

**Aus der Universitätsklinik für
Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer**

**Aktivierung vagaler Hirnstammnervenkerne und
extrinsischer afferenter Nervenfasern nach selektiver
COX-2 Inhibition während des postoperativen Ileus bei
der Maus**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Dimitrios Kampitoglou**

**aus
Thessaloniki/Griechenland
2007**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Kreis

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Enck

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
AK	Antikörper
AP	Area Postrema
BK	Bradykinin
CC	Canalis Centralis
c-Fos	Cellular Finkel Osteo Sarkoma
COX	Cyclooxygenase
DAB	Diaminobenzidin
DFU	5,5-dimethyl-3-(flurorophenyl)-4-(4-methylsulfonyl) phenyl- 2(5H)-furan
DMSO	Dimethylsulfoxid
GAR	Goat Anti- Rabbit
MPO	Myeloperoxidase
NBF	Neutral Buffered Formalin
NGS	Normal Goat Serum
NTS	Nucleus Tractus Solitarius
PBS	Phosphate Buffered Solution
PC	Pyrocatechol
PPD	p- Phenylenediamined-hydrochloride
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of the Mean
TBS	Tris Buffered Solution
ZNS	Zentralnervensystem

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
1 Einleitung	1
2 Material und Methodik	4
2.1 Versuchstiere	4
2.2 Versuchsdurchführung	4
2.2.1 Auslösen des postoperativen Ileus	4
2.2.2 Gewebeentnahme und Gewebeaufbereitung	5
2.3 Nervenfasernableitung	5
2.4 Immunhistochemie	8
2.4.1 MPO-Färbung (Myeloperoxidase)	8
2.4.2 Immunhistochemischer c-fos Nachweis	9
2.5 Versuchsprotokoll	11
2.6 Auswertung	13
2.6.1 Elektrophysiologie und Motilitätsmessungen	13
2.6.2 MPO	13
2.6.3 c-fos	13
2.7 Statistik	14
2.8 Substanzen und Lösungen	15
2.8.1. Elektrophysiologie	15
2.8.2 Immunhistochemie und Histologie	17
2.8.3 Materialien und Geräte	18
3 Ergebnisse	21
3.1 Darmmotilität	21
3.2 Intestinale afferente Sensibilität	24
3.2.1 Nervenfasernaktivität in Ruhe	24
3.2.2 Mechanische Stimulation	24
3.2.3 Chemische Stimulation	27

3.3 C-fos im Nucleus tractus solitarius (nTS)	30
3.4 Myeloperoxidasefärbung (MPO)	33
4 Diskussion	35
4.1 Diskussion der Ergebnisse	35
4.2 Klinischer Ausblick	40
5 Zusammenfassung	42
6 Abbildungen und Tabellen	44
7 Literaturverzeichnis	46

1. Einleitung

Nach abdominalchirurgischen Eingriffen kommt es häufig zu Störungen der gastrointestinalen Motilität. Dieser Zustand wird als postoperativer Ileus bezeichnet (59,79). Pathophysiologisch handelt es sich dabei um eine Darmparalyse, mit Reduktion des Darmtonus und der Darmperistaltik. Dauert dieser Zustand länger an, kommt es zur Stase und Darmwandüberdehnung und nachfolgend zu lokalen Durchblutungsstörungen, Darmwandödem sowie zu intestinalem Flüssigkeits- und Proteinverlust (60,88). Diese Störungen sind häufig mit Allgemeinsymptomen wie Hypovolämie, Hämokonzentration, verringertem Plasmavolumen bis hin zum Schock vergesellschaftet. Der postoperative Ileus führt zu einer erhöhten postoperativen Morbidität und hat einen verlängerten Krankenhausaufenthalt zur Folge (29). Die Gesamtleitlät beträgt ca. 25%. In den USA wurde für das Jahr 2000 angenommen, dass Motilitätstörungen nach Operationen zu einem finanziellen Mehraufwand von einer Milliarde Dollar pro Jahr führten (59,75). Auch in Deutschland dürfte, insbesondere wenn auch indirekte Kosten wie Arbeitsunfähigkeit mit einbezogen werden, eine dreistellige Euro-Millionensumme pro Jahr überschritten werden. Dieser Aspekt der Behandlung gewinnt erheblich an Bedeutung, da nach Einführung der "Diagnosis related groups" (DRG) in Deutschland der wirtschaftliche Druck, zumindest kostenneutral zu arbeiten, zunimmt. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die postoperativen Liegezeiten weiter zu verkürzen und den postoperativen Ileus frühzeitig zu behandeln oder möglichst ganz zu vermeiden.

In den letzten Jahren hat sich das Spektrum möglicher Ursachen für die Entstehung des postoperativen Ileus stark erweitert. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass lokale Entzündungsreaktionen in der Darmwand als möglicher zentraler Pathomechanismus zu diskutieren sind (4,22,49,95). In tierexperimentellen Versuchen ist beschrieben worden, dass es nach Darmmanipulation und nachfolgendem postoperativen Ileus zu einer vom

Ausmaß des Eingriffs abhängigen Aktivierung ortständiger Makrophagen, sowie zur Infiltration der Tunika muscularis der Darmwand mit Entzündungszellen im gesamten Gastrointestinaltrakt kommt (21,48,68,83,85). Diese Veränderungen sind mit denen einer Entzündungsreaktion vergleichbar, wie sie auch durch Lipopolysaccharide aus der Zellwand von Darmbakterien ausgelöst werden können und führen zu einer weiteren Verlangsamung des gastrointestinalen Transits (47). Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass der Prostaglandinstoffwechsel zur Entstehung des postoperativen Ileus beiträgt (65). Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass die postoperative Anwendung von nicht-steroidalen Antiphlogistika eine Reduktion des postoperativen Ileus bewirken können (18,22,42,52,72). Dabei scheint insbesondere die Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2), als wichtiges Enzym des Arachidonsäurezykluses, von Bedeutung zu sein (46,65). Während des postoperativen Ileus bei der Ratte konnte eine vermehrte Produktion von COX-2 mRNA und eine Zunahme der Prostaglandinkonzentration intraperitoneal und im Serum nachgewiesen werden (47,50,69).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Entstehung des postoperativen Ileus stellt die Aktivierung intestinaler neuronaler afferenter Übertragungswege dar (17). Hierbei kommt es nach Zunahme der neuronalen afferenten Entladungsfrequenz zu einer efferenten neuronalen Inhibition mit konsekutiver Darmmotilitätsreduktion. Diese ist über sympathische adrenerge Neurone vermittelt (55). Die beiden neuronalen Komponenten sind möglicherweise Teil eines neuronalen intestinalen Reflexmodells, welches zur Entstehung des postoperativen Ileus beiträgt (33,53). Es ist gezeigt worden, dass während des postoperativen Ileus spinale afferente Neurone aktiviert werden (10,103). Somit könnten spinale Afferenzen einen Teil dieses inhibitorischen neuronalen Reflexmechanismus in der Situation des postoperativen Ileus darstellen (87). Das wirft jedoch die Frage auf wie diese Afferenzen aktiviert werden. Hierfür gibt es zwei mögliche Mechanismen. Zum einen könnte es durch die Manipulation des Darms während der Operation zu einer Aktivierung von intestinalen mechanosensiblen afferenten Nervenfasern kommen. Des

Weiteren ist gezeigt worden, dass lokale Entzündungsreaktionen, wie sie beim postoperativen Ileus auftreten, eine vermehrte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie z.B. Histamin, Bradykinin oder Prostaglandin E₂, zur Folge haben können (8,33,55,89). Diese Entzündungsmediatoren haben die Potenz intestinale afferente Nervenfasern zu aktivieren und/oder zu sensibilisieren (32,33). Dieses Phänomen könnte möglicherweise eine hohe Relevanz für die Pathogenese des postoperativen Ileus besitzen, da hier die oben beschriebene neuronale Reflexhemmung zu einer sofortigen Stase des Darminhalts führt. Nachfolgend kommt es möglicherweise zur kontinuierlichen Störung der Darmpassage mit Überblähung des Darms, was eine Sensibilisierung mechanosensibler Afferenzen zur Folge haben könnte. Gleichzeitig könnte die Sensibilisierung der beschriebenen Afferenzen durch von ortsständigen oder eingewanderten Entzündungszellen ausgeschüttete Entzündungsmediatoren erfolgen (15,23,24). Es ist bekannt, dass diese Afferenzen auch als Nocizeptoren fungieren und so möglicherweise zu dem Beschwerdebild der Patienten während des postoperativen Ileus beitragen (Cervero F, Br Med Bull, 1991). Der genaue Mechanismus der Aktivierung und Sensibilisierung intestinaler afferenter Nervenfasern während des postoperativen Ileus ist jedoch weiter unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb die intestinale afferente Sensibilität während des postoperativen Ileus zu charakterisieren. Als zentrale Hypothese lag hierbei zu Grunde, dass die Manipulation des Dünndarms zu einer erhöhten Sensibilität intestinaler afferenter Nervenfasern für Entzündungsmediatoren und mechanosensitive Stimuli über einen COX-2 vermittelten Übertragungsweg führt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob weitere exzitatorische primär afferente neuronale Reflexmechanismen, wie z.B. vagale Afferenzen und nicht nur ausschließlich spinale afferente neuronale Übertragungswege ins zentrale Nervensystem, an der Entstehung der postoperativen Passagestörung beteiligt sind.

2. Material und Methodik

2.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden mit weiblichen Mäusen C57 BL 6 durchgeführt. Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 20-25g. Die Tiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen mit einem 12:12 Stunden hell/dunkel Zyklus gehalten und erhielten Trockenfutter und Trinkwasser ad libitum. Die Versuche wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Tierversuchsantrag C 03/7).

2.2 Versuchsdurchführung

2.2.1 Auslösen des postoperativen Ileus

Um den postoperativen Ileus zu induzieren, wurde zu Beginn des Versuches eine standardisierte Dünndarmmanipulation durchgeführt (51). Nach Enflurananästhesie wurde hierzu unter sterilen Bedingungen eine mediane Laparotomie durchgeführt. Anschließend erfolgte die Manipulation des gesamten Dünndarms mit sterilen Watteträgern. Nachfolgend wurde der Dünndarm wieder in die anatomisch korrekte Lage gebracht und das Abdomen in fortlaufender Naht verschlossen. Bei Kontrolltieren wurde eine Scheinoperation, d.h. eine Laparotomie ohne Darmmanipulation durchgeführt. Die Tiere wurden bis zu ihrem vollständigen Erwachen aus der Narkose überwacht (53).

2.2.2 Gewebeentnahme und Gewebeaufbereitung

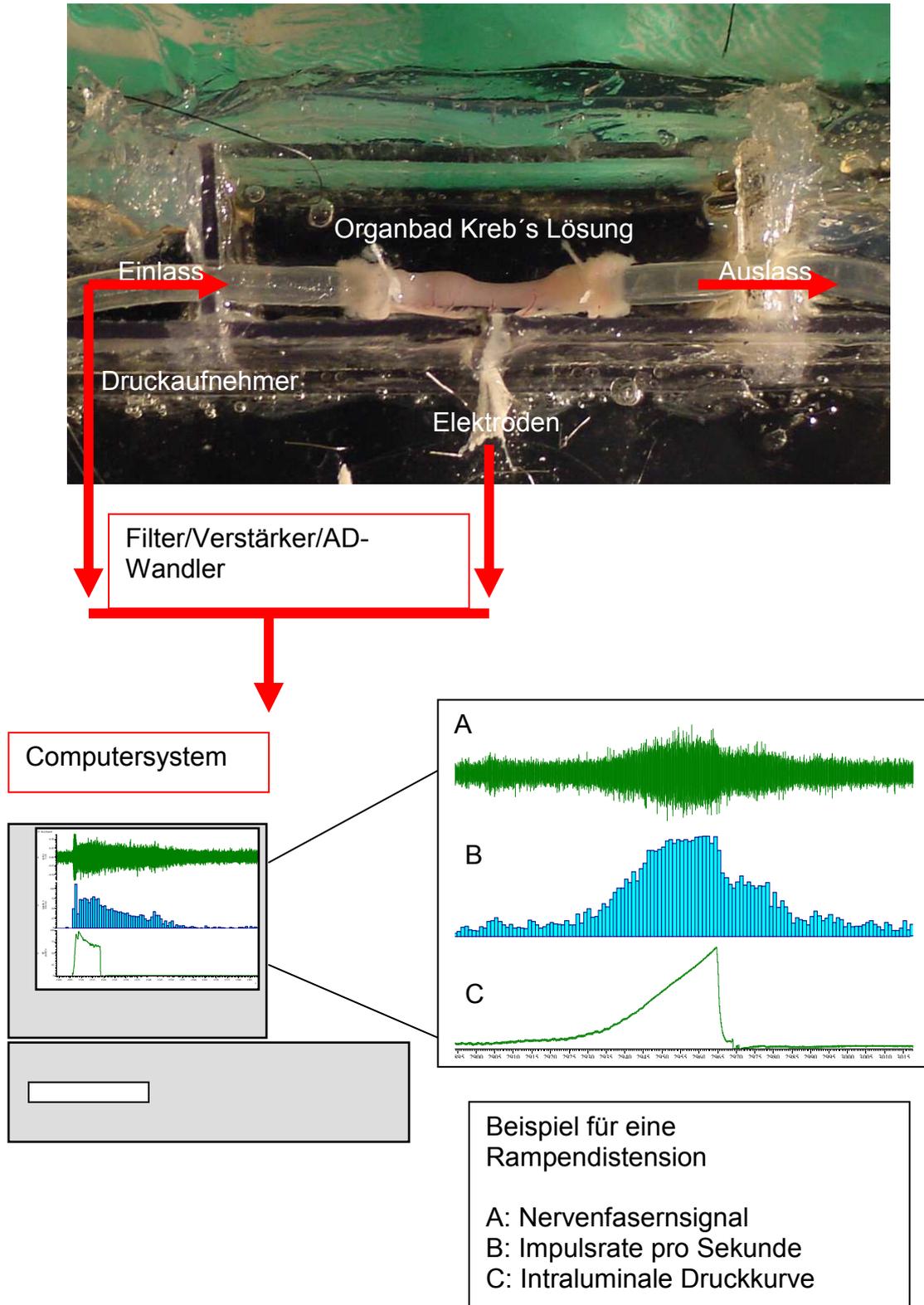
Nach 24 Stunden wurden die Tiere mit Überdosis Enfluran getötet. Zunächst erfolgte die Entnahme des oberen Jejunums. Nach Eröffnen des Darmsegments auf der mesenterialen Seite und Aufspannen derselben in silikonbeschichteten Schalen erfolgte die Fixierung des Darms für 4 h in neutral gepuffertem Formalin (NBF). Anschließend wurden die Darmproben dreimal mit PBS (Phosphate buffered solution) gewaschen. Danach erfolgte die Abpräparation der Mucosa und Abgabe des Präparats zur unten beschriebenen Myeloperoxidasefärbung. Abschließend wurde der Brustkorb der Versuchstiere eröffnet, die Herzspitze aufgesucht und ein kleiner Katheter durch die linke Herzkammer in die Aorta ascendens vorgeschoben. Nach Eröffnen der Vena cava inferior erfolgte zunächst die Perfusion der Versuchstiere mit 20 ml NaCl 0,9%. Nachdem die Versuchstiere blutleer gespült waren, erfolgte die Fixierung mit 50ml 4% Paraformaldehyd. Dann wurde das Stammhirn entnommen. Nach Nachfixierung des Präparats über weitere 4 Stunden, wurde das Stammhirn bis zur immunhistochemischen Aufarbeitung in 25% Sucrose konserviert. Anschließend wurden 30 µm dicke Kryoschnitte des Stammhirns angefertigt.

