



Stefanie Franz (Autor)

Effekt selektiver und nicht selektiver nichtsteroidaler Antiphlogistika auf die Entzündungsreaktion von durch Ischämie und Reperfusion geschädigtem equinen Jejunum

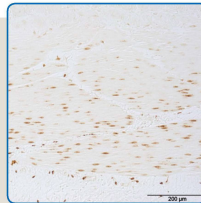
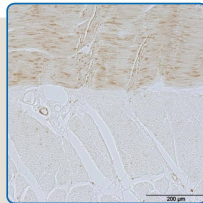
Wissenschaftliche Reihe
der Klinik für Pferde

Herausgegeben von
Karsten Feige, Peter Stadler,
Harald Sieme, Bernhard Ohnesorge



Stefanie Franz

Effekt selektiver und nicht selektiver nichtsteroidaler Antiphlogistika auf die Entzündungsreaktion von durch Ischämie und Reperfusion geschädigtem equinen Jejunum



STIFTUNG TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER

8



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6509>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



1 Einleitung

Kolik ist eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität beim Pferd (KANEENE et al. 1997; TINKER et al. 1997). Im Anschluss an eine Kolikoperation zählt der postoperative Ileus (POI) zu den häufigsten Komplikationen (MAIR u. SMITH 2005b). Studien am Dünndarm des Menschen und der Ratte haben gezeigt, dass eine Manipulation des Darms zu einer Leukozyteninfiltration in die glatte Muskulatur führt, die mit einem Abfall der in vitro Kontraktilität einhergeht (KALFF et al. 1998a, 1999, 2003; SCHWARZ et al. 2004). Die Leukozyteninfiltration konnte durch die Gabe von Dexamethason gehemmt werden (SCHWARZ et al. 2004). Nach Verabreichung eines nicht selektiven nichtsteroidalen Antiphlogistikums (NSAID) wurde ein signifikanter Anstieg und bei der Gabe verschiedener selektiver NSAIDs eine signifikante Reduktion, bzw. kein Effekt auf die Kontraktilität der zirkulären Muskelschicht der Tunica muscularis festgestellt (SCHWARZ et al. 2001).

Beim Pferd gibt es bisher nur wenige Studien, die sich mit der Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis des durch Ischämie und Reperfusion geschädigten equinen Jejunums beschäftigt haben (LITTLE et al. 2005; VENTE 2011). Es liegen bisher keine Studien vor, die die Wirkung von NSAIDs auf die Entzündungsreaktion der Tunica muscularis externa untersucht haben. In Ischämie-Reperfusionstudien an der Tunica mucosa des equinen Jejunum zeigte sich bei den mit Flunixin-Meglumin behandelten Probanden eine Hemmung der Regeneration der Darmbarriere (CAMPBELL u. BLIKSLAGER 2000; TOMLINSON et al. 2004; TOMLINSON u. BLIKSLAGER 2005; COOK et al. 2009a). Daher schlagen mehrere Studien für die Koliktherapie des Pferdes einen Wechsel von Flunixin-Meglumin zu einem selektiven NSAID vor.

Am equinen Jejunum ist bisher keine Motilitätsstudie bekannt, die einen Zusammenhang zwischen Motilität und NSAIDs untersucht hat. Eine negative Beeinflussung der Dünndarmmotorik durch selektive NSAIDs könnte für den klinischen Verlauf des Kolikers aber eine größere Bedeutung haben als ihr positiver Effekt auf die Regeneration geschädigter Schleimhaut. Deswegen ist das Ziel dieser



