

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

**Neuronale Aktivierung im Nucleus Tractus Solitarius
nach intrajejunaler und systemischer
Lipopolysaccharidgabe im Dünndarm der Ratte**

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

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

**vorgelegt von
Georgios Gakis
aus
Nürtingen**

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1.Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. E. Kreis

2.Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

Meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex
AP	Area postrema
CD	Cluster of differentiation
c-Fos	cellular Finkel Osteo Sarkoma
COX	Cyclooxygenase
DVC	Dorsal-vagal complex
EP	Prostaglandinrezeptor
H ₁ -/ H ₂	Histamin-H ₁ -/ Histamin-H ₂ -Rezeptor
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IBS	Irritable Bowel Syndrome
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LAL	Limulus Amoebocyte Lysate
LPS	Lipopolysaccharid
NF-κB	Nuclear factor-κB
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NTS	Nucleus Tractus Solitarius
SEM	Standard Error of the Mean
TLR	Toll-like Rezeptor
ZNS	Zentralnervensystem
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Interaktion des enterischen Nervensystems mit dem Immunsystem	1
1.3 Aufbau und Wirkung von Lipopolysacchariden	3
1.4 Klinische Relevanz der viszeralen Sensibilität	4
1.5 Fragestellungen	5
2. Material und Methoden	6
2.1 Versuchstiere	6
2.2 Versuchsdurchführung	6
2.2.1 Übersicht	6
2.2.2 Implantation des Jejunalkatheters	7
2.2.3 Abschlußexperimente und Gewebeentnahme	8
2.2.3.1 Versuchsablauf bei intrajejunaler LPS-Gabe	8
2.2.3.2 Versuchsablauf bei systemischer LPS-Gabe	9
2.2.3.3 Versuchsablauf bei systemischer LPS-Gabe und vorheriger Gabe von Medikamenten	9
2.2.3.4 Gewinnung von Serumproben	10
2.2.3.5 Fixierung des Versuchstieres	11
2.2.4 Fos-Immunohistochemie	11
2.2.4.1 Anwendung der Fos-Immunohistochemie zur Bestimmung der neuronalen Aktivität	11
2.2.4.2 Immunohistochemische Aufarbeitung des Gehirnpräparates	12
2.2.4.3 Fos-Kontrollen	14
2.2.5 Limulus Amoebocyte Lysate Chromogenic Endpoint Assay 15	
2.2.5.1 Zusammensetzung des Kits	15
2.2.5.2 Vorbereitungen für den LAL-Endpoint Assay	16

2.2.5.3	Procedere zur Bestimmung der Probenkonzentration ...	17
2.2.6	Übersicht Versuchsgruppen	18
2.3	Auswertung der Präparate	19
2.4	Statistik	20
2.5	Materialien	20
2.5.1	Substanzen.....	20
2.5.2	Lösungen.....	21
2.5.3	Labormaterialien und Geräte	22
3.	Ergebnisse.....	26
3.1	Fos-positive Zellen im NTS nach intrajejunaler Applikation von LPS versus Kontrollen.....	26
3.2	Fos-positive Zellen im NTS nach systemischer Applikation von Rezeptorantagonisten versus Kontrollen	27
3.3	Fos-positive Zellen in der Area postrema nach intrajejunaler und systemischer LPS-Gabe	29
4.	Diskussion	36
4.1	Material und Methoden	36
4.2	Diskussion der Ergebnisse	42
4.3	Überlegungen zu Brain-Gut-Interaktionen und Möglichkeiten der Modulation von Aktivierungsprozessen im ZNS	47
4.4	Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	53
5.	Zusammenfassung.....	58
6.	Abbildungen und Tabellen	61
7.	Literaturverzeichnis	63

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Dem Gastrointestinaltrakt des Menschen kommen zwei entgegengesetzte Aufgaben zu. Auf der einen Seite müssen Substanzen, die für den Stoffwechsel wichtig sind, resorbiert werden. Auf der anderen Seite muss der Körper Resorptionsbarrieren für toxische Stoffe aufrechterhalten und Keime mit schädlicher Potenz eliminieren [13].

Im Gastrointestinaltrakt finden sich aber auch Keime, die als Kommensalen für den Körper von Nutzen sind und als residente Flora bezeichnet werden. Da die Flora für den Körper nicht schädlich ist, besteht eine ihrer Aufgaben darin, ein Wachstum von Keimen mit schädlicher Potenz durch ihr eigenes Wachstum zu verhindern [13, 96].

Es ist bekannt, dass es nach einer längeren antibiotischen Behandlung zu Infektionen des Gastrointestinaltraktes kommen kann. Ein klinisches Beispiel hierfür liefert die pseudomembranöse Colitis, die nach Gabe antibiotischer Substanzen auftreten kann. Hierbei kommt es durch die antibiotische Behandlung zu einer Verminderung der Anzahl von residenten Keimen zugunsten von *Clostridium difficile* und damit zu einer hämorrhagischen Enterocolitis [51].

1.2 Interaktion des enterischen Nervensystems mit dem Immunsystem

Die Darmwand zeigt einen mehrschichtigen Aufbau. Unter einer durch Zotten und Mikrovilli stark vergrößerten resorptiven Oberfläche befindet sich die

Lamina propria, die mit Immunzellen, vor allem Mastzellen, und Nervenfasern besetzt ist. Dort befinden sich auch zahlreiche Nervenfasern des enterischen Nervensystems, die den sogenannten Plexus submucosus bilden, welcher für die Innervation der Schleimhaut zuständig ist. Die Peristaltik des Darms wird durch die Tunica muscularis propria mit einer quer- und längsgerichteten Muskulatur gewährleistet und durch den Plexus myentericus innerviert. Eine übergeordnete Regulation der physiologischen Vorgänge im Darm erfolgt vorwiegend durch vagale Nervenfasern [77]. Interaktionen zwischen Immunzellen und afferenten Neuronen wurden in zahlreichen Arbeiten beschrieben. Williams et al. konnten zeigen, dass Mastzellen in der intestinalen Mukosa eng mit afferenten vagalen Nervenfasern assoziiert sind [105]. Die Arbeit von Jiang et al. lieferte einen weiteren Hinweis auf die Assoziation zwischen Mastzellen und vagalen afferenten Nervenfasern. Sie zeigten, dass Mastzellmediatoren, wie Histamin und Serotonin, nach ihrer Freisetzung mesenteriale afferente Nervenfasern stimulieren können [43].

Weiterhin innervieren den Darm nicht nur vagale, sondern auch spinale afferente Nervenfasern. Die Projektion afferenter Signale in das Zentrale Nervensystem (ZNS) kann somit über den N. vagus oder über spinale Fasern erfolgen. Es wird angenommen, dass über den Vagus hauptsächlich Signale über physiologische Ereignisse, wie Peristaltik, in das ZNS weitergeleitet werden, wohingegen über spinale Afferenzen vorwiegend pathologische und nozizeptive Stimuli ihren Eingang in das ZNS finden [27, 28].

Der Nucleus tractus solitarius (NTS) ist ein im Hirnstamm gelegener Hirnnervenkernkomplex, der neben Fasern für die Geschmacksempfindung auch allgemein- und speziell viszerosensible afferente Nervenfasern aus der Peripherie erhält. Es ist bekannt, dass viszerosensible Afferenzen des N.vagus aus dem Intestinum in den Nucleus tractus solitarius projizieren [104]. Zudem kommt es nach lokaler Gabe bestimmter Allergene und einer damit

einhergehenden Mastzellaktivierung in der Lamina propria zu einer Aktivierung Fos-positiver Neuronen im NTS [50]. Somit können Signale über eine Aktivierung von Immunzellen im Darm, wie beispielsweise bei Entzündungen, an den NTS im ZNS fortgeleitet werden.

1.3 Aufbau und Wirkung von Lipopolysacchariden

Lipopolysaccharide (LPS) sind Moleküle, die in der bakteriellen Zellwand gramnegativer Zellen, wie *Escherichia coli* (E.coli), zu finden sind. Sie entwickeln pathogene Potenz, wenn eine Bakterienzelle lysiert und die in die Zellmembran eingelagerten LPS-Moleküle freigesetzt werden. Lipopolysaccharidmoleküle setzen sich funktionell aus zwei Bestandteilen zusammen. Das O-Antigen besitzt antigene Eigenschaften und ermöglicht die Anbindung an die Zielzelle, wohingegen das Lipid A die toxischen Eigenschaften des Moleküls vermittelt [96].

Lipopolysaccharide spielen eine große Rolle bei bakteriellen Infektionen des Gastrointestinaltraktes. Sie können beim Menschen bei Übertritt in den systemischen Kreislauf zur Ausbildung eines septischen Schocks führen. Es ist bisher unklar, ob LPS im physiologischen Zustand in der Lage ist, den dichten Aufbau der Epithelschicht des Darms, bestehend aus tight-junctions, zu überwinden und in der Folge Nervenendigungen in der Lamina propria zu sensibilisieren oder gar in den systemischen Kreislauf überzutreten [1]. Bei gestörter Homöostase, die häufig bei Intensivpatienten vorliegt, kann jedoch eine bakterielle Translokation und somit auch ein Übertritt von LPS erfolgen [2].

