

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	19
2 Literatur	21
2.1 Histologischer Aufbau der Darmwand	21
2.2 Intestinale Ischämie und Reperfusion	21
2.2.1 Darmstrangulationen beim Pferd	22
2.2.2 Makroskopische und histologische Veränderungen	23
2.2.3 Biochemische und zelluläre Veränderungen	23
2.2.3.1 Rolle der Neutrophilen Granulozyten	24
2.2.3.1.1 Nachweis der neutrophilen Granulozyten	26
2.2.3.2 Rolle der Mastzellen und Makrophagen	27
2.2.3.3 Eosinophile Granulozyten	27
2.2.3.3.1 Eosinophile Granulozyten im gesunden Gastrointestinaltrakt	27
2.2.3.3.2 Eosinophile Granulozyten bei intestinaler Schädigung	28
2.2.3.3.3 Nachweis der eosinophilen Granulozyten	30
2.3 Postoperativer Ileus	30
2.3.1 Allgemeines und prädisponierende Faktoren	30
2.3.2 Pathogenese	31
2.3.2.1 Inflammatorische Genese	32
2.3.2.1.1 Neutrophile Granulozyten	32
2.3.2.1.2 Makrophagen und proinflammatorische Zytokine	34
2.3.2.2 Kinetisch aktive Mediatoren	34
2.3.2.2.1 Stickstoffmonoxid	34
2.3.2.2.2 Prostaglandine	35
2.3.2.3 Hypocalcämie- und Hypomagnesiämie	36
2.4. Die Cyclooxygenasen	37
2.4.1 Allgemeines zu Cyclooxygenasen	37
2.4.2 Die Cyclooxygenase-1	39
2.4.2.1 Konstitutive Expression	39
2.4.2.2 Induzierbarkeit	41

2.4.3 Die Cyclooxygenase-2.....	42
2.4.3.1 Konstitutive Expression.....	42
2.4.3.2 Induzierbarkeit	43
2.4.3.3 Eigenschaften	44
2.4.4 Die Produkte der Cyclooxygenasen - Prostanoide	45
2.4.4.1 Prostanoide im Gastrointestinaltrakt	45
2.4.4.1.1 Einfluss auf die Darmbarriere.....	45
2.4.4.1.2 Einfluss auf die Darmmotilität.....	46
2.4.5 Wirkung von Cyclooxygenasehemmern	46
2.5 Nichtsteroidale Antiphlogistika	47
2.5.1 Allgemeines zu den Nichtsteroidalen Antiphlogistika.....	47
2.5.2 Nebenwirkungen der Cyclooxygenasehemmung im Gastrointestinaltrakt	48
2.5.2.1 Blutflussreduktion und Mucosaschäden.....	48
2.5.2.2 Hemmung der Regeneration der Darmbarriere.....	49
2.5.2.3 Beeinflussung der Motilität des Gastrointestinaltraktes.....	49
2.5.3 Einsatz selektiver NSAIDs.....	51
2.5.4 NSAIDs, Entzündungsmediatoren und neutrophile Granulozyten	52
2.6 Einzelstoffe	53
2.6.1 Flunixin-Meglumin	53
2.6.1.1 Pharmakokinetik	53
2.6.1.2 Beeinflussung der Mucosapermeabilität	54
2.6.1.3 Wirkung auf die Darmkontraktilität	55
2.6.1.4 Einsatz bei Endotoxämie	56
2.6.1.5 Nebenwirkungen	56
2.6.2 Firocoxib	57
2.6.2.1 Pharmakokinetik	57
2.6.2.2 Anwendung im postoperativen Schmerzmanagement.....	57
2.6.2.3 Nebenwirkungen	58
3 Material und Methoden.....	59
3.1 Probanden	59
3.1.1 Vorbereitung der Pferde und Narkose	59