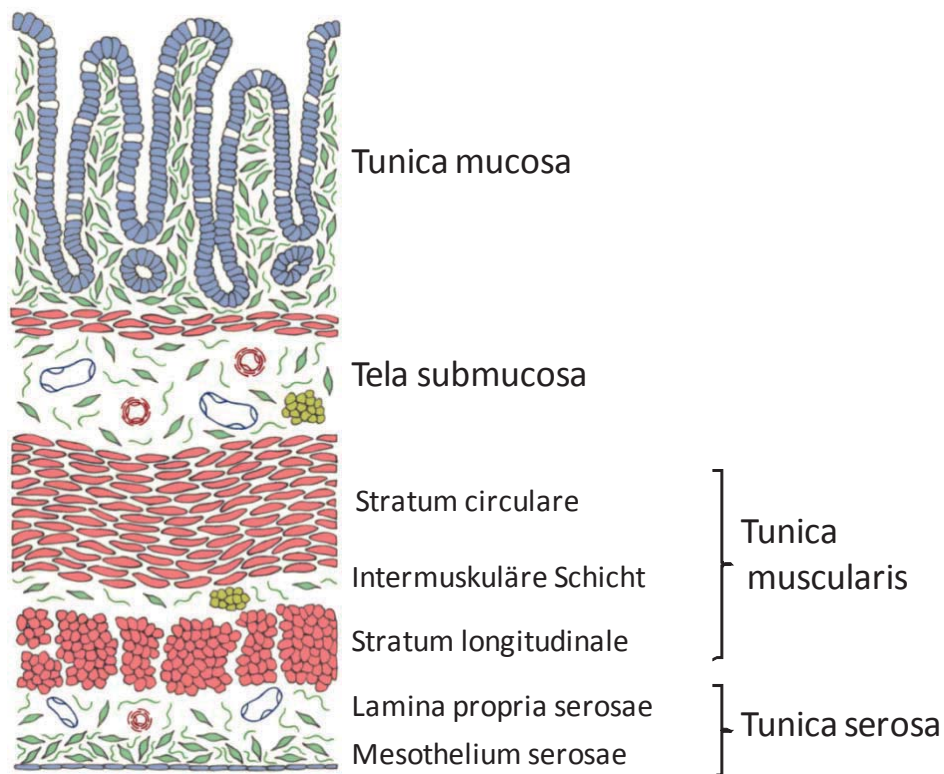
Arbeit die Charakterisierung der Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis und Tunica serosa des ischämisch geschädigten equinen Jejunums unter dem Einfluss des selektiven NSAIDs Firocoxib und des nicht selektiven NSAIDs Flunixin-Meglumin. Dazu wurden in einem ersten Versuchsabschnitt von zwölf Pferden Jejunumproben von ungeschädigtem, ischämisch geschädigtem und durch Ischämie und Reperfusion geschädigtem Jejunum entnommen. Im zweiten Versuchsabschnitt wurde dasselbe Schädigungsmodell an einem ein Meter entfernten Jejunumabschnitt durchgeführt. Der Unterschied bestand darin, dass die randomisierten Pferde während der Ischämie intravenös das nicht selektive NSAID Flunixin-Meglumin bzw. das selektive NSAID Firocoxib erhielten. Die Probenentnahme erfolgte zu denselben Zeitpunkten wie im ersten Versuchsabschnitt. Die anschließende Beurteilung von Tunica muscularis und Tunica serosa der histologisch und immunhistologisch aufbereiteten Proben umfasste die Lunafärbung zur Darstellung der eosinophilen Granulozyten, die Calprotectin-Immunhistochemie zur Darstellung der neutrophilen Granulozyten sowie eine Immunhistochemie zur Darstellung der Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2.

In Kombination mit einer angeschlossenen Kontraktilitätsstudie soll zudem überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Neutrophilenrekrutierung, der Behandlung mit einem NSAID und der Dünndarmkontraktilität besteht.

2 Literatur

2.1 Histologischer Aufbau der Darmwand

Die Darmwand gliedert sich von innen nach außen in die Tunica mucosa (Schleimhautschicht), die Tela submucosa (Unterschleimhautgewebe) sowie die Tunica muscularis (Muskelschicht) mit dem Stratum circulare (Ringmuskelschicht) und dem Stratum longitudinale (Längsmuskelschicht). Daran schließt sich die Tunica serosa (Serosaschicht) mit der bindegewebigen Lamina propria serosae und dem oberflächlichen einschichtigen Plattenepithel, dem Mesothelium serosae, an (Abb. 1) (KÖNIG et al. 1999; LIEBICH 2010).



In Anlehnung an: Caren-Imme von Stemm
Anatomisches Institut, Tierärztliche Hochschule Hannover

Abb. 1: Histologischer Aufbau der Darmwand

2.2 Intestinale Ischämie und Reperfusion

Es werden zunächst die Ursachen sowie die makroskopischen und histologischen Veränderungen, die bei Ischämie und Reperfusion am equinen Darm entstehen,



erläutert. Danach wird auf die biochemischen Abläufe und die beteiligten Zellen eingegangen.

2.2.1 Darmstrangulationen beim Pferd

Eine häufige Ursache der akuten Kolik beim Pferd sind strangulierende Dünn- und Dickdarmverlegungen (MAIR u. SMITH 2005a). Bei einer Strangulation kommt es sowohl zum Verschluss des Darmlumens, als auch der zu- und abführenden Blutgefäße (BLIKSLAGER 2008). Am Dünndarm wird die Strangulation am häufigsten von einem Lipom, einem Volvulus oder einer Inkarzeration des Darms in verschiedene abdominale Strukturen hervorgerufen, wohingegen am Dickdarm der Colonvolvulus die Hauptursache einer Strangulation ist (MAIR u. SMITH 2005a). Es können zwei Arten der Strangulationen unterschieden werden. Zum einen kann es bei einer Strangulation zu einem unvollständigen Verschluss der zu- und abführenden Blutgefäße kommen, was zu einer relativen (warmen) Ischämie führt (MEURER u. WOLF 2007). In der Regel erfolgt zunächst ein Verschluss des venösen Gefäßsystems, da die Venenwand dünner als die Arterienwand ist (BLIKSLAGER 2008). Da der arterielle Zufluss länger als der venöse Abfluss erhalten bleibt, kommt es zu einer hämorrhagischen Infarzierung des Darms. Diese Art der Strangulation wird auch als hämorrhagische Strangulation bezeichnet (SNYDER 1989; BLIKSLAGER 2008). Bei einem gleichzeitigen vollständigen Verschluss der zu- und abführenden Gefäße kommt es zu einer vollständigen (kalten) Ischämie des Gewebes. Diese Art der Strangulation wird als ischämische Strangulation bezeichnet (SNYDER 1989; BLIKSLAGER 2008).