Die Eigenschaft von LPS mesenteriale afferente Nervenfasern zu sensibilisieren, wurde von Liu et al. untersucht. Es zeigte sich, dass systemisch appliziertes LPS mesenteriale afferente Nervenfasern sensibilisieren kann. Darüber hinaus trat nach LPS-Gabe eine passagere Hypersensibilität für

mechanische Reize und 5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin) auf. Weiterhin wurde in dieser Arbeit die pharmakologische Regulation dieser Hypersensibilität untersucht. Die vorherige Gabe des Prostaglandin-E₂ Syntheseinhibitors Naproxen (10 mg kg⁻¹) führte zu einer Abnahme der Sensibilisierung mesenterialer afferenter Nervenfasern gegenüber 5-HT und mechanischer Dehnung nach LPS-Gabe. Im Gegensatz dazu hatte die Gabe von Aminoguanidin (15 mg kg⁻¹), einem Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase, eine Zunahme der Sensibilisierung zur Folge [55].

1.4 Klinische Relevanz der viszeralen Sensibilität

Die viszerale Sensibilität spielt bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) und Reizdarmsyndrom (IBS) eine bedeutende Rolle. Patienten mit IBS haben trotz geringer pathomorphologischer Veränderungen des Darms eine ausgeprägte abdominale Schmerzsymptomatik, wohingegen bei IBD-Patienten mit schweren morphologischen Veränderungen der Darmwand häufig eine verhältnismäßig moderate Schmerzsymptomatik besteht [6, 85]. Weiterhin ist bekannt, dass der Einfluss psychischer Stressfaktoren bei Patienten mit IBS eine bedeutendere Rolle in der Pathogenese spielt als bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen [69]. Diese Beobachtung legt nahe, dass das zentrale Nervensystem einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung und Modulation viszeraler nozizeptiver Stimuli hat.

1.5 Fragestellungen

Ziel dieser Studie war es damit folgende Fragen zu untersuchen:

1. Kommt es nach intrajejunaler und/oder systemischer Gabe von LPS zu einer Aktivierung im NTS bei der Ratte?
2. Welche Mechanismen liegen der Aktivierung im ZNS nach systemischer Gabe von LPS zugrunde?
3. Liegt gegebenenfalls einer Aktivierung von Neuronen im ZNS eine systemische Aufnahme von LPS zugrunde oder eine lokale Wirkung im Darm mit Weiterleitung lokal getriggertener Signale?

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 300 und 400 g. Die Tiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen gehalten (12:12 Stunden hell/dunkel Zyklus; Beginn des Lichtzyklus um 6 Uhr 30) und erhielten Trockenfutter sowie Trinkwasser ad libitum. Die Experimente wurden zuvor durch die Tierversuchskommission des Regierungspräsidiums Tübingen genehmigt.

2.2 Versuchsdurchführung

2.2.1 Übersicht

Tag 0: Implantation eines Polyethylenkatheters in das proximale Jejunum

Tag 4: Abschlussexperiment nach *Protokoll 1 oder 2.*

Protokoll 1:

Perfusion des Jejunalkatheters mit Lipopolysaccharid-Lösung oder mit NaCl-Lösung zu Kontrollzwecken.

Protokoll 2:

Intraperitoneale Applikation von LPS- oder NaCl-Lösung zu Kontrollzwecken. Gegebenenfalls Applikation von Medikamenten vor LPS-Gabe.

Nach Durchführung von Protokoll 1 und 2:

Gabe einer Pentobarbitalüberdosierung und Blutprobengewinnung zur Bestimmung der Serum-LPS Konzentration. Nachfolgend Perfusion des Tieres mit NaCl und Formalinlösung sowie Entnahme des Gehirns zur immunohistochemischen Untersuchung.

2.2.2 Implantation des Jejunalkatheters

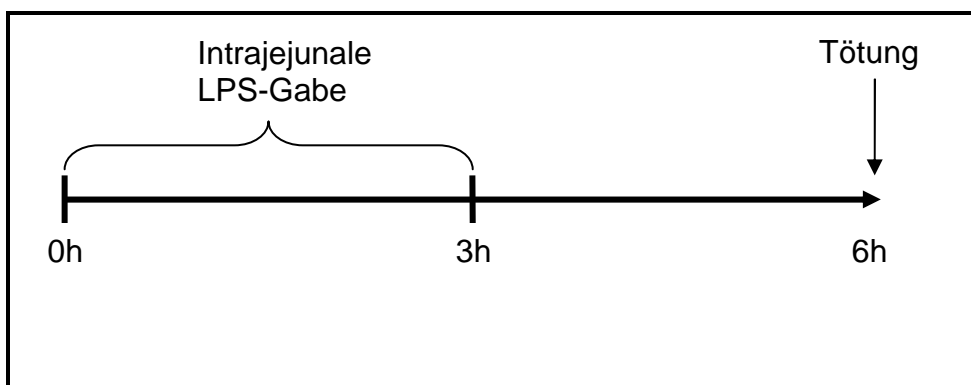
Die präoperative Nahrungskarenz der Tiere betrug 12 Stunden. Die Narkose für den abdominalen Eingriff zur Implantation des Katheters wurde mit Diethylether aufrechterhalten (inhalative Applikation). Nach Rasur, Desinfektion und steriler Abdeckung des Operationsfeldes erfolgte die Laparotomie durch einen medianen Längsschnitt. Es wurden die Haut, Linea alba sowie das Peritoneum scharf durchtrennt und anschließend das Omentum majus zusammen mit dem Dünndarmkonvolut nach kranial umgeschlagen, der proximale Anteil des Jejunums dargestellt und 0,5 cm distal der Flexura duodenojejunalis antimesenterial eröffnet. Ein Polyethylenkatheter mit 0,5 mm Innendurchmesser und 1,0 mm Außendurchmesser wurde in das Lumen eingebracht. Die Fixation des Katheters am Dünndarm geschah mit Hilfe einer Tabaksbeutelnaht. Der Katheter war zuvor durch Erwärmen an einer Flamme so geformt worden, dass an der Katheterspitze eine Krempe als Widerlager entstand, um eine spätere Dislokation des Katheters zu vermeiden. Der Katheter wurde dann über den linken Leberlappen, subdiaphragmal durch das Peritoneum und subkutan bis zum Nacken des Tieres ausgeleitet. Hier erfolgte die Fixation mit einem Pflasterföhnchen und einer Naht. Die Bauchdecke wurde mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Der Verschluss des Katheterlumens erfolgte mit einem Vaselinepfropf. Nach Narkoseende blieben die Tiere bis zum vollständigen Erwachen überwacht. Sie erhielten postoperativ Standardfutter ohne Zusätze.

2.2.3 Abschlußexperimente und Gewebeentnahme

2.2.3.1 Versuchsablauf bei intrajejunaler LPS-Gabe

Die operierten Tiere wurden zunächst gewogen und anschließend in sogenannte Bollmannkäfige gesetzt, die ein Umherlaufen der Tiere verhindern. Diese Käfige stellen damit sicher, dass sich das Versuchstier während des Abschlußexperiments ruhig verhält und folglich die Infusion von Lösungen in den Katheter korrekt erfolgt. Der am Nacken des Tieres ausgeleitete Katheter wurde mit einer stumpfen Hohnadel kanüliert und mit 0,1 ml Leitungswasser gespült. Im Anschluß daran erfolgte die kontinuierliche Infusion der Lipopolysaccharidlösung (E.coli-LPS 0111:B4, 10 mg ml⁻¹, Gesamtvolumen: 2 ml) mit Hilfe einer Infusionspumpe. Die Dauer der Perfusion betrug 180 Minuten bei einer Flussrate von 0.011 ml min⁻¹. Nach einer Latenzzeit von weiteren 180 Minuten wurde das Versuchstier durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital getötet. Anschließend wurde der Katheter mit einer Tintenlösung perfundiert, um die Dichtigkeit des Katheters zu kontrollieren und eine Extravasation der applizierten Lipopolysaccharidlösung auszuschließen [4].

Abb. 1: Versuchsablauf bei intrajejunaler LPS-Gabe anhand eines Zeitstrahls



2.2.3.2 Versuchsablauf bei systemischer LPS-Gabe

Wie unter 2.2.3.1 beschrieben wurden die Tiere gewogen und in Bollmannkäfige gesetzt. Dann wurde 1 mg kg^{-1} Tiergewicht E.coli-LPS (0111:B4) intraperitoneal verabreicht. 180 Minuten nach LPS-Gabe wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital getötet. Der weitere Versuchsablauf erfolgte wie unter 2.2.3.1 beschrieben.

2.2.3.3 Versuchsablauf bei systemischer LPS-Gabe und vorheriger Gabe von Medikamenten

Zur Klärung der pharmakologischen Beeinflussbarkeit dieser Aktivierungsprozesse im Hirnstamm wurden 30 Minuten vor systemischer LPS-Gabe die unterschiedlichen pharmakologischen Substanzen in entsprechender Konzentration intraperitoneal appliziert. Nach einer Zeitspanne von insgesamt 180 Minuten nach Medikamentengabe erfolgte die intraperitoneale Gabe einer Pentobarbitalüberdosierung. Der weitere Versuchsablauf verlief wie unter 2.2.3.1 beschrieben.