3.2 In vivo Modell	61
3.2.1 O2C-Gerät	62
3.2.2 Pulsoxymetrie	63
3.2.3 Ischämie und Reperfusion	64
3.3 Histologie	67
3.3.1 Probenverarbeitung	67
3.3.2 Vorbehandlung der Schnitte für histologische Färbungen und Immunhistochemie	68
3.3.3 Histologische Färbungen	69
3.3.3.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung	69
3.3.3.2 Lunafärbung	69
3.3.4 Immunhistochemie	70
3.3.4.1 Calprotectin	70
3.3.4.2 Cyclooxygenase-1	71
3.3.4.3 Cyclooxygenase 2	72
3.4 Molekularbiologie	73
3.4.1 Trizolextraktion	73
3.4.2 Vorbereitung für die konventionelle PCR (mRNA-Analyse)	74
3.4.2.1 RNA Isolierung	74
3.4.2.2 RNA Vermessung	75
3.4.2.3 DNase Verdau	75
3.4.2.4 cDNA-Synthese	76
3.4.2.5 Konventionelle PCR für Cyclooxygenase-1 und -2	76
3.4.3 Vorbereitung für den Western Blot	78
3.4.3.1 Proteinisolation	78
3.4.3.2 SDS-Gelelektrophorese	80
3.4.3.3 Western Blot für die Cyclooxygenase-1 und -2	80
3.4.3.4 Immunodetektion	80
3.5 Lichtmikroskopische Untersuchung	82
3.5.1 Auswertung Lunafärbung und Calprotectin-Immunhistochemie	82
3.5.1.1 Tunica muscularis	82

3.5.1.2 Tunica serosa	84
3.5.2 Auswertung Cyclooxygenase-1 und -2 Immunhistochemie.....	85
3.5.2.1 Tunica muscularis und Tunica serosa.....	85
4 Ergebnisse.....	88
4.1 Lunafärbung.....	88
4.1.1 Deskription	88
4.1.2 Quantifizierung der eosinophilen Granulozyten.....	90
4.1.2.1 Tunica muscularis	90
4.1.2.2 Tunica serosa	93
4.2 Immunhistochemie.....	94
4.2.1 Calprotectin	94
4.2.1.1 Deskription	94
4.2.1.1.1 Kontrolle 1 (K1) – ungeschädigtes Jejunum 1	94
4.2.1.1.2 Ischämisch geschädigtes Jejunum (I1)	95
4.2.1.1.3 Durch Ischämie und Reperfusion geschädigtes Jejunum (R1)....	96
4.2.1.1.4 Kontrolle 2 (K2) – ungeschädigtes Jejunum 2	98
4.2.1.1.5 Ischämisch geschädigtes und mit einem NSAID behandeltes Jejunum (I2)	100
4.2.1.1.6 Durch Ischämie und Reperfusion geschädigtes und mit einem NSAID behandeltes Jejunum (R2)	100
4.2.1.1.7 Kontrolle 3 (K3) – ungeschädigtes Jejunum 3	101
4.2.1.2 Negativ- und Isotypenkontrolle.....	104
4.2.1.3 Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten.....	105
4.2.1.3.1 Tunica muscularis	105
4.2.1.3.2 Tunica serosa.....	111
4.2.2 Cyclooxygenase-1	113
4.2.2.1 Deskription	113
4.2.2.1.1 Kontrolle 1 (K1) – ungeschädigtes Jejunum	113
4.2.2.1.2 Ischämisch geschädigtes Jejunum (I1)	119
4.2.2.1.3 Durch Ischämie und Reperfusion geschädigtes Jejunum (R1)....	121
4.2.2.2 Negativ- und Isotypenkontrolle.....	124
4.2.3 Cyclooxygenase-2	126