2.3 Nervenfasernableitung

Die elektrophysiologische Untersuchung erfolgte mit einem Darmsegment von 2 cm Länge mit ca. 1 cm anhängendem Mesenterium, das ebenfalls aus dem oberen Jejunum entnommen wurde. Das zu untersuchende Darmsegment wurde zunächst mit Krebs'- Lösung vom Darminhalt gereinigt. Dann wurde das gesamte Präparat in ein Zweikammerorganbad gebracht, wobei sich das Darmsegment in der mit Krebs' s Puffer, gepuffert mit 95 % O₂ and 5 % CO₂ (Kombination (mM) Na⁺ 143.5, K⁺ 5.9, Cl⁻ 126, Ca²⁺ 2.5, Mg²⁺ 1.2, H₂PO₄ 1.2, SO₄ 1.2, HCO₃⁻ 25, Glukose 10 and Natriumbutyrat 1, pH 7,4 bei 7 ml/min, Kammertemperatur 32 °C) perfundierten Kammer befand. Das Mesenterium wurde nachfolgend über eine kleine Öffnung in die zweite Kammer des

Organbads eingebracht und die Öffnung dann mit Silikon verschlossen. Die zweite Kammer wurde anschließend zur Isolation mit flüssigem farblosem Paraffin gefüllt. Dann wurde ein Katheter auf beiden Seiten des zu untersuchenden Darmsegments in das Darmlumen eingebracht, mit einer Ligatur fixiert und mit einem Druckaufnehmer verbunden. Anschließend erfolgte die Dissektion von Fett und Bindegewebe zur Darstellung der mesenterialen Nervenfasern. Die elektrophysiologische Ableitung wurde dann über zwei in die isolierte Kammer eingebrachte Platinelektroden durchgeführt. Anschließend wurden die Signale der Nervenfaserableitung und der Druckmessung gefiltert, verstärkt und nachfolgend einem Computersystem mit zugehöriger Software zugeleitet (Abbildung 1).

Abbildung 1: Setup der *in vitro* Präparation



2.4 Immuhistochemie

2.4.1 MPO-Färbung (Myeloperoxidase)

Die Leukozytenperoxidase (Myeloperoxidase) dient dem histochemischen Nachweis der Leukozytenperoxidase. Die Leukozytenperoxidase-Reagenzien sind für die "In-vitro-Diagnostik" bestimmt. Die klassischen Methoden der zytochemischen Lokalisierung von Myeloperoxidase (MPO) verwendeten Benzidin1 oder Diaminobenzidin (57). Im Jahr 1977 beschrieben Hanker et al. die Verwendung von p-Phenylendiamin und Katechol, um injizierte Meerrettich-Peroxidase nachzuweisen (28,30). Auf diesem Indikatorsystem beruht das Verfahren von Sigma - Aldrich zum Nachweis der Myeloperoxidase durch die folgende Reaktion:

MPO: p-Phenylendiamin + Braun-schwarzes unlösliches Reaktionsprodukt
Katechol + H₂O₂

MPO –Färbeprotokoll:

1. 3mal a 5 Min. waschen in PBS
2. 1 Tablette (20mg) PPD (p-Phenylenediaminedhydrochloride)
+ 40mg PC (Pyrocatechol)
+20ml TBS (Tris buffered solution) pH 7,6
+9,9µl H₂O₂
3. Das Gewebe wird 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
4. 3mal a 5 Minuten in PBS waschen
5. Das Gewebe wird auf einen Objektträger aufgezogen und eingedeckt.

2.4.2 Immunhistochemischer c-fos Nachweis

Das Fos - Protein ist durch ein Gen namens „c-fos“ codiert. C- fos steht für c: cellular, f: Finkel, Diskis, Jinkins (Entdecker), o: osteo, s: sarkoma. Das c- fos Proto- Onkogen und der c- fos Transkriptionsfaktor ist in das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung sowie Zellentwicklung involviert (16,25). Das Fos Gen wird durch eine Vielzahl von Reagenzien, wie Mitogene, pharmakologische Substanzen und andere Zellfaktoren stimuliert (94). Nach Aktivierung des Gens kommt es zu einer sehr schnellen Expression des 62000 Dalton schweren Fos- Proteins. Das Fos- Protein ist aber nicht stabil und repräsentiert nur ungefähr 0,1% der zellulären Proteinmenge. Es bildet zusammen mit dem sogenannten Jun- Protein einen Komplex, der spezifisch an eine Basensequenz der DNA (AP- 1 Bindungsstelle) bindet (12,19,31,76).

Zu großer Bedeutung gelangte das Gen bzw. sein Produkt durch die Tatsache, dass es immer dann in ZNS- Kerngebiete exprimiert wird, wenn Nervenzellen über einen längeren Zeitraum stimuliert werden. Folglich kann durch den immunhistochemischen Nachweis von Fos- Protein in den Zellkernen von ZNS- Kerngebieten deren Aktivierung nachgewiesen werden (35,77). Der Vorteil der c- fos Technik ist folglich die simultane Untersuchung anatomischer Strukturen und deren funktionelle Zuordnung (40,74).

c- fos- Färbeprotokoll

1. 2×5 Minuten in PBS waschen
2. Blockierung endogener Peroxidase: 15 Minuten bei RT
 - a. 200 ml PBS + 1 ml H₂O₂ (30%)
3. 3×5 Minuten in PBS waschen
4. 1.AK: über Nacht bei RT
 - a. c-fos Vorverdünnung 1:100
 - b. 10 µl rabbit anti -c- fos
 - c. + 990 µl Triton ×- 100 0,5% in PBS
 - d. b) c- fos Hauptverdünnung 1:2000

- i. 940 μ l Triton \times -100 (0,5%) in PBS
 - ii. + 10 μ l NGS (normal goat serum)
 - iii. + 50 μ l c-fos (1:100 Vorverdünnung)
5. 3 \times 5 Minuten waschen in PBS
6. 2.AK: 1:100 1,5h bei RT
 - i. 990 μ l Triton \times -100 (0,5%) in PBS
 - ii. + 10 μ l goat anti-rabbit
7. 3 \times 5 Minuten waschen in PBS
8. Strept. Avidin- biotin- Komplex /Peroxidase konjugiert:
 1. 1000 μ l Triton \times -100 (0,5%) in PBS
 2. +10 μ l Lösung A
 3. +10 μ l Lösung B
9. 3 \times 5 Minuten waschen in PBS
10. Entwicklung mit DAB: 10 Minuten bei RT
 1. 200ml TBS
 2. +100mg DAB
 3. +33 μ l H₂O₂ (30%)
11. 3 \times 5 Minuten waschen in PBS
12. ca. 10 Minuten Mounting- solution
13. Schnitte auf Objektträger aufziehen und trocken lassen
14. Aufsteigende Alkoholreihe:
 1. Jeweils 1 Minute in 50%, 70%, 96%, 100%,
 2. 1 Minute Xylol
15. Eindecken

2.5 Versuchsprotokoll

Elektrophysiologische Ableitung / Messung der extrinsischen affernten Entladungsfrequenz

- Bradykinin 1 μ M (2min)
- Druckdistension (60mmHg)
- Baseline Motilität

Leukozyteninfiltration Muskularis

Fos positive Neurone Nucleus tractus solitarius (nTS)

Versuchsguppen:

- Postoperativer Ileus
- Scheinoperation (Kontrolle)
- Postoperativer Ileus + DFU*
- Scheinoperation (Kontrolle) + DFU*

**5,5-dimethyl-3-(fluorophenyl)-4-(4-methylsulfonyl) phenyl- 2(5H)-furan,
10mg/kg s.c, 30 min und 4 h nach Dünndarmmanipulation*

Nach Stabilisierung der Nervenfasernableitung für wenigstens 15 Minuten wurde der Effekt der serosalen Bradykinigabe (1 μ M für 2 min) auf die afferente Nervenfasernaktivität untersucht. In den Distensionsversuchen wurden Jejunumsegmente mit neutral gepuffertem Kochsalz mit Hilfe einer Perfusionspumpe (IVAC 711, IVAC Corp, San Diego, USA) bis zu einem Spitzendruck von 60mmHg distendiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit wieder abgelassen. Der selektive COX-2 Inhibitor DFU (10 mg/kg), gelöst in DMSO (10 mg/kg), wurde 30 Minuten vor und 4 Stunden nach der Darmmanipulation subcutan appliziert. 24h danach erfolgte unter

Enflurannarkose die Entnahme eines 2 cm langen Jejunumsegmentes mit dazugehöriger mesenterialer Arkade. Extrazelluläre, afferente „multi-unit“ Signale wurden von einem nach proximal durchtrenntem paravaskulärem Nervenbündel abgeleitet. Des Weiteren wurde den Versuchstieren das Stammhirn entnommen und für den neuronalen Aktivierungsmarker Fos-Protein immunhistochemisch angefärbt. Fos-positive Neurone des Nucleus tractus solitarius (NTS) des Stammhirns wurden nachfolgend ausgewertet. Die Leukozyteninfiltration in der Darmwandmuskulatur wurde als Indikator der postoperativen Entzündungsreaktion bestimmt.

2.6 Auswertung

2.6.1 Elektrophysiologie und Motilitätsmessungen

Die Darmmotilität wurde als mittlere Peakamplitude über einen Auswertungszeitraum von 200 Sekunden bestimmt. Die elektrophysiologischen Daten wurden als Spitzenentladungsfrequenz in einem 5 Sekunden Intervall abzüglich der Baselinespitzenaktivität dargestellt.

2.6.2 MPO

Die Auswertung der Myeloperoxidase - positiven Zellen erfolgte unter dem Mikroskop (200-fache Vergrößerung). Es wurden pro Schnitt mindestens 30 konsekutive Gesichtsfelder ausgezählt. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop mit 200-facher Vergrößerung mit Hilfe des Bildanalyseverfahrens Quantimed 600.

2.6.3 c-fos

Die gesamte Anzahl der Fosprotein positiven Zellen des Nucleus tractus solitarius (NTS) wurde in beiden Hemisphären des Stammhirns 7,32mm und 7,7mm kaudal des Bregma als definierte Schnittebenen ausgezählt. Bregma bezeichnet anatomisch der Schnittpunkt der coronaren Schädelnaht mit der Sagitalnaht. Zur anatomischen Identifizierung der Gehirnareale des Versuchstieres wurden stereotaktische Atlanten herangezogen (40,74). Die einzelnen Fosprotein positiven Zellen wurden mit dem Mikroskop unter Zuhilfenahme des Quantimed Systems (Firma Leica), bestehend aus Bildanalysesoftware und der zugehörigen Hardwarekomponente ausgezählt. Die Fosprotein positiven Zellen wurden durch das Zählprogramm ausgewertet, welches die positiven, dunkel gefärbten Zellen, aufgrund der relativen Größe und Dichte vor der Hintergrundfärbung unterscheidet. Diese Daten wurden exemplarisch an einzelnen Schnitten durch manuelles Auszählen überprüft. Die

gesamte Anzahl an positiven Zellen des Nucleus tractus solitarius in den einzelnen definierten Ebenen des Stammhirns wurde dann durch die Anzahl der ausgezählten Schnitte geteilt, um so einen Mittelwert für jedes Areal zu erhalten. Die Auswertung erfolgte blind, das bedeutet in Unkenntnis der Versuchsgruppe, aus der das jeweilige Präparat stammte.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels oneway- ANOVA mit Bonferroni Korrektur, wenn notwendig. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Dabei wurde ein $P < 0,05$ als signifikanter Unterschied angenommen.