Abb. 2: Versuchsablauf bei systemischer LPS-Gabe anhand eines Zeitstrahls

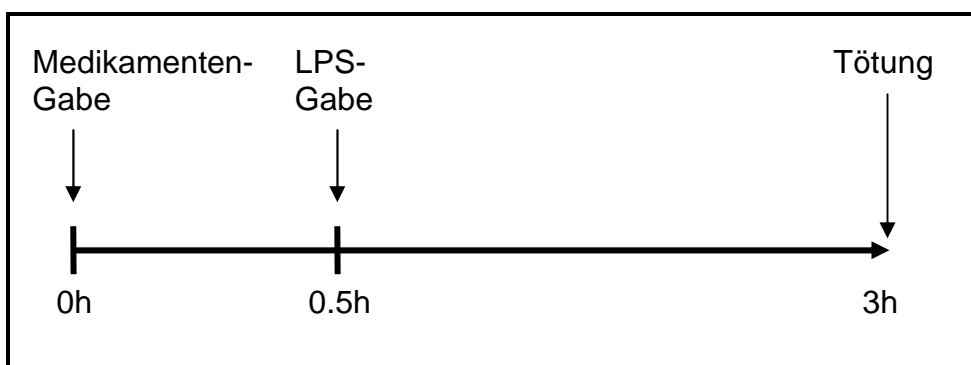
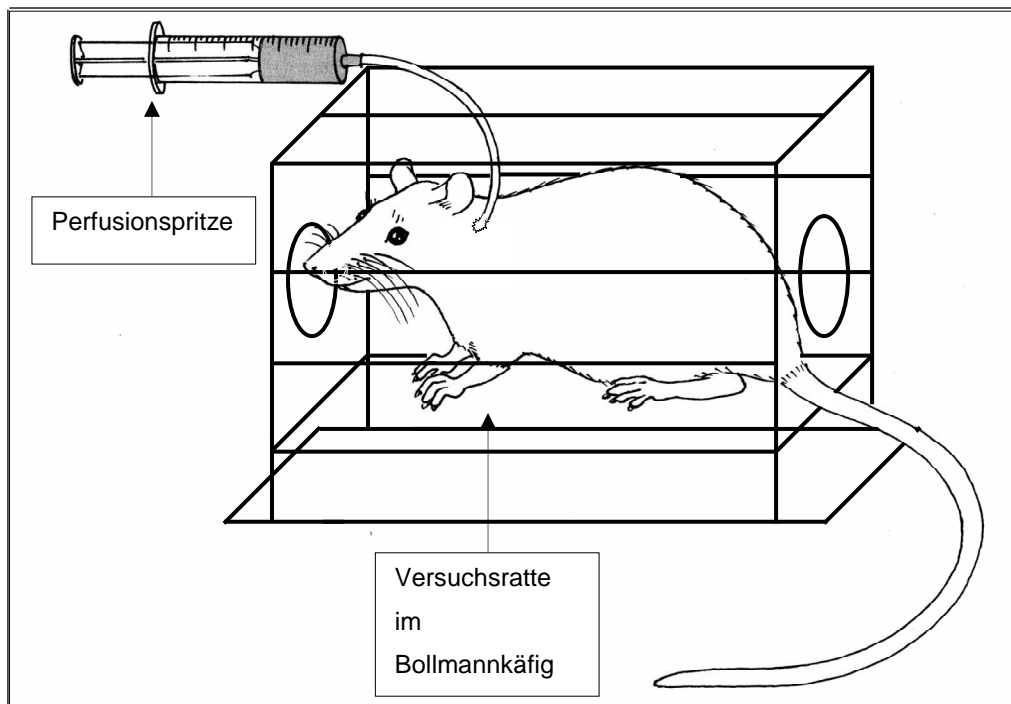


Abb. 3: Schematische Versuchsanordnung im Abschlussexperiment bei intrajejunaler LPS-Applikation



2.2.3.4 Gewinnung von Serumproben

Nachdem die Tiere durch eine Pentobarbitalüberdosis getötet worden waren, erfolgte eine mediane Laparotomie bis zum Processus xiphoideus, die nach links und rechts entlang der Rippenbögen erweitert wurde. Es wurde die Thoraxhöhle eröffnet und das Zwerchfell von seinen ventralen Ansätzen abgetrennt. Anschließend wurde das Perikard von der Hinterfläche des Sternums abgelöst und die Perikardhöhle scharf eröffnet. Nun wurden zur Probengewinnung mit einer Spritze 3 ml venöses Blut aus dem rechten Vorhof aspiriert. Im Anschluß daran wurde die entnommene Probe 20 Minuten lang zentrifugiert, das überstehende Serum abpipettiert und bis zur Durchführung des Assays bei -20°C eingefroren.

2.2.3.5 Fixierung des Versuchstieres

Im Anschluß an die Probengewinnung wurde zur Fixierung des Versuchstieres der linke Ventrikel scharf eröffnet, mit einer Knopfkanüle sondiert und diese bis in die Aorta ascendens eingelegt. Zwei Kocherklemmen dienten zur Fixierung der Knopfkanüle, die mit einer Infusionspumpe zur kontinuierlichen Perfusion verbunden war. Nun erfolgte die Eröffnung der Vena cava inferior, um das Ausströmen des Blutes und der Spülflüssigkeit bei der anschließenden Perfusion zu gewährleisten. Es wurde dann das Versuchstier mit 100 ml 0.9% NaCl in 0.1 M Phosphatpuffer blutleer gespült. Die Fixierung des Versuchstieres erfolgte mit 50 ml 4%iger Paraformaldehydlösung in 0.1 M PBS über die intraaortal liegende Knopfkanüle. Bei der anschließenden Präparation des Gehirns wurden zunächst das Fell und die Nackenmuskulatur von occipital aus abpräpariert und der atlanto-occipitale Übergang dargestellt. In der Folge wurde der Kopf vom Rumpf abgetrennt, die Wirbelbögen entlang des Rückenmarkkanals von dorsal aus entfernt und die Hirnstammregion freipräpariert. Anschließend erfolgte die Eröffnung der Schädelkalotte von occipital nach frontal mit Hilfe einer Luer-Zange. Das Gehirn wurde nun von der Schädelbasis aus beginnend abgehoben und schlussendlich unter Durchtrennung der einzelnen Hirnnerven aus der Schädelgrube herausgehoben. Zum Abschluss der Präparation wurde noch das Kleinhirn vom Hirnstamm abpräpariert.

2.2.4 Fos-Immunohistochemie

2.2.4.1 Anwendung der Fos-Immunohistochemie zur Bestimmung der neuronalen Aktivität

Die Aktivierung im NTS und in der AP wurde mittels eines immunohistochemischen Färbeverfahrens, der sogenannten Fos-Technik,

dargestellt. Sie beruht darauf, dass es in Nervenzellen nach vorheriger unspezifischer Aktivierung, wie nach einer Entzündung, zur Expression sogenannter early-onset genes kommt, zu denen unter anderen das c-Fos Gen zählt. Die Fos-Technik bietet den Vorteil der gleichzeitigen Darstellung anatomischer Strukturen und deren funktioneller Zuordnung [74, 95]. Die erhöhte Expression von early-onset genes hat unter anderem zur Aufgabe die für eine adäquate Entzündungsreaktion der Zelle notwendigen Proteine mit Abwehrfunktion, wie Zytokine und Interleukine, bereitzustellen [32].

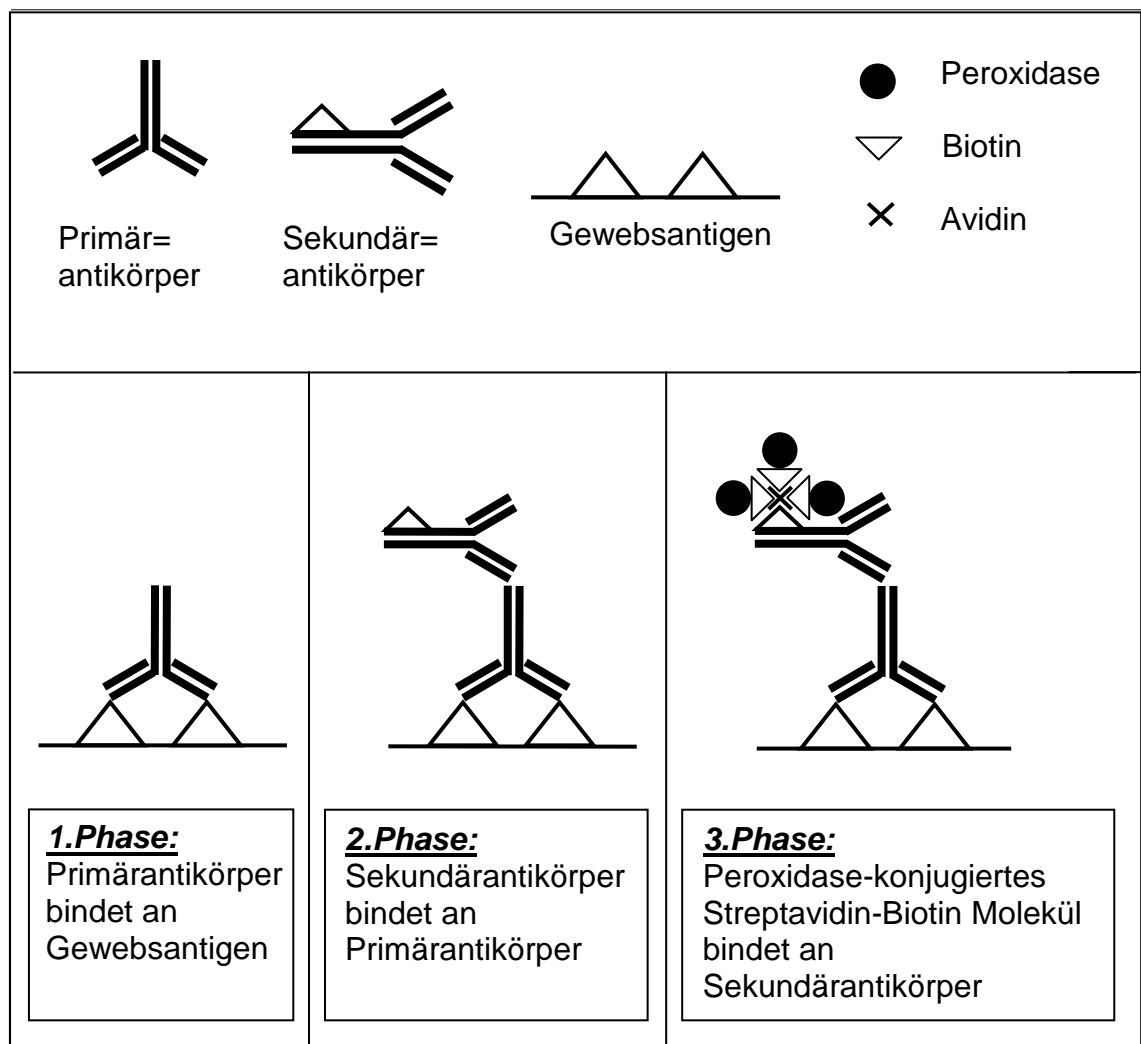
2.2.4.2 Immunohistochemische Aufarbeitung des Gehirnpräparates