Es gibt Hinweise, dass es bei der partiellen (warmen) Ischämie zu einer stärkeren Schädigung in der Phase der Reperfusion kommt, als bei einer totalen (kalten) Ischämie (PARK et al. 1990). So konnten am Darm der Ratte bei einer totalen Ischämie mit steigender Ischämiezeit zwar Schäden an den Mikrovilli beobachtet werden, es kam aber zu keiner Zunahme des Schadens während der Reperfusion (PARK et al. 1990). Bei der partiellen Ischämie hingegen konnte eine signifikante Verschlechterung des Mucosachadens in der Phase der Reperfusion beobachtet werden (PARK et al. 1990).



2.2.2 Makroskopische und histologische Veränderungen

Makroskopisch kommt es bei der partiellen Ischämie am equinen Dün- und Dickdarm zu einer dunkelroten bis schwarzen Verfärbung der Serosa sowie zu einer Ödematisierung und Verdickung der Darmwand (SNYDER et al. 1988; PRICHARD et al. 1991; VATISTAS et al. 1998; MATYJASZEK et al. 2009; MORTON et al. 2009). Im Jejunum konnte außerdem eine Distension des betroffenen Segmentes beobachtet werden (VATISTAS et al. 1998). Bei einer vollständigen Ischämie verfärbt sich die Serosa blaugrau (SNYDER et al. 1988).

In der histologischen Untersuchung fallen ein deutlicher Epithelzellverlust, eine Atrophie der Villi mit subepithelialen Flüssigkeitsansammlungen sowie Ödeme in der Tunica mucosa und Tela submucosa auf (VATISTAS et al. 1998; CAMPBELL u. BLIKSLAGER 2000; TOMLINSON et al. 2004; LITTLE et al. 2007b; COOK et al. 2009a; GROSCHE et al. 2011; HILTON et al. 2011).

Während der anschließenden Reperfusion kommt es am equinen Jejunum zu einem weiteren Epithelzellverlust und einer stärkeren Reduktion der Endothelzellintegrität in der Tela submucosa sowie zu einer zunehmenden Ödembildung und Extravasation von Erythrozyten im Vergleich zu den Ischämieproben (VATISTAS et al. 1998). Am equinen Colon wurden durch Reperfusion eine Vergrößerung der parazellulären Räume und große subepitheliale Spalten (GROSCHE et al. 2011) sowie eine Abnahme der Epithelhöhe festgestellt (MORTON et al. 2009). Bereits nach einer Stunde Reperfusion konnte eine Reepithelisierung und ein Verschluss der subepithelialen Lücken durch eine kontinuierliche Schicht von Epithelzellen beobachtet werden (GROSCHE et al. 2011). Auch nach einer 18-stündigen Reperfusion am equinen Jejunum kam es zu einer Reepithelisierung (TOMLINSON et al. 2004).

2.2.3 Biochemische und zelluläre Veränderungen

Während der Ischämie wird das Enzym Xanthindehydrogenase zur Xanthinoxidase umgewandelt (PARKS et al. 1988; PRICHARD et al. 1991). Gleichzeitig fällt eine Akkumulation des Substrates Hypoxanthin an, da die Xanthinoxidase Sauerstoff zur Umwandlung von Hypoxanthin benötigt, welcher während der Ischämie aber nicht



zur Verfügung steht (ARNDT et al. 1991; COLLARD u. GELMAN 2001). Während der Reperfusion kommt es durch den wieder zur Verfügung stehenden Sauerstoff zu einem schnellen Abbau des Hypoxanthins durch die Xanthinoxidase, wobei als Nebenprodukte die reaktiven Sauerstoffmetaboliten, Superoxid (O_2^-) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und beim Vorhandensein von Eisen auch Hydroxylradikale (OH) entstehen (ARNDT et al. 1991; COLLARD u. GELMAN 2001). Am Dünndarm der Katze konnte mit Beginn der Reperfusion dieser abrupte Anstieg der Radikalbildung nachvollzogen werden. Ein Teil dieser Radikale wurden von der Xanthinoxidase, ein weiterer Teil von den neutrophilen Granulozyten gebildet, beim dritten Teil war der Ursprung unklar (NILSSON et al. 1994). Dass sowohl die von der Xanthinoxidase induzierte Kaskade als auch die neutrophilen Granulozyten zum Ischämie-Reperfusionsschaden beitragen, zeigt die Studie von NILSSON et al. (1994). Sowohl bei Gabe des Xanthinoxidasehemmers Allopurinol als auch bei Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen neutrophile Granulozyten konnte eine Verbesserung der morphologischen und biochemischen Parameter festgestellt werden (NILSSON et al. 1994). Die Ergebnisse der Studie von GRISHAM et al. (1986) deuten außerdem daraufhin, dass Ischämie und Reperfusion zu einer von der Xanthinoxidase induzierten superoxidabhängigen Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Tunica mucosa führen und es zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten durch die neutrophilen Granulozyten kommt, die wiederum zu einer Steigerung des intestinalen Schadens führen.

