

Einleitung

Die Kolikoperation ist die häufigste notfallmäßig durchgeführte Operation bei Pferden, wobei bei 27 bis 49 % der chirurgischen Kolikpatienten eine Erkrankung im Bereich des Dünndarms ursächlich ist (Phillips und Walmsley, 1993; Vachon und Fischer, 1995; Mair, 2005a; Wormstrand et al., 2014). Bei einigen Erkrankungen, wie zum Beispiel Enteritiden, Neoplasien oder der Equinen Dysautonomie, ist die Diagnose nicht nur anhand klinischer Beurteilung während der Operation zu bestimmen. Dazu ist eine pathohistologische Untersuchung eines Dünndarmbiopsats, das alle Schichten der Wand enthält, notwendig. Diese Dünndarmbiopsate werden im Rahmen einer Kolikoperation eher selten entnommen, und es existiert hierfür keine standardisierte Methode. Bisherige Beschreibungen in der Literatur sind für Pferde wenig präzise und die unterschiedlichen Techniken wurden nicht miteinander verglichen (Freeman, 2019). Untersuchungen in der Human- und Kleintiermedizin beleuchten die jeweiligen Biopsietechniken zwar näher, sind aber nicht vollständig auf das Pferd übertragbar.

Mögliche Probleme, die durch eine Gewebeentnahme entstehen können, sind unter anderem eine Einengung des Dünndarmlumens, eine Kontamination des Operationsbereichs, eine Verlängerung der Operationszeit und eine postoperative Nahtdehiszenz an der Biopsiestelle. Außerdem besteht die Gefahr, bei einer Dünndarmbiopsie nicht alle Schichten ausreichend zu gewinnen oder bei der Entnahme Artefakte zu verursachen, welche die Auswertbarkeit negativ beeinflussen. Ziel dieser Studie war es, in der Literatur beschriebene Biopsietechniken anhand von klinischen und pathohistologischen Kriterien *ex vivo* zu vergleichen, um eine gut durchführbare und komplikationsarme Technik mit gut auswertbaren Biopsaten für die Gewebeentnahme im Rahmen einer Kolikoperation herauszustellen.

1 Literaturübersicht

1.1 Anatomie, Histologie und Physiologie des Dünndarms

Der Dünndarm ist beim Pferd der längste Abschnitt des Gastrointestinaltrakts und hat die Aufgabe, die bereits vorverdaute Nahrung aus dem Magen enzymatisch abzubauen und die Nährstoffe zu resorbieren (Aschenbach et al., 2022). Außerdem ist die Oberfläche durch *Plicae circulares* (Kerkring-Falten), Villi sowie Mikrovilli stark vergrößert und die Schleimhaut des Dünndarms beinhaltet sowohl resorbierende und sezernierende als auch endokrine Zellen (Vollmerhaus und Roos, 2004; Liebich, 2010; Aschenbach et al., 2022). Die Motorik und Sekretion des Dünndarms werden durch das vegetative Nervensystem gesteuert (Aschenbach et al., 2022).

1.1.1 Anatomie des Dünndarms bei Pferden

Der Dünndarm besteht aus drei Anteilen: dem Duodenum (Zwölffingerdarm), dem Jejunum (Leerdarm) und dem Ileum (Hüftdarm). Diese Anteile sind an der dorsalen Bauchwand durch das Mesenterium (Mesoduodenum, Mesojejunum und Mesoileum) befestigt (Vollmerhaus und Roos, 2004). Das Duodenum beginnt am Pylorus des Magens und ist beim Pferd etwa einen Meter lang und abermals unterteilt in kraniale, ascendierende und descendierende Teile. Im Anfangsteil des Duodenums münden die Ausführungsgänge des Pankreas und der *Ductus choledochus* (Hauptgallengang). Die aborale Grenze des Duodenums wird markiert durch die *Plica duodenocolica* (Vollmerhaus und Roos, 2004).

