen der äußeren Muskelschicht zu registrieren [Kunze et al. (1998); Spencer and Smith (2004); Smith, Spencer, Hennig, and Dickson (2007); Mazzuoli and Schemann (2009)], nämlich Inter- und Motoneurone.

Es gibt eine Vielzahl chemischer Marker für *Typ II-Neurone*; allerdings sind diese Marker nicht beliebig zwischen den verschiedenen Spezies übertragbar. Bei allen untersuchten Spezies (inklusive Mensch, Meerschweinchen, Schwein, Rind und Schaf) weisen *Typ II-Neurone* Immunreaktivität gegenüber NF (Neurofilament) auf, partiell auch gegenüber ChAT und / oder CGRP (oft auch TK) [Rivera, Thacker, and Furness (2009); Qu et al. (2008)].

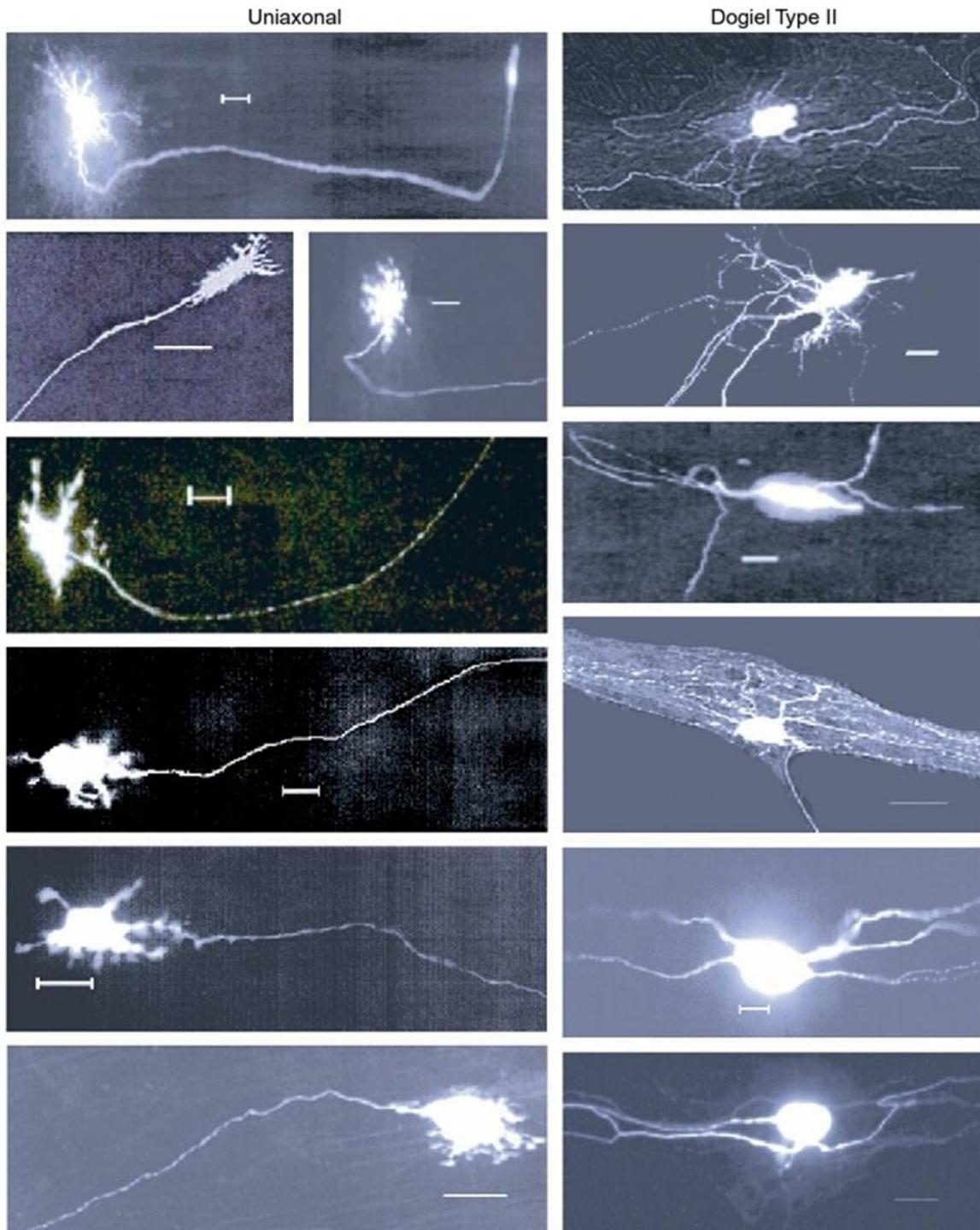
Weder eine Veränderung des chemischen Milieus noch ein mechanischer Stimulus bleiben auf eine Reichweite im Submillimeterbereich begrenzt. *Typ II-Neurone* bilden Netzwerke aus, innerhalb derer die Aktivierung eines Neurons zu einer verstärkten Erregbarkeit seiner Nachbarneurone führt [Kunze and Furness (1999)]. *Typ II-Neurone* werden somit gruppiert aktiviert, und erst die integrierte Aktivität vieler untereinander verbundener *Typ II-Neurone* bewirkt eine Reflexantwort. Computersimulationen zeigen, dass die Gruppenaktivität von *Typ II-Neuronen* mit

den spezifischen Eigenschaften enterischer Reflexe korreliert [Thomas, Sjøvall, and Bornstein (2004)]. Heute weiß man, dass die Neurotransmission zwischen einzelnen intrinsischen sensorischen Neuronen auf langsamen exzitatorischen synaptischen Potentialen beruht, die zumindest partiell über Tachykininfreisetzung vermittelt werden [Johnson, Bornstein, Yuan, and Furness (1996)].

Die mucosalen Nervenendigungen von *Typ II-Neuronen* werden vom Inneren des Darmes (dem Darmlumen) durch Epithelzellen getrennt. Die Aktivierung sensorischer Nervenendigungen (beispielsweise durch eine Änderung der chemischen Zusammensetzung des Darminhalts) muss somit indirekt erfolgen, etwa durch die lokale Freisetzung von Hormonen aus enteroendokrinen Zellen oder durch intraluminal lokalisierte Substanzen, die durch das Epithel hindurch bis in die Nachbarschaft der entsprechenden Nervenendigungen gelangen. Man nimmt an, dass für die Transduktion luminaler Signalen 5-HT (aus enteroendokrinen Zellen) eine wichtige Rolle spielt. Zusätzlich scheinen aber auch andere Signalmoleküle wie beispielsweise ATP involviert [Bayguinov et al. (2010); Bertrand (2009)].

### 1.3.2.3 Interneurone

Die Existenz von Interneuronen kann sowohl durch Läsionsstudien als auch durch neurochemische und funktionelle Untersuchungen nachgewiesen werden. Solche Studien konnten sowohl aufsteigende als auch absteigende Interneurone identifizieren [Brookes, Meedeniya, Jobling, and Costa (1997)]. Für den Dünndarm des Meerschweinchens konnten drei deszendierende Interneurontypen (mit Zellkörpern in myenterischen Ganglien) sowie ein ascendierender Interneurontyp identifiziert werden. Die Datenlage ist aktuell jedoch noch unzureichend; die Charakterisierung von Interneuronen in Dickdarm [Lomax and Furness (2000)] und Magen [Schemann, Reiche, and Michel (2001)] zeigt jedoch, dass sich Interneuronpopulationen von Region zu Region unterscheiden. Es scheint gesichert, dass im Plexus submucosus des Meerschweinchens (einem verhältnismäßig einfach organisierten Plexus) keine Interneurone vorkommen. Im Gegensatz dazu finden sich zahlreiche Interneurone im komplexer aufgebauten Plexus submucosus größerer Säugetiere (wie beispielsweise dem Schwein) [Brehmer, Rupprecht, and Neuhuber (2010)]. Die Analyse intrinsischer neuronaler Schaltkreise der Submucosa des Menschen gestaltet sich technisch sehr schwierig, Ergebnisse liegen hier noch nicht vor.



**Abbildung 5. Darstellung typischer *Typ I-* und *Typ II-Neurone* mittels Biocytin-Markierung.**

Neurone mit uniaxonaler Morphologie (linke Seite) zeigen S-elektrophysiologische Eigenschaften, Dogiel *Typ II-Neurone* (rechte Seite) hingegen AH-Eigenschaften. Calibration bars 20 µm.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

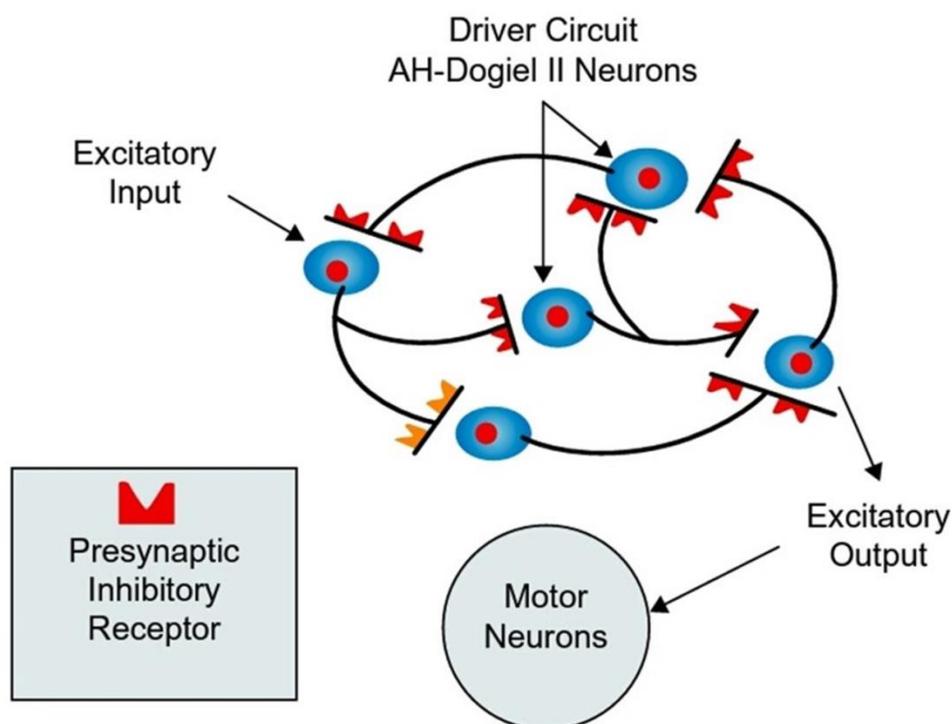
### 1.3.3 Neurophysiologie enterischer Neurone

#### 1.3.3.1 Enterische AH- und S-Neurone

Hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften lassen sich die enterischen Neurone in zwei unterschiedliche Typen einteilen. Auf der einen Seite AH-Neurone mit multipolarer Dogiel Typ II-Morphologie, auf der anderen Seite uniaxonale S-Neurone mit multiplen kurzen Dendriten (*siehe Abb.5*).

##### 1.3.3.1.1 AH-Neurone

AH-Neurone sind als Interneurone synaptisch miteinander verbunden, um benachbarte Neurone antegrad innerhalb eines entsprechenden Regelkreises zu erregen (*siehe Abb.6*).



**Abbildung 6. Positiver „feed-forward“ Regelkreis.**

Die Neurone des Regelkreises bilden multiple excitatorische synaptische Verbindungen untereinander aus, so dass ein positiver „feed-forward“ Fluss excitatorischer Signale resultiert.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

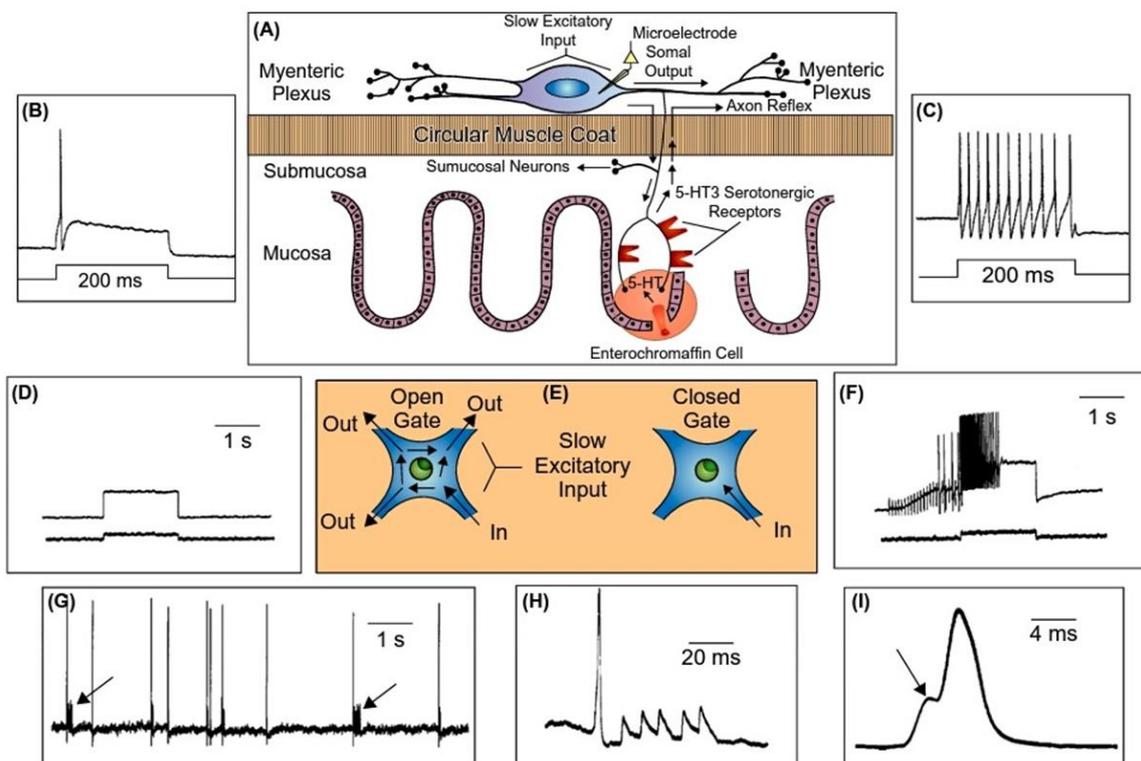
Die einzelnen Neurone eines solchen Regelkreises werden dabei umlaufend über die jeweiligen exzitatorischen synaptischen Verbindungen erregt, weshalb diese Art der neuronalen Verbindung auch als positiver „*feed forward*“ Regelkreis bezeichnet wird [Kunze, Furness, and Bornstein (1993)]. In einem „*feed forward*“ Regelkreis ermöglicht die synaptische Architektur, dass jedes einzelne Mitglied des Regelkreises schnell von einer Erregung erreicht wird (inklusive Überschreitung des Schwellenwerts für die Entstehung eines Aktionspotentials). Diese schnelle Erregung bzw. Entladung individueller Neurone des Regelkreises sichert eine simultane Aktivierung des gesamten neuronalen Netzwerks im jeweiligen Darmsegment [Thomas, Bertrand, and Bornstein (2000); Thomas and Bornstein (2003)]. Über den neuronalen Output des Regelkreises erfolgt die simultane Aktivierung entsprechender Motoneurone, welche die Ausbreitung der kontraktile Kräfte innerhalb der Muskulatur bewirken und so die Propulsion des Darminhalts ermöglichen.

Die Erregung von AH-Neuronen durch parakrine Mediatoren und / oder exzitatorischen synaptischen Input benachbarter Neurone des neuronalen Netzwerks stellt eine Schlüsselfunktion für deren „Gating“-Funktion dar. Die „Gating“-Eigenschaften der Zellkörper enterischer AH-Neurone kontrollieren die Erregungsausbreitung von Neuron zu Neuron innerhalb der entsprechenden Regelkreise (siehe **Abb.6** und **7**). Dabei bestimmt der Zustand des somalen „Gates“ (z.B. offen, geschlossen oder partiell geöffnet) das Output-Verhalten des Regelkreises. Wenn durch exzitatorischen synaptischen Input bzw. einen entsprechenden parakrinen Input die somalen „Gates“ vollständig geöffnet sind, feuern alle AH-Neurone des Regelkreises synchron. Im anderen Extremfall hingegen sind alle „Gates“ geschlossen und die Zellkörper der AH-Neurone sind nicht erregbar. Das „Gating“ kontrolliert demnach die Ausbreitung von Aktionspotentialen zwischen den multiplen Neuriten der AH-Neurone.

#### **1.3.3.1.2 S-Neurone**

Im Gegensatz zu AH-Neuronen, die nach ihrer charakteristischen späten Nachhyperpolarisation (after-hyperpolarization, AH) benannt wurden, erhielten S-Neurone („synaptische“ Neurone) ihren Namen aufgrund ihres Rezeptorbesatzes – nahezu alle enterischen S-Neurone exprimieren nikotinerge Acetylcholinrezeptoren.

Im Vergleich zu AH-Neuronen zeigen S-Neurone mit höherer Wahrscheinlichkeit spontane Aktionspotentialentladungen. Zu beachten bleibt, dass auch AH-Neurone spontan feuern, wenn sie durch exzitatorische Neurotransmitter bzw. parakrine Mediatoren stimuliert werden.



**Abbildung 7. Die „Gating“-Funktion der Zellkörper von AH-Interneuronen im ENS.**

(A) AH-Neurone des Plexus myentericus entsenden ihre Neuriten in Richtung Mucosa. Das hier freigesetzte 5-HT bindet an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und bewirkt im nachgeschalteten Neuron ein Aktionspotential. Die Erregung wird bidirektional (Pfeile) in Richtung Plexus submucosus und myentericus weitergeleitet; dabei bestimmt die Erregbarkeit der jeweiligen Zellkörper, wie die eintreffende Information weiter verarbeitet wird („Gating“).

(B) Aktionspotential eines myenterischen AH-Neurons in intermediärem Erregbarkeitszustand.

(C) Aktionspotentiale desselben AH-Neurons nach Histaminapplikation (Steigerung der Erregbarkeit).

(D) Myenterisches AH-Neuron im nicht erregbaren Zustand (geschlossene „Gates“).

(E) Funktionsweise der somalen „Gates“ eines AH-Neurons; langsamer exzitatorischer Input vermag die Erregbarkeit der Somamembran zu steigern und somit das „Gate“ zu öffnen.

(F) Stimulation (sEPSP) eines zunächst nicht erregbaren AH-Neurons steigert dessen Erregbarkeit.

(G) Im Zellkörper eines AH-Neurons eintreffende Aktionspotentiale; nur das erste eintreffende Aktionspotential erregt das Soma (Ursache ist die Nachhyperpolarisation des Membranpotentials).

(H/I) Aktionspotential aus (G) bei höherer zeitlicher Auflösung (Calibration bar 20 bzw. 4 ms). Der Pfeil markiert den für die Auslösung des Aktionspotentials nötigen Schwellenwert.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

### 1.3.3.2 Synaptische Übertragung

Die Mechanismen der chemisch vermittelten synaptischen Übertragung unterscheiden sich nicht zwischen ENS und ZNS. Die Freisetzung von Neurotransmittern erfolgt durch  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte Exozytose; Neurotransmitterdepots befinden sich in den Vesikeln der axonalen Terminalen und in transaxonalen Varikositäten und der depolarisierende Effekt eines Aktionspotentials führt über die Öffnung Spannungs-abhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle schließlich zur Transmitterfreisetzung. Die freigesetzten enterischen Neurotransmitter binden an spezifische postsynaptische Rezeptoren und entfalten ihre charakteristische ionotrope bzw. metabotrope Wirkung. Sind die Rezeptoren direkt an einen Ionenkanal gekoppelt, nennt man sie „*ionotrop*“; wenn sie indirekt über GTP-bindende Proteine (GTP, guanosine triphosphate) und second messenger (z.B. cAMP,  $\text{IP}_3$  oder DAG) die Öffnung bzw. den Schluss eines Ionenkanals bewirken, nennt man sie „*metabotrop*“. Synaptische Ereignisse des ENS sind prinzipiell vergleichbar mit denen in Gehirn und Rückenmark (ZNS). *EPSPs* (exzitatorische postsynaptische Potentiale), *IPSPs* (inhibitorische postsynaptische Potentiale) und *präsynaptische Hemmung* bzw. *Bahnung* sind die wichtigsten synaptischen Funktionen in ENS und ZNS. Mechanismen für die *langsame* (slow, „s“) und *schnelle* (fast, „f“) synaptische Neurotransmission existieren häufig für ein und dasselbe Neuron. *Schnelle* synaptische Potentiale dauern einige Millisekunden, *langsame* synaptische Potentiale hingegen mehrere Sekunden, Minuten oder noch länger. Bei *schnellen* synaptischen Potentialen handelt es sich zumeist um *EPSPs*; bei *langsamen* synaptischen Potentialen treten gleichermaßen *EPSPs* und *IPSPs* auf.

Bereits frühe elektrophysiologische Studien zeigen die Existenz schneller *EPSPs* (*fEPSPs*) in S-Neuronen des Plexus myentericus [Hirst, Holman, and Spence (1974)]. Folgestudien konnten *fEPSPs* sowohl in S- als auch in AH-Neuronen des Plexus myentericus und submucosus nachweisen [Hirst and McKirdy (1975); Nishi and North (1973)]. Bei *fEPSPs* handelt es sich um Depolarisationen kurzer Zeitdauer (< 50 ms). Sie sind für die schnelle Übertragung bzw. Verarbeitung von Informationen innerhalb enterischer Mikroregelkreise verantwortlich und bestimmen den Grad der Membrandepolarisation (und somit die Schwelle zur Entstehung eines Aktionspotentials). Durch die Summation vieler eintreffender Inputs erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass der Schwellenwert erreicht wird. Auf der anderen Seite

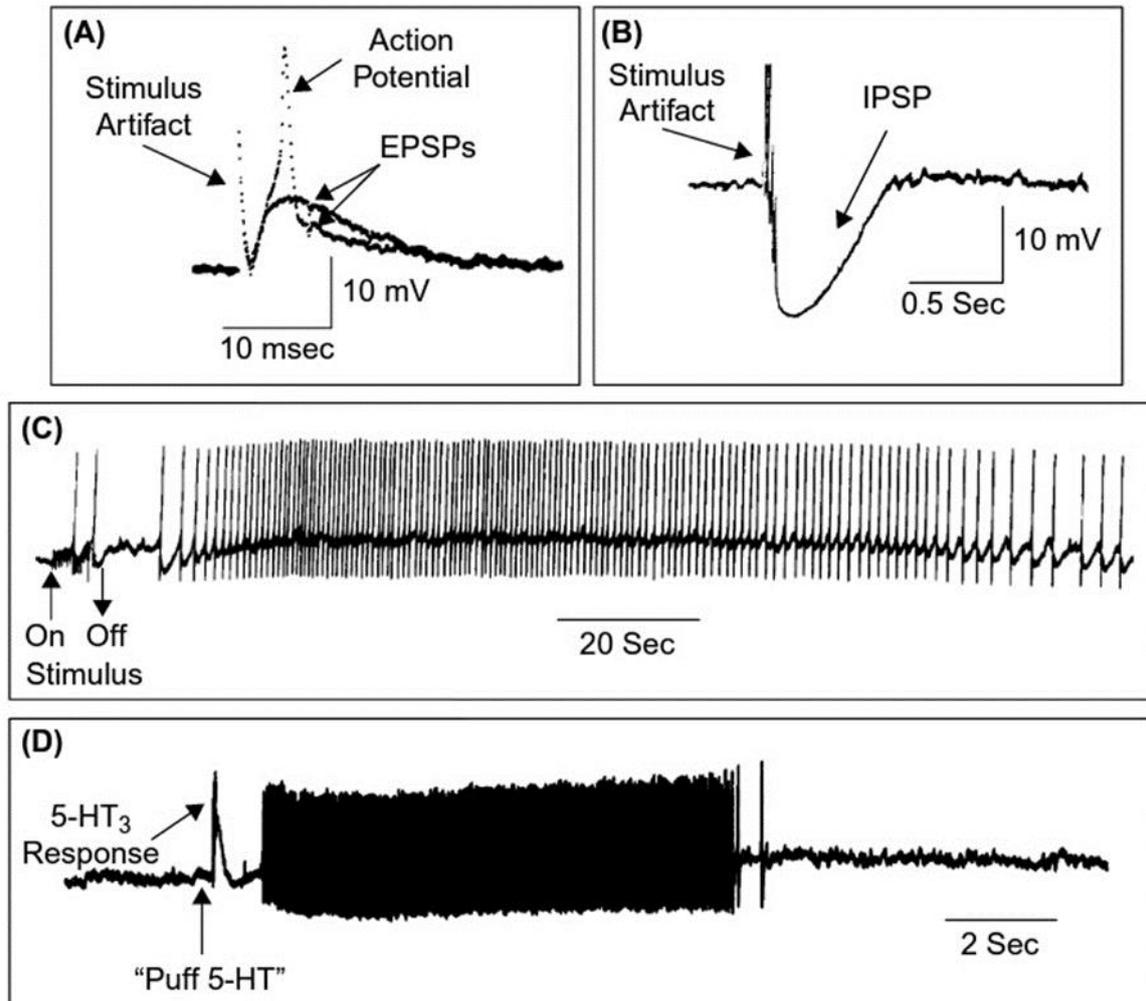
kann dieser nicht erreicht werden, wenn sich die neuronale Membran durch langsame IPSPs in einem hyperpolarisierten Zustand befindet.

Bei *langsamen inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (sIPSPs)* handelt es sich um hyperpolarisierende synaptische Potentiale. SIPSPs entstehen langsam, dauern mehrere Sekunden und sind als hyperpolarisierende Potentiale mit einer abgeschwächten Inputresistenz und verringerten Erregbarkeit assoziiert. Verschiedene Neurotransmitter und parakrine Substanzen entfalten sIPSP-ähnliche Wirkung; wichtige Vertreter sind **Norepinephrin**, sowie **Opiate und Opioide** [Liu et al. (2001); J. D. Wood and Galligan (2004)]. Da sIPSPs neben einer Minderung der Membranresistenz und -erregbarkeit auch eine Membranhyperpolarisation bewirken, verringern sie die Wahrscheinlichkeit, dass ein Aktionspotential entsteht; sprich: durch die sIPSPs die Wahrscheinlichkeit verringert, dass ein schneller exzitatorischer synaptischer Input die Somamembran tatsächlich erregen kann (*siehe Abb.6 und 7*). Charakteristisch für *sEPSPs* ist eine langsame Membrandepolarisation, die mehrere Sekunden bis Minuten (manchmal Stunden) andauert; auch sie führt zur Freisetzung von Neurotransmittern aus der präsynaptischen Nervenendigung (*siehe Abb.8*). Es gibt Substanzen, die langsame EPSPs imitieren, beispielsweise Serotonin (5-HT), Acetylcholin, Histamin und Bradykinin. Durch langsame EPSPs erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass im AH-Neuron ein Aktionspotential entsteht. Dies ist insbesondere für die peristaltischen Propulsionen des Intestinums von Bedeutung; hier muss für eine effektive Propulsion die neuronale Schubkraft über mehrere Sekunden aufrecht erhalten werden, was nur durch eine kontinuierliche neuronale Aktivität des entsprechenden Mikroregelkreises gewährleistet werden kann. Soll also eine Erregung / Hemmung der intestinalen Muskulatur über längere Zeit aufrechterhalten werden, dann können AH-Neurone diese Anforderung unter dem Einfluss von sEPSPs erfüllen.

Die *präsynaptische Bahnung* bedeutet eine Verstärkung der synaptischen Übertragung und beruht auf der Wirkung chemischer Substanzen am Ort der Neurotransmitterfreisetzung. Man kennt dieses Phänomen bei schnellen exzitatorischen Synapsen im Plexus myentericus von Dünndarm und Magenantrum sowie bei noradrenergen inhibitorischen Synapsen des Plexus submucosus.

Die *präsynaptische Hemmung* schließlich beruht auf Mechanismen, die zu einer Unterdrückung der Neurotransmitterfreisetzung an Axonterminalen und -varikositäten führen. Ein zentraler Mechanismus der präsynaptischen Hemmung ist die Bindung

chemischer Substanzen an inhibitorische Rezeptoren, die sich an der axonalen Freisetzungsstelle der entsprechenden Transmitter befinden. Durch die präsynaptische Hemmung wird eine überschießende Erregung in „feed-forward“ Regelkreisen verhindert (siehe **Abb.6**).



**Abbildung 8. Schnelle und langsame EPSPs und IPSPs.**

**(A)** Zwei schnelle EPSPs eines myenterischen S-Neurons. Lediglich eines der beiden EPSPs konnte die Schwelle für die Entstehung eines Aktionspotentials überschreiten.

**(B)** Langsames IPSP nach Stimulation eines non-cholinergen Neurons im Plexus submucosus.

**(C)** Langsames EPSP nach repetitiver elektrischer Stimulation eines myenterischen AH-Neurons.

**(D)** Mimikry der schnellen und langsamen Neurotransmission durch 5-HT am Beispiel eines myenterischen AH-Neurons nach parakriner Freisetzung aus enterochromaffinen Zellen. Die „schnelle“ Antwort entspricht der Stimulation des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorsubtyps inklusive Öffnung des entsprechenden Ionenkanals; die verzögerte und lang andauernde sEPSP-ähnliche Antwort hingegen beruht auf der Aktivierung des 5-HT<sub>1P/7</sub>-Rezeptorsubtyps.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

### 1.3.4 ENS und Immunabwehr

Etwa 70-80% der Immunzellen des Körpers befinden sich im Gastrointestinaltrakt. Man findet sie in der *Lamina propria mucosae* und in den *Payerschen Plaques* im Dünndarm. Die Innervation dieser meist diffus verteilten Zellen ist strukturell nur schwer nachweisbar; dennoch existieren multiple Hinweise auf neuroimmune Interaktionen [Furness, Kunze, and Clerc (1999); Gross and Pothoulakis (2007)]. Untersuchungen an verschiedenen Spezies einschließlich Katze [Feher, Fodor, and Burnstock (1992)], Schwein [Kulkarni-Narla, Beitz, and Brown (1999)], Hamster [Pfoch and Unsicker (1972)] und Maus [B. Ma, Jablonska, Lindenmaier, and Dittmar (2007)] konnten innervierende Fasern in den Follikeln der Payerschen Plaques nachweisen. Es handelt sich hier um submucosale Neurone mit Immunreaktivität gegenüber CGRP, Calbindin und ChAT; bislang bleibt unklar, ob es sich um eine oder mehrere Neuronenpopulationen handelt.

Des Weiteren konnten Makrophagen zwischen einzelnen Muskelzellbündeln der *zirkulären und longitudinalen Muskelschicht* in Dün- und Dickdarm nachgewiesen werden [Faussonne-Pellegrini, Pantalone, and Cortesini (1990)]. Sie liegen „sandwichartig“ formiert zwischen den einzelnen Muskelzellbündeln und bilden enge Kontakte sowohl zu den ICCs als auch zu glatten Muskelzellen aus [Faussonne-Pellegrini et al. (1990)]; ebenso zeigt sich eine enge Assoziation der Makrophagen zum *Plexus myentericus*. Die Lokalisation dieser Immunzellen erweist sich als ideal, um Einfluss auf die Regulation beispielsweise der ICC-Schrittmacheraktivität zu nehmen. Zudem können Makrophagen die Freisetzung von Transmittern wie Substanz P (SP), Acetylcholin und Norepinephrin aus den Neuronen des Plexus myentericus beeinflussen [Collins et al. (1992)].

Neben der beschriebenen Nähe der Immunzellen zur glatten Muskulatur existieren Makrophagen auch als umrahmende Zellen von Blutgefäßen, welche die Tunica muscularis durchziehen [Kalff, Schwarz, Walgenbach, Schraut, and Bauer (1998)]. Werden diese Makrophagen aktiviert, kommt es durch Zytokinfreisetzung zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, was die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen fördert [Carlos and Harlan (1994); X. Wang, Feuerstein, Gu, Lysko, and Yue (1995)]. Ebenso scheinen die nahe mesenterialer Mikrogefäße gelegenen Abwehrzellen als Sensoren zu fungieren, welche die Translokation von bakteriellen Produkten aus dem Darmlumen frühzeitig erkennen [Kalff, Schwarz, et al. (1998)]. Williams et al. konnten zudem zeigen, dass

Mastzellen der intestinalen Mucosa eng mit vagalen afferenten Nervenfasern assoziiert sind [Williams, Berthoud, and Stead (1997)]. Die Arbeit von Jiang et al. [Jiang et al. (2000)] lieferte weitere Hinweise auf die Interaktion zwischen Mastzellen und vagalen afferenten Nervenfasern; so können Mastzellmediatoren (wie Histamin und Serotonin) mesenteriale afferente Nervenfasern stimulieren [Jiang et al. (2000)]. Der im Hirnstamm gelegene Hirnnervenkernkomplex des Nucleus tractus solitarii (NTS; siehe weiter unten) empfängt unter anderem sensorische afferente Fasern des N. vagus aus dem Gastrointestinaltrakt [Watkins, Maier, and Goehler (1995)]. Im Rahmen einer allergischen Reaktion (und damit einhergehenden Mastzellaktivierung) innerhalb der Lamina propria werden Neurone des NTS aktiviert [Kreis, Muller, Zittel, Glatzle, and Grundy (2000)]; auf diese Weise können Informationen über eine Stimulation von Immunzellen im Darm nach zentral übermittelt werden. Durch den immunhistochemischen Nachweis von Fos-Protein in den Zellkernen des NTS wird es möglich, deren Aktivierung im Rahmen einer Entzündung auch experimentell nachzuweisen (*siehe hierzu weiter unten*).

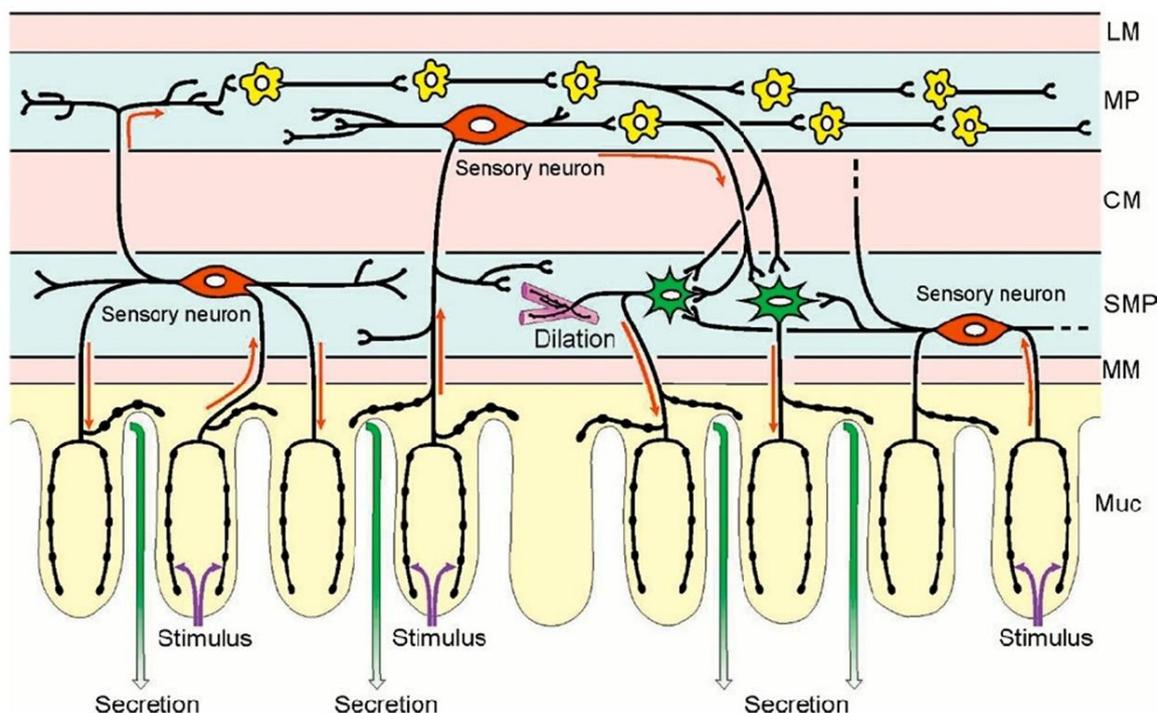
### **1.3.5 Die Organisation enterischer Regelkreise: Motilität vs. Sekretion**

Die Organisation neuronaler Regelkreise zur Kontrolle der Motilität wurde in zahlreichen Studien erforscht (*vergleiche Abb.4*) [Gwynne and Bornstein (2007b)]. Der auf Grundlage solcher Studien angenommene Aufbau eines Regelkreises stellt eine starke Vereinfachung dar. In der Tat kann ein und derselbe Regelkreis eine ganze Reihe von Verhaltensprogrammen aufweisen. Im Dünndarm beispielsweise koordiniert ein motorischer Regelkreis lokale propulsive peristaltische Bewegungen, Mischbewegungen und MMCs (migrating motor complexes), falls erforderlich aber auch gegenläufige Propulsionen zur Entfernung schädlicher Substanzen. Durch experimentelle Manipulationen wurden Stimuli entdeckt [Ferens, Baell, Lessene, Smith, and Furness (2007); Gwynne and Bornstein (2007a)], die einen Wechsel der einzelnen Motilitätsmuster im Intestinum bewirken. Allein aus der Kenntnis des Regelkreises kann jedoch nicht abgeleitet werden, wie es zu diesem Wechsel kommt.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der hochauflösenden konfokalen Mikroskopie konnten die neuronalen Verbindungen innerhalb der Motilitätskontrollierenden neuronalen Regelkreise dargestellt werden. Zudem konnten durch immunhistochemische Methoden die beteiligten Neurone identifiziert werden. Durch

diese Studien weiß man heute, dass intrinsische sensorische Neurone einerseits untereinander, andererseits aber auch mit Interneuronen und Motoneuronen direkt synaptisch verbunden sind [Pompolo and Furness (1988); Pompolo and Furness (1993); Pompolo and Furness (1998)]. Die direkte synaptische Verbindung mit Motoneuronen impliziert eine mögliche monosynaptische Organisation von lokalen Reflexen. Im Gegensatz dazu lässt die synaptische Verbindung zu Interneuronen wie auch die Anordnung von interneuronalen Verbindungsketten (mit Projektion nach oral oder aboral) entlang des Intestinums [Mann, Southwell, Young, and Furness (1997)] einen multisynaptischen Signalweg vermuten. Durch pharmakologische Analysen konnten die chemischen Grundlagen der Neurotransmission innerhalb neuronaler Regel- bzw. Steuerkreise identifiziert werden. Damit und mit dem Wissen um die Lokalisation von Neurotransmittern inklusive deren Rezeptoren kann man auf synaptische Verbindungen innerhalb von Reflexschleifen schließen [Bornstein, Furness, Kunze, and Bertrand (2002)]. Die Ergebnisse solcher Studien lassen vermuten, dass es sich bei den Mediatoren der schnellen exzitatorischen neuronalen Übertragung myenterischer Neurone um ACh, ATP und 5-HT handelt. Für die langsame exzitatorische Transmission scheinen sowohl 5-HT als auch Tachykinine verantwortlich [Gwynne and Bornstein (2007b); Galligan, LePard, Schneider, and Zhou (2000); Johnson and Bornstein (2004); Monro, Bornstein, and Bertrand (2005)]. Neben Regelkreisen zur Koordination der muskulären Darmaktivität existieren auch solche zur Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie des Blutflusses (*siehe Abb.9*). Sowohl die Distension der Darmwand als auch eine mechanische oder chemische Stimulation der Mucosa führt zu secretomotorischen und vasodilatatorischen Reflexen [Vanner and Macnaughton (2004); Frieling, Wood, and Cooke (1992); Vanner, Jiang, and Surprenant (1993)], die auch dann noch zu beobachten sind, wenn der Darm extrinsisch denerviert wurde [Cooke, Sidhu, Fox, Wang, and Zimmermann (1997); Weber, Neunlist, Schemann, and Frieling (2001)]. Man kann somit davon ausgehen, dass auch diese Reflexe (ähnlich wie die motorischen Reflexe) über intrinsische neuronale Reflexkreise vermittelt werden. Reflexe, die durch eine mechanische Stimulation der Mucosa oder durch Distension des Darmes verursacht werden, werden ausschließlich über den Plexus submucosus vermittelt. Dies bestätigen Studien an Darmpräparaten, bei denen lediglich Mucosa und Submucosa erhalten waren [Frieling et al. (1992); Weber et al. (2001)]. Hier erfolgte die Innervation der secretomotorischen und secretomotorisch-

vasodilatatorischen Neurone über intrinsische sensorische Neurone submucosaler Ganglien [Furness et al. (2003); Lomax, Bertrand, and Furness (2001); Reed and Vanner (2001)].



**Abbildung 9. Organisation sekretomotorischer und vasodilatatorischer Reflexe.**

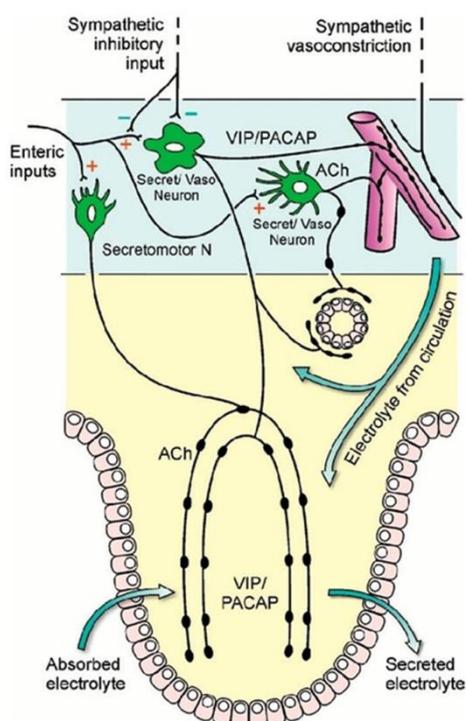
Secretomotorische und vasodilatatorische Reflexe werden durch die Aktivierung intrinsischer sensorischer Neurone initiiert, meist nach Stimulation deren mucosaler Terminalen. Reflektorische sekretorische Vorgänge werden durch drei verschiedene Regelkreise gesteuert. (1) Erstens können sie als monosynaptischer Reflex (als Axonreflex oder trans-somatischer Reflex) ausgerichtet sein; (2) zweitens können sie über synaptische Verbindungen zwischen intrinsischen sensorischen Neuronen und secretomotorischen bzw. secretomotorisch-vasodilatatorischen Neuronen submucosaler Ganglien geschaltet werden (quasi am Plexus myentericus vorbei); (3) drittens kann die Erregung auch über myenterische Ganglien die secretomotorischen bzw. secretomotorisch-vasodilatatorischen Neurone der submucosalen Ganglien erreichen.

Die Pfeile markieren die Richtung des Informationsflusses innerhalb der entsprechenden Regelkreise. MUC – mucosa; MM – muscularis mucosae; SMP – submucosal plexus; CM – circular muscle; MP – myenteric plexus; LM – longitudinal muscle.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

Sowohl strukturelle als auch funktionelle Analysen lassen eine integrative Kontrolle von Sekretion und mucosalem Blutfluss vermuten (siehe **Abb.10**). Das die Mucosa versorgende Blut stellt eine nicht unerhebliche Quelle für die Sekretion von

Flüssigkeit dar. Die Menge bidirektionaler Flüssigkeitsbewegungen über die Mucosa des Dünndarms beträgt täglich mehr als 10 Liter [Furness (2006)] bzw. das doppelte Blutvolumen. Ernste Konsequenzen sind somit kaum zu vermeiden, wenn es zu einer Dysregulation dieses Mechanismus kommt. In einem solchen Fall überwiegen Einflüsse des sympathischen Nervensystems und übernehmen die Steuerung der enterischen Regelkreise (*siehe Abb.10*). Die Steuerung gastrointestinaler Funktionen ist somit nicht unerheblich von Sympathikus und Parasympathikus abhängig – auf die Innervation des Gastrointestinaltraktes durch spinale und vagale Nervenfasern soll deshalb im folgenden Abschnitt eingegangen werden.



**Abbildung 10. Kontrolle secretomotorischer und vasodilatatorischer Regelkreise.**

Durch den Regelkreis werden Flüssigkeitssekretion und Elektrolytfreisetzung ins Darmlumen an den Körperbedarf angepasst. Die Existenz von (1) secretomotorischen und (2) secretomotorisch-vasodilatatorischen Neuronen ermöglicht die Versorgung mit Flüssigkeit aus zwei Quellen, nämlich (1) über das Epithel absorbierte Flüssigkeit und (2) Flüssigkeit aus dem Körperkreislauf. Die secretomotorischen Reflexe des ENS stehen unter Kontrolle des vegetativen Nervensystems; insbesondere wird die zu sezernierende Flüssigkeitsmenge durch die Aktivität sympathischer vasokonstriktorischer Neurone begrenzt, beispielsweise bei niedrigem Blutdruck oder vermindertem Blutvolumen.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

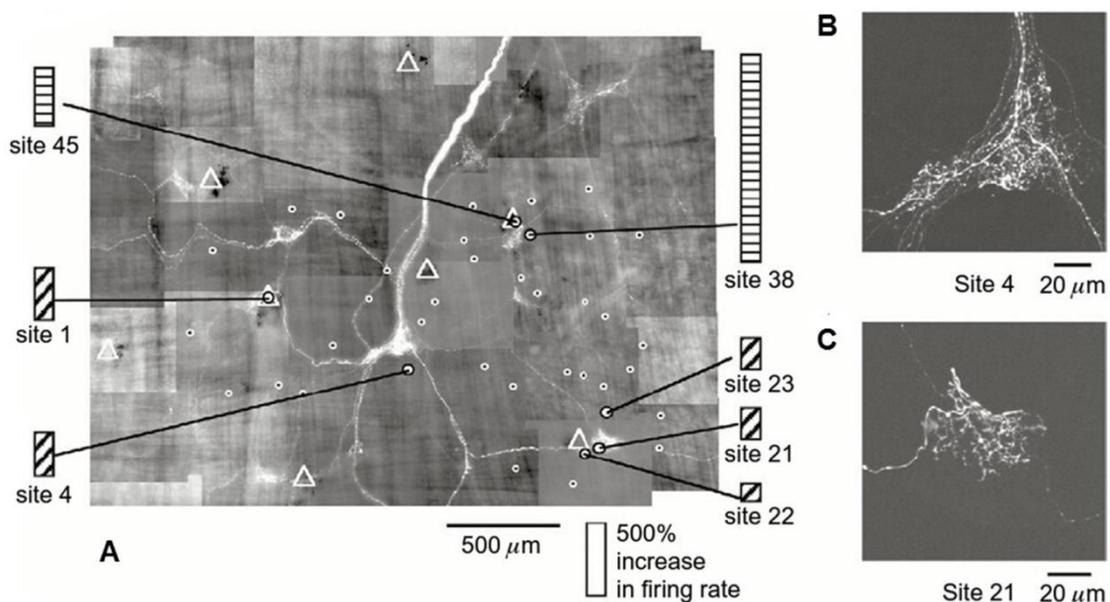
## 1.4 Die Innervation durch spinale und vagale afferente Nerven

### 1.4.1 Anatomie der afferenten Innervation

#### 1.4.1.1 Anatomie peripherer Nervenendigungen

##### 1.4.1.1.1 IGLEs und IMAs

Vagale afferente Fasern innervieren alle Wandschichten des Gastrointestinaltraktes. Sie besitzen verschiedene Arten mucosaler Nervenendigungen [Dutsch et al. (1998); Wank and Neuhuber (2001)], intraganglionäre laminare Nervenendigungen (**IGLEs**) und intramuskuläre Endigungen (**IMAs**) [Berthoud, Patterson, Neumann, and Neuhuber (1997); F. B. Wang and Powley (2000)], siehe **Abb.11**.



#### Abbildung 11. Vagale Nervenendigungen.

(A) Darstellung vagaler Nervenfasern mittels antegradem Labelling. Markiert sind Hotspots der Mechanotransduktion (große weiße Punkte mit schwarzer Umrandung) und Areale, für die keine derartige Aktivität aufgezeichnet werden konnte (kleine schwarze Punkte mit weißer Umrandung). Die als Hotspots der Mechanotransduktion markierten Areale entsprechen IGLEs.

weiße Dreiecke – Indian ink landmarks.

(B/C) Vergrößerungen der entsprechenden Hotspots 4 und 21 (Calibration bar 20 µm).

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

**IGLEs** sind lamelläre Strukturen, die von einem Elternaxon entspringen und enterische Ganglienzellen zwischen Stratum longitudinale und Stratum circulare bedecken [Rodrigo, Hernandez, Vidal, and Pedrosa (1975)]; einige Fortsätze können in das entsprechende Ganglion eintreten. Mittels antegradem Tracing von den Ganglia nodosa aus konnten diese Fasern als *vagale afferente Nervenendigungen* identifiziert werden. Im Gegensatz zu IMAs sind IGLEs verhältnismäßig gleichmäßig entlang des Gastrointestinaltraktes verteilt [F. B. Wang and Powley (2000); Phillips and Powley (2000)]. Zagorodnyuk et al. [Zagorodnyuk and Brookes (2000); Zagorodnyuk, Chen, and Brookes (2001); Zagorodnyuk, Chen, Costa, and Brookes (2003)] konnten am Tiermodell des Meerschweinchens die Existenz von IGLEs in Ösophagus und Magen bestätigen. Sie fanden eine überzeugende Korrelation zwischen dem Vorkommen von IGLEs und Hotspots der Mechanotransduktion (*siehe Abb.11*). Somit handelt es sich bei IGLEs um mechanosensorische Nervenendigungen vagaler afferenter Nervenfasern, die auf eine Dehnung geringer Intensität reagieren. Obwohl die Sensitivität dieser afferenten Fasern moduliert werden kann, ist der sensorische Transduktionsprozess scheinbar unabhängig von der chemischen Transmission.

Auch **IMAs** konnten in antegrad gelabelten Vagus-Präparaten (mit erhaltener Mageninnervation und Magen in situ) nachgewiesen werden; für sie konnte jedoch keine signifikante Beteiligung an der Mechanotransduktion gefunden werden [Zagorodnyuk et al. (2001)]. Dieses Ergebnis überrascht, wenn man bedenkt, dass IMAs aus langen Strängen sich verzweigender vagaler afferenter Nervenfasern bestehen, die in die glatte Muskulatur eingebettet und parallel zu den Muskelfasern angeordnet liegen [Berthoud and Powley (1992); Phillips and Powley (2000)]. Vagale IMAs sind spezielle Strukturen an Nervenendigungen, deren Elternaxone sich mehrmals verzweigen, bevor sie in der zirkulären und longitudinalen Muskulatur enden. Die Ausdehnung solcher „IMA-Anordnungen“ kann von mehreren 100 Mikronen bis zu mehreren Millimetern reichen [Berthoud and Powley (1992)]. In den Muskelschichten verlaufen die einzelnen Nervenendigungen mehrere Millimeter parallel zueinander und formen so ein eigenständiges Muster paralleler Elemente mit Assoziation zu den interstitiellen Zellen von Cajal [Phillips and Powley (2000); Berthoud, Jedrzejewska, and Powley (1990); Fox, Phillips, Martinson, Baronowsky, and Powley (2000); Berthoud and Powley (1992); Zagorodnyuk et al. (2001)].

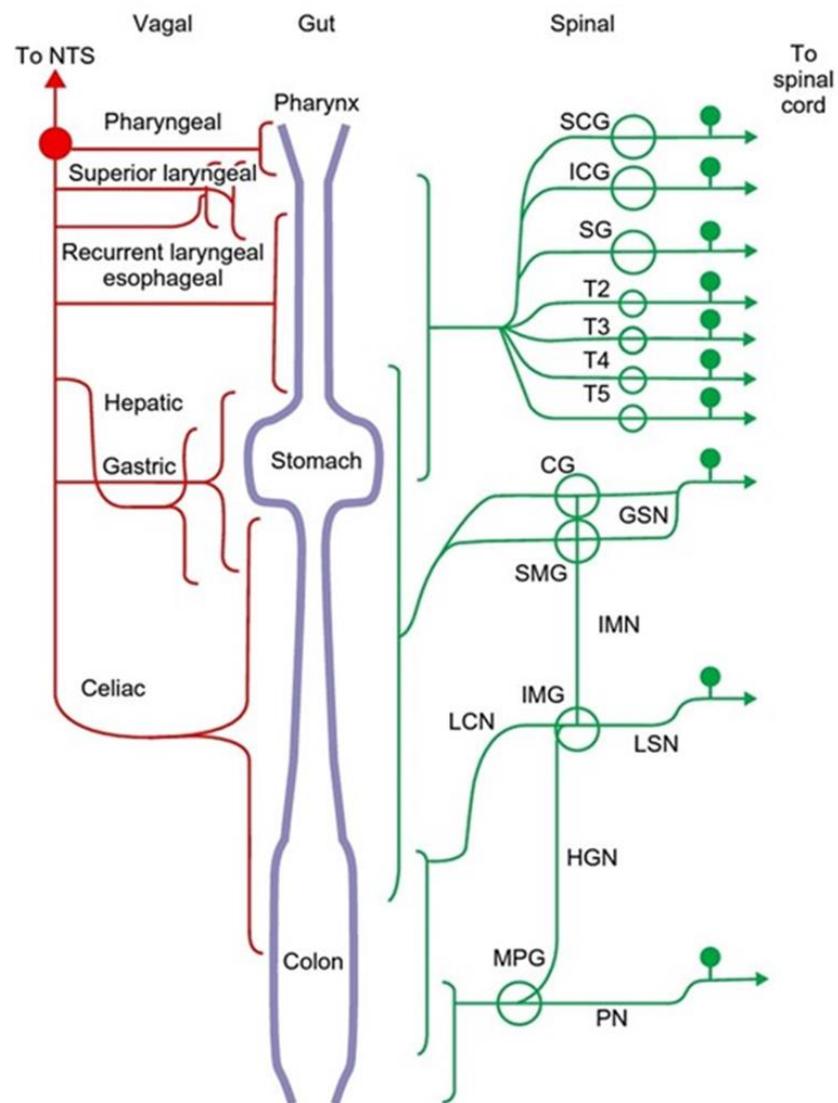
#### 1.4.1.1.2 Vagale afferente Fasern

Die höchste Dichte vagaler Nervenfasern findet sich in Magen und Ösophagus, nach distal hin nimmt die vagale Innervation immer mehr ab [Berthoud et al. (1997)]. Der Magendarmtrakt exprimiert auf seiner gesamten Länge identische Klassen von Nervenendigungen; im Bereich des Pylorus (als Hochdruckzone zwischen Antrum und Duodenum) ist die IMA-Dichte im Vergleich zu den übrigen Abschnitten des Intestinums erhöht. Distal des Pylorus gibt es nur wenige IMAs; im Gegensatz dazu sind IGLEs bis zum proximalen Colon hin zu finden. Der Grund für diese unterschiedliche Verteilung von Nervenfasern und -endigungen ist bislang nicht bekannt.

Die Nervenendigungen mucosaler afferenter Nervenfasern liegen im Dünndarm in enger Nachbarschaft zu enteroendokrinen Zellen; dies legt die Vermutung nahe, dass diese Nervenendigungen bei der Detektion freigesetzter gastrointestinaler Hormone eine Rolle spielen. Speziell für CCK-positive Zellen des Duodenums konnte eine eng benachbarte Lage zu mucosalen afferenten Nervenendigungen nachgewiesen werden [Berthoud, Kressel, Raybould, and Neuhuber (1995); Berthoud and Patterson (1996)]; bislang ist jedoch nicht bekannt, ob spezifische enteroendokrine Zellpopulationen vorrangig vagal innerviert werden.

#### 1.4.1.1.3 Spinale afferente Fasern

Ausgehend von ihren Nervenendigungen in der Darmwand verlaufen die Axone spinaler afferenter Nervenfasern gemeinsam mit vagalen afferenten Fasern in neurovaskulären Bündeln; spinale Nervenfasern erreichen die prävertebralen Ganglien (*siehe weiter unten*) und sind dort synaptisch mit postganglionären sympathischen Neuronen verbunden. Man vermutet, dass sie hier zu einer starken Aktivierung sympathischer Reflexe führen, die hauptsächlich eine Hemmung der Darmfunktion bewirken. Ihre Zellkörper liegen in den thorakalen, lumbalen und sakralen Hinterwurzelganglien, ihre zentralen Endigungen befinden sich im Hinterhorn des Rückenmarks. Die spinale afferente Innervation des Dünndarms erstreckt sich vom thorakalen bis zum lumbalen Rückenmark [Khurana and Petras (1991); Clerc (1983); Collman, Tremblay, and Diamant (1992); Brtva, Iwamoto, and Longhurst (1989)] und verläuft über die Nn.splanchnici (*siehe Abb.12*).

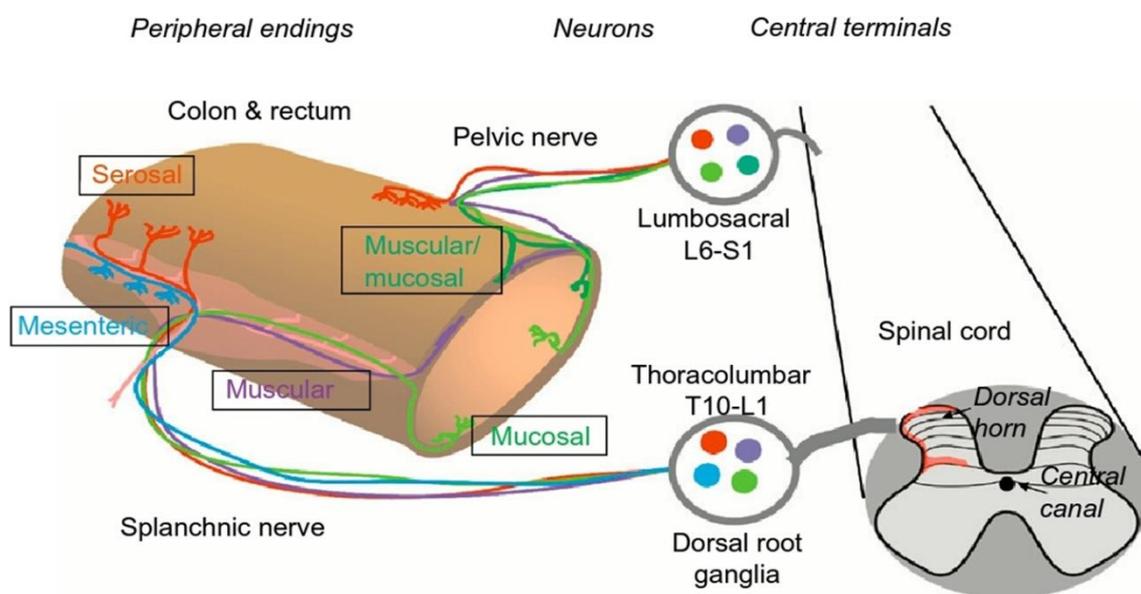


**Abbildung 12. Schematische Darstellung der vagalen und spinalen Innervation des Darms.**

CG – celiac ganglia; GSN – greater splanchnic nerve; HGN – hypogastric nerve; ICG – intermediate cervical ganglia; IMG – inferior mesenteric ganglia; IMN – intermesenteric nerve; LCN – lumbar colonic nerves; LSN – lumbar splanchnic nerve; MPG – major pelvic ganglia; NTS – nuclei tractus solitarii; PN – pelvic nerve; SCG – superior cervical ganglia; SG – stellate ganglia; SMG – superior mesenteric ganglia.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

Die afferenten spinalen Nervenfasern des Colons erreichen das Rückenmark über die Nn.splanchnici, die Nervenfasern des Rektums hingegen verlaufen über die Nn.pelvici (siehe **Abb.13**).

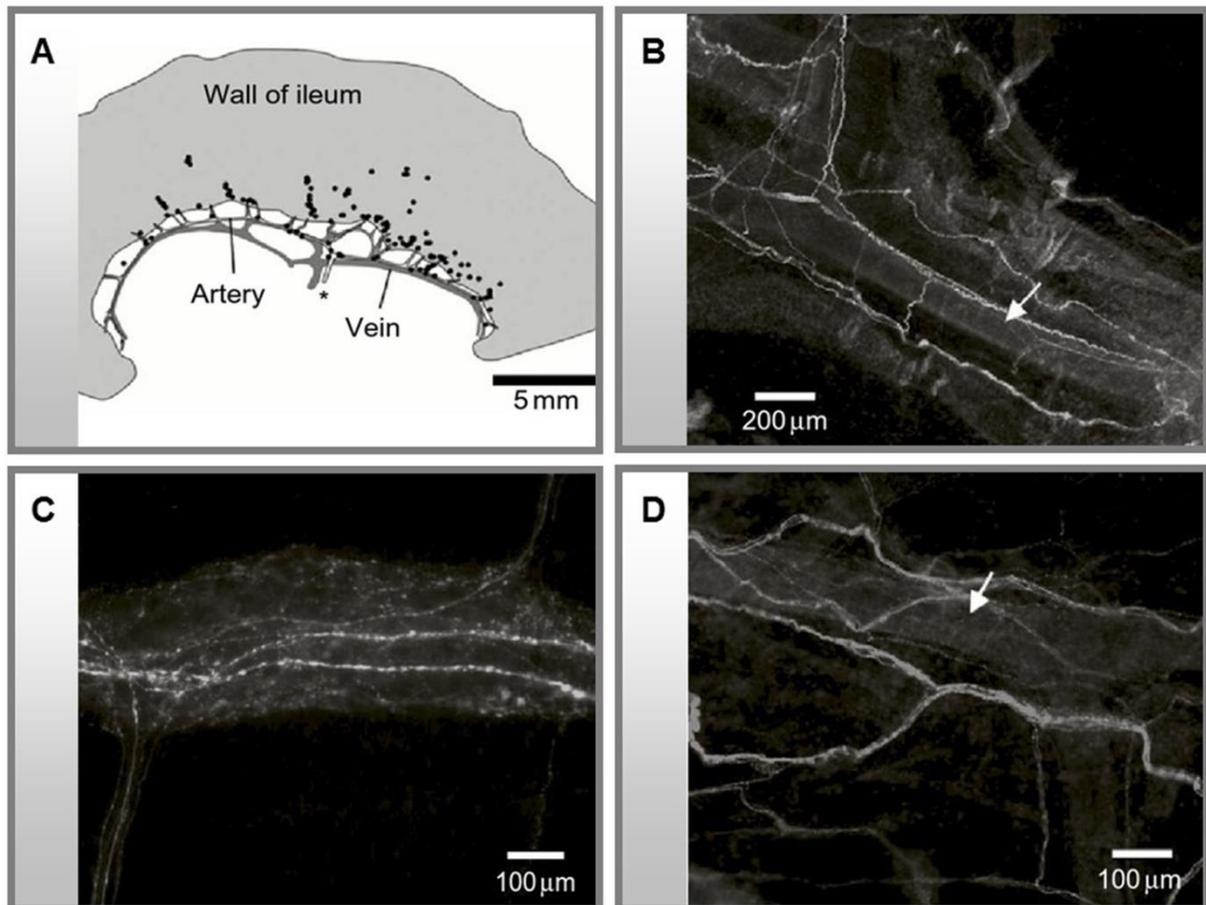


**Abbildung 13. Verlauf pelviner und splanchnischer afferenter Nervenendigungen.**

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

Bislang konnte die Anatomie spinaler afferenter Nervenendigungen im Dünndarm nicht spezifisch dokumentiert werden. Insbesondere die weitschweifige Anordnung der Hinterwurzelganglien erschwert die Erforschung der anatomischen Gegebenheiten – antegrade Tracerinjektionen gestalten sich hier technisch schwierig. Ein anderer Ansatz verfolgt die Tracer-Injektion in der Nähe der abgetrennten Enden afferenter Axone; man kann nun abwarten, bis die Tracer die peripheren Endigungen der Nervenfasern erreichen. Mit derartigen Studien konnten sowohl die afferenten als auch die efferenten Terminalen dargestellt und die einzelnen Nervenfasern hinsichtlich ihrer spezifischen neurochemischen Eigenschaften charakterisiert werden [Tassicker, Hennig, Costa, and Brookes (1999)]. So war es möglich, Struktur und Funktion der intestinalen Innervation zu korrelieren. Beim Meerschweinchen wurden in Ileum und proximalem Colon Nervenendigungen auf mesenterialen und submucosalen Blutgefäßen nachgewiesen (hier hauptsächlich Arterien), jedoch nicht in Muskelschichten und myenterischen Ganglien [Song et al. (2009)], was einen grundlegenden Unterschied zur vagalen

Innervation darstellt. Diese (mutmaßlich) spinalen Nervenendigungen werden als variköse Axonäste („varicose branching axons“) bezeichnet (siehe **Abb.14**). Beim Rektum offenbart dieser Ansatz ein vollständig anderes Innervationsmuster, welches eher dem der vagalen Innervation des oberen Gastrointestinaltraktes ähnelt.



**Abbildung 14. Antegrade Färbung von Axonen mesenterialer Nervenfaserbündel.**

Die einzigen spezialisierten axonalen Strukturen im Mesenterium sind variköse Axone auf Blutgefäßen.

**(A)** Schematische Darstellung des Ileums beim Meerschweinchen; die schwarzen Punkte markieren variköse Axonäste (beachte die enge Lagebeziehung zu mesenterialen Arterien).

**(B)** Biotinamid-gelabelte mesenteriale Axone, die Pfeile markieren sich verzweigenden Axone („varicose branching axons“) nahe arterieller Gefäße.

**(C)** „Varicose branching axons“ im Plexus myentericus (Calibration bar 100  $\mu$ m).

**(D)** Axonverlauf im Plexus submucosus (Calibration bar 100  $\mu$ m).

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

### 1.4.1.2 Anatomie zentraler Nervenendigungen

#### 1.4.1.2.1 Vagale afferente Fasern

Vagale afferente Fasern verschiedenster Eingeweide konvergieren zum Nucleus tractus solitarii (NTS) [Rinaman, Card, Schwaber, and Miselis (1989); Shapiro and Miselis (1985)] und machen ihn zu einer wichtigen integrativen Schaltstelle für das somatische und autonome sensorische System (*siehe genauer weiter unten*).

Young et al. [Young, Cooper, and Blackshaw (2008)] konnten zeigen, dass afferente Fasern von Mucosa und Muskulatur des *Magens* zu überlappenden Regionen des NTS projizieren; *ösophageale* afferente Nervenfasern projizieren ebenfalls zu verschiedenen Arealen innerhalb des NTS, jedoch hauptsächlich zum ventral gelegenen Subnucleus centralis [Wank and Neuhuber (2001)]. Bislang existieren kaum Studien, welche die zentralen Projektionen von *intestinalen* vagalen afferenten Nerven genauer untersuchen. Man vermutet, dass einige vagale afferente Fasern jenseits des NTS den DMN (dorsal vagal motor nucleus) erreichen und dort direkten Kontakt zu Dendriten von Motoneuronen ausbilden, die zurück zum Darm projizieren [Rinaman et al. (1989)]. In DMN und NTS existieren multiple Möglichkeiten zur Modulation der Neurotransmission [Travagli, Hermann, Browning, and Rogers (2006)]. Vom NTS aus projizieren diverse Nervenfasern zu einer Vielzahl anderer intrazerebraler Nuclei, die bei der Verarbeitung von autonomen und kognitiven Signalen eine Rolle spielen [van der Kooy, Koda, McGinty, Gerfen, and Bloom (1984)].