Die Nachfixierung des Gehirnpräparates erfolgte über 24 Stunden in PBS (phosphate-buffered solution) gepufferter 4%iger Paraformaldehydlösung. Um das Präparat bis zur Anfertigung der Hirnschnitte zu konservieren und zu entwässern, wurde es anschließend in 25%iger Sucroselösung aufbewahrt. Das fixierte Gehirn wurde nun im Gefriermikrotom aufgefroren und in 30 µm dicke Kryoschnitte geschnitten. Die Kryoschnitte wurden in PBS-Lösung gesammelt und jeder zweite Hirnschnitt der immunohistochemischen Färbung zugeführt. Die immunohistochemische Färbetechnik erfolgte mittels Streptavidin-Biotin Methode in Free-Floating Technik. Die durch Kryoschnitttechnik gewonnenen Gehirnschnitte der zu untersuchenden Hirnstammregion flotieren hierbei während der einzelnen Färbeschritte in der jeweiligen Reagenzienlösung. Sie werden erst nach Abschluß der gesamten Färbeschritte auf den Objektträger zur mikroskopischen Auswertung aufgezo-

Zunächst werden die Schnitte zweimal 5 Minuten lang in PBS gespült und dann bei Raumtemperatur für 15 Minuten in 0.3%iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert, um eine Mitreaktion der endogen vorhandenen Peroxidase während der Färbereaktion zu verhindern. Die Schnitte werden nun dreimal 5 Minuten lang in PBS gespült. Als nächstes werden durch Gabe einer Blockierungslösung (5% Ziegenserum) bei anschließender Inkubation für 30

Minuten unspezifische Bindungsstellen inaktiviert. Im nächsten Färbeschritt wird nun ohne vorheriges Spülen der polyklonale Antikörper rabbit anti-c-fos in einer Verdünnung von 1:2000 hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Spülen in PBS erfolgt dann die Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper goat anti-rabbit in einer Verdünnung von 1: 100. Die Inkubationszeit beträgt hierbei 90 Minuten bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem Spülen wird dann das peroxidase-konjugierte Streptavidin-Biotin-Komplexreagenz (ABC-Reagenz) hinzugefügt, welches eine hohe Affinität für den biotinylierten Zweitantikörper besitzt (Dissoziationskonstante: 10^{-19} M). Aufgrund dieser Eigenschaft besitzt die ABC-Methode eine hohe Sensitivität für den Nachweis von Bindungen zwischen Antikörpern und entsprechenden Antigenstrukturen und wird bei Gewebeschnitten und Zellpräparationen verwandt. Zur Entwicklung der Farbreaktion wird das chromogene Substrat 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) zusammen mit PBS und H_2O_2 hinzugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Spülen in PBS werden die Schnitte in Mounting-Solution eingelegt, welche gelöste Gelatine enthält. Zum Schluss werden die einzelnen Schnitte auf Objektträger aufgezogen, an Raumluft getrocknet, in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe und in Xylol dehydriert und schließlich in Roti-Histokitt eingedeckt [40].

Abb. 4: Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Streptavidin-Biotin Komplexreaktion



2.2.4.3 Fos-Kontrollen

Zur Überprüfung der korrekten Durchführung der immunohistochemischen Färbung wurden Positivkontrollen durchgeführt. Dazu wurden Gehirnschnitte von einem mit Cholecystinin (CCK) vorbehandelten

Versuchstier angefertigt und zu den Probenschnitten mitgeführt. Die systemische Gabe von CCK (8 µg CCK intraperitoneal) führt zu einer schnellen Fos-Expression im Hirnstamm der Ratte [26, 80]. Als positiv wurden nur diejenigen Präparate erachtet, bei denen sich in der lichtmikroskopischen Betrachtung die für die Fos-Expression charakteristischen dunkelbraunen Reaktionsprodukte in den Zellkernen des Hirnstamms nachweisen liessen.

2.2.5 Limulus Amoebocyte Lysate Chromogenic Endpoint Assay

Mit diesem Assay kann die LPS-Konzentration im Serum bestimmt werden. Der Test beruht darauf, dass Lipopolysaccharide mit Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) eine Reaktion eingehen und im weiteren Testverlauf unter Gabe eines Chromophores zur Bildung eines gelben Produktes führen, dessen Extinktion spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen werden kann [42, 96]. Der Test hat eine Detektionsgenauigkeit von $1,4 \text{ pg ml}^{-1}$ und erlaubt die Bestimmung der LPS-Konzentration im Serum in einer Messbreite von 1 bis 1000 pg ml^{-1} . Da dieser Test ein semiquantitativer Assay ist, wird zunächst eine Standardkurve erstellt, die zur Überprüfung doppelt angefertigt wird. Anhand des Kurvenverlaufes kann bei gegebener Extinktion die Serum-LPS Konzentration über ein Analysegerät errechnet werden [54].

2.2.5.1 Zusammensetzung des Kits

Der vorgefertigte Kit besteht aus:

- Mikrotiterplatten (endotoxinfrei)
- lyophilisiertem Standard von *Escherichia coli* (Menge: 10 ng)
- lyophilisiertem LAL-Reagenz
- endotoxinfreiem Wasser
- 2.5fach konzentrierter Stopplösung (11 ml), bestehend aus 50%iger Essigsäurelösung

2.2.5.2 Vorbereitungen für den LAL-Endpoint Assay

Es werden nur endotoxinfreie Materialien verwendet. Zur besseren Übersichtlichkeit wird schriftlich ein Pipettierschema der Mikrotiterplatte angefertigt, wie in Abb. 6 dargestellt. Die anfangs im Kühlschrank gehaltenen Mikrotiterplatten werden zur Verhinderung der Bildung von Kondensflüssigkeit erst nach Erreichen der Raumtemperatur geöffnet. Die Rekonstitution des Standardlösung und des LAL-Reagenzes werden unter 2.2.5.3 dargestellt. Die gefrorenen Serumproben werden langsam auf Raumtemperatur gebracht. Da die Reaktion zwischen LAL-Reagenz und Endotoxin pH-abhängig (zwischen pH 6.5-8.0) ist, wird der pH-Wert der einzelnen Proben bestimmt und gegebenenfalls mit TRIS-Puffer angepasst. Da Serumproben endotoxinbeeinflussende Substanzen, wie z.B. Proteine enthalten, erfolgt die Inkubation für 5 Minuten bei 75 ° C im Wasserbad, um diese zu denaturieren [54].