Das Mesenterium wird mit Beginn des Jejunums zunehmend länger und ermöglicht dem Jejunum somit eine höhere Beweglichkeit in der Bauchhöhle. Bei adulten Pferden hat das Jejunum eine ungefähre Länge von 25 Metern (m). Das Mesojejunoileum ist mit der dorsalen Bauchwand ventral des ersten Lendenwirbels verbunden und um die zentrale *A. mesenterica cranialis* gedreht. Man spricht hier von der sogenannten „Gekrösewurzel“ (*Radix mesenterii*). In der Schleimhaut des Jejunums befinden sich Lymphfollikel (*Noduli solitarii*) (Vollmerhaus und Roos, 2004)

Der Übergang vom Jejunum in das Ileum wird üblicherweise durch das Auftreten der *Plica ileocaecalis* gekennzeichnet, wobei das Ileum antimesenterial an dieser mit der dorsalen Taenie des Caecums befestigt ist (Vollmerhaus und Roos, 2004). Das Ileum hat beim adulten Pferd ungefähr eine Länge von circa 50 cm und zeichnet sich im Vergleich zum Jejunum durch eine dickere Muskelschicht und Ansammlungen von Lymphfollikeln (*Noduli aggregati*) die als Peyer-Platten bezeichnet werden. Diese Peyer-Platten können eine Länge von bis zu 25 Zentimetern (cm) erreichen und makroskopisch sichtbar sein (Vollmerhaus und Roos, 2004). Somit ist die Darmwand des Ileums insgesamt dicker als die des Jejunums. Das Ende des Ileums bildet die *Papilla ilealis*, welche sich an der axialen Seite der *Basis caeci* befindet (Edwards, 1981; Vollmerhaus und Roos, 2004).

1.1.2 Histologie des Dünndarms

1.1.2.1 Schleimhautschicht (*Tunica mucosa*)

Damit die Schleimhaut ihre Vielzahl an Aufgaben wahrnehmen kann, ist die innere Oberfläche des Darms stark vergrößert. Transversal verlaufende *Plicae circulares* sind auf der Innenseite des Darms von Dünndarmzotten (*Villi intestinales*) überzogen. Diese Zotten sind im Wesentlichen für die Oberflächenvergrößerung verantwortlich, haben eine Länge von 0,5-1,5 Millimetern (mm) und eine Dichte von 20-40/mm² (Liebich, 2010). Im Jejunum sind die Zotten im Vergleich zum Duodenum und Ileum am längsten. Ein dichter Mikrovillibesatz, der sich aus den Epithelzellen stülpt, dient der weiteren Oberflächenvergrößerung. *Glandulae intestinales* (Lieberkühn-Drüsen, Krypten) stülpen sich in die *Lamina propria mucosae* als gerade, unverzweigte Darmdrüsen ein. Gebildet wird die Oberfläche der Zotten und die epitheliale Wandauskleidung der Drüsen von einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel (Liebich, 2010). Dieses Epithel beinhaltet verschiedene Zellpopulationen, zu denen die Saumzellen (Enterozyten), Becherzellen, endokrine Zellen und Paneth-Zellen gehören. An das Epithel der Schleimhaut (*Epithelium mucosae*) schließt das Eigenblatt der Schleimhaut (*Lamina propria mucosae*) an, welches aus lockerem Bindegewebe besteht und damit die Grundlage der Darmzotten bildet. In die *Lamina propria*

mucosae ziehen die *Glandulae intestinales*. In dieser Schicht befinden sich zudem, auch bei adulten Pferden ohne gastrointestinale Erkrankungen, ansässige T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten. Diese lassen sich in ihrer Gesamtheit als sogenannte Immunzellen zusammenfassen (Liebich, 2010). Zwischen der *Lamina propria mucosae* im Bereich der Villi und im Bereich der Krypten bestehen Unterschiede in der Verteilung der Immunzellen (Packer et al., 2005; Rocchigiani et al., 2022). So kommen Plasmazellen, eosinophile Granulozyten und B-Lymphozyten, wie auch bei Hunden, vermehrt im Bereich zwischen den Darmdrüsen vor (German et al., 1999; Packer et al., 2005). T-Lymphozyten kommen bei Pferden in beiden Regionen gleichermaßen vor (Packer et al., 2005).