#### 1.4.1.2.2 Spinale afferente Fasern

Die zentralen Projektionen spinaler afferenter Nervenfasern treten in das Rückenmark ein und bilden Synapsen innerhalb des Hinterhorns (*siehe Abb.13*). Lumbale splanchnische Nervenfasern enden im thorakolumbalen Rückenmark (T10-L1), pelvine afferente Nerven hingegen projizieren in den lumbosakralen Abschnitt des Rückenmarks (L6-S2).

Die einzelnen durch viszerale Stimuli aktivierbaren Hinterhornneurone unterscheiden sich zwischen den verschiedenen spinalen Segmenten. Im *thorakolumbalen* Rückenmark werden durch viszerale Stimuli hauptsächlich die in die Lamina I projizierenden Neurone bzw. Interneurone aktiviert [Menetrey, Gannon, Levine, and Basbaum (1989)]. Im *lumbosakralen* Rückenmark reagieren auf viszerale Stimuli vor allem die Neurone in der Columna dorsalis (Laminae II-IV sowie um den Canalis

centralis, *siehe unten*) [Valentino, Kosboth, Colflesh, and Miselis (2000); G. Wang, Tang, and Traub (2005); Palecek, Paleckova, and Willis (2003)].

In die Lamina I des Rückenmarks projizierende Neurone vermitteln spezifische viszerale sensorische Informationen über den Tractus spinothalamicus an höhere Zentren des ZNS [Gamboa-Esteves, Lima, and Batten (2001); Palecek and Willis (2003)]. Im Rahmen der nozizeptiven Signalverarbeitung senden Neurone der Lamina I viszerale Informationen über den Tractus spinoparabrachialis an den parabrachialen Nucleus (PBn), der die Informationen wiederum an Zentren höherer Ordnung weiterleitet [Vizzard, Brisson, and de Groat (2000); Traub and Murphy (2002)]. Die Columna dorsalis spielt für die Vermittlung viszeraler Schmerzen ebenfalls eine Rolle; postsynaptische spinale Neurone der Columna dorsalis werden durch viszerale Stimuli (beispielsweise colorectale Distensionen) aktiviert und übermitteln die entsprechenden Signale an den ventralen posterolateralen Nucleus des Thalamus (VPL) [Al-Chaer, Lawand, Westlund, and Willis (1996)].

## **1.4.2 Struktur-Funktions-Beziehungen und ihre physiologische Bedeutung**

### **1.4.2.1 Mucosale afferente Nervenendigungen**

Vagale mucosale Rezeptoren reagieren auf eine leichte Berührung der Mucosa – beispielsweise ein Bestreichen (sog. „probing“) derselben. In der Folge eines solchen Stimulus wird eine kurze Serie von Aktionspotentialen ausgelöst [Clarke and Davison (1978); Davison (1972); Iggo (1957); Blackshaw and Grundy (1993); Page and Blackshaw (1998); Page, Martin, and Blackshaw (2002)]. Im Ruhezustand sind vagale mucosale Rezeptoren üblicherweise inaktiv; Aktivität entwickeln sie im Rahmen einer akuten Entzündung oder im Fall eines Epithelschadens – vermutlich in Abhängigkeit von der Freisetzung von Mediatoren (beispielsweise Serotonin) [Blackshaw and Grundy (1993)]. Mucosale Rezeptoren reagieren nicht auf Distensionen oder Kontraktionen der intestinalen Wand, es sei denn die Mucosa wird dabei ebenfalls irritiert. Durch die hohe Fragilität der Mucosa *in vitro* konnten bislang keine Struktur-Funktions-Korrelationen nachgewiesen werden. Gleichsam konnte eine Spezialisierung mucosaler Nervenendigungen bislang nicht beobachtet werden; man vermutet, dass sie diejenige Kraft übermitteln, die auf die Epithelzellen auftrifft. Elektrophysiologische Studien berichten über eine geringere Anzahl mucosaler afferenter Nervenfasern im Dickdarm [P. A. Lynn and Blackshaw (1999); Brierley, Jones, Gebhart, and Blackshaw (2004)] – im oberen Gastrointestinaltrakt stellen sie

etwa die Hälfte der afferenten Fasern [Page et al. (2002); Page and Blackshaw (1998)]. Mucosale afferente Nervenfasern des Dickdarms besitzen ähnliche Eigenschaften wie vagale mucosale Rezeptoren; insbesondere reagieren sie reproduzierbar auf die Berührung eines Rezeptorfeldes (beispielsweise durch „probing“ des Feldes mit einem 10 mg Frey-Haar). Ihre Funktion ist weniger klar als die ihrer Gegenstücke im oberen Gastrointestinaltrakt. Man vermutet, dass sie bei der Detektion der Stuhlkonsistenz eine Rolle spielen.

#### 1.4.2.2 Muskuläre afferente Nervenendigungen

##### 1.4.2.2.1 Spannungsrezeptoren

Spannungsrezeptoren (tension receptors) finden sich im Gastrointestinaltrakt verschiedenster Spezies. *In vivo* zeigen sie eine gewisse Ruheaktivität, die in Koordination mit auftretenden Muskelkontraktionen moduliert wird. Spannungsrezeptoren reagieren auf **nicht-schmerzhafte** „Spannungsreize“ der Darmwand (wie Kontraktion und Distension), und zwar in Form einer langsam adaptierenden linearen Reiz-Reaktions-Beziehung [Page and Blackshaw (1998); Page et al. (2002); Iggo (1955); Blackshaw, Grundy, and Scratcherd (1987b); Sengupta, Kauvar, and Goyal (1989)]. Sie übermitteln sowohl Amplitude als auch Richtung der Darmwandkontraktion an das ZNS und spielen somit eine wichtige Rolle für die Auslösung von motorischen Reflexen [Blackshaw, Grundy, and Scratcherd (1987a)]. Ihre Reiz-Reaktions-Beziehung findet innerhalb der physiologischen Spannbreite des intraluminalen Drucks statt; insbesondere anhand dieser Eigenschaft kann man Spannungsrezeptoren von anderen Klassen afferenter Nervenfasern unterscheiden [Sengupta et al. (1989)]. Durch Kombination verschiedener experimenteller Techniken konnten Zagorodnyuk et al. [Zagorodnyuk and Brookes (2000)] die IGLEs als anatomisches Korrelat der Spannungsrezeptoren im Ösophagus identifizieren (s.o.). Spannungsrezeptoren finden sich neben dem Ösophagus auch im gesamten Dünndarm. Man vermutet, dass sie beim Erbrechen die typischen retroperistaltischen Kontraktionen registrieren und so einen widersprüchlichen Hirnstamm-Input erzeugen, der schließlich zu Retropulsion und Erbrechen führt. Des Weiteren nimmt man an, dass es sich bei IMAs um in-Serie geschaltete Spannungsrezeptoren handelt, die als Dehnungs- oder Längendetektoren dienen und sowohl auf passive Dehnung als auch auf aktive

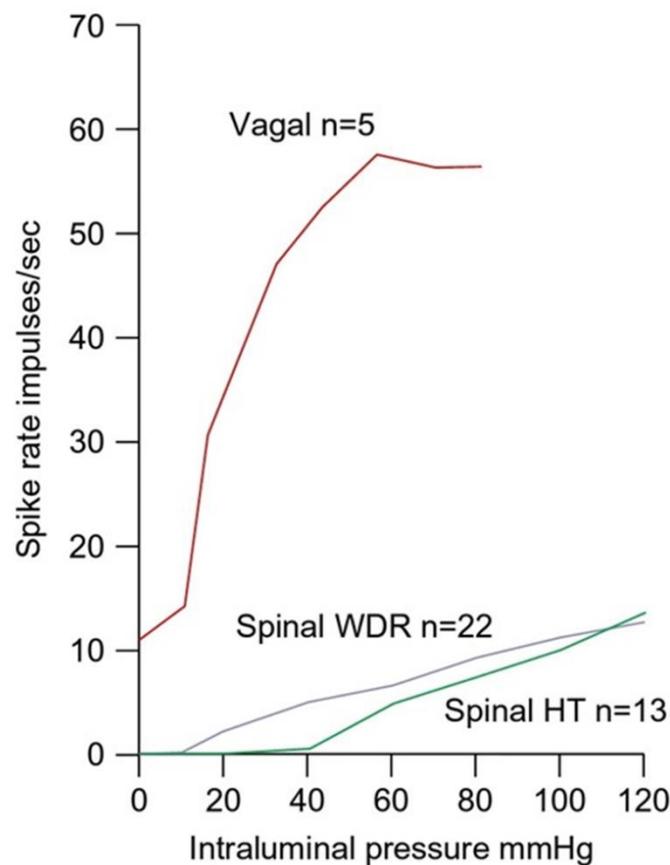
Muskelkontraktion reagieren [F. B. Wang and Powley (2000); Phillips and Powley (2000); Berthoud, Blackshaw, Brookes, and Grundy (2004)].

#### 1.4.2.2.2 LT- und HT Mechanozeptoren

Spinale afferente Nervenfasern des Magen-Darm-Traktes besitzen ähnliche Eigenschaften wie Spannungsrezeptoren; **(1)** sie reagieren auf Kontraktion bzw. Distension, **(2)** sie besitzen eine „low-threshold“-Aktivität, und **(3)** ihre rezeptiven Felder ähnlich den Spannungsrezeptoren innerhalb der Muskelschichten angeordnet. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Auslastung (Saturation). Am besten zu beobachten ist dies beim Ösophagus; hier kann derselbe Stimulus verschiedene Reaktionen (Stimulusantworten) bewirken. Experimentelle Studien des Ösophagus beim Opossum zeigen, dass vagale Spannungsrezeptoren ihre maximale Feuerfrequenz bei 40-50 mmHg erreichen, spinale afferente Fasern jedoch weit oberhalb dieser Reichweite aktiv werden [Sengupta, Saha, and Goyal (1990)]. Manche spinale Nervenfasern erreichen den Schwellenwert zur Aktionspotentialgenerierung erst ab etwa 40 mmHg (*siehe Abb.15*). Man unterscheidet bei **spinalen afferenten Nervenfasertypen** deshalb „**low-threshold**“ und „**high-threshold**“ Mechanozeptoren. Low-threshold Mechanozeptoren besitzen eine große dynamische Spannbreite (wide dynamic range, WDR), zeigen ein tonisches Entladungsmuster und reagieren linear auf Veränderungen der Darmwandspannung [Sengupta et al. (1989)]; high-threshold Mechanozeptoren hingegen (HT) besitzen ein phasisches Entladungsmuster.

Mittels elektrophysiologischer multi-unit Aufzeichnungen von Signalen afferenter Dünndarmnerven können spinale WDR- und HT-Mechanozeptoren sowohl voneinander als auch von vagalen afferenten Nervenfasern differenziert werden [Rong et al. (2004); Booth, Kirkup, Hicks, Humphrey, and Grundy (2001)]. WDR- und HT-afferente Fasern reagieren auf Spasmen der Darmwand und vermitteln das Gefühl von Krämpfen und Koliken. In den pelvinen Nerven von Ratte und Katze konnten *in vivo* WDR-ähnliche Nervenfasern nachgewiesen werden [Janig and Koltzenburg (1991); Sengupta and Gebhart (1994)]; auch splanchnische Nerven enthalten WDR-ähnliche Fasern, wie *in vivo* für die Katze [Blumberg, Haupt, Janig, and Kohler (1983)] und *in vitro* für Ratte und Maus [P. A. Lynn and Blackshaw (1999); Brierley et al. (2004); Hughes et al. (2009)] gezeigt wurde. Der Vergleich [Brierley et al. (2004); Hughes et al. (2009)] von splanchnischen und pelvinen

afferenten WDR-Fasern zeigt, dass WDR-Mechanozeptoren in pelvinen Nerven zahlreicher vorhanden sind und niedrigere Schwellenwerte sowie stärkere Reizantworten auf mechanische Stimuli aufweisen. Zudem zeigen sie im Vergleich zu splanchnischen Nerven bei andauernden Distensionen eine langsamere Adaptation [Brierley et al. (2004); Hughes et al. (2009)]. Diese Daten stützen die Hypothese, dass splanchnische Nervenfasern eine wichtige Rolle bei der Nozizeption spielen und pelvine Nerven eine additive nicht-nozizeptive Funktion übernehmen.



**Abbildung 15. Reaktion vagaler und spinaler afferenter Nervenfasern auf Distensionsreize.**

Die Reiz-Reaktions-Beziehung vagaler Nervenfasern liegt vollständig im nicht-schmerzhaften Bereich. Im Gegensatz dazu reagieren sowohl WDR- als auch HT-Mechanozeptoren (als Repräsentanten spinaler Nervenendigungen) auf schmerzhafte Stimuli; hierbei können beide durch ihre unterschiedlichen Schwellenwerte voneinander unterschieden werden.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

### 1.4.2.3 Serosale und mesenteriale afferente Nervenendigungen

Die Existenz serosaler und mesenterialer afferenter Nervenendigungen wurde bereits vor Jahrzehnten entdeckt [Bessou and Perl (1966); Morrison (1973)], ihre physiologische Bedeutung jedoch erst vor kurzem erkannt. Erstmals beschrieben wurden sie für splanchnische Nervenfasern [Blumberg et al. (1983); Bessou and Perl (1966); Morrison (1973)]. Damals konnten serosale afferente Fasern von mesenterialen Fasern jedoch einzig und allein durch die Lokalisation ihrer rezeptiven Felder differenziert werden [Blumberg et al. (1983); Bessou and Perl (1966); Morrison (1973)]. Tatsächlich jedoch wurden für einige Nervenfasern sowohl serosale als auch mesenteriale rezeptive Felder gefunden. Erst anhand von *in vitro* Untersuchungen am Tierbeispiel der Maus wurde erkannt, dass lediglich **splanchnische** afferente Nervenfasern das Mesenterium innervieren [Brierley et al. (2004)]. Die rezeptiven Felder pelviner afferenter Nervenfasern konnten in dieser Studie nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Dennoch war es möglich, durch ein Bestreichen der Serosa die afferenten Fasern beider Nervenpopulationen (pelvin und splanchnisch) zu aktivieren [Brierley, Jones, Xu, Gebhart, and Blackshaw (2005)]. Ob diese Ergebnisse auch auf andere Spezies (neben der Maus) übertragbar sind, bleibt zu klären.

Sowohl die pelvinen als auch die splanchnischen rezeptiven Felder liegen nahe an bzw. auf Blutgefäßen, die Mesenterium, Serosa oder Submucosa versorgen. Sie besitzen bis zu sieben kleine punktförmige (2-4 mm<sup>2</sup>) rezeptive Felder [Berthoud, Lynn, and Blackshaw (2001); Janig and Koltzenburg (1991); Sengupta and Gebhart (1994); Blumberg et al. (1983); Morrison (1973); P. A. Lynn and Blackshaw (1999); Bessou and Perl (1966)], wobei deren Anzahl von der Größe der untersuchten Spezies abhängt. Man klassifiziert sie anhand ihrer Reaktion entweder auf festes Bestreichen der Mucosa oder auf schmerzhafte Distorsion des Colons (nicht auf feines Bestreichen der Mucosa oder schmerzlose zirkuläre Darmwanddehnung). *Serosale* afferente Nervenfasern reagieren (wie zu erwarten) eher auf mechanische Stimulation der *serosalen* Oberfläche als auf mucosal applizierte Stimuli [P. A. Lynn and Blackshaw (1999)]. Da das anatomische Korrelat serosaler afferenter Nervenfasern wahrscheinlich innerhalb der Submucosa lokalisiert ist, ist der Begriff „serosal“ genau genommen eine Fehlbezeichnung. Tatsache ist, dass serosale afferente Fasern HT-Eigenschaften bezüglich mechanischer Stimulation aufweisen – bei lateraler Dehnung > 7 g und > 45 mmHg für intraluminalen Druck [Hughes et al.

(2009); Brierley et al. (2009); Brierley et al. (2008)]. Dies ist auch der Grund, weshalb in früheren Studien ihre Existenz nicht erkannt wurde – hier wurde mit einem Maximum von 5 g und somit unter dem entsprechendem Schwellenwert getestet [Brierley et al. (2004)]. Die soeben beschriebenen Eigenschaften der serosalen afferenten Nervenfasern stimmen nahezu mit den ursprünglichen *in vivo* Beschreibungen der HT-afferenten Nervenfasern an Ösophagus (Opossum) und Colon (Ratte) durch Sengupta überein [Sengupta and Gebhart (1994); Sengupta et al. (1990)].

Studien, die gezielt *mesenteriale* afferente Nervenfasern untersuchten, konnten zeigen, dass diese in idealer Weise auf punktförmige mechanische mesenteriale Stimuli oder auf eine Dehnung des Mesenteriums reagieren [Blumberg et al. (1983); Morrison (1973)]. Mesenteriale afferente Nervenfasern reagieren zudem auf Distensionsreize, insbesondere wenn es sich um ähnlich schmerzhaftem Dehnungsreize handelt, wie sie für die serosalen afferenten Fasern beschrieben wurden [Hughes et al. (2009); Blumberg et al. (1983); 95, 96]. Sie können somit eine den serosalen afferenten Fasern ähnliche Funktion übernehmen (i.e. Übermittlung mechanisch induzierter Schmerzen). Bislang ist nicht bekannt, weshalb diese afferenten Fasern lediglich in splanchnischen und nicht in pelvinen Nerven vorkommen. Generell sind Beckenorgane im Vergleich zu den übrigen abdominalen Organen besser verankert; man könnte demnach annehmen, dass die Signalübermittlung größerer Bewegungen somit auch weniger erforderlich ist.

Sowohl *serosale* als auch *mesenteriale* afferente Nervenfasern sind polymodal – die Mehrzahl der Fasern reagiert auch auf chemische Reize wie beispielsweise hypertone Kochsalzlösung, HCl und Gallensäure [P. A. Lynn and Blackshaw (1999); Haupt, Janig, and Kohler (1983)].

Erst kürzlich erschienene *in vitro* Studien an Colon von Ratte und Maus [Brierley et al. (2004); Hughes et al. (2009); P. A. Lynn and Blackshaw (1999); Hicks et al. (2002)] konnten zeigen, dass serosale / mesenteriale Nervenfasern bis zu 86% der afferenten Fasern im LSN (lumbar splanchnic nerve) und 33% der pelvinen Nerven ausmachen. Zusammenfassend müssen serosale und mesenteriale afferente Nervenfasern als spezifische HT-Mechano-Nozizeptoren betrachtet werden.

#### 1.4.2.4 Mechanisch insensitive afferente Nervenfasern

Die Bezeichnung „mechanisch insensitive“ wurde bei *in vivo*-Präparationen ursprünglich für afferente Nervenfasern verwendet, die zunächst nicht auf intraluminale Distensionreize reagierten, durch chemische Stimuli jedoch rekrutiert werden konnten und so sekundär mechano-sensitiv wurden [Habler, Janig, and Koltzenburg (1990)]. Diese Begriffsdefinition ist möglicherweise irreführend, da mucosale afferente Nervenfasern per definitionem sehr wohl „mechano-sensitiv“ gegenüber dem sanften Bestreichen der Mucosa reagieren, nicht jedoch gegenüber einer längeren Distension [Clarke and Davison (1978)]. Insofern wäre die Bezeichnung „Distensions-insensitiv“ passender.

*Serosale* afferente Nervenfasern reagieren auf schmerzhaftes Distension. Zudem weiß man, dass ihr entsprechender Schwellenwert zur Wahrnehmung des Distensionsreizes im Rahmen einer Entzündung absinkt [Hughes et al. (2009)]. Erst vor kurzem publizierte Ergebnisse legen nahe [Brierley, Carter, et al. (2005); Brierley, Jones, et al. (2005)], dass die Nn.splanchnici der Maus auch mechanisch in-sensitive afferente Nervenfasern enthalten, die auf Bradykinin, ATP oder Capsaicin reagieren, durch diese Stimuli jedoch nicht sensibilisiert bzw. sekundär mechanisch rekrutiert werden. Ihre Rolle ist bislang unklar – sie könnten als spezifische „chemorezeptorische“ afferente Nervenfasern fungieren. Im Gegensatz zu diesen Fasern konnten in derselben Studie zwei Drittel der mechanisch in-sensitiven Fasern durch Applikation eines „Mediator-Cocktails“ (der sogenannten „inflammatory soup“) sensibilisiert werden [Feng and Gebhart (2011)]. Als mechanischer Stimulus diente hier das direkte Bestreichen der rezeptiven Endigung mit einer Glaspipette („probing“), eine Prüfmethode, die jeglichen Zweifel hinsichtlich des Distension-Schwellenwertes beseitigt. Es stellt sich die Frage, weshalb dies erst jetzt und nur in dieser letzten Studie [Feng and Gebhart (2011)] gezeigt werden konnte. Eine Ursache ist höchstwahrscheinlich die Art des Stimulus – *elektrische* Stimuli aktivieren alle afferenten Fasern in ihrer Gesamtheit und unabhängig von ihrer Modalität. Heute vermutet man, dass afferente Nervenendigungen mechano-sensorische Proteine enthalten, die erst nach Rezeptoraktivierung funktionsfähig werden.

### 1.4.3 Periphere Ganglien, viszerale afferente Neurone und Reflexe

#### 1.4.3.1 Periphere Ganglien

Prävertebrale Ganglien (PVG) sind anatomisch eigenständige periphere Untereinheiten des sympathischen Nervensystems – Ganglion coeliacum, mesentericus superior und mesentericus inferior sind die wichtigsten der prävertebralen Ganglien (PVG). Im Gastrointestinaltrakt kontrollieren PVG-Neurone sowohl den Blutfluss (vasokonstriktorische bzw. vasomotorische Neurone) als auch Sekretion, Absorption und Motilität (viszeromotorische Neurone). Viszeromotorische Neurone besitzen alle Kennzeichen eines integrativen Zentrums; sie empfangen synaptischen Input sowohl von peripheren als auch zentralen präganglionären Nervenfasern und sind synaptisch mit mannigfaltigen neuronalen Strukturen des ENS verbunden. Auf diese Weise sind sie in der Lage, vorprogrammierte enterische Regelkreise zu modifizieren – die PVG liegen im Zentrum der sympathischen Innervation des Gastrointestinaltraktes.

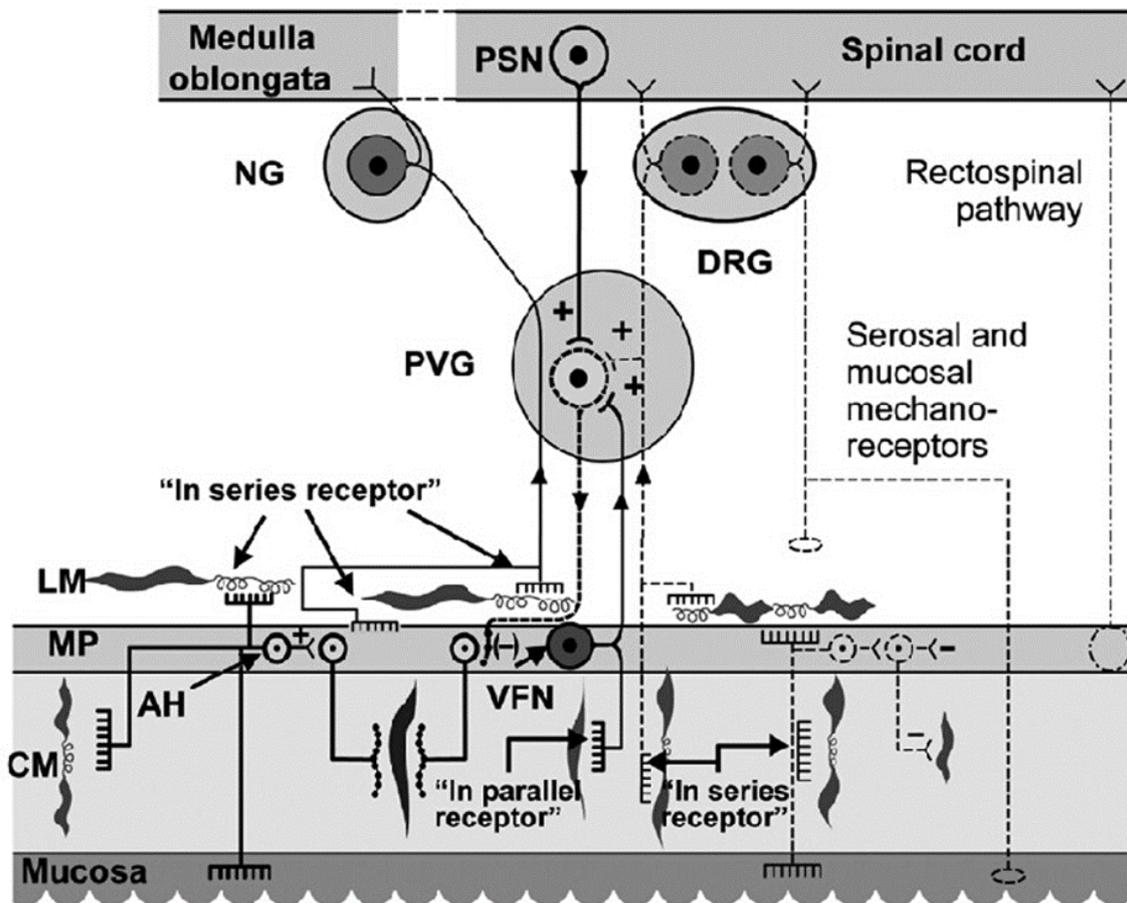
Für PVG-Neurone wurden drei unterschiedliche Entladungsmuster beschrieben [Janig and McLachlan (1992); Gola and Niel (1993)]: **(1)** ein „phasisches“ Entladungsmuster, **(2)** ein „tonisches“ Entladungsmuster und **(3)** die sogenannte „long after spike hyperpolarization“ (entsprechend einem einzelnen Aktionspotential gefolgt von einer ungewöhnlich langen Hyperpolarisation / Ruheperiode). Neurone mit letzterem Entladungsmuster werden als „LAH“-Neurone bezeichnet. Das Entladungsmuster der Neurone korreliert mit ihrer Neuropeptid-Ausstattung. Sogenannte NA/NPY-Neurone (Co-Expression von Noradrenalin und NPY) zeigen meist ein „phasisches“ Entladungsmuster. Neurone mit „tonischer“ Aktivität hingegen exprimieren entweder Noradrenalin und Somatostatin (NA/SOM-Neurone) oder nur Noradrenalin [Janig and McLachlan (1992); Keast, McLachlan, and Meckler (1993)]. Es gibt zudem eine Korrelation zwischen den Feuereigenschaften eines Neurons und der Stärke seines synaptischen Inputs. Typischerweise stehen LAH-Neurone und Neurone mit phasischem Entladungsmuster unter voller Kontrolle des ZNS. Sie erhalten „starken“ synaptischen Input und dienen als sogenannte Schaltneurone. Im Gegensatz dazu empfangen Neurone mit tonischem Entladungsmuster hauptsächlich „schwachen“ synaptischen Input [De Groat and Krier (1979); Iggo and Vogt (1960); Beacham and Perl (1964); Anthony and Kreulen (1994)]. Die Kolokalisation von Neurotransmittern bzw. Neuropeptiden liefert Hinweise auf

mögliche Innervationsziele der Neurone. Man nimmt an, dass es sich bei NA( $\pm$ SOM)-positiven Nervenfasern um viszeromotorische Neurone handelt. Dabei existieren zwischen den Katecholamin-haltigen Varikositäten der viszeromotorischen Neurone und den Neuronen enterischer Ganglien keine eigenständigen synaptischen Verbindungen; stattdessen bestehen zwischen diesen Strukturen sogenannte „en passant“ Verbindungen [Costa and Furness (1984)]. Die Nervenendigungen von NA/SOM<sup>+</sup>-Fasern liegen hauptsächlich in der Umgebung submucosaler Ganglienneurone, die Absorption und Sekretion kontrollieren; man nimmt deshalb an, dass NA/SOM<sup>+</sup>-Fasern secretomotorische Reflexe beeinflussen (insbesondere hemmen) [Keast et al. (1993); Costa and Furness (1984)]. NA-positive Neurone ohne Kotransmitter (NA/SOM<sup>-</sup>) hingegen scheinen insbesondere Neurone mit Einfluss auf die (reflektorische) motorische Aktivität des ENS zu hemmen.

#### 1.4.3.2 Afferente viszerale Neurone

Im Gastrointestinaltrakt unterscheidet man anhand der Lage ihrer Zellkörper und Axone **vier** Gruppen afferenter Neurone (*siehe Abb.16*).

Bei der **ersten** Gruppe handelt es sich um afferente Neurone, deren Zellkörper in Hinterwurzelganglien (bzw. in kranialen Ganglien) liegen. **Zweitens** kennt man afferente Neurone, deren Zellkörper und Axone ausschließlich in der Darmwand liegen (die demnach nicht nach extramural projizieren). **Drittens** unterscheidet man afferente Neurone, deren Zellkörper in der Darmwand liegen, die ihre Axone jedoch nach extramural zu den PVG (bzw. PG) entsenden; innerhalb dieser Gruppe differenziert man zwischen viszerofugalen und spinalen afferenten Neuronen. **Viertens** definiert man afferente Neurone, deren Zellkörper in den serosalen Ganglien bzw. im Plexus myentericus des distalen Rektums liegen (auf diese letzte Gruppe soll hier nicht weiter eingegangen werden).



**Abbildung 16. Anordnung mechanosensory afferenter Nervenfasern in der Darmwand.**

Anhand der Lage ihrer Zellkörper und Axone unterscheidet man vier Gruppen afferenter Neurone. **(1)** afferente Neurone, deren Zellkörper in Hinterwurzelganglien liegen; **(2)** afferente Neurone, deren Zellkörper und Axone ausschließlich in der Darmwand liegen; **(3)** afferente Neurone, deren Zellkörper in der Darmwand liegen, die ihre Axone jedoch nach extramural zu den PVG entsenden; innerhalb dieser Gruppe differenziert man zwischen viszerofugalen und spinalen afferenten Neuronen; **(4)** afferente Neurone, deren Zellkörper in den serosalen Ganglien bzw. im Plexus myentericus des distalen Rektums liegen (ganz rechts). Bei den „in Serie“ geschalteten Rezeptoren handelt es sich um IMAs und IGLEs.

DRG – dorsal root ganglion; NG – nodose ganglion; PSN – preganglionic sympathetic neuron; PVG – prevertebral ganglion; LM – longitudinal muscle; CM – circular muscle; MP – myenteric plexus; VFN – viscerofugal neurons.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

#### 1.4.3.2.1 Afferente Neurone mit Zellkörpern in Hinterwurzelganglien

Afferente Neurone, deren Zellkörper in den Hinterwurzelganglien Ganglien liegen [Berthoud et al. (2004); Cervero (1994)], empfangen als primär afferente mechanosensorische Nervenfasern mannigfaltige Signale aus dem Darmlumen. Ihre Nervenendigungen befinden sich sowohl in Mesenterium und Serosa als auch in der Tunica muscularis der Darmwand. Sie besitzen als Nozizeptoren meist (jedoch nicht ausschließlich) „high threshold“-Eigenschaften [Gebhart (1996)]; bei Ruhe sind sie inaktiv, auf einen Stimulus reagieren sie dynamisch mit verschiedensten Reiz-Reaktions-Mustern. *Vagale* mechanosensorische afferente Nerven können anhand ihrer Morphologie in IMAs (intramuscular arrays) und IGLEs (intraganglionic laminar endings) unterschieden werden (*siehe oben*); bei ihnen handelt es sich um „low-threshold“ Spannungsdetektoren, die bereits niedriger, physiologischer Distension aktiviert werden [F. B. Wang and Powley (2000); P. Lynn, Zagorodnyuk, Hennig, Costa, and Brookes (2005)].

#### 1.4.3.2.2 Ausschließlich innerhalb der Darmwand lokalisierte afferente Neurone

Enterische AH- / Dogiel Typ II-Neurone kontrollieren als mechanosensorische Neurone wichtige Aspekte der gastrointestinalen Motilität. Ihre Aktivität ist insbesondere vom vorherrschenden Muskeltonus abhängig (und weniger von der Darmdistension). Sie befinden sich ausschließlich innerhalb der Darmwand und funktionieren durch Ausbildung interneuronaler synaptischer Verbindungen als eigenständiges, „auto-augmentierendes“ Netzwerk [Kunze et al. (1998)]. Bei einer Unterart der S- / Dogiel Typ I-Neurone handelt es sich ebenfalls um mechanosensorische afferente Neurone [Spencer, Hennig, and Smith (2003); Spencer and Smith (2004)]. Sie werden sowohl durch Distension als auch durch Tonus-unabhängige Muskelkontraktionen aktiviert. Die aktuelle Datenlage lässt vermuten, dass S- / Dogiel Typ I-Neurone andauernde Kontraktionen verursachen, AH- / Dogiel Typ II-Neurone hingegen für phasische „peristaltische“ Kontraktionen verantwortlich sind [Spencer, Smith, and Hennig (2005)].

#### 1.4.3.2.3 Afferente Neurone mit Projektion zu PVG und PG

Bei viszerofugalen (auch intestinofugale Neurone genannt) Neuronen handelt es sich um cholinerge mechanosensorische Nervenfasern, deren Axone die PVG erreichen

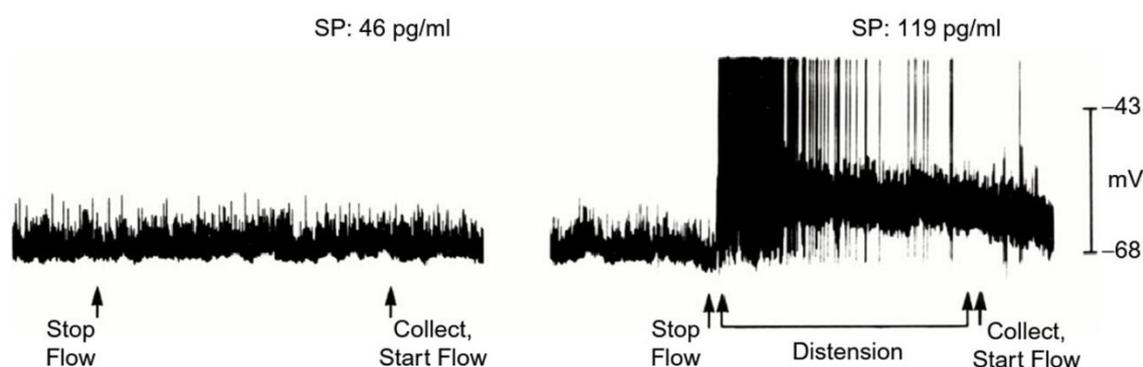
[Mann, Furness, Pompolo, and Mader (1995)]. Die Stimulation viszerofugaler Neurone (beispielsweise durch Distension oder elektrische Stimulation des entsprechenden Darmsegments) bewirkt ein fEPSP, das durch Nikotinrezeptorantagonisten verhindert werden kann [Szurszewski, Miller (1994)]. Neben Acetylcholin enthalten viszerofugale Neurone häufig auch Peptidtransmitter (beispielsweise VIP), einige exprimieren auch die NOS [Mann et al. (1995); Lindh, Hokfelt, and Elfvig (1988)].

Man unterscheidet heute im Gastrointestinaltrakt zwei verschiedene Populationen viszerofugaler Neurone. *Einerseits* definiert man *primäre* viszerofugale Neurone, die ohne jegliche synaptische Umschaltung die PVG erreichen. *Andererseits* kennt man *sekundäre* viszerofugale Neurone (oder sogar viszerofugale Neurone höherer Ordnung), die zunächst schnellen synaptischen Input von anderen ENS-Neuronen erhalten, bevor sie die Darmwand in Richtung PVG verlassen.

*Primäre* und *sekundäre* viszerofugale Neurone besitzen nikotinische Acetylcholinrezeptoren, einige dieser Neurone weisen eine Dogiel Typ II-ähnliche Morphologie auf. Bei viszerofugalen Neuronen handelt es sich um langsam oder gar nicht adaptierende Neurone [S. M. Miller, Ermilov, Szurszewski, Hammond, and Brimijoin (1997); Szurszewski, Ermilov, and Miller (2002)], die auf eine Dehnung der zirkulären Muskelschicht mit einer Salve von Aktionspotentialen reagieren [S. M. Miller et al. (1997); S. M. Miller and Szurszewski (2003)]. Sie fungieren als Volumenrezeptoren [S. M. Miller and Szurszewski (2003); Anthony and Kreulen (1990)] und sind parallel zur zirkulären Muskelschicht angeordnet. Ein Anstieg von Volumen oder Darmumfang führt zu einer Frequenzerhöhung des schnellen exzitatorischen synaptischen Inputs der PVG-Neurone. Im Gegensatz dazu geht der synaptische Input der PVG-Neurone gegen Null, wenn sich der Darmumfang verringert und die zirkuläre Muskulatur kontrahiert [Szurszewski et al. (2002); S. M. Miller and Szurszewski (2003)]; im Rahmen der Darmentleerung (mit Kontraktion der zirkulären Muskulatur entsprechender Dickdarmsegmente) werden demnach die Mechanorezeptoren entlastet und der schnelle synaptische Input geht zurück.

Sympathische Neurone, die viszerofugalen Input erhalten, setzen in der Darmwand Noradrenalin frei, um intrinsische Reflexe zu modulieren [S. M. Miller and Szurszewski (1997); Messenger and Furness (1993); S. M. Miller and Szurszewski (2002); S. M. Miller and Szurszewski (2003)]. Die Mehrheit der viszerofugalen Neurone, die CG, SMG und IMG erreichen, entspringen von Colon und Rektum

[Messenger and Furness (1993); Timmermans et al. (1993)]. Im Gegensatz dazu sind die noradrenergen inhibitorischen Neurone, die von diesen Ganglien entspringen, nahezu gleichmäßig entlang des Gastrointestinaltraktes verteilt. Diese anatomische Gegebenheit lässt vermuten, dass Colon und Rektum reflektorisch ihre eigene sowie die motorische Aktivität weiter proximal gelegener Regionen des Intestinums modulieren [Trudrung, Furness, Pompolo, and Messenger (1994); Messenger and Furness (1993)]. Zum einen kann so während der Darmfüllung die Relaxation der Colonwand aufrecht erhalten werden, da die Tendenz der glatten Muskelzellen zur Depolarisation und somit Kontraktion unterdrückt wird; zum anderen wird die motorische Aktivität des Dünndarms derart reguliert, dass der Inhalt proximal gelegener Darmschlingen zeitgerecht im Colon eintrifft. Dieser Reflexbogen stellt somit einen protektiven Puffermechanismus dar, mit dem ein zu starker Anstieg von Tonus und intraluminalen Druck im Darm verhindert werden kann.



**Abbildung 17. Intrazelluläre elektrische Aktivität vor und während Darmdistension.**

Auf der rechten Seite ist eindrucksvoll zu sehen, wie die elektrische Aktivität während der Distension des Colons ansteigt. In der Studie von Szurszewski et al. wurde zudem die freigesetzte Menge an Substanz P (SP) ermittelt, die bei Distension ebenfalls deutlich ansteigt [King and Szurszewski (1984)].

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

*Spinale* afferente Neurone entsenden ebenfalls Axonkollateralen zu den PVG, bilden mit diesen jedoch „en passant“-Synapsen aus. Auch bei spinalen afferenten Neuronen handelt es sich um mechanosensorische Neurone (*siehe Abb.17*) [King and Szurszewski (1984)], ihre Erregungsschwelle liegt jedoch höher ( $> 40\text{-}50\text{ cmH}_2\text{O}$ , sog. „*high-threshold*“ *Signalweg*) als bei klassischen viszerofugalen Neuronen [Parkman, Ma, Stapelfeldt, and Szurszewski (1993); R. C. Ma and

Szurszewski (1996a); R. C. Ma and Szurszewski (1996b)]. Ihre Nervenendigungen liegen innerhalb der Darmwand, reagieren auf Spannungsreize und sind sowohl mit der longitudinalen und zirkulären Muskelschicht „in Serie“ angeordnet [R. C. Ma and Szurszewski (1996a); Su, Wachtel, and Gebhart (2000)]. Die Aktivierung dieser peripheren Terminalen bewirkt in PVG-Neuronen ein sEPSP. Dies wiederum verstärkt den schnellen viszerofugalen cholinergen Input der PVG-Neurone, was schließlich eine vermehrte Hemmung der entsprechenden Darmsegmente bewirkt (siehe **Abb.17**).

### 1.4.3.3 Reflexe über periphere Ganglien

Das Konzept der Vermittlung viszero-viszeraler Reflexe über periphere autonome Ganglien entstand gegen Ende des 19. Jahrhunderts [Sokowin (1874)]. Studien dieser Zeit erforschten externe neuronale Verbindungen zwischen verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes und konnten zeigen, dass diese über die PVG verlaufen. Erste Studien am Hund [Galapeaux (1937)] postulieren die Existenz eines gastro-colischen Reflexes; Studien am Tiermodell der Katze [Garry (1933)] vermuten einen Reflexweg mit tonisch-inhibitorischem Input zwischen IMG und Colon [Lawson, Holt (1937)]. In den späten 30er und frühen 40er Jahren konnte Kuntz [Kuntz (1938)] am Tiermodell des Hundes die Existenz eines colo-colonischen Reflexes direkt nachweisen. Weitere Studienergebnisse dieser Zeit sprechen für einen ileo-hepatischen und colo-hepatischen Reflex [Kuntz, Van Buskirk (1941)]. Spätere Studien entdeckten inhibitorische intestino-gastrische Reflexe [Semba (1954)] und inhibitorische intestino-intestinale Reflexe [Semba (1954)] (einschließlich des recto-ilealen inhibitorischen Reflexes [Bulygin (1983)]). Neben der Distension wurden auch chemische Stimuli entdeckt, die eine Triggerung der Reflexaktivität zwischen verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes bewirken.

Die Existenz von peripheren, über die PVG vermittelten Reflexen wurde in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts auf Licht- und Elektronenmikroskopischer Ebene sowie durch retro- und antegrades Tracing bestätigt. Dennoch wurde das Konzept der PVG-vermittelten viszero-viszeralen Reflexe zunächst mit Skepsis betrachtet; so wurden die Ergebnisse von in vivo Studien mit dezentralisierten PVG zunächst angezweifelt. Man argumentierte, dass einige präganglionäre Fasertrakte der Sektion und Degeneration entgangen sein könnten, noch dazu da sich der Schwellenwert für den Reflex signifikant verändert hatte. Der direkte Nachweis eines über die PVG

vermittelten Reflexes gelang erstmals 1971 durch intrazelluläre in vitro-Aufzeichnungen der Signale von IMG-Neuronen [Crowcroft, Holman, and Szurszewski (1971)]. Bei einer intakten neuronalen Verbindung zwischen IMG und Colonssegment konnte für IMG-Neurone ein kontinuierlicher schneller cholinerg-nikotinerger synaptischer Input nachgewiesen werden; die Distension des Colons erhöhte hierbei die Frequenz des Inputs. Sobald jedoch die neuronale Verbindung zwischen Colonssegment und IMG durchtrennt wurde, verschwand die gesamte schnelle synaptische Aktivität [Crowcroft et al. (1971)].

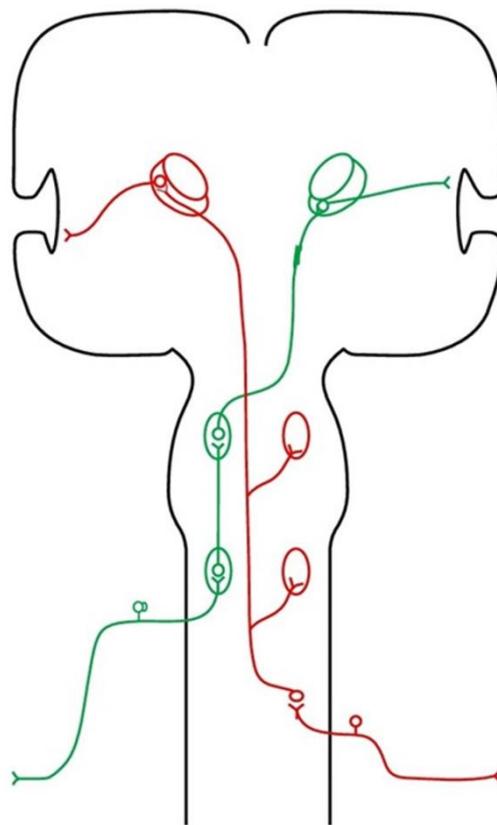
#### 1.4.4 Die Weiterverarbeitung sensorischer Signale im Gehirn

Das Gehirn empfängt eine Vielzahl sensorischer Signale aus gastrointestinalen afferenten Nervenfasern, die eine große Spannbreite peripherer Informationen enkodieren. Diese sensorischen Signale haben Effekte auf Motilität bzw. Sekretion und dienen der Aufrechterhaltung der homöostatischen Balance [Roman (1987)]. Die meisten dieser Signale sind unterschwellig und erreichen kaum unser Bewusstsein; wahrnehmbare Empfindungen wie Sättigung oder Völlegefühl und nicht zuletzt überschwellige Reize (beispielsweise Schmerzempfindungen) vervollständigen das sensorische Spektrum. Alle diese Empfindungen entstehen in den kortikalen und subkortikalen Strukturen des Gehirns, in denen die Informationen der afferenten Nervenfasern weiter verarbeitet werden [Berntson, Sarter, and Cacioppo (2003); Henry (2002); Saper (2002); Willis, Al-Chaer, Quast, and Westlund (1999); Willis and Westlund (1997); Derbyshire (2003)].

In diesem Abschnitt wird die Weiterverarbeitung gastrointestinaler sensorischer Signale im Gehirn erläutert. Neben der neuroanatomischen Repräsentation gastrointestinaler Sensationen sollen insbesondere die aufsteigenden vagalen und spinalen afferenten Nervenfasern inklusive ihrer zentralen Projektionen beschrieben werden.

Obwohl es praktisch erscheint, unterschiedliche Funktionen für *vagale* und *spinale* afferente Nervenfasern anzunehmen, konvergieren beide Fasertypen meist auf supraspinaler Ebene [Saper (2002); Bruggemann, Shi, and Apkarian (1998)], wodurch ihre Funktionen eng verbunden sind. Der Nucleus tractus solitarii (NTS) beispielsweise empfängt neben *vagalen* afferenten Nervenfasern auch ausgedehnten Input aus anderen Gehirnregionen sowie ein breites Spektrum an *spinalen* afferenten Fasern [Saper (2002)]. Er projiziert hauptsächlich zum Nucleus

parabrachialis der Pons, der multiple Projektionen aus den Laminae des Hinterhorns und so auf mehreren Wegen viszerale Informationen erhält [Henry (2002); Saper (2002)]. Der Nucleus parabrachialis selbst projiziert zu höheren zerebralen Strukturen einschließlich Thalamus und Hypothalamus sowie zum präfrontalen Cortex und anderen kortikalen Regionen, die sowohl vagale als auch spinale Informationen weiter verarbeiten [Henry (2002); Saper (2002)]. **Abbildung 18** zeigt eine schematische Darstellung der viszeralen sensorischen Signalwege in Rückenmark und Hirnstamm, die Thalamus und zerebralen Cortex erreichen.



**Abbildung 18. Afferente sensorische Signalwege zu Thalamus und Cortex.**

Rot dargestellt sind die *spinalen* afferenten Signalwege, grün die *viszeralen* afferenten Faserzüge des *N.vagus*; beachte, dass spinale Faserzüge bilateral zum NTS und Nucleus parabrachialis projizieren (vereinfacht werden hier nur die ipsilateralen Faserzüge dargestellt). Die *spinalen* afferenten Nervenfasern werden im *lateralen* Anteil des ventralen posterioren thalamischen Komplexes umgeschaltet und erreichen anschließend die *kaudal* gelegenen Anteile der Insula. Die *viszeralen* afferenten Fasern des *N.vagus* werden in NTS und Nucleus parabrachialis umgeschaltet und erreichen im Gegensatz zu den spinalen Fasern den *medialen* Anteil des ventralen posterioren thalamischen Komplexes; von hier aus erreichen sie den *anterioren* Anteil der Inselrinde.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

Integrative Prozesse bei der Signalverarbeitung spinaler und vagaler Informationen machen eine genaue Abgrenzung zwischen vagal und spinal vermittelten Informationen schwierig. Sogar bei der Erforschung des somatischen Schmerzes hat die enge Verbindung zwischen beiden Systemen in der Literatur darin gegipfelt, Schmerz als eine „viszerale Modalität“ [Saper (2002)] oder eine „homöostatische Gefühlsregung“ [Craig (2003)] zu bezeichnen, da sie „interozeptiv“ sei – sie beruht vielmehr auf der Integrität des Organismus als auf dessen Beziehung zur Außenwelt. Selbst auf der Ebene des Rückenmarks existiert eine ausgeprägte Konvergenz viszeraler und somatischer afferenter Fasern; schädliche Stimuli innerhalb des Gastrointestinaltraktes aktivieren *viszerosomatische nozizeptive* Nervenfasern und ihre jeweiligen Zielorte in den thalamischen Nuclei [Bruggemann, Shi, and Apkarian (1997); Bruggemann et al. (1998); Bruggemann, Shi, and Apkarian (1994)]. Im Folgenden sollen deshalb die somatischen und viszeralen Reaktionen als Teile eines miteinander verbundenen sensorischen Systems betrachtet werden.

Der Thalamus ist die größte Struktur innerhalb des Diencephalons und besteht aus insgesamt sechs separaten Kerngruppen (Nuclei). Die thalamischen Kerne lassen sich anhand ihrer Funktionsweise in zwei verschiedene Subgruppen unterteilen: Die sogenannten *spezifischen* Schaltkerne („Relay-Kerne“) übermitteln Informationen zwischen bestimmten kortikalen und subkortikalen Regionen (hauptsächlich Wahrnehmung, Bewegung, Emotion und Sprache). *Unspezifische* Kerne hingegen empfangen Input aus verschiedensten (meist konvergierenden) Quellen und erreichen über ihre Projektionen diverse kortikale Regionen [Lweine (1995)].

Im **lateralen** Thalamus liegen die Hauptzentren für die Verarbeitung schädlicher Stimuli in den *ventro-posterioren lateralen (VPL)* und in den *ventro-posterioren medialen (VPM)* Nuclei.

Nozizeptive Neurone des **VPL** reagieren auf schmerzhafte mechanische Stimuli bzw. Hitze und werden über aufsteigende C-Fasern erregt. Die rezeptiven Felder der VPL-Neurone sind verhältnismäßig klein, besitzen eine somatotope Organisation und projizieren nahezu ohne Ausnahme zum *primär* somatosensorischen Cortex (S1). Ca. 85% der VPL-Neurone reagieren sowohl auf kutane als auch auf viszerale Stimuli; der viszerale Input des VPL ist allerdings nicht viszerotop organisiert [Airapetian, Baganian, and Tatevosian (1982)].

Zwei andere für die Nozizeption relevante Kerngebiete des lateralen Thalamus sind der *ventro-posteriore inferiore (VPI)* und der *mediale Anteil des posterioren Komplexes (POm)*. Beide Kerngebiete sind somatotop gegliedert, besitzen jedoch größere rezeptive Felder als die Neurone des VPL. Man nimmt an, dass **VPI**-Neurone (im Gegensatz zu VPL-Neuronen) zum *sekundär* somatosensorischen Cortex (S2) projizieren.

Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass die *lateralen* und *medianen* zentralen Nuclei des **medialen** Thalamus relativ große rezeptive Felder besitzen [Bushnell and Duncan (1989)]; man vermutet deshalb, dass diese Regionen des Thalamus nicht der Lokalisierung des Schmerzreizes dienen, sondern stattdessen eine Differenzierung zwischen verschiedenen Schmerzintensitäten ermöglichen [Bushnell and Duncan (1989)].

Im **VMpo** konnten zudem nozizeptive Neurone nachgewiesen werden, die auf schädigende Stimuli wie große Hitze bzw. Kälte oder schmerzhaft mechanische Reize reagieren [Craig, Bushnell, Zhang, and Blomqvist (1994)]. Diese besitzen kleine rezeptive Felder, sind somatotop gegliedert und projizieren hauptsächlich zum Cortex der Insula [Craig et al. (1994)] sowie zu Area 3a des primär somatosensorischen Cortex. Vogt et al. konnten überdies Projektionen der medialen thalamischen Nuclei zu präfrontalen und anterior-cingulären Cortexarealen nachweisen, also zu Regionen, in denen kognitiv-emotionale Aspekte des Schmerzes verarbeitet werden [Vogt, Pandya, and Rosene (1987)].

Der **VMpo** erhält zudem Input über den Signalweg *Nervus vagus – NTS – Nucleus parabrachialis* [Henry (2002)]. Man vermutet, dass der Nervus vagus für die Homöostase des Gastrointestinaltraktes verantwortlich ist – mit Ausnahme der Dekodierung schädlicher Stimuli. Er projiziert einerseits zum *Nucleus reticularis*, andererseits zum *Nucleus intralaminaris* [Saper and Loewy (1980); Herbert, Moga, and Saper (1990)]; der *Nucleus reticularis* wiederum erreicht eine Vielzahl weiterer thalamischer Nuclei und ermöglicht so die Synchronisation der thalamo-corticalen Projektionen [Henry (2002)]; der *Nucleus intralaminaris* hingegen besitzt weitreichende Projektionen zu Striatum und cerebralem Cortex [Saper and Loewy (1980); Herbert et al. (1990)].

## 1.5 Überblick über die neurogenen Mechanismen des POI

Bereits im Jahre 1872 erkannten Goltz et al. [Goltz (1872)], dass die spontanen Darmkontraktionen an Häufigkeit und Stärke zunehmen, wenn das Rückenmark auf Höhe der Medulla oblongata durchtrennt wird; dies war eine der ersten Beobachtungen, welche die Existenz inhibitorischer spinaler Reflexe nahe legt. Eine Durchtrennung der Nn.splanchnici verbessert in tierexperimentellen Studien ebenfalls die gastrointestinale Motilität nach abdominalen Eingriffen; man nimmt deshalb an, dass vor allem die in den Nn.splanchnici verlaufenden afferenten Nervenfasern durch chirurgische Eingriffe am Darm aktiviert werden (und die Hypomotilität des Gastrointestinaltraktes bewirken). Dies bestätigt auch die Wirkung von Capsaicin an prävertebralen Ganglien (als Teil des splanchnischen Systems); als funktioneller Ablator von C-Fasern kann es die gastrointestinale Motilität postoperativ verbessern [Zittel, Rothenhofer, Meyer, and Raybould (1994); Zittel, Reddy, Plourde, and Raybould (1994); Zittel et al. (1998)]. Nachdem die Blockade von CGRP (calcitonin-gene-related peptide) einen ähnlichen Effekt nach sich zieht, geht man heute davon aus, dass dieses Peptid einen der Neurotransmitter darstellt, der von den erwähnten splanchnischen afferenten Nervenfasern freigesetzt wird. Eine Beteiligung von VIP (vasoactive intestinal polypeptide) gilt heute ebenfalls als gesichert [Boeckxstaens et al. (2000)].

Je nach Intensität des nozizeptiven Stimulus werden verschiedene neuronale Signalwege aktiviert.

Die reine Laparotomie (ohne Manipulation des Darmes) beeinträchtigt die Motilität nur kurzfristig; hier wird hauptsächlich ein adrenerger inhibitorischer Signalweg aktiviert [Boeckxstaens et al. (1999); Holzer, Lippe, and Amann (1992)]. Man nimmt an, dass dieser niederschwellige Signalweg einen spinalen Reflex darstellt, der mittels Durchtrennung der Nn.splanchnici unterbrochen werden kann [Livingston and Passaro (1990)].

Im Gegensatz dazu aktivieren stärkere Reize (wie beispielsweise die manuelle Stimulation des Darmes) einen höherschweligen supraspinalen Signalweg. Im Rahmen offener abdominaler Eingriffe, die unvermeidbar eine Manipulation einzelner Darmabschnitte nach sich ziehen, werden Neurone des NTS, des PVN und des Nucleus supraopticus aktiviert (erkennbar an einer gesteigerten c-Fos Expression innerhalb dieser Strukturen) [Barquist et al. (1996); Bonaz and Tache

(1997)]. Hier scheint CRF (corticotropin releasing factor) eine zentrale Rolle zu spielen – CRF-Antagonisten (direkt in die Cisterna magna appliziert) verhindern die Entstehung des POI und vermindern die c-Fos Expression im PVN nach abdominalen Eingriffen [Bonaz and Tache (1997)]. Dabei wird die Wirkung von CRF über Rezeptoren im Nucleus supraopticus des Hypothalamus vermittelt [C. Y. Chen et al. (2002); Luckey, Livingston, and Tache (2003)]. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren stimuliert Neurone, die ins Rückenmark projizieren und dort wiederum präganglionäre Neurone aktivieren, womit sich der supraspinale Reflexkreis schließt [Barquist et al. (1996); Tache, Monnikes, Bonaz, and Rivier (1993)].

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen inhibitorischen Signalwegen vermutet man einen weiteren nicht-adrenergen Signalweg [Boeckxstaens et al. (1999)]. In einer tierexperimentellen Studie konnte durch *alleinige* Blockade der *adrenergen* Neurotransmission weder der gestörte intestinale Transit noch die verzögerte Magenentleerung vollständig wiederhergestellt werden; die *zusätzliche* Blockade der *nitrergen* Transmission hingegen bewirkte eine vollkommene Wiederherstellung der genannten gastrointestinalen Funktionen. Man vermutet, dass es sich bei dem Transmitter dieses nonadrenergen Signalweges um Stickstoffmonoxid (NO) handelt [Boeckxstaens et al. (1999); De Winter et al. (1997)]. Andere Studien postulieren zudem VIP als inhibitorischer Neurotransmitter [Boeckxstaens et al. (2000); De Winter et al. (1998)].

## 1.6 Inflammatorische Mechanismen des POI

Die Aufgabe des Magen-Darm-Traktes besteht darin, lebenswichtige Nahrungsmittel aufzunehmen und unverdauliche Inhaltsstoffe nach aboral zu befördern. Im Rahmen der Nahrungsaufnahme gelangen neben der Nahrung auch Antigene und Mikroben in den Organismus. Die für die Resorption der Nahrungsstoffe verantwortlichen Enterozyten müssen somit zugleich eine Barrierefunktion übernehmen, so dass die für den Organismus schädlichen Stoffe nicht in den Körper gelangen können.

Die den Dickdarm des Menschen besiedelnden Bakterien unterstützen die Verdauung und limitieren die Besiedlung des Darmes mit Pathogenen. Sie können jedoch zu einer ernsten Bedrohung für den Organismus werden, wenn sie das Darmlumen verlassen und in die systemische Zirkulation gelangen. Das den Gastrointestinaltrakt auskleidende Epithel muss in der Lage sein, Gefahren in Form von pathogenen Bakterien (bzw. ihren Produkten), Nahrungsantigenen und

Medikamenten zu erkennen und auf sie zu reagieren. Den Trigger einer intestinalen Entzündung können Bakterien, Antigene und andere Pathogene darstellen; Epithelzellen, dendritische Zellen und Makrophagen müssen diese Trigger erkennen und auf sie reagieren, indem sie eine entsprechende Immunantwort regulieren.

### **1.6.1 Leukozyten der intestinalen Muscularis**

Auch unter physiologischen Bedingungen befinden sich die verschiedensten Arten von Immunzellen in der intestinalen Muscularis, wobei die sogenannten residenten Makrophagen weitaus am häufigsten anzutreffen sind [Kalff, Schwarz, et al. (1998)]. Sie bilden ein weitverzweigtes Netzwerk von Zellen entlang der gesamten Länge des Magen-Darm-Traktes [Faussone-Pellegrini et al. (1990); Bauer (1996); Mikkelsen (1995)]. Makrophagen fungieren im Rahmen der Immunabwehr als sogenannte Sentinelzellen und repräsentieren die ersten Zellen im Körper, die mit potentiellen Antigenen bakterieller oder viraler Herkunft in Kontakt treten [Kalff, Schwarz, et al. (1998)]. Durch diesen Kontakt werden die Makrophagen aktiviert, beginnen mit der Phagozytose der eingedrungenen Antigene und produzieren proinflammatorische Zytokine [Kalff, Schwarz, et al. (1998)]. Man nimmt an, dass Makrophagen hauptsächlich aus zirkulierenden Monozyten hervorgehen [Altschuler (1992)]. Monozyten sind im Blut zirkulierende Zellen des Immunsystems; ihre Aufgabe besteht ähnlich der der Makrophagen in der Zerstörung körperfremder Strukturen durch Phagozytose, zusätzlich aber auch in der Antigenpräsentation. Monozyten werden im Falle einer Entzündungsreaktion aktiv in das entsprechende Gewebe rekrutiert. Es ist bekannt, dass die Aktivität der Monozyten relativ schnell auf ein niedriges Niveau abfällt, sobald die Zellen den Blutstrom verlassen und in periphere Gewebe einwandern. Erst nach Exposition gegenüber induktiven Signalen kommt es zur erneuten Aktivierung und Ausdifferenzierung dieser Zellen in Gewebsmakrophagen [Adams, Johnson (1992)]. In diesem Zustand verbleiben sie in den entsprechenden peripheren Geweben über eine Zeitdauer von mehreren Monaten [Altschuler (1992)].

Neben Monozyten und Makrophagen befinden sich auch dendritische Zellen in der Tunica muscularis der Darmwand. Diese Zellen sind für ihre hohe Spezialisierung als Antigen-präsentierende Zellen bekannt. Sie phagozytieren zwar keine Antigene, präsentieren diese jedoch weiteren Zellen der Immunabwehr und haben somit einen immunstimulatorischen Effekt [Pavli, Maxwell, Van de Pol, and Doe (1996)]. Neben

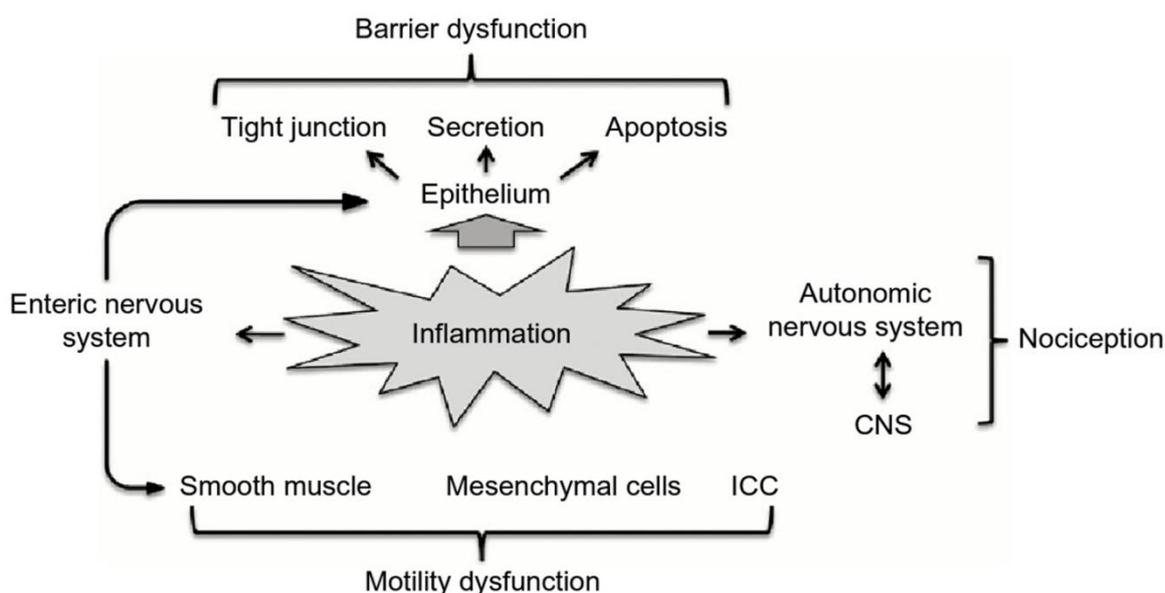
den beschriebenen Abwehrzellen kommen auch CD5-positive T-Zellen und natürliche Killerzellen (HNK 1-positiv) unter physiologischen Bedingungen in der Muscularis des Darmes vor [Kalff, Schwarz, et al. (1998)].

Bei verschiedensten Magen-Darm-Erkrankungen findet sich eine verstärkte Durchlässigkeit der mucosalen Barriere, so dass pathogene Keime und deren Produkte Zugang zur darunterliegenden Muscularis erlangen [Deitch (1990)]. Auf diese Weise kommt es zum ersten Kontakt zwischen den residenten Makrophagen und den eingedrungenen bakteriellen Toxinen, wodurch diese aktiviert werden [Adams and Hamilton (1987)]. Lipopolysaccharide (LPS, als Endotoxin ein Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien) können Makrophagen in kürzester Zeit aktivieren [Eskandari, Kalff, Billiar, Lee, and Bauer (1997)]. Man weiß heute zudem, dass bereits die einfache Präparation (im Sinne einer chirurgischen Manipulation) des Gewebes für nachfolgende *in vitro* Experimente einen potenten Stimulus für die Aktivierung residenter Makrophagen darstellt [Kalff, Schwarz, et al. (1998)]. Diese setzen daraufhin die kinetisch aktiven Substanzen NO und Prostaglandine frei, zum einen durch Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), zum anderen durch vermehrte Expression der Cyclooxygenase Typ II (COX II) [Kalff, Schraut, Billiar, Simmons, and Bauer (2000); Schwarz et al. (2001)]. Des Weiteren werden vermehrt proinflammatorische Zytokine (wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , oder Interleukin-1 $\beta$ ) sezerniert; diese Zytokine führen zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen (beispielsweise ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1) auf der Endothelschicht von Blutgefäßen der Muscularis [Kalff, Carlos, et al. (1999)]. Auf diese Weise erfolgt die Rekrutierung weiterer zirkulierender Leukozyten (Monozyten und neutrophile Granulozyten) in die Tunica muscularis, wodurch die inflammatorische Reaktion der Darmwand aufrechterhalten und sogar verstärkt wird [Kalff, Buchholz, et al. (1999); Kalff, Carlos, et al. (1999)].

Die zentrale Rolle kinetisch aktiver Substanzen (NO und Prostaglandine) für die Pathogenese des POI wurde in diversen Studien bestätigt [Kalff, Buchholz, et al. (1999); Kalff, Carlos, et al. (1999)]. Kalff et al. konnten überdies nachweisen, dass durch eine Hemmung der Leukozytenrekrutierung auch die abdominalchirurgisch induzierte Verschlechterung der Muskelfunktion verhindert werden kann [Kalff, Carlos, et al. (1999)].

## 1.6.2 Die Auswirkung der Entzündung auf die intestinale Funktionsfähigkeit

Die physiologischen Motilitätsmuster des Gastrointestinaltraktes werden durch intestinale Entzündungsvorgänge schwerwiegend gestört (siehe **Abb.19**). Insbesondere bei transmuralen Befall (z.B. bei einer Durchwanderung) können alle Ebenen der motorischen Kontrolle betroffen sein, von der Wahrnehmung bis hin zur glattmuskulären Funktion. Wie zu erwarten sind die Effekte einer Entzündung auf die motorische Funktion komplex – in der Literatur finden sich dementsprechend widersprüchliche Aussagen.



**Abbildung 19. Auswirkungen einer Entzündung auf die Funktionalität des Intestinums.**

Entzündungsreaktionen des Magen-Darm-Traktes haben weitreichende Effekte auf die Funktionen des Magen-Darm-Traktes, wie beispielsweise die motorische Aktivität, die Nozizeption und die Barrierefunktion des Epithels.

CNS – central nervous system; ICC – interstitial cells of Cajal.

aus: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 5.Auflage. Elsevier 2012.