Abb. 5: Schematische Darstellung der LPS-Struktur

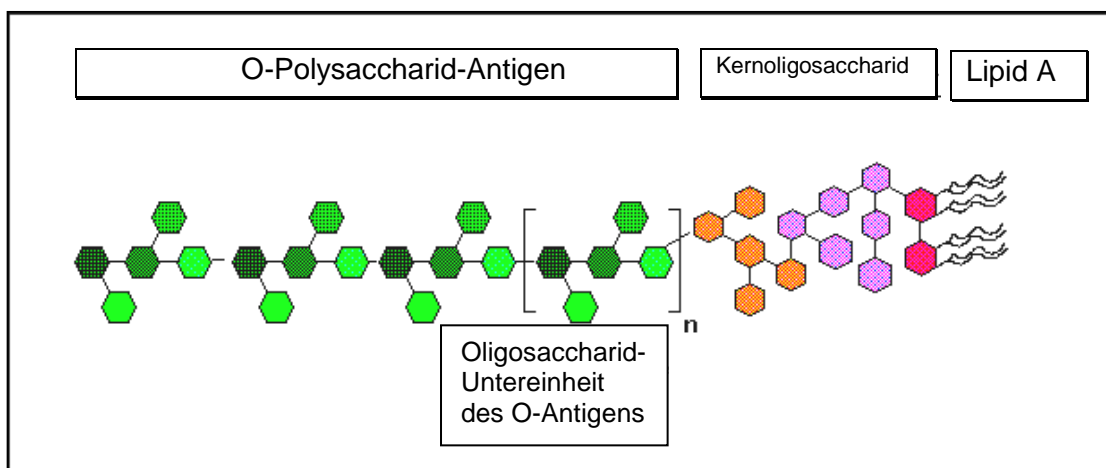
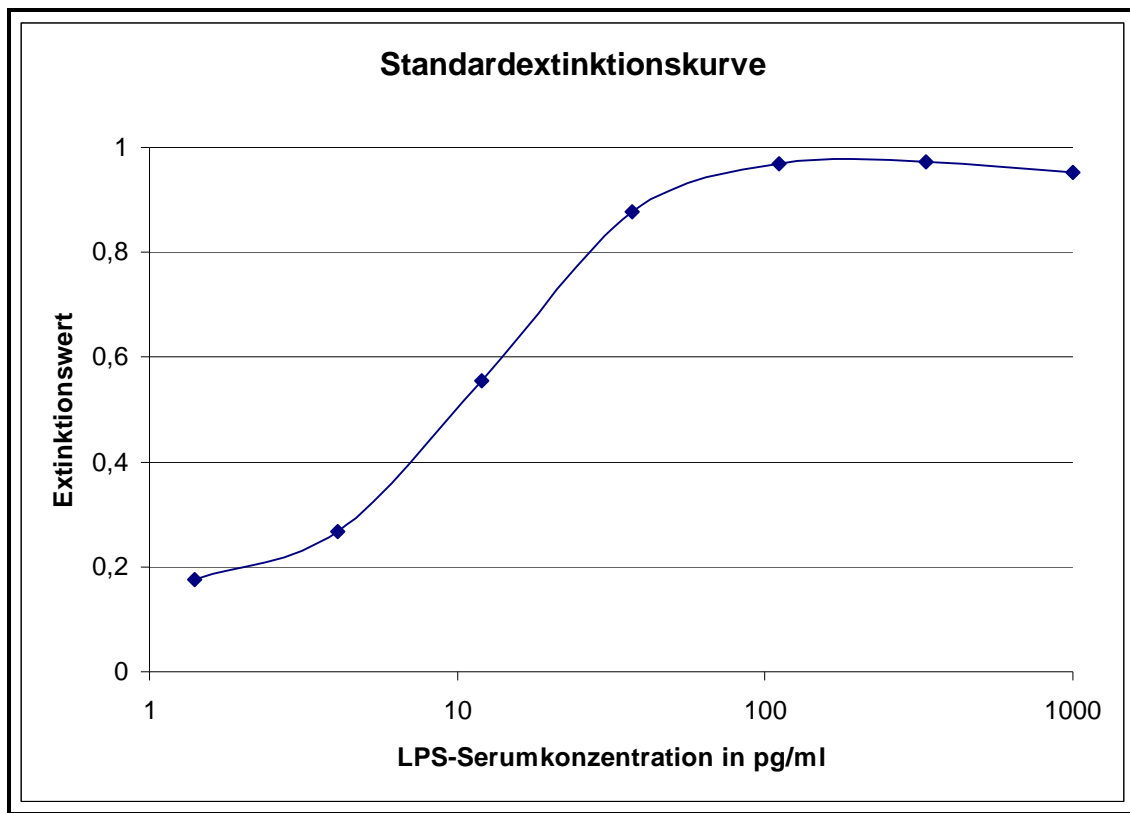


Abb. 6: Standardextinktionskurve des LAL Chromogenic Endpoint Assay



2.2.5.3 Procedere zur Bestimmung der Probenkonzentration

Es werden 50 μ l jeder aufgearbeiteten Serumprobe in doppelter Bestimmung auf die Platte aufpipettiert unter Benutzung einer eigenen sauberen Pipettenspitze pro Probe. Die Rekonstitution des LAL-Reagenzes erfolgt durch Gabe von 4 ml EFW. Zur Rekonstitution der Standardlösung werden 1.1 ml EFW verwandt. Die vorgefertigte Stopplösung wird in 15 ml destilliertem Wasser gelöst. Als nächstes werden 50 μ l des rekonstituierten LAL Reagenzes zu jeder Probe/Kontrolle hinzugegeben und nach dem dem Kit beigelegten Verdünnungsprotokoll vorgegangen. Bei der Kontrollreihe wird statt dem LAL-Reagenz endotoxinfreies Wasser verwandt. Nach Inkubation der Platte bei Raumtemperatur für 30-45 Minuten wird im Anschluss die Reaktion durch die Gabe von 50 μ l Stopplösung beendet unter Beibehaltung des

zeitlichen Abstands und der Reihenfolge des ursprünglichen Pipettierschemas. Die Mikrotiterplatte wird nun kurz vorsichtig geschüttelt, um eventuell bei der Inkubation entstandene Gasbläschen herauszulösen. Im Anschluss daran erfolgt die spektrophotometrische Messung der Extinktion der einzelnen Proben bei 405 nm.

Die sich daraus ergebenden Werte werden unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors in die Einheit pg ml^{-1} umgerechnet [54].

Abb. 7: Pipettierschema Mikrotiterplatte mit 96 Wells

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	P1	P1	P9	P9	P17	P17	P25	P25	K1	K1
B	S2	S2	P2	P2	P10	P10	P18	P18	P26	P26	K2	K2
C	S3	S3	P3	P3	P11	P11	P19	P19	P27	P27	K3	K3
D	S4	S4	P4	P4	P12	P12	P20	P20	P28	P28	K4	K4
E	S5	S5	P5	P5	P13	P13	P21	P21	P29	P29	K5	K5
F	S6	S6	P6	P6	P14	P14	P22	P22	P30	P30	K6	K6
G	S7	S7	P7	P7	P15	P15	P23	P23	P31	P31	K7	K7
H	S8	S8	P8	P8	P16	P16	P24	P24	P32	P32	K8	K8

(S= Standard, P= Probe, K= Kontrolle)

2.2.6 Übersicht Versuchsgruppen

1a) Intraejunale Lipopolysaccharidgabe (LPS)

1b) Intraejunale Kontrolle (Trägerlösung für LPS: NaCl 0.9%)

2a) Systemische LPS-Gabe

2b) Systemische LPS-Gabe nach Vorbehandlung mit Naproxen

2c) Systemische LPS-Gabe nach Vorbehandlung mit Aminoguanidin

2d) Systemische Kontrolle (Trägerlösung für LPS: NaCl 0.9%)

LPS-Bestimmungen im Serum erfolgten bei folgenden Gruppen:

- 1a) Intrajejunale LPS-Gabe
- 1b) Intrajejunale Kontrolle
- 2a) Systemische LPS-Gabe
- 2d) Systemische Kontrolle

2.3 Auswertung der Präparate

Die Auswertung wurde blind durchgeführt, das heisst in Unkenntnis der Versuchsgruppe, aus der das Präparat stammte. Zur Auszählung der Fos-positiven Zellen wurde das Bildanalysegerät Quantimet Q550 verwendet. Es besteht aus einer Bildanalysesoftware und den zugehörigen Hardwarekomponenten. Die exakte anatomische Identifizierung des NTS und der AP wurde anhand stereotaktischer Atlanten ermittelt [74]. Die Auswertung des NTS erfolgte in beiden Hemisphären auf Höhe 13.3 mm, 13.8 mm und 14.3 mm kaudal des Bregma. Die AP wurde auf Höhe 13.8 mm kaudal des Bregma ausgewertet. Als Bregma bezeichnet man anatomisch den Schnittpunkt der Sagittalnaht der Schädelkalotte mit der Kranznaht. Die Auszählung der Fos-positiven Zellen erfolgte durch ein Zählprogramm. Dieses detektiert die positiven dunkelbraun gefärbten Zellkerne der Fos-Färbung aufgrund ihrer Dichte und Größe und ermöglicht somit die Unterscheidung von der Hintergrundfärbung. Zur Überprüfung wurden die auf diese Weise ermittelten Daten exemplarisch an einzelnen Schnitten manuell ausgezählt. Es wurde jede Höhe des NTS an mehreren Schnittflächen pro Präparat ausgezählt und durch die Anzahl der ausgezählten Schnittflächen geteilt, um so ein repräsentatives Ergebnis für jede ausgewertete Höhe zu erhalten. Anschließend wurde die Summe der Fos-positiven Zellen aus den Einzelwerten der drei definierten Höhen gebildet und der dazugehörige statistische Mittelwert pro Höhe berechnet.

2.4 Statistik

Aus den Rohdaten erfolgte die statistische Testung mittels One-Way ANOVA und nachfolgendem Student-Newman-Keuls Vergleich. Waren die Rohdaten der Fos-Immunohistochemie nicht normal verteilt, erfolgte zunächst eine Umwandlung in eine Normalverteilung, in dem aus den Rohdaten der \log_{10} berechnet wurde. Als signifikanter Unterschied wurde ein $p < 0.05$ akzeptiert. Für die Auswertung des Assays wurde das identische Verfahren angewandt.