1.1.2.2 Unterschleimhautgewebe (*Tela submucosa*)

Die *Tela submucosa* besteht aus kollagenfaserreichem Grundgewebe und beinhaltet sowohl vermehrt Blutgefäße und den *Plexus nervorum submucosus* (Plexus submucosus, Meissner-Plexus) des enterischen Nervensystems, als auch einzelne Lymphknötchen (*Noduli lymphatici solitarii*) und im Ileum aggregierte Lymphknötchen (*Noduli lymphatici aggregati*, Peyer-Platten) (Liebich, 2010).

1.1.2.3 Muskelschicht (*Tunica muscularis*)

Die *Tunica muscularis* besteht innenliegend aus dem *Stratum circulare* und daran anschließend aus dem *Stratum longitudinale*, welche jeweils aus glatter Muskulatur gebildet werden. Zwischen den Muskelschichten befindet sich, neben Blut- und Lymphgefäßen, als zweites Nervengeflecht des enterischen Nervensystems der *Plexus nervorum myentericus* (Plexus myentericus, Auerbach-Plexus) (Liebich, 2010).

1.1.2.4 Serosaschicht (*Tunica serosa*)

Die *Tunica serosa* bildet die äußerste Schicht, welche abermals unterteilt wird. Die äußerste Schicht der Serosa bezeichnet man als Mesothel, gebildet aus einem

einschichtigen Plattenepithel. Darunter befindet sich die *Lamina propria serosae*, anschließend an die *Tela subserosa*, welche die *Tunica serosa* und die *Tunica muscularis* miteinander verbindet. Die Serosa geht am Ansatz des Mesenteriums in dieses über (Liebich, 2010; Aschenbach et al., 2022).

1.1.3 Physiologie des Dünndarms

Für die Sekretion und die Motorik des Dünndarms ist das vegetative Nervensystem verantwortlich (Aschenbach et al., 2022). Im Gegensatz zu anderen Organen hat der Darm zusätzlich als dritten Teil des vegetativen Nervensystems das enterische Nervensystem. Das enterische Nervensystem setzt sich aus dem *Plexus myentericus* und dem *Plexus submucosus* zusammen (Liebich, 2010; Aschenbach et al., 2022).

Der *Plexus myentericus* ist für den Ablauf einer koordinierten Dünndarmmotorik verantwortlich, was man als peristaltischen Reflex bezeichnet (Aschenbach et al., 2022). Störungen des *Plexus myentericus* führen entsprechend zu einer unkoordinierten Motorik und erheblichen Störungen im Weitertransport des Darminhalts. Für die Regulationsmechanismen schütten die enterischen Nervenzellen erregende und hemmende Neurotransmitter aus. Einer der wichtigsten Transmitter ist das Acetylcholin, welches von den erregenden Neuronen ausgeschüttet wird und sich an muscarinerge Rezeptoren Typ 3 (M3) auf der Darmmuskulatur und an nicotinerge Rezeptoren auf enterischen Nervenzellen bindet. Stickstoffmonoxid (NO) dient häufig als Transmitter hemmender Neurone. Neben der Muskulatur wirkt der *Plexus myentericus* auch auf die interstitiellen Cajal-Zellen (englisch „Interstitial cells of cajal“, ICC, nach Ramon y Cajal 1911) ein. Diese ICC gehören zu den sogenannten Schrittmacherzellen, welche in der Lage sind durch ihr instabiles Membranpotential (spontane rhythmische Membranpotentialschwankungen = slow waves) Aktionspotentiale zu erzeugen. Diese Aktionspotentiale werden über die Gap junctions an die glatten Muskelzellen weitergegeben (Aschenbach et al., 2022).

Der *Plexus submucosus* hingegen steuert die resorbierenden und sezernierenden Zellen der Mukosa (Aschenbach et al., 2022). Die Steuerung erfolgt ebenfalls über den Transmitter Acetylcholin und über das vasoaktive intestinale Peptid (VIP), die beide

erregend und somit am Epithel prosekretorisch wirken. Die Transmitter erhöhen die Sekretion von Chlorid-Ionen und Wasser in das Darmlumen. Die Aktivierung der Sekretion erfolgt zum einen über im Darmepithel freigesetzte Mediatoren und mechanische Stimuli, aber auch über bakterielle und virale Toxine und Entzündungsmediatoren, welche eine starke Sekretionsantwort zur Folge haben (Aschenbach et al., 2022).