2.8 Substanzen und Lösungen

2.8.1 Elektrophysiologie

Versuchstiere	Charles River GmbH Sandhoferweg 7 97633 Sulzfeld Deutschland
Bradykinin	Sigma Aldrich Chemie GmbH Gruenwalder Weg 30 82041 Deisenhofen Deutschland
Vaseline, weiß EuAB	Bombastus-Werke AG Wilsdrufferstrasse17 01705 Freital Deutschland
Sylgard	DOW Corning GmbH Rheingastr.34 65201 Wiesbaden Deutschland
Carbogengas	Fa. Hoepfner August-Lämmle Str.22 72766 Reutlingen Deutschland

DFU	Merck Frosst 16711 T. C. Highway Kirkland Quebec H9H 3L1 Canada
DMSO	Sigma Aldrich Chemie GmbH Gruenwalder Weg 30 D- 82041 Deisenhofen Deutschland
Ethrane (Enfluran)	Abbott GmbH Max-Planck-Ring 2 65205 Wiesbaden Deutschland
Mineral oil heavy white	Sigma Aldrich Chemie GmbH Gruenwalder Weg 30 82041 Deisenhofen Deutschland
Nahtmaterial	Ethicon GmbH und Co. KG Robert- Koch Straße 1 22851 Norderstedt Deutschland

Aqua dest.

B. Braun
Melsungen AG
Carl-Baun-Straße 1
34212 Melsungen
Deutschland

2.8.2 Immunhistochemie und Histologie

NBF (10% Neutral Buffered Formalin pH: 7,0)

Formaldehyd (37%)	111ml	Merck KG
Aqua dest.	889ml	Frankfurterstraße 250
Natriumdihydrogenphosphat	3,5g	64293 Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	6,5g	Deutschland

Sucrose 25%

Aqua dest.	300ml	Merck KG
0,5 M PBS	200ml	Frankfurterstraße 250
Sucrose	250mg	64293 Darmstadt
Aqua dest.	Auffüllen auf 1l	Deutschland

PPD 144 Tabletten PC 100g

Sigma Aldrich Chemie
GmbH
Gruenwalder Weg 30
82041 Deisenhofen
Deutschland

c- fos rabbit polyclonal serum
DIANOVA GmbH
Mittelweg 176
20148 Hamburg
Deutschland

biotinylated goat-anti-rabbit
DIANOVA GmbH
Mittelweg 176
20148 Hamburg
Deutschland

2.8.3 Materialien und Geräte

Bildanalysesystem Quantimed 600
Leica Mikroskopie
und Systeme
Ernst- Leitz Straße 30
65578 Wetzlar
Deutschland

Milenia Kinetic EIA Analyser
Diagnostic Products
Corp. Los Angeles,
California
USA

Softmax Molecular Devices Corp.
1311 Orleans Dr.
Sunnyvale
California 94089
USA

PC	Ilyama / co RTS Carl-Benz-Straße 2 D-85296 Rohrbach, Ilm Deutschland
Software Spike 2	CED Cambridge Electronic Design Science Park Milton Road Cambridge CB4 0FE England
AD-Wandler 1401	CED Cambridge Electronic Design Science Park Milton Road Cambridge CB4 0FE England
Filter und Verstärker 1902	CED Cambridge Electronic Design Science Park Milton Road Cambridge CB4 0FE England

Peristaltische Pumpen

Abimed
Analysen- Technik
GmbH
Raiffeisenstr. 3
40764 Langenfeld
Deutschland

Perfusionspumpe IVAC 711

IVAC Corp,
San Diego
California
USA

Adhesive Sealant

Dow Corning
Corporate Center
Midland
Michigan
USA

Präparationspinzetten

Fine Science Tools
Inc.
202- 277 Mountain
Highway
North Vancouver BC
V7J 3P2,
Canada

Platinumdraht

Goodfellow
Postfach1343
61213 Bad Nauheim
Deutschland

3. Ergebnisse

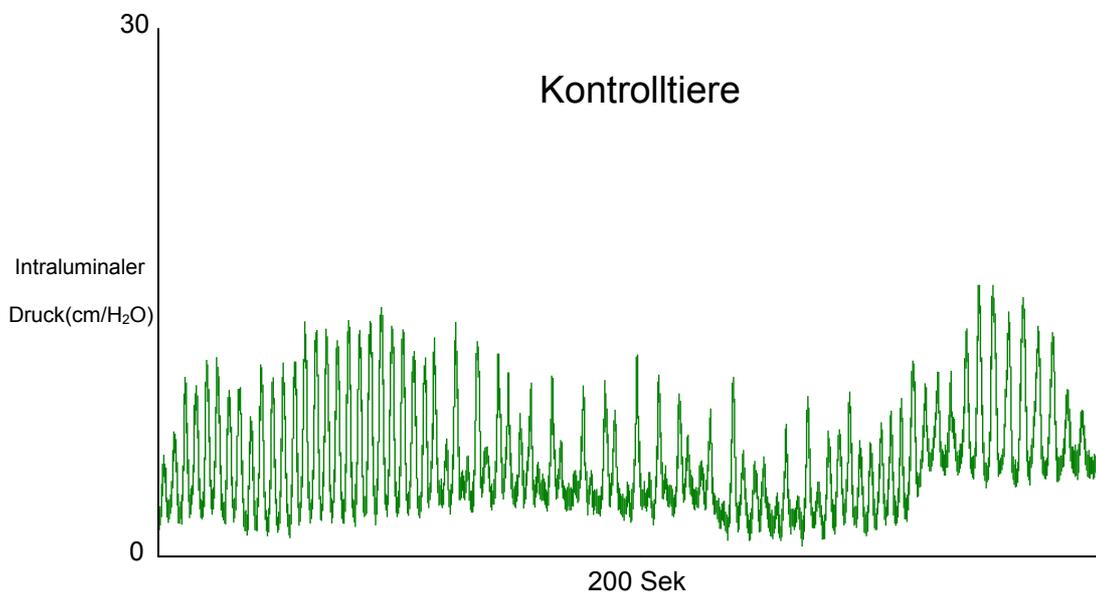
3.1 Darmmotilität

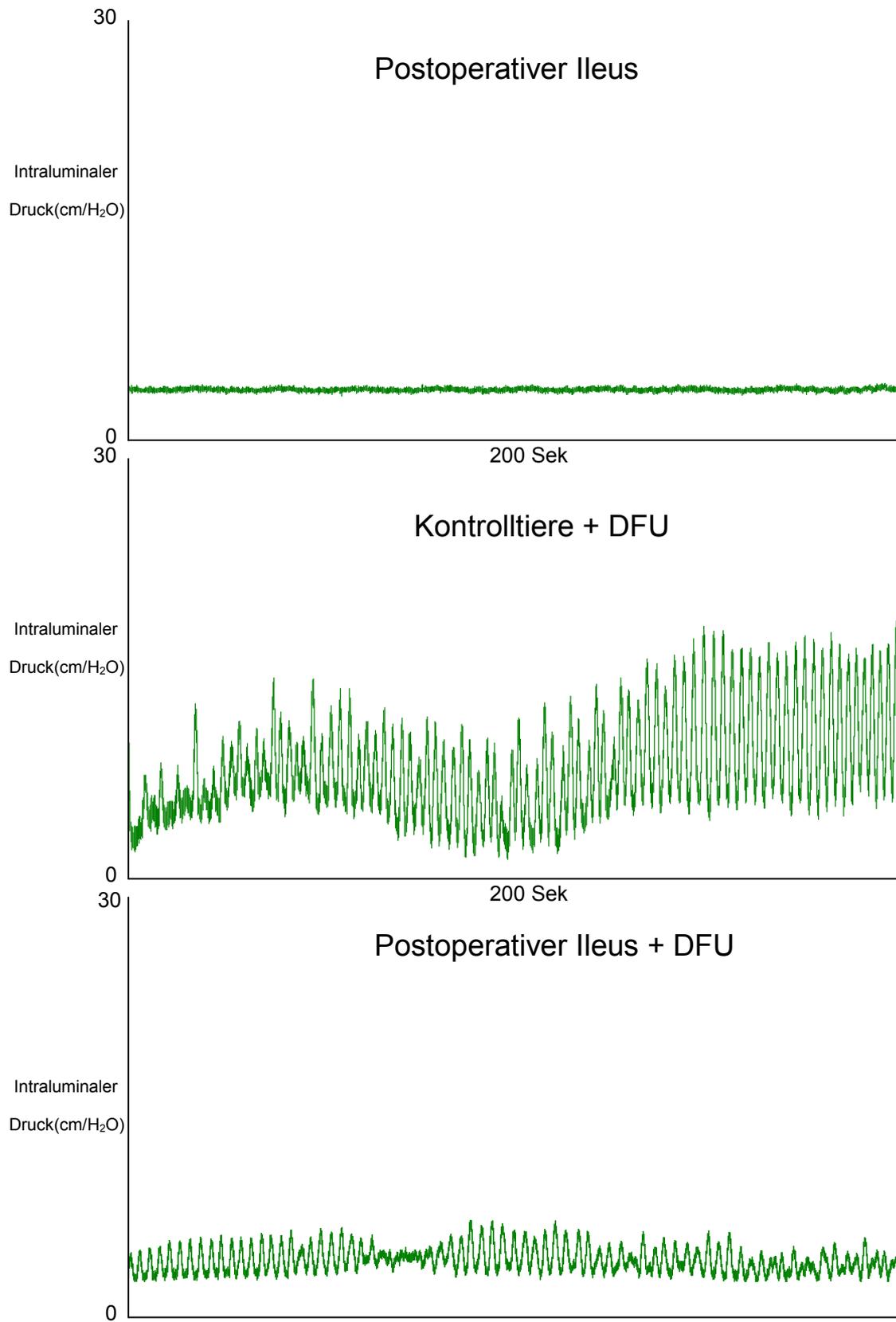
Jejunumsegmente aus Kontrolltieren zeigten phasische Kontraktionen während Darmsegmente aus Ileustieren keinerlei Kontraktionen aufwiesen. Nach selektiver COX-2 Hemmung mittels DFU kam es zur Abnahme der spontanen Motilität. Eine leichte Zunahme der spontanen Motilität wurde bei manipulierten Darmsegmenten beobachtet.

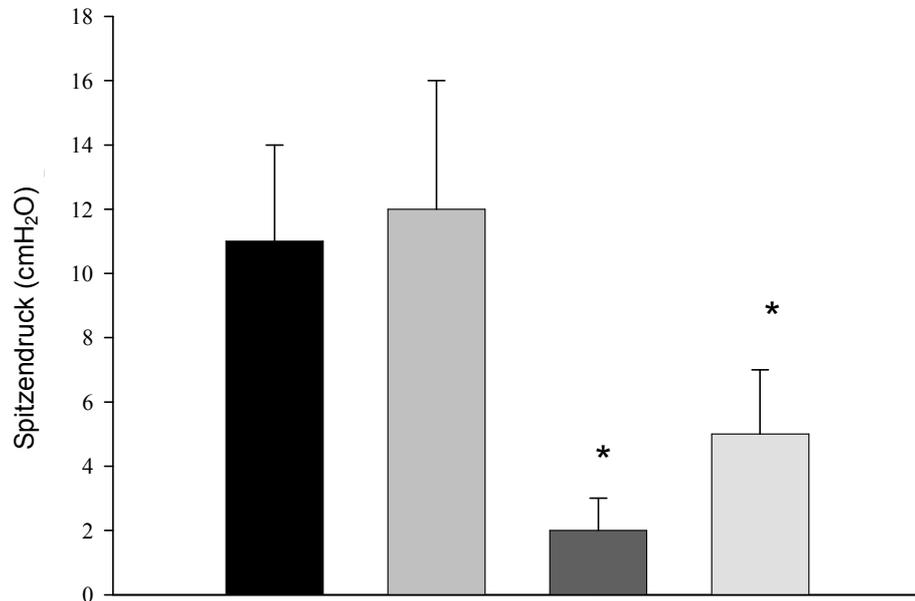
Abbildung 2:

A: Intraluminale Druckkurven in Ileus - und Kontrollexperimenten mit oder ohne selektiver COX-2 Inhibition durch DFU.

A





B

B: Quantitative Darstellung der intraluminalen Spitzendrücke über 200 Sekunden in den jeweiligen Versuchsgruppen in Balkendiagrammen (Mittelwerte \pm SEM, * $P < 0.05$).