2.2.3.1 Rolle der Neutrophilen Granulozyten

Eine wichtige Rolle in der Entstehung eines Reperfusionsschadens scheinen die neutrophilen Granulozyten einzunehmen. Es gibt mehrere Studien, die die Folgen von Ischämie und Reperfusion am Dün- und Dickdarm in Bezug auf neutrophile Granulozyten untersucht haben.

Verschiedene Studien zeigen, dass die Dauer der Ischämie eine wesentliche Rolle bei der Infiltration des equinen Jejunums mit neutrophilen Granulozyten spielt. So konnten LITTLE et al. (2005) nach einstündiger Ischämie und VENTE (2011) nach 90-minütiger Ischämie keinen Anstieg der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den Kontrollproben feststellen. Nach einer zweistündigen Ischämie hingegen konnte



ein geringer Anstieg von neutrophilen Granulozyten in der Tunica mucosa des equinen Jejunums festgestellt werden (VATISTAS et al. 1998; TOMLINSON et al. 2004), dort vor allem in den Darmzotten (VATISTAS et al. 1998). Andere Untersuchungen der Tunica mucosa des Jejunums bzw. der gesamten Jejunumwand beobachteten nach einer zweistündigen Ischämie eine signifikante Zunahme der neutrophilen Granulozyten, verglichen mit den ungeschädigten Kontrollproben (LITTLE et al. 2005, 2007b). GROSCHE et al. (2012) untersuchten außerdem die Aktivierung der Leukozyten während der Ischämie mit Hilfe der Nitrotyrosinbestimmung in den Zellen. In der Tunica mucosa und Tela submucosa des ischämisch geschädigten equinen Colons konnte eine Aktivierung der Leukozyten, gemessen an der steigenden Nitrotyrosinproduktion der Zellen, festgestellt werden. Dieser Anstieg nahm mit zunehmender Ischämiezeit ab. Außerdem konnte eine unterschiedlich starke Verteilung der neutrophilen Granulozyten in den einzelnen Schichten der Jejunumwand beobachtet werden (LITTLE et al. 2005). Sowohl in den ungeschädigten Kontrollproben als auch nach ein und zwei Stunden Ischämie waren die meisten neutrophilen Granulozyten in der Tunica serosa und der longitudinalen Schicht der Tunica muscularis im Vergleich mit den anderen Schichten vorhanden (LITTLE et al. 2005). Im Vergleich der beiden Muskelschichten enthielt die Längsmuskelschicht signifikant mehr neutrophile Granulozyten als die Ringmuskelschicht (LITTLE et al. 2005). Dabei befanden sich die neutrophilen Granulozyten in beiden Muskelschichten vor allem im interstitiellen Bindegewebe. Zwischen den aneinander liegenden glatten Muskelzellen befanden sich nur sehr wenige neutrophile Granulozyten (LITTLE et al. 2005). In der Tunica serosa befanden sich die meisten Zellen am mesothelialen Rand (LITTLE et al. 2005).

Während der Reperfusion kommt es zu einem signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den Ischämieproben (GRISHAM et al. 1986; GROSCHE et al. 2008; VENDE 2011). Dabei kann bereits zu Reperfusionsbeginn eine signifikante Migration der neutrophilen Granulozyten in die Tunica mucosa und Tela submucosa des equinen Jejunums und Colons beobachtet werden (MOORE et al. 1994; VENDE 2011). Die neutrophilen Granulozyten migrieren in die Tela



submucosa, zum Mucosaepithel und in das intestinale Lumen (GROSCHE et al. 2011). Wobei sich bereits nach 30-minütiger Reperfusion die meisten neutrophilen Granulozyten im intestinalen Lumen im Vergleich mit den zur Tela submucosa orientierten Mucosaschichten befanden (GROSCHE et al. 2008). Auch nach 18 Stunden Reperfusion war die Anzahl der migrierten neutrophilen Granulozyten in der Tunica mucosa im Vergleich zu den Ischämieproben signifikant erhöht (TOMLINSON et al. 2004; MATYJASZEK et al. 2009). VENTE (2011) beschreibt in der Tunica muscularis und Tunica serosa außerdem traubenförmige Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten, die sich von der zellulären Infiltration der Umgebung deutlich abhoben. Die Bedeutung der als Zellcluster bezeichneten Zellansammlungen ist unbekannt. Möglicherweise sind sie auf hämodynamische Ursachen zurückzuführen, da sie vor allem während der Reperfusion auftraten und sich häufig in der Nähe von Gefäßanschnitten befanden (VENTE 2011). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Leukozyten in der Tunica mucosa und Tela submucosa des equinen Colons durch Reperfusion zunimmt. So kam es zu einer Steigerung der Nitrotyrosinproduktion in den Reperfusionssproben im Vergleich mit den Kontrollproben, wobei nach 30-minütiger Reperfusion lediglich eine geringe Zunahme festgestellt werden konnte und es nach 18-stündiger Reperfusion zu einem signifikanten Anstieg der Nitrotyrosinproduktion kam (GROSCHE et al. 2012).