2.5 Materialien

2.5.1 Substanzen

E.coli - Lipopolysaccharid (0111:B4)	Sigma Aldrich Laborchemikalien
Aminoguanidin	GmbH
Naproxen	Wunstorferstrasse 40
Diethylether zur Narkose	D-30926 Seelze
C-fos rabbit polyclonal serum (Primärantikörper)	Oncogene Research Produkts 84, Rogers Street Cambridge, MA 02142, USA
Ziegenserum (Goat-Serum)	Dako Diagnostica GmbH Postfach 70 04 07 D-22004 Hamburg

Goat Anti-rabbit IgG (Sekundärantikörper)	DIANOVA GmbH Mittelweg 176 D-20148 Hamburg
Vectastain ABC-Peroxidasekit	Vector Medical Technologies Inc. Boca Raton, FL, USA (bezogen über: Linaris Hotelstrasse 11 97877 Wertheim)
Isoton. NaCl-Lösung Delta Select (zur i.v. Infusion Na 154)	Delta Select GmbH Benzstrasse 5 D-72793 Pfullingen
Fount India Black Ink	Pelikan GmbH Werftstrasse 9 D-30001 Hannover

2.5.2 Lösungen

Paraformaldehyd 4%, pH 7.4

Aqua dest.	1000 ml
Paraformaldehyd	80 g
NaOH	0.5 ml
0.5 M PBS	400 ml
Aqua dest.	Auffüllen bis 2 l

Sucrose 25 %

Aqua dest.	300 ml
0.5 M PBS	200 ml
Sucrose	250 g
Aqua dest.	Auffüllen auf 1 l

PBS (phosphat-buffered solution,
10-fach konzentrierte Stammlösung)

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	11.5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Aqua dest.	auf 1 l, pH 7.4

Mounting-solution

Gelatine	0.1 g
Ethanol	40 ml
Aqua dest.	60 ml

Verdünnungspuffer

PBS	0.1 M
Triton x-100	0.5 %

2.5.3 Labormaterialien und Geräte

Polyethylenkatheter ID 0.5 mm	Clay-Adams & Associates Inc. 54, Ferncliff Drive Asheville, NC 28850, USA
-------------------------------	---

Nahtmaterial	Ethicon GmbH und Co.KG Rober-Koch Strasse 1 D-22851 Norderstedt
Bildanalysesystem Quantimet Q550	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Lilienthalstrasse 39-45 D-64625 Bensheim
Milenia Kinetic EIA Analyser	Diagnostic Products Corporation 5210, Pacific Concourse Drive Los Angeles, CA 90045-6900, USA
Softmax (Software for Maxline Microplate Readers)	Molecular Devices Corp. 1311, Orleans Dr. Sunnyvale, CA 94089, USA
Wistar-Ratten (männlich, 300-400 g)	Harlan Winkelmann Gartenstrasse 27 D-33178 Borcheln
Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Chromogenic Endpoint Assay	HyCult Biotechnology b.v Frontstraat 2A 5405 PB Uden, Niederlande
Microlance 3 Einmalkanülen 3 0,55mal 25 Ref.304100	Becton Dickinson GmbH Tullastrasse 8-12 D-6900 Heidelberg

30 m Portex Non sterile polyethylene tubing(Polyethylenkatheter) 0.5 mm ID, 1.0 mm OD Ref. 800/110/160	Smiths Medical Deutschland GmbH Hauptstrasse 45-47 D-85614 Kirchseeon
Wattestäbchen (Ref. 825120)	MSP Schmeisser GmbH Siemensstrasse 14 D-72160 Horb
Ethicon Prolene 6-0 Ethicon Vicryl 3-0, violett geflochten 1/2c Nadel	Manufacturer Johnson & Johnson Intl. C/o European Logistics Centre Lenneke Marelaan, 6 BE-1932 St.Stevens-Woluwe
1 ml/5 ml/10 ml/20 ml Einmalspritzen Sterican Gr.20 0.4x20, BLIBB, 27G x 3/4	B.Braun Melsungen AG Carl-Braun Strasse 1 D-34212 Melsungen
Vaseline, weiss EuAB	Bombastus-Werke AG Wilsdrufferstrasse 170 D-01705 Freital
Sempermed Supreme, Surgical Gloves	Semperit Technische Produkte GmbH Modecenterstrasse 22 A-1031 Wien
Surgilene 7/0, USP, 0.5 mm, blau, Polypropylenfaden, 2xDRT 10	B.Braun GmbH Carl-Braun Strasse 1 D-34212 Melsungen

Leukoplast Hospital Pflaster

BDF Beiersdorf S.A.

Carretera de Mataró a Granollers

E-08310 Argentosa, Spanien

Cryo Vials, steril

Greiner Bio-One GmbH

Eppendorf Cups

Maybachstrasse 2

D-72636 Frickenhausen

Gazin Mullkompressen 10x10 cm,
12fach

Lohmann & Rauscher GmbH

Westerwaldstrasse 4

D-56579 Rengsdorf

3. Ergebnisse

3.1 Fos-positive Zellen im NTS nach intrajejunaler Applikation von LPS versus Kontrollen

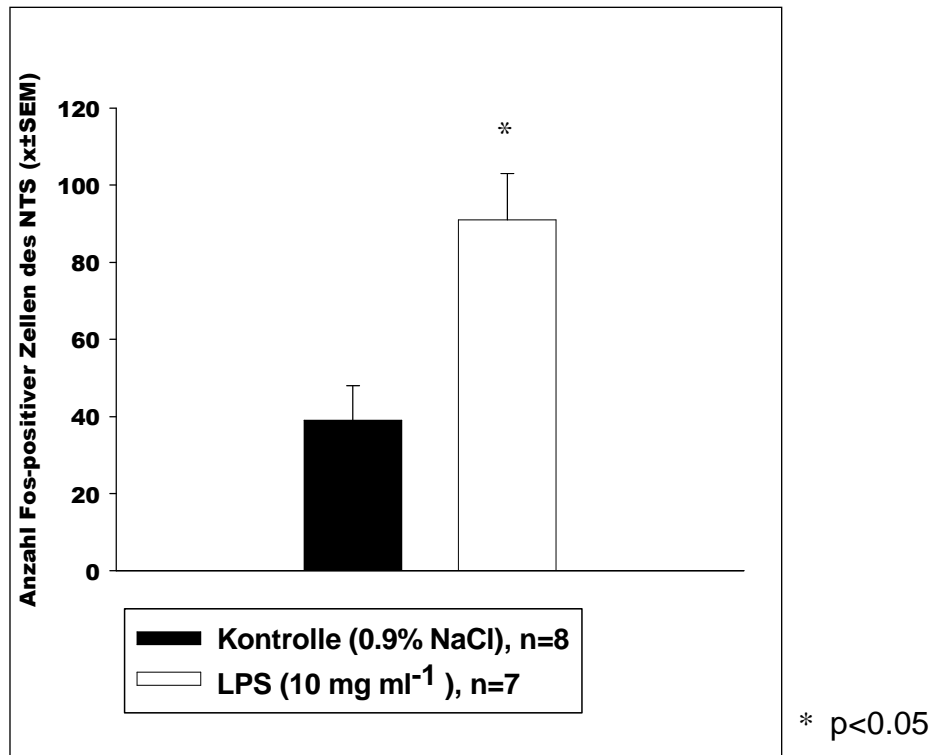
Die Gabe von intrajejunal appliziertem LPS führte zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen auf 91 ± 12 (n=7) im Vergleich zur Kontrolle (Trägerlösung: 0.9% NaCl) mit 39 ± 9 (n=8) in den drei definierten Schnittebenen des NTS auf Höhe 13.3 mm, 13.8 mm und 14.3 mm kaudal des Bregma ($p < 0.05$). Es gab keinen Unterschied in der Anzahl Fos-positiver Zellen zwischen linker und rechter Hemisphäre. Die größte Anzahl Fos-positiver Zellen fand sich in der Schnittebene 14.3 mm. Die wenigsten Zellen fanden sich hingegen in der Schnittebene 13.3 mm kaudal des Bregma (s. Tab. 1).

Tabelle 1: Summe der Fos-positiven Zellen in den drei definierten Schnittebenen des NTS bei intrajejunaler LPS-Gabe (Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwerts = SEM)

Schnittebenen im NTS	Intrajejunale Kontrolle	Intrajejunale LPS-Gabe
▪ 13.3 mm	7.9 ± 1.9	23.1 ± 5.0
▪ 13.8 mm	12.1 ± 2.6	32.1 ± 4.4
▪ 14.3 mm	18.5 ± 4.7	35.4 ± 3.5
Summe	39 ± 9	91 ± 12 *