- Kontrollexperimente (N=6)
- Kontrollexperimente + DFU (N=4)
- Postoperativer Ileus (N=6)
- Postoperativer Ileus + DFU (N=5)

3.2 Intestinale afferente Sensibilität

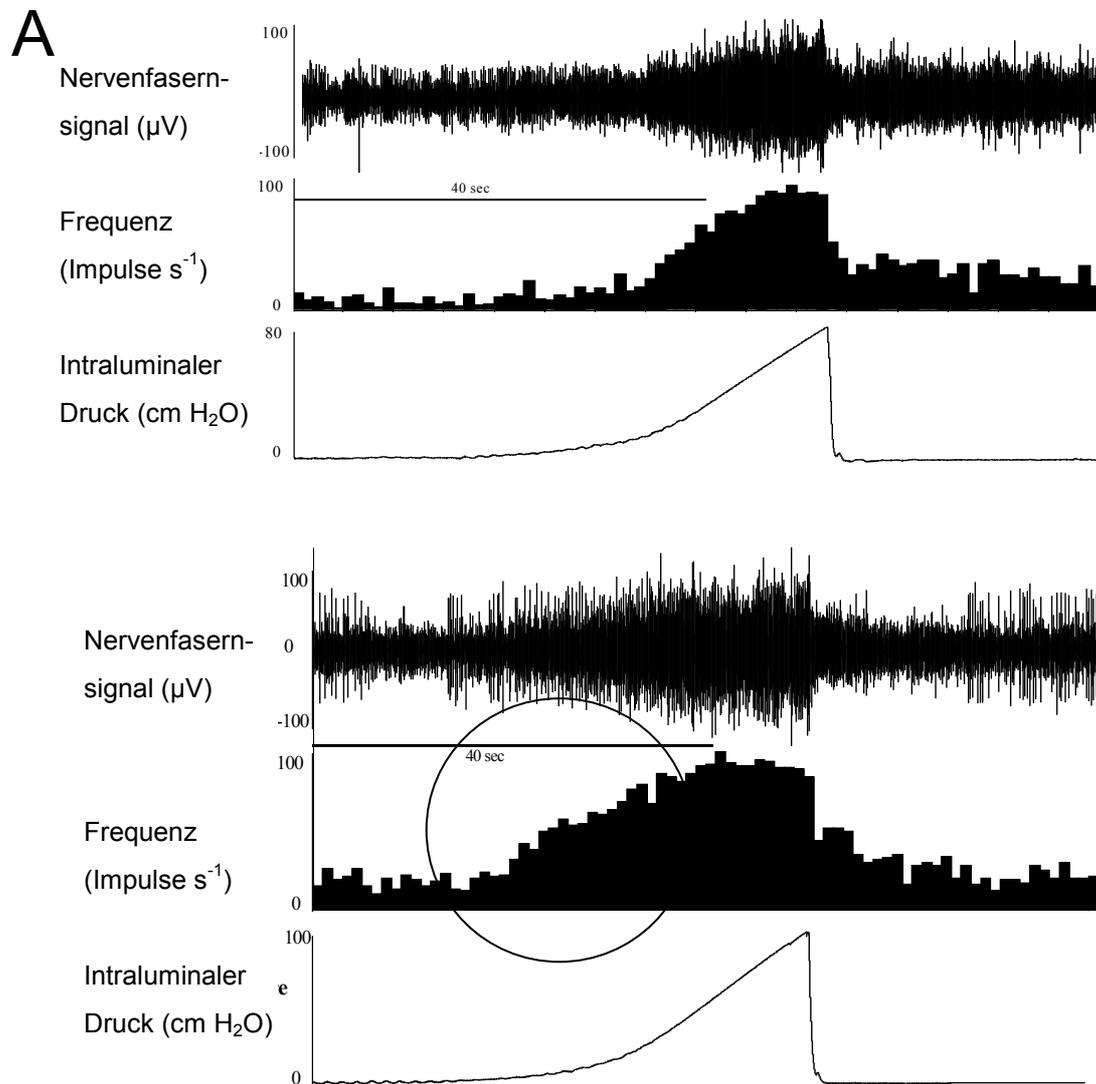
3.2.1 Nervenfasernaktivität in Ruhe

Das afferente Nervenfasersignal zeigte ein kontinuierliches Muster von Ruheentladungen, die Aktionspotentiale mit unterschiedlicher Amplitude und Form enthielten. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Ileus - und Kontrollsegmenten in der Spontanentladungsfrequenz von 17 ± 1 Impulse s^{-1} bei Ileustieren und 12 ± 2 Impulse s^{-1} und nach DFU- Applikation bei Ileustieren mit 11 ± 2 Impulse s^{-1} ($P=0.059$, $N=4$).

3.2.2 Mechanische Stimulation

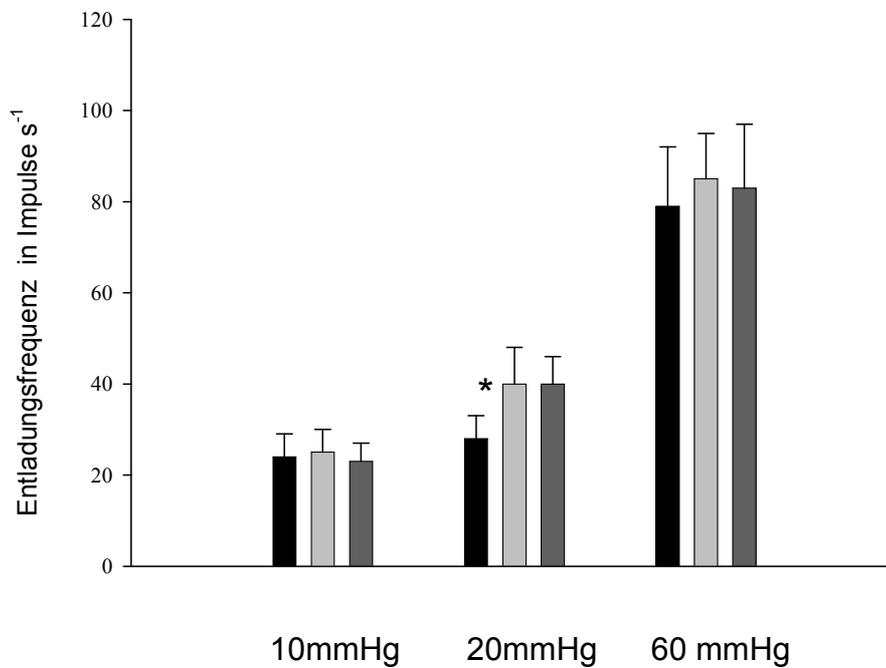
Die Rampendistension des Jejunums bis 60mmHg führte zum fünffachen Anstieg der afferenten Entladungsfrequenz. Es bestand kein Unterschied in der Spitzenentladungsfrequenz bei 60mmHg in den verschiedenen Gruppen. Der maximale Entladungsanstieg bei 60mmHg war mit 85 ± 6 Impulse s^{-1} bei Ileustieren, 71 ± 11 Impulse s^{-1} in der mittels COX-2 Inhibitor vorbehandelten Ileusgruppe im Vergleich zu 70 ± 4 Impulsen s^{-1} bei Kontrolltieren nicht signifikant verschieden. Signifikante Unterschiede mit 19 ± 2 Impulsen s^{-1} bei Ileustieren im Vergleich zu 9 ± 2 Impulsen s^{-1} bei den Kontrolltieren ergaben sich bei niedrigen Druckwerten (20mmHg). Dieser beobachtete Anstieg der afferenten Entladungsfrequenz war nach selektiver COX-2 Inhibition mit DFU in Ileustieren bei niedrigen Distensionsdrücken weiter vorhanden.

Abbildung 3:



A: Der obere Anteil der Graphik zeigt das „multiunit“ Nervenfasersignal während der Experimente. Die mittlere Kurve quantifiziert die Aktionspotentiale in einem Histogramm in Impulse pro Sekunde. Die untere Kurve zeigt das intraluminale Druckprofil während der Distensionsexperimente. Im niederen Druckniveaubereich kommt es bei postoperativen Ileustieren zu einer Sensibilisierung der intestinalen mechanosensitiven Afferenzen (siehe Kreis).

B



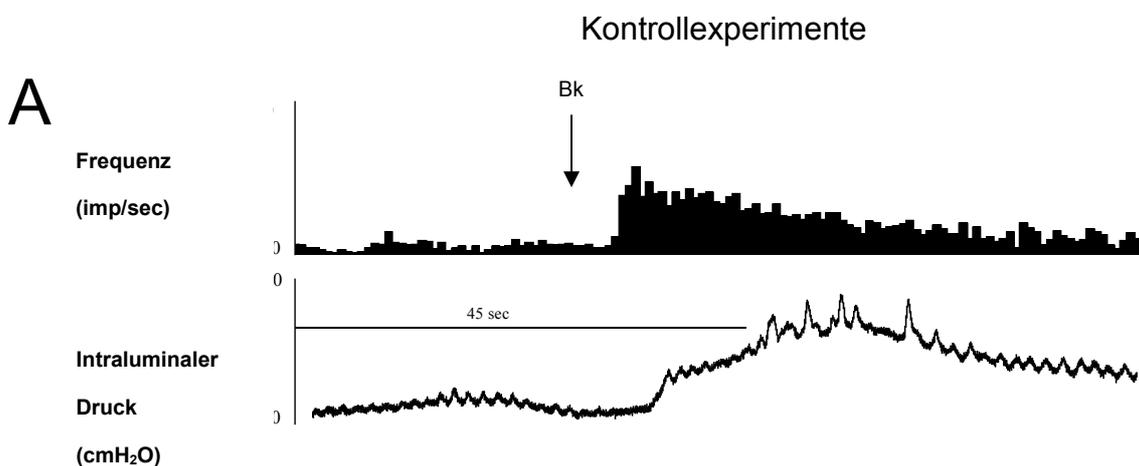
B: Das Balkendiagramm zeigt die afferente Nervenreaktion bei unterschiedlichen Distensionsdrücken bei Kontrolltieren, während des postoperativen Ileus, und bei Kontrollen und während des postoperativen Ileus nach selektiver COX-2 Inhibition. Beim postoperativen Ileus kommt es zur Sensibilisierung afferenter Nervenfasern bei niedrigen Distensionsdrücken (20 mmHg). Die selektive COX-2 Inhibition mit DFU hat keinen Einfluß auf die Entladungsfrequenz in den verschiedenen Phasen der Distensionsrampe. (Mittelwerte \pm SEM, * $P < 0.05$)

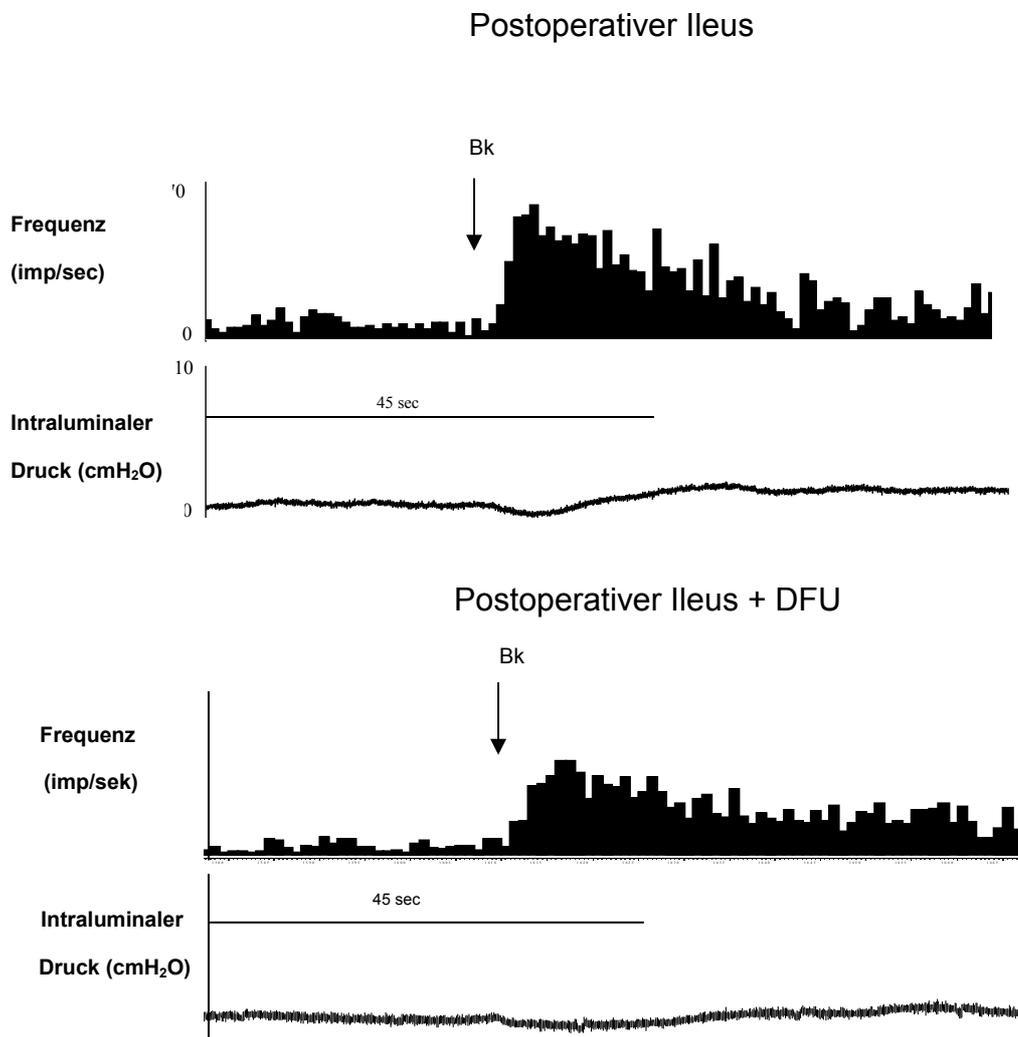
- Kontrollexperimente (N=10)
- Postoperativer Ileus (N=8)
- Postoperativer Ileus + DFU (N=6)