2.2.3.1.1 Nachweis der neutrophilen Granulozyten

Zur Bestimmung der neutrophilen Granulozyten im Gastrointestinaltrakt ist der immunhistochemische Nachweis von Calprotectin eine etablierte Methode (GROSCHE et al. 2008). Calprotectin ist auch unter den Namen Calgranulin, L-1 Protein oder MRP-8/14 bekannt (JOHNE et al. 1997) und macht ungefähr 30 - 50 % des Gesamtproteins im Zytosol der neutrophilen Granulozyten aus (SØRENSEN u. BORREGAARD 1999; YUI et al. 2003). Die neutrophilen Granulozyten sind die Hauptproduzenten des Calprotectins (YUI et al. 2003). Zusätzlich wird es in Makrophagen exprimiert, wobei der Gehalt in den Makrophagen wesentlich geringer ist und eine Expression nur während der akuten Entzündung stattfindet. Auch in Monozyten findet im Rahmen einer akuten Entzündung eine Calprotectinexpression statt, in Lymphozyten kommt es in der Regel nicht vor (YUI et al. 2003).



Studien am equinen Jejunum und Colon belegen, dass es eine signifikante Korrelation in der Anzahl der mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefärbten neutrophilen Granulozyten und den Calprotectin positiven Zellen gibt (LITTLE et al. 2005; GROSCHE et al. 2008). Die immunhistochemische Darstellung von Calprotectin erlaubt eine gute Differenzierung von positiven Zellen gegenüber der Umgebung und damit eine objektive und präzise Beurteilung von Verteilung und Akkumulation der Zellen. Sie bietet damit Vorteile gegenüber der konventionellen Darstellung der neutrophilen Granulozyten mit der HE-Färbung. In der HE-Färbung ist die Zelldifferenzierung schwierig und sehr subjektiv, vor allem nach einem Ischämie- und Reperfusionsschaden, der zu einem deutlichen Anstieg von Zellen im Gewebe führt (MOORE et al. 1994).

2.2.3.2 Rolle der Mastzellen und Makrophagen

Am Dickdarm des Pferdes konnte bei Schädigung durch Ischämie und Reperfusion eine Aktivierung der Mastzellen und Makrophagen festgestellt werden, wobei sich die Anzahl der Zellen nicht verändert. So wurde bei den Mastzellen eine abnehmende Anzahl an zytoplasmatischer Granula beobachtet, die als Degranulation und Freisetzung von proinflammatorischen Molekülen ins Interstitium interpretiert werden kann. Die Makrophagen enthielten große phagozytische, zytoplasmatische Vakuolen mit Zelldebris und apoptotischen Zellen. Diese Daten liefern Hinweise auf eine phagozytische Aktivität der Makrophagen während der Ischämie und Reperfusion (GROSCHE et al. 2011).

2.2.3.3 Eosinophile Granulozyten

2.2.3.3.1 Eosinophile Granulozyten im gesunden Gastrointestinaltrakt

Die eosinophilen Granulozyten sind überwiegend gewebständige Zellen, nur wenige zirkulieren im Blut (STRAUMANN u. SIMON 2004). Eine Studie, die Proben von humanen, nicht erkrankten Organen untersuchte, hat gezeigt, dass sich die eosinophilen Granulozyten, mit Ausnahme des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes, ausschließlich in der Tunica mucosa des Gastrointestinaltraktes befinden (KATO et al. 1998). Die Verteilung der eosinophilen Granulozyten innerhalb des Gastrointestinaltraktes ist dabei nicht homogen. So wurde im gesunden Darm von Kindern die höchste Dichte an eosinophilen Granulozyten im Caecum und im



Wurmfortsatz beobachtet, wohingegen im Magen und distalen Abschnitt des Dickdarms nur wenige Zellen festgestellt wurden (LOWICHIK u. WEINBERG 1996). Die Ergebnisse der Studie stimmen mit Befunden überein, die am nicht erkrankten Gastrointestinaltrakt des Pferdes erhoben wurden. Auch dort ist die Verteilung der eosinophilen Granulozyten inhomogen, mit der geringsten Dichte im Magen und der höchsten Dichte im Caecum (RÖTTING et al. 2008a). Vom Magen nimmt die Anzahl der eosinophilen Granulozyten bis zum Caecum schrittweise zu und danach wieder ab (RÖTTING et al. 2008a). Im Dickdarm (Caecum und Colon ascendens) befanden sich mehr eosinophile Granulozyten als im Duodenum und Jejunum (RÖTTING et al. 2008a).

