

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 |
| 2.2.3.1.2 Rolle der Mastzellen und Makrophagen | 27 |
| 2.2.3.2 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 - Prostanoiden | 45 |
| 2.4.4.1 Prostanoiden im Gastrointestinaltrakt | 45 |
| 2.4.4.1.1 Einfluss auf die Darmbarriere | 45 |
| 2.4.4.1.2 Einfluss auf die Darmmotilität | 46 |
| 2.4.4.5 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 Reperusionslänge | 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 | Neutrophilencluster 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 |