3.2.3 Chemische Stimulation

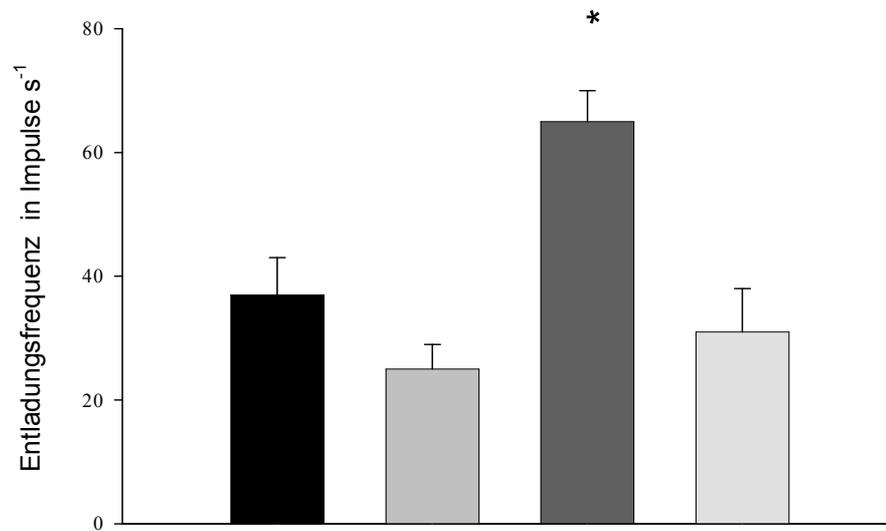
Serosal appliziertes Bradykinin ($1\mu\text{M}$) verursachte einen starken und kurzen Anstieg der afferenten Spitzenentladungsfrequenz bei Kontrolltieren mit einer Entladungsfrequenz von 37 ± 6 Impulsen s^{-1} . In Ileustieren kam es zu einem signifikanten Anstieg der Impulsrate auf 65 ± 5 Impulse s^{-1} (* $P < 0.05$). Nach selektiver COX-2 Inhibition der Ileustiere mit DFU war die afferente Entladungsfrequenz auf 31 ± 7 Impulse s^{-1} reduziert, was dem Niveau der Kontrolltiere entsprach. DFU hatte mit 26 ± 3 Impulse s^{-1} keinen Einfluss auf die afferente Entladungsfrequenz in Kontrolltieren.

Abbildung 4:





A: Der obere Anteil zeigt die Entladungsfrequenz als Ratehistogramm nach serosaler Bradykininapplikation ($1\mu\text{M}$) in den Jejunumsegmenten bei Kontrolltieren, bei Tieren mit postoperativem Ileus und bei Tieren mit postoperativem Ileus nach Applikation von COX-2 Antagonist, DFU. Die untere Kurve zeigt die intraluminale Druckkurve, (BK=Bradykinin).

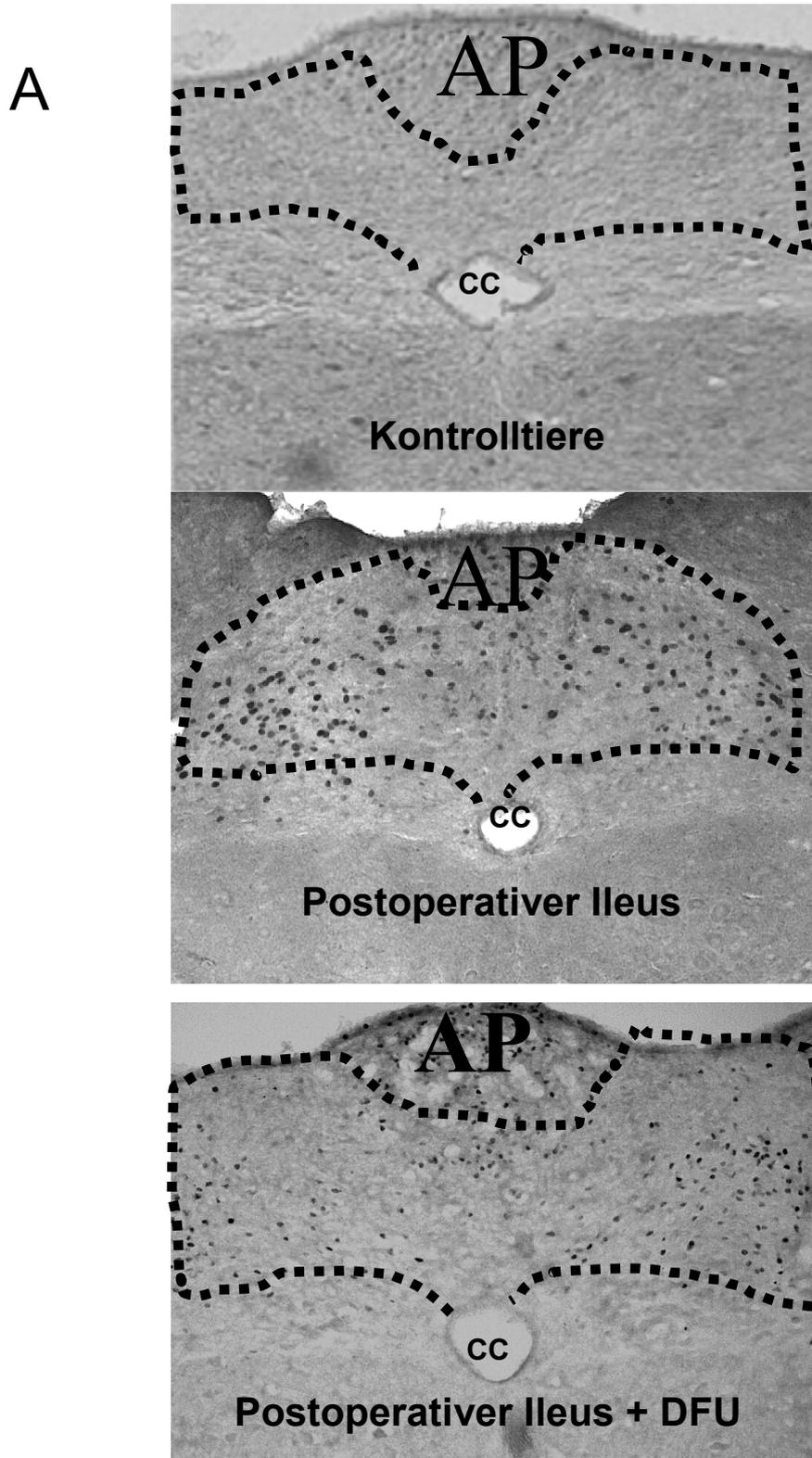
B

B: Quantitative Darstellung der Spitzenentladungsfrequenz der einzelnen Versuchsgruppen, Mittelwerte \pm SEM, * $P < 0.05$.

- Kontrolltiere (N=10)
- Kontrolltiere + DFU (N=10)
- Postoperativer Ileus (N=6)
- Postoperativer Ileus + DFU (N=6)

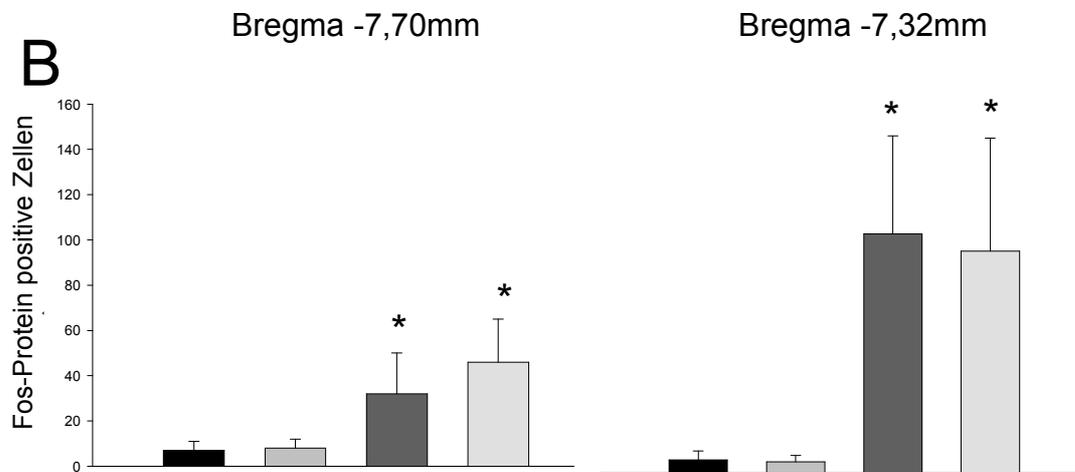
3.3 C-fos im Nucleus tractus solitarius (nTS)

Die Anzahl der Fos-positiven Neurone im nTS war bei Ileustieren mit 32 ± 18 positiven Zellen 7,7mm und 110 ± 45 positiven Zellen 7,32mm distal des Bregmas im Vergleich zu den Kontrollexperimenten mit 7 ± 4 positiven Zellen, 7,7mm distal des Bregmas und 6 ± 4 positiven Zellen, 7,32mm distal des Bregmas signifikant erhöht (* $P < 0.05$). Nach selektiver COX-2 Inhibition mit DFU blieb die Anzahl der Fos-positiven Neurone in den Ileustieren mit 102 ± 52 positiven Zellen 7,32mm und 46 ± 19 positiven Zellen 7,7mm distal des Bregmas unverändert hoch.

Abbildung 5:

A: Repräsentative mikroskopische Aufnahmen des Nucleus tractus solitarius 7,32 mm distal des Bregma in den verschiedenen Versuchsgruppen. AP: Area

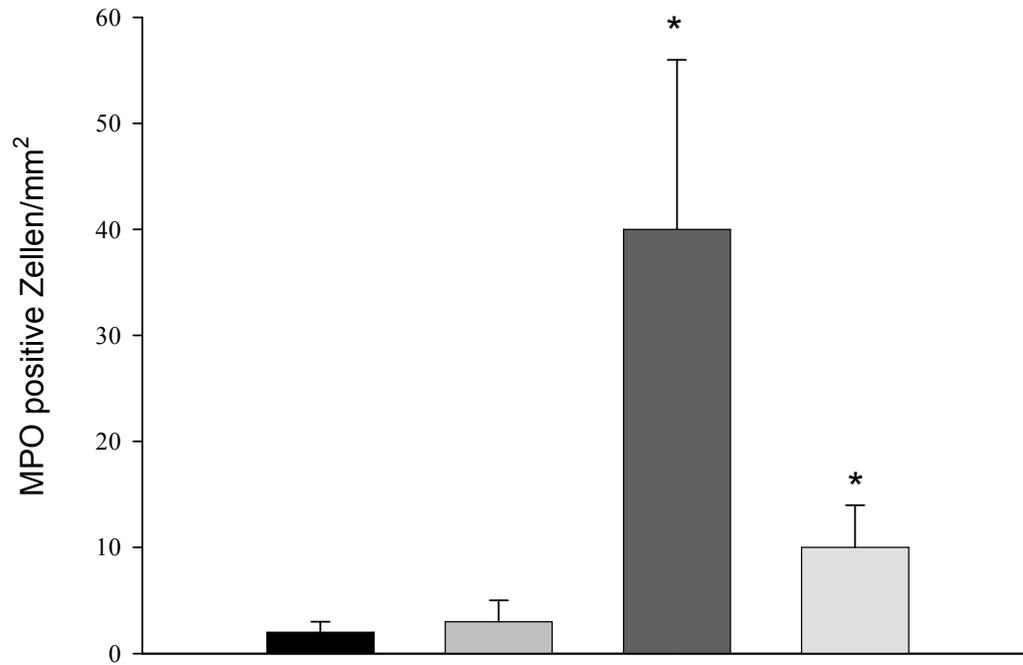
postrema: CC: Canalis centralis.



B: Quantitative Darstellung der Fos-Protein positiven Zellen im Nucleus tractus solitarius in den verschiedenen Versuchsgruppen 7,32mm und 7,70mm distal des Bregmas. *P<0.05.

-  Kontrolltiere (N=4)
-  Kontrolltiere+ DFU (N= 4)
-  Postoperativer Ileus (N=4)
-  Postoperativer Ileus + DFU (N=4)

B



B: Quantitative Darstellung der MPO positiven Zellen in den verschiedenen Versuchsgruppen. (Mittelwert \pm SEM, *P<0.05).