1.2 Biopatientnahmeverfahren am Dünndarm

Die Entnahme und Untersuchung von Darmbiopatienten hat zum Ziel, entzündliche, degenerative oder neoplastische gastrointestinale Erkrankungen und Veränderungen zu diagnostizieren (Hostetter und Uzal, 2022). Ob eine Diagnose gestellt werden kann, ist stark abhängig von der Qualität des Biopatienten. Grundsätzlich gibt es bei Pferden, wie auch bei anderen Spezies, die Möglichkeit Dünndarmbiopatienten entweder chirurgisch oder endoskopisch zu entnehmen, was jeweils Vor- und Nachteile mit sich bringt (Hostetter und Uzal, 2022).

1.2.1 Endoskopische und chirurgische Biopatientnahmen beim Pferd

Mit chirurgischen Techniken können Biopatienten aus dem Dünndarm von Pferden entnommen werden, die alle Schichten enthalten. Dies kann zum einen in Narkose über eine mediane Laparotomie oder zum anderen in Sedierung am stehenden Pferd über eine Flankenlaparotomie erfolgen (Coomer et al., 2016; Munsterman et al., 2023). Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit einer minimalinvasiven chirurgischen Biopatientnahme über einen laparoskopischen Zugang in der Flanke (Schambourg und Marcoux, 2006; Bracamonte et al., 2008; Graham und Freeman, 2014). Anhand solcher Biopatienten können nach feingeweblicher Aufarbeitung der Proben und in Verbindung mit den intra-operativen Befunden Diagnosen mit der größtmöglichen Sicherheit gestellt werden. Darüber hinaus können über einen laparoskopischen Zugang Biopatienten aus allen Anteilen des Dünndarms, des Colons und aus der Caecumwand entnommen werden. Bei einer Biopsie über eine mediane Laparotomie sind das Duodenum und das Rektum nicht vorzulagern (Freeman, 2019; Hostetter und

Uzal, 2022). Nachteile sind die Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs und damit einhergehenden Komplikationsrisiken sowie eine erforderliche chirurgische Expertise. (Tabelle 1)

Die endoskopische Entnahme von Biopaten (minimalinvasive Biopsien) wird am stehenden, sedierten Pferd durchgeführt. Da die Entnahme ausgehend vom Darmlumen erfolgt, können jedoch lediglich Biopate der Mukosa oder gelegentlich auch von Teilen der Submukosa entnommen werden (Hostetter und Uzal, 2022). Aufgrund der beschränkten Länge der Endoskope im Vergleich zur Länge des Gastrointestinaltrakts der Pferde können Biopate über den proximalen (meist nasopharyngealen) Zugang nur aus dem Duodenum bzw. über den distalen (rektalen) Zugang aus dem Rektum oder dem aboralen Colon descendens entnommen werden (Boshuizen et al., 2018; Stewart et al., 2018; Grob et al., 2020). Durch ihre Größe und die Entnahme mit endoskopischen Zangen, die über den Arbeitskanal eingeführt werden, sind endoskopisch entnommene Biopate anfälliger für Artefakte und auch ihre Qualität ist abhängig von der Erfahrung desjenigen, der die Entnahme durchführt (Boshuizen et al., 2018; Stewart et al., 2018; Hostetter und Uzal, 2022). (Tabelle 1)

Tabelle 1: Vergleich von chirurgischen und endoskopischen Biopsien

	Chirurgische Biopsie *1	Endoskopische Biopsie *2
Invasivität	Invasiv	Weniger invasiv
Entnahmebereiche	Laparoskopie: Alle Darmanteile Laparotomie: Alle außer Duodenum und Rektum	Duodenum, Rektum, aborales Colon descendens
Schichten	Alle Schichten	Mukosa und teilweise oberflächliche Submukosa
Artefakte	Weniger häufig	häufig
Benötigte Erfahrung	Fortgeschrittene chirurgische Erfahrung notwendig	Qualität der Biopate abhängig von Erfahrung
Anzahl möglicher Biopate	Wenige	Vielzahl

*1 Schambourg und Marcoux 2006; Bracamonte et. al, 2008; Hostetter und Uzal, 2022

*2 Boshuizen et al., 2018; Stewart et al., 2018; Grob et. al, 2020; Hostetter und Uzal, 2022

Da sich die endoskopischen Biopsien nicht für die Diagnose von Erkrankungen in allen Dünndarmabschnitten und nicht für den Einsatz während einer Kolikoperation eignen, wird folgend nur auf chirurgische Biopsien zur Entnahme von vollständigen Wandbiopsaten eingegangen.