Die Verteilung innerhalb der Darmwand ist ebenfalls inhomogen. So haben zwei Studien am equinen Jejunum und Colon gezeigt, dass sich die eosinophilen Granulozyten fast ausschließlich in der Tunica mucosa und Tela submucosa befinden und dort ausschließlich in dem Bereich, welcher der Lamina muscularis mucosae anliegt (SULLINS et al. 1985; HOPSTER-IVERSEN et al. 2011; VENDE 2011). Bei differenzierter Betrachtung der Tunica mucosa fällt außerdem auf, dass sich mehr als 80 % der eosinophilen Granulozyten in der basalen Schicht und keine Zellen in der luminalen Zone der Tunica mucosa befinden (RÖTTING et al. 2003; RÖTTING et al. 2008a). In der Tunica muscularis und Tunica serosa wurden sie nur vereinzelt beobachtet (HOPSTER-IVERSEN et al. 2011; VENDE 2011).

2.2.3.3.2 Eosinophile Granulozyten bei intestinaler Schädigung

Bei Schädigung des Darms durch Ischämie und Reperfusion sowie bei mechanischer oder chemischer Reizung kommt es vor allem zu einer Migration und Aktivierung der eosinophilen Granulozyten, aber nicht immer zu einer deutlichen Änderung der Zellanzahl. So konnte am equinen Colon nach ein- und zweistündiger Ischämie in der Tunica mucosa kein Anstieg der eosinophilen Granulozyten festgestellt werden (GROSCHKE et al. 2011; GROSCHKE et al. 2012). Bei einer Ischämiezeit von mindestens 3,25 Stunden hingegen konnte ein Anstieg der eosinophilen Granulozyten in der Tunica mucosa des equinen Colons festgestellt werden, so dass die Dauer der Ischämie eventuell einen Einfluss auf eine Zunahme der eosinophilen Granulozyten hat (MOORE et al. 1994). Bei differenzierter Betrachtung der einzelnen



Darmschichten des equinen Jejunums stellte VENTE (2011) in der Tunica mucosa, Tela submucosa und Tunica muscularis nach Ischämie und Reperfusion keine Unterschiede in der Anzahl der eosinophilen Granulozyten fest. Demgegenüber kam es in der Tunica serosa zu einem signifikanten Anstieg der eosinophilen Granulozyten im Vergleich mit den Kontrollproben (VENTE 2011). Bei Laparotomie und mechanischer Manipulation des equinen Jejunums konnte hingegen ein Anstieg der eosinophilen Granulozyten in der Colonmucosa beobachtet werden (HOPSTER-IVERSEN et al. 2011). Die Aktivität der eosinophilen Granulozyten, gemessen an der Nitrotyrosinproduktion, nahm während ein- und zweistündiger Ischämie signifikant zu. Während der sich anschließenden 30-minütigen Reperfusion konnte eine Aufrechterhaltung dieser Aktivität festgestellt werden, wobei die Produktion nach 18-stündiger Reperfusion signifikant abnahm (GROSCHKE et al. 2012).

Zusätzlich konnten zwei Studien bei verschiedenartiger Schädigung des equinen Colons eine Migration der eosinophilen Granulozyten in der Tunica mucosa feststellen. In der einen Studie wurde die Tunica mucosa des dorsalen Colons in hypochloriger Säure inkubiert. Dies führte zu einer progressiven Migration der eosinophilen Granulozyten in die oberflächliche Schicht der Tunica mucosa und nach 30 Minuten zusätzlich zu einem signifikanten Anstieg an der Mucosaoberfläche bzw. im intestinalen Lumen mit Akkumulation der eosinophilen Granulozyten (RÖTTING et al. 2003). In der anderen Studie konnte bei mechanischer Manipulation der Colonserosa eine Umverteilung der eosinophilen Granulozyten zum intestinalen Lumen hin festgestellt werden (HOPSTER-IVERSEN et al. 2011).

Bei Pferden mit intestinaler Schädigung durch Larven der kleinen Strongyliden konnte im Caecum und Colon eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der eosinophilen Granulozyten und der Hauptbelastung mit Würmern und Larven festgestellt werden (COLLOBERT-LAUGIER et al. 2002). In einer anderen Studie hingegen gab es hinsichtlich der eosinophilen Granulozyten keine Unterschiede in den Dickdarmproben von normal aufgestellten Pferden, Pferden aus einer parasitenfreien Umgebung und experimentell mit *Strongylus vulgaris* infizierten Probanden. In der experimentell infizierten Gruppe konnten auch keine Unterschiede



zwischen den mit einem Anthelmintikum behandelten und den unbehandelten Probanden festgestellt werden (RÖTTING et al. 2008b).

2.2.3.3.3 Nachweis der eosinophilen Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten können mit Hilfe der für sie spezifischen Lunafärbung nachgewiesen werden. Bei der Lunafärbung färbt sich die eosinophile Granula rot, die Erythrozyten orange und die Kernelemente blau (LUNA 1992), so dass sich die eosinophilen Granulozyten sehr gut von der Umgebung differenzieren lassen. Dieses erlaubt eine präzise sowie objektive Darstellung von Verteilung und Akkumulation der eosinophilen Granulozyten, die sich in vorherigen Studien (RÖTTING et al. 2008a, b; HOPSTER-IVERSEN et al. 2011; VENDE 2011) bewährt hat.