- Kontrolltiere (N=6)
- Kontrolltiere+ DFU (N= 4)
- Ileus (N=6)
- DFU (N=5)

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den Mechanismus der intestinalen neuronalen afferenten Aktivierung während des postoperativen Ileus. Wir konnten zeigen, dass die Motilität in den untersuchten Jejunumsegmenten während des postoperativen Ileus gestört ist. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass es während des postoperativen Ileus zu einer Zunahme von MPO positiven Zellen in der Darmwandmuskulatur kommt. Diese Beobachtungen deuten, wie bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, auf eine entzündliche Reaktion während des postoperativen Ileus hin (47,51). Sowohl die gestörte Darmmotilität, als auch die erhöhte Zahl von MPO positiven Zellen in der Darmwandmuskulatur konnte durch den selektiven COX-2 Hemmer DFU zumindest partiell antagonisiert werden. Wir beobachteten eine erhöhte vagal vermittelte Mechanosensibilität der mesenterialen Afferenzen (43). Darüber hinaus kam es zur Aktivierung sensibler Hirnnervenkerne des Nervus vagus im nTS, während des postoperativen Ileus. DFU hatte keinen Einfluss auf diese beiden Phänomene. Im Gegensatz dazu wurde die erhöhte mesenteriale afferente Sensibilität nach Bradykininverabreichung, die vor allem spinale afferente Nervenfasern sensibilisiert (7,42,65), durch DFU reduziert.

In der vorliegenden Arbeit führte die Darmmanipulation zur Abnahme der spontanen Darmmotilität und des Muskeltonuses und trotzdem war die spontane intestinale neuronale afferente Entladungsfrequenz im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert. Es gibt afferente Nervenfasern, die unter physiologischen Bedingungen nicht aktiv sind. Diese werden als so genannte „stille“ oder „schlafende“ Nocizeptoren bezeichnet (8,42,70). Eine mögliche Erklärung für die unveränderte Ruheaktivität, während des postoperativen Ileus bei verminderter Darmmotilität, könnte somit eine Sensibilisierung dieser stillen Nocizeptoren durch sekundär ausgeschüttete Entzündungsmediatoren während der beim postoperativen Ileus entstehenden Entzündungsreaktion darstellen.

Eine mögliche Reduktion von mechanosensitiven afferenten Nervenfasern durch die gestörte Darmmotilität könnte dadurch kompensiert werden. Tatsächlich gibt es Entzündungsmediatoren, die Nocizeptoren aktivieren können (34,61,65,97).

Es gibt drei Klassen von Nervenfasern in afferenten Mesenterialnerven, die Informationen vom Intestinum ins ZNS weiterleiten. Hierbei handelt es sich um vagale (99), spinale (41) und intestinofugale Fasern (91). Wir konnten zeigen, dass spinale und vagale afferente Nervenfasern über unterschiedliche Mechanismen während des postoperativen Ileus sensibilisiert werden. Die Rolle der enterischen Neurone, die an das Ganglion prävertebrale projizieren, wurde dabei nicht untersucht. Es gibt jedoch in der Literatur keinen Hinweis auf eine Beteiligung dieser Neurone bei der Entstehung des postoperativen Ileus. Darüber hinaus ist die Zahl dieser Neuronensubpopulation relativ gering (91). Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass diese Nervenfasern einen entscheidenden Beitrag zum gemessenen afferenten mesenterialen Nervenfasersignal in der vorliegenden Untersuchung leisten.

In der Darmwandmuskulatur gelegene stimulierte ortsständige und extravasale Leukozyten generieren ein entzündliches Milieu, welches wiederum Leukozyten anlockt und die Motilitätsstörung während des postoperativen Ileus verlängert (51). Diese aktivierten Leukozyten können Prostaglandine, über den COX-2-Stoffwechsel synthetisieren und ausschütten, was nachfolgend wiederum eine Hemmung der gastrointestinalen Motilität zur Folge haben kann (39,46,51,62,66,84). Welche Relevanz die COX-2 für dieses zelluläre entzündliche Infiltrat während des postoperativen Ileus darstellt, wurde anhand des unselektiven COX - Hemmers Indomethacin und des selektiven COX-2 Hemmers NS-398 untersucht (84). In der vorliegenden Untersuchung wurden diese Beobachtungen bezüglich der verbesserten postoperativen Motilität und der Reduktion des entzündlichen Infiltrats durch den selektiven COX-2 Hemmer DFU bestätigt. Darüber hinaus kam es während des postoperativen Ileus nach Gabe des Entzündungsmediators Bradykinin zur Sensibilisierung mesenterialer

afferenter Nervenfasern (55). Das erreichte Entladungsmaximum nach Bradykininverabreichung dieser mesenterialen Afferenzen wurde vor den eintretenden Veränderungen des intraluminalen Drucks erreicht. Deshalb ist eine sekundäre Beeinflussung über afferente Mechanosensoren eher unwahrscheinlich. Die beobachtete Sensibilisierung mesenterialer Afferenzen nach Bradykiningabe war COX-2 abhängig, d.h. es kam zu einer signifikanten Reduktion der Spitzenentladungsfrequenz in postoperativen Ileustieren nach DFU Verabreichung. Intestinale Makrophagen und andere Immunzellen, die Teil des entzündlichen Infiltrats der Darmwand während des postoperativen Ileus darstellen (84), können Bradykinin synthetisieren und ausschütten (79). Es ist bereits in anderen Nocizeptionsmodellen gezeigt worden, dass Bradykinin im Beisein von Prostanoiden Nervenfasernendigungen sensibilisieren kann (7,26,27,65). Die o.g. Aussage und die Beobachtung, dass die COX-2 Expression und nachfolgend die Prostaglandinkonzentration nach der Dünndarmmanipulation ansteigt, (84) erklären, weswegen die intestinale afferente Nervenfasernaktivität während des postoperativen Ileus nach Bradykiningabe erhöht war und warum dieser Effekt nach Applikation des COX-2 Hemmers DFU gehemmt wurde.

Bradykinin sensibilisiert spinale afferente Nervenfasern über den B2-Rezeptor (7). Darüber hinaus ist bekannt, dass vor allem serosale Afferenzen sensibilisiert werden (20). Diese spinalen Afferenzen bilden Synapsen mit sympathischen Neuronen. Deren sekundäre Aktivierung wiederum führt zur Hemmung der gastrointestinalen Motilität (34). Wenn es erst einmal zur Sensibilisierung spinaler Afferenzen durch die beim postoperativen Ileus typischerweise auftretende Entzündungsreaktion mit nachfolgender Aktivierung von sympathischen Neuronen gekommen ist, scheint es wahrscheinlich, dass Bradykinin zur Aufrechterhaltung des postoperativen Ileus beiträgt (100). Als weiteren denkbaren Mechanismus zur Aktivierung spinaler Afferenzen ist die Cytokinausschüttung zu nennen. In der vorliegenden Studie wurden diese Mediatoren jedoch nicht untersucht.

In der vorliegenden Studie wurde nachgewiesen, dass nicht nur die spinalen, sondern auch die vagalen afferenten interstinalen Nervenfasern während des postoperativen Ileus sensibilisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es durch eine mechanische Distension der Jejunumsegmente zu einem Anstieg der Nervenfasernentladungsfrequenz kommt. Bei relativ niedrigen Distensionsdrücken (20mmHg) kam es zu einer Sensibilisierung dieser Fasern, d.h. dass es zu einer Zunahme der Entladungsfrequenz bei gleichbleibendem Stimulus kam. Bei hohen Drücken (60mmHg) war dieser Effekt nicht zu beobachten. Die Sensibilisierung afferenter Nervenfasern bei 20mmHg war dabei unabhängig von den selektiven COX-2 Hemmungen mittels DFU.

Es ist bereits ausführlich beschrieben worden, dass geringe Distensionsdrücke eher vagale afferente Fasern sensibilisieren (42,43,90), während spinale Afferenzen durch höhere Distensionsdrücke aktiviert werden (27,70). Die Erklärung dieses Phänomens könnte sein, dass vagale Afferenzen hauptsächlich physiologische Druckereignisse im Gastrointestinaltrakt vermitteln, während spinale Afferenzen aktiviert werden, wenn Nozizeption ins ZNS weitergeleitet wird. Folglich ist die isolierte Sensibilisierung der mechanosensitiven afferenten Nervenfasern bei niederen Distensionsdrücken vagalen mechanosensitiven Afferenzen während des postoperativen Ileus zuzuordnen. Die Interpretation, dass dieser Vorgang COX-2 unabhängig ist, deckt sich mit der Beobachtung, dass bei COX-2 Abhängigkeit Prostanoid freigesetzt werden müssen, die dann überwiegend spinale und nicht vagale Afferenzen sensibilisieren (7,65).

Des Weiteren kam es zur Aktivierung von Neuronen im Nucleus tractus solitarius (nTS). Hierhin projizieren sensorische vagale afferente Nervenfasern. Der nTS stellt den primären sensorischen Hirnnervenkern des Nervus vagus dar (73). Eine Aktivierung dieser Neurone muss folglich über eine Sensibilisierung vagaler Afferenzen vermittelt sein, damit gezeigt werden kann, dass es während des postoperativen Ileus die Aktivierung des ZNS über periphere vagale afferente Nervenfasern vermittelt wird. In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass die Entzündungsmediatoren Histamin und 5-HT, die

während intestinaler Entzündungsreaktionen synthetisiert und ausgeschüttet werden, die Eigenschaft haben eine zentrale neuronale Aktivierung im nTS auszulösen (53,54). Diese zentrale neuronale Aktivierung wird nicht von dem COX-2 Hemmer DFU beeinflusst. Dies könnte man ebenfalls mit der oben beschriebenen Beobachtung erklären, dass die während des postoperativen Ileus ausgeschütteten Prostaglandine überwiegend spinale und nicht vagale Afferenzen sensibilisieren (54,65). Während der Aktivierung im Nucleus tractus solitarius zeigten sich auch Fos-positive Zellen im Bereich der Area postrema. Die Area postrema liegt außerhalb der Blut-Hirnschranke und ist deshalb systemischen zirkulatorischen Prozessen ausgesetzt. Die Entzündungsmediatoren, die während des postoperativen Ileus freigesetzt werden, können in den Blutstrom eintreten. Dadurch könnten Neurone im Bereich der Area postrema aktiviert werden. Die Zahl der Fos-Protein positiven Zellen war jedoch im Vergleich zur Anzahl der Fos-positiven Zellen im nTS gering und sind deshalb wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung. Diese Daten werden hier nicht gezeigt, sind aber gesondert ausgewertet worden.

Daraus ergibt sich die Fragestellung, was der nTS des Stammhirns mit der aus der Peripherie übermittelten Information macht. Borovikova et al. haben nachgewiesen, dass durch die Aktivierung des efferenten Anteils des Nervus vagus systemische Entzündungsvorgänge abgeschwächt werden können (6). Die Aktivierung dieser vagalen Efferenzen bedingen eine periphere Acetylcholinfreisetzung aus Nervenendigungen. Das ausgeschüttete Acetylcholin hemmt wiederum die Freisetzung von TNF- α und der anderen proinflammatorischen Zytokinen aus Makrophagen, die den α -7 Acetylcholinrezeptor exprimieren (73). Dieser Mechanismus wurde als „antiinflammatorischer, cholinergischer Mechanismus“ oder als „inflammatorischer Reflex“ bezeichnet (93). Eine mögliche Erklärung für die Sensibilisierung vagaler Afferenzen während des postoperativen Ileus könnte somit, wenn man den oben beschriebenen Mechanismus heranzieht, die Aktivierung vagaler Efferenzen durch das Stammhirn darstellen, die wiederum die intestinale Entzündungsreaktion während des postoperativen Ileus hemmt.

4.2 Klinischer Ausblick

Das Problem des postoperativen Ileus ist immer noch wenig verstanden und verursacht im klinischen Alltag immense Probleme. Die bisher existierenden Therapieformen des postoperativen Ileus sind nicht kausal. Die konventionelle klinische Behandlung des postoperativen Ileus beinhaltet vor allem den Einsatz von Prokinetika, wie das über Motilinrezeptoren im Oberbauch wirkende Erythromycin oder Acetylcholinesterasehemmer, wie Neostigmin (2,9,13,14,63,64,71,79,98). Neben begleitenden Maßnahmen, wie die intraoperative Flüssigkeitsrestriktion, der frühzeitige Kostenaufbau und die Mobilisation des Patienten, ist gezeigt worden, dass der Einsatz von Periduralkathetern oder eine intravenöse Lidocaininjektion den postoperativen Ileus günstig beeinflusst (3,5,29,44,45,80,82,96). Es wurde spekuliert, dass dadurch eine spinale Neurolyse oder Hemmung viszeraler afferenter Nervenfasern erzielt wird (1,44,81,86). Diese Beobachtung stützt die aus experimentellen Daten gewonnene Erkenntnis, dass neuronale Reflexe bei der Entstehung des postoperativen Ileus eine wichtige Rolle spielen (37). Ein weiterer Ansatz könnte die Beeinflussung der sowohl experimentell als auch in einzelnen klinischen Studien beschriebenen intestinalen Entzündungsreaktion sein. Es ist beschrieben worden, dass es durch den Einsatz von nichtsteroidalen Antiphlogistika anstelle von Opioiden in der Schmerztherapie nach viszeralchirurgischen Eingriffen zu einer Verbesserung der postoperativen Motilität kommt (11,38,47,48,50,52,58,92,101-104). Diese Annahme lässt sich auch durch die vorliegenden Daten unterstützen. Es ist möglich, dass insbesondere die COX-2 eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der mit dem postoperativen Ileus vergesellschafteten intestinalen Entzündungsreaktion spielt. Eine selektive COX-2 Hemmung könnte somit den postoperativen Ileus günstig beeinflussen. Es muss jedoch hierbei von einer multifaktoriellen und multiphasischen Genese des postoperativen Ileus ausgegangen werden, so dass eine unifaktorielle Therapie möglicherweise nicht den gewünschten Effekt zeigt. Ein multimodales Therapiekonzept mit COX-2 Hemmung und Beeinflussung des afferenten

