



Stefanie Franz (Autor)

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

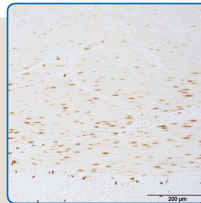
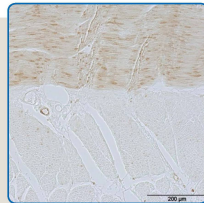
Wissenschaftliche Reihe
der Klinik für Pferde

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>



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
2.2.3.1.3 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 - 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
2.4.5 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	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