2.3 Postoperativer Ileus

2.3.1 Allgemeines und prädisponierende Faktoren

Unter einem Ileus versteht man die Minderung des aboralen Transportes von gastrointestinalem Inhalt aufgrund einer mechanischen Behinderung oder funktionellen Störung (RAKESTRAW 2002). Beim POI handelt es sich um eine funktionelle Störung der gastrointestinalen Passage (RAKESTRAW 2002). Von einem POI spricht man beim Pferd ab einem Refluxvolumen von > 20 Litern in den ersten 24 Stunden nach der Kolikoperation oder bei einem Refluxvolumen von > 8 Liter bei der Kontrolle der Nasenschlundsonde nach der Kolikoperation (ROUSSEL et al. 2001; COHEN et al. 2004; TORFS et al. 2009).

Der POI ist beim Pferd nach medianer Laparotomie und Darmmanipulation beschrieben (GERRING u. HUNT 1986; GARCIA-LOPEZ et al. 2001; DELESALLE et al. 2005) und ist eine der häufigsten Komplikationen nach einer Kolikoperation (BLIKSLAGER et al. 1994; PROUDMAN et al. 2002; MAIR u. SMITH 2005b). Dabei entwickeln Pferde mit einer Obstruktion bzw. Strangulation des Dünndarms signifikant häufiger einen POI als Pferde mit Colonobstruktion bzw. -strangulation (ROUSSEL et al. 2001; MAIR u. SMITH 2005b). FREEMAN et al. (2000) beobachteten ausschließlich bei strangulierenden Dünndarmverschlüssen einen POI. Ein dreifach erhöhtes POI Risiko nach Strangulation durch gestielte Lipoma pendulans gegenüber anderen Dünndarmverschlüssen ist von FRENCH et al. (2002)



beschrieben. In mehreren Studien hat sich gezeigt, dass es weitere prädisponierende Faktoren gibt, die das Risiko der Entwicklung eines POI erhöhen. Dazu zählt ein erhöhter Hämatokrit bei Vorstellung des kolikenden Pferdes (BLIKSLAGER et al. 1994; ROUSSEL et al. 2001; FRENCH et al. 2002; COHEN et al. 2004), eine Anästhesiedauer von über 2,5 Stunden bzw. eine Chirurgiedauer von über 2 (ROUSSEL et al. 2001) bzw. 3 Stunden (COHEN et al. 2004) und eine Läsion des Dünndarms (BLIKSLAGER et al. 1994; ROUSSEL et al. 2001; COHEN et al. 2004). Der POI tritt meist in den ersten Tagen nach der Kolikoperation auf (PROUDMAN et al. 2002), im Durchschnitt 13 Stunden (0,5 +/- 120 Stunden) nach der Operation, mit einer Dauer von einem Tag (1 +/- 7 Tage) (BLIKSLAGER et al. 1994). Klinisch fallen die Pferde beim POI durch Tachykardie, abdominale Schmerzen, Reflux, Hämokonzentration, Ausbleiben der Darmgeräusche und fehlendem Kotabsatz auf (ROUSSEL et al. 2001; LITTLE et al. 2005).

Die kurzfristige Überlebensrate ist bei Pferden, die einen POI entwickeln, signifikant niedriger als bei Pferden, die keinen entwickeln (MAIR u. SMITH 2005b). Die Angaben zur Mortalität von Pferden, die einen POI entwickeln, sind in verschiedenen Studien unterschiedlich. Sie liegt bei 9 % (FREEMAN et al. 2000), 13 % (BLIKSLAGER et al. 1994), 30 % (PROUDMAN et al. 2002), 37,5 % (MORTON u. BLIKSLAGER et al. 2002) und 42,9 % (HUNT et al. 1986) von allen Pferden die eine POI entwickelten.

2.3.2 Pathogenese

Beim Pferd werden verschiedene Ursachen im Zusammenhang mit dem POI diskutiert. Dazu gehören Entzündungen des Gastrointestinaltraktes, Peritonitis, Endotoxämie, Elektrolytimbalancen und Hypoalbuminämie (KING u. GERRING 1991; BLIKSLAGER et al. 1994; ROUSSEL et al. 2001; Nieto et al. 2002). BOECKXSTAENS und DE JONGE (2009) beschreiben eine zeitliche Einteilung des POI in eine frühe und eine späte Phase. Die frühe Phase des POI beschränkt sich auf die ersten drei Stunden nach dem chirurgischen Eingriff und scheint durch neurogene Reflexe vermittelt zu werden, die während oder direkt nach dem chirurgischen Eingriff aktiviert werden. Es ist die Beteiligung verschiedener neurogener Mechanismen beschrieben. Der Sympathikus scheint eine Rolle zu