### 1.6.2.1 ICCs

Die Kontrolle der basalen glattmuskulären Aktivität erfolgt durch die interstitiellen Zellen von Cajal (ICCs), deren Struktur und Funktion durch entzündliche Veränderungen im Gastrointestinaltrakt gestört werden – gut nachvollziehbar im Jejunitis-Modell (induziert durch Infektion mit *N.brasiliensis*) der Ratte [Fausson-

Pellegrini, Gay, Vannucchi, Corsani, and Fioramonti (2002)]. Hier persistierte die Struktur- und Funktionsstörung über längere Zeit, bis schließlich 30 Tage nach der Infektion keine ICCs mehr nachweisbar waren [Faussone-Pellegrini et al. (2002)]. Die ultrastrukturelle Untersuchung des entzündlich veränderten Gewebes zeigte eine reduzierte ICC-Dichte, Verletzungen an den Fortsätzen der ICCs sowie gestörte Kontakte der Fortsätze mit den entsprechenden glatten Muskelzellen [Lu et al. (1997); Der et al. (2000)]. Funktionsstörungen der ICCs finden sich insbesondere nach deren Kontakt mit Immunzellen [X. Y. Wang et al. (2002)]. Bei Trichinen-infizierten Mäusen (*Trichinella spiralis*) konnte im Dünndarm eine Zerstörung der ICCs beobachtet werden; dies wurde getriggert durch eine akute inflammatorische Reaktion (evtl. verursacht durch Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 oder TNF $\beta$ ) [Khan and Collins (1994)] und war mit einer abnormen basalen elektrischen rhythmischen Aktivität assoziiert – verursacht durch den Verlust der Schrittmacheraktivität der ICCs [Der et al. (2000)]. Es resultierte ein durch Ruheperioden charakterisiertes motorisches Muster, welches von Perioden sowohl ante- als auch retrograder peristaltischer Aktivität unterbrochen wurde [Der et al. (2000)].

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass Entzündungs-induzierte Veränderungen der ICC-Struktur und -Funktion eine nicht unerhebliche Bedeutung für die Entwicklung einer motorischen Dysfunktion besitzen – nicht nur in der Akutphase sondern auch post-inflammatorisch.

### **1.6.2.2 Plexus myentericus**

Der Plexus myentericus ist ein wichtiger neuronaler Regulator der intestinalen Motilität. Die Rhythmik der Darmbewegungen ist an das intrinsische oszillierende Transmembranpotential der ICCs gebunden; enterische Nerven verändern das Membranpotential der glatten Muskelzellen, indem sie es de- oder hyperpolarisieren und die oszillierenden Potentialveränderungen den Schwellenwert für die Entstehung eines Aktionspotentials (mit den daraus resultierenden Muskelkontraktionen) mehr oder weniger leicht erreichen. Mechanische Reize (wie beispielsweise ein Distensionsreiz) können einen Signalweg aktivieren, der von enterochromaffinen Zellen aus über afferente sensorische Nervenfasern den Plexus myentericus erreicht und hier auf- und absteigende Interneurone stimuliert, die anschließend ihrerseits exzitatorische oder inhibitorische Motoneurone aktivieren.

Auf der Ergebnisbasis hauptsächlich tierexperimenteller Studien verdichtet sich ein Ansatz, nach dem durch eine Entzündung sowohl die Struktur als auch die Funktion enterischer Nerven verändert werden – und somit indirekt auch die Funktionsweise bzw. Funktionalität der gastrointestinalen Motilität [Villanacci et al. (2008); Lomax, Fernandez, and Sharkey (2005)]. Interessanterweise sind einige der zu beobachtenden Veränderungen relativ subtil, sogar bei schweren entzündlichen Veränderungen – möglicherweise dadurch bedingt, dass es sich bei den enterischen Ganglien um immun-privilegierte neuronale Stationen handelt; evtl. ist in den meisten Tiermodellen die Zeitspanne für die Entzündungsreaktion jedoch auch zu kurz ausgelegt [Lomax et al. (2005)].

Spezifische inflammatorische Mediatoren verändern die Erregbarkeit myenterischer Neurone. Im Ileitis-Modell des Kaninchens war die nicht-cholinerge neuronale Aktivität nach der Administration von Ricin gesteigert [Goldhill, Sanders, Sjogren, and Shea-Donohue (1995)]. Beim Ileus des Meerschweinchens bewirkt exogen appliziertes PGE<sub>2</sub> als exzitatorischer Neuromodulator eine langsame Depolarisation sowohl von AH- als auch S-Neuronen [Dekkers, Akkermans, and Kroese (1997)]. Im Colitis-Modell des Meerschweinchens (induziert durch TNBS) korrelierte die vermehrte Expression der COX-2 im Plexus myentericus *in vitro* mit einer gesteigerten Erregbarkeit von AH-Neuronen einerseits und mit einer verminderten propulsiven Aktivität andererseits [Linden, Sharkey, Ho, and Mawe (2004)]. Die Hemmung der COX-2 konnte weder den Anstieg des mucosalen Serotonins noch die vermehrten fEPSPs verhindern; durch Hemmung der COX-2 war es jedoch möglich, die inflammatorisch induzierte gesteigerte Erregbarkeit der AH-Neurone zu verhindern und das Verhältnis zu S-Neuronen (mit sEPSPs) zu normalisieren [Linden et al. (2004)].

Die Funktion enterischer Nerven (inklusive der Motilität-regulierenden Neurone) wird durch neuronale Opioid-Rezeptoren moduliert, die auf den Neuronen selbst exprimiert werden [J. D. Wood and Galligan (2004)]. Opioid-Agonisten hemmen signifikant die Motilität – ein Grund für die schwerwiegenden Nebenwirkungen, die diese Wirkstoffe im Gastrointestinaltrakt entfalten [Holzer (2004)]. Interessanterweise führt eine Entzündung des Jejunums zu einer vermehrten Expression von  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren auf myenterischen Neuronen, nicht jedoch auf submucosalen Neuronen [Pol, Alameda, and Puig (2001)]. Dieser inflammatorisch induzierte Anstieg der Opioid-Rezeptor Expression könnte dem ausgeprägt bewegungshemmendem Effekt

der Opioide zugrunde liegen, wie er beim entzündlich veränderten Darm zu finden ist [Pol, Sanchez, and Puig (1996)].

Intestinale Entzündungsprozesse können auch die Freisetzung von Neurotransmittern verändern. Im tierexperimentellen Modell wurde nach einer Infektion mit *T. spiralis* die Freisetzung von Norepinephrin im Plexus myentericus *in vitro* unterdrückt [Swain, Blennerhassett, and Collins (1991); Jacobson, McHugh, and Collins (1995)]. Noch ist unklar, welcher Mechanismus diese veränderte Neurotransmitterfreisetzung während einer Entzündung bewirkt; man nimmt jedoch an, dass die veränderte Expression synaptischer Proteine eine Rolle spielt.

Alternativ könnte auch eine veränderte Weiterverarbeitung der Neurotransmittersignale (nach ihrer Freisetzung) als Erklärung für die myenterische Dysfunktion bei Entzündungsvorgängen dienen. Für das Modell der *T. spiralis* Infektion beispielsweise war ein signifikanter Abfall der Acetylcholinesterase-Aktivität an Tag sechs der Infektion zu beobachten, und das obwohl der Entzündungsprozess mit einer schnelleren Cholin-Uptake-Rate assoziiert war [Davis, Masella, and Blennerhassett (1998)]; dies lässt vermuten, dass bei einer Entzündung die neuronale Kontrolle der Darmmotorik durch eine gestörte Weiterverarbeitung des Acetylcholinsignals beeinträchtigt wird.

### 1.6.3 Spinale afferente Nervenfasern

Wie bereits weiter oben beschrieben bewirkt die chirurgische Manipulation des Darmes eine lokale Entzündungsreaktion und beeinträchtigt in der Folge die Muskelfunktion [Kalff, Schraut, et al. (1998); Kalff, Carlos, et al. (1999); Kalff et al. (2000); Schwarz et al. (2001); de Jonge et al. (2003); Bauer, Schwarz, Moore, Turler, and Kalff (2002); Kalff et al. (2003); Turler et al. (2002)]. Studienergebnisse zeigen, dass die Manipulation des Dünndarms sowohl zu einer Verlangsamung des intestinalen Transits als auch zu einer Verzögerung der Magenentleerung führt [de Jonge et al. (2003)]. Dies lässt Mechanismen vermuten, die ihre Wirkung in einiger Entfernung vom Ort der Entzündungsreaktion entfalten [de Jonge et al. (2003)] – Kalff et al. bezeichnen dieses Phänomen auch als „*field-effect*“ [Kalff, Buchholz, et al. (1999); Kalff, Carlos, et al. (1999)]. Eine Erklärung hierfür könnten Interaktionen zwischen den entzündlichen Veränderungen der intestinalen Muscularis und dem Aktivitätsniveau primärer afferenter Nerven liefern. Tierexperimentelle Studien bestätigen, dass die verzögerte Magenentleerung tatsächlich durch die

entzündlichen Veränderungen der Muscularis bedingt wird, und zwar durch Aktivierung eines spinalen inhibitorischen adrenergen Signalweges – auch erkennbar an der gesteigerten c-Fos Expression im Rückenmark [de Jonge et al. (2003)]. Zahlreiche Mediatoren könnten diese afferenten Fasern und damit den neuronalen Reflexweg aktivieren.

Im Rahmen der Entzündungsreaktion beim postoperativen Ileus werden (durch gesteigerte Expression der COX II) vermehrt Prostaglandine sezerniert [Schwarz et al. (2001)]. Kreiss et al. konzipierten eine tierexperimentelle Studie, die eruieren sollte, ob durch COX II-generierte Prostaglandine eine Sensibilisierung primärer afferenter Nerven bewirken [88]. Auch hier fand sich nach chirurgischer Manipulation eine gesteigerte c-Fos Expression im Rückenmark als Ausdruck der spinal vermittelten zentralen Aktivierung. Durch die Anwendung von DFU (als selektiven COX II-Hemmer) waren zum einen die POI-Charakteristika (Leukozyteninfiltration der Muscularis und Dilatation des Darmes) rückläufig, zum anderen normalisierten sich die Prostaglandinspiegel (Prostaglandin E<sub>2</sub>) [Kreiss, Birder, Kiss, VanBibber, and Bauer (2003)]; der COX II kommt demnach bei der Pathogenese des POI eine neuromodulatorische Schlüsselrolle zu. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich eine Hypothese formulieren, nach der intestinale Entzündungsvorgänge primäre afferente Nervenfasern aktivieren – es kommt zur Initiierung eines inhibitorischen Reflexes, der schließlich die Dysfunktion des Magen-Darm-Traktes verursacht.

Nach chirurgischer Manipulation des Darmes kommt es nicht nur zur vermehrten Sekretion von Prostaglandinen, sondern auch zur Mastzelldegranulation [de Jonge et al. (2003)]. Auch hier sind verzögerte Magenentleerung und entzündliche Muscularisinfiltration die Folge; beides kann durch den Mastzellstabilisator Ketotifen verhindert werden [de Jonge et al. (2003)].

#### **1.6.4 Cholinergic anti-inflammatory Pathway**

Sowohl Acetylcholin als auch Nikotin sind in der Lage, die Aktivierung von Makrophagen effektiv zu hemmen [Borovikova et al. (2000)]. Über diesen sogenannten „cholinergic antiinflammatory pathway“ wird die proinflammatorische Mediatorproduktion (wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6) durch Makrophagen effektiv gesenkt [H. Wang et al. (2004)]. Man weiß heute, dass durch Stimulation des efferenten N. vagus die Aktivierung von Makrophagen (und damit die Produktion proinflammatorischer Mediatoren) signifikant vermindert werden kann [Borovikova et

al. (2000); Tracey (2002)]. Die Aktivierung des nikotinischen Acetylcholinrezeptors auf Makrophagen ( $\alpha 7nAChR$ ) resultiert über eine Signalkaskade in der verminderten Produktion proinflammatorischer Mediatoren [de Jonge et al. (2005)]. Die Aktivierung des Acetylcholinrezeptors auf Makrophagen durch Stimulation des N. vagus („cholinergic antiinflammatory pathway“) führt demnach zu einer verringerten Infiltration der Muscularis mit Entzündungszellen und letztendlich auch zu einer Besserung der beim Ileus auftretenden Symptome [de Jonge et al. (2005)].

## **1.7 Pharmakologische Mechanismen des POI**

### **1.7.1 Die Wirkung von Anästhetika**

Alle bekannten Substanzklassen von Anästhetika haben eine Wirkung auf die gastrointestinale Motilität [Ogilvy and Smith (1995)]. Ihren stärksten Einfluss entfalten sie im Dickdarm, der keine interzellulären gap junctions und somit eine größere Anfälligkeit gegenüber der Anästhetikawirkung aufweist [Livingston and Passaro (1990)].

Die postoperative Epiduralanästhesie mit lokal wirksamen Anästhetika blockiert afferente und efferente inhibitorische Reflexe und wirkt zudem partiell antiinflammatorisch [Liu, Carpenter, and Neal (1995); Steinbrook (1998)]. Epidural applizierte Anästhetika können zudem afferente Stimuli blockieren, die eine metabolische Stressantwort des Organismus als Reaktion auf den chirurgischen Eingriff triggern [Holte and Kehlet (2002)]. Mehrere Studien zeigen, dass im Vergleich zu einer alleinigen postoperativen systemischen Opioidtherapie die zusätzliche epidurale Anwendung von Bupivacain-Hydrochlorid zu einer signifikanten Reduktion des Beschwerdebildes des POI führt [Wattwil (1989); Ahn, Bronge, Johansson, Ygge, and Lindhagen (1988); Scheinin, Asantila, and Orko (1987); Wallin et al. (1986)]. Generell scheint der Ort entscheidend zu sein, an dem die geplante Epiduralanästhesie zur Anwendung kommen soll; bei einer lumbalen oder tiefen thorakalen epiduralen Anästhesie konnte im Gegensatz zur midthorakalen Epiduralanästhesie kein positiver Effekt für den Verlauf des POI verzeichnet werden [Luckey et al. (2003)].

### **1.7.2 Die Wirkung von endogenen und exogenen Opioiden**

Opioide werden nach abdominalen chirurgischen Eingriffen häufig als Analgetika eingesetzt, haben aber meist eine verlängerte Krankheitsdauer zur Folge. Seit

Jahren ist bekannt, dass exogene Opioide zu einer Störung der gastrointestinalen Motilität führen [Ogilvy and Smith (1995)]. *In vivo* Studien zur Funktion des Dünndarms konnten zeigen, dass exogene  $\delta$ - und  $\mu$ -Opioidrezeptor-Agonisten die peristaltische Aktivität zum Erliegen bringen [Bauer and Szurszewski (1991); Bauer, Sarr, and Szurszewski (1991)]. Endogene Opioide (wie beispielsweise Enkephalin und Dynorphin) konnten innerhalb des Plexus myentericus und der zirkulären Muskelschicht des Dünndarms nachgewiesen werden. Derzeit kennt man drei unterschiedliche Typen von Opioidrezeptoren im Gastrointestinaltrakt:  $\delta$ -,  $\mu$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptoren [Bauer et al. (1991)]. Sowohl  $\delta$ - als auch  $\mu$ -Opioidrezeptoren finden sich auf NO-freisetzenden NANC-Fasern (non-adrenerge non-cholinerge Nervenfasern) zur zirkulären Muskelschicht. Binden Methionin-Enkephalin oder auch Dynorphin an  $\delta$ -Opioidrezeptoren auf NANC-Neuronen, kommt es zu einer verminderten Freisetzung deren inhibitorischer Neurotransmitter (wie beispielsweise NO) [Bauer and Szurszewski (1991)].

## 1.8 Hypothesen und Zielsetzung der Arbeit

Die Aktivierung intestinaler afferenter Signalwege spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des postoperativen Ileus (POI) [De Winter et al. (1997)]. Hierbei kommt es durch eine *Zunahme der afferenten* neuronalen Aktivität zu einer *Hemmung der efferenten* Aktivität und konsekutiv zu einer verminderten Darmmotilität [Kreis, Haupt, Kirkup, and Grundy (1998)]. Man nimmt an, dass diese beiden neuronalen Komponenten (*afferent* und *efferent*) Teil eines neuronalen Reflexes darstellen, welcher bei der Entstehung des POI eine entscheidende Rolle spielt [Kreis et al. (2000); Hillsley, Kirkup, and Grundy (1998)]. Es ist bekannt, dass während des POI *spinale afferente* Neurone aktiviert werden [Zittel, Reddy, et al. (1994); Castex, Fioramonti, Fargeas, More, and Bueno (1994)]; möglicherweise handelt es sich hier um die *afferente* Komponente des besagten inhibitorischen Reflexmechanismus [Snape, Wright, Battle, and Cohen (1979)]. Es stellt sich nun die Frage, wie diese afferenten Fasern aktiviert bzw. sensibilisiert werden. Hierfür gibt es **zwei** mögliche Mechanismen. *Zum einen* könnte es durch die Manipulation des Darms während der Operation zu einer Aktivierung von intestinalen mechanosensiblen afferenten Nervenfasern kommen. *Zum anderen* könnten lokale Entzündungsreaktionen (wie sie beim POI beobachtet werden) durch eine vermehrte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (beispielsweise Histamin, Bradykinin oder Prostaglandin E<sub>2</sub>)

[Kreis et al. (1998); Hillsley et al. (1998); Bueno and Fioramonti (1999)] afferente Nervenfasern aktivieren und / oder sensibilisieren [Hillsley et al. (1998)]. Insbesondere letzteres Phänomen könnte von hoher Relevanz für die Pathogenese des POI sein; die beschriebene (entzündlich bedingte) neuronale Reflexhemmung führt zu einer sofortigen Störung der Motilität mit Überblähung des Darms (Distension), was wiederum die Sensibilisierung mechanosensibler afferenter Nervenfasern bewirken könnte. Es ist bekannt, dass diese afferenten mechanosensiblen Fasern als Nozizeptoren fungieren und so möglicherweise zu dem Beschwerdebild der Patienten während des POI beitragen [Cervero (1991)]. Der genaue Mechanismus der Aktivierung und Sensibilisierung intestinaler afferenter Nervenfasern während des POI ist jedoch weiterhin unklar.

**Die neurogenen Mechanismen, die bei der Entstehung des POI zum Tragen kommen, wurden bisher lediglich durch indirekte Methoden untersucht** [Kalff, Buchholz, et al. (1999); De Winter et al. (1997); Holzer, Lippe, and Holzer-Petsche (1986); Nadelhaft, de Groat, and Morgan (1986)]; **eine direkte Aufzeichnung der afferenten neuronalen Aktivität während der Frühphase des POI war bislang nicht möglich.** Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die intestinale afferente Nervenfasernaktivität während der Frühphase des POI direkt zu erfassen und zu charakterisieren. Hierbei war die **zentrale Hypothese**, dass es durch mechanische Manipulation des Dünndarms zu einer Steigerung der Sensibilität *spinaler* afferenter Nervenfasern gegenüber *Schmerzmediatoren* (wie beispielsweise Bradykinin) und *mechanosensitiver Stimuli* (wie zum Beispiel mechanische Distension) kommt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob weitere exzitatorische neuronale Reflexmechanismen wie *vagale* afferente Signalwege (und nicht nur ausschließlich *spinale* afferente Signalwege) an der Entstehung der postoperativen Passagestörung beteiligt sind. Begleitend sollten Motilität und Entzündungsreaktion des Darms sowie seine Morphologie durch entsprechende Untersuchungsverfahren dokumentiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen Mäusen des Stammes C57BL/6NCrl durchgeführt, das Gewicht der Tiere betrug zwischen 19 – 21 g. Sie wurden bei standardisierten Laborbedingungen in ein einem 12:12 Stunden hell/dunkel Zyklus (Beginn des Lichtzyklus um 6:30 Uhr) gehalten und erhielten Trockenfutter sowie Trinkwasser ad libitum. Die Tierversuche wurden unter dem Aktenzeichen 11/05 vor Versuchsbeginn durch die Regierung von Oberbayern gemäß des § 8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) genehmigt.

### 2.2 Versuchsdurchführung

#### 2.2.1 Übersicht

#### 2.2.2 Auslösen des postoperativen Ileus

Der postoperative Ileus (POI) wurde durch einen operativen Eingriff ausgelöst, in dessen Zentrum die sogenannte standardisierte Dünndarmmanipulation steht [Kalff, Carlos, et al. (1999); Kalff, Schraut, et al. (1998)]. Nachfolgend sollen die einzelnen Schritte der Operation detailliert beschrieben werden.

Zunächst wurde die Narkose der Versuchstiere eingeleitet; dies erfolgte durch Inhalation des volatilen Anästhetikums Isofluran. Das Operationsfeld wurde anschließend mittels Rasur und Desinfektion von Haaren und Keimen befreit. Nach steriler Abdeckung des OP-Gebietes durch befeuchtete Mullkompressen erfolgte die mediane Laparotomie (medianer Bauchlängsschnitt) mit einer Länge von ca. 2 cm; hierbei wurden Haut, Linea alba und Peritoneum scharf durchtrennt. Anschließend wurde das Dünndarmkonvolut vorsichtig aus seiner anatomischen Lage disloziert und auf den Kompressen in seiner gesamten Länge dargestellt. Nun erfolgte die sogenannte standardisierte Dünndarmmanipulation. Diese bestand darin, den Inhalt des Dünndarms mit sterilen Watteträgern durch simultane Rollbewegungen zunächst in Richtung Zökum, und in der Folge wieder zurück in Richtung Duodenum zu bewegen (*siehe Abb.20*). Diese Prozedur wurde in standardisierter Weise dreimal wiederholt. Nach der Manipulation wurde der Darm in seine anatomisch korrekte Lage zurückverlagert und das Abdomen mit fortlaufender Naht verschlossen.

Sogenannte Kontrolltiere erhielten eine Scheinoperation, bei der lediglich eine Laparotomie (ohne Darmmanipulation) durchgeführt wurde. Alle Tiere wurden bis zu ihrem vollständigen Erwachen aus der Narkose überwacht und auf einer Wärmeplatte vor Auskühlung geschützt. Bereits ein bis zwei Stunden nach dem operativen Eingriff begannen die Tiere wieder mit der Nahrungsaufnahme; dabei konnte hinsichtlich des Ess- und Trinkverhaltens kein offensichtlicher Unterschied zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen ausgemacht werden.



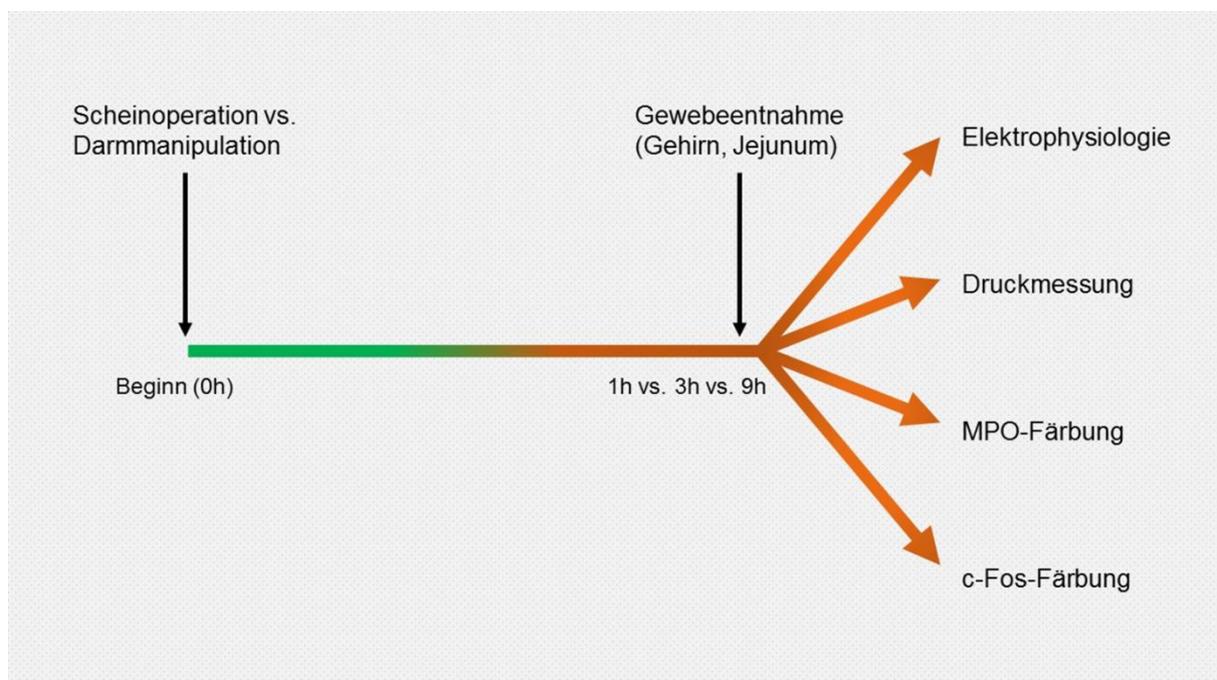
**Abbildung 20. Mechanische Darmmanipulation.**

Zu Beginn der Ileus-auslösenden Operation wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und der Dünndarm aus seiner anatomischen Lage disloziert. Zur Induktion des postoperativen Ileus wurde der Darm durch simultane Rollbewegungen mit zwei feuchten Wattestäbchen manipuliert. Die Operationen fanden unter standardisierten OP-Bedingungen statt, der Darm der Tiere wurde ausschließlich mit sterilen Watteträgern berührt und manipuliert.

## 2.2.3 Gewebeentnahme und Gewebeaufbereitung

### 2.2.3.1 Entnahme des Jejunums für MPO-Färbung und Nervenfaserableitung

Nach einer Stunde bzw. drei oder neun Stunden wurden die Tiere durch eine Überdosis Isofluran geopfert. Anschließend erfolgte eine erneute mediane Laparotomie – wiederum unter sterilen Kautelen – zur Entnahme des proximalen Jejunums. *Ein Teil* des Darmes wurde anschließend präpariert / fixiert und für die *Myeloperoxidasefärbung* vorbereitet. *Der andere* Darmabschnitt hingegen wurde direkt den *elektrophysiologischen Untersuchungen* zugeführt (siehe **Abb.21**).

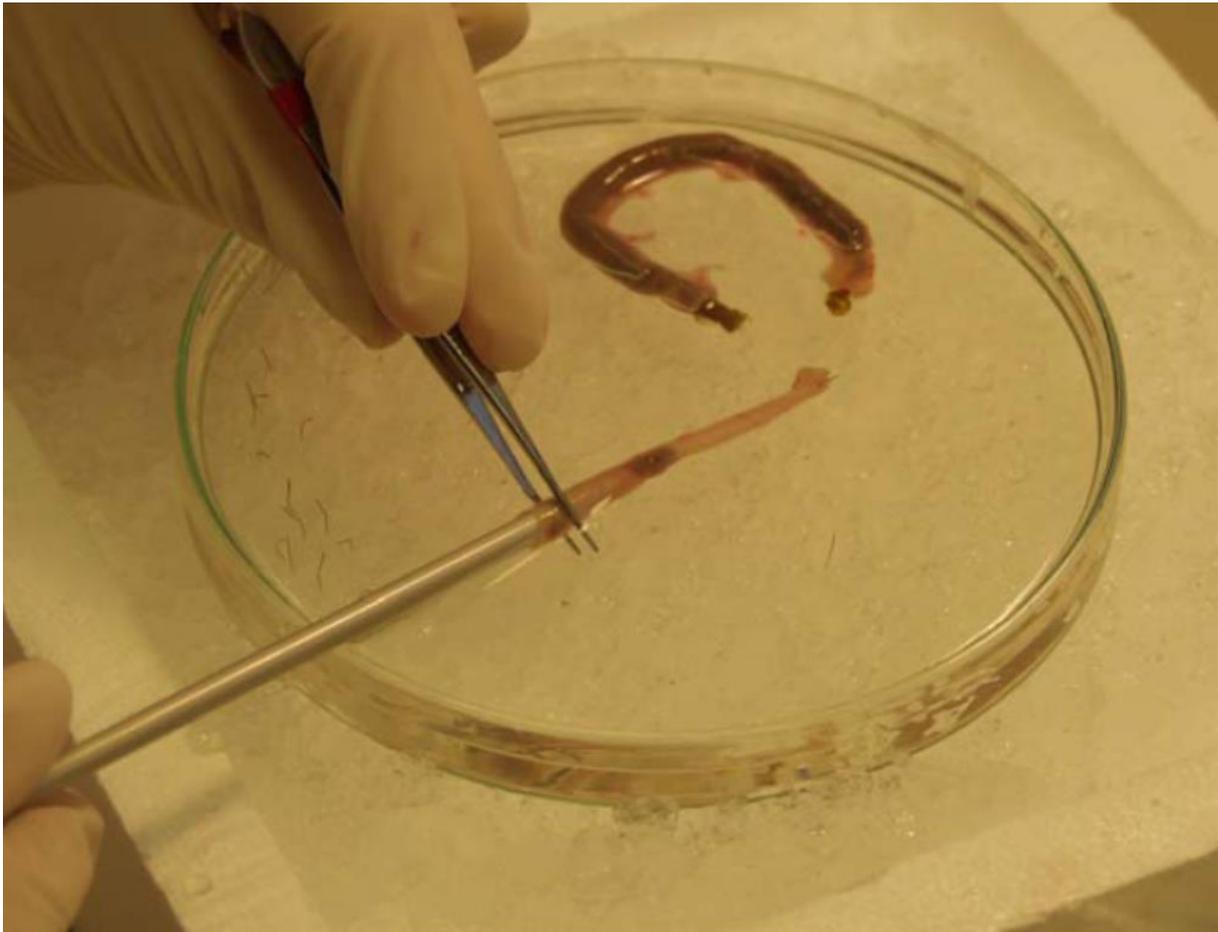


**Abbildung 21. Versuchsablauf.**

Ablauf der Experimente, beginnend mit der entsprechenden Operation der Versuchstiere (Scheinoperation vs. Darmmanipulation) über die Entnahme der relevanten Gewebe (Jejunum und Gehirn) bis zur Durchführung der einzelnen Versuche.

Zunächst sollen die einzelnen Schritte erläutert werden, durch die der Darm für die **Myeloperoxidasefärbung** vorbereitet wurde.

In einem ersten Schritt wurden die entnommenen Darmsegmente von mesenterialem Fett- und Bindegewebe befreit. Anschließend wurde eine Knopfkanüle in das Darmlumen eingebracht, so dass der Darm mit Krebs-Lösung gespült und von Darminhalt gereinigt werden konnte (siehe **Abb.22**).



**Abbildung 22. Darmreinigung.**

Reinigung eines Jejunumsegments von Darminhalt mit Hilfe einer Knopfkanüle im Rahmen der Vorbereitung für die elektrophysiologischen Untersuchungen.

In einem nächsten Schritt wurde der entnommene Darm in gleich große ca. 1,5 bis 2 cm lange Abschnitte unterteilt, die alle separat der Myeloperoxidasefärbung zugeführt wurden. Die einzelnen Darmsegmente wurden auf ihrer mesenterialen Seite mittels Längsschnitt eröffnet und mit ihrer mucosalen Oberfläche nach oben flach ausgerollt. In dieser Position wurde der Darm auf dafür vorgesehenen Korkplättchen aufgespannt und mit feinen Nadeln im Randbereich fixiert. Die aufgespannten Jejunumsegmente wurden nun für vier Stunden in neutral gepuffertem Formalin (NBF) fixiert. Anschließend wurden die fixierten Darmsegmente in silikonbeschichtete Schalen eingebracht, dreimal mit PBS (Phosphate Buffered Solution) gewaschen und mit Kanülenspitzen auf der Silikonoberfläche befestigt. Unter dem Mikroskop erfolgte nun die Separation der Mucosa / Submucosa von der Muscularis mit feinen Pinzetten. Die fertigen Muscularis-Präparate wurden anschließend in NBF bei 4 °C bis zum Aufziehen auf die Objektträger aufbewahrt.

Nach Aufziehen der Präparate auf die Objektträger erfolgte die Trocknung bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von ca. 30 bis 40 Minuten. Dann wurden die Proben bei -20 °C eingefroren und bis zur Durchführung der Myeloperoxidasefärbung konserviert.

Für die **elektrophysiologischen Untersuchungen** wurden ein bis drei ca. 2 cm lange Darmsegmente aus dem oberen Jejunum verwendet. Die Segmente wurden (wie oben bereits geschildert) mit Hilfe einer Knopfkanüle gespült und von Darminhalt gereinigt (*siehe Abb.22*). Im Anschluss wurde ein Segment direkt der elektrophysiologischen Untersuchung zugeführt; die übrigen Segmente wurden in eine eisgekühlte und mit einer Mischung aus O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%) voroxygenierten Krebs-Ringer-Lösung eingebracht. Auf diese Weise konnten die Präparate ein bis zwei Stunden konserviert werden, bis sie ebenfalls elektrophysiologisch wurden.

### 2.2.3.2 Fixierung des Versuchstiers und Entnahme des Gehirns

Nach der Darmentnahme erfolgte die Entnahme und Fixierung des Gehirns. Zunächst wurde der linke Ventrikel des Herzens scharf eröffnet und mit einer Knopfkanüle sondiert. Diese wurde bis in die Aorta ascendens vorgeschoben und mit zwei Kocherklemmen fixiert. Nun erfolgte die Eröffnung der Vena cava inferior, um das Ausströmen des Blutes und der Spülflüssigkeit zu gewährleisten. Dann wurde das Versuchstier über die intraaortal liegende Knopfkanüle mit 100 ml 0,9% Natriumchloridlösung blutleer gespült. Die Fixierung des Versuchstieres erfolgte mit 50 ml 4%iger Paraformaldehydlösung in 0,1 M PBS.

Bei der anschließenden Präparation des Gehirns wurden zunächst das Fell und die Nackenmuskulatur von okzipital her abpräpariert und der atlanto-okzipitale Übergang dargestellt. In der Folge wurden die Wirbelbögen entlang des Rückenmarkkanals von dorsal aus entfernt und die Hirnstammregion freipräpariert. Anschließend erfolgte die Eröffnung der Schädelkalotte von okzipital nach frontal mit Hilfe einer Pinzette. Das Gehirn wurde nun von der Schädelbasis aus beginnend abgehoben und letztendlich unter Durchtrennung der einzelnen Hirnnerven aus der Schädelgrube heraus luxiert (*siehe Abb.23*). Zum Abschluss der Präparation wurde der Hirnstamm vom restlichen Gehirn abgetrennt und vier Stunden lang mit NBF nachfixiert. Bis zur immunhistochemischen Aufarbeitung wurde das Präparat in 25%iger Sucrose entwässert und konserviert.



Zu Beginn der Gehirnentnahme wird ein Hautschnitt in ventro-dorsaler Richtung durchgeführt, bis die Schädelkalotte und Sutura sagittalis gut sichtbar im Operationsfeld liegen.



Entlang der Sutura sagittalis wird das Schädeldach spaltförmig eröffnet. Hierbei ist darauf zu achten, dass das Großhirn nicht durch das Seziermesser verletzt wird.



Durch Aufspreizen des Os parietale mit der Pinzette wird das Großhirn zugänglich gemacht

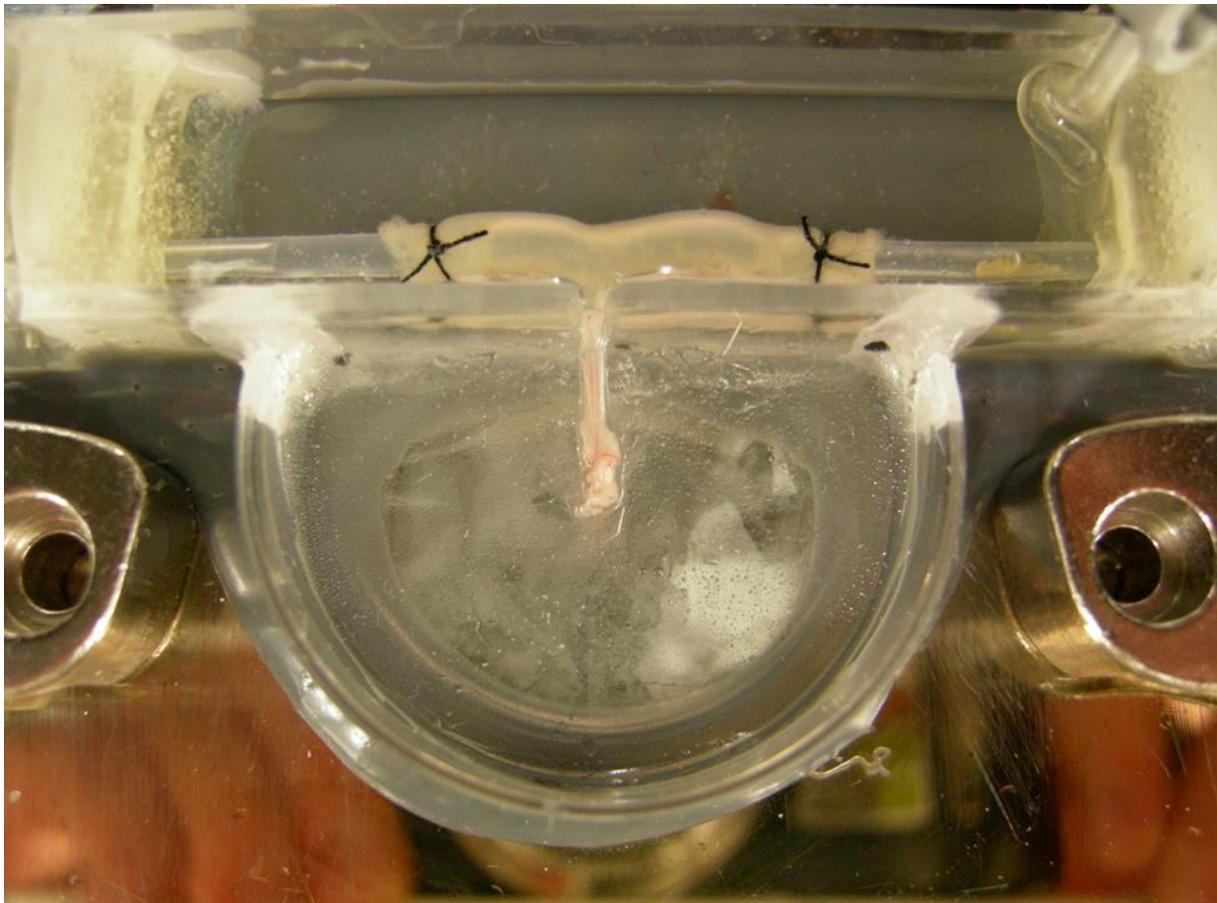


Mit einer kleinen Schere wird das Os parietale reseziert, bis das Gehirn entnommen werden kann

Abbildung 23. Gehirnentnahme.

### 2.3 Nervenfaserableitung und intraluminale Druckmessung

Die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgten an einem Darmsegment des oberen Jejunums mit ca. 2 cm Länge. Im Unterschied zu den für die MPO-Färbung vorgesehenen Präparaten wurde das anhängende Mesenterium inklusive der darin verlaufenden Nerven hier erhalten. Das vorbereitete Präparat (siehe oben) wurde in einem Zweikammerorganbad untersucht; hierbei nahm eine mit Krebs-Puffer perfundierte Kammer („Perfusionskammer“) das Darmsegment auf, die andere Kammer („Präparationskammer“) war mit Silikon beschichtet und diente der Nervenpräparation (siehe **Abb.24**).

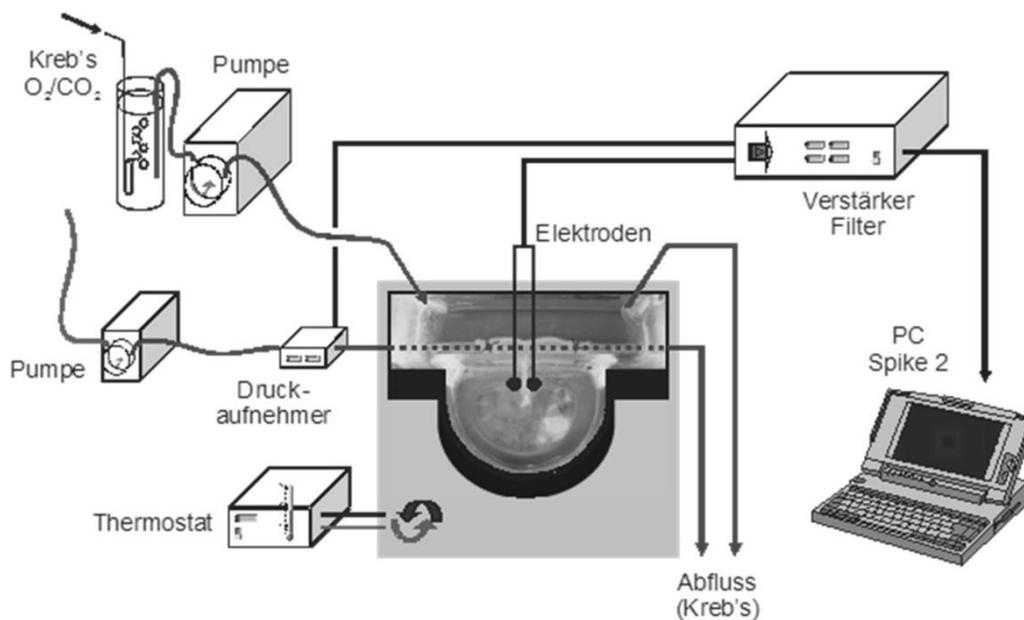


**Abbildung 24. Organbad.**

Die Fotografie zeigt das Darmpräparat in der mit Krebs-Puffer perfundierten Kammer („Perfusionskammer“), in der anderen Kammer („Präparationskammer“) erfolgt die Nervenpräparation.

Die Temperatur der Perfusionskammer betrug konstant 32 °C. Die Krebs-Lösung (Zusammensetzung (mM): Na<sup>+</sup> 143,5; K<sup>+</sup> 5,9; Cl<sup>-</sup> 126,0; Ca<sup>2+</sup> 2,5; Mg<sup>2+</sup> 1,2; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; SO<sub>4</sub> 1,2; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 25,0; Glukose 10,0 und Natriumbutyrat 1,0) wurde mit O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>

(95/5%) präoxygeniert, um den pH-Wert konstant bei 7,4 zu halten. Die Perfusionsgeschwindigkeit, mit der die Krebs-Lösung die Kammer durchfloss, betrug konstant 7,0 ml/min. Nachdem auf beiden Seiten des zu untersuchenden Darmsegments ein Perfusionskatheter in das Darmlumen eingebracht worden war, wurde der Darm beidseits an diesen Kathetern mittels Ligatur fixiert. Unmittelbar anschließend wurde die Perfusion des Darmes mit Krebs-Ringer-Lösung begonnen (die Perfusionsgeschwindigkeit betrug hier 10,0 ml/h) – sie sollte den physiologischen Fluss der Nahrung von oral nach aboral imitieren. Der proximale Katheter war zu diesem Zweck direkt mit einer Perfusionspumpe (IVAC 711) verbunden, wohingegen der distale Katheter einen offenen Abfluss aufwies und nach Belieben verschlossen werden konnte. Der zuführende Schenkel war zudem mit einem Druckaufnehmer verbunden, so dass permanent der intraluminale Druck im Darm gemessen werden konnte. Nachfolgend wurde das Mesenterium des so platzierten Darmes durch eine kleine Öffnung in die Präparationskammer des Organbads gezogen. Diese kleine Öffnung wurde anschließend mit Silikon-Hochvakuumfett verschlossen, um eine vollkommene Trennung beider Organbadkammern voneinander zu gewährleisten. Nun wurde die Präparationskammer des Organbades zur elektrischen Isolation mit flüssigem Mineralöl gefüllt. Als nächstes erfolgte die Dissektion des Fett- und Bindegewebes, die Darstellung der Gefäße und schließlich die Freilegung der mesenterialen Nervenfasern. Anschließend wurde eine elektrophysiologische Ableitung über bipolare Platinelektroden durchgeführt. Der freipräparierte Nerv wurde hierfür mit dem einen Arm der Elektroden verbunden, während der andere Arm als Referenz diente und mit einem Stück Bindegewebe der Mesenterialarkade konnektiert wurde. Die Elektroden wurden an einen CED 1902 Verstärker und Filter (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) angeschlossen. Dies ermöglichte die 10.000fache Verstärkung des Signals und dessen Filterung mit einer Bandbreite von 100 Hz bis 1 kHz. Gleichzeitig wurden die Signale des Druckaufnehmers an einen weiteren CED 1902 Verstärker und Filter geleitet. Die Signale der elektrophysiologischen Nervenfaserableitung wurden ebenso wie die des Druckaufnehmers einem AD-Wandler 1401 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) zugeführt. Dort wurden sie weiterverarbeitet und letztendlich in ein Computersystem mit zugehöriger Software (Spike 2 Software, Version 4.01, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) eingespeist (siehe **Abb.25**).



**Abbildung 25. Experimentelles Setup zur Nervenfaserableitung.**

Der Dünndarm wird zunächst in der Perfusionskammer (hintere Kammer) platziert und sowohl intraluminal via Katheter als auch extraluminal durch ein Pumpensystem mit physiologischer Kreb's-Ringer-Lösung perfundiert. Über eine kleine Öffnung zwischen beiden Kammern wird das Mesenterium des Darms in die Präparationskammer (vordere Kammer) gezogen, wo schließlich der Nerv freipräpariert und mit den Ableitungselektroden konnektiert wird. Die Signale der elektrophysiologischen Nervenfaserableitung werden gefiltert, verstärkt und in ein Computersystem eingespeist.

## 2.4 Immunhistochemischer Nachweis des Fos-Proteins

### 2.4.1 Immunhistochemie zur Bestimmung der neuronalen Aktivität

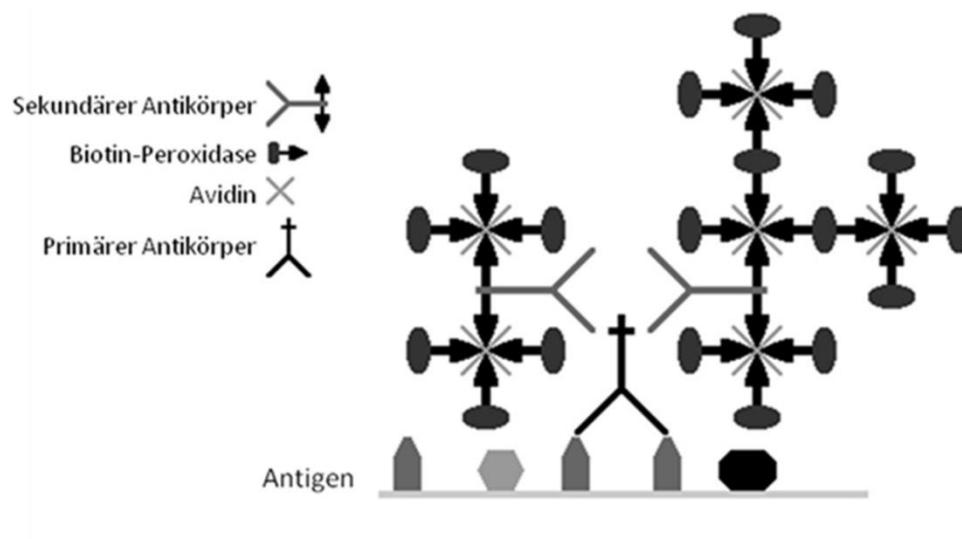
Die neuronale Aktivierung im Nucleus tractus solitarii (NTS) und in der Area postrema (AP) wurde mittels eines immunhistochemischen Färbeverfahrens, der sogenannten Fos-Technik dargestellt. In Nervenzellen kommt es durch unspezifische Aktivierung wie etwa im Rahmen einer Entzündung zur Expression sogenannter „early-onset genes“. Dies dient unter anderem der Bereitstellung von Proteinen, die für eine adäquate Entzündungsreaktion der Zelle notwendig sind. Es handelt sich hierbei hauptsächlich um Proteine mit Abwehrfunktion, wie beispielsweise Zytokine und Interleukine. Um ein solches „early-onset gene“ handelt es sich auch beim c-Fos Gen. Der Buchstabe *c* bildet die Abkürzung für „cellular“; der Buchstabe *F* steht stellvertretend für die Namen der drei Entdecker des Gens – Finkel, Diskins und

Jinkins; die Buchstaben o und s stehen für den Begriff „osteosarcoma“ [Finkel, Biskis, and Jinkins (1966)]. Das c-Fos Gen gehört zur Gruppe der Proto-Onkogene; das Gen selbst wie auch sein c-Fos Transkriptionsfaktor sind somit für Zellwachstum, Zelldifferenzierung sowie Zellentwicklung von Bedeutung [de Jonge et al. (2003); Finkel et al. (1966)]. Das c-Fos Gen wird durch eine Vielzahl von Reagenzien wie Mitogene, pharmakologische Substanzen und andere Zellfaktoren stimuliert [Trouche et al. (1993)]. Nach Aktivierung des Gens kommt es zu einer raschen Expression des 62000 Dalton schweren Fos-Proteins. Das Fos-Protein ist nicht stabil und repräsentiert nur ungefähr 0,1% der zellulären Proteinmenge. Es bildet allerdings zusammen mit dem sogenannten Jun-Protein einen Komplex, der spezifisch an eine Basensequenz der DNA bindet und somit gewisse Stabilität erlangt [Colotta, Polentarutti, Sironi, and Mantovani (1992); Distel and Spiegelman (1990); Herrera et al. (1990); Ransone and Verma (1990)]. Bedeutung erlangte das Gen bzw. sein Produkt durch die Tatsache, dass es immer dann in ZNS-Kerngebieten exprimiert wird, wenn Nervenzellen über einen längeren Zeitraum stimuliert werden. Somit kann durch den immunhistochemischen Nachweis von Fos-Protein in den Zellkernen von ZNS-Kerngebieten deren Aktivierung nachgewiesen werden [Hunt, Pini, and Evan (1987)].

#### **2.4.2 Immunhistochemische Aufbereitung des Gehirnpräparates**

Das fixierte Gehirn wurde zur weiteren Aufarbeitung aus der 25%igen Sucrose-Lösung (*siehe oben*) entnommen, im Gefriermikrotom aufgefroren und in 30 µm dicke Kryoschnitte geschnitten. Nach Sammeln der Kryoschnitte in PBS-Lösung (Phosphate Buffered Saline) wurde jeder zweite Hirnschnitt der immunhistochemischen Färbung zugeführt. Die immunhistochemische Färbetechnik erfolgte mittels Streptavidin-Biotin Methode in Free-Floating Technik (*siehe Abb.26*). Zunächst wurden die Schnitte zweimal fünf Minuten lang in PBS gespült. Dann erfolgte eine 15-minütige Inkubation in 30%iger Wasserstoffperoxidlösung bei Raumtemperatur, um die Mitreaktion endogener Peroxidasen während der Färbereaktion zu verhindern. Nachfolgend wurden die Schnitte dreimal fünf Minuten lang in PBS gespült, gefolgt von der Inkubation in einer Blockierlösung (Normal Goat Serum) für 20 Minuten. Im anschließenden Färbeschritt wurde der polyklonale Antikörper „rabbit anti-c-Fos“ (Primärantikörper) in einer Verdünnung von 1:2000 hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem

Spülen in PBS erfolgte dann die Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper „goat anti-rabbit“ (Sekundärantikörper) in einer Verdünnung von 1:100. Die Inkubationszeit betrug hierbei 90 Minuten bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem Spülen wurde dann das Peroxidase-konjugierte Streptavidin-Biotin Komplexreagenz (ABC-Reagenz) hinzugefügt, welches eine hohe Affinität für den biotinylierten Zweitantikörper besitzt (Dissoziationskonstante  $10^{-19}$  M). Nach erneutem Spülen in PBS wurde nun zur Entwicklung der Farbreaktion das chromogene Substrat 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) zusammen mit PBS in Wasserstoffperoxid eingebracht und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Spülen in PBS erfolgte das Einlegen der Schnitte in Mounting-Solution. Zum Abschluss wurden die einzelnen Schnitte auf Objektträger aufgezogen, bei Raumluft getrocknet, in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe / Xylol dehydriert und schließlich in Roti-Histokitt eingedeckt [Hsu, Raine, and Fanger (1981)]. Ein Überblick über das c-Fos Färbeprotokoll wird in **Tabelle 2** gegeben.



**Abbildung 26. Schematische Darstellung der Streptavidin-Biotin-Komplexreaktion.**

In der 1. Phase kommt es zur Bindung des primären Antikörpers an das Antigen. In der 2. Phase bindet der an das Antigen gebundene Primärantikörper an den Sekundärantikörper. In einer 3. Phase bindet das Peroxidase-konjugierte Streptavidin-Biotin-Molekül an den Sekundärantikörper.

1.		2 x 5 Minuten in PBS (Phosphate Buffered Saline) waschen
2.		Blockierung der endogenen Peroxidase für 15 Minuten bei RT
	a.	100 ml PBS
	b.	+ 0.5 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
3.		3 x 5 Minuten in PBS waschen
4.		Blockierlösung für 20 Minuten bei RT
	a.	950 µl Verdünnungspuffer Triton X-100
	b.	+ 50 µl NGS (Normal Goat Serum)
5.		Primärantikörper über Nacht bei RT / c-Fos Vorverdünnung 1:100
	a.	10 µl rabbit anti-c-Fos (Primärantikörper)
	b.	+ 990 µl Verdünnungspuffer Triton X-100
6.		Primärantikörper / c-Fos Hauptverdünnung 1:2000
	a.	940 µl Verdünnungspuffer Triton X-100
	b.	+ 10 µl NGS (Normal Goat Serum)
	c.	+ 50 µl c-Fos Vorverdünnung (1:100)
7.		3 x 5 Minuten in PBS waschen
8.		Sekundärantikörper für 90 Minuten bei RT / Verdünnung 1:100
	a.	990 µl Verdünnungspuffer Triton X-100
	b.	+ 10 µl goat anti-rabbit (Sekundärantikörper)
8.		3 x 5 Minuten in PBS waschen
9.		ABC-Reagenz für 90 Minuten bei RT
	a.	1000 µl Verdünnungspuffer Triton X-100
	b.	+ 10 µl Lösung A (ABC-Reagenz)
	c.	+ 10 µl Lösung B (ABC-Reagenz)
10.		3 x 5 Minuten in PBS waschen
11.		Entwicklung mit DAB (3,3-Diaminobenzidin) für 10 Minuten bei RT
	a.	100 ml TBS (Tris Buffered Solution)
	b.	+ 50 mg DAB
	c.	+ 33 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
12.		3 x 5 Minuten in PBS waschen
13.		10 Minuten in Mounting-Solution
14.		Schnitte auf Objektträger aufziehen und trocknen lassen
15.		aufsteigende Alkoholreihe
	a.	jeweils 1 Minute in 50%, 70%, 96% und 100% Ethanol
	b.	1 Minute in Xylol
16.		Eindecken in Roti-Histokitt

Tabelle 2. C-Fos Färbeprotokoll.

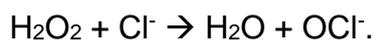
### 2.4.3 Fos-Protein-Kontrollen

Zur Überprüfung der korrekten Durchführung der immunhistochemischen Färbung wurden Positivkontrollen durchgeführt. Dazu wurden Gehirnschnitte von einem mit Cholecystinin (CCK) vorbehandelten Versuchstier angefertigt und gleichfalls immunhistochemisch nach c-Fos gefärbt. Die systemische Gabe von CCK (8 µg/gKG CCK intraperitoneal) führt nach 90 Minuten zur c-Fos Expression im Hirnstamm. Als positiv wurden nur diejenigen Präparate erachtet, bei denen sich in der lichtmikroskopischen Betrachtung die für die Fos-Expression charakteristischen dunkelbraunen Reaktionsprodukte in den Zellkernen des Hirnstamms nachweisen ließen.

## 2.5 Myeloperoxidase-Färbung

Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das bei der Regulation und Terminierung von Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle spielt. Es wird von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und diversen Gewebsmakrophagen exprimiert [Green et al. (2004)] und gehört zu einer Gruppe von Peroxidasen, denen ein kovalent gebundenes, gebogenes Häm (Häm M) gemein ist.

Myeloperoxidase katalysiert die Oxidation von Chloridionen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid:



Das reaktive HClO reagiert mit einer Vielzahl oxidierbarer Biomoleküle, die ungesättigte Doppelbindungen, Thiole oder Stickstoffkomponenten enthalten. Chlorierungsreaktionen finden einerseits mit Pyridinnukleotiden (z. B. NAD<sup>+</sup>), Cholesterol und ungesättigten Fettsäuren (Bildung von Chlorhydrinen), andererseits mit Aminogruppen (Bildung von Chloraminen) statt. Durch die Aktivität der MPO werden beispielsweise cholesterinreiches LDL und Membranlipide oxidiert [Green et al. (2004)].

Die klassischen Methoden der zytochemischen Lokalisierung von Myeloperoxidase beruhen auf der Verwendung von Benzidin oder Diaminobenzidin. Im Jahre 1977 entwickelten Hanker et al. eine Methode, bei der mittels p-Phenylendiamin und Katechol das Vorkommen der Peroxidase nachgewiesen werden kann [Graham and

Karnovsky (1966); Hanker, Yates, Metz, and Rustioni (1977)]. In dieser Doktorarbeit wurde die Myeloperoxidase durch eine weiterentwickelte Methode nachgewiesen, die (wie der oben beschriebene c-Fos-Nachweis) auf einem immunhistochemischen Ansatz basiert.

Zunächst wurden die Präparate aufgetaut (fünf bis zehn Minuten bei 50 °C auf der Heizplatte), gefolgt von fünf minütigem Spülen in PBS. Die endogene Peroxidaseaktivität der Präparate wurde anschließend durch Einlegen in Wasserstoffperoxid und Methanol (15 Minuten) gehemmt. In der Folge wurden die Schnitte erneut dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Dann erfolgte die Gabe einer Blockierlösung (Swine Serum) mit anschließender 20-minütiger Inkubation, um unspezifische Bindungsstellen zu deaktivieren. Im nächsten Färbeschritt wurde der Primärantikörper „rabbit anti-MPO“ in einer Verdünnung von 1:50 zugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur und dreimaligem Spülen in PBS wurde der biotinylierte Sekundärantikörper „swine anti-rabbit“ in einer Verdünnung von 1:600 zugegeben; die Inkubationszeit betrug hier 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem Spülen wurde das Peroxidase-konjugierte Streptavidin-Biotin Komplexreagenz (ABC-Reagenz) hinzugefügt; auch hier erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach erneutem Spülen in PBS wurde nun zur Entwicklung der Farbreaktion das chromogene Substrat 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) zusammen mit PBS in Wasserstoffperoxid eingebracht und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen und erneut in Wasserstoffperoxid gespült. Abschließend erfolgten die Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe / Xylol und die Eindeckung der Proben in Roti-Histokitt. Ein Überblick über das MPO Färbeprotokoll wird in **Tabelle 3** gegeben.

### **2.5.1 LPS-Kontrollen**

Zur Überprüfung der korrekten Durchführung der Myeloperoxidase-Färbung wurden Positivkontrollen durchgeführt. Dazu wurde das obere Jejunum von einem mit Lipopolysaccharid (LPS) vorbehandelten Versuchstier entnommen und der Myeloperoxidasefärbung zugeführt. Die systemische Gabe von LPS (1 mg/gKG) führt innerhalb von vier Stunden zu einer signifikanten Infiltration der Muskelschicht des Darmes mit Entzündungszellen. Als positiv wurden nur diejenigen Präparate

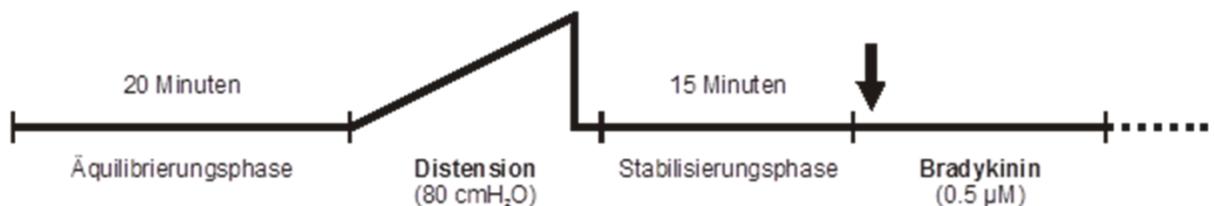
erachtet, bei denen sich in der lichtmikroskopischen Betrachtung die charakteristisch gefärbten MPO-positiven Entzündungszellen in der Muscularis zeigten.

1.		5 Minuten in PBS waschen
2.	a. b.	Blockierung der endogenen Peroxidase für 15 Minuten bei RT 120 ml Methanol + 2 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
3.		3 x 5 Minuten in PBS waschen
4.	a. b.	Blockierlösung für 20 Minuten bei RT 950 µl Verdünnungspuffer Triton X-100 + 50 µl SS (Swine Serum)
5.	a. b.	Primärantikörper über Nacht bei RT / Verdünnung 1:50 10 µl rabbit anti-MPO (Primärantikörper) + 990 µl Verdünnungspuffer Triton X-100
6.		3 x 5 Minuten in PBS waschen
7.	a. b.	Sekundärantikörper für 60 Minuten bei RT / Verdünnung 1:600 990 µl Verdünnungspuffer Triton X-100 + 10 µl swine anti-rabbit (Sekundärantikörper)
8.		3 x 5 Minuten in PBS waschen
9.	a. b. c.	ABC-Reagenz für 60 Minuten bei RT 1000 µl Verdünnungspuffer Triton X-100 + 10 µl Lösung A (ABC-Reagenz) + 10 µl Lösung B (ABC-Reagenz)
10.		3 x 5 Minuten in PBS waschen
11.	a. b. c.	Entwicklung mit DAB (3,3-Diaminobenzidin) für 10 Minuten bei RT 100 ml TBS (Tris Buffered Solution) + 50 mg DAB + 33 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
12.		5 Minuten in H <sub>2</sub> O spülen
13.	a. b.	aufsteigende Alkoholreihe jeweils 1 Minute in 50%, 70%, 96% und 100% Ethanol 1 Minute in Xylol
14.		Eindecken in Roti-Histokitt

**Tabelle 3. Myeloperoxidase Färbeprotokoll.**

## 2.6 Versuchsprotokoll Elektrophysiologie

Voraussetzung für den Beginn der Versuche war eine stabile Nervenfaserveraktivität; zu diesem Zweck wurde initial eine Äquilibrationsphase von mindestens 20 Minuten eingehalten, bis eine stabile Ruhennervenfaserveraktivität aufgezeichnet werden konnte (siehe **Abb.27**).



**Abbildung 27. Versuchsprotokoll der elektrophysiologischen Versuche.**

Nach einer Äquilibrationsphase erfolgt zunächst die Distension des Darmes. Hat sich das Nervenfasersignal wieder ausreichend stabilisiert (Stabilisierungsphase) wird die chemische Stimulation des Darms mit Bradykinin durchgeführt.

In einem ersten Versuchsabschnitt erfolgte das sogenannte „**Distensionsexperiment**“. Hierbei handelte es sich um eine mechanische Distension des Darmes durch langsame Steigerung des intraluminalen Drucks vom Ausgangsniveau (ca. 3 bis 5 cmH<sub>2</sub>O) bis auf 80 cmH<sub>2</sub>O. Zu diesem Zweck wurde der abführende Schenkel des Perfusionssystems verschlossen, während zeitgleich die Perfusion des Darms mit Krebs-Lösung kontinuierlich fortgeführt wurde. Nach Erreichen der Druckspitze wurde der Katheterabfluss wieder geöffnet und das Abfließen der angestauten Lösung ermöglicht.

Anschließend wurde erneut eine Stabilisierungsphase von mindestens 15 Minuten eingehalten, bis eine konstante Ruhennervenfaserveraktivität wiederhergestellt war (siehe **Abb.27**).

Der zweite Versuchsabschnitt beinhaltete die „**chemische Stimulation**“. Hierbei wurde Bradykinin in einer Konzentration von 0,5 µM auf die Serosa des Darmes appliziert. Zu diesem Zweck wurde die Perfusion gestoppt und die Substanz mit Hilfe einer Pipette direkt ins das Organbad gegeben, wo sie über einen Zeitraum von zwei Minuten belassen wurde (siehe **Abb.27**). Danach wurde die Perfusion mit Krebs-Lösung wieder aufgenommen, so dass die gesamte applizierte Bradykininmenge

ausgewaschen wurde. Die verwendete Bradykinindosis (0,5  $\mu\text{M}$ , moderat submaximale Dosis) wurde durch Dosis-Wirkungs-Versuche ermittelt.

## **2.7 Auswertung**

### **2.7.1 Elektrophysiologie und Motilitätsmessungen**

#### **2.7.1.1 Ruhephase**

Als Ruhenervenfaseraktivität ( $\text{impsec}^{-1}$ ) wurde diejenige Nervenentladungsfrequenz pro Sekunde festgesetzt, die unmittelbar vor Anwendung des jeweiligen Teststimulus über einen Zeitraum von 60 Sekunden vorherrschte.

#### **2.7.1.2 Distensionsexperiment**

Zunächst wurde die Entladungsfrequenz der afferenten Nerven als Reaktion auf mechanische Distension ausgewertet. Hierzu wurden Mittelwert und SEM (standard error of means) der registrierten Impulse bestimmt, jeweils abzüglich der zuvor ermittelten Ruhenervenfaseraktivität. Diese Werte wurden dann dem jeweils vorherrschenden intraluminalen Druck im Darm zugeordnet. Für die Auswertung wurde der Druckanstieg wie folgt in Intervalle von je 10  $\text{cmH}_2\text{O}$  unterteilt: 0 – 10  $\text{cmH}_2\text{O}$ , 10 – 20  $\text{cmH}_2\text{O}$ , 20 – 30  $\text{cmH}_2\text{O}$ , 30 – 40  $\text{cmH}_2\text{O}$ , 40 – 50  $\text{cmH}_2\text{O}$ , 50 – 60  $\text{cmH}_2\text{O}$ , 60 – 70  $\text{cmH}_2\text{O}$ , 70 – 80  $\text{cmH}_2\text{O}$ .

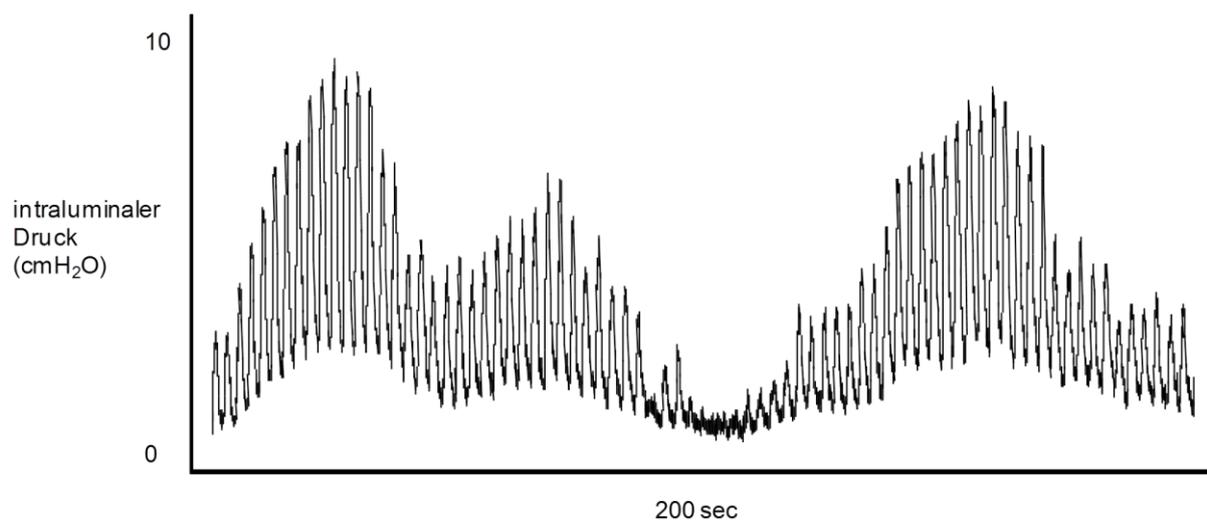
#### **2.7.1.3 Chemische Stimulation**

Anschließend wurde die Entladungsfrequenz der afferenten Nerven als Reaktion auf chemische Stimulation mit Bradykinin ausgewertet. Dies erfolgte durch Messung des durchschnittlichen Anstiegs der Anzahl afferenter Nervenimpulse über einen Zeitraum von 60 Sekunden nach Bradykininapplikation. Auch hier wurde die Ruhenervenfaseraktivität von den ermittelten Zahlenwerten subtrahiert.