* $p < 0.05$

Abb. 8: Fos-positive Zellen im NTS nach intrajejunaler LPS-Applikation



3.2 Fos-positive Zellen im NTS nach systemischer Applikation von Rezeptorantagonisten versus Kontrollen

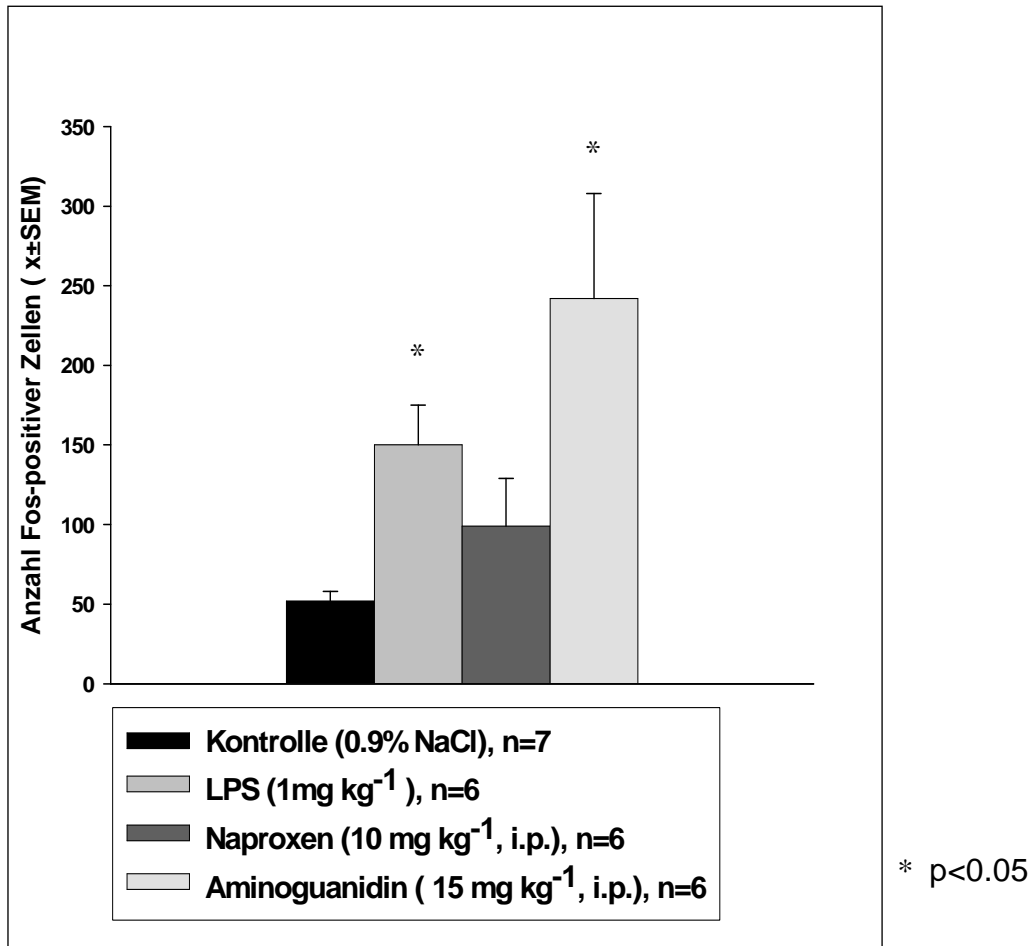
Die systemische LPS-Gabe führte zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen auf 150 ± 25 ($n=6$) im Vergleich zur Kontrollsubstanz mit 52 ± 6 ($n=7$; $p<0.05$). Nach Vorbehandlung mit dem Cyclooxygenasehemmer Naproxen in einer Konzentration 10 mg kg^{-1} Körpergewicht (KG) kam es im Vergleich zur LPS-Gabe zu keiner signifikanten Abnahme ($p>0.05$) der Anzahl Fos-positiver Zellen (99 ± 30 ; $n=6$). Nach Vorbehandlung mit dem Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase Aminoguanidin in einer Konzentration von 15 mg kg^{-1} KG betrug die Anzahl Fos positiver Zellen 242 ± 66 ($n=6$; $p<0.05$).

Tabelle 2: Summe der Fos-positiven Zellen in den drei definierten Schnittebenen des NTS bei systemischer LPS-Gabe und Pharmakologie (Mittelwert \pm SEM)

Schnittebenen im NTS	Systemische Kontrolle	Systemische LPS-Gabe	LPS-Gabe nach Naproxen	LPS-Gabe nach Aminoguanidin
▪ 13.3 mm	11.6 \pm 2.3	41.8 \pm 11.2	38.0 \pm 13.7	80.0 \pm 21.4
▪ 13.8 mm	13.3 \pm 2.3	54.0 \pm 11.0	32.2 \pm 9.6	90.8 \pm 25.4
▪ 14.3 mm	27.1 \pm 3.8	46.2 \pm 8.9	29.0 \pm 7.4	73.8 \pm 19
Summe	52 \pm 6	150 \pm 25 *	99 \pm 30	242 \pm 66 *

* $p < 0.05$

Abb. 9: Fos-positive Zellen im NTS nach systemischer LPS-Applikation



3.3 Fos-positive Zellen in der Area postrema nach intrajejunaler und systemischer LPS-Gabe

Die Area postrema, welche sich nach dorsal auf Höhe von 13.8 mm kaudal des Bregma an den NTS anschließt, wurde ebenso ausgewertet. Der Vergleich der Anzahl Fos-positiver Zellen nach intrajejunaler Gabe von LPS mit den entsprechenden Kontrollen zeigte, dass es nach intrajejunaler LPS-Gabe zu keiner Zunahme der Aktivierung kam (26.6 ± 4.5 , $n=7$ versus 16 ± 3.0 , $n=7$, $p>0.05$). Hingegen kam es nach systemischer LPS-Gabe zu einer Zunahme der

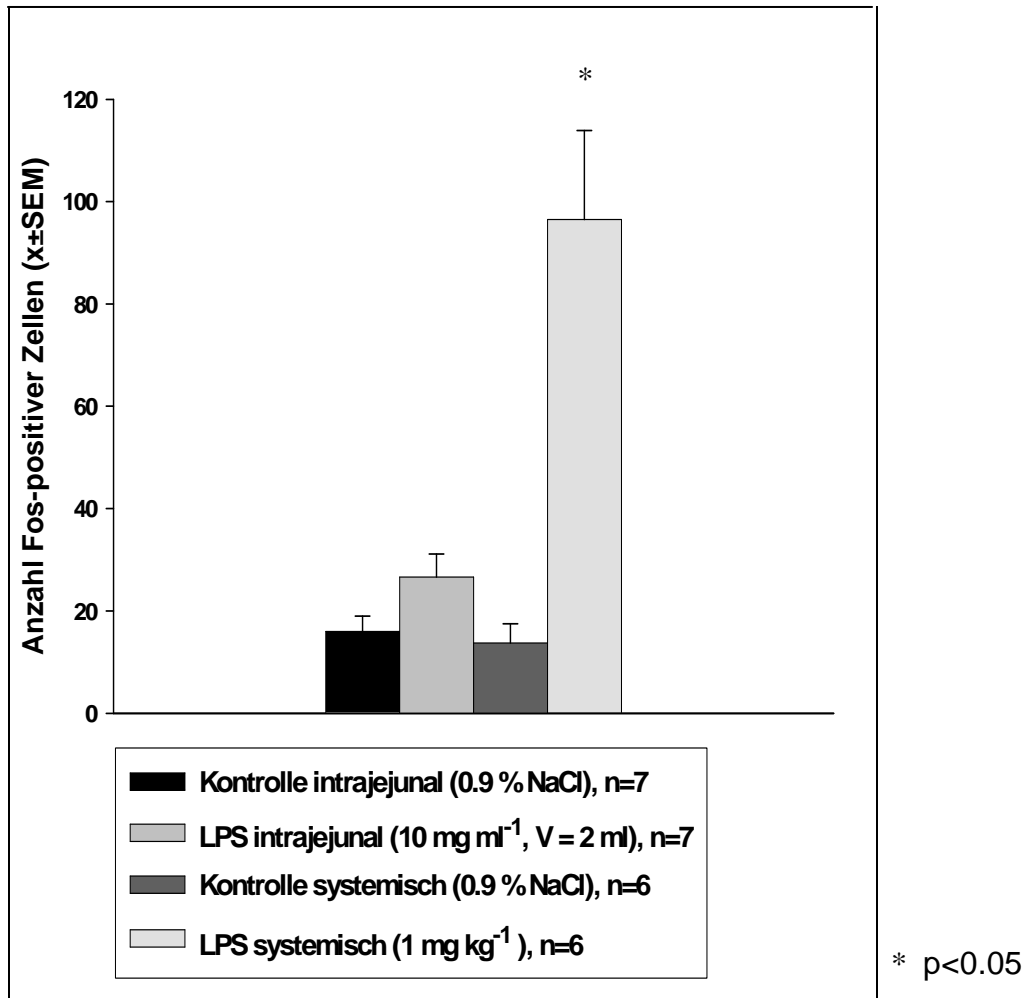
Anzahl auf 96.5 ± 17.4 (n=6) im Vergleich zur Kontrolle mit 13.7 ± 3.8 (n=6, $p < 0.05$).

Tabelle 3: Anzahl Fos-positiver Zellen in der Area postrema bei intrajejunaler und systemischer LPS-Gabe (Mittelwert \pm SEM)

Area postrema	Intrajejunale Kontrolle	Intrajejunale LPS-Gabe	Systemische Kontrolle	Systemische LPS-Gabe
▪ 13.8 mm	16 ± 3.0	26.6 ± 4.5	13.7 ± 3.8	96.5 ± 17.4 *

* $p < 0.05$

Abb. 10: Fos-positive Zellen in der Area postrema



3.4 Ergebnisse der Serum-LPS Messung mit LAL Chromogenic Endpoint Assay

Nach intrajejunaler LPS-Gabe kam es zu keiner signifikanten Zunahme der LPS-Konzentration im Serum ($68 \pm 42 \text{ pg ml}^{-1}$; $n=5$) im Vergleich zur Kontrollsubstanz mit 34 ± 8 ($n=9$, $p>0.05$). Nach systemischer LPS-Gabe war eine Zunahme der Serum-Konzentration von LPS auf $492810 \pm 207162 \text{ pg ml}^{-1}$ ($n=6$) im Vergleich zur Kontrolle mit $34 \pm 9 \text{ pg ml}^{-1}$ ($n=7$, $p<0.05$) zu beobachten.