neuronalen Reflexmechanismus ist möglicherweise vielversprechender. Es müssen jedoch zur Klärung der Pathogenese weitere klinische und experimentelle Untersuchungen durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, dass es beim postoperativen Ileus zu einer Sensibilisierung vagaler und spinaler afferenten Nervenfasern kommt. Diese Sensibilisierung ist zum Teil über die COX-2 vermittelt. Zunächst erscheint es wenig sinnvoll, dass zwei neuronale Subsysteme während des postoperativen Ileus getrennt aktiviert werden. Dies kann jedoch dadurch erklärt werden, dass spinale afferente Nervenfasern durch für den Gastrointestinaltrakt gefährliche Stimuli aktiviert werden (7,42,65). Diese Stimuli triggern die Ausschüttung von Schmerzmediatoren, wie Prostaglandin oder Bradykinin. Das wiederum führt zur vom Patienten wahrgenommenen Schmerzsensation. Im Gegensatz dazu, reguliert das vagale System die meisten physiologischen Funktionen im Gastrointestinaltrakt. Deshalb scheint eine Regulation der Darmmotilität und Sensibilisierung oder Modulation von Entzündungsreaktionen durch das vagale System eher wahrscheinlich (43,56,67). Überträgt man nun das Ganze auf die Situation des postoperativen Ileus, übermitteln spinale afferente Nervenfasern Schmerzreize wie sie in der Initialphase der postoperativen Passagestörung bereits auftreten, während vagale afferente Nervenfasern sekundär nach Beginn der intestinalen Entzündungsreaktion aktiviert werden. Über vagale Efferenzen könnte eine Regulation dieser intestinalen Entzündungsreaktion erfolgen. In Zukunft könnten die beiden oben genannten neuronalen Mechanismen ein Ziel für therapeutische Ansätze zur Behandlung bzw. Prophylaxe des postoperativen Ileus darstellen. COX-2 Inhibitoren, Antihistaminika und 5-HT Rezeptorantagonisten könnten hierbei

eine therapeutische Option darstellen. Dies muss jedoch noch in klinischen Studien evaluiert werden. Es kann nun abschließend aus den vorliegenden Daten geschlossen werden, dass die Aktivierung des nTS und die Sensibilisierung der mechanosensitiven afferenten Nervenfasern bei niederen Distensionsdrücken vagal vermittelt und COX-2 unabhängig vermittelt ist. Die über spinale afferente Nervenfasern vermittelte Reaktion nach Bradykiningabe ist im Gegensatz dazu COX-2 abhängig.

Man kann daraus schlussfolgern, dass es zu einer Sensibilisierung von intestinalen vagalen und spinalen extrinsischen afferenten Nervenfasern während des postoperativen Ileus kommt. Jedoch scheint nur der spinale Übertragungsweg COX-2 vermittelt.

6. Abbildungen und Tabellen

Abbildungen	Seite
Abbildung 1 Setup der in vitro Präparation	7
Abbildung 2 A Intraluminale Druckkurven in Ileus - und Kontrollexperimenten mit oder ohne selektiver COX-2 Inhibition durch DFU	21
B Quantitative Darstellung der intraluminalen Spitzendrücke über 200 Sekunden in den jeweiligen Versuchsgruppen in Balkendiagrammen	23
Abbildung 3 A Das „multiunit“ Nervenfasersignal, die Aktionspotentiale in einem Histogramm in Impulse pro Sekunde und das intraluminale Druckprofil während der Experimente	25
B Die afferente Nervenreaktion bei unterschiedlichen Distensionsdrücken	26
Abbildung 4 A Die Entladungsfrequenz als Ratehistogramm nach serosaler Bradykininapplikation (1µM) und die intraluminale Druckkurve, während der Experimente	27

B Quantitative Darstellung der Spitzenentladungsfrequenz der einzelnen Versuchsgruppen 29

Abbildung 5

A Mikroskopische Aufnahmen des Nucleus tractus solitarius 7,32 mm distal des Bregma in den verschiedenen Versuchsgruppen 31

B Quantitative Darstellung der Fos-Protein positiven Zellen im Nucleus tractus solitarius in den verschiedenen Versuchsgruppen 7,32mm und 7,70mm distal des Bregmas 32

Abbildung 6

A Repräsentative Beispiele aus Myeloperoxidase gefärbten Schnitten der Muskularis der verschiedenen Versuchsgruppen bei 200facher Vergrößerung 33

B Quantitative Darstellung der MPO positiven Zellen in den verschiedenen Versuchsgruppen 34

7. Literaturverzeichnis

1. Ahn H., Bronge A., Johansson K., Ygge H., Lindhagen J. (1988): Effect of continuous postoperative epidural analgesia on intestinal motility. *Br. J. Surg.* 75: 1176 – 1178.
2. Altomare DF, Rubini D, Pilot MA, Farese S, Rubini G, Rinaldi M, Memeo V, D'Addabbo A. Oral erythromycin improves gastrointestinal motility and transit after subtotal but not total gastrectomy for cancer. *Br J Surg.* 1997 Jul;84(7):1017-21
3. Basse L., Madsen J. L., Kehlet H. (2001): Normal gastrointestinal transit after colonic resection using epidural analgesia, enforced oral nutrition and laxative. *Br. J. Surg.* 88: 1498 – 1500.
4. Bauer MB, Murphy S, Gerhart GF. Stimulation of cyclic GMP production via a nitrosyl factor in sensory neuronal cultures by algescic or inflammation agents. *Journal of Neurochemistry* 1995; 65:363-372
5. Berit M., Casati A., Fanelli G., Albertin A., et al (2000): 0.2 % ropivacain with or without fentanyl for patient-controlled epidural analgesia after major abdominal surgery: a double-blind study. *J. Clin. Anesth.* 12: 292 – 297.
6. Borovikova LV, Ivanowva S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin *Nature* 2000; 405: 462-468
7. Brunsden AM, Grundy D. Sensitization of visceral afferents to bradykinin in the rat jejunum. *in vitro.* *J Physiol* 1999; 521: 517-527.
8. Bueno L, Fioramonti J. Effects of inflammatory mediators on gut sensitivity. *Can J Gastroenterol.* 1999 13: 42-46.
9. Burt M, Scott A, Williard WC, Pommier R, Yeh S, Bains MS, Turnbull AD, Fortner JG, McCormack PM, Ginsberg RJ. Erythromycin stimulates gastric emptying after esophagectomy with gastric replacement: a randomized clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996 Mar;111(3):649-54.
10. Castex N., Fioramonti J., Fargeas M. J., More J., Bueno L. (1994): Role of 5-HT₃ receptors and afferent fibres in the effects of mast cell degranulation on colonic motility in rats. *Gastroenterology* 107: 976 – 984.
11. Cheng G., Cassissi C., Drexler P. G., Vogel S. B., et al (1996): Salsalate, morphine, and postoperative ileus. *Am. J. Surg.* 171: 85 – 89.

12. Colotta F., Polentarutti N., Sironi M., Mantovani A. Expression and involvement of c-fos and c-jun protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J. Biol. Chem.* 1992; 267(26): 18278- 18283
13. Cullen J. J., Eagon J. C., Dozois E. J., Kelly K. A. (1993): Treatment of acute postoperative ileus with octreotide. *Am. J. Surg.* 165: 113 – 120.
14. Cullen J. J., Eagon J. C., Kelley K. A. (1994): Gastrointestinal peptide hormones during postoperative ileus: Effect of octreotide. *Dig. Dis. Sci.* 39: 1179 – 1184.
15. Daniel E. E., Parrish M. B., Watson E. G., Fox-Threlkeld J. E. T., et al (1995): The tachykinin receptor inducing contractile responses of canine ileum circular muscle. *Am. J. Physiol.* 268: G161 – G170.
16. De Jonge WJ, Van Den Wungaard RM, The FO, Ter Beek M, Bennink RJ, Tytgat GNJ, Buus RM, Reitsma PH, Van Deventer SJ, Boeckxstaens GE. Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology* 2003; 125: 1137-1147
17. De Winter B. Y., Boeckxstaens G. E., De Man J. G., Moreels T. G., et al (1997): Effect of adrenergic and nitrenergic blockade on experimental ileus in rats. *Br. J. Pharmacol.* 120: 464 – 468.
18. De Winter BY, Boeckxstaens GE, De Man JG, Moreels TG et al. Differential effects of indomethacin and ketorolac on postoperative ileus in rats. *Europ J Pharmacol* 1998; 344: 71-76
19. Distel, R.J., Spiegelman, B.M Protooncogene c-fos as transcription factor. *Adv. Cancer Res.* 1990; 55: 33-55
20. Dunn PM, Rang HP. Bradykinin-induced depolarisation of primary afferent nerve terminals in the neonatal rat spinal cord in vitro. *British Journal of Pharmacology* 1990; 100: 656-660.
21. Eastwood, C., Grundy, D. Mast cell modulation of the intestinal afferents. *Gastroenterology* 1996; 110: A659
22. Eskandari MK, Kalff JC, Billiar TR, Lee KKW, Bauer AJ. Lipopolysaccharide deactivates the intestinal muscularis macrophages network and suppresses circular smooth muscle activity. *Am J Physiol* 1997; 273: G727-734.
23. Espot N. J., Cheng G., Kelley M. C., Vogel S. B., et al (1995): Vasoactive intestinal peptide and substance p receptor antagonists improve postoperative ileus. *J. Surg. Res.* 58: 719 – 723.

24. Eutamene H., Theodorou V., Fioramonti J., Bueno L. (1995): Implication of NK1 and NK2 receptors in rat colonic hypersecretion induced by interleukin 1 β : Role of nitric oxide. *Gastroenterology* 109: 483 – 489.
25. Finkel, M.B., Biskis, B.O., Jinkins, P.B. Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science* 1966; 151: 698-701
26. Gebhart GF. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications IV. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: 834-838.
27. Gebhart GF. Visceral polymodal receptors. *Prog Brain Res* 113: 101-112, 1996.
28. Graham RC, Karnovsky MJ: The early stage of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubule of mouse kidney; Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem* 14:291, 1966.
29. Groudine S. B., Fisher H. A., Kaufman R. P., Patel M. K., et al (1998): Intravenous lidocaine speeds the return of bowel function, decreases postoperative pain, and shortens hospital stay in patients undergoing radical retropubic prostatectomy. *Anesth. Analg.* 86: 235 – 239.
30. Hanker JS, Yates PE, Metz CB, Rustioni A: A new specific sensitive and noncarcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. *Histochem* 9:789, 1977.
31. Herrera, R., Agarwall, S., Walton, K., Satterberg, B., Distel, R.J., Goodman R., Spiegelman B.M., Roberts T.M. A direct role for c-fos in AP- 1-dependent gene transcription. *Cell Growth Differ.* 1990; 1(10): 483-490
32. Herrscher T. (2002): Hemmung der Magenentleerung durch Substanz P und Calcitonin Gene-related Peptide in der postoperativen Phase bei der Ratte. Dissertation, Eberhard- Karls- Universität Tübingen.
33. Hillsley, K., Kirkup, A.J., Grundy, D. Direct and indirect actions of 5-hydroxytryptamine on the discharge of mesenteric afferent fibers innervating the rat jejunum. *J Physiol Lond* 1998; 506: 551-561.
34. Hofstetter CP, Card JP, Olson L. A spinal cord pathway connecting primary afferents to the segmental sympathetic outflow system *Exp Neurol* 2005 194:128-138.
35. Holland, R.J. and Ewart, W.R. Gastrointestinal anaphylaxis induces c-fos over expression in the brainstem nuclei of the rats. *Dig. Dis. Sci.* 1992; 37:978
36. Holzer P. (1998): Implications of tachykinins and calcitonin gene-related peptide in inflammatory bowel disease. *Digestion* 59: 269 – 283.