#### 2.7.1.4 Motilität

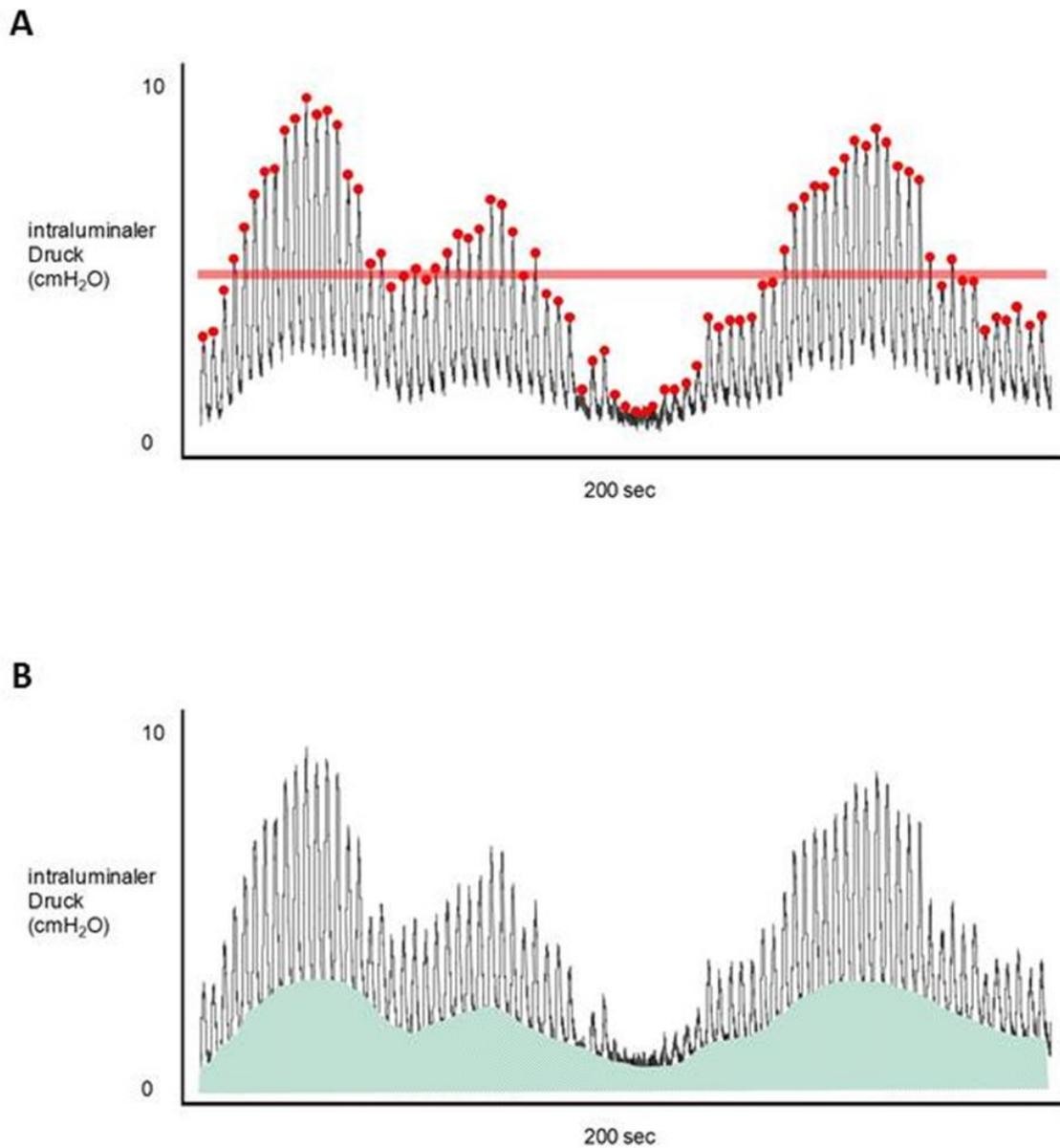
Auch in Ruhephasen waren physiologische Schwankungen des intraluminalen Drucks zu beobachten (siehe **Abb.28**). Es ergaben sich unterschiedliche Möglichkeiten, die intestinale Motilität zu charakterisieren. **Zum einen** wurde die mittlere Amplitude des intraluminalen Drucks (Peak) über einen Zeitraum von 200 Sekunden ermittelt (siehe **Abb.29a**). Als Alternativmethode wurde zudem die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) bestimmt und zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen verglichen (auch hier über einen Zeitraum von 200 Sekunden, siehe **Abb.29b**). **Zum anderen** wurde die Frequenz der physiologischen Schwankungen ermittelt, gemessen als Anzahl der Amplituden (Peaks) in einem Zeitraum von 200 Sekunden.

Alle diese Messungen wurden direkt nach der Äquilibrationsphase zu Beginn des Experiments durchgeführt (noch vor mechanischer bzw. chemischer Stimulation).



**Abbildung 28. Intraluminaler Druck während einer Ruhephase.**

Die physiologischen Schwankungen des intraluminalen Drucks (cmH<sub>2</sub>O) während einer Ruhephase lassen sich gut erkennen.

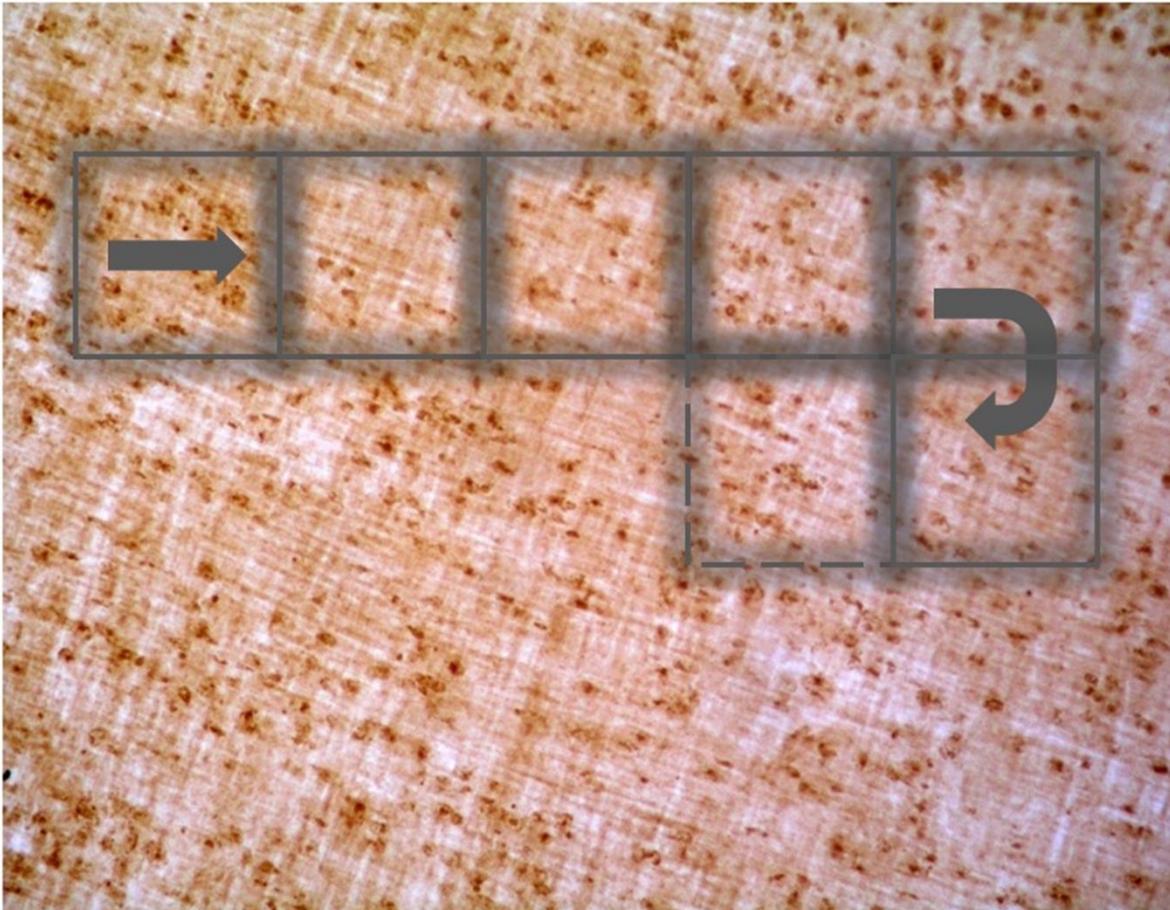


### Abbildung 29. Methoden der Motilitätscharakterisierung.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten verwendet, die intestinale Motilität zu charakterisieren. Zum einen wurde die mittlere Amplitude des intraluminalen Drucks (Peak; rote Punkte) über einen Zeitraum von 200 Sekunden ermittelt (A). Als Alternativmethode wurde zudem die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC; grün) bestimmt und zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen verglichen (B).

### 2.7.2 Myeloperoxidase

Die Auswertung der Myeloperoxidase positiven Zellen erfolgte unter dem Mikroskop mit 200facher Vergrößerung. Es wurden pro Schnitt 15 konsekutive Gesichtsfelder ausgezählt (siehe **Abb.30**); die Auswertung erfolgte „blind“, also in Unkenntnis der Versuchsgruppe, aus der das jeweilige Präparat stammte.



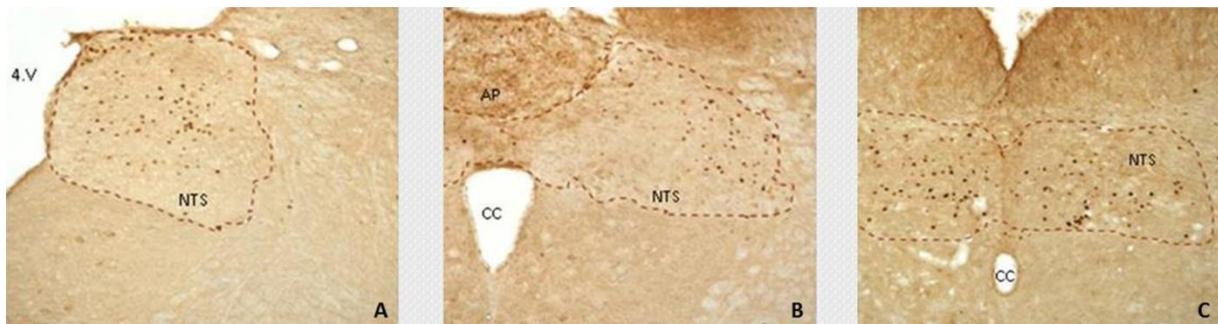
**Abbildung 30. MPO-Auswertung.**

Die Auswertung der Myeloperoxidase positiven Zellen erfolgte unter dem Mikroskop mit 200facher Vergrößerung. Es wurden pro Schnitt meanderförmig 15 konsekutive Gesichtsfelder ausgezählt.

### 2.7.3 Fos-Protein-Immunhistochemie

Auch hier wurde die Datenauswertung „blind“ durchgeführt. Fos-positive Zellen besitzen eine charakteristische dunkle Färbung und sind von definierter Größe (siehe **Abb.31**). Die exakte anatomische Identifizierung des Nucleus tractus solitarii (NTS) und der Area postrema (AP) wurde anhand stereotaktischer Atlanten ermittelt. Als wichtiger Orientierungspunkt diente hierbei das Bregma, welches anatomisch den

Schnittpunkt der Sagittalnaht der Schädelkalotte mit der Kranznaht bildet. Die Auswertung des NTS erfolgte in beiden Hemisphären auf einer Höhe von 6,64 mm, 7,08 mm und 8,43 mm kaudal des Bregma, die AP wurde 7,08 mm kaudal des Bregma analysiert. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop bei 200facher Vergrößerung in allen Regionen des (6,64 mm, 7,08 mm und 8,43 mm kaudal des Bregma) ausgezählt und aufsummiert; gleiches geschah für die Area postrema (7,08 mm kaudal des Bregma). Mittelwert und Standardabweichung wurden berechnet und zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen verglichen.



**Abbildung 31. C-Fos-Auswertung.**

Die Fos-positiven Zellen sind gut an ihrer charakteristischen Größe und dunklen Farbe erkennbar. Sie wurden unter dem Mikroskop bei 200facher Vergrößerung in allen Regionen des NTS (6,64 mm **(A)**, 7,08 mm **(B)** und 8,43 mm **(C)** kaudal des Bregma) ausgezählt und aufsummiert; gleiches geschah für die Area postrema (7,08 mm kaudal des Bregma; **B**).

AP – Area postrema; CC – Canalis centralis; NTS – Nucleus tractus solitarii; 4.V – 4.Ventrikel.

## 2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus den Bradykinin-Versuchen erfolgte mittels one-way ANOVA. Die Versuchsdaten zur Distension wurden mithilfe einer two-way ANOVA und post-hoc Holm-Sidak Test ausgewertet. Alle Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Dabei wurde ein  $p < 0,05$  als signifikanter Unterschied angenommen. Alle Versuche wurden mit  $n = 6$  durchgeführt.

### **2.8.1 Geräte und Labormaterialien**

Im Anhang werden die verwendeten Geräte und Labormaterialien dargestellt (*siehe Anhang Tab.4*).

### **2.8.2 Chemikalien**

Im Anhang werden die verwendeten Chemikalien dargestellt (*siehe Anhang Tab.5*).

### **2.8.3 Lösungen**

Im Anhang werden die verschiedenen verwendeten Lösungen in ihrer Zusammensetzung beschrieben (*siehe Anhang Tab.6 – 15*).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei verschiedenen Zeitpunkte 1, 3 und 9 Stunden nach Auslösen des POI dargestellt. Der Einfachheit halber wird in der Folge von „1h-Ileus-Gruppe“ gesprochen, wenn die entsprechenden Experimente eine Stunde nach Induktion des postoperativen Ileus (POI) durchgeführt werden. Analoges gilt für die Zeitpunkte drei bzw. neun Stunden nach dem jeweiligen operativen Eingriff bzw. für Untersuchungen an Kontrolltieren (z.B. 3h-Kontroll-Gruppe oder 9h-Sham-Gruppe).

### 3.2 Darmmotilität

Die jejunalen Darmsegmente weisen deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Motilität auf – sowohl beim Vergleich der einzelnen Kontrollgruppen bzw. Ileusgruppen miteinander als auch beim Vergleich der Kontrollgruppen mit den Ileusgruppen.

#### 3.2.1 Vergleich der Kontrollgruppen

Betrachtet man die Schwankungen des intraluminalen Drucks über 200 Sekunden, so fallen bereits bei der bloßen Inaugenscheinnahme der Motilitätsmuster gewisse Unterschiede auf; während sich die Amplituden selbst (Peak) nur geringfügig ändern, scheint die Anzahl der Amplituden (Frequenz) zuzunehmen, je länger der operative Eingriff (blose Laparotomie ohne Darmmanipulation) zurückliegt (*siehe Abb.32*). Dieser Eindruck lässt sich durch weitere Analysen untermauern.

##### 3.2.1.1 Amplitude (Peak)

Hinsichtlich der Amplitude (Peak) lassen sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Kontrollgruppen (1 Stunde, 3 und 9 Stunden) feststellen.

So beträgt der mittlere Peak der 1h-Kontroll-Gruppe  $5,1 \pm 0,8$  cmH<sub>2</sub>O. Für die 3h- bzw. 9h-Kontrollgruppe finden sich Werte von  $5,3 \pm 1,2$  cmH<sub>2</sub>O und  $4,3 \pm 0,9$  cmH<sub>2</sub>O ( $p_{1h \text{ vs. } 3h} = 0,929$ ;  $p_{1h \text{ vs. } 9h} = 0,484$ ;  $p_{3h \text{ vs. } 9h} = 0,518$ ). *Siehe* hierzu auch **Tabelle 16**.

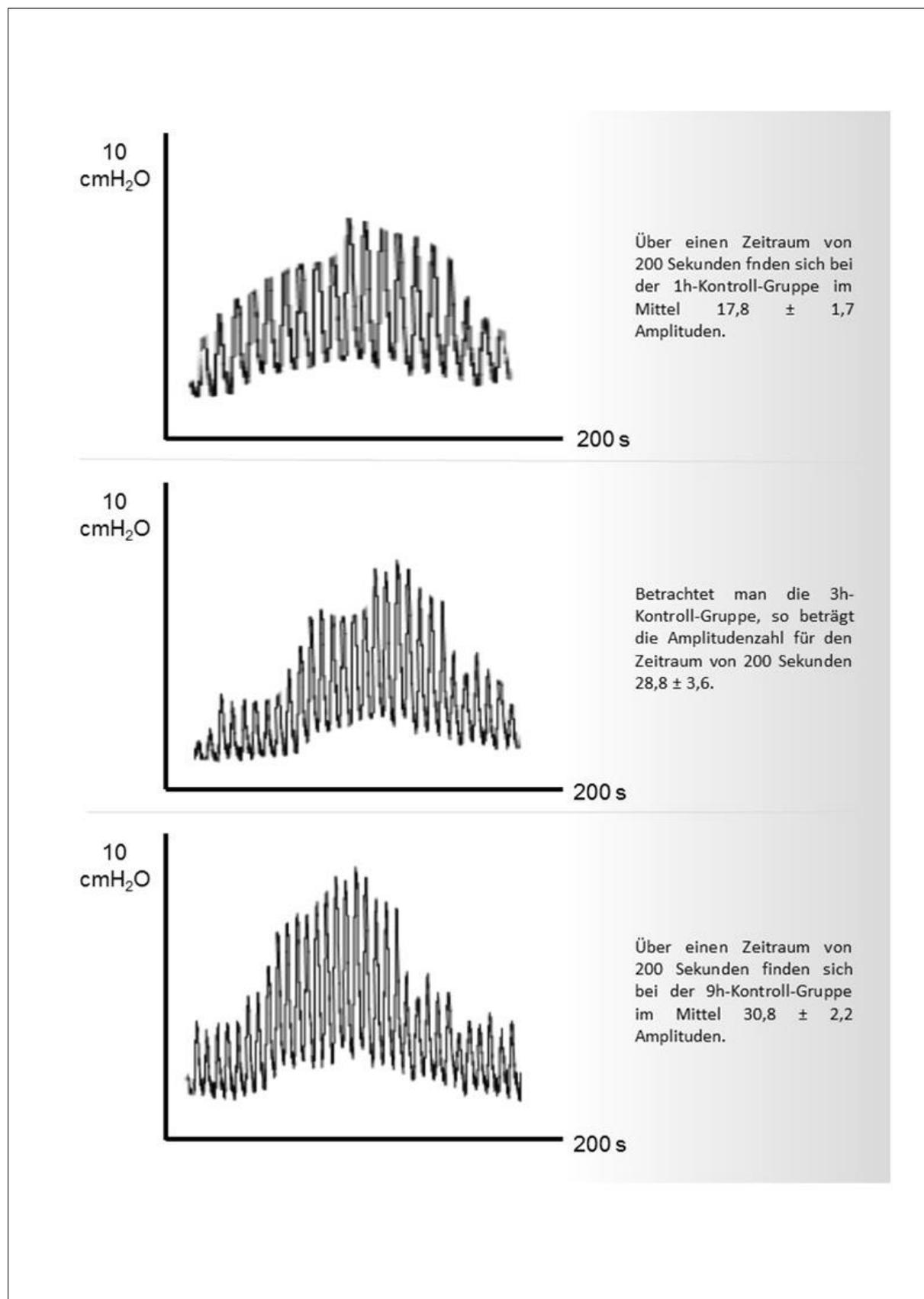


Abbildung 32. Motilität der Kontrollgruppen.

### 3.2.1.2 Fläche unter der Kurve (AUC)

Auch hinsichtlich der Fläche unter der Kurve lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Kontrollgruppen (1 Stunde, 3 und 9 Stunden) ausmachen.

Hier ergeben sich für die AUC (200 s) der 1h-Kontroll-Gruppe Werte von  $520,9 \pm 147,6$  cmH<sub>2</sub>O und für die 3h- bzw. 9h-Kontrollgruppe Werte von  $626,5 \pm 193,5$  cmH<sub>2</sub>O und  $225,4 \pm 79,0$  cmH<sub>2</sub>O ( $p_{1h \text{ vs. } 3h} = 0,674$ ;  $p_{1h \text{ vs. } 9h} = 0,108$ ;  $p_{3h \text{ vs. } 9h} = 0,084$ ). Dabei wird die Signifikanz für den Vergleich zwischen der 3h- und 9h-Kontrollgruppe um gut 0,03 Punkte verfehlt. *Siehe* hierzu auch **Tabelle 16**.

### 3.2.1.3 Amplitudenanzahl („Frequenz“)

Vergleicht man die Anzahl der Amplituden zwischen den einzelnen Kontrollgruppen, so lässt sich eine Zunahme der Frequenz beobachten.

Über einen Zeitraum von 200 Sekunden finden sich bei der 1h-Kontroll-Gruppe im Mittel  $17,8 \pm 1,7$  Amplituden. Betrachtet man die 3h-Kontroll-Gruppe, so beträgt die Amplitudenanzahl für den gleichen Zeitraum  $28,8 \pm 3,6$ . Im Vergleich zur 1h-Kontroll-Gruppe ist die Amplitudenfrequenz demnach signifikant gesteigert ( $p = 0,020$ ). Gleiches findet sich, wenn man 1h- und 9h-Kontroll-Gruppe vergleicht:  $17,8 \pm 1,7$  vs.  $30,8 \pm 2,2$ ;  $p = 0,001$ . Vergleicht man hingegen die Werte der 3h- und 9h-Kontroll-Gruppe so findet sich keine signifikante Frequenzzunahme von drei zu neun Stunden:  $28,8 \pm 3,6$  vs.  $30,8 \pm 2,2$ ;  $p = 0,646$ . *Siehe* hierzu auch **Tabelle 16**.

	1h	3h	9h
<b>Peak (cmH<sub>2</sub>O)</b>	$5,1 \pm 0,8$	$5,3 \pm 1,2$	$4,3 \pm 0,9$
<b>AUC (cmH<sub>2</sub>O)</b>	$520,9 \pm 147,6$	$626,5 \pm 193,5$	$225,4 \pm 79,0$
<b>Frequenz</b>	$17,8 \pm 1,7$	$28,8 \pm 3,6$ *	$30,8 \pm 2,2$ *

\*  $p < 0,05$  (Vergleich mit 1h)  
Mittelwert  $\pm$  SEM (cmH<sub>2</sub>O) angegeben

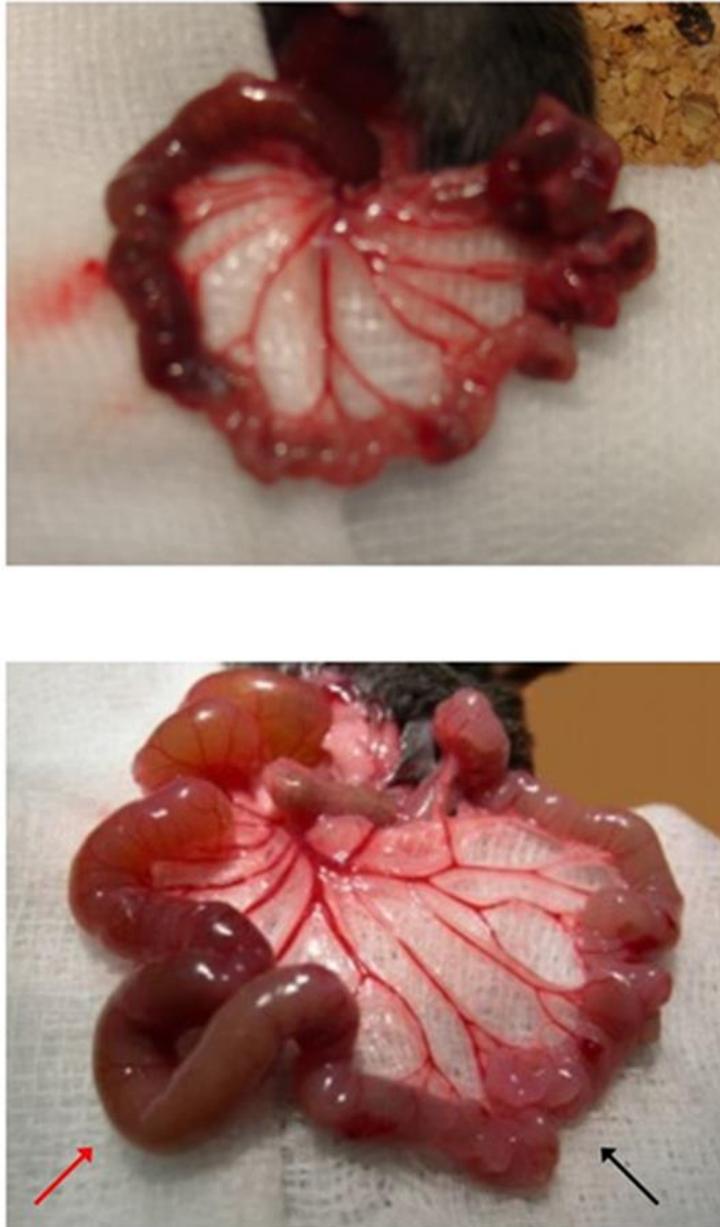
**Tabelle 16. Motilität der Kontrollgruppen.**

### 3.2.2 Vergleich der Ileusgruppen

Die Schwankungen des intraluminalen Drucks (charakterisiert als Peak, AUC und Frequenz) können auch zwischen den einzelnen Ileusgruppen (1h bzw. 3h und 9h) verglichen werden. Während die Amplitude hier durchgehend sehr niedrig ist, scheint die Anzahl der Amplituden (Frequenz) zuzunehmen, je länger der operative Eingriff (Darmmanipulation) zurückliegt. Bei der Analyse der 9h-Ileus-Gruppe fällt zudem eine makroskopische Besonderheit auf: bei einigen Dünndarmabschnitten ist der Darm dilatiert, andere Segmente hingegen weisen ein normales oder sogar eher verengtes Kaliber auf. Dabei befinden sich die dilatierten Abschnitte des Darmes proximal, wohingegen die normalkalibrigen Anteile weiter distal zu finden sind (*siehe Abb.33 und 34*). Die beiden beschriebenen Kaliberausprägungen des Darmes bleiben während des gesamten Beobachtungszeitraums unverändert. Da das Vorhandensein von dilatierten und normalkalibrigen Darmabschnitten innerhalb der 9h-Gruppe eine konstante Erscheinung ist, werden diese Segmente getrennt untersucht und ausgewertet.



Abbildung 33. Fotografie eines Ileus-geschädigten Darmabschnitts (proximales Jejunum) 9h postoperativ.



**Abbildung 34. Beispiele von Dünndarmabschnitten.**

Repräsentative Dünndarmsegmente der 1h-Ileus Gruppe (oben) und der 9h-Ileus-Gruppe (unten). Bei der 9h-Ileus-Gruppe zeigen sich normalkalibrige (schwarzer Pfeil) und dilatierte (roter Pfeil) Abschnitte.

### 3.2.2.1 Amplitude (Peak)

Hinsichtlich der Amplitude (Peak) lassen sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Ileusgruppen (1 Stunde, 3 und 9 Stunden) feststellen.

So beträgt der mittlere Peak der 1h-Ileus-Gruppe  $0,8 \pm 0,2$  cmH<sub>2</sub>O und für die 3h-Ileusgruppe  $1,8 \pm 0,5$  cmH<sub>2</sub>O ( $p_{1h \text{ vs. } 3h} = 0,240$ ). Für die dilatierten Darmabschnitte der 9h-Ileus-Gruppe finden sich Werte von  $0,8 \pm 0,1$  cmH<sub>2</sub>O, bei den eng gestellten Darmabschnitten betragen die Werte  $0,8 \pm 0,2$  cmH<sub>2</sub>O ( $p_{1h \text{ vs. } 9h\uparrow} = 0,868$ ;  $p_{1h \text{ vs. } 9h\downarrow} = 0,991$ ;  $p_{3h \text{ vs. } 9h\uparrow} = 0,240$ ;  $p_{3h \text{ vs. } 9h\downarrow} = 0,180$ ). *Siehe hierzu auch Tabelle 17.*

	1h	3h	9h	
			dilatiert	eng
<b>Peak (cmH<sub>2</sub>O)</b>	$0,8 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$
<b>AUC (cmH<sub>2</sub>O)</b>	$350,1 \pm 37,26$	$234,6 \pm 170,2$	$13,3 \pm 105,9$	$-142,2 \pm 36 *$
<b>Frequenz</b>	$24,0 \pm 1,1$	$29,3 \pm 2,4$	$36,0 \pm 2,3 *$	$37,8 \pm 2,6 *$

\*  $p < 0,05$  (Vergleich mit 1h)  
Mittelwert  $\pm$  SEM (cmH<sub>2</sub>O) angegeben

Tabelle 17. Motilität der Ileusgruppen.

### 3.2.2.2 Fläche unter der Kurve (AUC)

Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve stellen sich die Ergebnisse etwas komplexer dar.

Hier ergeben sich für die AUC (200 s) der 1h-Ileus-Gruppe Werte von  $350,1 \pm 37,2$  und für die 3h-Ileusgruppe Werte von  $234,6 \pm 170,2$  ( $p = 0,180$ ). Die AUC-Mittelwerte für die 9h-Ileusgruppen liegen niedriger und partiell knapp im negativen Bereich; für die dilatierten Darmabschnitte der 9h-Ileus-Gruppe finden sich Werte von  $13,3 \pm 105,9$ , bei den eng gestellten Darmabschnitten betragen die Werte  $-142,2 \pm 36,1$ . Weder für die 1h-Ileus-Gruppe ( $350,1 \pm 37,2$ ;  $p = 0,868$ ) noch für die 3h-Ileus-Gruppe ( $234,6 \pm 170,2$ ;  $p = 0,240$ ) ergibt sich ein signifikanter Unterschied zu den mittleren AUC-Werten der dilatierten 9h-Ileus-Darmsegmente ( $13,3 \pm 105,9$ ). Im Gegensatz dazu findet sich im Vergleich zu den Werten der 1h-Ileusgruppe eine signifikant verminderte ( $p = 0,001$ ) AUC der eng gestellten 9h-Ileus-Darmabschnitte ( $-142,2 \pm$

36,0). Verglichen mit der 3h-Ileus-Gruppe fällt die AUC der eng gestellten 9h-Ileus-Segmente zwar deutlich ab ( $234,6 \pm 170,2$  vs.  $-142,2 \pm 36,0$ ), die Signifikanz wird jedoch knapp nicht erreicht ( $p = 0,056$ ). *Siehe* hierzu auch **Tabelle 17**.

### 3.2.2.3 Amplitudenanzahl („Frequenz“)

Vergleicht man die Anzahl der Amplituden zwischen den einzelnen Ileusgruppen, lässt sich eine Zunahme der Frequenz beobachten.

Über einen Zeitraum von 200 Sekunden finden sich bei der 1h-Ileus-Gruppe im Mittel  $24,0 \pm 1,1$  Amplituden. Bei der 3h-Ileus-Gruppe beträgt die Amplitudenanzahl für den gleichen Zeitraum  $29,3 \pm 2,4$ . Im Vergleich zur 1h-Kontroll-Gruppe ist dieser Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,073$ ).

Vergleicht man die AUC zwischen den beiden 9h-Ileus-Gruppen (dilatiert vs. eng gestellt), so findet sich hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied ( $36,0 \pm 2,3$  vs.  $37,8 \pm 2,6$ ;  $p = 0,605$ ). Im Folgenden sollen deshalb die 1h- bzw. 3h-Ileus-Gruppe nur mit einer der beiden 9h-Gruppen (stellvertretend mit der 9h-Ileus-Gruppe<sub>dilatiert</sub>) verglichen werden. Im Vergleich zur 1h-Ileus-Gruppe findet sich bei der 9h-Ileus-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Amplitudenfrequenz ( $24,0 \pm 1,1$  vs.  $36,0 \pm 2,3$ ;  $p = 0,001$ ). Im Vergleich zur 3h-Ileus-Gruppe steigt die Frequenz bei der 9h-Ileus-Gruppe zwar ebenfalls noch etwas an, das Signifikanzniveau wird hier jedoch nicht erreicht ( $29,3 \pm 2,4$  vs.  $36,0 \pm 2,3$ ;  $p = 0,073$ ). *Siehe* hierzu auch **Tabelle 17**.

### 3.2.3 Vergleich der Ileus- und Kontrollgruppen

Wie sich in den vorangegangenen Abschnitten bereits gezeigt hat, unterscheiden sich die Motilitätsmuster auch zwischen Kontroll- und Ileus-Gruppen. Bereits wenn man die Aufzeichnungen der intraluminalen Druckschwankungen in Augenschein nimmt (*siehe* **Abb.35**) zeigt sich, dass bei den Ileus-Experimenten im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle die Amplitude deutlich abnimmt. Im Gegensatz dazu nimmt die Amplitudenfrequenz zu. Diese augenscheinlichen Ergebnisse lassen sich durch Bestimmung von Peak, AUC und Amplitudenfrequenz verifizieren.

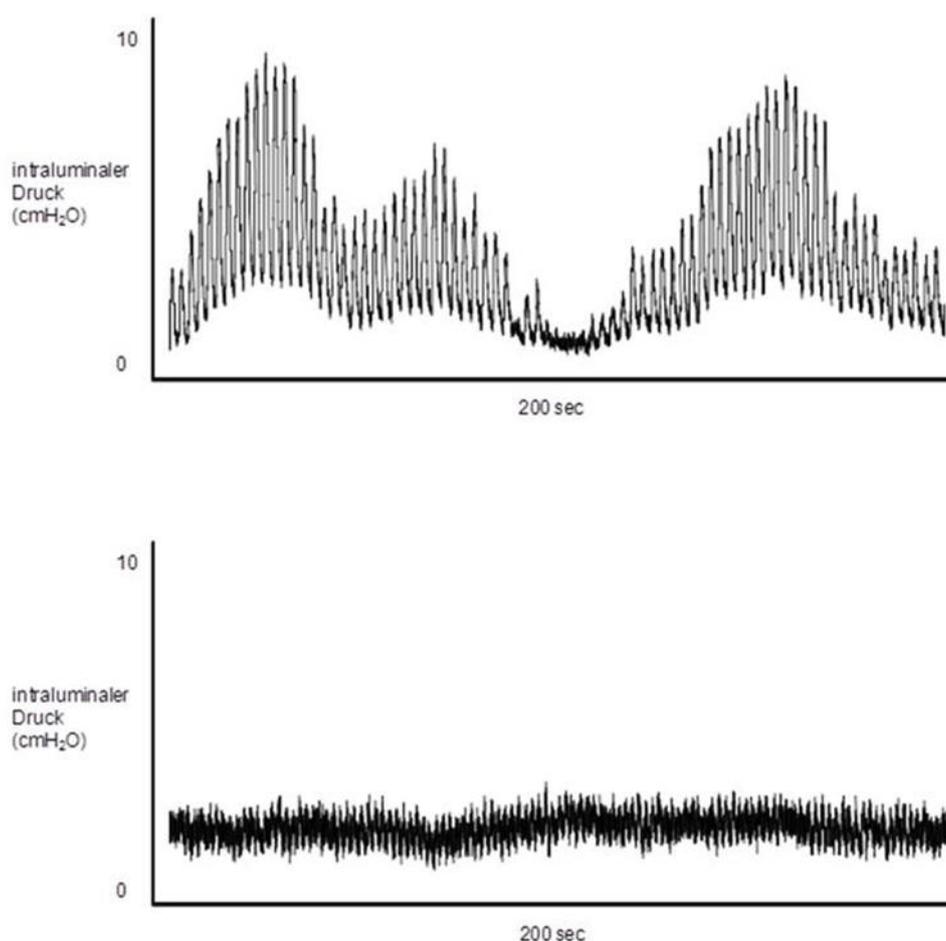
#### 3.2.3.1 Amplitude (Peak)

Bereits eine Stunde nach dem operativen Eingriff lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-Gruppe und Ileus-Gruppe feststellen. Die mittlere Amplitude beträgt für die 1h-Kontroll-Gruppe  $5,1 \pm 08$  cmH<sub>2</sub>O und für die 1h-Ileus-

Gruppe  $0,8 \pm 0,2$  cmH<sub>2</sub>O, was einem signifikantem Abfall ( $p = 0,002$ ) der Amplitude bei der Ileus-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle entspricht.

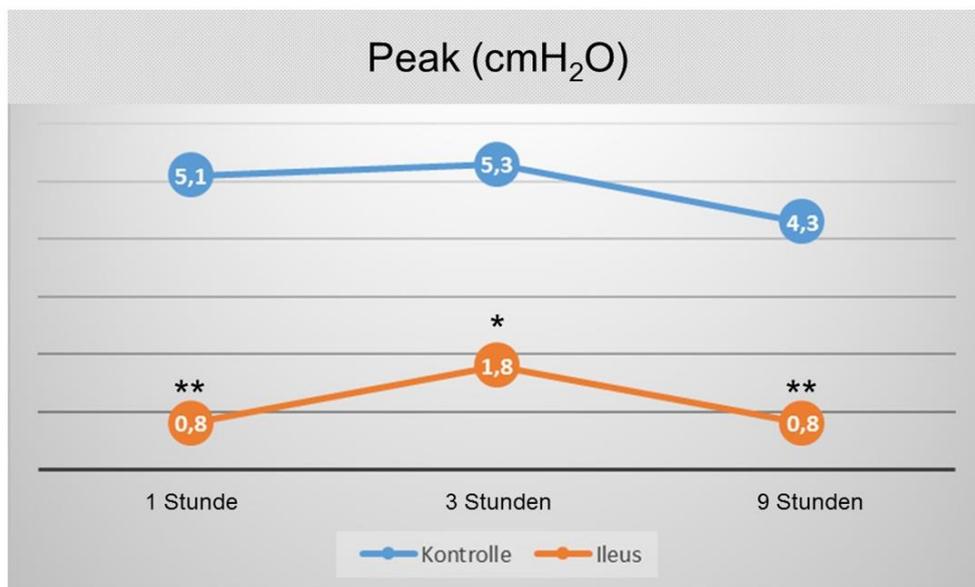
Ein ähnliches Ergebnis findet sich drei Stunden nach der Operation; die Amplitude der 3h-Ileus-Gruppe nimmt im Vergleich zur 3h-Kontroll-Gruppe signifikant von  $5,3 \pm 1,2$  auf  $1,8 \pm 0,5$  ab ( $p = 0,024$ ).

Auch für die 9h-Gruppen lässt sich dieser Trend erkennen, und zwar unabhängig davon, ob es sich um dilatierte oder eng gestellte Darmabschnitte handelt. Die Amplitude der 9h-Ileus-Gruppen nimmt im Vergleich zur 9h-Kontroll-Gruppe signifikant von  $4,3 \pm 0,9$  (Kontrolle) auf  $0,8 \pm 0,1$  (dilatiert) bzw.  $0,8 \pm 0,2$  (eng gestellt) ab (jeweils  $p = 0,002$ ). *Siehe hierzu auch **Abb.36** und **37**.*



**Abbildung 35. Repräsentative Aufzeichnungen des intraluminalen Drucks im Darm.**

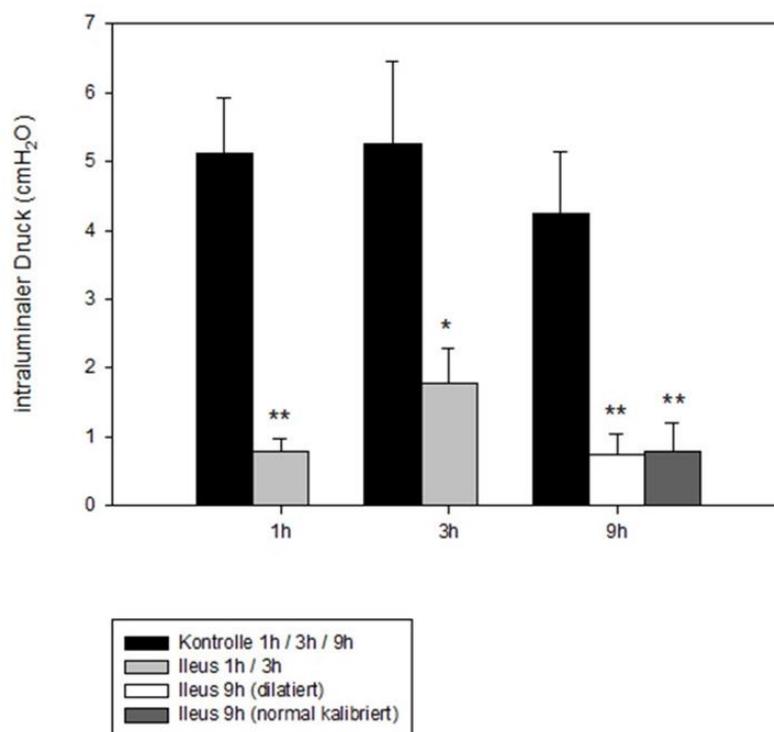
Beim Jejunumsegment des Kontrolllexperiments (1h-Sham-Gruppe, oben) zeigt sich eine normale Phase III Motilität. Im Gegensatz dazu ist die Darmmotilität beim POI (1h-Ileus-Gruppe, unten) fast vollkommen verschwunden.



**Abbildung 36. Vergleich Peak (cmH<sub>2</sub>O) zwischen Ileus und Kontrolle.**

Die Motilität des Darmes beim POI ist im Vergleich zu den jeweils entsprechenden Kontrollexperimenten signifikant reduziert.

Darstellung als Mittelwert, jeweils n = 6. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.



**Abbildung 37. Motilität (Peak) im Vergleich zwischen Ileus und Kontrolle.**

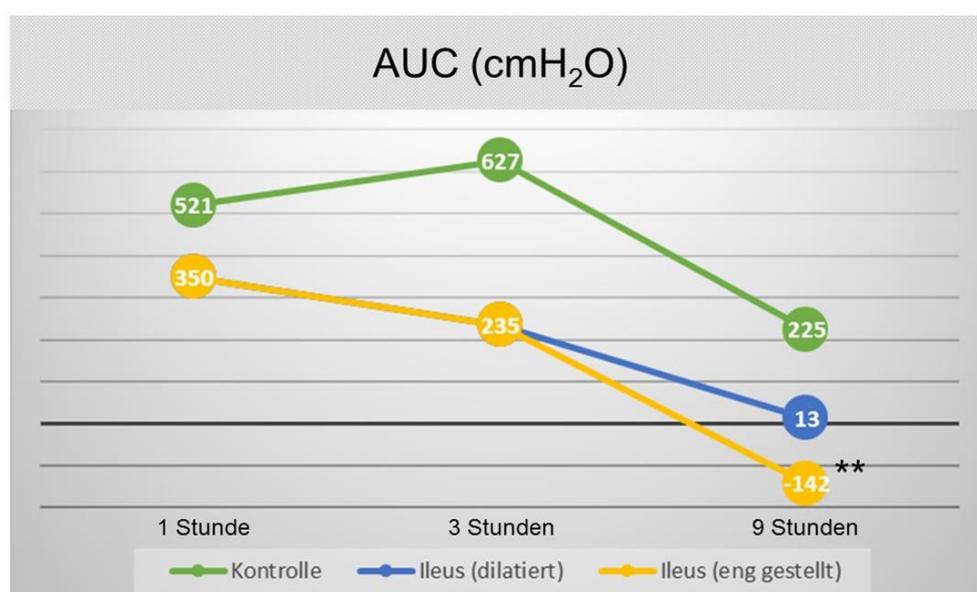
Darstellung als Mittelwert ± SEM, jeweils n = 6. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

### 3.2.3.2 Fläche unter der Kurve (AUC)

Vergleicht man die Fläche unter der Kurve, so ergibt sich eine Stunde nach dem operativen Eingriff kein Unterschied zwischen der Ileus-Gruppe und der Kontroll-Gruppe ( $350,1 \pm 37,2$  vs.  $520,9 \pm 147,6$ ;  $p = 0,288$ ).

Ein ähnliches Ergebnis findet sich für die 3h-Gruppen; hier beträgt der Wert für die AUC der 3h-Kontroll-Gruppe  $626,5 \pm 193,5$  und für die 3h-Ileus-Gruppe  $234,6 \pm 170,2$  ( $p = 0,159$ ).

Komplexer verhalten sich die Ergebnisse, wenn man Kontroll- und Ileus-Gruppe neun Stunden nach dem jeweiligen operativen Eingriff vergleicht. Betrachtet man die dilatierten Darmsegmente der 9h-Ileus-Gruppe ( $13,3 \pm 105,9$ ), so ergibt sich kein signifikanter Unterschied zur 9h-Kontroll-Gruppe ( $225,4 \pm 79,0$ ;  $p = 0,140$ ). Für die eng gestellten Darmabschnitte der 9h-Ileus-Gruppe hingegen ( $-142,2 \pm 36,1$ ) ergibt sich eine signifikant niedrigere AUC im Vergleich zur 9h-Kontroll-Gruppe ( $225,4 \pm 79,0$ ;  $p = 0,002$ ). *Siehe hierzu auch **Abb.38**.*



**Abbildung 38. Vergleich AUC (cmH<sub>2</sub>O) zwischen Ileus und Kontrolle.**

Für die eng gestellten Darmabschnitte der 9h-Ileus-Gruppe ergibt sich eine signifikant niedrigere AUC im Vergleich zur 9h-Kontroll-Gruppe. Betrachtet man die dilatierten Darmsegmente der 9h-Ileus-Gruppe, so findet sich kein signifikanter Unterschied zur 9h-Kontroll-Gruppe.

Darstellung als Mittelwert, jeweils  $n = 6$ . \*\*  $p < 0,01$ .

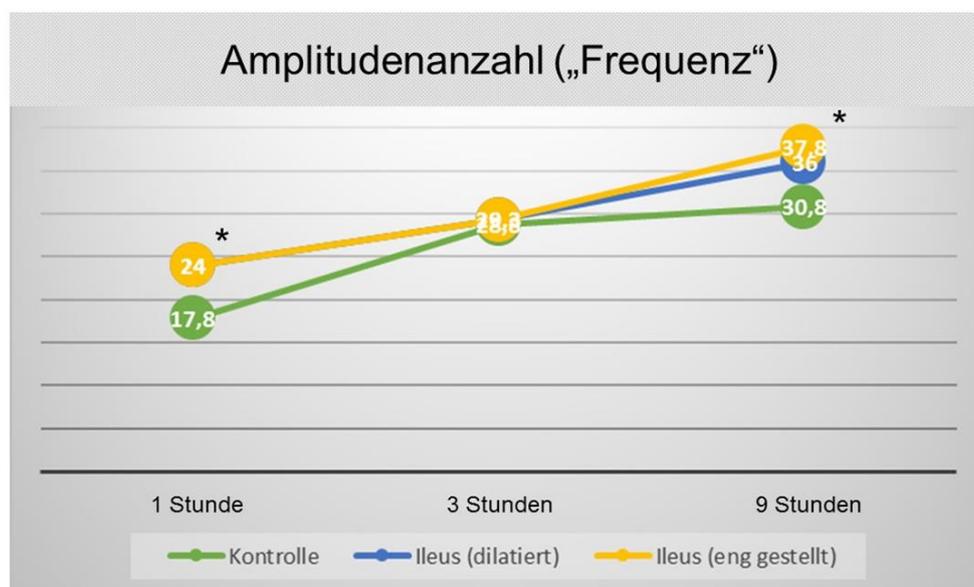
### 3.2.3.3 Amplitudenanzahl („Frequenz“)

Bei der Analyse der Amplitudenanzahl über einen Zeitraum von 200 Sekunden ergeben sich folgende Ergebnisse:

Die Anzahl der Amplituden (Frequenz) ist bei der 1h-Ileus-Gruppe signifikant höher als bei der 1h-Kontroll-Gruppe ( $24,0 \pm 1,1$  vs.  $17,8 \pm 1,7$ ;  $p = 0,012$ ).

Drei Stunden nach dem operativen Eingriff hingegen finden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Amplitudenanzahl; für die 3h-Ileus-Gruppe beträgt die Amplitudenanzahl  $29,3 \pm 2,4$ , für die 3h-Kontroll-Gruppe  $28,8 \pm 3,6$  ( $p = 0,911$ ).

Für die 9h-Gruppen müssen die beiden unterschiedlich konfigurierten Darmsegmente der Ileus-Gruppe wiederum getrennt betrachtet werden. Der Vergleich zwischen der 9h-Kontrolle ( $30,8 \pm 2,2$ ) und den dilatierten Segmenten der 9h-Ileus-Gruppe ( $36,0 \pm 2,3$ ) ergibt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Amplitudenanzahl ( $p = 0,135$ ). Anders verhält es sich bei den eng gestellten Darmsegmenten; hier ist die Amplitudenanzahl der Ileus-Gruppe ( $37,8 \pm 2,6$ ) signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $30,8 \pm 2,2$ ) gesteigert ( $p = 0,045$ ). *Siehe hierzu auch **Abb.39**.*



**Abbildung 39. Vergleich Frequenz zwischen Ileus und Kontrolle.**

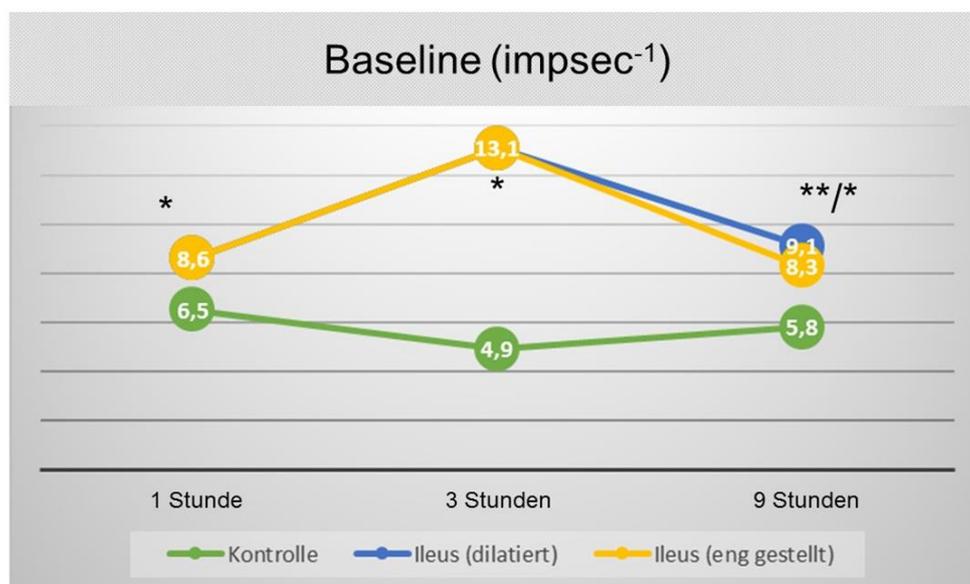
Die Anzahl der Amplituden (Frequenz) ist bei der 1h-Ileus-Gruppe signifikant höher als bei der 1h-Kontroll-Gruppe. Ähnlich verhält es sich bei den eng gestellten Darmsegmenten der 9h-Ileus-Gruppe; hier ist die Amplitudenanzahl signifikant gegenüber der 9h-Kontroll-Gruppe gesteigert.

Darstellung als Mittelwert, jeweils  $n = 6$ . \*  $p < 0,05$ .

### 3.3 Intestinale afferente Nervenfaseraktivität

#### 3.3.1 Ruhenervenfaseraktivität

Die Ruhenervenfaseraktivität wird vor mechanischer (Distension) oder chemischer Stimulation (Bradykininapplikation) ermittelt. Das Signal zeigt ein kontinuierliches Muster von Ruheentladungen mit Aktionspotentialen unterschiedlich hoher Amplitude und Form. Die afferente Ruhenervenfaseraktivität in den verschiedenen Untergruppen wird im Folgenden als Impulsrate pro Sekunde dargestellt (siehe **Abb.40**).



**Abbildung 40. Vergleich Ruhenervenfaseraktivität (impsec<sup>-1</sup>) zwischen Ileus und Kontrolle.**

Bereits eine Stunde nach Manipulation ist die Ruhenervenfaseraktivität der Ileus-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant gesteigert. Ein ähnliches Ergebnis findet sich auch für die 3h-Gruppen. Auch neun Stunden nach dem operativen Eingriff ist die Ruheaktivität der 9h-Ileus-Gruppe (dilatierte Segmente \*\* bzw. eng gestellte Segmente \*) gegenüber der 9h-Kontroll-Gruppe signifikant gesteigert. Darstellung als Mittelwert, jeweils n = 6. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

#### 3.3.1.1 Vergleich der Kontrollgruppen

Beim Vergleich der Kontrollgruppen untereinander zeigen sich nur minimale Unterschiede hinsichtlich der Baselineaktivität (siehe **Abb.40**).

Die Baselineaktivität der 1h- bzw. 3h-Kontroll-Gruppe beträgt  $6,5 \pm 0,9$  impsec<sup>-1</sup> bzw.  $4,9 \pm 0,9$  impsec<sup>-1</sup> und weist somit keinen signifikanten Unterschied auf (p = 0,240).

Neun Stunden nach der Kontrolloperation (ohne Darmmanipulation) zeigt sich ebenfalls eine niedrige Ruheaktivität von  $5,8 \pm 0,5$  impsec<sup>-1</sup>; weder im Vergleich zur 1h- noch zur 3h-Kontroll-Gruppe ist die Baselineaktivität demnach signifikant verändert ( $p_{1h \text{ vs. } 9h} = 0,699$ ;  $p_{3h \text{ vs. } 9h} = 0,392$ ).

### 3.3.1.2 Vergleich der Ileusgruppen

Die Ruhenervenfaseraktivität ist unabhängig von der Zeitdauer nach dem Ileus-auslösenden operativen Eingriff ebenfalls relativ konstant (jeweils  $p > 0,05$ ; *siehe Abb.40*).

Die Baselineaktivität der 1h- bzw. 3h-Ileus-Gruppe beträgt  $8,6 \pm 1,1$  impsec<sup>-1</sup> bzw.  $13,1 \pm 2,6$  impsec<sup>-1</sup>. Bei den dilatierten und eng gestellten Darmsegmenten der 9h-Ileus-Gruppen finden sich ähnliche Werte von  $9,1 \pm 1,4$  impsec<sup>-1</sup> und  $8,6 \pm 0,6$  impsec<sup>-1</sup>.

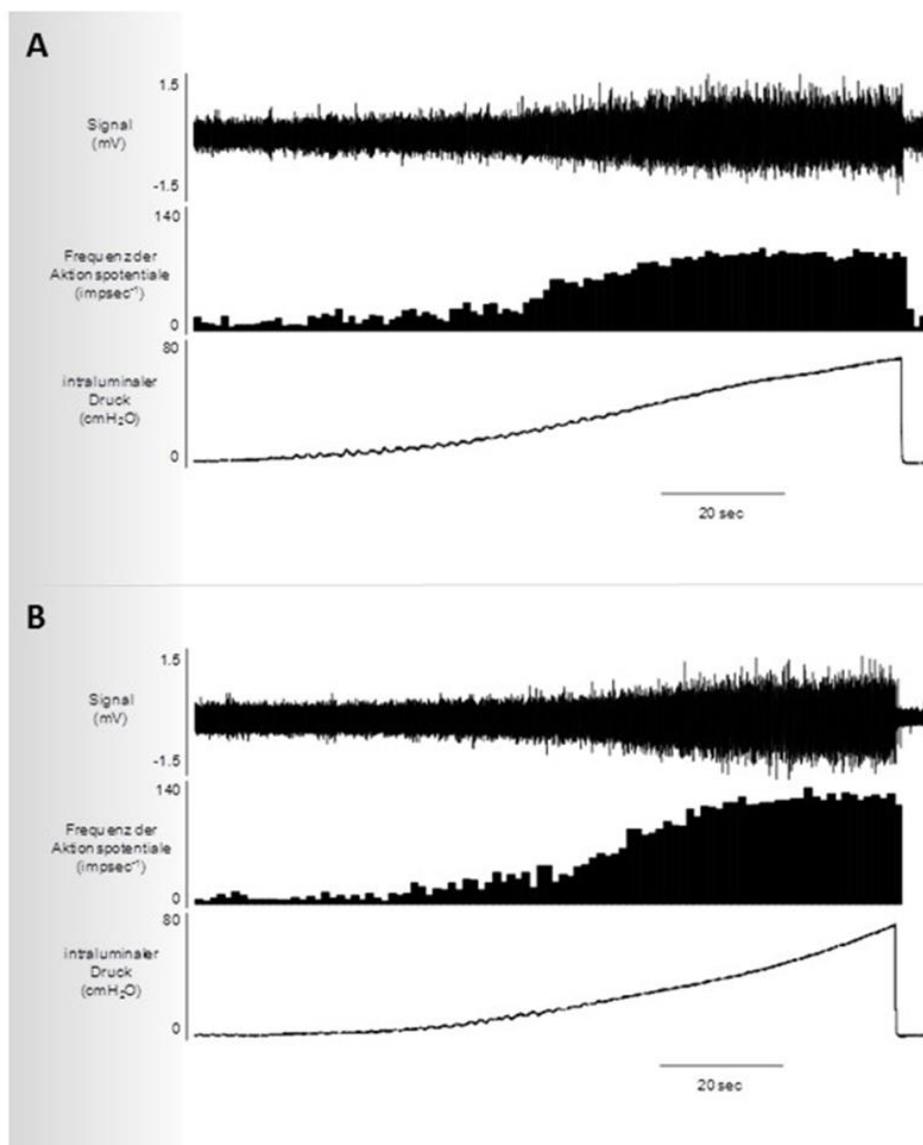
### 3.3.1.3 Vergleich der Ileus- und Kontrollgruppen

Bereits eine Stunde nach Manipulation ist die Ruhenervenfaseraktivität der Ileus-Gruppe ( $8,6 \pm 1,1$  impsec<sup>-1</sup>) gegenüber der Kontroll-Gruppe ( $6,5 \pm 0,9$  impsec<sup>-1</sup>) signifikant gesteigert ( $p = 0,041$ ).

Ein ähnliches Ergebnis findet sich sowohl für die 3h-Gruppen als auch für die 9h-Gruppen; die Baselineaktivität der 3h-Ileus-Gruppe beträgt  $13,1 \pm 2,6$  impsec<sup>-1</sup> und ist gegenüber der 3h-Kontroll-Gruppe ( $4,9 \pm 0,9$  impsec<sup>-1</sup>) signifikant gesteigert ( $p = 0,015$ ); neun Stunden nach dem operativen Eingriff misst die Ruheaktivität der 9h-Ileus-Gruppe (dilatierte Segmente)  $8,3 \pm 0,6$  bzw. (eng gestellte Segmente)  $9,1 \pm 1,4$  und ist gegenüber der 9h-Kontroll-Gruppe ( $5,8 \pm 0,5$ ) jeweils signifikant gesteigert ( $p_{\text{dilatiert}} = 0,007$ ;  $p_{\text{eng}} = 0,049$ ; *siehe Abb.40*).

### 3.3.2 Mechanische Stimulation – Distension

Über alle experimentellen Gruppen hinweg bewirkt die mechanische Distension einen vom intraluminalen Druck abhängigen Anstieg der afferenten Nervenfaserveraktivität. Diese gesteigerte Nervenfaserveraktivität findet sich sowohl bei Darmsegmenten von Ileustieren als auch bei Kontrollsegmenten (*siehe Abb.41*).



**Abbildung 41. Veränderung des Nervenfasersignals bei Rampendistension.**

Repräsentative Aufzeichnungen des afferenten Multiunit-Nervenfasersignales im Verlauf der mechanischen Rampendistension. Abgebildet ist die nervale Aktivität eines Kontrollexperimentes (3h-Sham-Gruppe, oben, **A**) und die nervale Reaktion eines Darmsegmentes mit POI (3h-Ileus-Gruppe, unten, **B**).

Zur Vereinfachung werden im Folgenden nicht die Absolutwerte in impsec<sup>-1</sup> angegeben, sondern Prozentwerte; als 100% wird jeweils die Baselineaktivität (unmittelbar vor Stimulation) gesetzt.

Zunächst sollen beide Versuchsgruppen (Kontrolle vs. Ileus) separat voneinander betrachtet werden; anschließend sollen sie miteinander verglichen werden.

### 3.3.2.1 Vergleich der Kontrollgruppen

Bereits beim Vergleich der einzelnen Kontrollgruppen (1h-Kontrolle, 3h-Kontrolle und 9h-Kontrolle) ergeben sich Unterschiede hinsichtlich der afferenten Nervenfasernaktivität, jeweils abhängig vom Druckniveau.

Zu Beginn der Distension (auf einem Druckniveau von 0 bis 10 cmH<sub>2</sub>O) unterscheidet sich die afferente Nervenfasernaktivität nicht signifikant zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (jeweils  $p > 0,05$ ); eine Stunde nach der Scheinoperation beträgt die afferente Entladungsfrequenz im Mittel  $122,4 \pm 6,4$  % (im Verhältnis zur Baseline), im Vergleich dazu zeigen sich nach drei bzw. neun Stunden Werte von  $135,5 \pm 9,4$  % bzw.  $207,1 \pm 20,1$  %.

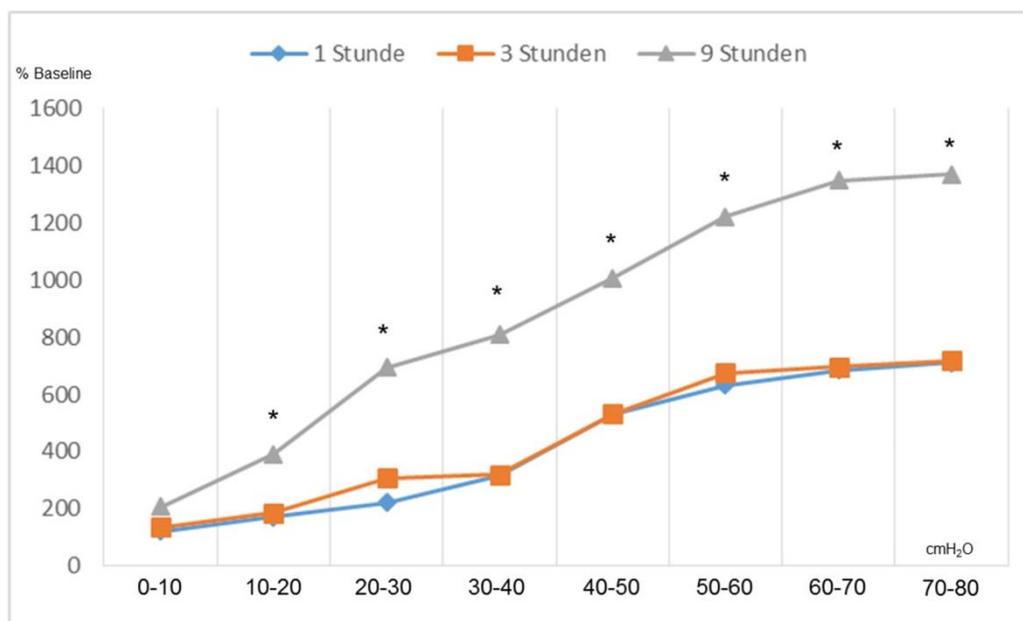
Druck (cmH <sub>2</sub> O)	1h	3h	9h
0 – 10	122 ± 6	135 ± 9	207 ± 20
10 – 20	171 ± 14	185 ± 14	392 ± 24 *
20 – 30	221 ± 24	307 ± 17	694 ± 42 *
30 – 40	315 ± 26	319 ± 30	809 ± 48 *
40 – 50	530 ± 30	532 ± 28	1008 ± 69 *
50 – 60	633 ± 44	675 ± 22	1222 ± 103 *
60 – 70	685 ± 25	696 ± 28	1349 ± 121 *
70 – 80	712 ± 19	719 ± 32	1469 ± 122 *

\*  $p < 0,05$  (Vergleich mit 3h)  
Mittelwert ± SEM (% der Baseline) angegeben

Tabelle 18. Vergleich der Kontrollgruppen bei Rampendistension.

Vergleicht man die 1h- und die 3h-Kontroll-Gruppe auf einem Druckniveau  $> 10$  cmH<sub>2</sub>O, so findet sich eine minimale Steigerung der Entladungsfrequenz zugunsten der 3h-Kontroll-Gruppe; diese ist jedoch unabhängig vom intraluminalen Druckniveau in keinem Fall signifikant (jeweils  $p > 0,05$ ).

Im Vergleich der 3h- mit der 9h-Kontrollgruppe hingegen ist die afferente Entladungssequenz ab einem Druckniveau > 10 cmH<sub>2</sub>O zugunsten der 9h-Gruppe signifikant gesteigert. Gleiches findet sich erwartungsgemäß beim Vergleich der 1h- mit der 9h-Kontroll-Gruppe. *Siehe* hierzu **Tabelle 18** und **Abb.42**.



**Abbildung 42. Rampendistension der Kontrollgruppen.**

Beim Vergleich der 3h- mit der 9h-Kontrollgruppe ist die afferente Entladungssequenz (% der Baseline) ab einem Druckniveau > 10 cmH<sub>2</sub>O zugunsten der 9h-Gruppe signifikant gesteigert.

\*  $p < 0,05$  (Vergleich mit 3h).

### 3.3.2.2 Vergleich der Ileusgruppen

Um die Veränderungen der afferenten Entladungsfrequenz im zeitlichen Verlauf des POI zu untersuchen, werden auch die einzelnen Ileus-Gruppen (1h-Ileus, 3h-Ileus und 9h-Ileus) miteinander verglichen; hierbei wird wiederum zwischen den dilatierten und eng gestellten Darmabschnitten der 9h-Ileus-Gruppe unterschieden.

Auf niedrigen Druckniveaus (< 20 cmH<sub>2</sub>O) unterscheiden sich all diese Gruppen nicht signifikant voneinander (jeweils  $p > 0,05$ ).