spielen, da der Abbau von adrenergen Nerven die Unterbrechung der normalen gastrointestinalen Motilität verhindert (PLOURDE et al. 1993; ZITTLE et al. 1994). Weitere Studien deuten außerdem auf eine vagale Beteiligung hin (ZITTEL et al. 1993; BOECKXSTAENS et al. 1999). Dass die Abdominalchirurgie bei der Ratte zu einer Aktivierung von spezifischen Neuronen im Hypothalamus, in der Medulla und dem Pons führt, liefert außerdem Hinweise auf eine Beteiligung zentraler Mechanismen bei der Entstehung des POI (BONAZ et al. 1994). Zusätzlich scheint die Aktivierung des Corticotrophin-Releasing Faktors eine Rolle zu spielen. Die Autoren hypothesieren, dass der Corticotrophin-Releasing Faktor Neurone im Nucleus supraopticus des Hypothalamus aktiviert, die wiederum Signale zu sympathischen, präganglionären Neuronen im Rückenmark senden, deren Aktivierung zu einer Hemmung der gastrointestinalen Aktivität führt (TACHE et al. 1993; BARQUIST et al. 1996).

Die späte inflammatorische Phase des POI beginnt drei bis vier Stunden nach der Operation und scheint für die Aufrechterhaltung des POI verantwortlich zu sein (BOECKXSTAENS u. DE JONGE 2009).

2.3.2.1 Inflammatorische Genese

Verschiedene Studien zeigen, dass eine Beeinträchtigung der Darmmotilität durch eine entzündliche Infiltration der Tunica muscularis externa in Folge chirurgischer Manipulation des Darms hervorgerufen werden kann (KALFF et al. 1998a, 1999; TÜRRLER et al. 2002; SCHWARZ et al. 2004; WEHNER et al. 2007).

2.3.2.1.1 Neutrophile Granulozyten

Schon bei Öffnung der Bauchhöhle mit und ohne Vorlagerung des Darms kommt es zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten in die Tunica muscularis externa des Dünndarms der Ratte (KALFF et al. 1998a). Eine sehr dichte und homogene Verteilung der neutrophilen Granulozyten in der Tunica muscularis externa wird nach Ausstreichen und bei Kompression des Jejunums bei der Ratte beobachtet. In den manipulierten Jejunumabschnitten zeigten in vitro Kontraktilitätsuntersuchungen zudem eine Reduktion der Kontraktionen der zirkulären Muskelschicht der Tunica muscularis (KALFF et al. 1998a). Zwei Studien, bei denen eine Manipulation am



Jejunum bzw. am Colon der Ratte durchgeführt wurde, zeigten im gesamten Gastrointestinaltrakt eine deutliche Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (TÜRLER et al. 2002; SCHWARZ et al. 2004). In vivo wurde neben einer Reduktion der Motilität im manipulierten Darmanteil auch eine verzögerte Magenentleerung und verzögerte Ingestapassage im gesamten Gastrointestinaltrakt beobachtet. In vitro wurde bei beiden Studien eine Reduktion der zirkulären Muskelkontraktilität festgestellt (TÜRLER et al. 2002; SCHWARZ et al. 2004). Bei Gabe von Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, P-Selectin) der Endothel- und Immunzellen wurden keine neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten rekrutiert und es konnte keine Dysfunktion der zirkulären Muskelschicht der Tunica muscularis festgestellt werden (KALFF et al. 1999). Auch die Behandlung von Ratten mit Dexamethason vor der Manipulation des Jejunums führte zu einer deutlichen Abnahme der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie zu einer Reduktion der Kontraktilitätshemmung (SCHWARZ et al. 2004). Auch in humanen und equinen Studien konnte eine zelluläre Infiltration durch Manipulation des Darms beobachtet werden. So konnte bei Menschen, bei denen eine Dünndarmresektion vorgenommen wurde, in den Resektionsenden von makroskopisch unverändertem Darm ein signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten und Monozyten in der zirkulären Muskelschicht der Tunica muscularis beobachtet werden, wohingegen die Längsmuskelschicht annähernd zellfrei war (KALFF et al. 2003). Bei Patienten, die nach 24 bzw. 48 Stunden erneut einer medianen Laparotomie unterzogen werden mussten, wurde eine deutliche Reduktion der spontanen Kontraktilität beobachtet (KALFF et al. 2003). Im ischämisch geschädigten equinen Jejunum ist eine signifikante neutrophile Entzündungsreaktion in der Tunica muscularis externa, der Tunica serosa sowie im Plexus myentericus beschrieben (LITTLE et al. 2005). Da die neutrophile Inflammation mit dem Zeitpunkt des Auftretens der klinischen Symptome des POI übereinstimmt, liefert die Studie Hinweise, dass die inflammatorische Pathogenese auch beim Pferd eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des POI spielt (LITTLE et al. 2005). Am Colon des Pferdes kommt es nach mechanischer Irritation der Tunica serosa ebenfalls zu einer Infiltration der zirkulären Muskelschicht der Tunica muscularis mit neutrophilen Granulozyten (HOPSTER-IVERSEN et al. 2011). Die