1.2.2 Entnahme von vollständigen Wandbiopsaten aus dem Dünndarm von Pferden

1.2.2.1 Beschreibungen von Biopsietechniken in der Literatur

Für das Pferd gibt es in der gängigen Fachliteratur nur wenig detaillierte Beschreibungen über die Entnahme von vollständigen Wandbiopsaten aus dem Dünndarm (Freeman, 2019). Bei einer Biopsie sollte der Darm mit besonderer Vorsicht behandelt werden. Kleine Biopsate können mit einer Hautstanze mit 6 mm Durchmesser entnommen werden. Aus Beschreibungen klinischer Anwendungen dieser Technik geht hervor, dass es nach dem Einsatz der Hautstanze teilweise noch eine Schere erforderlich ist, um zusätzlich zu den anderen Wandschichten auch Mukosa zu entnehmen (Schumacher et al., 2000). Darüber hinaus wird die Nutzung einer Schere auch zur Entnahme von Dünndarmbiopsaten mit elliptischer Form empfohlen (Freeman, 2019). Die Entnahme sollte an der antimesenterialen Oberfläche des Dünndarms in longitudinaler Ausrichtung erfolgen. Für Biopsate aus dem Ileum wird empfohlen, ein elliptisches Stück auf Höhe des oralen Endes der *Plica ileocaecalis* mittig, zwischen der mesenterialen und antimesenterialen Grenze, zu entnehmen (Freeman, 2019). Der Verschluss des entstandenen Defekts im Dünndarm kann ein- oder zweischichtig erfolgen. Ein Verschluss in transversaler Richtung wird aufgrund eines angenommenen Risikos für Invaginationen nicht empfohlen. Somit sollte der Verschluss nach einer Literaturangabe ausschließlich in longitudinaler Ausrichtung erfolgen (Freeman, 2019). Während der Biopsie im Rahmen einer Kolikoperation sind die Lokalisationen für die Entnahme auf Darmanteile beschränkt, welche aus dem Abdomen vorzulagern sind (Freeman, 2019; Hostetter und Uzal, 2022).

Weitere Beschreibungen beziehen sich vor allem auf Dünndarmbiopsien am stehenden, sedierten Pferd im Rahmen einer Laparotomie oder Laparoskopie in der linken oder rechten Flanke (Schambourg und Marcoux, 2006; Bracamonte et al., 2008; Coomer et al., 2016; Munsterman et al., 2023).

Zum einen gibt es Beschreibungen in klinischen *in-vivo*-Studien zu Biopsien über einen Laparotomie-Zugang in der *Fossa paralumbalis*. Der Dünndarm wurde hierbei nach laparoskopischem Beginn der Operation hand-assistiert oder mit Instrumenten durch eine kleine Laparotomie vorgelagert und ein Bioptat mit Hilfe einer Schere entnommen. Die antimesenterial am Jejunum entnommenen Bioptate hatten eine Größe von 8 x 20 mm, und der Verschluss erfolgte einschichtig mit einer fortlaufenden Cushing-Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial. In dieser Studie wurden lediglich Bioptate aus dem Jejunum entnommen (Coomer et al., 2016).