Ab einem Druckniveau > 20 cmH<sub>2</sub>O jedoch ist die afferente Entladungsfrequenz der dilatierten Darmsegmente der 9h-Ileus-Gruppe signifikant gegenüber der 3h- und entsprechend auch der 1h-Ileus-Gruppe gesteigert. Für die eng gestellten Darmabschnitte der 9h-Ileus-Gruppe lässt sich eine solche Aktivitätssteigerung

allerdings nicht nachvollziehen; für diese gleichen die Werte denen der 1h- und 3h-Ileus-Gruppe (jeweils  $p > 0,05$ ). Eine Ausnahme hiervon findet sich auf dem Druckniveau 30 bis 40 cmH<sub>2</sub>O; hier ist die Entladungsfrequenz der eng gestellten Darmabschnitte der 9h-Gruppe mit  $651,4 \pm 63,8$  % im Vergleich 1h-Ileus-Gruppe ( $368,2 \pm 19,8$  %) signifikant gesteigert ( $p < 0,05$ ). *Siehe hierzu auch **Tabelle 19** und **Abb.43**.*

Druck (cmH <sub>2</sub> O)	1h	3h	9h	
			dilatiert	eng
0 – 10	124 ± 10	125 ± 9	205 ± 21	203 ± 19
10 – 20	165 ± 19	220 ± 14	458 ± 55	317 ± 24
20 – 30	278 ± 36	360 ± 45	650 ± 83 *	441 ± 44
30 – 40	368 ± 20	465 ± 48	1002 ± 128 *	651 ± 64 **
40 – 50	565 ± 21	654 ± 45	1374 ± 175 *	781 ± 66
50 – 60	754 ± 38	806 ± 37	1651 ± 163 *	908 ± 98
60 – 70	804 ± 46	866 ± 25	1790 ± 154 *	962 ± 111
70 – 80	852 ± 50	906 ± 26	1905 ± 150 *	927 ± 111

\*  $p < 0,05$  (Vergleich mit 3h)

\*\*  $p < 0,05$  (Vergleich mit 1h)

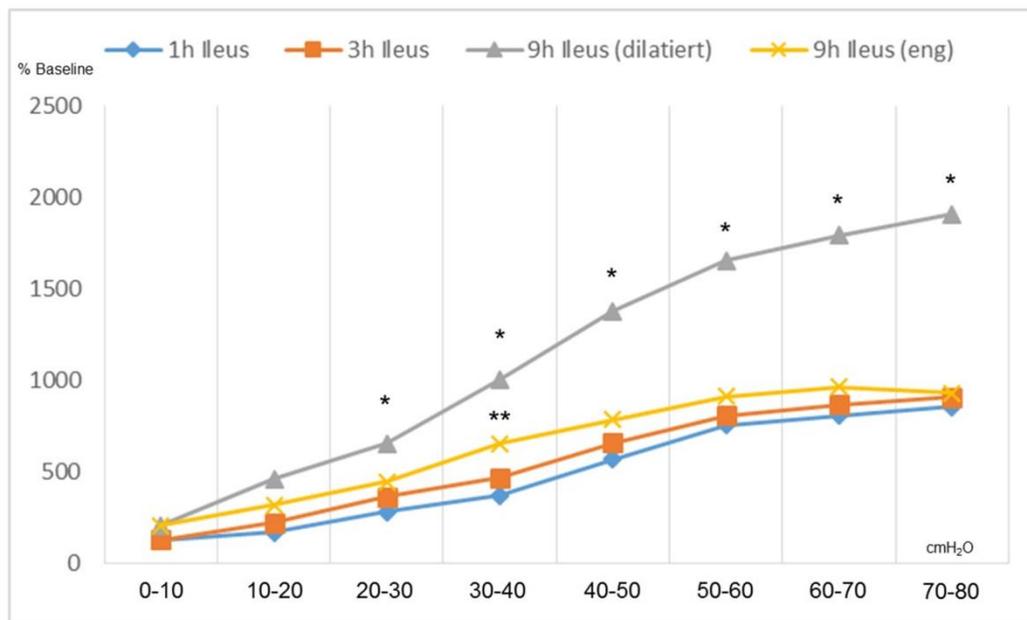
Mittelwert ± SEM (% der Baseline) angegeben

**Tabelle 19.** Vergleich der Ileusgruppen bei Rampendistension.

### 3.3.2.3 Vergleich der Ileus- und Kontrollgruppen

Der Effekt der Darmmanipulation im Vergleich zur bloßen Laparotomie lässt sich durch den direkten Vergleich der Kontroll- mit den Ileus-Gruppen quantifizieren.

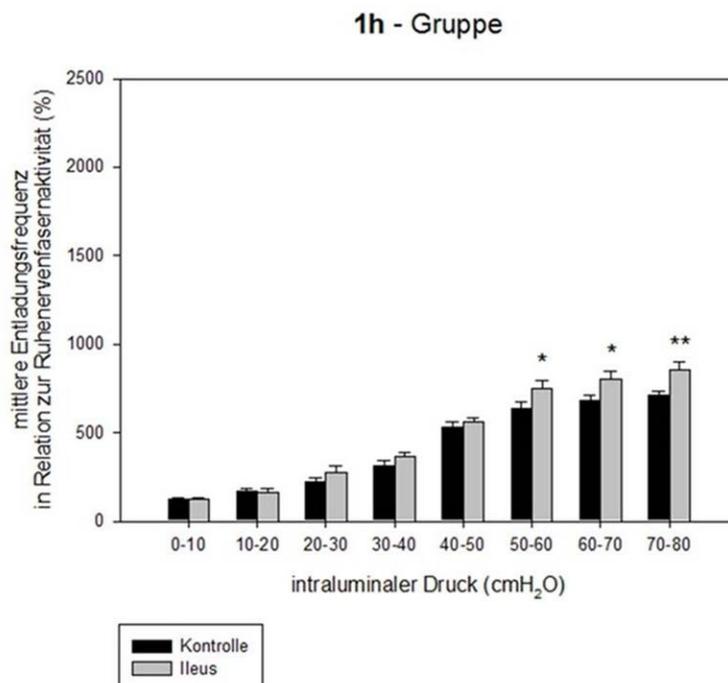
Gegenüber der 1h-Kontroll-Gruppe ist bei der 1h-Ileus-Gruppe die afferente Entladungsfrequenz ab einem intraluminalen Druck  $> 50$  cmH<sub>2</sub>O signifikant gesteigert (*siehe **Abb.44***). Eine Steigerung der afferenten Nervenfasernaktivität im Vergleich zur 3h-Kontroll-Gruppe kann auch für die 3h-Ileus-Gruppe beobachtet werden, hier allerdings bereits ab einem Druck  $> 30$  cmH<sub>2</sub>O (*siehe **Abb.45***).



**Abbildung 43. Rampendistension der Ileusgruppen.**

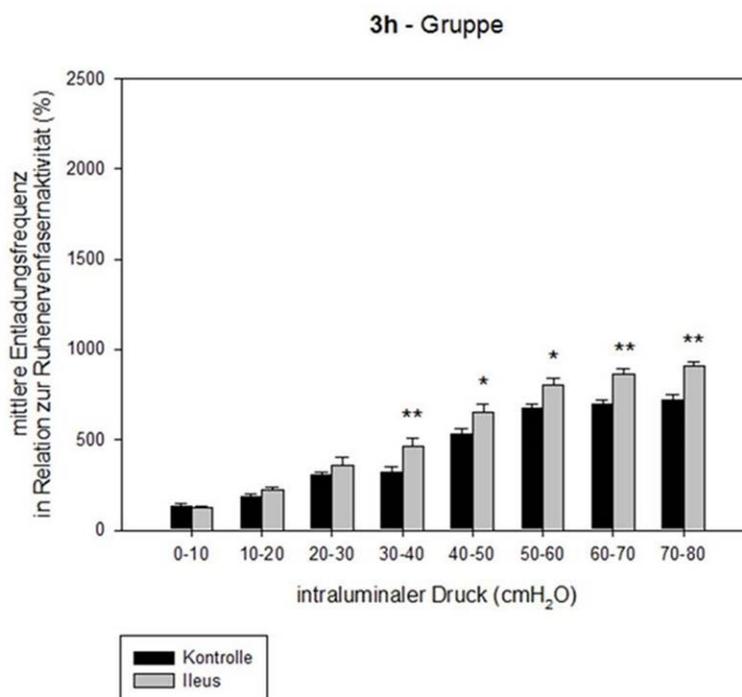
Ab einem Druckniveau > 20 cmH<sub>2</sub>O ist die afferente Entladungsfrequenz der dilatierten Darmsegmente der 9h-Ileus-Gruppe signifikant gegenüber der 3h-Ileus-Gruppe gesteigert. Für die eng gestellten Darmabschnitte der 9h-Ileus-Gruppe lässt sich eine solche Aktivitätssteigerung nicht nachvollziehen.

\*  $p < 0,05$  (Vergleich mit 3h); \*\*  $p < 0,05$  (Vergleich mit 1h).



**Abbildung 44. Nervenfasernaktivität der 1h-Gruppen bei Rampendistension.**

Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SEM, jeweils  $n = 6$ . \*  $p < 0,01$  vs. Kontrolle, \*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle.

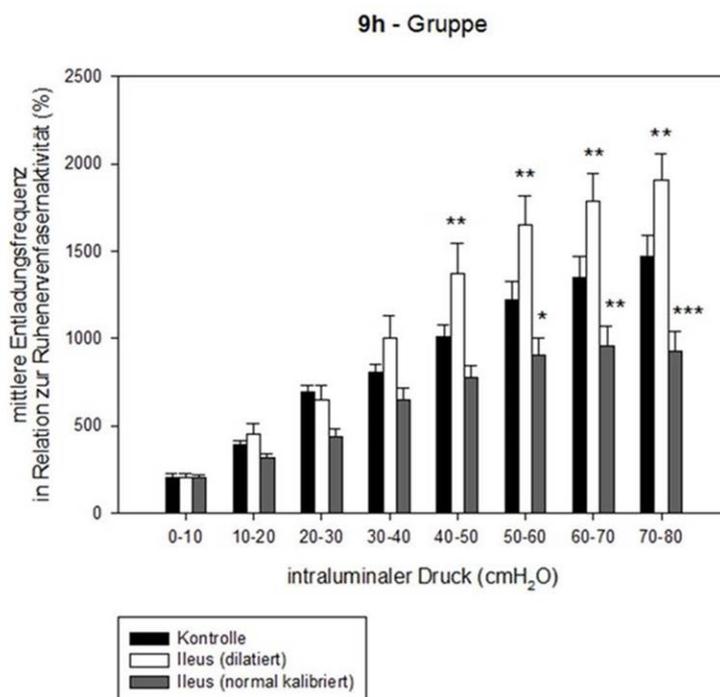


**Abbildung 45. Nervenfaseraktivität der 3h-Gruppen bei Rampendistension.**

Die Abbildung zeigt eine histogrammische Darstellung der registrierten afferenten Nervenfaseraktivität innerhalb der 3h-Gruppe während mechanischer Distension bis zu einem Druck von 80 cmH<sub>2</sub>O. Die schwarzen Säulen repräsentieren die mittlere nervale Aktivität der Kontrollgruppe (3h-Sham-Gruppe), die hellgrauen Säulen diejenige der Ileusgruppe (3h-Ileus-Gruppe).

Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SEM, jeweils n = 6. \* p < 0,01 vs. Kontrolle, \*\* p < 0,001 vs. Kontrolle.

Für die 9h-Ileus-Gruppe werden die registrierten Signale der normalkalibrigen und dilatierten Darmsegmente wiederum separat ausgewertet. Im Vergleich zur 9h-Kontroll-Gruppe ist die afferente Nervenfaseraktivität von normalkalibrigen 9h-Ileus-Darmsegmenten ab einem intraluminalen Druck > 50 cmH<sub>2</sub>O reduziert. Hier werden maximal  $46 \pm 5$  impsec<sup>-1</sup> bei einem Höchstdruck von 80 cmH<sub>2</sub>O erreicht, im Vergleich zu  $77 \pm 4$  impsec<sup>-1</sup> bei Kontrollversuchen (p < 0,001, jeweils n = 6). Ganz das Gegenteil findet sich für die dilatierten Darmabschnitte der 9h-Ileus-Gruppe im Vergleich zur 9h-Kontroll-Gruppe; hier ist die afferente Nervenfaseraktivität ab einem intraluminalen Druck > 40 cmH<sub>2</sub>O signifikant gesteigert (p < 0,01). Dabei zeigt sich ein Maximum von  $176 \pm 16$  impsec<sup>-1</sup> bei 80 cmH<sub>2</sub>O (siehe **Abb.46**).



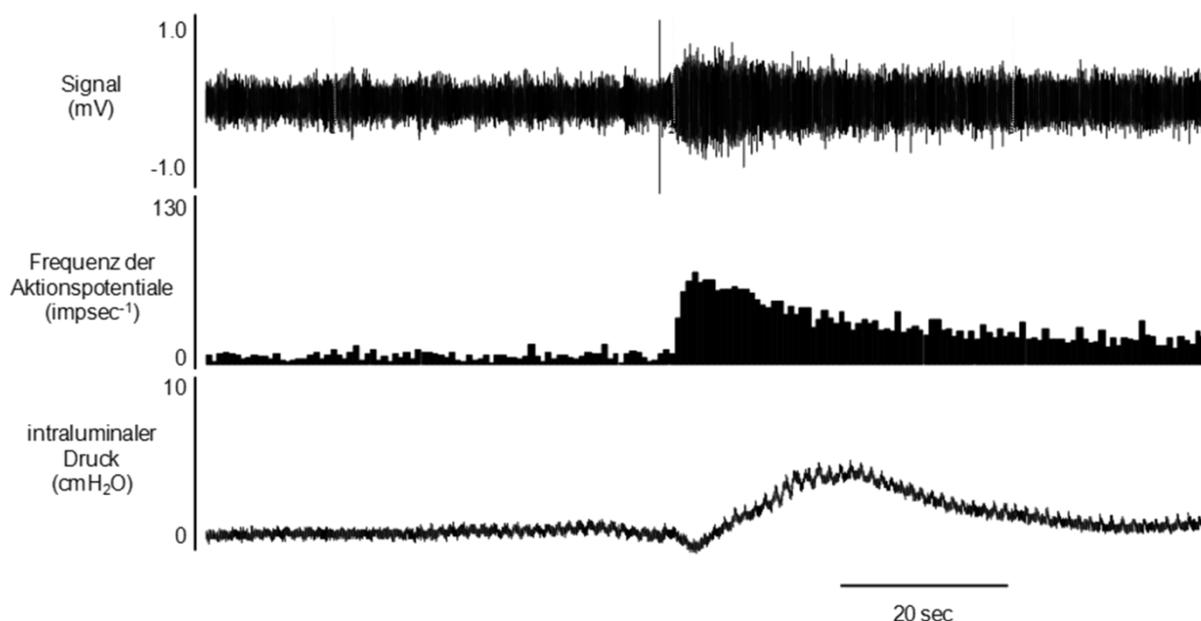
**Abbildung 46. Nervenfaseraktivität der 9h-Gruppen bei Rampendistension.**

Im Vergleich zur 9h-Kontroll-Gruppe ist die afferente Nervenfaseraktivität von eng gestellten 9h-Ileus-Darmsegmenten ab einem intraluminalen Druck > 50 cmH<sub>2</sub>O reduziert. Ganz das Gegenteil findet sich für die dilatierten Darmabschnitte der 9h-Ileus-Gruppe im Vergleich zur 9h-Kontroll-Gruppe; hier ist die afferente Nervenfaseraktivität ab einem intraluminalen Druck > 40 cmH<sub>2</sub>O signifikant gesteigert.

Darstellung als Mittelwert ± SEM, jeweils n = 6. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

### 3.3.3 Chemische Stimulation

Unabhängig von der jeweiligen experimentellen Gruppe bewirkt die serosale Bradykininapplikation (0,5 µM) einen abrupten Anstieg der Nervenfaseraktivität (siehe **Abb.47**). Gleichzeitig ist ein kurzfristiger Abfall des intraluminalen Drucks zu verzeichnen, der innerhalb weniger Sekunden durch einen erneuten Druckanstieg kompensiert wird. Während dieser Kompensationsreaktion werden kurzfristig intraluminale Spitzendrücke mit Werten oberhalb des Ausgangsniveaus (Baselineaktivität) erreicht (siehe **Abb.47**). Dieses durch die serosale Bradykininapplikation ausgelöste Motilitätsmuster tritt unabhängig von der afferenten Nervenaktivität auf und bildet sich innerhalb kürzester Zeit (ca. 2 Minuten) wieder zurück.



**Abbildung 47. Veränderung des Nervenfasersignals nach Bradykininapplikation.**

Die serosale Bradykininapplikation bewirkt einen abrupten Anstieg der Nervenfaserveraktivität, gleichzeitig ist ein kurzfristiger Abfall des intraluminalen Drucks zu verzeichnen, der innerhalb weniger Sekunden durch einen erneuten Druckanstieg kompensiert wird. Dieses durch die serosale Bradykininapplikation ausgelöste Motilitätsmuster tritt unabhängig von der afferenten Nervenaktivität auf und bildet sich innerhalb kurzer Zeit wieder zurück.

### 3.3.3.1 Vergleich der Kontrollgruppen

Beim Vergleich der Reaktion der afferenten Nervenfaserveraktivität auf Bradykinin ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der 1h- und der 3h-Kontroll-Gruppe (*siehe Tabelle 20*); die mittlere Nervenfaserveraktivität der 1h-Kontroll-Gruppe beträgt  $12,1 \pm 0,9 \text{ impsec}^{-1}$ , die der 3h-Kontroll-Gruppe  $14,5 \pm 1,1 \text{ impsec}^{-1}$  ( $p = 0,129$ ).

Anders verhält es sich beim Vergleich der 9h- mit der 3h- bzw. 1h-Kontroll-Gruppe; die afferente Nervenfaserveraktivität nach Bradykiningabe ist hier für die 9h-Kontroll-Gruppe mit  $19,9 \pm 1,3 \text{ impsec}^{-1}$  im Vergleich zur 3h-Kontroll-Gruppe ( $14,5 \pm 1,1 \text{ impsec}^{-1}$ ;  $p = 0,01$ ) bzw. 1h-Kontroll-Gruppe ( $12,1 \pm 0,9 \text{ impsec}^{-1}$ ;  $p = 0,001$ ) signifikant gesteigert.

### 3.3.3.2 Vergleich der Ileusgruppen

Die Reaktion der afferenten Nervenfaserveraktivität auf Bradykinin unterscheidet sich partiell auch zwischen den einzelnen Ileus-Gruppen (1h-Ileus-Gruppe, 3h-Ileus-Gruppe und 9h-Ileus-Gruppe). Auch hier wird wieder zwischen den beiden

morphologisch unterschiedlichen Darmabschnitten der 9h-Ileus-Gruppe (dilatiert vs. eng) differenziert.

	1h	3h	9h
<b>Impulsrate (impsec<sup>-1</sup>)</b>	12,1 ± 0,9	14,5 ± 1,1	19,9 ± 1,3 *

\* p < 0,05 (Vergleich mit 3h)  
Mittelwert ± SEM (impsec<sup>-1</sup>) angegeben

**Tabelle 20. Nervenfaseraktivität der Kontrollgruppe nach Bradykininapplikation.**

Im Vergleich zur 1h-Ileus-Gruppe (15,0 ± 0,9 impsec<sup>-1</sup>) ist die Reaktion auf Bradykinin bei der 3h-Ileus-Gruppe (38,5 ± 4,0 impsec<sup>-1</sup>) signifikant gesteigert (p = 0,001). Gleiches ergibt sich für die 9h-Ileus-Gruppe im Vergleich zur 1h-Ileus-Gruppe, und zwar unabhängig davon, ob es sich um dilatierte oder eng gestellte Darmabschnitte handelt; die Nervenfaseraktivität beträgt hier bei distendierten Abschnitten im Mittel 35,3 ± 2,1 impsec<sup>-1</sup> (p = 0,001) und bei eng gestellten Segmenten 32,8 ± 1,8 impsec<sup>-1</sup> (p = 0,001). Im Vergleich zur 3h-Ileus-Gruppe (38,5 ± 4,0 impsec<sup>-1</sup>) ist die Nervenfaseraktivität der 9h-Ileus-Gruppe jedoch nicht signifikant unterschiedlich (p<sub>3h vs. 9h↑</sub> = 0,505; p<sub>3h vs. 9h↓</sub> = 0,234). *Siehe* hierzu auch **Tabelle 21**.

	1h	3h	9h	
			dilatiert	eng
<b>Impulsrate (impsec<sup>-1</sup>)</b>	15,0 ± 0,9	38,4 ± 4,0	35,3 ± 2,1 *	32,8 ± 1,8 *

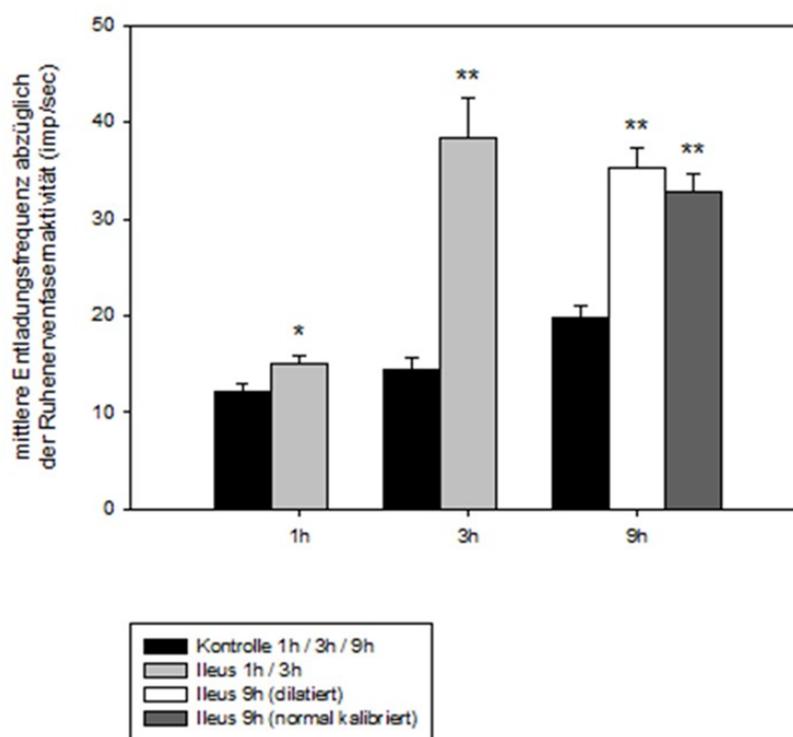
\* p < 0,05 (Vergleich mit 1h)  
Mittelwert ± SEM (impsec<sup>-1</sup>) angegeben

**Tabelle 21. Nervenfaseraktivität der Ileusgruppe nach Bradykininapplikation.**

### 3.3.3.3 Vergleich der Ileus- und Kontrollgruppen

Im Vergleich zur entsprechenden 1h-Kontroll-Gruppe (12,1 ± 0,9 impsec<sup>-1</sup>) ist die afferente Nervenfaseraktivität nach Bradykiningabe bei der 1h-Ileus-Gruppe (15,0 ± 0,9 impsec<sup>-1</sup>) signifikant erhöht (p = 0,046; *siehe* **Abb.48** und **49**). Das gleiche

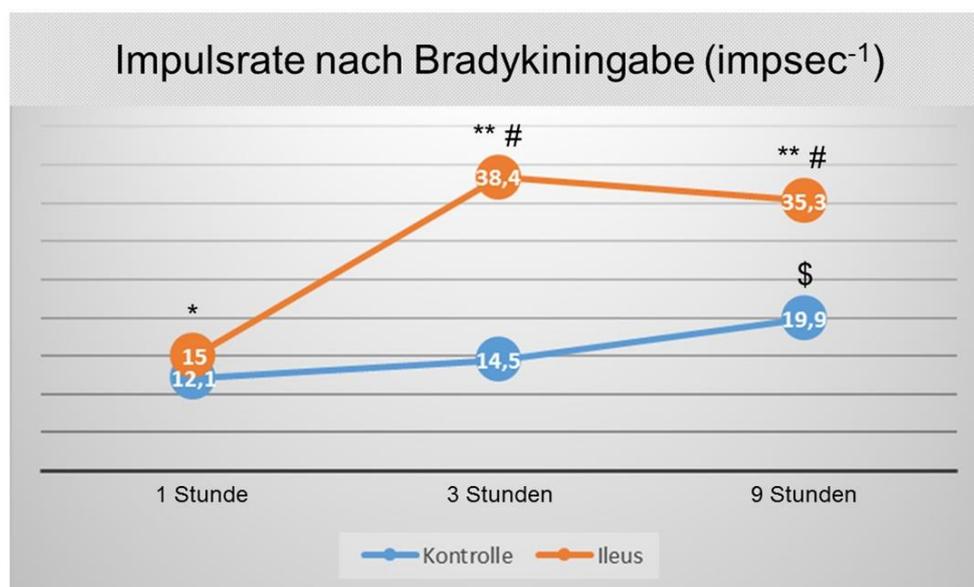
Ergebnis liefert auch der Vergleich der 3h- bzw. 9h-Ileus-Gruppe mit der entsprechenden Kontrollgruppe, und zwar unabhängig davon, ob es sich um dilatierte oder eng gestellte Darmsegmente handelt (siehe **Abb.48** und **49**). Für die 3h-Ileus-Gruppe ergeben sich Werte von  $38,5 \pm 4,0$  impsec<sup>-1</sup>, für die 3h-Kontroll-Gruppe  $14,5 \pm 1,1$  impsec<sup>-1</sup> ( $p = 0,001$ ). Neun Stunden nach dem operativen Eingriff beträgt die afferente Nervenfasernaktivität der 9h-Kontroll-Gruppe nach Bradykininapplikation  $19,9,5 \pm 1,3$  impsec<sup>-1</sup>, diejenige der 9h-Ileus-Gruppe  $35,3 \pm 2,1$  impsec<sup>-1</sup> (dilatiert) bzw.  $32,8 \pm 1,8$  impsec<sup>-1</sup> (eng gestellt); jeweils  $p = 0,01$ .



**Abbildung 48. Vergleich der Nervenfasernaktivität nach Bradykiningabe.**

Die histogrammische Darstellung zeigt die registrierte afferente Nervenfasernaktivität nach serosaler Applikation von BK (Bradykinin,  $0,5 \mu\text{M}$ ). Innerhalb der Ileus-Gruppen findet sich im Vergleich zu den Kontrollen (schwarze Säulen) eine signifikante Steigerung der neuralen Aktivität. Die beiden hellgrauen Säulen repräsentieren die 1h- bzw. 3h-Ileus-Gruppe. Innerhalb der 9h-Ileus-Gruppe sind dilatierte Darmabschnitte durch weiße Säulen und normalkalibrige Segmente durch dunkelgraue Säulen abgebildet.

Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SEM, jeweils  $n = 6$ . \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; \*\*  $p < 0,01$  vs. Kontrolle.



**Abbildung 49. Nervenfasernaktivität nach Bradykiningabe (impsec<sup>-1</sup>) bei Ileus und Kontrolle.**

Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ist die afferente Nervenfasernaktivität nach Bradykiningabe bei der entsprechenden Ileus-Gruppe signifikant erhöht. In der Grafik wird stellvertretend lediglich die dilatierte 9h-Ileus-Gruppe abgebildet.

Darstellung als Mittelwert, jeweils n = 6. \* p < 0,05 vs. Kontrolle; \*\* p < 0,01 vs. Kontrolle; # p < 0,05 vs. 1h-Ileus; \$ p < 0,05 vs. 3h-Kontrolle.

## 3.4 Immunhistochemischer Nachweis des Fos-Proteins

### 3.4.1 Vergleich der Kontrollgruppen

Um die Auswirkungen der Laparotomie (ohne Darmmanipulation) auf die zentrale neuronale Aktivierung zu untersuchen, werden die einzelnen Kontrollgruppen miteinander verglichen.

#### 3.4.1.1 NTS der Kontrollgruppen

Bei der 1h-Kontroll-Gruppe beträgt die Anzahl der fos-positiven Zellen im gesamten NTS im Mittel  $10,7 \pm 0,4$ . Im Vergleich dazu ist die Anzahl der fos-positiven Zellen sowohl bei der 3h-Kontroll-Gruppe ( $12,2 \pm 0,5$ ; p = 0,040) als auch bei der 9h-Kontroll-Gruppe ( $60,2 \pm 1,4$ ; p = 0,002) signifikant erhöht. Auch beim Vergleich der 3h-Kontroll-Gruppe mit der 9h-Kontroll-Gruppe ist die Zellzahl zugunsten der 9h-Kontroll-Gruppe signifikant erhöht (p = 0,002).

### 3.4.1.2 Area postrema der Kontrollgruppen

In der Area postrema verhalten sich die Ergebnisse etwas anders. Hier unterscheidet sich die Anzahl der fos-positiven Zellen in der 3h-Kontroll-Gruppe ( $1,3 \pm 0,5$ ) nicht signifikant von der in der 1h-Kontroll-Gruppe ( $1,5 \pm 0,8$ ;  $p = 0,937$ ). Betrachtet man hingegen die Anzahl der fos-positiven Zellen neun Stunden nach der Scheinoperation ( $14,2 \pm 1,3$ ), so unterscheidet sich diese signifikant sowohl von derjenigen der 1h-Kontroll-Gruppe als auch der 3h-Kontroll-Gruppe (jeweils  $p = 0,002$ ).

### 3.4.2 Vergleich der Ileusgruppen

Auch bei den Ileus-Gruppen lässt sich die Zunahme der fos-positiven Zellen im zeitlichen Verlauf nach der Operation beobachten.

#### 3.4.2.1 NTS der Ileusgruppen

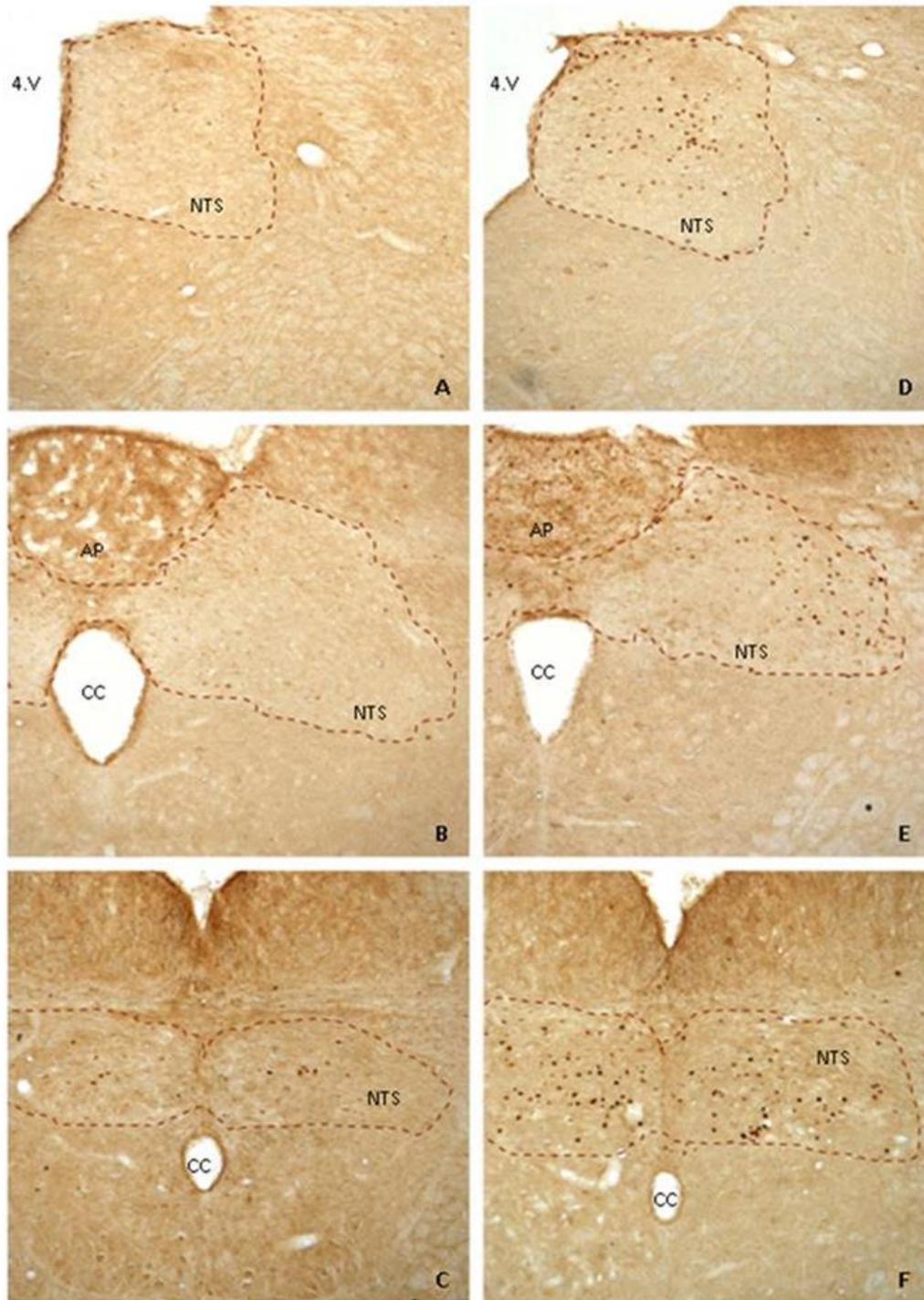
Bei der 1h-Ileus-Gruppe beträgt die Anzahl der fos-positiven Zellen im gesamten NTS im Mittel  $10,5 \pm 0,3$ . Im Vergleich dazu ist die Anzahl der fos-positiven Zellen sowohl bei der 3h-Ileus-Gruppe ( $12,8 \pm 0,3$ ;  $p = 0,01$ ) als auch bei der 9h-Ileus-Gruppe ( $127,7 \pm 4,1$ ;  $p = 0,002$ ) signifikant erhöht. Auch beim Vergleich der 3h-Ileus-Gruppe mit der 9h-Ileus-Gruppe ist die Zellzahl zugunsten der 9h-Ileus-Gruppe signifikant erhöht ( $p = 0,003$ ).

#### 3.4.2.2 Area postrema der Ileusgruppen

Hier unterscheidet sich die Anzahl der fos-positiven Zellen in der 3h-Ileus-Gruppe ( $2,0 \pm 0,4$ ) nicht signifikant von der in der 1h-Ileus-Gruppe ( $1,8 \pm 0,2$ ;  $p = 0,818$ ). Betrachtet man hingegen die Anzahl der fos-positiven Zellen neun Stunden nach der Darmmanipulation ( $38,0 \pm 2,0$ ), so unterscheidet sich diese signifikant sowohl von derjenigen der 1h-Ileus-Gruppe ( $p = 0,003$ ) als auch der 3h-Ileus-Gruppe ( $p = 0,01$ ).

### 3.4.3 Vergleich der Ileus- und Kontrollgruppen

Der Effekt der Darmmanipulation (im Vergleich zur alleinigen Laparotomie) auf die zentrale neuronale Aktivierung lässt sich durch den direkten Vergleich der Kontroll- mit den Ileus-Gruppen quantifizieren (siehe **Abb.50 – 52**).



**Abbildung 50. Repräsentative Schnittbilder des Hirnstamms 9h postoperativ.**

Bei den Hirnschnitten der 9h-Kontrolle (**A – C**) findet sich nur eine geringe Zahl der dunkel angefarbten Fos-positiven Nervenzellen;

**(A)** 6,64 mm kaudal des Bregma; **(B)** 7,08 mm kaudal des Bregma; **(C)** 8,43 mm kaudal des Bregma.

In den Schnitten der 9h-Ileus-Gruppe (**D – F**) zeigt sich eine erhöhte Anzahl c-Fos positiver Zellen;

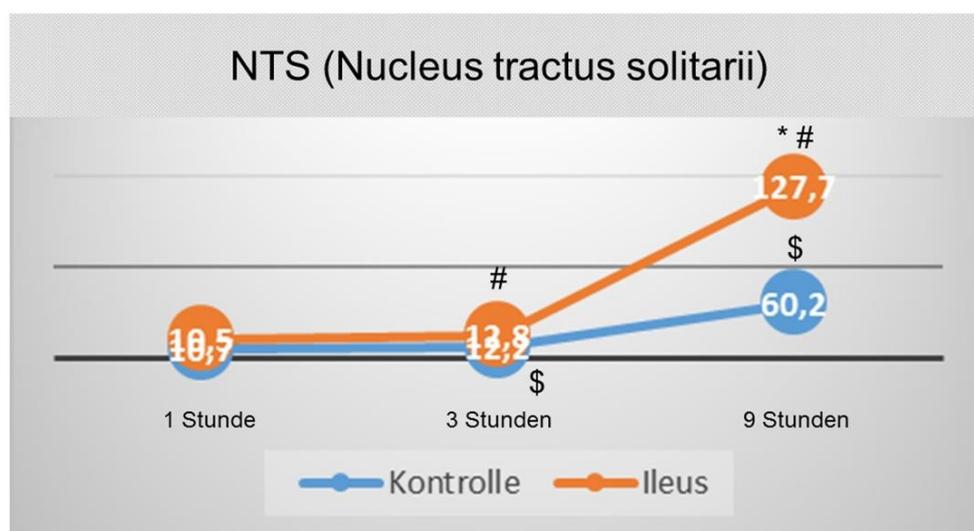
**(D)** 6,64 mm kaudal des Bregma; **(E)** 7,08 mm kaudal des Bregma; **(F)** 8,43 mm kaudal des Bregma.

AP – Area postrema; CC – Canalis centralis; NTS – Nucleus tractus solitarii; 4.V – 4.Ventrikel.

### 3.4.3.1 NTS im Vergleich zwischen Ileus und Kontrolle

Die Anzahl der fos-positiven Zellen im gesamten NTS unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der 1h-Kontroll-Gruppe ( $10,7 \pm 0,4$ ) und der 1h-Ileus-Gruppe ( $10,5 \pm 0,3$ ;  $p = 0,765$ ). Ein ähnliches Ergebnis findet sich beim Vergleich der 3h-Gruppen; hier beträgt die Zellzahl bei der 3h-Kontroll-Gruppe  $12,2 \pm 0,5$  und bei der 3h-Ileus-Gruppe  $12,8 \pm 0,3$  ( $p = 0,267$ ).

Anders verhält es sich neun Stunden nach dem operativen Eingriff; hier sind im NTS der 9h-Ileus-Gruppe ( $127,7 \pm 4,1$ ) signifikant mehr fos-positive Zellen nachweisbar als bei der 9h-Kontroll-Gruppe ( $60,2 \pm 1,4$ ;  $p = 0,001$ ).



**Abbildung 51. Fos-positive Zellen im Nucleus tractus solitarii bei Ileus und Kontrolle.**

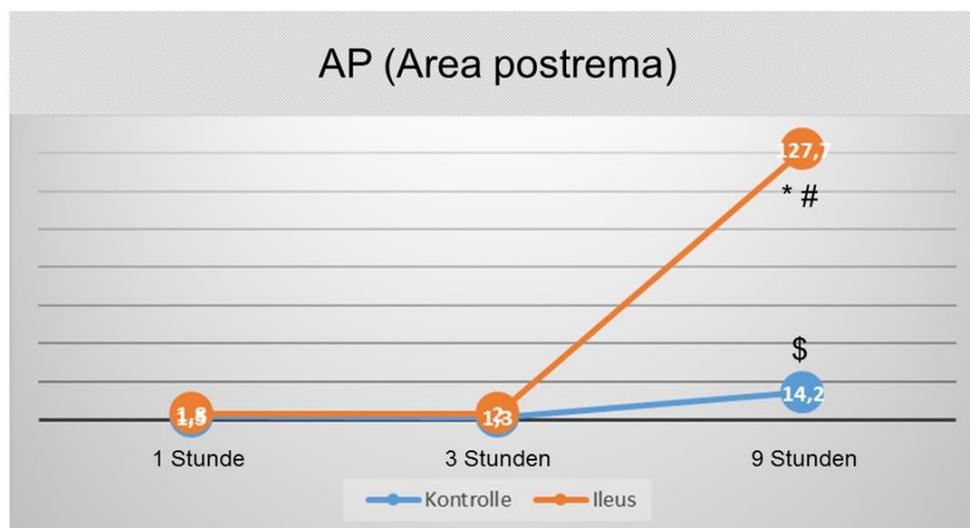
Neun Stunden nach dem operativen Eingriff sind im NTS der 9h-Ileus-Gruppe signifikant mehr fos-positive Zellen nachweisbar als bei der 9h-Kontroll-Gruppe.

\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle; #  $p < 0,01$  vs. 1h-Ileus; \$  $p < 0,01$  vs. 1h-Kontrolle.

### 3.4.3.2 Area postrema im Vergleich zwischen Ileus und Kontrolle

Hier unterscheidet sich die Anzahl der fos-positiven Zellen in der 1h-Ileus-Gruppe ( $1,8 \pm 0,2$ ) nicht signifikant von der in der 1h-Kontroll-Gruppe ( $1,5 \pm 0,3$ ;  $p = 0,401$ ). Ein ähnliches Ergebnis findet sich beim Vergleich der 3h-Gruppen; hier beträgt die Zellzahl bei der 3h-Kontroll-Gruppe  $1,3 \pm 0,2$  und bei der 3h-Ileus-Gruppe  $2,0 \pm 0,4$  ( $p = 0,145$ ).

Betrachtet man hingegen die Anzahl der fos-positiven Zellen in der Area postrema neun Stunden nach der Darmmanipulation ( $38,0 \pm 2,0$ ), so unterscheidet sich diese signifikant von derjenigen der 9h-Kontroll-Gruppe ( $14,2 \pm 1,3$ ;  $p = 0,001$ ).



**Abbildung 52. Fos-positive Zellen in der Area postrema bei Ileus und Kontrolle.**

Neun Stunden nach dem operativen Eingriff sind in der Area postrema der 9h-Ileus-Gruppe signifikant mehr fos-positive Zellen nachweisbar als bei der 9h-Kontroll-Gruppe.

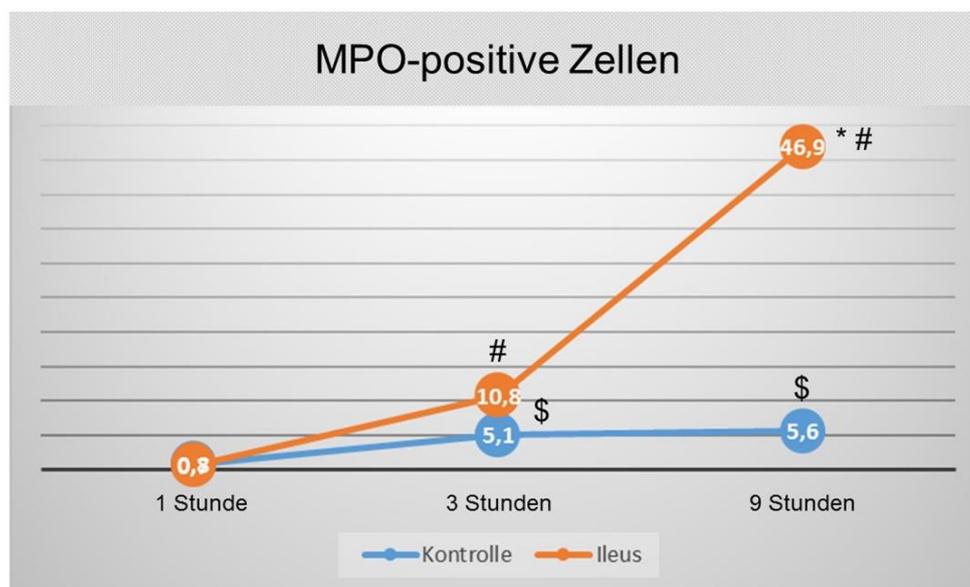
\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle; #  $p < 0,01$  vs. 1h-Ileus; \$  $p < 0,01$  vs. 1h-Kontrolle.

## 3.5 Myeloperoxidasefärbung

### 3.5.1 Vergleich der Kontrollgruppen

Beim Vergleich der einzelnen Kontroll-Gruppen (1h-Kontroll-Gruppe, 3h-Kontroll-Gruppe, 9h-Kontroll-Gruppe) zeigen sich bereits Unterschiede hinsichtlich der Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen (*siehe Abb.53*).

Bereits drei Stunden nach der Scheinoperation ist die Anzahl der MPO-positiven Entzündungszellen mit  $5,1 \pm 2,4$  Zellen signifikant gegenüber der 1h-Kontroll-Gruppe ( $0,8 \pm 0,2$ ) erhöht ( $p = 0,041$ ). Neun Stunden nach dem operativen Eingriff beträgt die Zellzahl  $5,6 \pm 1,4$ , liegt also in einem ganz ähnlichen Bereich wie bereits nach drei Stunden ( $p = 0,846$ ).



**Abbildung 53. MPO-positive Zellen bei Ileus und Kontrolle.**

Neun Stunden nach dem operativen Eingriff sind in der Tunica muscularis der 9h-Ileus-Gruppe (exemplarisch sind hier nur die Ergebnisse der dilatierten Darmabschnitte dargestellt) signifikant mehr MPO-positive Zellen nachweisbar als bei der 9h-Kontroll-Gruppe.

\*  $p < 0,01$  vs. Kontrolle; #  $p < 0,01$  vs. 1h-Ileus; \$  $p < 0,05$  vs. 1h-Kontrolle.

### 3.5.2 Vergleich der Ileusgruppen

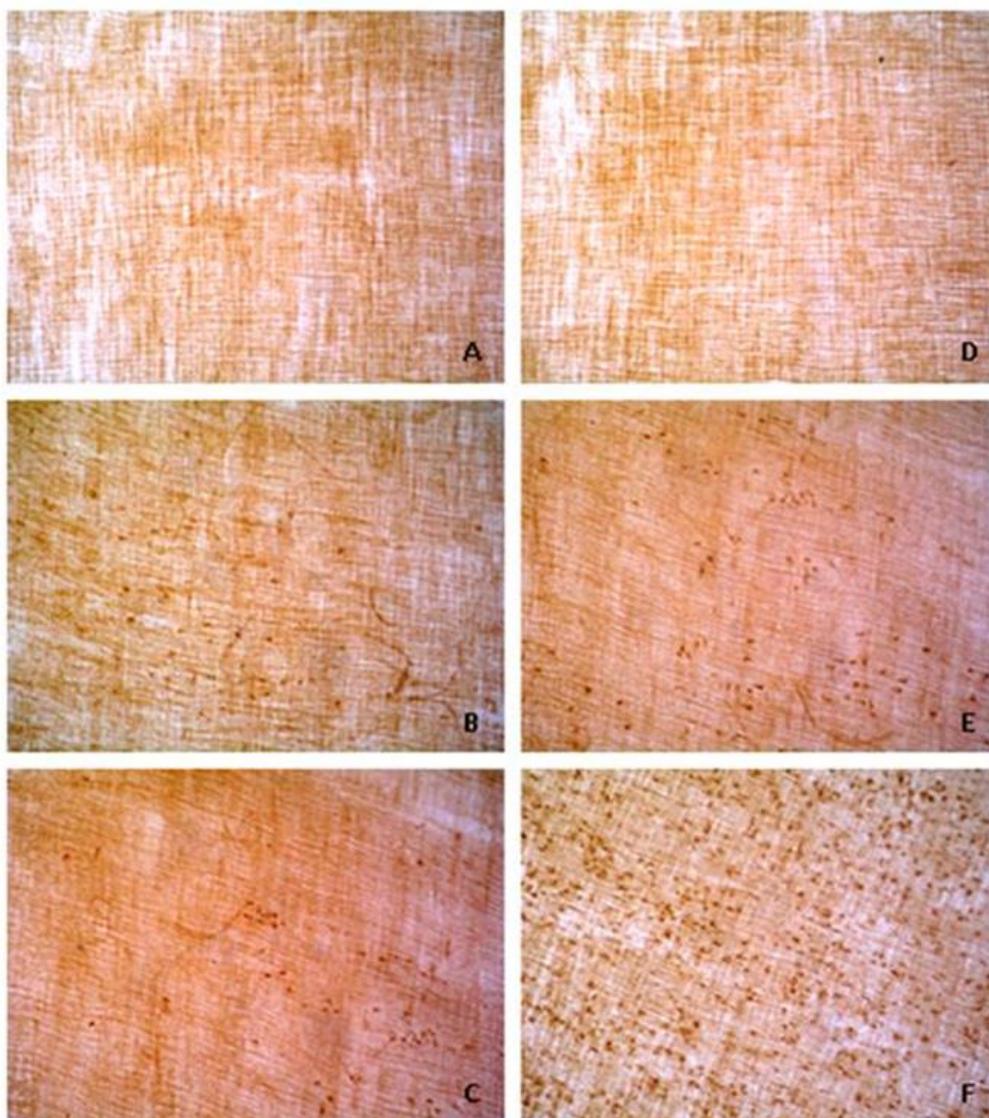
Mit fortschreitender Dauer des Ileus kann man eine deutlich zunehmende Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen beobachten (*siehe Abb.53*).

So beträgt die Zellzahl bei der 1h-Ileus-Gruppe  $0,7 \pm 0,2$ , bei der 3h-Ileus-Gruppe  $10,8 \pm 1,2$  ( $p = 0,002$ ) und bei der 9h-Ileus-Gruppe  $46,9 \pm 5,8$  (dilatierte Darmsegmente,  $p = 0,002$ ). Hinsichtlich der Zahl an Entzündungszellen ist kein Unterschied zwischen den beiden Kalibern der 9h-Ileus-Gruppe auszumachen (dilatiert:  $46,9 \pm 5,8$  vs. eng gestellt:  $53,5 \pm 5,0$ ;  $p = 0,406$ ).

### 3.5.3 Vergleich der Ileus- und Kontrollgruppen

Die Anzahl der MPO-positiven Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen der 1h-Kontroll-Gruppe ( $0,8 \pm 0,2$ ) und der 1h-Ileus-Gruppe ( $0,7 \pm 0,2$ ;  $p = 0,783$ ). Ein weit weniger eindeutiges Ergebnis findet sich beim Vergleich der 3h-Gruppen; hier beträgt die Zellzahl bei der 3h-Kontroll-Gruppe  $5,1 \pm 2,4$  und bei der 3h-Ileus-Gruppe  $10,8 \pm 1,2$ ; die Signifikanz wird hier knapp ( $p = 0,053$ ) verfehlt.

Anders verhält es sich neun Stunden nach dem operativen Eingriff; hier sind in der Tunica muscularis der 9h-Ileus-Gruppe (dilatiert  $46,9 \pm 5,8$ ; eng gestellt  $53,5 \pm 5,0$ ) signifikant mehr MPO-positive Zellen nachweisbar als bei der 9h-Kontroll-Gruppe ( $5,6 \pm 1,4$ );  $p_{\text{dilatiert}} = 0,001$  und  $p_{\text{eng}} = 0,002$ . *Siehe* zudem **Abb.53** und **Abb.54**.



**Abbildung 54. Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen.**

Die Abbildungen zeigen repräsentative lichtmikroskopische Ausschnitte der Tunica muscularis des Jejunums nach immunhistochemischer MPO-Färbung. Es finden sich lediglich wenige Immunzellen bei den Kontrollgruppen (**A – C**);

**(A)** 1h-Sham-Gruppe; **(B)** 3h-Sham-Gruppe; **(C)** 9h-Sham-Gruppe.

In den Ileusgruppen (**D – F**) steigt die Anzahl MPO-positiver Zellen mit zunehmender Zeitdauer des Ileus; 3h postoperativ wird die Signifikanz jedoch knapp verfehlt ( $5,1 \pm 2,4$  vs.  $10,8 \pm 1,2$ ;  $p = 0,053$ );

**(D)** 1h-Ileus-Gruppe; **(E)** 3h-Ileus-Gruppe; **(F)** 9h-Ileus-Gruppe (dilatierter Abschnitt).

## 4 Diskussion

### 4.1 Allgemeine Diskussion

Die pathophysiologischen Vorgänge bei der Entstehung des postoperativen Ileus (POI) sind komplex – verschiedene Mechanismen und eine Vielzahl beteiligter Mediatoren spielen bei der Entwicklung des Krankheitsbildes eine Rolle [Livingston and Passaro (1990); Bauer and Boeckxstaens (2004); Condon et al. (1986); Moss, Regal, and Lichtig (1986)]. Die Behandlung des POI ist aufgrund des unzureichenden Verständnisses der zugrunde liegenden Pathomechanismen häufig von begrenzter Effektivität.

In den letzten Jahren wurde das Konzept der biphasischen Pathogenese des POI beschrieben [Bauer and Boeckxstaens (2004)]. Man spricht nach diesem Konzept von einer ersten Phase des POI, die vor allem durch inhibitorische neuronale Reflexmechanismen gekennzeichnet ist [Bayliss and Starling (1901); Spiller (2003)]. In der zweiten Phase überwiegt hingegen eine Entzündungsreaktion innerhalb der Darmwand. Während dieser späten und länger andauernden Phase des POI kommt es neben der Rekrutierung zirkulierender Leukozyten in die intestinale Tunica muscularis zu einer verstärkten proinflammatorischen Zytokinproduktion [Bauer and Boeckxstaens (2004); Kalff, Carlos, et al. (1999); Spiller (2003)]. Es entsteht das komplexe Bild des POI mit multiplen Wechselwirkungen zwischen Immunzellen und neuronalen Komponenten [de Jonge et al. (2003)]. Da zu diesem Zeitpunkt bereits viele verschiedene Faktoren involviert sind, ist eine effiziente Therapie der Erkrankung schwierig. Man kann nun folgern, dass es am effektivsten wäre, den POI bereits in seiner initialen Phase zu behandeln.

Die vorliegenden Daten unterstützen diese Überlegungen. Bereits nach wenigen Stunden kommt es beim POI zu einer Zunahme der afferenten neuronalen Sensibilität. Dies führt in der Folge zu einer neuronalen Aktivierung im Hirnstamm; zudem werden inhibitorische neuronale Reflexmechanismen bzw. efferente inhibitorische Elemente aktiviert. Des Weiteren ist anzunehmen, dass über die efferente Innervation des Darms auch inflammatorische Vorgänge (auf Darmebene) reguliert wird [Kalff, Schraut, et al. (1998); Kalff, Carlos, et al. (1999)].

Die Auswirkungen eines chirurgischen Eingriffs auf die Darmmotilität wurden in zahlreichen Studien untersucht [Livingston and Passaro (1990); Resnick et al. (1997); Bauer and Boeckxstaens (2004); Tolleson et al. (1992); Kalff, Schraut, et al. (1998), Kalff, Buchholz, et al. (1999)]. Diese zeigen, dass bereits in der Frühphase des POI vermehrt neuronale afferente Bahnen aktiviert werden [Zittel, Reddy, et al. (1994)]. Allerdings war es bis heute nicht möglich, diese neuronale Aktivierung durch direkte Nervenfaserableitung nachzuweisen. Alle Studien bedienten sich bisher *indirekter* Methoden zur Messung der neuronalen Aktivität. **In der vorliegenden Arbeit konnte die neuronale Aktivierung nun erstmals *direkt* nachgewiesen werden – durch eine spezifisch hierfür entwickelte elektrophysiologische Ableitungstechnik.** Durch diese Technik wurde es möglich, die afferente Innervation als Teil eines hemmenden Reflexmechanismus genau zu untersuchen.

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung derjenigen Mechanismen, die zeitnah nach dem operativen Eingriff aktiviert werden. Diese frühen Pathomechanismen sind insbesondere von Interesse, da sie das spätere Ausmaß des POI beeinflussen können. Eine frühe Intervention könnte demnach den Verlauf des POI zum Positiven hin verändern. Eine weitere Rationale für die Untersuchung der Frühphase des POI war die Überlegung, dass hier die bewussten Pathomechanismen sukzessive aktiviert werden und möglicherweise leichter separat untersucht werden können; im Gegensatz dazu wirken im späteren Krankheitsverlauf zahlreiche Faktoren gleichzeitig und erschweren deren Untersuchung.

Das spezifische Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der afferenten Nervenfaserveraktivität bereits kurz nach dem chirurgischen Eingriff (eine Stunde bis neun Stunden postoperativ); zusätzlich sollte untersucht werden, ab wann nachgeschaltete Stationen des ZNS (NTS und Area postrema) aktiviert werden. Um die Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern, wurde simultan die entzündliche Reaktion in der Darmwand erfasst, wie sie nach mechanischer Manipulation des Darmes zu beobachten ist [Kalff, Schraut, et al. (1998); Kalff, Carlos, et al. (1999)].

## 4.2 Spezielle Diskussion

### 4.2.1 Darmmotilität

In dieser Arbeit zur Untersuchung der Pathogenese des POI kam ein standardisiertes Operationsprotokoll zum Einsatz. Bei beiden Versuchsgruppen (Ileus- und Kontroll-Gruppe) wurde zunächst eine mediane Laparotomie durchgeführt; hierbei wurde neben allen Bauchwandschichten auch das Peritoneum scharf durchtrennt. Bei der Ileus-Gruppe erfolgte anschließend die standardisierte Manipulation des Dünndarms mit sterilen Watteträgern zur Induktion des POI. Im Gegensatz dazu wurde bei der Kontrollgruppe lediglich eine mediane Laparotomie (auch hier mit Durchtrennung von Bauchwand und Peritoneum, aber ohne weitere Darmmanipulation) durchgeführt.

Die experimentellen Verfahren zur Induktion des POI wurden eingehend von der Arbeitsgruppe um De Winter et al. [De Winter et al. (1997)] untersucht. Die Hemmung der gastrointestinalen Motilität wurde hier durch die Anwendung unterschiedlich starker nozizeptiver Stimuli erreicht; diese reichten von der reinen Äthernarkose über einen einfachen Hautschnitt bzw. die vollständige Laparotomie (inklusive scharfer Durchtrennung des Peritoneums) bis zur mechanischen Dünndarmmanipulation. Die gastrointestinale Motilität wurde weder durch die reine Äthernarkose (ohne weiteren operativen Eingriff) noch durch die Hautinzision signifikant beeinflusst. Im Gegensatz dazu führte die Laparotomie zu einer Verzögerung des gastrointestinalen Transits, was durch die zusätzliche mechanische Manipulation des Darmes noch deutlich akzentuiert wurde (*siehe Abb.55*) [De Winter et al. (1997)].

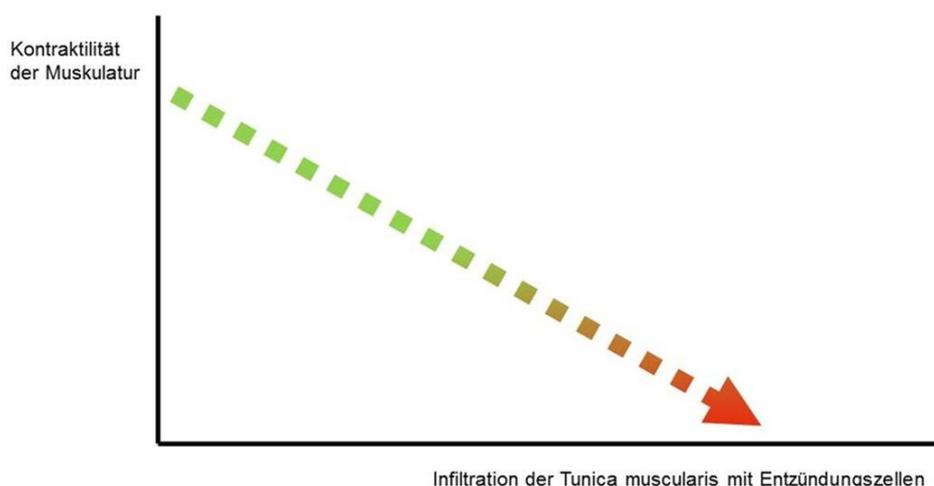


Abbildung 55. Progrediente Hemmung der Motilität durch zunehmend invasive Stimuli.

Auch in anderen Studien [Kalff, Schraut, et al. (1998); Kalff, Carlos, et al. (1999); Kalff, Buchholz, et al. (1999)] konnte nach Darmmanipulation eine im Vergleich zur reinen Laparotomie zunehmende Beeinträchtigung der Motilität nachgewiesen werden. Andere Arbeitsgruppen manipulierten isoliert das Zökum, um Motilitätsstörungen im Sinne eines POI hervorzurufen [Zittel et al. (1998)]. Gemeinsamkeit aller Methoden ist eine (Darm-) Manipulation unterschiedlichen Ausmaßes; die Darmmanipulation kann zur Induktion des POI als etabliert angesehen werden.

In dieser Arbeit erhielt die Kontrollgruppe eine reine Laparotomie (und nicht etwa nur eine Inhalationsnarkose oder Hautinzision). Zum einen war es so möglich, den Effekt der mechanischen Manipulation auf die intestinale Motilität separat zu untersuchen; zum anderen konnten auf diese Weise die Auswirkungen der isolierten Laparotomie in ihrem zeitlichen Verlauf genau untersucht werden.

Kalff et al. [Kalff, Schraut, et al. (1998)] beobachteten im selben Ileusmodell eine Korrelation zwischen der Infiltration der Tunica muscularis mit Entzündungszellen und der Hemmung der zirkulären Muskelkontraktibilität (*siehe Abb.56*).



**Abbildung 56. Korrelation zwischen Muskelkontraktibilität und Muscularisinfiltration.**

Man weiß heute, dass die Infiltration der Tunica muscularis mit Entzündungszellen eine wichtige Ursache für die Beeinträchtigung der Muskelfunktion beim POI ist. Die Ergebnisse von Kalff et al. beziehen sich allerdings auf einen Untersuchungszeitpunkt 24 Stunden nach Induktion des POI. Man muss davon ausgehen, dass zu diesem Zeitpunkt die pathophysiologischen Vorgänge sehr komplex sind und dass die unterschiedlichsten Faktoren an der Aufrechterhaltung der Störung beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit sollten sowohl die Motilität als auch die Entzündungsreaktion in der Darmwand zu einem früheren Zeitpunkt (eine Stunde, drei und neun Stunden postoperativ) untersucht werden; so sollte eruiert werden, ob der Effekt der Entzündungsreaktion auf die Motilität bereits kurz nach dem operativen Eingriff von Bedeutung ist, oder ob hier andere Mechanismen die führende Rolle spielen.

**In dieser Arbeit wurde die gastrointestinale Motilität *in vitro* anhand der physiologischen Schwankungen des intraluminalen Druckes im Darm (cmH<sub>2</sub>O) beurteilt.** Die Auswertung der Daten beruhte hier auf zwei unterschiedlichen Methoden. **Zum einen** wurde die mittlere Amplitude des intraluminalen Drucks (Peak) über einen Zeitraum von 200 Sekunden ermittelt. Als Alternativmethode wurde zudem die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) ermittelt und zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen verglichen (auch hier für einen Zeitraum von 200 Sekunden). **Zum anderen** wurde die Frequenz der physiologischen Druckschwankungen im Darm ermittelt, gemessen als Anzahl der Amplituden (Peaks) in einem Zeitraum von 200 Sekunden. Die untersuchten Darmsegmente wiesen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Motilität auf – sowohl beim Vergleich der einzelnen Kontrollgruppen bzw. Ileusgruppen untereinander als auch beim Vergleich der Kontrollgruppen mit den Ileusgruppen.

#### **4.2.1.1 Motilität der Kontrollgruppen**

Hinsichtlich Amplitude (Peak) und Fläche unter der Kurve (AUC) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kontrollgruppen (eine Stunde, drei und neun Stunden postoperativ) festzustellen. Im Gegensatz dazu nahm die Amplitudenzahl (Frequenz) im frühen zeitlichen Verlauf (3 Stunden vs. 1 Stunde) signifikant zu, blieb (9 Stunden) dann aber relativ konstant auf dem erreichten Niveau.

Es stellt sich nun die Frage, wie die gemessenen Werte (Peak, AUC, Amplitudenzahl) inhaltlich zu interpretieren sind. Die Höhe der Amplitude kann als Ausmaß bzw. Kraft der Darmkontraktion angesehen werden. Die Amplitudenzahl entspricht der Anzahl der Darmkontraktionen in 200 Sekunden, kann also gewissermaßen als Kontraktionsfrequenz betrachtet werden. Schwieriger verhält es sich mit der Fläche unter der Kurve; sie enthält Informationen über den generellen Druck im Darm, aber auch über Frequenz und Kraft der Darmkontraktionen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergänzen diejenigen von De Winter et al. [De Winter et al. (1997)] – bereits eine simple Laparotomie beeinflusst die Darmmotilität, und zwar schon kurz nach dem operativen Eingriff. Während der generelle Druck im Darm und auch die Kontraktionskraft stabil bleiben, steigt die Kontraktionsfrequenz bereits kurz nach dem Eingriff (drei Stunden) signifikant an, stabilisiert sich dann aber im weiteren Verlauf auf diesem Niveau. Der Organismus ist demnach in der Lage, die motile Funktion des Darmes nach einer gewissen Zeit (neun Stunden) zu stabilisieren, wenn sich die operative Manipulation (reine Laparotomie) in Grenzen hält.

#### 4.2.1.2 Motilität der Ileusgruppen

Bei der Analyse der 9h-Ileus-Gruppe fiel eine makroskopische Besonderheit auf; einige Dünndarmabschnitte waren dilatiert, andere Segmente hingegen wiesen ein normales bzw. eher enges Kaliber auf. Dabei befanden sich die dilatierten Abschnitte des Darmes proximal, die normalkalibrigen Anteile waren etwas weiter distal zu finden. **Eine derartige makroskopische Veränderung des Darmes wurde beim POI bislang nicht beobachtet.** Mehrere Arbeiten beschreiben den Darm beim POI als „dilatiert“ oder „schlaff“ [Kalff, Buchholz, et al. (1999); Kalff, Carlos, et al. (1999); Kreiss et al. (2003); Mueller et al. (2008)]; allerdings wurde in diesen Studien nicht die Frühphase des POI untersucht. Kreiss et al. berichten über eine signifikante Zunahme des Darmumfangs 24 Stunden nach mechanischer Manipulation [88]. Auch Müller et al. beobachten 24 Stunden nach Induktion des POI eine massive Dilatation des gesamten Dünndarms [Mueller et al. (2008)]. **Bislang wurde der Darm zu einem so frühen Zeitpunkt (ein bis neun Stunden) weder makroskopisch noch elektrophysiologisch untersucht.** Versucht man, eine Erklärung für dieses Nebeneinander von dilatierten und normal kalibrigen Darmabschnitten neun Stunden postoperativ zu finden, bietet es sich an, den zeitlichen Verlauf des POI näher zu betrachten. Während man bei den beiden frühen Untersuchungszeitpunkten dieser

Arbeit (eine Stunde bzw. drei Stunden postoperativ) relativ sicher davon ausgehen kann, dass es sich um die *frühe* Phase des POI handelt, könnte neun Stunden nach Induktion des POI bereits ein *Übergang* von der Früh- in die Spätphase stattfinden. Die Spätphase ist einerseits durch eine heftige Immunantwort mit Infiltration der Muscularis durch Entzündungszellen gekennzeichnet [Kalff, Buchholz, et al. (1999); Kalff, Carlos, et al. (1999)], andererseits ist die Dilatation des gesamten Dünndarms ein typisches Merkmal [Kreiss et al. (2003); Mueller et al. (2008)]. Eine Stunde nach der Ileus-auslösenden Operation ist weder das eine noch das andere Phänomen derart zu finden; die Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen befindet sich in einer initialen Phase, und der Darm weist noch einen relativ normalen bzw. engen Durchmesser auf. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen einer klinischen Studie überein, in der anhand von Barostat-Aufzeichnungen gezeigt werden konnte, dass der Dünndarm in den ersten Stunden nach einem abdominalchirurgischen Eingriff einen eher geringeren Durchmesser besitzt [Huge et al. (2000)]. Diese Interpretation der Datenlage würde auch mit der klinischen Erfahrung übereinstimmen, nach der einige Zeit vergehen muss, bis die betroffenen Patienten ein geblähtes Abdomen entwickeln. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass neun Stunden nach mechanischer Darmmanipulation gerade ein Übergang von der Frühphase in die Spätphase des POI stattfindet, so dass zu diesem Zeitpunkt beide Kaliberzustände des Darmes nachweisbar sind. Diese Annahme lässt sich weiter untermauern, wenn man die Veränderungen der Motilität (Peak, AUC und Frequenz) zwischen den verschiedenen Ileusgruppen (eine Stunde, drei und neun Stunden) genauer analysiert.