37. Holzer P., Lippe I. T., Amann R. (1992): Participation of capsaicin-sensitive afferent neurons in gastric motor inhibition caused by laparotomy and intraperitoneal acid. *Neuroscience* 48: 715 – 722.
38. Holzer P., Lippe I. T., Holzer Petsche U. (1986): Inhibition of gastrointestinal transit due to surgical trauma or peritoneal irritation is reduced in capsaicin-treated rats. *Gastroenterology* 91: 360 – 363,
39. Huge A., Zittel T. T., Kreis M. E., Habermann F. M., et al (2000): Nitric oxide synthesis blockade increases small intestinal and colonic motility in awaked rats. *Neurogastroenterology. From the Basics to the Clinics*. Krammer H. J., Singer M. V., editors, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 227 – 230.
40. Hunt, S.P., Pini, A., Evans, G. Introduction of the c-fos-like protein in the spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987; 328: 632-634
41. Jaenig W, and McLachlan EM. Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev* 67:1332-404, 1987.
42. Jaenig W, Morrison JFB. 1986 Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs with special emphasis on visceral nociception. In *Progress in Brain Research*, vol 67, ed. Cervero F and Morisson JFB pp. 87-144. Elsevier, New York.
43. Jaenig W. Neurobiology of visceral afferent neurons: neuroanatomy, functions, organ regulations and sections. *Biol Psychol* 1996; 42: 29-51.
44. Jansen M, Fass J, Tittel A, Mumme T, Anurov M, Titkova S, Polivoda M, Ottinger A, Schumpelick V. Influence of postoperative epidural analgesia with bupivacaine on intestinal motility, transit time, and anastomotic healing. *World J Surg*. 2002 Mar;26(3):303-6. Epub 2001 Dec 21.
45. Jorgensen H., Wetterslev J., Moiniche S., Dahl J. B. (2002): Epidural local anaesthetics versus opioid-based analgesic regimens on postoperative gastrointestinal paralysis, PONV and pain after abdominal surgery. *The Cochrane Library*: 1.
46. Josephs M. D., Cheng G., Ksontini R., Moldawer L. L., Hocking M. P. (1999): Products of cyclooxygenase-2 catalysis regulate postoperative bowel motility. *J. Surg. Res*. 86: 50 – 54.
47. Kalff J. C., Buchholz B. M., Eskandari M. K., Hierholzer C., et al (1999): Biphasic response to gut manipulation and temporal correlation of cellular infiltrates and muscle dysfunction in rat. *Surgery* 126: 498 – 509
48. Kalff J. C., Carlos T. M., Schraut W. H., et al (1999): Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology* 117: 378 – 387.

49. Kalff J. C., Schraut W. H., Billiar T. R., Simmons R. L., Bauer A. J. (2000): Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Gastroenterology* 118: 316 – 327.
50. Kalff J. C., Schraut W. H., Sinmmons R. L., Bauer A.L. (1998): Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann. Surg.* 228: 652 – 663.
51. Kalff J.C, Schraut WH, Simmons RL, et al. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Ann Surg* 1998; 228:652–639.
52. Kelley M. C., Hocking M. P., Marchand S. D., Sninsky C. A. (1993): Ketorolac prevents postoperative small intestinal ileus in rats *Am. J. Surg.* 165: 107 – 112.
53. Kreis M.E., Müller M., Zittel T.T., Glatzle J., Grundy, D. Mediators of central neuronal activation following intestinal anaphylaxis in rat. *Neuroscience Letteres.* 289 (1): 45-48 (Jul 28 2000).
54. Kreis ME, Mueller MH, Reber D, Glatzle J, Enck P, Grundy D. Stress-induced attenuation of brain stem activation following intestinal anaphylaxis in the rat. *Neurscience Letters* 2003 Jul; 345 (3): 187-191
55. Kreis, M.E., Haupt, W., Kirkup, A.J., Grundy, D. Histamine sensitivity of mesenteric afferent nerves in the rat jejunum. *Am J Physiol* 1998; 275: G675-G680.
56. Kreiss C, Birder LA, Kiss S, VanBibber MM, Bauer AJ. (2003) COX-2 dependent inflammation increases spinal FOS expression during rodent postoperative ileus. *Gut*;52(4): 527-34
57. Lander A, Redkar R, Nicholls G, Lawson A, Choudhury SR, Corkery JJ, Gornall P, Buick RG, Booth IW. Cisapride reduces neonatal postoperative ileus: randomised placebo controlled trial.
58. Levein NG, Thörn SE, Lindberg G, Wattwill M. Dopamine reduces gastric tone in a dose- related manner. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43: 722-725
59. Livingston EH, Passaro EP Jr. Postoperative Ileus. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 121-132.
60. Lowman RM. The potassium depletion states and postoperative ileus: the role of potassium ion. *Radiology* 1971; 98: 691-694
61. MacNaughton W., Moore B., Vanner S. (1997): Cellular pathways mediating tachykinin- evoked secretomotor responses in guinea pig ileum. *Am. J. Physiol.* 273: G1127 – G1134.

62. Mashimo H., Goyal R.K. (1999): Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice.
63. Matsunaga H, Tanaka M, Takahata S, Ogawa Y, Naritomi G, Yokohata K, Yamaguchi K, Chijiwa K. Manometric evidence of improved early gastric stasis by erythromycin after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. *World J Surg.* 2000 Oct;24(10):1236-41; discussion 1242
64. Matsunaga H., Tanaka M., Naritomi G., Yokohata K., et al (1998): Effect of Leucine 13-Motilin (KW5139) on early gastric stasis after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. *Ann. Surg.* 227: 507 – 512.
65. Maubach KA, Grundy D The role of prostaglandins in the bradykinin-induced activation of serosal afferents in the rat jejunum in vitro. *J Physiol* 1999; 515: 277-285.
66. Moojen T. M., Van Gulik T. M., Hoek F. J., Gouma D. J., et al (1999): Possible role of nitric oxide in postoperative ileus: a comparative study. *Neurogastroenterol. Motil.* 11: 403 – 408.
67. Morgan C, Nadelhaft I, deGroat WC. Distribution within the spinal cord of visceral primary afferent axons carried by lumbar colonic nerve of the cat. *Brain research.* 1986; 398: 11-17.
68. Moss G, Regal ME, Lichting LK. Reducing postoperative pain, narcotics, and length of hospitalization. *Surgery* 1986; 90: 206-210.
69. N. T., Kalff J. C., Türler A., Engel B. M., et al (2001): Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus. *Gastroenterology* 121: 1354 – 1371.
70. Ness TJ, Gebhart GF 1990 Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain* 41: 167-234.
71. Ohwada S, Satoh Y, Kawate S, Yamada T, Kawamura O, Koyama T, Yoshimura S, Tomizawa N, Ogawa T, Morishita Y. Low-dose erythromycin reduces delayed gastric emptying and improves gastric motility after Billroth I pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg.* 2001 Nov;234(5):668-74.
72. Pairet M., Ruckebusch Y. (1989): On the relevance of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the prevention of paralytic ileus in rodents. *J. Pharm. Pharmacol.* 41: 757 – 761.
73. Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, and Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med* 9: 125-34, 2003.
74. Paxinos, G., Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn., Academic Press, San Diego, 1986

75. Prasad M., Matthews J. B. (1999): Deflating postoperative ileus. *Gastroenterology* 117: 489–492.
76. Ransone, L.J., Verma, I.M. Nuclear proto- oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1990; 6: 539-557
77. Ransone, L.J., Wansley, P., Morely, K.L., Verma, I.M. Domain swapping reveals the modular nature of Fos, Jun and CREB proteins. *Mol. Cell. Biol.* 1990; 10(9): 4565- 4573
78. Regoli, D. & Barabe, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological Reviews* 1980; 32, 1-46.
79. Resnick J, Greenwald DA, Brandt LJ. Delayed gastric emptying and postoperative ileus after nongastric abdominal surgery: part II. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 934-940
80. Rimbäck G., Cassuto J., Tollesson P. O. (1990): Treatment of postoperative paralytic ileus by intravenous lidocaine infusion. *Anesth. Analg.* 70: 414–419.
81. Schnitzler M, Kilbride MJ, Senagore A. Effect of epidural analgesia on colorectal anastomotic healing and colonic motility. *Reg Anesth.* 1992 May-Jun;17(3):143-7.
82. Schnitzler M., Kilbride M. J., Senagore A. (1992): Effect of epidural analgesia on colorectal anastomotic healing and colonic motility. *Reg. Anesth.* 17: 143 – 147.
83. Schwarz N. T., Beer-Stolz D., Simmons R. L., Bauer A. J. (2002): Pathogenesis of paralytic ileus. Intestinal manipulation opens a transient pathway between the intestinal lumen and the leukocytic infiltrate of the jejunal muscularis. *Ann. Surg.* 235: 31 – 40.
84. Schwarz NT, Kalff JC, Turler A, Engel BM, Watkins SC, Billar TRm Bauer AJ. Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus. *Gastroenterology* 2001; 121: 1364-1371.
85. Schwarz, N. T., Engel, B., Eskandari, M. K., Kalff, J. C., Grandis, J. R., Bauer, A. J. (2002) Lipopolysaccharide preconditioning and cross-tolerance: the induction of protective mechanisms for rat intestinal ileus. *Gastroenterology* 123: 586 – 598.
86. Scott A. M., Starling J. R., Ruscher A. E., DeLesson S. T., Harms B. A. (1996): Thoracic versus lumbar epidural anesthesia’s effect on pain control and ileus resolution after restorative proctocolectomy. *Surgery* 120: 688 – 697.
87. Snape WJ, Weight SH, Battle WM, Cohen S. The gastrocolonic response: evidence for neural mechanism. *Gastroenterology* 1979; 77: 1235-1240

88. Streeten DHP, Williams EMV. Loss of cellular potassium as a cause of intestinal paralysis in dogs. *J Physiol* 1952; 118: 149-170
89. Swanson, L.W. *Brain Maps: Structure of The Rat Brain*, Elsevier, Amsterdam, 1992.
90. Szurszewski J. H., Miller S. M. (1994): Physiology of prevertebral ganglia. In: Johnson L. R. (ed): *Physiology of the gastrointestinal tract*. 3rd edn. Raven, New York; 795 – 878.
91. Szurszewski JK, Ermilov LG, and Miller SM. Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurons. *Gut* 51(suppl), i6 – i10, 2002.
92. Thorén T., Sundberg A., Wattwil M., Garvill J.-E., Jürgensen U. (1989): Effect of epidural bupivacaine and epidural morphine on bowel function and pain after hysterectomy. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 33: 181 – 185.
93. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853-859, 2002
94. Trouche, D., Grigoriev, M., Lenormand, J.L, Robin, P., Leibovitch, S.A., Sassone- Corsi, P., Harel- Bellan, A. Repression of c-fos promoter by MyoD on muscle cell differentiation. *Nature* 1993; 363(6424): 79-82
95. Türler, A., Moore, B. A., Pezzone, M. A., Overhaus, M., Kalff, J. C., Bauer, A. J. (2002) Colonic postoperative inflammatory ileus in the rat. *Ann. Surg.* 236: 56 – 66.
96. Wattwil M., Thorén T., Hennerdal S., Garvill J.-E. (1989): Epidural analgesia with bupivacaine reduces postoperative paralytic ileus after hysterectomy. *Anesth. Analg.* 68: 353 – 358.
97. Wood JN, Dochery R. Chemical activators of sensory neurons. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 457-482.
98. Yeo CJ, Barry MK, Sauter PK, Sostre S, Lillemoe KD, Pitt HA, Cameron JL. Erythromycin accelerates gastric emptying after pancreaticoduodenectomy. A prospective, randomized, placebo-controlled trial. *Ann Surg.* 1993 Sep;218(3):229-37; discussion 237-8.
99. Zhang X, Fogel R, and Renehan WE. Physiology and morphology of neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus and the nucleus of the solitary tract that are sensitive to distension of the small intestine. *J Comp Neurol* 323: 432-48, 1992.
100. Zittel T. T., Lloyd K. C. K., Rothenhöfer I., Wong H., et al (1998): Calcitonin gene-related peptide and spinal afferents partly mediate postoperative colonic ileus in the rat. *Surgery* 123: 518 – 527.

101. Zittel T. T., Meile T., Hüge A., Kreis M. E., et al (2001): Preoperative intraluminal application of capsaicin increases postoperative gastric and colonic motility in rats. *J. Gastrointest. Surg.* 5: 503 – 513.
102. Zittel T. T., Meile T., Jehle E. C., Becker H. D. (2001): Intraperitoneal capsaicin treatment reduces postoperative gastric ileus in awake rats. *Langenbeck's Arch. Surg.* 386: 204 – 211,
103. Zittel T. T., Reddy S. N., Plourde V., Raybould H. E. (1994): Role of spinal afferents and calcitonin gene-related peptide in the postoperative gastric ileus in anesthetized rats. *Ann. Surg.* 219: 79 – 87.
104. Zittel T. T., Rothenhöfer I., Meyer J. H., Raybould H. E. (1994): Small intestinal capsaicin-sensitive afferents mediate feedback inhibition of gastric emptying in rats. *Am. J. Physiol.* 267: G1142 – G1145.

Danksagung

Die Entstehung dieser Arbeit wäre ohne die Hilfe meiner Mutter, Anastasia Stratopoulou, nicht möglich gewesen. Vielen Dank für ihre Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Kampitoglou
Vorname:	Dimitrios
Geburtsdatum:	27.11.1980
Geburtsort:	Thessaloniki /Griechenland
Eltern:	Merkourios und Anastasia Kampitoglou
Geschwister:	Stavros
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	griechisch

Schulbildung

1986-1992	Grundschule in Thessaloniki
1992-1998	19.Gymnasium (Lyzeum) in Thessaloniki Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife

Hochschulbildung

1999	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Semmelweis-Universität Budapest
2001	Ärztliche Vorprüfung
2002	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2004	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
22.11.2005	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
30.11.2005	Erteilung der Approbation

Praktisches Jahr

10/04- 02/05

1. Tertial an der Abteilung der Inneren Medizin der Universitätsklinik Tübingen

02/05- 06/05

2. Tertial an der Abteilung für Allgemeine Chirurgie der Universitätsklinik Ippokrateio der Aristoteles-Universität in Thessaloniki/ Griechenland

06/05- 09/05

3. Tertial an der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universitätsklinik Ippokrateio der Aristoteles-Universität in Thessaloniki/ Griechenland