Neben der Biopsie über eine Laparotomie besteht auch die Möglichkeit, vollständige Wandbioptate laparoskopisch, ebenfalls über die Flanke, zu entnehmen (Schambourg und Marcoux, 2006; Bracamonte et al., 2008). In einer *in-vivo*-Studie wurde der Dünndarm intraabdominal mit laparoskopischen atraumatischen Darmfassklemmen fixiert und die Biopsie in zwei Schritten vorgenommen (Schambourg und Marcoux, 2006). Im ersten Schritt wurde mit einer laparoskopischen Schere in longitudinaler Ausrichtung zur Längsachse des Darmrohrs ein elliptisches Bioptat entnommen, das zunächst nur die *Tunica serosa* und *Tunica muscularis* enthielt. Die Biopsiestelle wurde im Anschluss zum Teil mit einer einschichtigen fortlaufenden Lembert-Naht und resorbierbarem Nahtmaterial intraabdominal verschlossen. Durch die noch nicht verschlossene Stelle wurde dann die *Tunica mucosa* und *Tela submucosa* evertiert und ebenfalls mit einer Schere abgesetzt, bevor die Biopsiestelle im Anschluss vollständig intraabdominal verschlossen wurde. Der Dünndarm wurde vor dem Zurücklagern ins Abdomen gespült. Nach den Biopsien wurde die Bauchhöhle noch mit 10 Litern (L) NaCl-Lösung gespült. In dieser Studie betrug die Gesamtdauer des Eingriffs durchschnittlich 131 Minuten (Schambourg und Marcoux, 2006). In einer weiteren Studie wurden Bioptate ebenfalls über einen laparoskopischen Zugang entnommen, der Verschluss und die Entnahme erfolgte jedoch mit einem endoskopischen linearen chirurgischen Schneide- und Klammergeräts (ELS) mit 45

mm Branchen. Die Biopate wurden *in vivo* aus Duodenum und Ileum antimesenterial entnommen und hatten eine Größe von 3 x 1 cm. In einem *ex vivo* Teil der Studie wurde außerdem der Berstdruck von Biopsiestellen nach manuellem Verschluss (zweischichtig fortlaufende Cushing-Naht) und nach ELS-Verschluss verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass der Berstdruck in der Gruppe der mit ELS verschlossenen Biopsiestellen deutlich geringer war, als in der Gruppe der von Hand genähten Naht (Bracamonte et al., 2008). In einer anderen *ex-vivo*-Studie wurde eine weitere Biopsiemethode erprobt und mit einer elliptischen, antimesenterialen Biopsietechnik mit Verschluss von Hand verglichen (Munsterman et al., 2023). Die neu entwickelte Biopsietechnik wurde dort an zuvor aus dem Pferd entnommenen Darmanteilen durchgeführt. Für die Entnahme wurde zunächst ein Haltezügel antimesenterial angebracht und von einem Assistenten auf Spannung gehalten. Anschließend wurde über den gespannten Darmanteil eine Fadenschlinge mit 4S Roeder Knoten platziert und angezogen. Das Biopat wurde mit einer Schere entnommen und die Biopsiestelle und die zugezogene Schlinge mit einer Cushing-Naht seromuskulär übergenäht, wobei ein Faden mit Widerhaken (englisch: "barbed suture") verwendet wurde. Ein Vorteil dieser Technik soll sein, dass durch den vorherigen Verschluss weniger Kontaminationen entstehen. Diese Technik soll der Biopsie via Laparoskopie dienen, ist bisher jedoch nicht *in vivo* erprobt (Munsterman et al., 2023). In derselben Studie wurde die neue Biopsietechnik mit einer bereits in anderen Studien beschriebenen verglichen, bei welcher Gewebeprobe in elliptischer Form antimesenterial mit einer Schere entnommen und die Entnahmestellen zweischichtig verschlossen wurden. Bei beiden Techniken waren die Einengung des Darmlumens und der Berstdruck annähernd gleich. Darüber hinaus waren die gewonnenen Biopate beider Techniken angemessen histologisch auswertbar (Munsterman et al., 2023).

Bei Pferden besteht die Möglichkeit, den Darm nach einer Inzision mit einer sogenannten modifizierten Heineke-Mikulicz-Technik zu verschließen. Diese Technik wurde ursprünglich in der Humanmedizin zur Therapie von Pylorusstenosen und Dünndarm-Strikturen beschrieben, um einen Erhalt des ursprünglichen Lumendurchmessers oder eine Erweiterung zu erreichen (Dietz et al., 2002;