Betrachtet man die Kraft der einzelnen Darmkontraktionen (Amplitudenpeaks), so war kein Unterschied zwischen den einzelnen Ileusgruppen zu erkennen – die Amplituden waren hier durchgehend niedrig. Der Ileus-geschädigte Darm ist demnach bereits zu einem frühen Zeitpunkt (eine Stunde) nach dem operativen Eingriff nicht mehr in der Lage, kraftvoll zu kontrahieren.

Betrachtet man hingegen die Kontraktionsfrequenz, so lässt sich eine von der Bestehensdauer der Erkrankung abhängige Frequenzzunahme beobachten. Der Darm scheint demnach zu versuchen, die schwachen Kontraktionen durch eine höhere Anzahl an Kontraktionen wieder wett zu machen, um den Darminhalt doch noch in aboraler Richtung zu transportieren. An dieser Stelle ergibt sich eine weitere mögliche Erklärung für die beiden unterschiedlichen Kaliberzustände des Darmes

neun Stunden nach dem operativen Eingriff; ab einem gewissen Punkt ist es für den Dünndarm nicht mehr möglich, den Darminhalt weiter zu transportieren – nämlich wenn die erhöhte Frequenz die verminderte Kraft der Kontraktionen nicht mehr zu kompensieren vermag; es kommt zur Stase des Darminhalts in den proximalen Darmabschnitten und bewirkt deren Dilatation.

Komplex gestaltet sich die Interpretation der Ergebnisse zur Fläche unter der Kurve (AUC) bei den Ileusgruppen; wie bereits weiter oben erläutert beinhaltet sie Informationen sowohl zu Kontraktionskraft und Frequenz als auch zum generellen Druck im Darm. Die Fläche unter der Kurve nahm im zeitlichen Verlauf des POI immer mehr ab. Diese Abnahme ist an den Zahlenwerten deutlich erkennbar ( $AUC_{1h} = 350$  vs.  $AUC_{3h} = 235$  vs.  $AUC_{9h \text{ dilatiert}} = 13$ ;  $p$  jeweils  $> 0,05$ ), ist jedoch bis auf eine Ausnahme nicht signifikant: Bei den **eng gestellten Darmsegmenten** der 9h-Gruppe lag die AUC im negativen Bereich ( $AUC_{9h \text{ eng}} = -142$ ) und war im Vergleich zur 1h-Ileus-Gruppe ( $AUC_{1h} = 350$ ) **signifikant vermindert** ( $p = 0,001$ ); im Vergleich zur 3h-Ileus-Gruppe wurde die Signifikanz knapp nicht erreicht ( $AUC_{9h \text{ eng}} = -142$  vs.  $AUC_{3h} = 235$ ;  $p = 0,056$ ). Zum Teil erklären sich diese Ergebnisse der AUC sicher über die gesteigerte Frequenz bei gleichzeitig verringerter Kontraktionskraft. Zusätzlich ist jedoch auch von einem generell verminderten Druck in den eng gestellten Darmsegmenten auszugehen, der partiell sogar im negativen Bereich angesiedelt ist. Dies stimmt wiederum mit den Ergebnissen der oben bereits erwähnten klinischen Barostat-Studie überein, nach der in den ersten Stunden nach einem abdominalchirurgischen Eingriff der Dünndarm einen eher geringen Darmdurchmesser und intraluminalen Druck aufweist [Huge et al. (2000)].

Es bleibt nun noch zu klären, wie die negativen intraluminalen Drücke bei den eng gestellten 9h-Ileus-Darmsegmenten zustande kommen. Dies ist anhand der vorliegenden Daten nicht mit letzter Sicherheit zu eruieren; erste Erklärungsansätze ergeben sich, wenn man die physiologische Funktionsweise des Darms betrachtet. Die integrative Funktionsweise von Muskulatur und Nervensystem ermöglicht eine Vielzahl von Motilitätsmustern, die sämtlich als „Motorprogramme“ in einer Art „Programm-Bibliothek“ des ENS abgespeichert sind und die den Darminhalt vermischen und vorantreiben sollen; im Folgenden soll insbesondere auf die propulsive Motilität eingegangen werden. Der peristaltische Reflex beinhaltet als polysynaptischer Reflex des ENS sämtliche propulsive Motilitätsmuster, die in Dünndarm und Dickdarm zu finden sind. Man kann ihn als Analogie der spinalen Motorreflexe

(z.B. Patellar- und Achillessehnenreflex) im Gastrointestinaltrakt begreifen. Spinale Reflexe lassen sich durch Stimulation muskulärer Dehnungsrezeptoren (Muskelspindeln) oder kutaner Nozizeptoren auslösen; diese aktivieren spinale  $\alpha$ -Motoneurone, die wiederum die Kontraktion des jeweiligen Skelettmuskels bewirken (z.B. des M. quadriceps femoris beim Patellarsehnenreflex). *Monosynaptische* spinale Reflexe sind als Folge einer abrupten Aktivierung muskulärer Dehnungsrezeptoren zum Verständnis der komplexen neuronalen Kontrolle von Haltung und Bewegung nur von geringer Bedeutung. Bei *polysynaptischen* spinalen Reflexen hingegen folgt die *motorische* Antwort einer *sensorischen* Stimulation; in gewisser Weise ähnelt der peristaltische Reflex den polysynaptischen spinalen Reflexen, da hier auf einen spezifischen *sensorischen* Reiz hin (nämlich die Dehnung der Darmwand oder die Berührung der Mucosa) eine determinierte *motorische* Antwort erfolgt. Diese motorische Antwort geschieht jeweils in derselben Art und Weise, wann auch immer der Reflex aktiviert wird; der Reflex ist also gewissermaßen mit dem entsprechenden Stimulus fest verbunden („hardwired“). Beim peristaltischen Reflex bedeutet dies, dass unterhalb des applizierten Stimulus (1) eine Relaxation des Stratum circulare und zugleich (2) eine Kontraktion des Stratum longitudinale der Darmwand erfolgt; dies resultiert in einer propulsiven Darmbewegung in aboraler Richtung. Wie auch bei spinalen Reflexen befindet sich der peristaltische Reflex im hierarchischen Modell der neuronalen Kontrolle auf dem niedrigsten Level; das bedeutet, dass er jederzeit durch andere Motilitätsmuster verdrängt werden kann, wenn es für eine adäquate Funktionsweise des Gastrointestinaltraktes erforderlich ist. Wie bereits erwähnt ist das muskuläre Verhaltensmuster beim peristaltischen Reflex fest im Reflexzirkel verankert („hardwired“), es gibt also keine Variationen der Sequenzfolge Stratum-circulare-Relaxation / Stratum-longitudinale-Kontraktion. Im Gegensatz dazu kann die Stärke der einzelnen Reflexkomponenten (Relaxation bzw. Kontraktion) wie auch die Rate an Wiederholungen durch sensorische Feedback-Mechanismen variiert werden; dies gewährleistet, dass einerseits lokale Belastungen adäquat kompensiert werden, dass andererseits aber auch höhere funktionelle Anforderungen an den Gastrointestinaltrakt „als Ganzes“ erfüllt werden können. Die genaue Konfiguration der peristaltischen Propulsion wird durch polysynaptische peristaltische Regelkreise des ENS bestimmt, die exzitatorische und inhibitorische Motoneurone beider Muskelschichten (Stratum longitudinale und circulare) aktivieren. Im Rahmen der Propulsion *kontrahiert* sich das Stratum *longitudinale* distal des eintreffenden

Darminhalts in der Folge einer Aktivierung *exzitatorischer* Motoneurone. Gleichzeitig kommt es zu einer *Relaxation* des *Stratum circulare* aufgrund einer Aktivierung *inhibitorischer* Motoneurone. Geometrisch betrachtet entsprechen die Darmschlingen einer Art Zylinder [J. D. Wood and Perkins (1970)]; die Verkürzung der longitudinalen Achse des Zylinders im Rahmen einer Kontraktion führt zu einer Expansion des Darmlumens, die zusätzlich durch die Relaxation der zirkulären Muskulatur unterstützt wird. Auf diese Weise wird das distale, den Darminhalt erwartende Segment quasi auf diesen vorbereitet. Diese Vorbereitung des distalen Segments auf den Darminhalt ist die führende Komponente der propulsiven Peristaltik. Die zweite Komponente besteht in der eigentlichen Propulsion des Darminhalts. Hierbei kontrahiert sich die zirkuläre Muskulatur in dem Segment proximal des Darminhalts und treibt diesen voran – es formiert sich ein sogenanntes propulsives Segment. Wie sich die longitudinale Muskelschicht in diesem kontrahierten Darmsegment verhält, ist bislang nicht bekannt. Tatsache ist, dass es durch die sich kontrahierende starke zirkuläre Muskulatur zu einer Verkürzung des entsprechenden Darmsegments kommt, wodurch sich auch dessen Durchmesser verringert. Durch eine fehlerhafte Steuerung dieser Vorgänge könnte es zu den beobachteten Differenzen der 9h-Ileus-Darmsegmente (proximal dilatiert und distal eng gestellt) kommen. Der beobachtete negative Druck in den eng gestellten 9h-Ileus-Segmenten könnte gleichfalls durch eine Fehlregulation des peristaltischen Reflexes zustande kommen, beispielsweise durch Überlagerung der beiden Phasen (Segmentvorbereitung / Ausbildung des propulsiven Segments). Weitere Studien bleiben abzuwarten, um diese Phänomene letztlich verstehen zu können.

#### **4.2.1.3 Vergleich der Motilität zwischen Ileus- und Kontrollgruppen**

Wir wissen nun, dass bereits die alleinige Laparotomie die Darmmotilität beeinträchtigt. Wenn man die Ergebnisse der Kontrollgruppen (Laparotomie) mit denjenigen der Ileusgruppen (Laparotomie inklusive Darmmanipulation) vergleicht, kann man den Effekt der Darmmanipulation auf die Motilität isoliert betrachten.

Analysiert man die Kontraktionskraft des Ileus-geschädigten Darms (Peak), so war diese gegenüber der Kontrolle signifikant vermindert. Eine derartige Beeinträchtigung der Motilität war bereits eine Stunde nach dem operativen Eingriff zu beobachten und fand sich auch drei bzw. neun Stunden in ähnlicher Weise. Die Kontraktionskraft des Darmes wird durch dessen Manipulation demnach in kürzester Zeit kompromittiert.

Es stellt sich nun die Frage nach der Ursache dieser frühen Funktionsstörung. Kalff et al. [Kalff, Schraut, et al. (1998)] beobachteten 24 Stunden nach dem operativen Eingriff eine Korrelation zwischen der *Infiltration* der Tunica muscularis mit Entzündungszellen und der *Hemmung* der zirkulären Muskelkontraktibilität (*siehe Abb.56*). Man weiß heute, dass die Infiltration der Tunica muscularis mit Entzündungszellen eine wichtige Ursache für die Beeinträchtigung der Muskelfunktion beim POI darstellt. In der vorliegenden Arbeit war jedoch eine Stunde nach dem operativen Eingriff keine vermehrte Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen (im Vergleich zur Kontrolle) nachweisbar. In der initialen Frühphase des POI muss die intestinale Kontraktionskraft demnach durch andere Mechanismen kompromittiert werden. Hypothese dieser Arbeit war, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkt afferente Nervenfasern aktiviert werden, die über neurogene Reflexmechanismen die Hemmung der Motilität bewirken (*siehe genauer weiter unten*). Dies stünde mit den hier erhobenen Daten in Einklang, da eine Stunde postoperativ die Kontraktionskraft zwar bereits gemindert, zirkulierende Leukozyten jedoch noch nicht in signifikantem Ausmaß rekrutiert waren. Einschränkend bleibt zu bemerken, dass inflammatorische Ereignisse sehr wohl den Verlauf des POI (inklusive Motilitätsstörung) beeinflussen könnten, selbst wenn noch kein signifikantes Infiltrat der Tunica muscularis mit Entzündungszellen nachweisbar ist. Man weiß heute, dass zeitnah nach einem operativen Eingriff *residente* Makrophagen aktiviert werden [Kalff, Schwarz, et al. (1998)]; Kalff et al. konnten dies anhand der gesteigerten Expression des Makrophagen-Aktivierungsmarkers LFA-1 bereits 15 Minuten postoperativ nachweisen. Es ist deshalb durchaus möglich, dass bereits in der initialen Frühphase des POI proinflammatorische Mediatoren die Kontraktionskraft des Darmes negativ beeinflussen; diese Mediatoren müssten den residenten Immunzellen der Tunica muscularis entstammen, was in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht wurde.

#### **4.2.2 Afferente Nervenfaseraktivität**

##### **4.2.2.1 Ruhennervenfaseraktivität**

Vor Beginn der elektrophysiologischen Experimente (mechanische Distension und chemische Stimulation mit Bradykinin) wurde die spontane Aktivität der afferenten Nervenfasern (Ruhennervenfaseraktivität bzw. Baselineaktivität) registriert und analysiert.

#### 4.2.2.1.1 Ruhenervenfaseraktivität der Kontrollgruppen und der Ileusgruppen

Beim Vergleich der Kontrollgruppen untereinander zeigten sich nur minimale Unterschiede hinsichtlich der Baselineaktivität (7 vs. 5 vs. 6 impsec<sup>-1</sup>); ein ähnliches Ergebnis fand sich für die Ileusgruppen (9 vs. 13 vs. 9 impsec<sup>-1</sup>), p jeweils > 0,05.

Wie weiter oben bereits erläutert konnte nicht nur die Darmmanipulation, sondern auch die alleinige Laparotomie die Darmmotilität beeinflussen, und zwar schon kurz nach dem operativen Eingriff. Nichtsdestotrotz waren weder beim Vergleich der Kontroll- noch der Ileusgruppen untereinander signifikante Unterschiede der Baselineaktivität zu erkennen. Es stellt sich nun die Frage, wodurch diese Motilitätsstörungen verursacht wurden. Die zunehmende entzündliche *Infiltration* der Tunica muscularis war in der initialen Frühphase des POI unerheblich und kommt ursächlich nicht in Frage. In einem gewissen Maße könnte die *Aktivierung residenter Immunzellen* (beispielsweise Makrophagen) eine Rolle spielen, wie weiter oben bereits erläutert. Eine weitere mögliche Erklärung orientiert sich an der Hypothese der *neurogenen Frühphase* des POI. Man weiß heute, dass afferente Nervenfasern existieren, die unter physiologischen Bedingungen nicht aktiv sind – sogenannte „stille“ oder „schlafende“ Nozizeptoren [Bueno and Fioramonti (1999); Ness and Gebhart (1990)]. Man könnte vermuten, dass bei den **Kontrollgruppen** die zunehmende *Kontraktionsfrequenz* durch eine Sensibilisierung stiller Nozizeptoren zustande kommt. Gleichsam könnte die verminderte *Kontraktionskraft* und gesteigerte *Kontraktionsfrequenz* bei den **Ileusgruppen** durch die Rekrutierung ansonsten schlafender Nozizeptoren verursacht werden. Es ist bekannt, dass Entzündungsmediatoren diese Nozizeptoren aktivieren können [J. N. Wood and Docherty (1997)]. Im Rahmen der Entzündungsreaktion des POI kommt es zur Freisetzung diverser inflammatorischer Mediatoren, sowohl innerhalb kürzester Zeit durch die Aktivierung residenter Makrophagen als auch verzögert im Rahmen der Rekrutierung von Leukozyten (s.o.). Die freigesetzten Entzündungsmediatoren könnten eine Sensibilisierung stiller Nozizeptoren durchaus bewirken. Um dies für die Kontrollgruppe separat nachzuweisen, müsste man Ruhenervenfaseraktivität bzw. Motilität mit derjenigen eines vollständig unbehandelten Kontrolltieres (keine Laparotomie) vergleichen; derartige Versuche wie auch der Nachweis spezifischer Entzündungsmediatoren wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht durchgeführt bzw. erbracht, da das Hauptaugenmerk auf der spezifischen Wirkung der Darmmanipulation (im Vergleich zur reinen Laparotomie) und auf der Untersuchung

der neurogenen Mechanismen des POI lag. Die Ruhenervenfaseraktivität der Kontrollgruppe blieb unabhängig vom Zeitpunkt (eine Stunde, drei Stunden und neun Stunden postoperativ) relativ konstant; es ist somit sehr unwahrscheinlich, dass die Ruhenervenfaseraktivität selbst für die beobachteten Änderungen der Motilität (zunächst steigende [3h], dann stabile Kontraktionsfrequenz [9h]) verantwortlich ist. Vergleichbares gilt für die Ileus-Gruppen – bei relativ stabiler Baselineaktivität nahm die Kontraktionsfrequenz des Darmes zeitabhängig stetig zu. Die Aktivierung schlafender Nozizeptoren scheint somit für die Veränderungen der Kontraktionsfrequenz des Darmes von untergeordneter Bedeutung (zumindest für deren zeitlichen Verlauf), vorausgesetzt dass sich eine solche Nozizeptor-Rekrutierung zumindest in einer steigenden Ruhenervenfaseraktivität abbilden müsste.

Man muss davon ausgehen, dass bereits früh nach dem operativen Eingriff verschiedenste bislang weitgehend unbekannte Mechanismen die Kontraktionsfrequenz des Darmes beeinflussen; weitere Studien bleiben abzuwarten, um diese Phänomene hinreichend zu klären.

#### **4.2.2.1.2 Vergleich der Baselinaktivität zwischen Ileus- und Kontrollgruppen**

Anders verhalten sich die Ergebnisse, wenn man die Ileus- mit den Kontroll-Gruppen vergleicht.

**Bereits eine Stunde nach Manipulation war die Ruhenervenfaseraktivität der Ileus-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe signifikant gesteigert.** Ein ähnliches Ergebnis fand sich auch drei und neun Stunden postoperativ (unabhängig vom Darmdurchmesser).

Betrachtet man nun die intestinale Motilität und vergleicht diese zwischen den beiden experimentellen Gruppen, so ist die **Kontraktionskraft bei den Ileus-Gruppen eindrücklich gegenüber der Kontrolle vermindert.** Hier stellt sich nun erneut die Frage nach der Bedeutung **schlafender Nozizeptoren.** Wie bereits erwähnt, könnten diese durch inflammatorische Mediatoren bereits in der Frühphase des POI aktiviert werden. Durch ihre im Vergleich zur Kontrolle vermehrte Rekrutierung würde das Ruhenervensignal beim POI verstärkt (übereinstimmend mit den vorliegenden Daten). Auf diese Weise könnten über Reflexkreise vermehrt efferente inhibitorische Neurone aktiviert werden, die letztlich eine Minderung der Kontraktionskraft bewirken. Nicht zuletzt sind hier auch Veränderungen des zellulären Milieus zu

bedenken; möglicherweise kommt es durch die gesteigerte Baselinaktivität zu Veränderungen im Calciumhaushalt und auf diese Weise zu Muskelkontraktionen geringerer Amplitude. Interaktionen der genannten Mechanismen sind auch hier wahrscheinlich und bedürfen einer weiteren Untersuchung in Folgestudien.

#### 4.2.2.2 Nervenfaserveraktivität unter Stimulation

Nicht nur die Analyse der Ruhennervenfaserveraktivität gewährt Einblicke in die pathophysiologischen Vorgänge beim POI; auch die Untersuchung der Nervenfaserveraktivität unter Stimulation liefert Informationen zur neuronalen Kontrolle der Darmfunktion bei dieser Erkrankung. Als Stimuli wurden in der vorliegenden Arbeit einerseits der „Schmerzmediator“ **Bradykinin**, andererseits die mechanische **Distension** des Darmes eingesetzt.

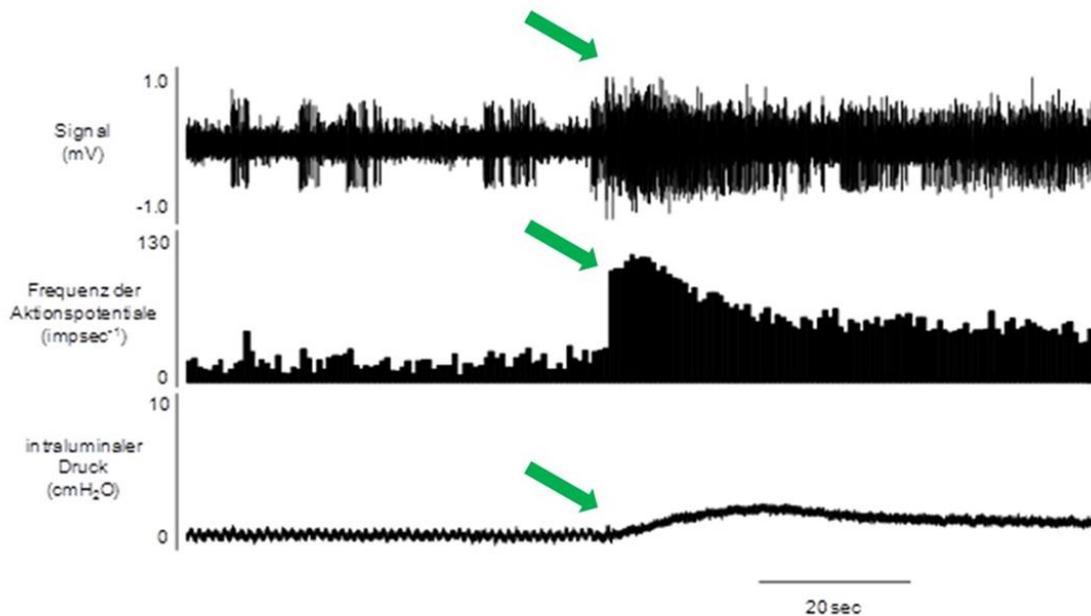
Durch ein standardisiertes **Rampendistensionsprotokoll** wird es möglich, die Mechanosensibilität afferenter Nerven abhängig vom jeweiligen Druckniveau im Darm zu untersuchen. Betrachtet man das Distensionsprotokoll genauer, so kann man grob zwischen einer Distension mit hohem (zwischen 50 und 80 cmH<sub>2</sub>O) und niedrigem intraluminalen Druck (zwischen 0 und 40 cmH<sub>2</sub>O) unterscheiden. Man weiß heute, dass bei niedrigem intraluminalen Druck (zwischen 0 und 40 cmH<sub>2</sub>O) vor allem *vagale* afferente Nervenfasern aktiviert werden [Booth et al. (2008)]. Müller et al. [Mueller et al. (2008)] konnten zeigen, dass beim POI 24 Stunden postoperativ die so genannte neuronale „low-threshold“ Komponente sensibilisiert wird; dies bedeutet, dass die afferente Nervenfaserveraktivität bei niedrigem intraluminalen Druck (zwischen 0 und 40 cmH<sub>2</sub>O) erhöht ist. Bei diesen mechanosensiblen „low-threshold“ Fasern handelt es sich demnach um *vagale* afferente Nervenfasern; diese Daten unterstützen das Konzept einer *vagalen* Sensibilisierung 24 Stunden nach Induktion des POI. Es stellt sich die nun Frage, wie diese *vagale* Sensibilisierung zustande kommt. Einerseits könnte es sich um einen direkten Effekt auf die Regulation der Erregbarkeit afferenter Nervenfasern handeln. Andererseits könnten auch die veränderte Wandspannung des Darms bzw. dessen Motilitätsstörung zur *vagalen* Sensibilisierung beitragen. Die zweite Erklärung ist jedoch eher unwahrscheinlich. Müller et al. konnten zeigen, dass die bei der Rampendistension erkennbare neuronale Sensibilisierung mit einer Hemmung der motorischen Aktivität einhergeht; während sich die Darmmotilität jedoch durch Gabe eines COX II-Hemmers (DFU)

zumindest teilweise erholen kann, bleibt die neuronale Sensibilisierung auch nach Gabe von DFU erhalten [Mueller et al. (2008)].

Im Gegensatz zum niedrigen Druckniveau (zwischen 0 und 40 cmH<sub>2</sub>O) werden bei höheren Drücken (> 50 cmH<sub>2</sub>O) hauptsächlich Nervenfasern aktiviert, die auf schmerzhaft stimuli (wie eben eine ausgeprägte Distension) reagieren [Booth et al. (2008)]. Hier handelt es sich nicht um Fasern des N. vagus, sondern um splanchnische Nervenfasern, die zum Rückenmark ziehen und hier weiter verschaltet werden (*spinale* Nervenfasern) [Booth et al. (2008)]. Bei diesen *spinalen* Fasern handelt es sich um Neurone, die bereits im Rückenmark (und nicht erst in Hirnstamm oder Gehirn) auf efferente inhibitorische Neurone umgeschaltet werden [Dunn and Rang (1990)]; in diesem Sinne bilden sie den afferenten Schenkel eines Reflexkreises, der (zumindest partiell) für die Hemmung der intestinalen Motilität beim POI verantwortlich ist [Spiller (2003)].

Neben der schmerzhaften Distension des Darmes auf hohem Druckniveau (> 50 cmH<sub>2</sub>O) existieren weitere Stimuli, durch die *spinale* Nervenfasern aktiviert / sensibilisiert werden können. Bradykinin aktiviert als sogenannter „Schmerzmediator“ ebenfalls *spinale* afferente Nervenfasern. Es ist demnach gleichfalls von Interesse, die afferente Nervenaktivität beim POI auch während der Stimulation mit Bradykinin zu untersuchen. Müller et al. konnten zeigen, dass beim POI 24 Stunden postoperativ afferente Nervenfasern auch gegenüber Bradykinin sensibilisiert sind [Mueller et al. (2008)]. **Bislang ist jedoch nicht bekannt, wie früh im Verlauf der Erkrankung diese Sensibilisierung stattfindet. In dieser Arbeit war es zum ersten Mal möglich, die Sensibilisierung afferenter Nervenfasern direkt mittels elektrophysiologischer Methoden nachzuweisen – und zwar bereits eine Stunde nach Induktion des POI (siehe genauer weiter unten).**

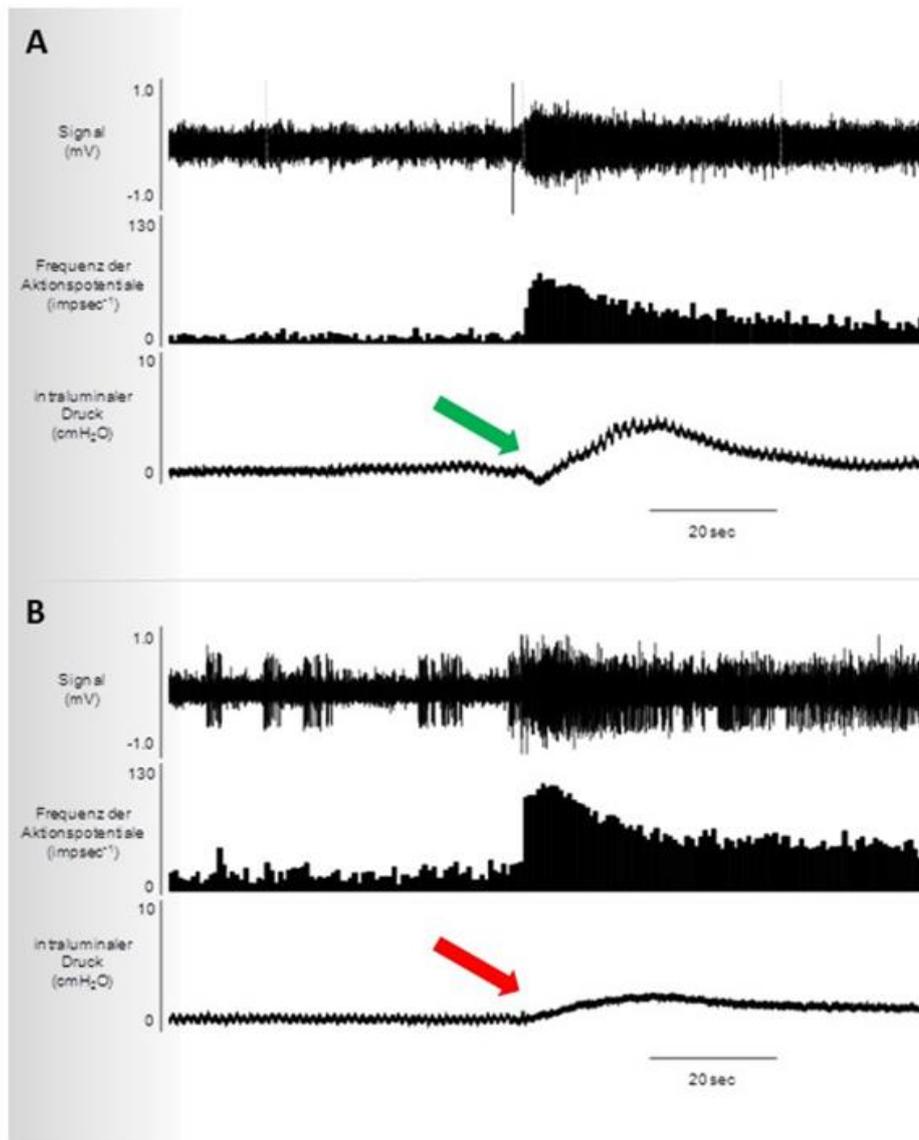
Einige Arbeiten berichten neben der Sensibilisierung splanchnischer bzw. *spinaler* Nervenfasern auch von der Aktivierung *vagaler* afferenter Nervenfasern durch Bradykinin [Brunsden and Grundy (1999)]. Man nimmt allerdings an, dass die Aktivierung *vagaler* mechanosensitiver Fasern durch sogenannte „motor events“ verursacht wird; hier handelt es sich um Bewegungen des Darms, die durch die Bradykininapplikation selbst ausgelöst werden [Brunsden and Grundy (1999)] (*siehe Abb.57*).



**Abbildung 57. Nervenfasersignal und Darmmotilität nach Bradykininapplikation.**

Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Bradykininapplikation. Im unteren Anteil der Grafik (Aufzeichnung des intraluminalen Drucks, cmH<sub>2</sub>O) lässt sich ein sog. „motor event“ erkennen, also Bewegungen des Darms, die durch die Bradykininapplikation selbst ausgelöst werden.

In dieser Arbeit konnten „motor events“ insbesondere für die Kontrollgruppen nachgewiesen werden (siehe **Abb.58**); allerdings wurde der für die Bradykininwirkung typische Anstieg des intraluminalen Drucks kurz nach der maximalen Nervenentladung beobachtet (siehe **Abb.59**). Die initial nach Bradykininapplikation beobachtete Nervenaktivität beinhaltet demnach nicht die Aktivität *vagaler* Fasern, die durch „motor events“ stimuliert wurden; vielmehr handelt es sich initial um Anteile *spinaler* Nervenfasern, die durch Bradykinin stimuliert wurden. Im weiteren Verlauf nach Bradykiningabe könnten „motor events“ für die Nervenfaserveraktivierung / -sensibilisierung allerdings freilich eine Rolle spielen (siehe **Abb.59**) – insbesondere bei den Kontrollgruppen.

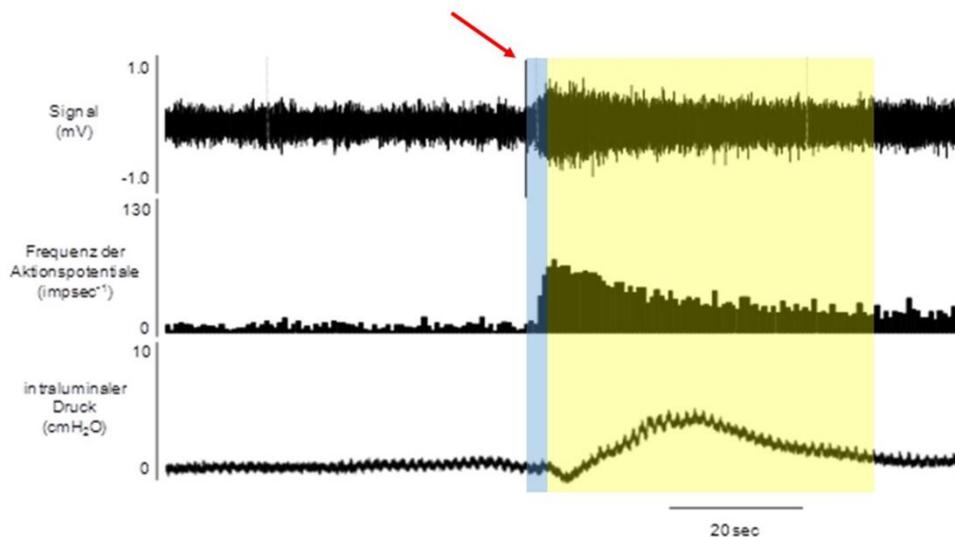


**Abbildung 58. Darmmotilität nach Bradykininapplikation bei Kontrolle und Ileus.**

**(A)** 3h-Kontroll-Gruppe mit deutlichem „motor event“ (grüner Pfeil). **(B)** 3h-Ileus-Gruppe mit weniger stark ausgeprägtem motor event (roter Pfeil); hier fehlt der intraluminale Druckabfall vollständig, und der nachfolgende Druckanstieg ist im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer ausgeprägt.

Bei den Ileusgruppen waren „motor events“ nach Bradykininstimulation bei generell eingeschränkter Motilität nur in abgeschwächter Form zu beobachten (*siehe Abb.58 und 60*). Hier fehlte der intraluminale Druckabfall vollständig, und der nachfolgende Druckanstieg war geringer ausgeprägt. Dennoch war auch bei den Ileusgruppen die Steigerung der afferenten Nervenaktivität nach Bradykiningabe zu beobachten, was

ebenfalls gegen eine signifikante Bedeutung der „motor events“ bzw. eine *vagale* Sensibilisierung nach Bradykininapplikation spricht.

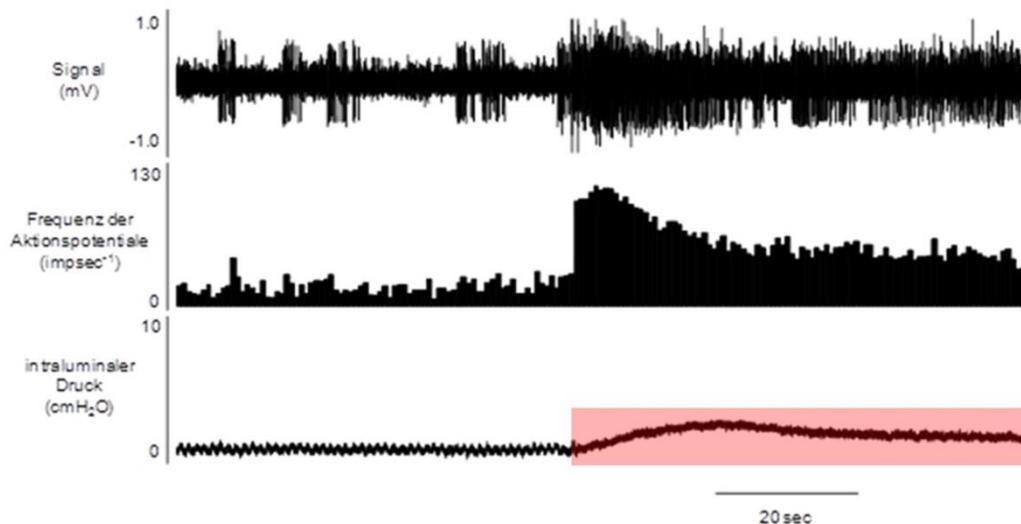


**Abbildung 59. Zeitlicher Zusammenhang Nervenfaser-signal und Motilität nach Bradykinin-gabe.**

Gut erkennbar ist das Injektionsartefakt (roter Pfeil), das durch die Applikation des Bradykinin mit der Pipette zustande kommt. Der für die Bradykininwirkung typische Anstieg des intraluminalen Drucks findet sich kurz nach der maximalen Nervenentladung. Die initial nach Bradykininapplikation beobachtete Nervenaktivität beinhaltet demnach nicht die Aktivität vagaler Fasern, die durch „motor events“ stimuliert wurden; vielmehr handelt es sich initial um Anteile splanchnischer und spinaler Nervenfasern, die durch Bradykinin stimuliert wurden.

- Latenz zwischen Bradykininapplikation und maximaler Nervenentladung; beachte, dass in diesem Zeitabschnitt noch kein „motor event“ zu erkennen ist.
- Veränderungen während / nach Initiierung des „motor events“.

Bislang ist nicht bekannt, in welchem Maße *vagale* bzw. *spinale* Fasern in der Frühphase des POI sensibilisiert werden. Dies sollte in dieser Dissertation untersucht werden; hierbei diene die **Distension** der Untersuchung sowohl *vagaler* (bei niedrigem Druckniveau < 50 cmH<sub>2</sub>O) als auch *spinaler* (bei hohem Druckniveau > 50 cmH<sub>2</sub>O) Nervenfasern [Booth et al. (2008), Mueller et al. (2008)]. Die Stimulation mit **Bradykinin** hingegen ließ insbesondere Rückschlüsse auf die Aktivierung *spinaler* Fasern zu [Booth et al. (2001)].



**Abbildung 60.** „Motor event“ eines Ileus-geschädigten Darmabschnitts.

3h-Ileus-Gruppe mit wenig stark ausgeprägtem motor event (rot markiertes Areal); hier fehlt der intraluminale Druckabfall vollständig, und der nachfolgende Druckanstieg ist relativ gering ausgeprägt.

#### 4.2.2.2.1 Distension

Über alle experimentellen Gruppen hinweg bewirkte die mechanische Distension einen vom intraluminalen Druck abhängigen Anstieg der afferenten Nervenfasernaktivität. Diese gesteigerte Nervenfasernaktivität fand sich sowohl bei Darmsegmenten von Ileustieren als auch bei Kontrollexperimenten.

Um die spezifische Wirkung von Laparotomie und Darmmanipulation zu untersuchen, wurden auch hier zunächst die Kontroll- und Ileusgruppen separat voneinander betrachtet; erst im Anschluss erfolgte der Vergleich zwischen Ileus und Kontrolle.

##### 4.2.2.2.1.1 Afferente Nervenfasernaktivität der Kontrollgruppen bei Distension

Bereits beim Vergleich der einzelnen Kontrollgruppen (1h-Kontrolle, 3h-Kontrolle und 9h-Kontrolle) ergaben sich Unterschiede hinsichtlich der afferenten Nervenfasernaktivität, jeweils abhängig vom Druckniveau.

Bei einem Druck von  $< 10$  cmH<sub>2</sub>O unterschied sich die afferente Nervenfasernaktivität nicht signifikant zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Ab einem Druckniveau  $> 10$  cmH<sub>2</sub>O war die afferente Nervenfasernaktivität **drei Stunden** nach der Scheinoperation *tendenziell* und **neun Stunden** postoperativ *signifikant* erhöht.

Die reine Laparotomie ist demnach in der Lage, Mechanismen in Gang zu setzen, die eine Sensibilisierung afferenter Nerven gegenüber mechanischer Distension bewirken. Es scheint allerdings einige Zeit (neun Stunden) vergehen zu müssen, bis diese Mechanismen in signifikantem Ausmaß zum Tragen kommen. Betrachtet man die Ergebnisse genauer, so kann man vermuten, dass vagale und spinale Nervenfasern gleichermaßen sensibilisiert werden – sowohl auf einem Druckniveau  $< 50 \text{ cmH}_2\text{O}$  (genauer  $> 10$  und  $< 50 \text{ cmH}_2\text{O}$ ) als auch  $> 50 \text{ cmH}_2\text{O}$  ist die afferente Nervenfasernaktivität signifikant gesteigert.

Es stellt sich nun die Frage, wie es zu dieser Sensibilisierung kommt. Betrachten wir zunächst die Sensibilisierung der **vagalen** afferenten Nervenfasern. Weiter oben wurden bereits mögliche Mechanismen erläutert, durch die eine Sensibilisierung vagaler Nervenfasern denkbar ist. **(1)** Der Effekt der veränderten **Wandspannung** des Darms kann in diesem Fall nur von untergeordneter Bedeutung sein. Zwischen den einzelnen Kontrollgruppen lassen sich (zumindest mit dem bloßen Auge) keine signifikanten Unterschiede der Komponenten des Laplace-Gesetzes (transmuraler Druck, Radius und Wanddicke; *siehe genauer weiter unten*) ausmachen. **(2)** In Frage käme noch die **Motilitätsstörung** des Darmes, die zu einer Sensibilisierung vagaler afferenter Nervenfasern führen könnte. Betrachtet man die Motilität der einzelnen Kontrollgruppen, so findet sich jedoch keine signifikante Zunahme der Kontraktionsfrequenz der 9h-Gruppe gegenüber der 3h-Gruppe. Die Motilitätsstörung des Darmes kommt demnach ebenfalls nicht als zentraler Sensibilisierungsmechanismus in Frage. **(3)** Vagale afferente Nervenfasern könnten durch zirkulierende **Katecholamine** sensibilisiert werden, wie man es für die Lunge kennt [Gu, Lin, and Lee (2007); Miyashita and Williams (2006)]. Es existieren bislang allerdings keine Daten zur Frühphase des POI, die eine Sensibilisierung autonomer afferenter Nervenfasern durch zirkulierende Katecholamine nachweisen konnten. **(4)** Man geht heute von einer Interaktion neuronaler und inflammatorischer Mechanismen bei der Pathogenese des POI aus. **Inflammatorische Mechanismen** spielen auch nach reiner Laparotomie eine Rolle, wie die signifikant gesteigerte Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen neun Stunden postoperativ zeigt (*siehe genauer weiter unten*). Inflammatorische Mediatoren wie beispielsweise Histamin besitzen das Potential, intestinale vagale Afferenzen zu sensibilisieren [Jiang et al. (2000)] und werden im späteren Verlauf

des POI vermehrt ausgeschüttet [Kalff, Buchholz, et al. (1999); Kalff, Carlos, et al. (1999)]. Für die reine Laparotomie wurden neun Stunden postoperativ die Histaminlevel im Blut noch nicht untersucht; eine inflammatorisch bedingte Sensibilisierung vagaler Afferenzen kann demnach bislang nur hypothetisch angenommen werden.

An dieser Stelle bietet es sich an, den Nutzen einer afferenten vagalen Aktivierung abzuwägen. Kürzlich erschienene Studien konnten zeigen, dass eine intakte vagale Innervation des Magen-Darm-Traktes *anti-inflammatorisch* wirkt [H. Wang et al. (2004); Tracey (2002)]. Aus diesem Grunde wurde für diesen Signalweg auch die Bezeichnung „cholinergic antiinflammatory pathway“ etabliert [Tracey (2002); The et al. (2007)]. Es scheint so, dass der Nervus vagus eine regulierende Funktion einnimmt, indem er die intestinale Entzündungsreaktion begrenzt und ein massives Überwiegen entzündlicher Faktoren limitiert [Kreiss et al. (2003); Nadelhaft et al. (1986)].

Wenden wir uns nun denjenigen Mechanismen zu, die **spinale** afferente Nervenfasern gegenüber einem Distensionsreiz sensibilisieren könnten. **(1)** Eine Möglichkeit könnte wiederum (wie schon für vagale afferente Nervenfasern) in der Wirkung zirkulierender **Katecholamine** bestehen; Katecholamine sind sowohl in der Lage, die intestinale Motilität zu hemmen [Condon et al. (1986); Esser, Mahoney, Robinson, Cowles, and Condon (1987); Hallerback et al. (1987)] als auch die afferente neuronale Reizempfindlichkeit zu erhöhen [X. Chen and Levine (2005)]. Wie oben bereits erwähnt existieren bislang keine Daten zur Frühphase des POI, die eine Sensibilisierung autonomer afferenter Nervenfasern durch zirkulierende Katecholamine nachweisen konnten – dieser Mechanismus bleibt insofern derzeit hypothetisch. **(2) Inflammatorische Mechanismen** könnten auch bei der Sensibilisierung *spinaler* Nervenfasern eine Rolle spielen. Neun Stunden nach der Scheinoperation findet sich bereits eine signifikante Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen. Unter diesen MPO-positiven Zellen befinden sich auch neutrophile Granulozyten, die in der Lage sind, eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren freizusetzen. De Jonge et al. konnten zudem zeigen, dass die *mechanische Manipulation* des Darmes zu einer Degranulation von Mastzellen und konsekutiv zur Freisetzung z.B. von Prostanoiden führt [de Jonge et al. (2004)]. Wie bereits erwähnt können Prostanoiden *spinale* afferente Nervenfasern

gegenüber spezifischen Stimuli sensibilisieren [Brunsdon and Grundy (1999); The et al. (2008); Seeling, Heinrich, and Oettinger (1986)]. In der Studie von De Jonge et al. führte (neben der mechanischen Darmmanipulation) auch die Laparotomie selbst zu einer gewissen Mastzelldegranulation – allerdings in geringerem Ausmaß [de Jonge et al. (2004)]. Es ist dennoch denkbar, dass auch nach alleiniger Laparotomie inflammatorische Mechanismen die Sensibilisierung *spinaler* Nervenfasern begünstigen.

#### 4.2.2.2.1.2 Afferente Nervenfasernaktivität der Ileusgruppen bei Distension

Um die Veränderungen der afferenten Entladungsfrequenz während mechanischer Distension im zeitlichen Verlauf des POI zu untersuchen, wurden die einzelnen Ileus-Gruppen (1h-Ileus, 3h-Ileus und 9h-Ileus) miteinander verglichen; hierbei wurde wiederum zwischen den dilatierten und eng gestellten Darmabschnitten der 9h-Ileus-Gruppe differenziert.

Auf niedrigem Druckniveau ( $< 20 \text{ cmH}_2\text{O}$ ) unterschieden sich all diese Gruppen nicht signifikant. Ab einem Druckniveau  $> 20 \text{ cmH}_2\text{O}$  jedoch war die afferente Entladungsfrequenz der *dilatierten* Darmsegmente der 9h-Ileus-Gruppe signifikant gegenüber der 3h-Ileus-Gruppe gesteigert. Für die *eng gestellten* Darmabschnitte der 9h-Ileus-Gruppe ließ sich eine solche Aktivitätssteigerung nicht nachvollziehen.

Die Laparotomie inklusive Darmmanipulation setzt demnach ebenfalls Mechanismen in Gang, die eine Sensibilisierung afferenter Nerven gegenüber mechanischer Distension bewirken. Auch hier scheint einige Zeit (neun Stunden) vergehen zu müssen, bis diese Mechanismen in signifikantem Ausmaß zum Tragen kommen. Genau wie bereits beim Vergleich der Kontrollgruppen werden *vagale* und *spinale* Nervenfasern gleichermaßen sensibilisiert – beginnend ab einem intraluminalen Druck  $> 20 \text{ cmH}_2\text{O}$ .

Man kann beim POI ähnliche Sensibilisierungsmechanismen vermuten wie bereits bei den Kontrollgruppen beschrieben (*siehe oben*). Es stellt sich nun allerdings die Frage, weshalb diese Sensibilisierung im Verlauf des POI nur bei den *dilatierten* Darmabschnitten derart nachzuweisen ist. Hier lässt sich vermuten, dass ein weiterer Mechanismus hinzukommt, der mit Hilfe des Laplace-Gesetzes (Zusammenhang zwischen Wandspannung, transmuralen Druck, Radius und Wanddicke) erklärt werden kann. Hierauf wird *im folgenden Abschnitt* ausführlich eingegangen.

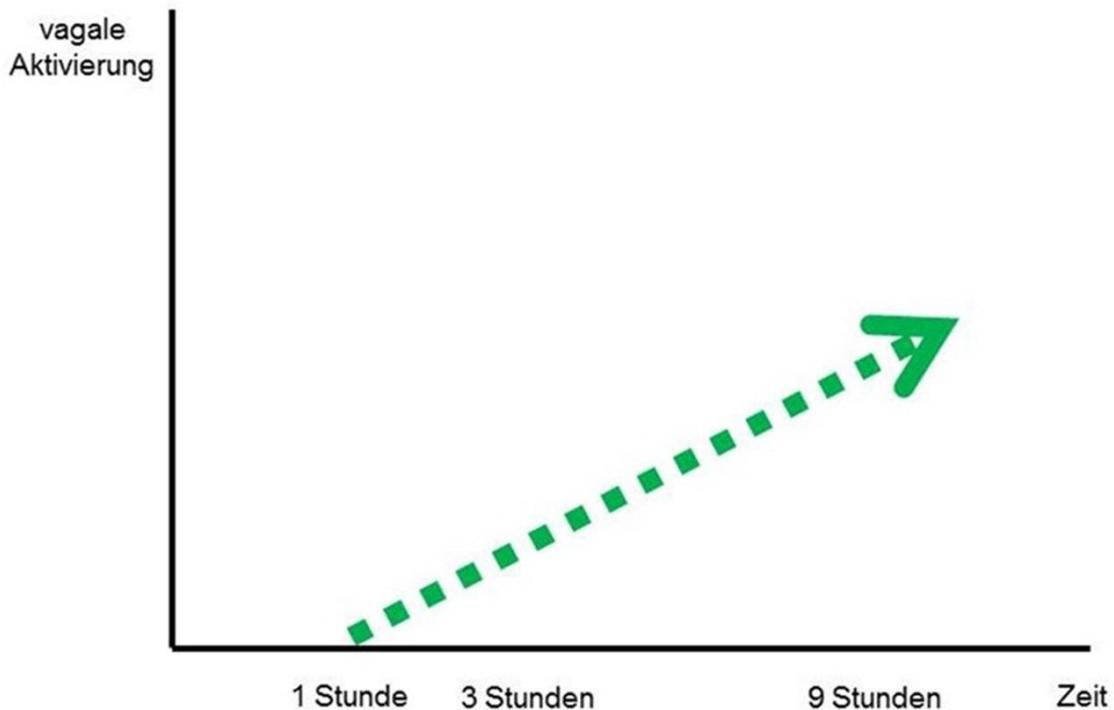
#### 4.2.2.2.1.3 Distension: Ileus vs. Kontrolle

In dieser Arbeit lag ein besonderes Augenmerk auf der spezifischen Wirkung der Darmmanipulation auf die Nervenfaseraktivität; diese lässt sich durch den direkten Vergleich der Kontroll- mit den Ileus-Gruppen quantifizieren.

Bei *niedrigem Druckniveau* zeigten sich keine Unterschiede zwischen Ileus- und Kontroll-Gruppen. Signifikante Unterschiede ergaben sich erst bei *höherem intraluminalen Druck*. Gegenüber der 1h-Kontroll-Gruppe war bei der 1h-Ileus-Gruppe die afferente Entladungsfrequenz ab einem intraluminalen Druck  $> 50 \text{ cmH}_2\text{O}$  signifikant gesteigert. Ähnliches findet sich auch drei Stunden postoperativ (ab  $> 30 \text{ cmH}_2\text{O}$ ). Die normalkalibrigen und dilatierten Darmsegmente der 9h-Ileus-Gruppe wurden getrennt mit der entsprechenden Kontroll-Gruppe verglichen; bei *normalkalibrigen* Darmsegmenten war die Nervenfaseraktivität ab einem intraluminalen Druck  $> 50 \text{ cmH}_2\text{O}$  signifikant reduziert. Ganz das Gegenteil fand sich für die *dilatierten* Darmabschnitte – hier war die Nervenfaseraktivität ab einem intraluminalen Druck  $> 40 \text{ cmH}_2\text{O}$  signifikant gesteigert.

Im Gegensatz zur Distension auf hohem Druckniveau werden bei geringerem intraluminalen Druck ( $< 50 \text{ cmH}_2\text{O}$ ) vor allem *vagale* afferente Bahnen [Booth et al. (2008)] aktiviert. Eine Stunde postoperativ finden sich bei niedrigem Druck ( $< 50 \text{ cmH}_2\text{O}$ ) keine signifikanten Unterschiede zwischen Ileus und Kontrolle – durch die Darmmanipulation werden demnach unmittelbar postoperativ vagale Fasern nicht in signifikantem Ausmaß sensibilisiert. Drei und neun Stunden postoperativ ändert sich dies; hier werden nach der Darmmanipulation vagale Fasern zumindest partiell vermehrt aktiviert, nämlich ab  $30 \text{ cmH}_2\text{O}$  (drei Stunden) bzw.  $40 \text{ cmH}_2\text{O}$  (neun Stunden, dilatierte Darmsegmente). Bemerkenswert ist zudem, dass bei den eng gestellten Darmabschnitten neun Stunden postoperativ keine signifikante Aktivierung vagaler Nervenfasern stattgefunden hat. Dies lässt bereits vermuten, dass der Durchmesser des Darmes für die Sensibilisierung von Nervenfasern eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt. Studien, die einen späteren Zeitpunkt des POI untersuchten (beispielsweise 24 Stunden postoperativ), beschreiben einen Anstieg der afferenten Sensibilität gegenüber mechanischer Distension vor allem auf niedrigem, vagal vermitteltem Druckniveau [Mueller et al. (2008)]. Zu diesem Zeitpunkt ist auch der Darmumfang signifikant vermehrt [Kreiss et al. (2003); Mueller et al. (2008)]. Zusammenfassend kann man sagen, dass im zeitlichen Verlauf nach der Darmmanipulation vagale Fasern zunehmend (jedoch nicht unmittelbar)

sensibilisiert werden (siehe **Abb.61**), und dass hierbei möglicherweise der Darmumfang eine Rolle spielt.



**Abbildung 61. Vagale Aktivierung im zeitlichen Verlauf postoperativ.**

Dennoch ist die Motilität des Darmes bereits eine Stunde nach Darmmanipulation deutlich beeinträchtigt. Auf der Suche nach weiteren neurogenen Ursachen für diese Funktionseinschränkung ist es hilfreich, die Aktivität / Sensibilität der *spinalen* Nervenfasern zu analysieren. Dies wird anhand der Distension auf hohem Druckniveau ( $> 50 \text{ cmH}_2\text{O}$ ; oder auch durch Bradykininapplikation) möglich.

Wir wissen bereits, dass durch die Laparotomie allein vagale und spinale afferente Nervenfasern gleichermaßen sensibilisiert werden, wenn eine gewisse Zeit (neun Stunden) nach dem operativen Eingriff vergangen ist. Analysiert man nun den spezifischen Effekt der Darmmanipulation im Vergleich zur alleinigen Laparotomie, so erkennt man, dass hierdurch **(1)** hauptsächlich **spinale** Nervenfasern sensibilisiert werden und dass **(2)** diese **spinale** Sensibilisierung **bereits eine Stunde nach Induktion des POI** nachweisbar ist. Zu jedem hier untersuchten Zeitpunkt war die spinale afferente Nervenfasernaktivität (Druckniveau  $> 50 \text{ cmH}_2\text{O}$ ) beim POI gegenüber der Kontrolle erhöht – mit Ausnahme der eng gestellten 9h-Ileus

Segmente. Hier war die afferente spinale Nervenfaseraktivität im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert. Es stellt sich nun die Frage, wie diese verminderte Nervenfaseraktivität der eng gestellten Darmsegmente zustande kommt.

Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Schmerzwahrnehmung in der Folge einer Darmdistension und der dabei entstehenden Wandspannung [Petersen, Gao, Arendt-Nielsen, Gregersen, and Drewes (2003)]. Betrachtet man die Schmerzwahrnehmung als Funktion der neuronalen Entladungsfrequenz, dann hängt die afferente Nervenfaseraktivität von der jeweils vorherrschenden Wandspannung ab. An dieser Stelle bietet es sich an, auf das Gesetz von Laplace zurückzugreifen (*wie weiter oben bereits angedeutet*). Es gilt für Kraftverhältnisse in der Wand von Kugeln und kann näherungsweise auch für eine zylindrische Struktur wie den Darm angenommen werden. Hierbei stellt Laplace folgende Beziehung her:

$$K = P r / 2d$$

**K** bezeichnet die auftretende Wandspannung und **P** den transmuralen Druck, **r** steht für den gemessenen Radius und **d** für die Wanddicke. Das Gesetz findet üblicherweise innerhalb der Physiologie des Herz-Kreislauf-Systems seine Anwendung. Auf den Darm bezogen ergibt sich bei vorgegebenem Druck und unveränderter Wanddicke eine geringere Wandspannung, wenn es sich um einen Darmabschnitt mit geringerem Durchmesser handelt; entsprechend findet sich bei höherem Diameter eine höhere Wandspannung. Dies lässt sich auf die oben dargestellten Ergebnisse anwenden – bei einem Spitzendruck von 80 cmH<sub>2</sub>O wird die Wandspannung eines dilatierten Darmsegments höher sein als bei einem Darmabschnitt mit geringerem Durchmesser. Wenn man nun annimmt, dass die Wandspannung des Darms direkt proportional zur Entladungsfrequenz der afferenten Nervenentladungsfrequenz ist, dann könnte dies die vorliegenden Ergebnisse erklären. Die biomechanischen Veränderungen der Darmwand würden demnach beim POI eine Aktivierung / Sensibilisierung afferenter spinaler Nervenfasern (bei dilatierten Darmsegmenten) bzw. deren Desensibilisierung (bei eng gestellten Darmabschnitten) bewirken. Nichtsdestotrotz bleibt diese Interpretation der Datenlage spekulativ; weitere wissenschaftliche Studien sind unabdingbar, um diese Hypothese zu untermauern.

Neben dieser biomechanischen Erklärung können auch inflammatorische Prozesse in der Darmwand zur Ergebnisinterpretation herangezogen werden. Müller et al. konnten 24 Stunden nach Induktion des POI nicht nur eine massive Dilatation des gesamten Dünndarms, sondern auch eine ausgeprägte Infiltration der Tunica muscularis mit neutrophilen Granulozyten feststellen [Mueller et al. (2008)]. Wie bereits erwähnt, sind diese in der Lage, eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren (beispielsweise Prostanoiden) freizusetzen. Diese wiederum können afferente Nervenfasern sensibilisieren – beispielsweise gegenüber Stimuli wie Bradykinin oder mechanischer Distension auf hohem Druckniveau [Brunsdon and Grundy (1999); The et al. (2008); Seeling et al. (1986)]. Die von Müller et al. berichtete Steigerung der afferenten Nervenfasernaktivität nach Bradykininapplikation oder mechanischer Distension könnte somit durch die Freisetzung von Prostanoiden bedingt sein [Mueller et al. (2008)]. Es stellt sich nun die Frage, ob ein ähnlicher Mechanismus bereits neun Stunden nach Induktion des POI zum Tragen kommt. Die immunhistochemischen Färbungen des Darms zeigten ein gleichmäßiges Infiltrat der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen, unabhängig davon, ob es sich um ein dilatiertes oder eng gestelltes 9h-Ileus-Darmsegment handelte. Allein durch die *Anzahl* der Entzündungszellen in der Tunica muscularis können die Unterschiede der Nervenfasernaktivität (gesteigert vs. vermindert) nicht erklärt werden. Dass die Entzündungsreaktion für die Sensibilisierung afferenter Nervenfasern allerdings dennoch von Bedeutung sein könnte, zeigen die Ergebnisse zur Bradykininstimulation.

#### **4.2.2.2 Bradykinin**

Wie *weiter oben* bereits erläutert, kann man im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von Bradykinin als eine direkte Sensibilisierung der *spinalen* afferenten Nervenfasern interpretieren. Über alle experimentellen Gruppen hinweg bewirkte die Bradykininapplikation einen abrupten Anstieg der afferenten Nervenfasernaktivität – sowohl bei Darmsegmenten von Ileustieren als auch bei Kontrollexperimenten.

Um die spezifische Wirkung der alleinigen Laparotomie sowie der zusätzlichen Darmmanipulation zu untersuchen, wurden auch hier zunächst die Kontroll- und Ileusgruppen separat voneinander betrachtet; im Anschluss erfolgte der Vergleich zwischen Ileus und Kontrolle.

#### 4.2.2.2.1 Bradykininstimulation der Kontrollgruppen

Beim Vergleich der afferenten Nervenfasernaktivität in Reaktion auf Bradykinin ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der 1h- und der 3h-Kontroll-Gruppe. Anders verhielt es sich beim Vergleich der 9h- mit der 3h-Kontroll-Gruppe; die afferente Nervenfasernaktivität nach Bradykiningabe war für die 9h-Kontroll-Gruppe signifikant gesteigert.

Die reine Laparotomie ist demnach in der Lage, Mechanismen in Gang zu setzen, die eine Sensibilisierung afferenter Nerven gegenüber Bradykinin bewirken. Es scheint allerdings auch hier einige Zeit (neun Stunden) vergehen zu müssen, bis diese Mechanismen in signifikantem Ausmaß zum Tragen kommen.

#### 4.2.2.2.2 Bradykininstimulation der Ileusgruppen

Die Reaktion der afferenten Nervenfasernaktivität auf Bradykinin unterschied sich partiell auch zwischen den einzelnen Ileus-Gruppen (1h-Ileus-Gruppe, 3h-Ileus-Gruppe und 9h-Ileus-Gruppe). Auch hier wurde wieder zwischen den beiden morphologisch unterschiedlichen Darmabschnitten der 9h-Ileus-Gruppe (dilatiert vs. eng gestellt) differenziert. Im Vergleich zur 1h-Ileus-Gruppe war die Reaktion auf Bradykinin bei der 3h-Ileus-Gruppe signifikant gesteigert. Gleiches ergab sich für die 9h-Ileus-Gruppe im Vergleich zur 1h-Ileus-Gruppe, und zwar unabhängig davon, ob es sich um dilatierte oder eng gestellte Darmabschnitte handelte. Im Vergleich zur 3h-Ileus-Gruppe war die Nervenfasernaktivität der 9h-Ileus-Gruppe nicht signifikant gesteigert (jeweils unabhängig vom Darmdurchmesser).

Man weiß heute, dass die Reaktion afferenter *spinaler* Nervenfasern auf Bradykinin in Anwesenheit von Prostanoiden (Prostaglandine, Prostacyclin und Thromboxane) gesteigert ist [Maubach and Grundy (1999); Gebhart (2000b); Gebhart (2000a)]. *In vitro* Studien konnten Prostaglandin E<sub>2</sub> als Substanz identifizieren, durch die afferente *spinale* Nervenfasern gegenüber Bradykinin sensibilisiert werden [Brunsdon and Grundy (1999)]. Hemmt man die Prostaglandinsynthese durch den nicht-selektiven COX I- / COX II-Inhibitor Naproxen, wird die afferente Reizantwort auf Bradykinin abgeschwächt. Beim POI im Speziellen ist die Bradykinin-Sensibilisierung der afferenten *spinalen* Nervenfasern abhängig von der Cyclooxygenase II (COX II); Müller et al. konnten zeigen, dass durch den COX II-Hemmer DFU die afferente Nervenaktivität nach Bradykininapplikation wieder auf das Niveau der Kontrolle absinkt [Mueller et al. (2008)]. Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass

die afferente Reizantwort auf Bradykinin von dem Vorhandensein körpereigener Prostaglandine abhängig ist [Maubach and Grundy (1999)]. Es ist nun denkbar, dass es beim POI zu unphysiologisch hohen Prostaglandinkonzentrationen kommt und die afferenten *spinalen* Nervenfasern gegenüber Bradykinin sensibilisiert werden. Dies würde erklären, warum die Nervenfaseraktivität nach Bradykiningabe beim POI 24 Stunden postoperativ erhöht ist und warum der von Müller et al. eingesetzte COX II-Hemmer DFU diese auf ein physiologisches Niveau senken konnte [Mueller et al. (2008)].

#### **4.2.2.2.3 Bradykininstimulation: Ileus vs. Kontrolle**

Im Vergleich zur entsprechenden 1h- bzw. 3h-Kontroll-Gruppe war die afferente Nervenfaseraktivität nach Bradykiningabe bei der 1h- bzw. 3h-Ileus-Gruppe signifikant erhöht. Das gleiche Ergebnis lieferte auch der Vergleich der 9h-Ileus-Gruppe mit der entsprechenden Kontrolle, und zwar unabhängig davon, ob es sich um dilatierte oder eng gestellte Darmsegmente handelte.

Da sowohl in distendierten als auch in nicht distendierten Darmabschnitten eine Infiltration der Muscularis mit Entzündungszellen nachzuweisen war, könnte die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren bei der neuronalen Sensibilisierung durchaus eine Rolle spielen. Diese Annahme wird auch durch anatomische Gegebenheiten unterstützt; ein Teil der residenten Makrophagen befindet sich direkt angrenzend an Blutgefäße der Tunica muscularis [Kalff, Schwarz, et al. (1998)]. Werden die Makrophagen aktiviert, gelangen die von ihnen freigesetzten Zytokine über den Blutweg an andere Orte und können dort zeitnah ihre Wirkung entfalten. Diese Interpretation der Datenlage ist freilich hypothetisch – weitere Studien bleiben abzuwarten. **Wahrscheinlich sind beide Mechanismen an der Sensibilisierung afferenter *spinaler* Nervenfasern beteiligt – sowohl proinflammatorische Mediatoren als auch Veränderungen der Wandspannung des Darms.**

### **4.2.3 MPO-positive Zellen**

#### **4.2.3.1 Vergleich der MPO-positiven Zellen innerhalb der Kontroll-Gruppe**

Beim Vergleich der einzelnen Kontroll-Gruppen (1h-Kontroll-Gruppe, 3h-Kontroll-Gruppe, 9h-Kontroll-Gruppe) zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen. Bereits drei Stunden nach der Scheinoperation war die Anzahl der MPO-positiven Entzündungszellen signifikant

gegenüber der 1h-Kontrolle erhöht. Im weiteren Verlauf (neun Stunden) nach dem operativen Eingriff blieb die Anzahl der Entzündungszellen jedoch konstant.

Die Laparotomie allein reicht demnach aus, die Rekrutierung MPO-positiver Entzündungszellen zu initiieren. Es scheint sich hier jedoch nicht um einen Reiz zu handeln, der als „point of no return“ zu einer immer weiter zunehmenden entzündlichen Infiltration der Tunica muscularis führt; vielmehr stabilisiert sich die Entzündungsreaktion drei Stunden nach der Laparotomie auf einem im Vergleich zur Darmmanipulation relativ niedrigen Niveau (*siehe weiter unten*).