4.2.3.1 Deskription	126
4.2.3.1.1 ungeschädigtes Jejunum zu den Probezeitpunkten K1, K2 und K3	126
4.2.3.1.2 Ischämisch geschädigtes Jejunum zu den Probezeitpunkten I1 und I2	131
4.2.3.1.3 Durch Ischämie und Reperfusion geschädigtes Jejunum zu den Probezeitpunkten R1 und R2	133
4.2.3.2 Negativ- und Isotypenkontrolle.....	135
4.2.3.3 Positivkontrolle.....	135
4.3 RT-PCR	138
4.4 Western Blot	138
5 Diskussion	140
5.1 Methodik – in vivo Versuch	140
5.1.1 Probanden.....	140
5.1.2 Versuchsaufbau.....	142
5.1.3 Anlegen der Ischämie.....	143
5.1.4 O2C-Gerät und Pulsoxymeter	144
5.1.5 Ischämie und Reperfusionslänge	146
5.1.6 Abstände der Proben zueinander	147
5.1.7 Zeitpunkt der Applikation des nichtsteroidalen Antiphlogistikums	148
5.1.8 Auswahl der nichtsteroidalen Antiphlogistika.....	148
5.2 Methodik - Histologische und molekularbiologische Auswertung	149
5.2.1 Lunafärbung	149
5.2.2 Calprotectin-Immunhistochemie	149
5.2.3 Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2.....	150
5.3 Ergebnisse	152
5.3.1 Eosinophile Granulozyten.....	152
5.3.2 Neutrophile Granulozyten	153
5.3.2.1 Allgemein	153
5.3.2.2 Vergleichende Betrachtung in der Ring- und Längsmuskelschicht ..	156
5.3.2.3 Neutrophilcluster in der Tunica muscularis und Tunica serosa	156
5.3.2.4 Einfluss der nichtsteroidalen Antiphlogistika	157

5.3.2.5 Klinische Relevanz.....	159
5.3.2.5.1 Postoperativer Ileus.....	159
5.3.2.6 Versuchsaufbau	160
5.3.3 Cyclooxygenase-1	160
5.3.3.1 Konstitutive Expression.....	160
5.3.3.2 Expression bei ischämischer Schädigung.....	161
5.3.3.3 Expression bei Schädigung durch Reperfusion	162
5.3.3.4 Einfluss der nichtsteroidalen Antiphlogistika auf die Expression.....	162
5.3.3.5 Expression in der Tunica muscularis	163
5.3.3.5.1 Expression innerhalb der Muskelzellen	163
5.3.3.6 Expression in Zellen (ausgenommen Muskelzellen) der Tunica muscularis und Tunica serosa	164
5.3.3.7 Expression in den Endothelzellen.....	164
5.3.4 Cyclooxygenase-2.....	165
5.3.4.1 Konstitutive Expression.....	165
5.3.4.2 Expression bei ischämischer Schädigung.....	166
5.3.4.3 Expression bei Schädigung durch Reperfusion	166
5.3.4.4 Einfluss der nichtsteroidalen Antiphlogistika auf die Expression.....	167
5.3.4.5 Expression in der Tunica muscularis	168
5.3.4.5.1 Expression innerhalb der Muskelzellen	169
5.3.4.6 Expression in Zellen (ausgenommen Muskelzellen) der Tunica muscularis und Tunica serosa	169
5.3.4.7 Expression in den Endothelzellen.....	171
5.4 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....	172
6 Zusammenfassung	175
7 Summary	177
8 Literaturverzeichnis	179
9 Anhang	204
9.1 Versuch.....	204
9.1.1 Medikamente.....	204
9.1.2 Geräte	205
9.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	205

9.2 Probenbearbeitung.....	205
9.2.1 Fixierlösung	205
9.2.2 Lösungen Hämatoxylin-Eosin-Färbung	206
9.2.3 Lösungen Luna-Färbung	206
9.2.4 Puffer und Lösungen Immunhistochemie	207
9.2.5 Puffer und Lösungen PCR und Western Blot	208
9.2.6 Stoffe und Reagenzien.....	211
9.2.7 Antikörper.....	213
9.2.8 Geräte	214
9.2.9 Verbrauchsmaterialien.....	215
9.3 Tabellarische Auswertungen Calprotectin.....	216
9.3.1 Probe K1	216
9.3.2 Probe I1	217
9.3.3 Probe R1	218
9.3.4 Probe K2	219
9.3.5 Probe I2.....	220
9.3.6 Probe R2	221
9.3.7 Probe K3	222
9.4 Tabellarische Auswertung Luna.....	223
9.4.1 Probe K1	223
9.4.2 Probe I1	224
9.4.3 Probe R1	225
9.4.4 Probe K2	226
9.4.5 Probe I2.....	227
9.4.6 Probe R2	228
9.4.7 Probe K3	229
Danksagung	230