#### 4.2.3.2 Vergleich der MPO-positiven Zellen innerhalb der Ileus-Gruppe

Mit fortschreitender Dauer des Ileus (eine Stunde bis neun Stunden) konnte man eine deutlich zunehmende Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen beobachten. Ein interessantes Ergebnis zeigte sich insbesondere neun Stunden nach Induktion des POI; hier unterschied sich die Nervenfaserveraktivität zwischen den Darmsegmenten mit verschiedenen Kaliberausprägungen (dilatiert vs. eng gestellt) – allerdings lediglich als Antwort auf den Distensionsreiz, nicht nach Bradykininapplikation. Die immunhistochemische Färbung des Darms zeigte neun Stunden postoperativ ein gleichmäßiges Infiltrat der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen – unabhängig davon, ob es sich um ein dilatiertes oder eng gestelltes Ileus-Darmsegment handelte. Allein durch die Entzündungsreaktion in der Darmwand ist die unterschiedliche Nervenfaserveraktivität (dilatiert vs. eng gestellt) während Distension demnach nicht zu erklären. Vielmehr scheint für die Rampendistension der biomechanische Aspekt der Wandspannung von zentraler Bedeutung (*siehe oben*). Dieser kann jedoch nicht allein für die Veränderungen der Nervenfaserveraktivität beim POI verantwortlich sein, wie die Ergebnisse der Bradykininuntersuchungen zeigen. Man muss davon ausgehen, dass beide Mechanismen (proinflammatorische Mediatoren und Veränderungen der Wandspannung) an der Sensibilisierung afferenter *spinaler* Nervenfasern beteiligt sind. Durch diese vom jeweiligen Stimulus (Distension vs. Bradykinin) abhängigen Reaktionen der Nervenfasern (Distensionsreiz: *unterschiedliche* Reaktion eng gestellter und dilatierter Darmsegmente; Bradykininstimulus: *vergleichbare* Reaktion eng gestellter und dilatierter Darmsegmente) muss zudem das Konzept der **Nervenfasersensibilisierung bzw. -desensibilisierung** kritisch betrachtet werden. Diejenigen eng gestellten Darmsegmente der 9h-Ileus-Gruppe, die eine *verminderte*

Nervenfaseraktivität während Distension zeigten, waren auch diejenigen, bei denen eine *verstärkte* Nervenfaseraktivität nach Bradykininapplikation nachgewiesen werden konnte. Eine Deutung beider Phänomene als Sensibilisierung (im Sinne einer gleichzeitigen De- und Sensibilisierung) ist logisch nicht nachvollziehbar. Es stellt sich nun die Frage, welche neuronalen Mechanismen neben der Sensibilisierung noch in Frage kommen, um die Veränderungen der Nervenfaseraktivität neun Stunden postoperativ bei den eng gestellten Darmsegmenten zu erklären. Es wäre denkbar, dass durch die unterschiedliche „Vordehnung des Darmes“ jeweils verschiedene spezifische Nervenfasern aktiviert werden; man könnte sich vorstellen, dass bei geringerer Vordehnung (eng gestellte Darmabschnitte) eher serosale afferente Nervenfasern aktiviert werden. Bei stärkerer Vordehnung des Darmes hingegen (dilatierte Darmsegmente) könnte neben der Serosa das Mesenterium selbst gereizt werden, so dass hier neben serosalen Nervenfasern nun vermehrt mesenteriale afferente Nervenfasern aktiviert werden. Die Existenz serosaler und mesenterialer afferenter Nervenendigungen wurde bereits vor Jahrzehnten entdeckt [Bessou and Perl (1966); Morrison (1973)], ihre physiologische Bedeutung wurde jedoch erst vor kurzem erkannt. Erstmals beschrieben wurden sie für splanchnische Nervenfasern [Bessou and Perl (1966); Morrison (1973)]. Man weiß heute aus tierexperimentellen Studien, dass lediglich splanchnische afferente Nervenfasern das *Mesenterium* innervieren [Brierley et al. (2004)]. Die splanchnischen rezeptiven Felder liegen nahe an bzw. auf Blutgefäßen, die Mesenterium, Serosa oder Submucosa versorgen. Man klassifiziert sie anhand ihrer Reaktion auf festes Bestreichen der Mucosa oder auf schmerzhaftes Distorsion des Colons (nicht auf feines Bestreichen der Mucosa oder schmerzlose zirkuläre Darmwanddehnung). *Serosale* afferente Nervenfasern reagieren (wie zu erwarten) eher auf eine mechanische Stimulation der *serosalen* Oberfläche als auf mucosal applizierte Stimuli [P. A. Lynn and Blackshaw (1999)]. Tatsache ist, dass serosale afferente Fasern HT-Eigenschaften bezüglich mechanischer Stimulation aufweisen – bei lateraler Dehnung  $> 7$  g und  $> 45$  mmHg für intraluminalen Druck [Hughes et al. (2009); Brierley et al. (2009); Brierley et al. (2008)]. Diese stimmen nahezu mit den ursprünglichen *in vivo* Beschreibungen der HT-afferenten Nervenfasern an Ösophagus (Opossum) und Colon (Ratte) durch Sengupta überein [Sengupta and Gebhart (1994); Sengupta et al. (1990)]. Studien, die gezielt *mesenteriale* afferente Nervenfasern untersuchten, konnten zeigen, dass diese in idealer Weise auf

punktförmige mechanische *mesenteriale* Stimuli oder auf eine Dehnung des Mesenteriums reagieren [Blumberg et al. (1983); Morrison (1973)]. *Mesenteriale* afferente Nervenfasern können zudem auf Distensionsreize reagieren, insbesondere wenn es sich um ähnlich schmerzhaftem Dehnungsreize handelt, wie sie für die *serosalen* afferenten Fasern beschrieben wurden [Hughes et al. (2009); Blumberg et al. (1983); Brierley et al. (2009); Brierley et al. (2008)]. Sie können somit eine den *serosalen* afferenten Fasern ähnliche Funktion übernehmen (Übermittlung mechanisch induzierter Schmerzen). Zusammenfassend müssen *serosale* und *mesenteriale* afferente Nervenfasern als spezifische HT-Mechano-Nozizeptoren betrachtet werden, die beide auf schmerzhaftem mechanische Distension reagieren. Analysiert man die unterschiedliche Reaktionsweise der afferenten Nerven dilatierter bzw. eng gestellter Darmsegmente (Aktivitätssteigerung vs. –minderung), so bietet die Aktivierung serosaler und additiv mesenterialer Nervenfasern zumindest partiell eine mögliche Erklärung: Die zusätzliche Reizung *mesenterialer* Nerven im Rahmen der stärkeren Vordehnung des Darmes könnte die bereits bestehende *serosale* nervale Aktivität augmentieren.

#### **4.2.3.3 MPO-positive Zellen: Ileus vs. Kontrolle**

Die Anzahl der MPO-positiven Zellen unterschied sich nicht signifikant zwischen der 1h-Kontroll-Gruppe und der 1h-Ileus-Gruppe. Drei Stunden postoperativ war die Anzahl der MPO-positiven Zellen bereits deutlich (aber nicht signifikant) zugunsten der Ileus-Gruppe gesteigert. Neun Stunden nach dem operativen Eingriff schließlich waren in der Tunica muscularis der Ileus-Gruppe signifikant mehr MPO-positive Zellen nachweisbar als bei der Kontroll-Gruppe (und zwar unabhängig vom Darmdurchmesser).

Kreiss et al. fanden eine Korrelation zwischen der Zunahme des Darmumfangs und der Anzahl MPO-positiver neutrophiler Granulozyten in der Tunica muscularis [Kreiss et al. (2003)]. Durch die Hemmung des COX II-vermittelten Signalweges konnte hier sowohl die Dilatation des Darmes als auch die Infiltration der Darmwand mit Entzündungszellen signifikant vermindert werden [Kreiss et al. (2003)]. Es stellt sich nun die Frage, ob zwischen der entzündlichen Darmwandinfiltration und der Dilatation des Darmes ein ursächlicher Zusammenhang bestehen könnte. In der vorliegenden Arbeit fand sich die entzündliche Infiltration der Tunica muscularis sowohl in dilatierten als auch in eng gestellten Darmabschnitten; eine ursächliche

Verbindung zwischen beiden Faktoren wird somit unwahrscheinlich. Einschränkend bleibt zu bemerken, dass beide Arbeiten verschiedene Zeitabschnitte des POI untersuchten (24 Stunden vs. 9 Stunden). Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die zentrale Bedeutung der inflammatorischen Komponente für die pathophysiologischen Vorgänge beim POI.

#### 4.2.4 Zentrale neuronale Aktivierung beim POI

Die Ergebnisse dieser und vorheriger Studien zeigen, dass sich beim POI Frühphase und Spätphase hinsichtlich der Aktivität bzw. Sensibilität afferenter Nerven unterscheiden. Nach einer Stunde bzw. nach drei oder neun Stunden zeigen sich andere Aktivitäts- / Sensibilisierungsmuster, als sie nach 24 Stunden beobachtet werden können. 24 Stunden postoperativ beobachtet man eine Steigerung der afferenten Nervenfasernaktivität während mechanischer Distension vor allem bei niedrigem Druckniveau [Mueller et al. (2008)], was einer vorwiegend *vagalen* Sensibilisierung entspricht [Booth et al. (2008)]. Neben diesen *lokal-regionalen* Veränderungen der Nervenaktivität konnten Müller et al. 24 Stunden postoperativ auch im ZNS eine Aktivierung vagaler Signalwege nachweisen [Mueller et al. (2008)]. Man geht heute davon aus, dass diese zentrale vagale Aktivierung Folge der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie beispielsweise Histamin und Serotonin (5-HT) ist. Diese Mediatoren besitzen das Potential, vagale afferente Nervenfasern zu sensibilisieren [Jiang et al. (2000)] und werden im späteren Stadium des POI vermehrt ausgeschüttet [Kalff, Buchholz, et al. (1999); Kalff, Carlos, et al. (1999)]. Experimentell lässt sich die beschriebene zentrale Aktivierung durch die Expression von c-Fos in NTS und Area postrema nachweisen. Die Methode der c-Fos Bestimmung konnte in zahlreichen Studien die Aktivierung afferenter Signalwege mit Projektionen zum ZNS nachweisen [Traub, Lim, Sengupta, Meller, and Gebhart (1994); Traub, Sengupta, and Gebhart (1996)]. Als Stimuli wurden neben der Darmdistension auch chemische Reize verwendet [Traub et al. (1994); Traub et al. (1996)]. Sie führen zu einer Sensibilisierung polymodaler sensorischer Nervenfasern, indem sie einerseits deren Schwellenpotential senken und andererseits deren Aktionspotentialfrequenz steigern [Bielefeldt, Ozaki, and Gebhart (2002)]. Inflammatorische Prozesse bewirken zudem die Rekrutierung „schlafender“ bzw. „stiller“ afferenter Nervenfasern (*siehe hierzu auch weiter oben*) [Gebhart (2000b); Gebhart (2000a)].

Der Nucleus tractus solitarii (NTS) ist als Teil des dorsalen vagalen Hirnnervenkernkomplexes die erste Schaltstation vagaler afferenter Nervenfasern im Hirnstamm [Kreis et al. (2000); Zhang, Fogel, and Renehan (1992); Kreis et al. (2003)]. Man geht heute davon aus, dass die meisten Informationen den NTS über den N.vagus erreichen; nichtsdestotrotz gibt es Anhaltspunkte dafür, dass (1) auch einige wenige spinale Fasern den NTS erreichen und dass (2) mehrere Regionen des ZNS deszendierende Bahnen zum NTS entsenden [Scott, Tan, Miampamba, and Sharkey (1998)]. Die Aktivität deszendierender Bahnen würde auf die Neurone des NTS jedoch eher eine hemmende Wirkung entfalten – beispielsweise durch die Freisetzung von CRF (corticotropin releasing factor) aus dem Hypothalamus im Rahmen einer Stressreaktion [Kreis et al. (2003)]. Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die Aktivierung fos-positiver Neurone im NTS und in der Area postrema über afferente vagale Nervenfasern vermittelt wurde.

Die Area postrema ist ein zirkumventrikuläres Organ am kaudalen Ende des Bodens der Rautengrube, dorsal des Nucleus tractus solitarii (NTS). Sie empfängt Projektionen aus NTS und anderen autonomen Kontrollzentren im Hirnstamm. Aktiviert wird sie durch viszerale afferente Impulse aus dem Gastrointestinaltrakt. Man geht heute davon aus, dass die Verbindung zwischen NTS und Area postrema die primäre Schleife eines Signalweges darstellt, der durch die Integration mannigfaltigen pro-emetischen Inputs schließlich zum Erbrechen führt. Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung der Area postrema über **vagale** Nervenfasern **keine** zentrale Rolle für die Initiierung der Brechreaktion spielt [A. D. Miller and Leslie (1994)]. Es stellt sich die Frage, ob sie möglicherweise für die pathophysiologischen Vorgänge beim **POI** von Bedeutung ist. Beim Kapillarendothel der Area postrema handelt es sich um gefenstertes Endothel – die Area postrema liegt somit funktionell außerhalb der Blut-Hirn-Schranke. Über das Blut transportierte Stoffe erreichen auf diese Weise direkt Neurone der Area postrema, die für die autonome Kontrolle von Körperfunktionen von großer Bedeutung sind – möglicherweise auch im Rahmen des POI. Weitergehende Studien bleiben auch hier abzuwarten.

#### 4.2.4.1 C-Fos: Vergleich der Kontroll-Gruppen

Um die Auswirkungen der Laparotomie (ohne Darmmanipulation) auf die zentrale neuronale Aktivierung zu untersuchen, wurden die einzelnen Kontrollgruppen miteinander verglichen.

Mit fortschreitender Zeit nach der Laparotomie (eine Stunde bis neun Stunden) fand sich eine signifikante Zunahme fos-positiver Zellen im **NTS**, beginnend bereits drei Stunden postoperativ. In der **Area postrema** verhielten sich die Ergebnisse etwas anders. Hier unterschied sich die Anzahl der fos-positiven Zellen der 3h-Kontrolle nicht signifikant von der 1h-Kontrolle. Neun Stunden postoperativ hingegen war die Anzahl der fos-positiven Zellen auch in der Area postrema signifikant erhöht.

Die bloße Laparotomie bewirkt demnach bereits eine zentrale vagale Aktivierung. Wir wissen aus den Distensionsexperimenten der Kontrollgruppe, dass die vagale afferente Nervenfaserveraktivität **drei Stunden** nach der Scheinoperation *tendenziell* und **neun Stunden** postoperativ *signifikant erhöht* war. Diese „periphere“ vagale Aktivierung setzt sich also bereits früh nach „zentral“ fort – zunächst in die primäre Schaltstation vagaler afferenter Fasern, den NTS. Wie bereits erwähnt, erreichen die Area postrema zahlreiche Projektionen aus dem NTS. Es stellt sich nun die Frage, ob **(1)** durch die Laparotomie auch Regionen der Area postrema aktiviert werden, und ob **(2)** diese Aktivierung zeitlich nach der Aktivierung des NTS stattfindet. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen beides; nach einer initialen vaginalen Aktivierung des NTS (drei Stunden postoperativ) wird im weiteren Verlauf (neun Stunden postoperativ) die nachgeschaltete Area postrema aktiviert – sie wird quasi über die peripheren Ereignisse (nämlich die Laparotomie) ebenfalls „informiert“ und in die Lage versetzt, protektive Mechanismen zu initiieren. Beispielsweise könnten vagale Efferenzen aktiviert werden, die im weiteren Verlauf die Immunreaktion in der Darmwand regulieren bzw. eindämmen – als „cholinergic antiinflammatory pathway“ (*siehe weiter oben*) [Tracey (2002); The et al. (2007)].

#### 4.2.4.2 C-Fos: Vergleich der Ileus-Gruppen

Auch bei den Ileus-Gruppen ließ sich eine Akkumulation fos-positiver Zellen beobachten; mit fortschreitender Dauer des Ileus (eine Stunde bis neun Stunden) konnte man eine deutliche Zunahme der fos-positiven Zellen im **NTS** beobachten. In der **Area postrema** verhielten sich die Ergebnisse ähnlich, wie wir es bereits vom Vergleich der Kontrollgruppen her kennen; erst neun Stunden postoperativ (und

damit später als im NTS) war die Anzahl der fos-positiven Zellen signifikant erhöht. Auch die Darmmanipulation bewirkt demnach eine initiale vagal vermittelte Aktivierung des NTS (drei Stunden postoperativ), die im weiteren Verlauf (neun Stunden postoperativ) die nachgeschaltete Area postrema erreicht.

Generell ist zu bedenken, dass die beobachtete zentrale neuronale Aktivierung auch durch Faktoren hervorgerufen werden könnte, die in direktem Zusammenhang mit dem operativen Eingriff (insbesondere der Darmmanipulation) stehen. Ein solcher Faktor wäre beispielsweise die unmittelbare Aktivierung von Mechanorezeptoren durch die Darmmanipulation selbst. Studien, die einen späteren Zeitpunkt des POI untersuchten (24 Stunden postoperativ), konnten jedoch ebenfalls diese zentrale neuronale Aktivierung nachweisen [Kreiss et al. (2003); Mueller et al. (2008)]; man möchte meinen, dass zu diesem späten Zeitpunkt (24 Stunden postoperativ) die direkte Wirkung manipulativer Vorgänge abgeklungen sei [Kalff, Buchholz, et al. (1999)]. Die zentrale vagale Aktivierung wäre somit von nachhaltigem Charakter und nicht nur durch direkte mechanische Faktoren verursacht.

#### 4.2.4.3 C-Fos: Ileus vs. Kontrolle

Der spezifische Effekt der Darmmanipulation (im Vergleich zur alleinigen Laparotomie) auf die zentrale neuronale Aktivierung lässt sich durch den direkten Vergleich der Kontroll- mit den Ileus-Gruppen eruieren. Eine Stunde und drei Stunden postoperativ unterschied sich die Anzahl der fos-positiven Zellen in **NTS und Area postrema** nicht signifikant zwischen Kontrolle und POI. Neun Stunden postoperativ hingegen waren in **NTS und Area postrema** der Ileus-Gruppe signifikant mehr fos-positive Zellen nachweisbar als bei der Kontrolle.

Wir wissen bereits, dass die bloße Laparotomie vagal vermittelt Zentren im ZNS aktiviert – hier bereits drei Stunden postoperativ. Der zusätzliche Effekt der Darmmanipulation wird jedoch erst neun Stunden postoperativ manifest. Ein ähnliches Ergebnis war auch in den Distensionsexperimenten zu erkennen. Hier setzte die *Laparotomie* bereits zu einem frühen Zeitpunkt Mechanismen in Gang, die eine Sensibilisierung afferenter Nerven gegenüber mechanischer Distension bewirken; dabei wurden gleichermaßen *vagale* und *spinale* Nervenfasern sensibilisiert. Der spezifische Effekt der *Darmmanipulation* auf die Sensibilisierung vagaler Nervenfasern gegenüber Distension zeigte sich jedoch erst im weiteren Verlauf des POI. Unmittelbar postoperativ (eine Stunde) wurden vagale Nervenfasern

noch nicht in signifikantem Ausmaß sensibilisiert. Dies änderte sich drei bzw. neun Stunden nach dem operativen Eingriff; hier wurden (im Vergleich zur bloßen Laparotomie) durch die Darmmanipulation vagale Fasern zunehmend aktiviert bzw. sensibilisiert. Man kann demnach festhalten, dass durch die Darmmanipulation vagale Fasern **zunächst** (drei Stunden postoperativ) *peripher* sensibilisiert werden und dass diese Aktivierung / Sensibilisierung **später** (neun Stunden postoperativ) nach *zentral* (NTS und Area postrema) weitergeleitet wird. Wie oben bereits erwähnt, konnten Müller et al. beim POI 24 Stunden postoperativ ebenfalls eine ausgeprägte Aktivierung vagaler Zentren im ZNS nachweisen [Mueller et al. (2008)]. Die im zeitlichen Verlauf zunehmende zentrale vagale Aktivierung könnte den Übergang von der Frühphase in die Spätphase des POI charakterisieren. Wie oben bereits erläutert geht man heute davon aus, dass die zentrale vagale Aktivierung Folge der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (wie beispielsweise Histamin und Serotonin) ist, die im Rahmen der Infiltration der Tunica muscularis mit Entzündungszellen vermehrt freigesetzt werden. Aufgrund des in dieser Arbeit untersuchten zeitlichen Ablaufs der Vorgänge beim POI scheint folgende Kaskade bei der Pathogenese der Erkrankung denkbar: Die mechanische Manipulation des Darmes führt neben einer reflektorischen Hemmung der intestinalen Motilität (wie oben ausführlich beschrieben) zur entzündlichen Infiltration der intestinalen Muscularis; die hier freigesetzten Mediatoren bewirken dann mit entsprechender Verzögerung die Aktivierung vagaler zentralnervöser Strukturen.

Neben inflammatorischen könnten weitere Mechanismen bei der Vermittlung der zentralen vagalen Aktivierung im Rahmen des POI von Bedeutung sein. Die beim POI zu beobachtende Dilatation des Darmes ist bekanntermaßen in der Lage, viszerale afferente Nervenfasern zu aktivieren [Traub et al. (1994)]. Man könnte nun annehmen, dass sich diese Dilatations-vermittelte neuronale Aktivierung ebenfalls nach zentral fortsetzt und die c-Fos Expression in NTS und Area postrema begünstigt. Dies erscheint insbesondere plausibel, da die Darmdilatation *zeitgleich* (neun Stunden postoperativ) mit der stärksten fos-Expression in NTS und AP auftritt. Insgesamt muss man von einem multifaktoriellen Geschehen ausgehen, an dem sowohl mechanische wie auch inflammatorische Vorgänge beteiligt sind. Aktuell lässt sich nicht eruieren, welche relative Bedeutung den genannten Mechanismen bei der Pathogenese des POI zukommt; weitere Studien bleiben abzuwarten.

Neben der neuronalen Aktivierung im Nucleus tractus solitarii wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine Steigerung der c-Fos Expression in der Area postrema nachgewiesen. Da diese Region des ZNS bei fehlender Blut-Hirn-Schranke unmittelbaren Kontakt zur systemischen Zirkulation hat, kann ihre Aktivierung auch durch in den Blutstrom freigesetzte Mediatoren angestoßen worden sein. Kalff et al. haben die Rolle residenter Makrophagen und Mastzellen bei der Vermittlung inflammatorischer Prozesse beim POI ausführlich beschrieben [Kalff, Schraut, et al. (1998); Kalff, Carlos, et al. (1999)]. Ein Teil dieser Immunzellen befindet sich in der direkten Umgebung von Blutgefäßen der Tunica muscularis [Kalff, Schwarz, et al. (1998)]; von ihnen freigesetzte Zytokine können somit in den Blutstrom gelangen und andernorts ebenfalls ihre Wirkung entfalten. Die neuronale Aktivierung der Area postrema könnte somit auch auf der Wirkung von proinflammatorischen Mediatoren (wie beispielsweise Histamin und Serotonin) beruhen, die in die systemische Zirkulation gelangt sind. Neben den *oben erwähnten* Mechanismen kann demnach auch eine **direkte** zentrale neuronale Aktivierung (durch über den Blutweg zur Area postrema gelangte Mediatoren) nicht ausgeschlossen werden.

## 5 Zusammenfassung

Der postoperative Ileus (POI) tritt regelhaft nach abdominalchirurgischen Eingriffen auf und ist hauptsächlich durch eine Motilitätsstörung des Gastrointestinaltraktes gekennzeichnet. Eine solche postoperative Passagestörung hat für die betroffenen Patienten zahlreiche, zum Teil gravierende Konsequenzen. Die Therapie ist weitestgehend symptomatisch orientiert – einer effektiven Therapie steht insbesondere das unzureichende Verständnis der zugrunde liegenden Pathomechanismen im Wege. Die pathophysiologischen Vorgänge bei der Entstehung des POI sind komplex und zeigen insbesondere bei längerem Verlauf Interaktionen – die Therapie des POI sollte demnach bestenfalls in der Frühphase beginnen. Ziel dieser Doktorarbeit war deshalb die Untersuchung derjenigen Pathomechanismen, die bereits kurz nach dem operativen Eingriff initialisiert werden.

Bei der Entstehung des POI ist die Aktivierung intestinaler afferenter Signalwege von entscheidender Bedeutung [De Winter et al. (1997)]. Hierbei kommt es durch eine *Zunahme* der *afferenten* neuronalen Aktivität zu einer *Hemmung* der *efferenten* Aktivität und konsekutiv zu einer verminderten Darmmotilität [Kreis et al. (1998)]. Man nimmt an, dass diese beiden neuronalen Komponenten (afferent und efferent) Teil eines neuronalen Reflexes darstellen, welcher bei der Entstehung des POI eine entscheidende Rolle spielt [Kreis et al. (2000); Hillsley et al. (1998)]. Die neurogenen Mechanismen, die bei der Entstehung des POI zum Tragen kommen, wurden bisher lediglich durch indirekte Methoden untersucht [Kalff, Buchholz, et al. (1999); De Winter et al. (1997); Holzer et al. (1986); Nadelhaft et al. (1986)]. **Eine direkte Aufzeichnung der afferenten neuronalen Aktivität während der Frühphase des POI war bislang nicht möglich. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die intestinale afferente Nervenfasernaktivität während der Frühphase des POI direkt zu erfassen und zu charakterisieren.** Hierbei war die zentrale Hypothese, dass es durch mechanische Manipulation des Dünndarms (im Gegensatz zur bloßen Laparotomie) zu einer Steigerung der Sensibilität *spinaler* afferenter Nervenfasern gegenüber Schmerzmediatoren (wie beispielsweise Bradykinin) und mechanosensitiven Stimuli (wie zum Beispiel mechanische Distension) kommt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob weitere exzitatorische neuronale Reflexmechanismen wie beispielsweise *vagale* afferente Signalwege (und nicht nur

ausschließlich *spinale* afferente Signalwege) an der Entstehung der postoperativen Passagestörung beteiligt sind. Begleitend sollten **Motilität** und **Entzündungsreaktion** des Darms sowie seine Morphologie durch entsprechende Untersuchungsverfahren dokumentiert werden.

Unter Isoflurannarkose wurden die Versuchstiere (männliche Mäuse des Stammes C57BL/6NCr) einem standardisierten abdominal-chirurgischen Eingriff unterzogen. *Einerseits* erfolgte eine sogenannte Scheinoperation, bei der lediglich eine mediane Laparotomie durchgeführt wurde (*Kontroll-Gruppe*), *andererseits* erfolgte die manuell-mechanische Manipulation des Dünndarms zur Induktion des POI (*Ileus-Gruppe*). Nach einer Stunde bzw. nach drei und neun Stunden wurden die für die **Experimente** relevanten Gewebe entnommen: **(1)** Die afferente Nervenfaserveraktivität wurde in einem Zweikammerorganbad mittels multi-unit Ableitung mesenterialer Dünndarmnerven untersucht. Hierbei wurde neben der Ruhennervenfaserveraktivität auch die Nervenfaserveraktivität während Rampendistension (0 bis 80 cmH<sub>2</sub>O) und nach Applikation des Schmerzmediators Bradykinin (0,5 µM) gemessen. **(2)** Parallel dazu wurde die Motilität des Darms durch intraluminale Druckmessungen charakterisiert. **(3)** Des Weiteren wurde die Infiltration der Darmwand (Tunica muscularis) mit MPO-positiven Entzündungszellen registriert. **(4)** Darüber hinaus wurde untersucht, in welchem Maße vagale Zentren im Hirnstamm an der Entstehung der postoperativen Passagestörung beteiligt sind; hierfür wurden immunhistochemische Färbungen von Nucleus tractus solitarii und Area postrema angefertigt und die Anzahl c-Fos-positiver Zellen ermittelt.

Die experimentellen Gruppen wiesen deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer **Motilität** auf. Die **Kontraktionskraft** des Darmes (gemessen als intraluminale Druckamplitude) blieb im zeitlichen Verlauf nach reiner *Laparotomie* im Wesentlichen erhalten (1h<sub>Kontrolle</sub> 5,1 ± 0,8 cmH<sub>2</sub>O vs. 3h<sub>Kontrolle</sub> 5,3 ± 1,2 cmH<sub>2</sub>O vs. 9h<sub>Kontrolle</sub> 4,3 ± 0,9 cmH<sub>2</sub>O; jeweils p > 0,05). Die *Darmmanipulation* hingegen führte dazu, dass die Kontraktionskraft des Darmes signifikant abnahm (1h<sub>Kontrolle</sub> 5,1 ± 0,8 cmH<sub>2</sub>O vs. 1h<sub>Ileus</sub> 0,8 ± 0,2 cmH<sub>2</sub>O, p = 0,002; 3h<sub>Kontrolle</sub> 5,3 ± 1,2 vs. 3h<sub>Ileus</sub> 1,8 ± 0,5, p = 0,024). **Bei der 9h-Ileus-Gruppe fiel zudem eine makroskopische Besonderheit des Darms auf, die bislang in der Literatur nicht beschrieben wurde.** Bei einigen Dünndarmabschnitten schien der Darm dilatiert, andere Segmente hingegen wiesen

ein normales oder sogar eher verengtes Kaliber auf. Dabei befanden sich die dilatierten Abschnitte des Darmes proximal, wohingegen die normalkalibrigen Anteile weiter distal zu finden waren. Da die Unterscheidung von dilatierten und normalkalibrigen Darmabschnitte innerhalb der 9h-Ileus-Gruppe eine konstante Erscheinung war, wurden diese Segmente getrennt untersucht und ausgewertet. Die Kontraktionskraft des mechanisch manipulierten Darmes nahm im Vergleich zur Laparotomie allerdings unabhängig davon ab, ob es sich um dilatierte oder eng gestellte Darmsegmente handelte (9h<sub>Kontrolle</sub>  $4,3 \pm 0,9$  vs. 9h<sub>Ileus dilatiert</sub>  $0,8 \pm 0,1$  bzw. 9h<sub>Ileus eng</sub>  $0,8 \pm 0,2$ , jeweils  $p = 0,002$ ). Neben der Kontraktionskraft wurde als weiteres Charakteristikum der Darmmotilität die **Kontraktionsfrequenz** untersucht (gemessen als Anzahl der Amplituden über einen Zeitraum von 200 Sekunden). Bereits die bloße *Laparotomie* verursachte zeitnah nach der Operation eine Zunahme der Kontraktionsfrequenz (1h<sub>Kontrolle</sub>  $17,8 \pm 1,7$  vs. 3h<sub>Kontrolle</sub>  $28,8 \pm 3,6$ ;  $p = 0,02$ ), die sich im weiteren Verlauf jedoch stabilisierte (9h<sub>Kontrolle</sub>  $30,8 \pm 2,2$ ). Auch der *manipulierte* Darm zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine (wenn auch inhomogene) Zunahme der Kontraktionsfrequenz (1h<sub>Ileus</sub>  $24,0 \pm 1,1$  vs. 1h<sub>Kontrolle</sub>  $17,8 \pm 1,7$ ,  $p = 0,012$ ; 3h<sub>Ileus</sub>  $29,3 \pm 2,4$  vs. 3h<sub>Kontrolle</sub>  $28,8 \pm 3,6$ ,  $p = 0,911$ ; 9h<sub>Kontrolle</sub>  $30,8 \pm 2,2$  vs. 9h<sub>Ileus dilatiert</sub>  $36,0 \pm 2,3$ ,  $p = 0,135$  bzw. 9h<sub>Ileus eng</sub>  $30,8 \pm 2,2$ ,  $p = 0,045$ ).

Die **Ruhenervenfaseraktivität** (Impulsrate pro Sekunde, gemessen als  $\text{impsec}^{-1}$ ) wurde vor mechanischer (Distension) oder chemischer Stimulation (Bradykininapplikation) ermittelt. Die alleinige *Laparotomie* hatte hierbei keinen signifikanten Einfluss auf die Baselineaktivität (1h<sub>Kontrolle</sub>  $6,5 \pm 0,9 \text{ impsec}^{-1}$  vs. 3h<sub>Kontrolle</sub>  $4,9 \pm 0,9 \text{ impsec}^{-1}$  vs. 9h<sub>Kontrolle</sub>  $5,8 \pm 0,5 \text{ impsec}^{-1}$ ;  $p$  jeweils  $> 0,05$ ). Durch die *Darmmanipulation* hingegen kam es schnell und anhaltend zu einer signifikanten Steigerung der Ruhenervenfaseraktivität (1h<sub>Ileus</sub>  $8,6 \pm 1,1 \text{ impsec}^{-1}$  vs. 1h<sub>Kontrolle</sub>  $6,5 \pm 0,9 \text{ impsec}^{-1}$ ,  $p = 0,041$ ; 3h<sub>Ileus</sub>  $13,1 \pm 2,6 \text{ impsec}^{-1}$  vs. 3h<sub>Kontrolle</sub>  $4,9 \pm 0,9 \text{ impsec}^{-1}$ ,  $p = 0,015$ ; 9h<sub>Ileus dilatiert</sub>  $8,3 \pm 0,6$  bzw. 9h<sub>Ileus eng</sub>  $9,1 \pm 1,4$  vs. 9h<sub>Kontrolle</sub>  $5,8 \pm 0,5$ ,  $p$  jeweils  $< 0,05$ ).

Nicht nur die Analyse der Ruhenervenfaseraktivität gewährt Einblicke in die pathophysiologischen Vorgänge beim POI; auch die Untersuchung der Nervenfaseraktivität unter Stimulation liefert Informationen zur neuronalen Kontrolle der Darmfunktion im Rahmen dieser Erkrankung. **Bradykinin** aktiviert als sogenannter „Schmerzmediator“ *spinale* Nervenfasern. In den hier durchgeführten Versuchen bewirkte die serosale **Bradykininapplikation** ( $0,5 \mu\text{M}$ ) unabhängig von

der jeweiligen experimentellen Gruppe einen abrupten Anstieg der Nervenfaseraktivität. Gleichzeitig war ein kurzfristiger Abfall des intraluminalen Drucks zu verzeichnen, der innerhalb weniger Sekunden durch einen erneuten Druckanstieg kompensiert wurde (sog. „motor event“). Einige Arbeiten berichten neben der Sensibilisierung *spinaler* Nervenfasern auch von der Aktivierung *vagaler* afferenter Nervenfasern durch Bradykinin [Brunsdon and Grundy (1999)]. Man nimmt allerdings an, dass die Aktivierung vagaler mechanosensitiver Fasern durch die genannten „motor events“ verursacht wird, also kurz nach der eigentlichen Bradykininstimulation geschieht. Die Stimulation mit Bradykinin, wie sie in dieser Arbeit angewandt und analysiert wurde, erlaubt vor allem Rückschlüsse auf die Aktivierung bzw. Sensibilisierung *spinaler* Nervenfasern [Booth et al. (2001)]. Durch die reine *Laparotomie* werden erst im späten postoperativen Verlauf (9 Stunden postoperativ) vermehrt *spinale* Nervenfasern aktiviert / sensibilisiert (1h<sub>Kontrolle</sub>  $12,1 \pm 0,9 \text{ impsec}^{-1}$  vs. 3h<sub>Kontrolle</sub>  $14,5 \pm 1,1 \text{ impsec}^{-1}$ ,  $p = 0,129$ ; 3h<sub>Kontrolle</sub> vs. 9h<sub>Kontrolle</sub>  $19,9 \pm 1,3 \text{ impsec}^{-1}$ ,  $p = 0,01$ ). Durch die *Darmmanipulation* bzw. die *Auslösung des POI* hingegen wurden bereits kurz nach dem operativen Eingriff *spinale* Fasern in signifikantem Ausmaß aktiviert (1h<sub>Kontrolle</sub>  $12,1 \pm 0,9 \text{ impsec}^{-1}$  vs. 1h<sub>Ileus</sub>  $15,0 \pm 0,9 \text{ impsec}^{-1}$ ,  $p = 0,046$ ). Diese Sensibilisierung *spinaler* Nervenfasern gegenüber Bradykinin blieb beim POI während des gesamten Untersuchungszeitraums erhalten, und zwar unabhängig vom Darmdurchmesser neun Stunden postoperativ (3h<sub>Kontrolle</sub>  $14,5 \pm 1,1 \text{ impsec}^{-1}$  vs. 3h<sub>Ileus</sub>  $38,5 \pm 4,0 \text{ impsec}^{-1}$ ,  $p = 0,001$ ; 9h<sub>Kontrolle</sub>  $19,9,5 \pm 1,3 \text{ impsec}^{-1}$  vs. 9h<sub>Ileus dilatiert</sub>  $35,3 \pm 2,1 \text{ impsec}^{-1}$  bzw. 9h<sub>Ileus eng</sub>  $32,8 \pm 1,8 \text{ impsec}^{-1}$ , jeweils  $p = 0,001$ ).

Durch ein standardisiertes **Rampendistensionsprotokoll** wird es möglich, die Mechanosensibilität afferenter Nerven abhängig vom jeweiligen Druckniveau zu untersuchen. Betrachtet man das hier verwendete Distensionsprotokoll genauer, so kann man grob zwischen einer Distension mit hohem (zwischen 50 und 80 cmH<sub>2</sub>O) und niedrigem intraluminalen Druck (zwischen 0 und 40 cmH<sub>2</sub>O) unterscheiden. Man weiß heute, dass bei *niedrigem* intraluminalen Druck (zwischen 0 und 40 cmH<sub>2</sub>O) vor allem *vagale* afferente Nervenfasern aktiviert werden, während bei *höheren* Drücken (> 50 cmH<sub>2</sub>O) hauptsächlich *spinale* Nervenfasern aktiviert werden. Bei diesen *spinalen* Fasern handelt es sich um Neurone, die bereits im Rückenmark (und nicht erst in Hirnstamm oder Gehirn) auf efferente inhibitorische Neurone umgeschaltet werden [Dunn and Rang (1990)]; in diesem Sinne bilden sie den

afferenten Schenkel eines Reflexkreises, der (zumindest partiell) für die Hemmung der intestinalen Motilität beim POI verantwortlich ist [Spiller (2003)]. Über alle experimentellen Gruppen hinweg bewirkte die mechanische Distension einen vom intraluminalen Druck abhängigen Anstieg der afferenten Nervenfasernaktivität. Durch die reine *Laparotomie* wurden sowohl *vagale* als auch *spinale* Nervenfasern gegenüber Distensionsreizen sensibilisiert – dies geschah allerdings nicht sofort nach dem operativen Eingriff, sondern erst neun Stunden postoperativ. Anders verhielt es sich, wenn tatsächlich ein *POI* ausgelöst wird (*Laparotomie inklusive Darmmanipulation*). Hier wurden unmittelbar (eine Stunde) postoperativ lediglich *spinale* Nervenfasern gegenüber Distensionsreizen sensibilisiert. Die Sensibilisierung *vagaler* Nervenfasern spielt demnach in der initialen Frühphase des POI keine nachweisbare Rolle. Auch im weiteren Verlauf (drei und neun Stunden postoperativ) des POI stand die Sensibilisierung *spinaler* Nervenfasern im Zentrum; jedoch wurden hier zunehmend auch *vagale* Nervenfasern gegenüber Distensionsreizen sensibilisiert, wie es für die Spätphase des POI bereits nachgewiesen werden konnte [Mueller et al. (2008)]. Man kann demnach davon ausgehen, dass in der **Frühphase** des POI die Sensibilisierung *spinaler* Nervenfasern dominiert, während in der **Spätphase** hauptsächlich *vagale* Nervenfasern sensibilisiert werden. In dieser Arbeit wurde neben der Frühphase (rein *spinale* Aktivierung) **erstmalig auch eine Art Übergangsphase erfasst**, bei der sich sowohl *spinale* als auch *vagale* Sensibilisierungsprozesse nachweisen lassen (drei und neun Stunden postoperativ). Neben neuronalen **Sensibilisierungsprozessen** ist in der Übergangsphase des POI auch der Darmdurchmesser bzw. die **Wandspannung** des Darms von erheblicher Bedeutung. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Schmerzwahrnehmung während einer Darmdistension und der dabei entstehenden Wandspannung [Petersen et al. (2003)]. Betrachtet man die Schmerzwahrnehmung als Funktion der neuronalen Entladungsfrequenz, dann hängt die afferente Nervenfasernaktivität von der jeweils vorherrschenden Wandspannung ab. An dieser Stelle bietet es sich an, auf das Gesetz von Laplace zurückzugreifen:  $K = P r / 2d$  ( $K$  = Wandspannung,  $P$  = transmuraler Druck,  $r$  = Radius und  $d$  = Wanddicke). Auf den Darm bezogen ergibt sich bei vorgegebenem Druck und unveränderter Wanddicke nach Laplace eine geringere Wandspannung, wenn es sich um einen Darmabschnitt mit geringerem Durchmesser handelt; entsprechend findet sich bei höherem Diameter eine höhere Wandspannung. Nimmt man an, dass die Wandspannung des Darms direkt

proportional zur Entladungsfrequenz der afferenten Nerven ist, dann könnte dieser biomechanische Mechanismus die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erklären: Im Vergleich zur 9h-Kontroll-Gruppe war die afferente Nervenfasernaktivität von normalkalibrigen 9h-Ileus-Darmsegmenten ab einem intraluminalen Druck  $> 50$  cmH<sub>2</sub>O signifikant reduziert (9h<sub>Ileus eng 80cmH<sub>2</sub>O</sub>  $46 \pm 5$  impsec<sup>-1</sup> vs. 9h<sub>Kontrolle 80cmH<sub>2</sub>O</sub>  $77 \pm 4$  impsec<sup>-1</sup>;  $p < 0,001$ ). Ganz das Gegenteil fand sich für die dilatierten Darmabschnitte der 9h-Ileus-Gruppe; hier war die afferente Nervenfasernaktivität ab einem intraluminalen Druck  $> 40$  cmH<sub>2</sub>O signifikant gesteigert (9h<sub>Ileus dilatiert 80cmH<sub>2</sub>O</sub>  $176 \pm 16$  impsec<sup>-1</sup> vs. 9h<sub>Kontrolle 80cmH<sub>2</sub>O</sub>  $77 \pm 4$  impsec<sup>-1</sup>;  $p < 0,001$ ). Neun Stunden postoperativ wird die spinale Sensibilisierung demnach durch mechanische Veränderungen der Darmwand dominiert.

Neben neuronalen und biomechanischen Komponenten ist die lokale **Entzündungsreaktion** innerhalb der Darmwand ein weiterer wichtiger Pathomechanismus für die Entstehung des POI. Bereits die alleinige *Laparotomie* führte dazu, dass die Tunica muscularis in signifikantem Ausmaß mit MPO-positiven Entzündungszellen infiltriert wurde (1h<sub>Kontrolle</sub>  $0,8 \pm 0,2$  vs. 3h<sub>Kontrolle</sub>  $5,1 \pm 2,4$ ;  $p = 0,041$ ). Diese lokale Entzündungsreaktion der Darmwand stabilisierte sich allerdings im weiteren Verlauf (3h<sub>Kontrolle</sub>  $5,1 \pm 2,4$  vs. 9h<sub>Kontrolle</sub>  $5,6 \pm 1,4$ ;  $p = 0,846$ ) – ganz im Gegensatz zum Verlauf der inflammatorischen Reaktion beim POI. Hier nahm die Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen kontinuierlich zu (1h<sub>Kontrolle</sub>  $0,8 \pm 0,2$  vs. 1h<sub>Ileus</sub>  $0,7 \pm 0,2$ ,  $p = 0,783$ ; 3h<sub>Kontrolle</sub>  $5,1 \pm 2,4$  vs. 3h<sub>Ileus</sub>  $10,8 \pm 1,2$ ;  $p = 0,053$ ; 9h<sub>Kontrolle</sub>  $5,6 \pm 1,4$  vs. 9h<sub>Ileus dilatiert</sub>  $46,9 \pm 5,8$  bzw. 9h<sub>Ileus eng</sub>  $53,5 \pm 5,0$ , jeweils  $p < 0,05$ ). Entzündungszellen setzen eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren (beispielsweise Prostaglandine) frei, die afferente Nervenfasern sensibilisieren – unter anderem gegenüber Stimuli wie Bradykinin oder mechanischer Distension auf hohem Druckniveau [Brunsdon and Grundy (1999); Seeling et al. (1986); The et al. (2008)]. Die Entzündungsreaktion spielt demnach für die Pathogenese des POI ebenfalls eine elementare Rolle – insbesondere für die Übergangs- und Spätphase, weniger für die Frühphase.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, in welchem Maße **vagale Zentren im Hirnstamm** an der Entstehung der postoperativen Passagestörung beteiligt sind. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen von Nucleus tractus solitarii und Area postrema angefertigt und die Anzahl c-Fos-positiver Zellen ermittelt. Bereits durch die bloße *Laparotomie* wurden vagale Zentren im ZNS

schnell und nachhaltig aktiviert; hierbei erfolgte die Aktivierung zunächst im NTS (1h<sub>Kontrolle</sub>  $10,7 \pm 0,4$ ; 3h<sub>Kontrolle</sub>  $12,2 \pm 0,5$ ; 9h<sub>Kontrolle</sub>  $60,2 \pm 1,4$ ; jeweils  $p < 0,05$ ) und etwas später in der nachgeschalteten Area postrema (1h<sub>Kontrolle</sub>  $1,5 \pm 0,8$  vs. 3h<sub>Kontrolle</sub>  $1,3 \pm 0,5$ ,  $p = 0,937$ ; 9h<sub>Kontrolle</sub>  $14,2 \pm 1,3$ ,  $p_{\text{vs.1h-Kontrolle bzw. 3h-Kontrolle}} = 0,002$ ). Das Ausmaß der zentralen vagalen Aktivierung hielt sich bei den Kontrollgruppen im Vergleich zum POI jedoch in Grenzen. Beim POI zeigte sich eine überaus starke zentrale vagale Aktivierung in NTS (1h<sub>Kontrolle</sub>  $10,7 \pm 0,4$  vs. 1h<sub>Ileus</sub>  $10,5 \pm 0,3$ ,  $p = 0,765$ ; 3h<sub>Kontrolle</sub>  $12,2 \pm 0,5$  vs. 3h<sub>Ileus</sub>  $12,8 \pm 0,3$ ,  $p = 0,267$ ; 9h<sub>Kontrolle</sub>  $60,2 \pm 1,4$  vs. 9h<sub>Ileus</sub>  $127,7 \pm 4,1$ ,  $p = 0,001$ ) und Area postrema (1h<sub>Kontrolle</sub>  $1,5 \pm 0,3$  vs. 1h<sub>Ileus</sub>  $1,8 \pm 0,2$ ,  $p = 0,401$ ; 3h<sub>Kontrolle</sub>  $1,3 \pm 0,2$  vs. 3h<sub>Ileus</sub>  $2,0 \pm 0,4$ ,  $p = 0,145$ ; 9h<sub>Kontrolle</sub>  $14,2 \pm 1,3$  vs. 9h<sub>Ileus</sub>  $38,0 \pm 2,0$ ,  $p = 0,001$ ) mit Punctum maximum in der Übergangsphase (neun Stunden postoperativ).

Durch die hier gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass sowohl *spinale* als auch *vagale* Nervenfasern bei Entstehung des POI eine Rolle spielen. In der Frühphase des POI überwiegt die Sensibilisierung *spinaler* Nervenfasern; diese wird in der Übergangsphase durch vagale Sensibilisierungsprozesse ergänzt, die in der Spätphase schließlich dominieren. Beim POI bewirkt die Sensibilisierung *spinaler* afferenter Nervenfasern *initial* und *reflektorisch* die Hemmung der Motilität. Etwas später und parallel zur Entwicklung der *Entzündungsreaktion* der Darmwand kommt es zur Dilatation des Darms – einerseits mit direkten *biomechanischen* Effekten auf die neuronale Aktivität, andererseits mit zunehmender Aktivierung *vagaler Zentren im Hirnstamm*, die beide wiederum die gastrointestinale Motilität nachhaltig beeinflussen. **Die neurogenen Mechanismen, die bei der Entstehung des POI zum Tragen kommen, konnten durch diese Arbeit erstmals direkt charakterisiert werden.** Die **zentrale Hypothese**, dass es durch mechanische Manipulation des Dünndarms zu einer Sensibilitätssteigerung **spinaler** afferenter Nervenfasern kommt, konnte somit eindrücklich bestätigt werden. Neben den bereits bekannten *inflammatorischen* und *vagal-neurogenen* Faktoren sollten zunehmend auch *spinale Reflexmechanismen* ins Zentrum der Forschung rücken, da diese beim POI initial von immenser Bedeutung sind und interessante therapeutische Angriffspunkte bieten könnten.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-hydroxytryptamine (serotonin)
ABC	avidin biotin complex
ANS	autonomic nervous system
AP	area postrema
ATP	adenosine triphosphate
BK	bradykinin
CC	canalis centralis
CCK	cholecystokinin
CD	cluster of differentiation
c-Fos	cellular Finkel osteo sarcoma
CGRP	calcitonin-gene-related peptide
cNOS	constitutive nitric oxide synthase
COX I / II	cyclooxygenase I / II
CRF	corticotropin releasing factor
DAB	3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DFU	5.5-dimethyl-3-(flurorophenyl)-4-(4-methylsulfonyl)-phenyl-2-furan
DMN	dorsal motor nucleus
DNA	desoxyribonucleid acid
DRG	diagnosis related groups
DVC	dorsal vagal complex
ENS	enteric nervous system
EP	prostaglandin receptor
GI-	gastrointestinal-
H <sub>1</sub> / H <sub>2</sub>	histamine H <sub>1</sub> / H <sub>2</sub> receptor
HNK-1	human natural killer 1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
ICC	interstitial cell of Cajal
IκB	inhibitor of NF-κB
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
Jak2	Janus kinase 2
k.d.B.	kaudal des Bregma

LFA-1	lymphocyte function associated antigen 1
LPS	lipopolysaccharide
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MHC I / II	major histocompatibility complex I / II
MPO	myeloperoxidase
NA	nucleus ambiguus
nAChR	nicotinic acetylcholine-receptor
NBF	neutral buffered formalin
NF- $\kappa$ B	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B cells
NGF	normal goat serum
NO	nitric oxide
NTS	nucleus tractus solitarii
PBN	parabrachial nucleus
PBS	phosphate buffered saline
POI	postoperative ileus
PVN	paraventricular nucleus
RT	room temperature
SEM	standard error of the mean
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SP	substance P
SS	swine serum
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TBS	Tris buffered solution
TNF	tumor necrosis factor
VIP	vasoactive intestinal peptide
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb.1. Aufbau der Darmwand.....	S.15
Abb.2. Anordnung der Ganglien und Nervenplexus im Enterischen Nervensystem (ENS).....	S.17
Abb.3. Erscheinungsbild enterischer Neurone.....	S.19
Abb.4. Motorische Reflexkreise im Gastrointestinaltrakt.....	S.21
Abb.5. Darstellung typischer Typ I- und Typ II-Neurone mittels Biocytin-Markierung.....	S.27
Abb.6. Positiver „feed-forward“ Regelkreis.....	S.28
Abb.7. Die „Gating“-Funktion der Zellkörper von AH-Interneuronen im ENS.....	S.30
Abb.8. Schnelle und langsame EPSPs und IPSPs.....	S.33
Abb.9. Organisation secretomotorischer und vasodilatatorischer Reflexe.....	S.37
Abb.10. Kontrolle secretomotorischer und vasodilatatorischer Regelkreise.....	S.38
Abb.11. Vagale Nervenendigungen.....	S.39
Abb.12. Schematische Darstellung der vagalen und spinalen Innervation des Darms.....	S.42
Abb.13. Verlauf pelviner und splanchnischer afferenter Nervenendigungen.....	S.43
Abb.14. Antegrade Färbung von Axonen mesenterialer Nervenfaserbündel.....	S.44
Abb.15. Reaktion vagaler und spinaler afferenter Nervenfasern auf Distension.....	S.49
Abb.16. Anordnung mechanosensorischer afferenter Nervenfasern in der Darmwand.....	S.55
Abb.17. Intrazelluläre elektrische Aktivität vor und während Darmdistension.....	S.58
Abb.18. Afferente sensorische Signalwege zu Thalamus und Cortex.....	S.61
Abb.19. Auswirkungen einer Entzündung auf die Funktionalität des Intestinums.....	S.68
Abb.20. Mechanische Darmmanipulation.....	S.77
Abb.21. Versuchsablauf.....	S.78
Abb.22. Darmreinigung.....	S.79
Abb.23. Gehirnentnahme.....	S.81
Abb.24. Organbad.....	S.82
Abb.25. Experimentelles Setup zur Nervenfaserableitung.....	S.84
Abb.26. Schematische Darstellung der Streptavidin-Biotin-Komplexreaktion.....	S.86
Abb.27. Versuchsprotokoll der elektrophysiologischen Versuche.....	S.91
Abb.28. Intraluminaler Druck während einer Ruhephase.....	S.93
Abb.29. Methoden der Motilitätscharakterisierung.....	S.94
Abb.30. MPO-Auswertung.....	S.95
Abb.31. C-Fos-Auswertung.....	S.96
Abb.32. Motilität der Kontrollgruppen.....	S.99
Abb.33. Fotografie eines Ileus-geschädigten Darmabschnitts (proximales Jejunum) 9h postoperativ.....	S.101
Abb.34. Beispiele von Dünndarmabschnitten.....	S.102
Abb.35. Repräsentative Aufzeichnungen des intraluminalen Drucks im Darm.....	S.105
Abb.36. Vergleich Peak (H <sub>2</sub> O) zwischen Ileus und Kontrolle. ....	S.106
Abb.37. Motilität (Peak) im Vergleich zwischen Ileus und Kontrolle.....	S.106
Abb.38. Vergleich AUC (H <sub>2</sub> O) zwischen Ileus und Kontrolle.....	S.107
Abb.39. Vergleich Frequenz zwischen Ileus und Kontrolle.....	S.108
Abb.40. Vergleich Ruhenervenfaseraktivität (impsec <sup>-1</sup> ) zwischen Ileus und Kontrolle. ....	S.109
Abb.41. Veränderung des Nervenfasersignals bei Rampendistension.....	S.111
Abb.42. Rampendistension der Kontrollgruppen.....	S.113
Abb.43. Rampendistension der Ileusgruppen.....	S.115

Abb.44. Nervenfaseraktivität der 1h-Gruppen bei Rampendistension.....	S.115
Abb.45. Nervenfaseraktivität der 3h-Gruppen bei Rampendistension.....	S.116
Abb.46. Nervenfaseraktivität der 9h-Gruppen bei Rampendistension. ....	S.117
Abb.47. Veränderung des Nervenfasersignals nach Bradykininapplikation.....	S.118
Abb.48. Vergleich der Nervenfaseraktivität nach Bradykiningabe.....	S.120
Abb.49. Nervenfaseraktivität nach Bradykiningabe (impsec <sup>-1</sup> ) bei Ileus und Kontrolle.....	S.121
Abb.50. Repräsentative Schnittbilder des Hirnstamms 9h postoperativ.....	S.123
Abb.51. Fos-positive Zellen im Nucleus tractus solitarii bei Ileus und Kontrolle.....	S.124
Abb.52. Fos-positive Zellen in der Area postrema bei Ileus und Kontrolle.....	S.125
Abb.53. MPO-positive Zellen bei Ileus und Kontrolle.....	S.126
Abb.54. Infiltration der Tunica muscularis mit MPO-positiven Entzündungszellen. ....	S.127
Abb.55. Progrediente Hemmung der Motilität durch zunehmend invasive Stimuli.....	S.130
Abb.56. Korrelation zwischen Muskelkontraktilität und Muscularisinfiltration.....	S.131
Abb.57. Nervenfasersignal und Darmmotilität nach Bradykininapplikation.....	S.143
Abb.58. Darmmotilität nach Bradykininapplikation bei Kontrolle und Ileus.....	S.144
Abb.59. Zeitlicher Zusammenhang Nervenfasersignal und Motilität nach Bradykiningabe.....	S.145
Abb.60. „Motor event“ eines Ileus-geschädigten Darmabschnitts.....	S.146
Abb.61. Vagale Aktivierung im zeitlichen Verlauf postoperativ.....	S.151

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Eigenschaften myenterischer Neurone.....	S.22
Tabelle 2. C-Fos Färbeprotokoll.....	S.87
Tabelle 3. Myeloperoxidase Färbeprotokoll.....	S.90
Tabelle 4. Verwendete Geräte und Labormaterialien.....	S.199
Tabelle 5. Verwendete Chemikalien.....	S.202
Tabelle 6. 10x Stock Solution.....	S.206
Tabelle 7. Kreb's Solution.....	S.206
Tabelle 8. 0,5 M PBS (Phosphate Buffered Solution).....	S.207
Tabelle 9. 10% NBF (Neutral Buffered Formalin).....	S.207
Tabelle 10. 25% Sucrose.....	S.207
Tabelle 11. Natrium-Azid.....	S.207
Tabelle 12. Verdünnungspuffer Triton X-100 0,5%.....	S.208
Tabelle 13. TBS (Tris Buffered Solution).....	S.208
Tabelle 14. Mounting Solution für Gefriermikrotom.....	S.208
Tabelle 15. Mounting Solution für free floating sections.....	S.208
Tabelle 16. Motilität der Kontrollgruppen.....	S.100
Tabelle 17. Motilität der Ileusgruppen.....	S.103
Tabelle 18. Vergleich der Kontrollgruppen bei Rampendistension.....	S.112
Tabelle 19. Vergleich der Ileusgruppen bei Rampendistension.....	S.114
Tabelle 20. Nervenfaserveraktivität der Kontrollgruppe nach Bradykiningabe.....	S.119
Tabelle 21. Nervenfaserveraktivität der Ileusgruppe nach Bradykiningabe.....	S.119

## 9 Literaturverzeichnis (online verfügbar)

- Adams, D. O., & Hamilton, T. A. (1987). Molecular transductional mechanisms by which IFN gamma and other signals regulate macrophage development. *Immunol Rev*, 97, 5-27.
- Ahn, H., Bronge, A., Johansson, K., Ygge, H., & Lindhagen, J. (1988). Effect of continuous postoperative epidural analgesia on intestinal motility. *Br J Surg*, 75(12), 1176-1178.
- Airapetian, A. A., Baganian, L. G., & Tatevosian, I. G. (1982). [Convergence and interaction of somatic and visceral inputs in the neurons of the ventral posterolateral nucleus of the thalamus]. *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova*, 68(7), 976-984.
- Al-Chaer, E. D., Lawand, N. B., Westlund, K. N., & Willis, W. D. (1996). Visceral nociceptive input into the ventral posterolateral nucleus of the thalamus: a new function for the dorsal column pathway. *J Neurophysiol*, 76(4), 2661-2674.
- Anthony, T. L., & Kreulen, D. L. (1990). Volume-sensitive synaptic input to neurons in guinea pig inferior mesenteric ganglion. *Am J Physiol*, 259(3 Pt 1), G490-497.
- Anthony, T. L., & Kreulen, D. L. (1994). A physiologically-evoked M1-muscarinic depolarization in guinea-pig inferior mesenteric ganglion neurons. *J Auton Nerv Syst*, 46(3), 207-215.
- Barquist, E., Bonaz, B., Martinez, V., Rivier, J., Zinner, M. J., & Tache, Y. (1996). Neuronal pathways involved in abdominal surgery-induced gastric ileus in rats. *Am J Physiol*, 270(4 Pt 2), R888-894.
- Bauer, A. J. (1996). Transplantation-induced injuries of the intestinal muscularis and its innervation: from preservation to chronic rejection. *Transplant Proc*, 28(5), 2539-2541.
- Bauer, A. J., & Boeckxstaens, G. E. (2004). Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil*, 16 Suppl 2, 54-60. doi: 10.1111/j.1743-3150.2004.00558.x
- Bauer, A. J., Sarr, M. G., & Szurszewski, J. H. (1991). Opioids inhibit neuromuscular transmission in circular muscle of human and baboon jejunum. *Gastroenterology*, 101(4), 970-976.
- Bauer, A. J., Schwarz, N. T., Moore, B. A., Turler, A., & Kalff, J. C. (2002). Ileus in critical illness: mechanisms and management. *Curr Opin Crit Care*, 8(2), 152-157.
- Bauer, A. J., & Szurszewski, J. H. (1991). Effect of opioid peptides on circular muscle of canine duodenum. *J Physiol*, 434, 409-422.
- Bayguinov, P. O., Hennig, G. W., & Smith, T. K. (2010). Calcium activity in different classes of myenteric neurons underlying the migrating motor complex in the murine colon. *J Physiol*, 588(Pt 3), 399-421. doi: 10.1113/jphysiol.2009.181172
- Bayliss, W. M., & Starling, E. H. (1901). The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol*, 26(3-4), 125-138.
- Beacham, W. S., & Perl, E. R. (1964). Background and Reflex Discharge of Sympathetic Preganglionic Neurons in the Spinal Cat. *J Physiol*, 172, 400-416.
- Berntson, G. G., Sarter, M., & Cacioppo, J. T. (2003). Ascending visceral regulation of cortical affective information processing. *Eur J Neurosci*, 18(8), 2103-2109.
- Berthoud, H. R., Blackshaw, L. A., Brookes, S. J., & Grundy, D. (2004). Neuroanatomy of extrinsic afferents supplying the gastrointestinal tract.

- Neurogastroenterol Motil*, 16 Suppl 1, 28-33. doi: 10.1111/j.1743-3150.2004.00471.x
- Berthoud, H. R., Jedrzejewska, A., & Powley, T. L. (1990). Simultaneous labeling of vagal innervation of the gut and afferent projections from the visceral forebrain with Dil injected into the dorsal vagal complex in the rat. *J Comp Neurol*, 301(1), 65-79. doi: 10.1002/cne.903010107
- Berthoud, H. R., Kressel, M., Raybould, H. E., & Neuhuber, W. L. (1995). Vagal sensors in the rat duodenal mucosa: distribution and structure as revealed by in vivo Dil-tracing. *Anat Embryol (Berl)*, 191(3), 203-212.
- Berthoud, H. R., Lynn, P. A., & Blackshaw, L. A. (2001). Vagal and spinal mechanosensors in the rat stomach and colon have multiple receptive fields. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280(5), R1371-1381.
- Berthoud, H. R., & Patterson, L. M. (1996). Anatomical relationship between vagal afferent fibers and CCK-immunoreactive entero-endocrine cells in the rat small intestinal mucosa. *Acta Anat (Basel)*, 156(2), 123-131.
- Berthoud, H. R., Patterson, L. M., Neumann, F., & Neuhuber, W. L. (1997). Distribution and structure of vagal afferent intraganglionic laminar endings (IGLEs) in the rat gastrointestinal tract. *Anat Embryol (Berl)*, 195(2), 183-191.
- Berthoud, H. R., & Powley, T. L. (1992). Vagal afferent innervation of the rat fundic stomach: morphological characterization of the gastric tension receptor. *J Comp Neurol*, 319(2), 261-276. doi: 10.1002/cne.903190206
- Bertrand, P. P. (2009). The cornucopia of intestinal chemosensory transduction. *Front Neurosci*, 3, 48. doi: 10.3389/neuro.21.003.2009
- Bertrand, P. P., Kunze, W. A., Bornstein, J. C., Furness, J. B., & Smith, M. L. (1997). Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am J Physiol*, 273(2 Pt 1), G422-435.
- Bessou, P., & Perl, E. R. (1966). A movement receptor of the small intestine. *J Physiol*, 182(2), 404-426.
- Bielefeldt, K., Ozaki, N., & Gebhart, G. F. (2002). Mild gastritis alters voltage-sensitive sodium currents in gastric sensory neurons in rats. *Gastroenterology*, 122(3), 752-761.
- Blackshaw, L. A., & Grundy, D. (1993). Effects of 5-hydroxytryptamine on discharge of vagal mucosal afferent fibres from the upper gastrointestinal tract of the ferret. *J Auton Nerv Syst*, 45(1), 41-50.
- Blackshaw, L. A., Grundy, D., & Scratcherd, T. (1987a). Involvement of gastrointestinal mechano- and intestinal chemoreceptors in vagal reflexes: an electrophysiological study. *J Auton Nerv Syst*, 18(3), 225-234.
- Blackshaw, L. A., Grundy, D., & Scratcherd, T. (1987b). Vagal afferent discharge from gastric mechanoreceptors during contraction and relaxation of the ferret corpus. *J Auton Nerv Syst*, 18(1), 19-24.
- Blumberg, H., Haupt, P., Janig, W., & Kohler, W. (1983). Encoding of visceral noxious stimuli in the discharge patterns of visceral afferent fibres from the colon. *Pflugers Arch*, 398(1), 33-40.
- Boeckxstaens, G. E., Hirsch, D. P., Kodde, A., Moojen, T. M., Blackshaw, A., Tytgat, G. N., & Blommaart, P. J. (1999). Activation of an adrenergic and vagally-mediated NANC pathway in surgery-induced fundic relaxation in the rat. *Neurogastroenterol Motil*, 11(6), 467-474.
- Boeckxstaens, G. E., Hollmann, M., Heisterkamp, S. H., Robberecht, P., de Jonge, W. J., van Den Wijngaard, R. M., . . . Blommaart, P. J. (2000). Evidence for VIP(1)/PACAP receptors in the afferent pathway mediating surgery-induced

- fundic relaxation in the rat. *Br J Pharmacol*, 131(4), 705-710. doi: 10.1038/sj.bjp.0703625
- Bohm, B., Milsom, J. W., & Fazio, V. W. (1995). Postoperative intestinal motility following conventional and laparoscopic intestinal surgery. *Arch Surg*, 130(4), 415-419.
- Bonaz, B., & Tache, Y. (1997). Corticotropin-releasing factor and systemic capsaicin-sensitive afferents are involved in abdominal surgery-induced Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res*, 748(1-2), 12-20.
- Booth, C. E., Kirkup, A. J., Hicks, G. A., Humphrey, P. P., & Grundy, D. (2001). Somatostatin sst(2) receptor-mediated inhibition of mesenteric afferent nerves of the jejunum in the anesthetized rat. *Gastroenterology*, 121(2), 358-369.
- Booth, C. E., Shaw, J., Hicks, G. A., Kirkup, A. J., Winchester, W., & Grundy, D. (2008). Influence of the pattern of jejunal distension on mesenteric afferent sensitivity in the anaesthetized rat. *Neurogastroenterol Motil*, 20(2), 149-158. doi: 10.1111/j.1365-2982.2007.01003.x
- Bornstein, J. C., Costa, M., Furness, J. B., & Lang, R. J. (1986). Electrophysiological analysis of projections of enteric inhibitory motoneurons in the guinea-pig small intestine. *J Physiol*, 370, 61-74.
- Bornstein, J. C., Hendriks, R., Furness, J. B., & Trussell, D. C. (1991). Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J Comp Neurol*, 314(3), 437-451. doi: 10.1002/cne.903140303
- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., . . . Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 405(6785), 458-462. doi: 10.1038/35013070
- Brehmer, A. (2006). Structure of enteric neurons. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 186, 1-91.
- Brehmer, A., Rupprecht, H., & Neuhuber, W. (2010). Two submucosal nerve plexus in human intestines. *Histochem Cell Biol*, 133(2), 149-161. doi: 10.1007/s00418-009-0657-2
- Brierley, S. M., Carter, R., Jones, W., 3rd, Xu, L., Robinson, D. R., Hicks, G. A., . . . Blackshaw, L. A. (2005). Differential chemosensory function and receptor expression of splanchnic and pelvic colonic afferents in mice. *J Physiol*, 567(Pt 1), 267-281. doi: 10.1113/jphysiol.2005.089714
- Brierley, S. M., Hughes, P. A., Page, A. J., Kwan, K. Y., Martin, C. M., O'Donnell, T. A., . . . Blackshaw, L. A. (2009). The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algescic stimuli. *Gastroenterology*, 137(6), 2084-2095 e2083. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.048
- Brierley, S. M., Jones, R. C., 3rd, Gebhart, G. F., & Blackshaw, L. A. (2004). Splanchnic and pelvic mechanosensory afferents signal different qualities of colonic stimuli in mice. *Gastroenterology*, 127(1), 166-178.
- Brierley, S. M., Jones, R. C., 3rd, Xu, L., Gebhart, G. F., & Blackshaw, L. A. (2005). Activation of splanchnic and pelvic colonic afferents by bradykinin in mice. *Neurogastroenterol Motil*, 17(6), 854-862. doi: 10.1111/j.1365-2982.2005.00710.x
- Brierley, S. M., Page, A. J., Hughes, P. A., Adam, B., Liebrechts, T., Cooper, N. J., . . . Blackshaw, L. A. (2008). Selective role for TRPV4 ion channels in visceral sensory pathways. *Gastroenterology*, 134(7), 2059-2069. doi: 10.1053/j.gastro.2008.01.074

- Brookes, S. J., Meedeniya, A. C., Jobling, P., & Costa, M. (1997). Orally projecting interneurons in the guinea-pig small intestine. *J Physiol*, *505* ( Pt 2), 473-491.
- Brookes, S. J., Steele, P. A., & Costa, M. (1991). Identification and immunohistochemistry of cholinergic and non-cholinergic circular muscle motor neurons in the guinea-pig small intestine. *Neuroscience*, *42*(3), 863-878.
- Brtva, R. D., Iwamoto, G. A., & Longhurst, J. C. (1989). Distribution of cell bodies for primary afferent fibers from the stomach of the cat. *Neurosci Lett*, *105*(3), 287-293.
- Bruggemann, J., Shi, T., & Apkarian, A. V. (1994). Squirrel monkey lateral thalamus. II. Viscerosomatic convergent representation of urinary bladder, colon, and esophagus. *J Neurosci*, *14*(11 Pt 2), 6796-6814.
- Bruggemann, J., Shi, T., & Apkarian, A. V. (1997). Viscero-somatic neurons in the primary somatosensory cortex (SI) of the squirrel monkey. *Brain Res*, *756*(1-2), 297-300.
- Bruggemann, J., Shi, T., & Apkarian, A. V. (1998). Viscerosomatic interactions in the thalamic ventral posterolateral nucleus (VPL) of the squirrel monkey. *Brain Res*, *787*(2), 269-276.
- Brunsdon, A. M., & Grundy, D. (1999). Sensitization of visceral afferents to bradykinin in rat jejunum in vitro. *J Physiol*, *521* Pt 2, 517-527.
- Bueno, L., & Fioramonti, J. (1999). Effects of inflammatory mediators on gut sensitivity. *Can J Gastroenterol*, *13* Suppl A, 42A-46A.
- Bult, H., Boeckxstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Jordaens, F. H., Van Maercke, Y. M., & Herman, A. G. (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*, *345*(6273), 346-347. doi: 10.1038/345346a0
- Bulygin, I. A. (1983). A consideration of the general principles of organization of sympathetic ganglia. *J Auton Nerv Syst*, *8*(4), 303-330.
- Bushnell, M. C., & Duncan, G. H. (1989). Sensory and affective aspects of pain perception: is medial thalamus restricted to emotional issues? *Exp Brain Res*, *78*(2), 415-418.
- Carlos, T. M., & Harlan, J. M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, *84*(7), 2068-2101.
- Castex, N., Fioramonti, J., Fargeas, M. J., More, J., & Bueno, L. (1994). Role of 5-HT<sub>3</sub> receptors and afferent fibers in the effects of mast cell degranulation on colonic motility in rats. *Gastroenterology*, *107*(4), 976-984.
- Cervero, F. (1991). Mechanisms of acute visceral pain. *Br Med Bull*, *47*(3), 549-560.
- Cervero, F. (1994). Sensory innervation of the viscera: peripheral basis of visceral pain. *Physiol Rev*, *74*(1), 95-138.
- Chen, C. Y., Million, M., Adelson, D. W., Martinez, V., Rivier, J., & Tache, Y. (2002). Intracisternal urocortin inhibits vagally stimulated gastric motility in rats: role of CRF(2). *Br J Pharmacol*, *136*(2), 237-247. doi: 10.1038/sj.bjp.0704713
- Chen, X., & Levine, J. D. (2005). Epinephrine-induced excitation and sensitization of rat C-fiber nociceptors. *J Pain*, *6*(7), 439-446. doi: 10.1016/j.jpain.2005.02.004
- Clarke, G. D., & Davison, J. S. (1978). Mucosal receptors in the gastric antrum and small intestine of the rat with afferent fibres in the cervical vagus. *J Physiol*, *284*, 55-67.
- Clerc, N. (1983). Afferent innervation of the lower oesophageal sphincter of the cat. An HRP study. *J Auton Nerv Syst*, *9*(4), 623-636.
- Clevers, G. J., Smout, A. J., van der Schee, E. J., & Akkermans, L. M. (1991). Myoelectrical and motor activity of the stomach in the first days after abdominal

- surgery: evaluation by electrogastrography and impedance gastrography. *J Gastroenterol Hepatol*, 6(3), 253-259.
- Collins, S. M., Hurst, S. M., Main, C., Stanley, E., Khan, I., Blennerhassett, P., & Swain, M. (1992). Effect of inflammation of enteric nerves. Cytokine-induced changes in neurotransmitter content and release. *Ann N Y Acad Sci*, 664, 415-424.
- Collman, P. I., Tremblay, L., & Diamant, N. E. (1992). The distribution of spinal and vagal sensory neurons that innervate the esophagus of the cat. *Gastroenterology*, 103(3), 817-822.
- Colotta, F., Polentarutti, N., Sironi, M., & Mantovani, A. (1992). Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J Biol Chem*, 267(26), 18278-18283.
- Condon, R. E., Frantzides, C. T., Cowles, V. E., Mahoney, J. L., Schulte, W. J., & Sarna, S. K. (1986). Resolution of postoperative ileus in humans. *Ann Surg*, 203(5), 574-581.
- Cooke, H. J., Sidhu, M., Fox, P., Wang, Y. Z., & Zimmermann, E. M. (1997). Substance P as a mediator of colonic secretory reflexes. *Am J Physiol*, 272(2 Pt 1), G238-245.
- Costa, M., & Furness, J. B. (1984). Somatostatin is present in a subpopulation of noradrenergic nerve fibres supplying the intestine. *Neuroscience*, 13(3), 911-919.
- Costa, M., Furness, J. B., Llewellyn-Smith, I. J., & Cuello, A. C. (1981). Projections of substance P-containing neurons within the guinea-pig small intestine. *Neuroscience*, 6(3), 411-424.
- Craig, A. D. (2003). Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. *Annu Rev Neurosci*, 26, 1-30. doi: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131022
- Craig, A. D., Bushnell, M. C., Zhang, E. T., & Blomqvist, A. (1994). A thalamic nucleus specific for pain and temperature sensation. *Nature*, 372(6508), 770-773. doi: 10.1038/372770a0
- Crowcroft, P. J., Holman, M. E., & Szurszewski, J. H. (1971). Excitatory input from the distal colon to the inferior mesenteric ganglion in the guinea-pig. *J Physiol*, 219(2), 443-461.
- Davis, K. A., Masella, J., & Blennerhassett, M. G. (1998). Acetylcholine metabolism in the inflamed rat intestine. *Exp Neurol*, 152(2), 251-258. doi: 10.1006/exnr.1998.6839
- Davison, J. S. (1972). Response of single vagal afferent fibres to mechanical and chemical stimulation of the gastric and duodenal mucosa in cats. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 57(4), 405-416.
- De Groat, W. C., & Krier, J. (1979). The central control of the lumbar sympathetic pathway to the large intestine of the cat. *J Physiol*, 289, 449-468.
- de Jonge, W. J., The, F. O., van der Coelen, D., Bennink, R. J., Reitsma, P. H., van Deventer, S. J., . . . Boeckxstaens, G. E. (2004). Mast cell degranulation during abdominal surgery initiates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology*, 127(2), 535-545.
- de Jonge, W. J., van den Wijngaard, R. M., The, F. O., ter Beek, M. L., Bennink, R. J., Tytgat, G. N., . . . Boeckxstaens, G. E. (2003). Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology*, 125(4), 1137-1147.

- de Jonge, W. J., van der Zanden, E. P., The, F. O., Bijlsma, M. F., van Westerloo, D. J., Bennink, R. J., . . . Boeckxstaens, G. E. (2005). Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol*, *6*(8), 844-851. doi: 10.1038/ni1229
- De Winter, B. Y., Boeckxstaens, G. E., De Man, J. G., Moreels, T. G., Herman, A. G., & Pelckmans, P. A. (1997). Effect of adrenergic and nitrenergic blockade on experimental ileus in rats. *Br J Pharmacol*, *120*(3), 464-468. doi: 10.1038/sj.bjp.0700913
- De Winter, B. Y., Robberecht, P., Boeckxstaens, G. E., De Man, J. G., Moreels, T. G., Herman, A. G., & Pelckmans, P. A. (1998). Role of VIP1/PACAP receptors in postoperative ileus in rats. *Br J Pharmacol*, *124*(6), 1181-1186. doi: 10.1038/sj.bjp.0701954
- Deitch, E. A. (1990). Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma*, *30*(12 Suppl), S184-189.
- Dekkers, J. A., Akkermans, L. M., & Kroese, A. B. (1997). Effects of the inflammatory mediator prostaglandin E2 on myenteric neurons in guinea pig ileum. *Am J Physiol*, *272*(6 Pt 1), G1451-1456.
- Der, T., Bercik, P., Donnelly, G., Jackson, T., Berezin, I., Collins, S. M., & Huizinga, J. D. (2000). Interstitial cells of cajal and inflammation-induced motor dysfunction in the mouse small intestine. *Gastroenterology*, *119*(6), 1590-1599.
- Derbyshire, S. W. (2003). A systematic review of neuroimaging data during visceral stimulation. *Am J Gastroenterol*, *98*(1), 12-20. doi: 10.1111/j.1572-0241.2003.07168.x
- Distel, R. J., & Spiegelman, B. M. (1990). Protooncogene c-fos as a transcription factor. *Adv Cancer Res*, *55*, 37-55.
- Dubois, F., Icard, P., Berthelot, G., & Levard, H. (1990). Coelioscopic cholecystectomy. Preliminary report of 36 cases. *Ann Surg*, *211*(1), 60-62.
- Dunn, P. M., & Rang, H. P. (1990). Bradykinin-induced depolarization of primary afferent nerve terminals in the neonatal rat spinal cord in vitro. *Br J Pharmacol*, *100*(3), 656-660.
- Dutsch, M., Eichhorn, U., Worl, J., Wank, M., Berthoud, H. R., & Neuhuber, W. L. (1998). Vagal and spinal afferent innervation of the rat esophagus: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study with special emphasis on calcium-binding proteins. *J Comp Neurol*, *398*(2), 289-307.
- Eskandari, M. K., Kalff, J. C., Billiar, T. R., Lee, K. K., & Bauer, A. J. (1997). Lipopolysaccharide activates the muscularis macrophage network and suppresses circular smooth muscle activity. *Am J Physiol*, *273*(3 Pt 1), G727-734.
- Esser, M. J., Mahoney, J. L., Robinson, J. C., Cowles, V. E., & Condon, R. E. (1987). Effects of adrenergic agents on colonic motility. *Surgery*, *102*(2), 416-423.
- Fahrenkrug, J. (1979). Vasoactive intestinal polypeptide: measurement, distribution and putative neurotransmitter function. *Digestion*, *19*(3), 149-169.
- Faussone-Pellegrini, M. S., Gay, J., Vannucchi, M. G., Corsani, L., & Fioramonti, J. (2002). Alterations of neurokinin receptors and interstitial cells of Cajal during and after jejunal inflammation induced by *Nippostrongylus brasiliensis* in the rat. *Neurogastroenterol Motil*, *14*(1), 83-95.
- Faussone-Pellegrini, M. S., Pantalone, D., & Cortesini, C. (1990). Smooth muscle cells, interstitial cells of Cajal and myenteric plexus interrelationships in the human colon. *Acta Anat (Basel)*, *139*(1), 31-44.

- Feher, E., Fodor, M., & Burnstock, G. (1992). Distribution of somatostatin-immunoreactive nerve fibres in Peyer's patches. *Gut*, 33(9), 1195-1198.
- Feng, B., & Gebhart, G. F. (2011). Characterization of silent afferents in the pelvic and splanchnic innervations of the mouse colorectum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300(1), G170-180. doi: 10.1152/ajpgi.00406.2010
- Ferens, D., Baell, J., Lessene, G., Smith, J. E., & Furness, J. B. (2007). Effects of modulators of Ca(2+)-activated, intermediate-conductance potassium channels on motility of the rat small intestine, in vivo. *Neurogastroenterol Motil*, 19(5), 383-389. doi: 10.1111/j.1365-2982.2007.00898.x
- Finkel, M. P., Biskis, B. O., & Jinkins, P. B. (1966). Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science*, 151(3711), 698-701.
- Fox, E. A., Phillips, R. J., Martinson, F. A., Baronowsky, E. A., & Powley, T. L. (2000). Vagal afferent innervation of smooth muscle in the stomach and duodenum of the mouse: morphology and topography. *J Comp Neurol*, 428(3), 558-576.
- Frieling, T., Wood, J. D., & Cooke, H. J. (1992). Submucosal reflexes: distension-evoked ion transport in the guinea pig distal colon. *Am J Physiol*, 263(1 Pt 1), G91-96.
- Furness, J. B., Alex, G., Clark, M. J., & Lal, V. V. (2003). Morphologies and projections of defined classes of neurons in the submucosa of the guinea-pig small intestine. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 272(2), 475-483. doi: 10.1002/ar.a.10064
- Furness, J. B., & Costa, M. (1979). Projections of intestinal neurons showing immunoreactivity for vasoactive intestinal polypeptide are consistent with these neurons being the enteric inhibitory neurons. *Neurosci Lett*, 15(2-3), 199-204.
- Furness, J. B., Jones, C., Nurgali, K., & Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol*, 72(2), 143-164. doi: 10.1016/j.pneurobio.2003.12.004
- Furness, J. B., Kunze, W. A., Bertrand, P. P., Clerc, N., & Bornstein, J. C. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol*, 54(1), 1-18.
- Furness, J. B., Kunze, W. A., & Clerc, N. (1999). Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 1), G922-928.
- Furness, J. B., Li, Z. S., Young, H. M., & Forstermann, U. (1994). Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. *Cell Tissue Res*, 277(1), 139-149.
- Furness, J. B., Robbins, H. L., Xiao, J., Stebbing, M. J., & Nurgali, K. (2004). Projections and chemistry of Dogiel type II neurons in the mouse colon. *Cell Tissue Res*, 317(1), 1-12. doi: 10.1007/s00441-004-0895-5
- Furness, J. B., Trussell, D. C., Pompolo, S., Bornstein, J. C., & Smith, T. K. (1990). Calbindin neurons of the guinea-pig small intestine: quantitative analysis of their numbers and projections. *Cell Tissue Res*, 260(2), 261-272.
- Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J Anat*, 111(Pt 1), 69-97.
- Galligan, J. J., LePard, K. J., Schneider, D. A., & Zhou, X. (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst*, 81(1-3), 97-103.
- Gamboa-Esteves, F. O., Lima, D., & Batten, T. F. (2001). Neurochemistry of superficial spinal neurones projecting to nucleus of the solitary tract that express c-fos on chemical somatic and visceral nociceptive input in the rat. *Metab Brain Dis*, 16(3-4), 151-164.

- Garcia-Caballero, M., & Vara-Thorbeck, C. (1993). The evolution of postoperative ileus after laparoscopic cholecystectomy. A comparative study with conventional cholecystectomy and sympathetic blockade treatment. *Surg Endosc*, 7(5), 416-419.
- Garry, R. C. (1933). The nervous control of the caudal region of the large bowel in the cat. *J Physiol*, 77(4), 422-431.
- Gebhart, G. F. (1996). Visceral polymodal receptors. *Prog Brain Res*, 113, 101-112.
- Gebhart, G. F. (2000a). Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications IV. Visceral afferent contributions to the pathobiology of visceral pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278(6), G834-838.
- Gebhart, G. F. (2000b). Visceral pain-peripheral sensitisation. *Gut*, 47 Suppl 4, iv54-55; discussion iv58.
- Gola, M., & Niel, J. P. (1993). Electrical and integrative properties of rabbit sympathetic neurones re-evaluated by patch clamping non-dissociated cells. *J Physiol*, 460, 327-349.
- Goldhill, J. M., Sanders, K. M., Sjogren, R., & Shea-Donohue, T. (1995). Changes in enteric neural regulation of smooth muscle in a rabbit model of small intestinal inflammation. *Am J Physiol*, 268(5 Pt 1), G823-830.
- Graham, R. C., Jr., & Karnovsky, M. J. (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*, 14(4), 291-302.
- Green, P. S., Mendez, A. J., Jacob, J. S., Crowley, J. R., Growdon, W., Hyman, B. T., & Heinecke, J. W. (2004). Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 90(3), 724-733. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02527.x
- Gross, K. J., & Pothoulakis, C. (2007). Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 13(7), 918-932. doi: 10.1002/ibd.20129
- Gu, Q., Lin, Y. S., & Lee, L. Y. (2007). Epinephrine enhances the sensitivity of rat vagal chemosensitive neurons: role of beta3-adrenoceptor. *J Appl Physiol* (1985), 102(4), 1545-1555. doi: 10.1152/jappphysiol.01010.2006
- Gwynne, R. M., & Bornstein, J. C. (2007a). Mechanisms underlying nutrient-induced segmentation in isolated guinea pig small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292(4), G1162-1172. doi: 10.1152/ajpgi.00441.2006
- Gwynne, R. M., & Bornstein, J. C. (2007b). Synaptic transmission at functionally identified synapses in the enteric nervous system: roles for both ionotropic and metabotropic receptors. *Curr Neuropharmacol*, 5(1), 1-17.
- Habler, H. J., Janig, W., & Koltzenburg, M. (1990). Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol*, 425, 545-562.
- Hallerback, B., Carlsen, E., Carlsson, K., Enkvist, C., Glise, H., Haffner, J., . . . Kirno, K. (1987). Beta-adrenoceptor blockade in the treatment of postoperative adynamic ileus. *Scand J Gastroenterol*, 22(2), 149-155.
- Hanker, J. S., Yates, P. E., Metz, C. B., & Rustioni, A. (1977). A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. *Histochem J*, 9(6), 789-792.
- Harrison, J. S., & McSwiney, B. A. (1936). The chemical transmitter of motor impulses to the stomach. *J Physiol*, 87(1), 79-86.
- Haupt, P., Janig, W., & Kohler, W. (1983). Response pattern of visceral afferent fibres, supplying the colon, upon chemical and mechanical stimuli. *Pflugers Arch*, 398(1), 41-47.

- Henry, T. R. (2002). Therapeutic mechanisms of vagus nerve stimulation. *Neurology*, 59(6 Suppl 4), S3-14.
- Hens, J., Vanderwinden, J. M., De Laet, M. H., Scheuermann, D. W., & Timmermans, J. P. (2001). Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. *J Neurochem*, 76(2), 464-471.
- Herbert, H., Moga, M. M., & Saper, C. B. (1990). Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol*, 293(4), 540-580. doi: 10.1002/cne.902930404
- Herrera, R., Agarwal, S., Walton, K., Satterberg, B., Distel, R. J., Goodman, R., . . . Roberts, T. M. (1990). A direct role for c-fos in AP-1-dependent gene transcription. *Cell Growth Differ*, 1(10), 483-490.
- Hicks, G. A., Coldwell, J. R., Schindler, M., Ward, P. A., Jenkins, D., Lynn, P. A., . . . Blackshaw, L. A. (2002). Excitation of rat colonic afferent fibres by 5-HT(3) receptors. *J Physiol*, 544(Pt 3), 861-869.
- Hillsley, K., Kirkup, A. J., & Grundy, D. (1998). Direct and indirect actions of 5-hydroxytryptamine on the discharge of mesenteric afferent fibres innervating the rat jejunum. *J Physiol*, 506 ( Pt 2), 551-561.
- Hirst, G. D., Holman, M. E., & Spence, I. (1974). Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J Physiol*, 236(2), 303-326.
- Hirst, G. D., & McKirdy, H. C. (1975). Synaptic potentials recorded from neurones of the submucous plexus of guinea-pig small intestine. *J Physiol*, 249(2), 369-385.
- Holte, K., & Kehlet, H. (2002). Epidural anaesthesia and analgesia - effects on surgical stress responses and implications for postoperative nutrition. *Clin Nutr*, 21(3), 199-206.
- Holzer, P. (2004). Opioids and opioid receptors in the enteric nervous system: from a problem in opioid analgesia to a possible new prokinetic therapy in humans. *Neurosci Lett*, 361(1-3), 192-195. doi: 10.1016/j.neulet.2003.12.004
- Holzer, P., & Holzer-Petsche, U. (1997). Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther*, 73(3), 173-217.
- Holzer, P., Lippe, I. T., & Amann, R. (1992). Participation of capsaicin-sensitive afferent neurons in gastric motor inhibition caused by laparotomy and intraperitoneal acid. *Neuroscience*, 48(3), 715-722.
- Holzer, P., Lippe, I. T., & Holzer-Petsche, U. (1986). Inhibition of gastrointestinal transit due to surgical trauma or peritoneal irritation is reduced in capsaicin-treated rats. *Gastroenterology*, 91(2), 360-363.
- Horowitz, B., Ward, S. M., & Sanders, K. M. (1999). Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu Rev Physiol*, 61, 19-43. doi: 10.1146/annurev.physiol.61.1.19
- Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29(4), 577-580.
- Huge, A., Kreis, M. E., Zittel, T. T., Becker, H. D., Starlinger, M. J., & Jehle, E. C. (2000). Postoperative colonic motility and tone in patients after colorectal surgery. *Dis Colon Rectum*, 43(7), 932-939.
- Hughes, P. A., Brierley, S. M., Martin, C. M., Brookes, S. J., Linden, D. R., & Blackshaw, L. A. (2009). Post-inflammatory colonic afferent sensitisation:

- different subtypes, different pathways and different time courses. *Gut*, 58(10), 1333-1341. doi: 10.1136/gut.2008.170811
- Hunt, S. P., Pini, A., & Evan, G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328(6131), 632-634. doi: 10.1038/328632a0
- Iggo, A. (1955). Tension receptors in the stomach and the urinary bladder. *J Physiol*, 128(3), 593-607.
- Iggo, A. (1957). Gastric mucosal chemoreceptors with vagal afferent fibres in the cat. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 42(4), 398-409.
- Iggo, A., & Vogt, M. (1960). Preganglionic sympathetic activity in normal and in reserpine-treated cats. *J Physiol*, 150, 114-133.
- Jacobson, K., McHugh, K., & Collins, S. M. (1995). Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat. *Gastroenterology*, 109(3), 718-722.
- Janig, W., & Koltzenburg, M. (1991). Receptive properties of sacral primary afferent neurons supplying the colon. *J Neurophysiol*, 65(5), 1067-1077.
- Janig, W., & McLachlan, E. M. (1992). Characteristics of function-specific pathways in the sympathetic nervous system. *Trends Neurosci*, 15(12), 475-481.
- Jiang, W., Kreis, M. E., Eastwood, C., Kirkup, A. J., Humphrey, P. P., & Grundy, D. (2000). 5-HT(3) and histamine H(1) receptors mediate afferent nerve sensitivity to intestinal anaphylaxis in rats. *Gastroenterology*, 119(5), 1267-1275.
- Johnson, P. J., & Bornstein, J. C. (2004). Neurokinin-1 and -3 receptor blockade inhibits slow excitatory synaptic transmission in myenteric neurons and reveals slow inhibitory input. *Neuroscience*, 126(1), 137-147. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.03.021
- Johnson, P. J., Bornstein, J. C., Yuan, S. Y., & Furness, J. B. (1996). Analysis of contributions of acetylcholine and tachykinins to neuro-neuronal transmission in motility reflexes in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol*, 118(4), 973-983.
- Kalff, J. C., Buchholz, B. M., Eskandari, M. K., Hierholzer, C., Schraut, W. H., Simmons, R. L., & Bauer, A. J. (1999). Biphasic response to gut manipulation and temporal correlation of cellular infiltrates and muscle dysfunction in rat. *Surgery*, 126(3), 498-509.
- Kalff, J. C., Carlos, T. M., Schraut, W. H., Billiar, T. R., Simmons, R. L., & Bauer, A. J. (1999). Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology*, 117(2), 378-387.
- Kalff, J. C., Schraut, W. H., Billiar, T. R., Simmons, R. L., & Bauer, A. J. (2000). Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Gastroenterology*, 118(2), 316-327.
- Kalff, J. C., Schraut, W. H., Simmons, R. L., & Bauer, A. J. (1998). Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann Surg*, 228(5), 652-663.
- Kalff, J. C., Schwarz, N. T., Walgenbach, K. J., Schraut, W. H., & Bauer, A. J. (1998). Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. *J Leukoc Biol*, 63(6), 683-691.
- Kalff, J. C., Turler, A., Schwarz, N. T., Schraut, W. H., Lee, K. K., Tweardy, D. J., . . . Bauer, A. J. (2003). Intra-abdominal activation of a local inflammatory response within the human muscularis externa during laparotomy. *Ann Surg*, 237(3), 301-315. doi: 10.1097/01.SLA.0000055742.79045.7E

- Keast, J. R., McLachlan, E. M., & Meckler, R. L. (1993). Relation between electrophysiological class and neuropeptide content of guinea pig sympathetic prevertebral neurons. *J Neurophysiol*, *69*(2), 384-394.
- Khan, I., & Collins, S. M. (1994). Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. *Gastroenterology*, *107*(3), 691-700.
- Khurana, R. K., & Petras, J. M. (1991). Sensory innervation of the canine esophagus, stomach, and duodenum. *Am J Anat*, *192*(3), 293-306. doi: 10.1002/aja.1001920309
- King, B. F., & Szurszewski, J. H. (1984). Mechanoreceptor pathways from the distal colon to the autonomic nervous system in the guinea-pig. *J Physiol*, *350*, 93-107.
- Kirchgessner, A. L., Tamir, H., & Gershon, M. D. (1992). Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. *J Neurosci*, *12*(1), 235-248.
- Klemm, M. F. (1995). Neuromuscular junctions made by nerve fibres supplying the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. *J Auton Nerv Syst*, *55*(3), 155-164.
- Kreis, M. E., Haupt, W., Kirkup, A. J., & Grundy, D. (1998). Histamine sensitivity of mesenteric afferent nerves in the rat jejunum. *Am J Physiol*, *275*(4 Pt 1), G675-680.
- Kreis, M. E., Mueller, M. H., Reber, D., Glatzle, J., Enck, P., & Grundy, D. (2003). Stress-induced attenuation of brain stem activation following intestinal anaphylaxis in the rat. *Neurosci Lett*, *345*(3), 187-191.
- Kreis, M. E., Muller, M., Zittel, T. T., Glatzle, J., & Grundy, D. (2000). Mediators of neuronal activation in the rat brainstem following intestinal anaphylaxis. *Neurosci Lett*, *289*(1), 45-48.
- Kreiss, C., Birder, L. A., Kiss, S., VanBibber, M. M., & Bauer, A. J. (2003). COX-2 dependent inflammation increases spinal Fos expression during rodent postoperative ileus. *Gut*, *52*(4), 527-534.
- Kulkarni-Narla, A., Beitz, A. J., & Brown, D. R. (1999). Catecholaminergic, cholinergic and peptidergic innervation of gut-associated lymphoid tissue in porcine jejunum and ileum. *Cell Tissue Res*, *298*(2), 275-286.
- Kunze, W. A., Bornstein, J. C., & Furness, J. B. (1995). Identification of sensory nerve cells in a peripheral organ (the intestine) of a mammal. *Neuroscience*, *66*(1), 1-4.
- Kunze, W. A., & Furness, J. B. (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol*, *61*, 117-142. doi: 10.1146/annurev.physiol.61.1.117
- Kunze, W. A., Furness, J. B., Bertrand, P. P., & Bornstein, J. C. (1998). Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch. *J Physiol*, *506* ( Pt 3), 827-842.
- Kunze, W. A., Furness, J. B., & Bornstein, J. C. (1993). Simultaneous intracellular recordings from enteric neurons reveal that myenteric AH neurons transmit via slow excitatory postsynaptic potentials. *Neuroscience*, *55*(3), 685-694.
- Li, C. G., & Rand, M. J. (1990). Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol*, *191*(3), 303-309.
- Linden, D. R., Sharkey, K. A., Ho, W., & Mawe, G. M. (2004). Cyclooxygenase-2 contributes to dysmotility and enhanced excitability of myenteric AH neurones

- in the inflamed guinea pig distal colon. *J Physiol*, 557(Pt 1), 191-205. doi: 10.1113/jphysiol.2004.062174
- Lindh, B., Hokfelt, T., & Elfvin, L. G. (1988). Distribution and origin of peptide-containing nerve fibers in the celiac superior mesenteric ganglion of the guinea-pig. *Neuroscience*, 26(3), 1037-1071.
- Liu, S., Carpenter, R. L., & Neal, J. M. (1995). Epidural anesthesia and analgesia. Their role in postoperative outcome. *Anesthesiology*, 82(6), 1474-1506.
- Liu, S., Hu, H. Z., Ren, J., Gao, C., Gao, N., Lin, Z., . . . Wood, J. D. (2001). Pre- and postsynaptic inhibition by nociceptin in guinea pig small intestinal myenteric plexus in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281(1), G237-246.
- Livingston, E. H., & Passaro, E. P., Jr. (1990). Postoperative ileus. *Dig Dis Sci*, 35(1), 121-132.
- Lomax, A. E., Bertrand, P. P., & Furness, J. B. (2001). Electrophysiological characteristics distinguish three classes of neuron in submucosal ganglia of the guinea-pig distal colon. *Neuroscience*, 103(1), 245-255.
- Lomax, A. E., Fernandez, E., & Sharkey, K. A. (2005). Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil*, 17(1), 4-15. doi: 10.1111/j.1365-2982.2004.00607.x
- Lomax, A. E., & Furness, J. B. (2000). Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res*, 302(1), 59-72.
- Lowman, R. M. (1971). The potassium depletion states and postoperative ileus. The role of the potassium ion. *Radiology*, 98(3), 691-694. doi: 10.1148/98.3.691
- Lu, G., Qian, X., Berezin, I., Telford, G. L., Huizinga, J. D., & Sarna, S. K. (1997). Inflammation modulates in vitro colonic myoelectric and contractile activity and interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol*, 273(6 Pt 1), G1233-1245.
- Luckey, A., Livingston, E., & Tache, Y. (2003). Mechanisms and treatment of postoperative ileus. *Arch Surg*, 138(2), 206-214.
- Ludwig, K. A., Frantzides, C. T., Carlson, M. A., & Grade, K. L. (1993). Myoelectric motility patterns following open versus laparoscopic cholecystectomy. *J Laparoendosc Surg*, 3(5), 461-466.
- Lynn, P., Zagorodnyuk, V., Hennig, G., Costa, M., & Brookes, S. (2005). Mechanical activation of rectal intraganglionic laminar endings in the guinea pig distal gut. *J Physiol*, 564(Pt 2), 589-601. doi: 10.1113/jphysiol.2004.080879
- Lynn, P. A., & Blackshaw, L. A. (1999). In vitro recordings of afferent fibres with receptive fields in the serosa, muscle and mucosa of rat colon. *J Physiol*, 518 (Pt 1), 271-282.
- Ma, B., Jablonska, J., Lindenmaier, W., & Dittmar, K. E. (2007). Immunohistochemical study of the reticular and vascular network of mouse lymph node using vibratome sections. *Acta Histochem*, 109(1), 15-28. doi: 10.1016/j.acthis.2006.11.002
- Ma, R. C., & Szurszewski, J. H. (1996a). Modulation by opioid peptides of mechanosensory pathways supplying the guinea-pig inferior mesenteric ganglion. *J Physiol*, 491 (Pt 2), 435-445.
- Ma, R. C., & Szurszewski, J. H. (1996b). Release of calcitonin gene-related peptide in guinea pig inferior mesenteric ganglion. *Peptides*, 17(1), 161-170.
- Mann, P. T., Furness, J. B., Pompolo, S., & Mader, M. (1995). Chemical coding of neurons that project from different regions of intestine to the coeliac ganglion of the guinea pig. *J Auton Nerv Syst*, 56(1-2), 15-25.
- Mann, P. T., Southwell, B. R., Young, H. M., & Furness, J. B. (1997). Appositions made by axons of descending interneurons in the guinea-pig small intestine, investigated by confocal microscopy. *J Chem Neuroanat*, 12(3), 151-164.

- Mao, Y., Wang, B., & Kunze, W. (2006). Characterization of myenteric sensory neurons in the mouse small intestine. *J Neurophysiol*, 96(3), 998-1010. doi: 10.1152/jn.00204.2006
- Maubach, K. A., & Grundy, D. (1999). The role of prostaglandins in the bradykinin-induced activation of serosal afferents of the rat jejunum in vitro. *J Physiol*, 515 (Pt 1), 277-285.
- Mazzuoli, G., & Schemann, M. (2009). Multifunctional rapidly adapting mechanosensitive enteric neurons (RAMEN) in the myenteric plexus of the guinea pig ileum. *J Physiol*, 587(Pt 19), 4681-4694. doi: 10.1113/jphysiol.2009.177105
- Menetrey, D., Gannon, A., Levine, J. D., & Basbaum, A. I. (1989). Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation. *J Comp Neurol*, 285(2), 177-195. doi: 10.1002/cne.902850203
- Messenger, J. P., & Furness, J. B. (1993). Distribution of enteric nerve cells projecting to the superior and inferior mesenteric ganglia of the guinea-pig. *Cell Tissue Res*, 271(2), 333-339.
- Mikkelsen, H. B. (1995). Macrophages in the external muscle layers of mammalian intestines. *Histol Histopathol*, 10(3), 719-736.
- Miller, A. D., & Leslie, R. A. (1994). The area postrema and vomiting. *Front Neuroendocrinol*, 15(4), 301-320. doi: 10.1006/frne.1994.1012
- Miller, S. M., Ermilov, L. G., Szurszewski, J. H., Hammond, P. I., & Brimijoin, S. (1997). Selective disruption of neurotransmission by acetylcholinesterase antibodies in sympathetic ganglia examined with intracellular microelectrodes. *J Auton Nerv Syst*, 67(3), 156-167.
- Miller, S. M., & Szurszewski, J. H. (1997). Colonic mechanosensory afferent input to neurons in the mouse superior mesenteric ganglion. *Am J Physiol*, 272(2 Pt 1), G357-366.
- Miller, S. M., & Szurszewski, J. H. (2002). Relationship between colonic motility and cholinergic mechanosensory afferent synaptic input to mouse superior mesenteric ganglion. *Neurogastroenterol Motil*, 14(4), 339-348.
- Miller, S. M., & Szurszewski, J. H. (2003). Circumferential, not longitudinal, colonic stretch increases synaptic input to mouse prevertebral ganglion neurons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285(6), G1129-1138. doi: 10.1152/ajpgi.00292.2003
- Miyashita, T., & Williams, C. L. (2006). Epinephrine administration increases neural impulses propagated along the vagus nerve: Role of peripheral beta-adrenergic receptors. *Neurobiol Learn Mem*, 85(2), 116-124. doi: 10.1016/j.nlm.2005.08.013
- Monro, R. L., Bornstein, J. C., & Bertrand, P. P. (2005). Slow excitatory post-synaptic potentials in myenteric AH neurons of the guinea-pig ileum are reduced by the 5-hydroxytryptamine<sub>7</sub> receptor antagonist SB 269970. *Neuroscience*, 134(3), 975-986. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.05.006
- Morrison, J. F. (1973). Splanchnic slowly adapting mechanoreceptors with punctate receptive fields in the mesentery and gastrointestinal tract of the cat. *J Physiol*, 233(2), 349-361.
- Moss, G., Regal, M. E., & Lichtig, L. (1986). Reducing postoperative pain, narcotics, and length of hospitalization. *Surgery*, 99(2), 206-210.
- Mueller, M. H., Glatzle, J., Kampitoglou, D., Kasperek, M. S., Grundy, D., & Kreis, M. E. (2008). Differential sensitization of afferent neuronal pathways during

- postoperative ileus in the mouse jejunum. *Ann Surg*, 247(5), 791-802. doi: 10.1097/SLA.0b013e31816a9d97
- Mutafova-Yambolieva, V. N., Hwang, S. J., Hao, X., Chen, H., Zhu, M. X., Wood, J. D., . . . Sanders, K. M. (2007). Beta-nicotinamide adenine dinucleotide is an inhibitory neurotransmitter in visceral smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(41), 16359-16364. doi: 10.1073/pnas.0705510104
- Nadelhaft, I., de Groat, W. C., & Morgan, C. (1986). The distribution and morphology of parasympathetic preganglionic neurons in the cat sacral spinal cord as revealed by horseradish peroxidase applied to the sacral ventral roots. *J Comp Neurol*, 249(1), 48-56. doi: 10.1002/cne.902490105
- Ness, T. J., & Gebhart, G. F. (1990). Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain*, 41(2), 167-234.
- Nishi, S., & North, R. A. (1973). Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *J Physiol*, 231(3), 471-491.
- Nurgali, K., Stebbing, M. J., & Furness, J. B. (2004). Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of enteric neurons in the mouse colon. *J Comp Neurol*, 468(1), 112-124. doi: 10.1002/cne.10948
- Ogilvy, A. J., & Smith, G. (1995). The gastrointestinal tract after anaesthesia. *Eur J Anaesthesiol Suppl*, 10, 35-42.
- Page, A. J., & Blackshaw, L. A. (1998). An in vitro study of the properties of vagal afferent fibres innervating the ferret oesophagus and stomach. *J Physiol*, 512 ( Pt 3), 907-916.
- Page, A. J., Martin, C. M., & Blackshaw, L. A. (2002). Vagal mechanoreceptors and chemoreceptors in mouse stomach and esophagus. *J Neurophysiol*, 87(4), 2095-2103. doi: 10.1152/jn.00785.2001
- Palecek, J., Paleckova, V., & Willis, W. D. (2003). Fos expression in spinothalamic and postsynaptic dorsal column neurons following noxious visceral and cutaneous stimuli. *Pain*, 104(1-2), 249-257.
- Palecek, J., & Willis, W. D. (2003). The dorsal column pathway facilitates visceromotor responses to colorectal distention after colon inflammation in rats. *Pain*, 104(3), 501-507.
- Parkman, H. P., Ma, R. C., Stapelfeldt, W. H., & Szurszewski, J. H. (1993). Direct and indirect mechanosensory pathways from the colon to the inferior mesenteric ganglion. *Am J Physiol*, 265(3 Pt 1), G499-505.
- Pavli, P., Maxwell, L., Van de Pol, E., & Doe, F. (1996). Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. *Clin Exp Immunol*, 104(1), 124-132.
- Petersen, P., Gao, C., Arendt-Nielsen, L., Gregersen, H., & Drewes, A. M. (2003). Pain intensity and biomechanical responses during ramp-controlled distension of the human rectum. *Dig Dis Sci*, 48(7), 1310-1316.
- Pfoch, M., & Unsicker, K. (1972). Electron microscopic study on the innervation of Peyer's patches of the Syrian hamster. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 123(3), 425-429.
- Phillips, R. J., & Powley, T. L. (2000). Tension and stretch receptors in gastrointestinal smooth muscle: re-evaluating vagal mechanoreceptor electrophysiology. *Brain Res Brain Res Rev*, 34(1-2), 1-26.
- Pol, O., Alameda, F., & Puig, M. M. (2001). Inflammation enhances mu-opioid receptor transcription and expression in mice intestine. *Mol Pharmacol*, 60(5), 894-899.
- Pol, O., Sanchez, B., & Puig, M. M. (1996). Peripheral effects of opioids in a model of intestinal inflammation in mice. *Pharmacology*, 53(6), 340-350.

- Pompolo, S., & Furness, J. B. (1988). Ultrastructure and synaptic relationships of calbindin-reactive, Dogiel type II neurons, in myenteric ganglia of guinea-pig small intestine. *J Neurocytol*, 17(6), 771-782.
- Pompolo, S., & Furness, J. B. (1990). Ultrastructure and synaptology of neurons immunoreactive for gamma-aminobutyric acid in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J Neurocytol*, 19(4), 539-549.
- Pompolo, S., & Furness, J. B. (1993). Origins of synaptic inputs to calretinin immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine. *J Neurocytol*, 22(7), 531-546.
- Pompolo, S., & Furness, J. B. (1998). Quantitative analysis of inputs to somatostatin-immunoreactive descending interneurons in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res*, 294(2), 219-226.
- Prasad, M., & Matthews, J. B. (1999). Deflating postoperative ileus. *Gastroenterology*, 117(2), 489-492.
- Qu, Z. D., Thacker, M., Castelucci, P., Bagyanszki, M., Epstein, M. L., & Furness, J. B. (2008). Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell Tissue Res*, 334(2), 147-161. doi: 10.1007/s00441-008-0684-7
- Ransone, L. J., & Verma, I. M. (1990). Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol*, 6, 539-557. doi: 10.1146/annurev.cb.06.110190.002543
- Reed, D. E., & Vanner, S. J. (2001). Converging and diverging cholinergic inputs from submucosal neurons amplify activity of secretomotor neurons in guinea-pig ileal submucosa. *Neuroscience*, 107(4), 685-696.
- Resnick, J., Greenwald, D. A., & Brandt, L. J. (1997). Delayed gastric emptying and postoperative ileus after nongastric abdominal surgery: part II. *Am J Gastroenterol*, 92(6), 934-940.
- Rinaman, L., Card, J. P., Schwaber, J. S., & Miselis, R. R. (1989). Ultrastructural demonstration of a gastric monosynaptic vagal circuit in the nucleus of the solitary tract in rat. *J Neurosci*, 9(6), 1985-1996.
- Rivera, L. R., Thacker, M., & Furness, J. B. (2009). High- and medium-molecular-weight neurofilament proteins define specific neuron types in the guinea-pig enteric nervous system. *Cell Tissue Res*, 335(3), 529-538. doi: 10.1007/s00441-008-0732-3
- Rodrigo, J., Hernandez, J., Vidal, M. A., & Pedrosa, J. A. (1975). Vegetative innervation of the esophagus. II. Intraganglionic laminar endings. *Acta Anat (Basel)*, 92(1), 79-100.
- Rong, W., Hillsley, K., Davis, J. B., Hicks, G., Winchester, W. J., & Grundy, D. (2004). Jejunal afferent nerve sensitivity in wild-type and TRPV1 knockout mice. *J Physiol*, 560(Pt 3), 867-881. doi: 10.1113/jphysiol.2004.071746
- Sanders, K. M., Hwang, S. J., & Ward, S. M. (2010). Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. *J Physiol*, 588(Pt 23), 4621-4639. doi: 10.1113/jphysiol.2010.196030
- Sanders, K. M., & Ward, S. M. (1992). Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol*, 262(3 Pt 1), G379-392.
- Saper, C. B. (2002). The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annu Rev Neurosci*, 25, 433-469. doi: 10.1146/annurev.neuro.25.032502.111311
- Saper, C. B., & Loewy, A. D. (1980). Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res*, 197(2), 291-317.
- Scheinin, B., Asantila, R., & Orko, R. (1987). The effect of bupivacaine and morphine on pain and bowel function after colonic surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*, 31(2), 161-164.

- Schemann, M., Reiche, D., & Michel, K. (2001). Enteric pathways in the stomach. *Anat Rec*, 262(1), 47-57.
- Schippers, E., Ottinger, A. P., Anurov, M., Polivoda, M., & Schumpelick, V. (1993). Laparoscopic cholecystectomy: a minor abdominal trauma? *World J Surg*, 17(4), 539-542; discussion 543.
- Schwarz, N. T., Kalff, J. C., Turler, A., Engel, B. M., Watkins, S. C., Billiar, T. R., & Bauer, A. J. (2001). Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus. *Gastroenterology*, 121(6), 1354-1371.
- Scott, R. B., Tan, D. T., Miampamba, M., & Sharkey, K. A. (1998). Anaphylaxis-induced alterations in intestinal motility: role of extrinsic neural pathways. *Am J Physiol*, 275(4 Pt 1), G812-821.
- Seeling, W., Heinrich, H., & Oettinger, W. (1986). [The eventration syndrome: prostacyclin liberation and acute hypoxemia due to eventration of the small intestine]. *Anaesthesist*, 35(12), 738-743.
- Semba, T. (1954). Intestino-intestinal inhibitory reflexes. *Jpn J Physiol*, 4(3), 241-245.
- Sengupta, J. N., & Gebhart, G. F. (1994). Characterization of mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the colon of the rat. *J Neurophysiol*, 71(6), 2046-2060.
- Sengupta, J. N., Kauvar, D., & Goyal, R. K. (1989). Characteristics of vagal esophageal tension-sensitive afferent fibers in the opossum. *J Neurophysiol*, 61(5), 1001-1010.
- Sengupta, J. N., Saha, J. K., & Goyal, R. K. (1990). Stimulus-response function studies of esophageal mechanosensitive nociceptors in sympathetic afferents of opossum. *J Neurophysiol*, 64(3), 796-812.
- Shapiro, R. E., & Miselis, R. R. (1985). The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat. *J Comp Neurol*, 238(4), 473-488. doi: 10.1002/cne.902380411
- Shimizu, Y., Matsuyama, H., Shiina, T., Takewaki, T., & Furness, J. B. (2008). Tachykinins and their functions in the gastrointestinal tract. *Cell Mol Life Sci*, 65(2), 295-311. doi: 10.1007/s00018-007-7148-1
- Smith, T. K., Spencer, N. J., Hennig, G. W., & Dickson, E. J. (2007). Recent advances in enteric neurobiology: mechanosensitive interneurons. *Neurogastroenterol Motil*, 19(11), 869-878. doi: 10.1111/j.1365-2982.2007.01019.x
- Snape, W. J., Jr., Wright, S. H., Battle, W. M., & Cohen, S. (1979). The gastrocolic response: evidence for a neural mechanism. *Gastroenterology*, 77(6), 1235-1240.
- Song, X., Chen, B. N., Zagorodnyuk, V. P., Lynn, P. A., Blackshaw, L. A., Grundy, D., . . . Brookes, S. J. (2009). Identification of medium/high-threshold extrinsic mechanosensitive afferent nerves to the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 137(1), 274-284, 284 e271. doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.061
- Spencer, N. J., Hennig, G. W., & Smith, T. K. (2003). Stretch-activated neuronal pathways to longitudinal and circular muscle in guinea pig distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284(2), G231-241. doi: 10.1152/ajpgi.00291.2002
- Spencer, N. J., & Smith, T. K. (2004). Mechanosensory S-neurons rather than AH-neurons appear to generate a rhythmic motor pattern in guinea-pig distal colon. *J Physiol*, 558(Pt 2), 577-596. doi: 10.1113/jphysiol.2004.063586

- Spiller, R. C. (2003). Mechanisms of postoperative intestinal motor dysfunction. *Curr Opin Gastroenterol*, 19(2), 103-105.
- Steinbrook, R. A. (1998). Epidural anesthesia and gastrointestinal motility. *Anesth Analg*, 86(4), 837-844.
- Su, X., Wachtel, R. E., & Gebhart, G. F. (2000). Mechanosensitive potassium channels in rat colon sensory neurons. *J Neurophysiol*, 84(2), 836-843.
- Swain, M. G., Blennerhassett, P. A., & Collins, S. M. (1991). Impaired sympathetic nerve function in the inflamed rat intestine. *Gastroenterology*, 100(3), 675-682.
- Szurszewski, J. H., Ermilov, L. G., & Miller, S. M. (2002). Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut*, 51 Suppl 1, i6-10.
- Tache, Y., Monnikes, H., Bonaz, B., & Rivier, J. (1993). Role of CRF in stress-related alterations of gastric and colonic motor function. *Ann N Y Acad Sci*, 697, 233-243.
- Tassicker, B. C., Hennig, G. W., Costa, M., & Brookes, S. J. (1999). Rapid anterograde and retrograde tracing from mesenteric nerve trunks to the guinea-pig small intestine in vitro. *Cell Tissue Res*, 295(3), 437-452.
- The, F. O., Bennink, R. J., Ankum, W. M., Buist, M. R., Busch, O. R., Gouma, D. J., . . . Boeckxstaens, G. E. (2008). Intestinal handling-induced mast cell activation and inflammation in human postoperative ileus. *Gut*, 57(1), 33-40. doi: 10.1136/gut.2007.120238
- The, F. O., Boeckxstaens, G. E., Snoek, S. A., Cash, J. L., Bennink, R., Larosa, G. J., . . . de Jonge, W. J. (2007). Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology*, 133(4), 1219-1228. doi: 10.1053/j.gastro.2007.07.022
- Thomas, E. A., Bertrand, P. P., & Bornstein, J. C. (2000). A computer simulation of recurrent, excitatory networks of sensory neurons of the gut in guinea-pig. *Neurosci Lett*, 287(2), 137-140.
- Thomas, E. A., & Bornstein, J. C. (2003). Inhibitory cotransmission or after-hyperpolarizing potentials can regulate firing in recurrent networks with excitatory metabotropic transmission. *Neuroscience*, 120(2), 333-351.
- Thomas, E. A., Sjøvall, H., & Bornstein, J. C. (2004). Computational model of the migrating motor complex of the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286(4), G564-572. doi: 10.1152/ajpgi.00369.2003
- Timmermans, J. P., Adriaensen, D., Cornelissen, W., & Scheuermann, D. W. (1997). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 118(2), 331-340.
- Timmermans, J. P., Barbiers, M., Scheuermann, D. W., Stach, W., Adriaensen, D., & De Groot-Lasseel, M. H. (1993). Occurrence, distribution and neurochemical features of small intestinal neurons projecting to the cranial mesenteric ganglion in the pig. *Cell Tissue Res*, 272(1), 49-58.
- Tolleson, P. O., Cassuto, J., & Rimback, G. (1992). Patterns of propulsive motility in the human colon after abdominal operations. *Eur J Surg*, 158(4), 233-236.
- Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, 420(6917), 853-859. doi: 10.1038/nature01321
- Traub, R. J., Lim, F., Sengupta, J. N., Meller, S. T., & Gebhart, G. F. (1994). Noxious distention of viscera results in differential c-Fos expression in second order sensory neurons receiving 'sympathetic' or 'parasympathetic' input. *Neurosci Lett*, 180(1), 71-75.

- Traub, R. J., & Murphy, A. (2002). Colonic inflammation induces fos expression in the thoracolumbar spinal cord increasing activity in the spinoparabrachial pathway. *Pain*, *95*(1-2), 93-102.
- Traub, R. J., Sengupta, J. N., & Gebhart, G. F. (1996). Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat. *Neuroscience*, *74*(3), 873-884.
- Travagli, R. A., Hermann, G. E., Browning, K. N., & Rogers, R. C. (2006). Brainstem circuits regulating gastric function. *Annu Rev Physiol*, *68*, 279-305. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040504.094635
- Trouche, D., Grigoriev, M., Lenormand, J. L., Robin, P., Leibovitch, S. A., Sassone-Corsi, P., & Harel-Bellan, A. (1993). Repression of c-fos promoter by MyoD on muscle cell differentiation. *Nature*, *363*(6424), 79-82. doi: 10.1038/363079a0
- Trudrung, P., Furness, J. B., Pompolo, S., & Messenger, J. P. (1994). Locations and chemistries of sympathetic nerve cells that project to the gastrointestinal tract and spleen. *Arch Histol Cytol*, *57*(2), 139-150.
- Turler, A., Moore, B. A., Pezzone, M. A., Overhaus, M., Kalff, J. C., & Bauer, A. J. (2002). Colonic postoperative inflammatory ileus in the rat. *Ann Surg*, *236*(1), 56-66.
- Valentino, R. J., Kosboth, M., Colflesh, M., & Miselis, R. R. (2000). Transneuronal labeling from the rat distal colon: anatomic evidence for regulation of distal colon function by a pontine corticotropin-releasing factor system. *J Comp Neurol*, *417*(4), 399-414.
- van der Kooy, D., Koda, L. Y., McGinty, J. F., Gerfen, C. R., & Bloom, F. E. (1984). The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol*, *224*(1), 1-24. doi: 10.1002/cne.902240102
- Vanner, S., Jiang, M. M., & Surprenant, A. (1993). Mucosal stimulation evokes vasodilation in submucosal arterioles by neuronal and nonneuronal mechanisms. *Am J Physiol*, *264*(2 Pt 1), G202-212.
- Vanner, S., & Macnaughton, W. K. (2004). Submucosal secretomotor and vasodilator reflexes. *Neurogastroenterol Motil*, *16 Suppl 1*, 39-43. doi: 10.1111/j.1743-3150.2004.00473.x
- Villanacci, V., Bassotti, G., Nascimbeni, R., Antonelli, E., Cadei, M., Fisogni, S., . . . Geboes, K. (2008). Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel diseases. *Neurogastroenterol Motil*, *20*(9), 1009-1016. doi: 10.1111/j.1365-2982.2008.01146.x
- Vizzard, M. A., Brisson, M., & de Groat, W. C. (2000). Transneuronal labeling of neurons in the adult rat central nervous system following inoculation of pseudorabies virus into the colon. *Cell Tissue Res*, *299*(1), 9-26.
- Vogt, B. A., Pandya, D. N., & Rosene, D. L. (1987). Cingulate cortex of the rhesus monkey: I. Cytoarchitecture and thalamic afferents. *J Comp Neurol*, *262*(2), 256-270. doi: 10.1002/cne.902620207
- Wallin, G., Cassuto, J., Hogstrom, S., Rimback, G., Faxen, A., & Tolleson, P. O. (1986). Failure of epidural anesthesia to prevent postoperative paralytic ileus. *Anesthesiology*, *65*(3), 292-297.
- Wang, F. B., & Powley, T. L. (2000). Topographic inventories of vagal afferents in gastrointestinal muscle. *J Comp Neurol*, *421*(3), 302-324.
- Wang, G., Tang, B., & Traub, R. J. (2005). Differential processing of noxious colonic input by thoracolumbar and lumbosacral dorsal horn neurons in the rat. *J Neurophysiol*, *94*(6), 3788-3794. doi: 10.1152/jn.00230.2005

- Wang, H., Liao, H., Ochani, M., Justiniani, M., Lin, X., Yang, L., . . . Ulloa, L. (2004). Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med*, *10*(11), 1216-1221. doi: 10.1038/nm1124
- Wang, X., Feuerstein, G. Z., Gu, J. L., Lysko, P. G., & Yue, T. L. (1995). Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, *115*(1), 89-98.
- Wang, X. Y., Berezin, I., Mikkelsen, H. B., Der, T., Bercik, P., Collins, S. M., & Huizinga, J. D. (2002). Pathology of interstitial cells of Cajal in relation to inflammation revealed by ultrastructure but not immunohistochemistry. *Am J Pathol*, *160*(4), 1529-1540.
- Wank, M., & Neuhuber, W. L. (2001). Local differences in vagal afferent innervation of the rat esophagus are reflected by neurochemical differences at the level of the sensory ganglia and by different brainstem projections. *J Comp Neurol*, *435*(1), 41-59.
- Watkins, L. R., Maier, S. F., & Goehler, L. E. (1995). Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci*, *57*(11), 1011-1026.
- Wattwil, M. (1989). Postoperative pain relief and gastrointestinal motility. *Acta Chir Scand Suppl*, *550*, 140-145.
- Weber, E., Neunlist, M., Schemann, M., & Frieling, T. (2001). Neural components of distension-evoked secretory responses in the guinea-pig distal colon. *J Physiol*, *536*(Pt 3), 741-751.
- Williams, R. M., Berthoud, H. R., & Stead, R. H. (1997). Vagal afferent nerve fibres contact mast cells in rat small intestinal mucosa. *Neuroimmunomodulation*, *4*(5-6), 266-270.
- Willis, W. D., Al-Chaer, E. D., Quast, M. J., & Westlund, K. N. (1999). A visceral pain pathway in the dorsal column of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(14), 7675-7679.
- Willis, W. D., & Westlund, K. N. (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol*, *14*(1), 2-31.
- Wood, J. D. (1981). Intrinsic neural control of intestinal motility. *Annu Rev Physiol*, *43*, 33-51. doi: 10.1146/annurev.ph.43.030181.000341
- Wood, J. D., & Galligan, J. J. (2004). Function of opioids in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, *16 Suppl 2*, 17-28. doi: 10.1111/j.1743-3150.2004.00554.x
- Wood, J. D., & Perkins, W. E. (1970). Mechanical interaction between longitudinal and circular axes of the small intestine. *Am J Physiol*, *218*(3), 762-768.
- Wood, J. N., & Docherty, R. (1997). Chemical activators of sensory neurons. *Annu Rev Physiol*, *59*, 457-482. doi: 10.1146/annurev.physiol.59.1.457
- Xue, L., Farrugia, G., Miller, S. M., Ferris, C. D., Snyder, S. H., & Szurszewski, J. H. (2000). Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(4), 1851-1855.
- Young, R. L., Cooper, N. J., & Blackshaw, L. A. (2008). Chemical coding and central projections of gastric vagal afferent neurons. *Neurogastroenterol Motil*, *20*(6), 708-718. doi: 10.1111/j.1365-2982.2007.01071.x
- Zagorodnyuk, V. P., & Brookes, S. J. (2000). Transduction sites of vagal mechanoreceptors in the guinea pig esophagus. *J Neurosci*, *20*(16), 6249-6255.

- Zagorodnyuk, V. P., Chen, B. N., & Brookes, S. J. (2001). Intraganglionic laminar endings are mechano-transduction sites of vagal tension receptors in the guinea-pig stomach. *J Physiol*, 534(Pt 1), 255-268.
- Zagorodnyuk, V. P., Chen, B. N., Costa, M., & Brookes, S. J. (2003). Mechanotransduction by intraganglionic laminar endings of vagal tension receptors in the guinea-pig oesophagus. *J Physiol*, 553(Pt 2), 575-587. doi: 10.1113/jphysiol.2003.051862
- Zhang, X., Fogel, R., & Renehan, W. E. (1992). 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*, 323(3), 432-448. doi: 10.1002/cne.903230310
- Zittel, T. T., Lloyd, K. C., Rothenhofer, I., Wong, H., Walsh, J. H., & Raybould, H. E. (1998). Calcitonin gene-related peptide and spinal afferents partly mediate postoperative colonic ileus in the rat. *Surgery*, 123(5), 518-527. doi: 10.1067/msy.1998.88090
- Zittel, T. T., Reddy, S. N., Plourde, V., & Raybould, H. E. (1994). Role of spinal afferents and calcitonin gene-related peptide in the postoperative gastric ileus in anesthetized rats. *Ann Surg*, 219(1), 79-87.
- Zittel, T. T., Rothenhofer, I., Meyer, J. H., & Raybould, H. E. (1994). Small intestinal capsaicin-sensitive afferents mediate feedback inhibition of gastric emptying in rats. *Am J Physiol*, 267(6 Pt 1), G1142-1145.

## 10 Ergänzende Literatur

- Adams, D. O., & Johnson, S. P. (1992). Molecular bases of macrophage activation: regulation of class II MHC genes in tissue macrophages. In: Van Furth, V. et al., eds. *Mononuclear Phagocytes. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic*, p.425-436.
- Altschuler, S. M., Rinanman, L., & Miselis, R. R. (1992). Viscerotopic representation of the alimentary tract in the dorsal and ventral vagal complexes in the rat. In: Ritter, S, Ritter, R. C., & Barnes, C. D., eds. *Neuroanatomy and physiology of abdominal vagal afferents. Boca Raton, FL: CRC*, p.21-53.
- Bornstein, J. C., Furness, J. B., Kunze, W. A. A., & Bertrand, P. P. (2002). Enteric reflexes that influence motility. In: *Brookes, S. J. H., Costa, M., eds. Innervation of the Gastrointestinal Tract. London: Taylor & Francis*, p.1-55.
- Dogiel, A. S. (1899). Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch Anat Physiol Leipzig Anat Abt Jg. 1899*, 130-158.
- Furness, J. B. (2006). The enteric nervous system. *Oxford: Blackwell*.
- Galapeaux, E. A., & Templeton, R. D. (1937). The influence of filling the stomach on colon motility in the dog. *Am J Physiol (119)*, 312-313.
- Goltz, F. (1872). Studien über die Bewegungen der Speiseröhre und des Magens der Frösche: Vorläufige Mittheilung.
- Kuntz, A. (1938). The structural organization of the celiac ganglia. *J Comp Neurol (69)*, 1-12.
- Kuntz, A., & Van Buskirk, C. (1941). Reflex inhibition of bile flow and intestinal motility mediated through decentralized celiac plexus. *Proc Soc Exp Biol (46)*, 519-523.
- La Villa, I. (1898). Estructura de los ganglios intestinales. *Revista Trimestral Micrografica (2)*, 187-191.
- Lawson, H., Holt, J. P. (1937). The control of the large intestine by the decentralized inferior mesenteric ganglion. *Am J Physiol Legacy Content (118)*, 780-785.
- Lweine, J. (1995). Introduction to functional neuroimaging: functional neuroanatomy. In: Orrison, W., Lewine, J., Sanders, J., & Hartshone, M., eds. *Functional Brain Imaging. St. Louis: Mosby*, p.13-96.
- Roman, C. (1987). Physiology of the enteric nervous system. In: Johnson, L., ed. *Physiology of the GI tract (2nd ed.)*. *New York: Raven*, .p.503-553.

Sokowin, N. (1874). Cited by Kowalesky, H., & Arnstein, C. *Pfuegers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere* (8), 600.

Szurszewski, J. H., & Miller, S. M. (1994). Physiology of prevertebral ganglia, Chapter 19, Edition 3. In: Johnson, L. R., ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, p.795-877.

11 **Anhang****Tabelle 4. Verwendete Geräte und Labormaterialien.**

Versuchstiere	Charles River GmbH Sandhoferweg 7 97633 Sulzfeld Deutschland
Filter und Verstärker 1902	CED Cambridge Electronic Design Science Park Milton Road Cambridge CB4 0FE England
AD-Wandler 1401	CED Cambridge Electronic Design Science Park Milton Road Cambridge CB4 0FE England
PC	Fujitsu Siemens Computers GmbH Domagkstrasse 28 80807 München Deutschland
Software Spike 2	CED Cambridge Electronic Design Science Park Milton Road Cambridge CB4 0FE England
Peristaltische Pumpen „Minipuls 3“	Gilson Inc. 3000 Parmenter Street P.O. Box 620027 Middleton, WI 53562-0027 USA

Perfusionspumpe „IVAC 711“	IVAC Corporation 10221 Wateridge Circle San Diego, CA 92121 USA
Druckaufnehmer „Neurolog pressure amplifier NL 108“	Digitimer Ltd. 37 Hydeway Welwyn Garden City Hertfordshire, AL7 3BE England
Platinumdraht	Goodfellow GmbH Postfach1343 61213 Bad Nauheim Deutschland
Sylgard	DOW Corning GmbH Wiesbaden Rheingastr.34 65201 Wiesbaden Deutschland
Carbogengas	Linde AG Seitnerstrasse 70 82049 Höllriegelskreuth Deutschland
Silikon-Hochvakuumfett	DRAWIN Vertriebs-GmbH Rudolf-Diesel-Strasse 15 85521 Ottobrunn Deutschland
Mineralöl	Sigma Aldrich Chemie GmbH Grünwalder Weg 30 82041 Deisenhofen Deutschland
Präparationspinzetten	Fine Science Tools GmbH Im Weiher 12 69121 Heidelberg Deutschland

Pipetten	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH Peter-Henlein-Str. 2 50389 Wesseling-Berzdorf Deutschland
Handschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH Modecenterstrasse 22 1031 Wien Österreich
Nahtmaterial	Ethicon Johnson & Johnson GmbH Robert- Koch Straße 1 22851 Norderstedt Deutschland
Mullkompressen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH Höltkenstrasse 1-5 58300 Wetter Deutschland
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH Höltkenstrasse 1-5 58300 Wetter / Ruhr Deutschland
Einmalspritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	BD Becton Dickinson GmbH Tullastrasse 8-12 69126 Heidelberg Deutschland
Eppendorfgefäße	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH Peter-Henlein-Str. 2 50389 Wesseling-Berzdorf Deutschland
Roti-Histokitt	Carl Roth GmbH & Co KG Schoemperlenstrasse 3-5 76185 Karlsruhe Deutschland

**Tabelle 5. Verwendete Chemikalien.**

Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG Carl-Braun-Straße 1 34212 Melsungen Deutschland
Natriumchloridlösung 0.9%	B. Braun Melsungen AG Carl-Braun-Straße 1 34212 Melsungen Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH & Co KG Schoemperlenstrasse 3-5 76185 Karlsruhe Deutschland
Ethanol	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
Methanol	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
Xylol	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
Isofluran	Abbott GmbH & Co KG Max-Planck-Ring 2 65205 Wiesbaden Deutschland
Bradykinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 89555 Steinheim Deutschland

Cholecystokinin (CCK)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 89555 Steinheim Deutschland
Serotonin (5-HT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 89555 Steinheim Deutschland
Ziegenserum (Normal Goat Serum)	DAKO Diagnostica GmbH Am Stadtrand 52 22047 Hamburg Deutschland
rabbit anti-c-Fos Antikörper	Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Oncogene Science 80 Rogers Street Cambridge, MA 02142 USA
goat anti-rabbit Antikörper	DIANOVA GmbH Warburgstrasse 45 20354 Hamburg Deutschland
Schweineserum (Swine Serum)	DAKO Diagnostica GmbH Am Stadtrand 52 22047 Hamburg Deutschland
rabbit anti-MPO Antikörper	DIANOVA GmbH Warburgstrasse 45 20354 Hamburg Deutschland
swine anti-rabbit Antikörper	DAKO Diagnostica GmbH Am Stadtrand 52 22047 Hamburg Deutschland

Vectastain ABC Kit	LINARIS Biologische Produkte GmbH Hotelstrasse 11 97877 Wertheim - Bettingen Deutschland
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 89555 Steinheim Deutschland
Gelatine	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
Lipopolysaccharid (Salmonella typhosa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 89555 Steinheim Deutschland
Formaldehyd (37%)	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
Glucose	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
Sucrose	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
Natrium-Azid	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland

Triton X-100 10%	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
NaCl	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
KCl	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 89555 Steinheim Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
MgSO <sub>4</sub>	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 89555 Steinheim Deutschland

NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 89555 Steinheim Deutschland
TRIS HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Riedstrasse 2 89555 Steinheim Deutschland
TRIS NaOH	Merck KGaA Frankfurter Strasse 250 64293 Darmstadt Deutschland

**Tabelle 6. 10x Stock Solution.**

NaCl	225 g
KCl	11.5 g
CaCl <sub>2</sub>	9.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.275 g
MgSO <sub>4</sub>	9.55 g
Aqua dest.	2725 ml

**Tabelle 7. Kreb's Solution.**

10x Stock Solution	200 ml
Glucose	3.6 g
NaHCO <sub>3</sub>	5.159 g
Aqua dest.	2185 ml

**Tabelle 8. 0,5 M PBS (Phosphate Buffered Solution).**

Aqua dest.	700 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	103.74 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15.59 g
Aqua dest.	Auffüllen auf 1 l
Filtern	
pH-Einstellung auf pH 7.4	
Aufbewahrung bei RT	

**Tabelle 9. 10% NBF (Neutral Buffered Formalin).**

Formaldehyd (37%)	111 ml
Aqua dest.	889 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.5 g

**Tabelle 10. 25% Sucrose.**

Aqua dest.	300 ml
0.5 M PBS	200 ml
Sucrose	250 mg
Aqua dest.	Auffüllen auf 1 l
Aufbewahrung bei 4°C	

**Tabelle 11. Natrium-Azid 10%.**

Aqua dest.	80 ml
Natrium-Azid	10 g
Aqua dest.	Auffüllen auf 100 ml
Aufbewahrung bei 4°C	

**Tabelle 12. Verdünnungspuffer Triton X-100 0,5%.**

Triton X-100 10%	10 ml
0.1 M PBS	190 ml
Aufbewahrung bei 4°C	

**Tabelle 13. TBS (Tris Buffered Solution).**

Aqua dest.	700 ml
TRIS HCl	66.1 g
TRIS NaOH	9.7 g
Aqua dest.	Auffüllen auf 1 l
Filtern	
pH-Einstellung auf pH 7.4	
Aufbewahrung bei RT	

**Tabelle 14. Mounting Solution für Gefriermikrotom.**

Aqua dest.	150 ml
Sucrose	20 g
Ethanol 100%	3 ml
Aqua dest.	Auffüllen auf 100 ml
Aufbewahrung bei RT	

**Tabelle 15. Mounting Solution für free floating sections.**

Aqua dest.	60 ml
Gelatine	0.1 g
Ethanol 100%	40 ml
Aufbewahrung bei RT	

---

## Eidesstattliche Versicherung

Brandlhuber, Martina

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

**Afferente Sensibilität und morphologische Charakterisierung  
des Dünndarms in der Frühphyse des postoperativen Ileus bei der Maus**

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

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

Polding, den 03.10.2015

Martina Brandlhuber