Tabelle 4: Serum-LPS Konzentration in pg ml^{-1}

Serum-LPS Konz.	Intrajejunale Kontrolle	Intrajejunale LPS-Gabe	Systemische Kontrolle	Systemische LPS-Gabe
in pg ml^{-1}	34 ± 8	68 ± 42	34 ± 9	$492810 \pm 207162 *$

* $p < 0.05$

Abb. 11: Ergebnisse der Serum-LPS-Bestimmung

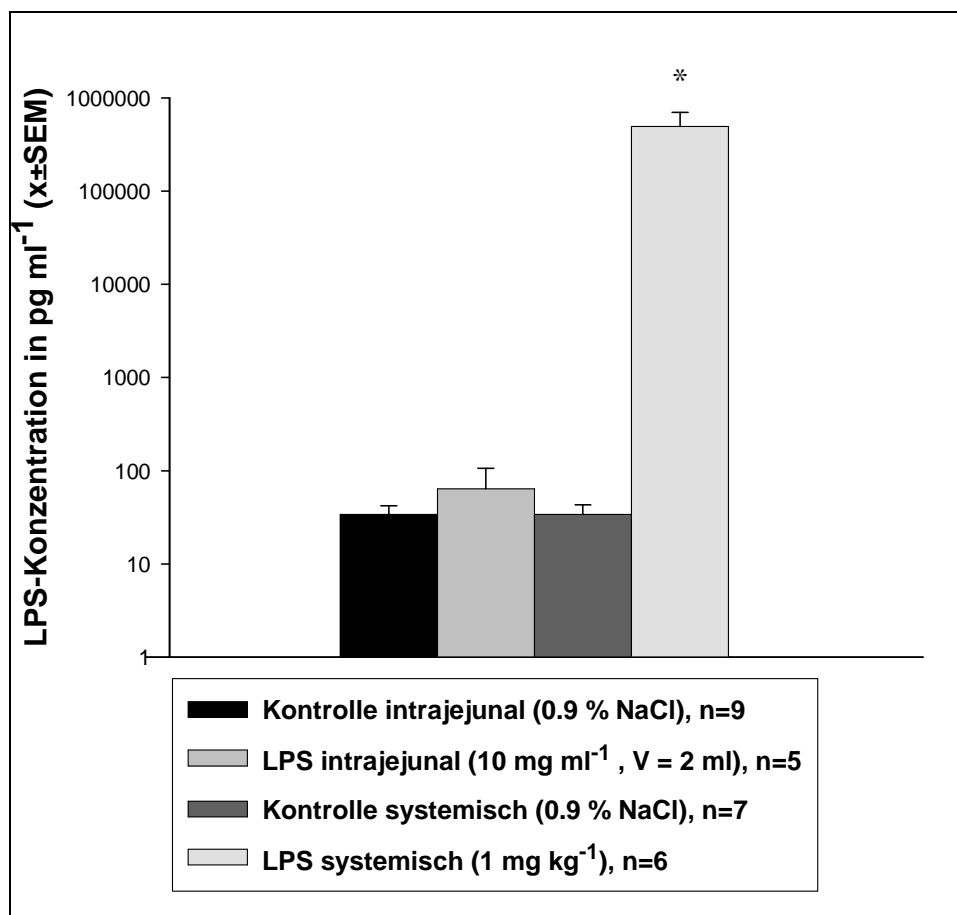
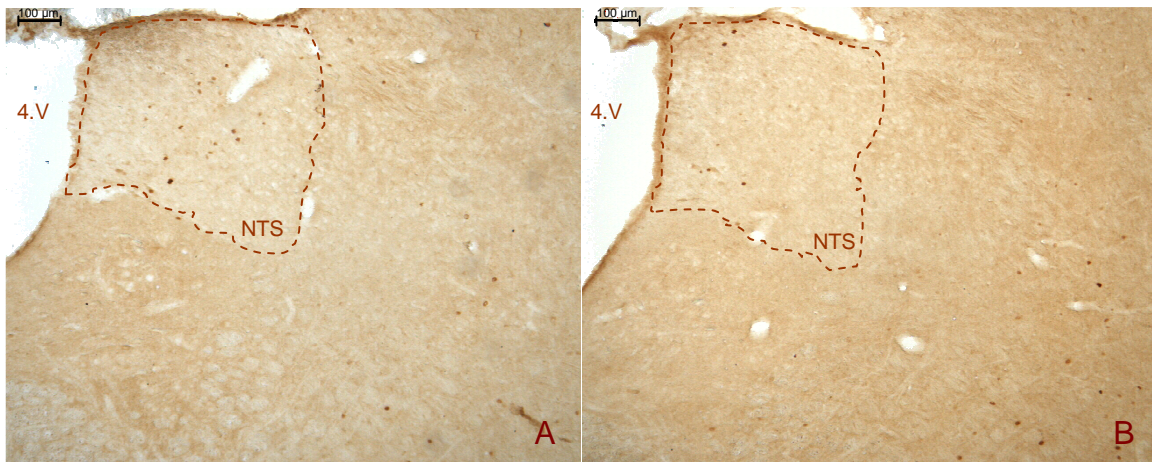
* $p < 0.05$

Abb. 12: Fos-Immunohistochemie bei **intrajejunaler** LPS-Gabe (A) versus Kontrolle (B) des NTS bei **13.3 mm** kaudal des Bregma



Abkürzungen:

4. V: 4.Ventrikel

NTS: Nucleus tractus solitarius

Abb. 13: Fos-Immunohistochemie bei **systemischer** LPS-Gabe (A) und Kontrolle (B) des NTS bei **13.3 mm** kaudal des Bregma

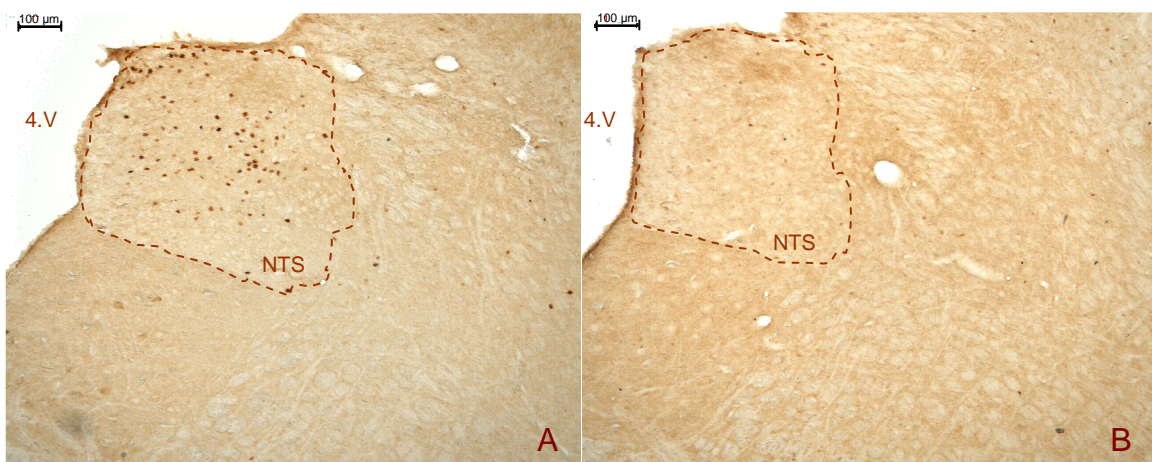
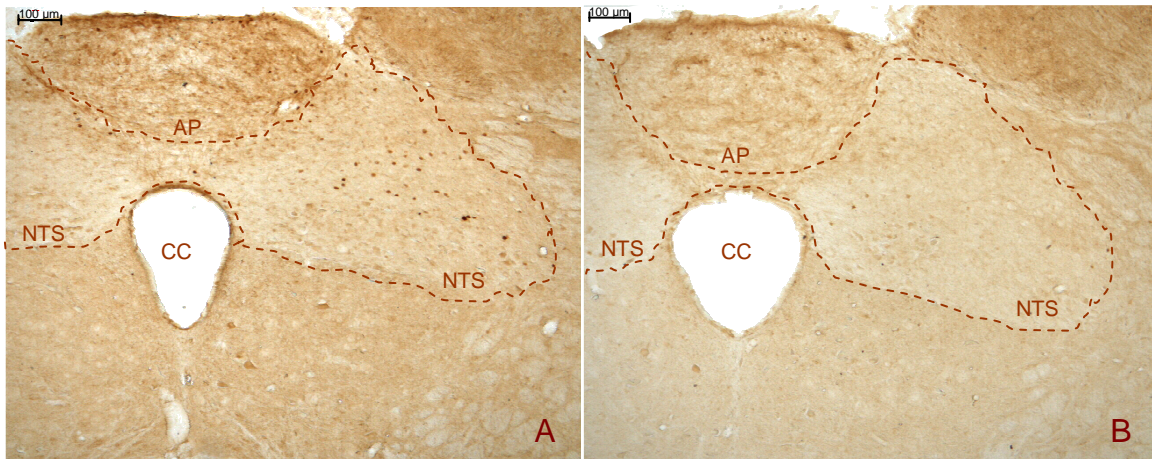


Abb. 14: Fos-Immunohistochemie bei **intrajejunaler** LPS-Gabe (A) und Kontrolle (B) des NTS bei **13.8 mm** kaudal des Bregma und Area postrema



Abkürzungen:

CC: Zentralkanal

NTS: Nucleus Tractus Solitarius

AP: Area postrema

Abb. 15: Fos-Immunohistochemie bei **systemischer** LPS-Gabe (A) versus Kontrolle (B) des NTS bei **13.8 mm** kaudal des Bregma und Area postrema

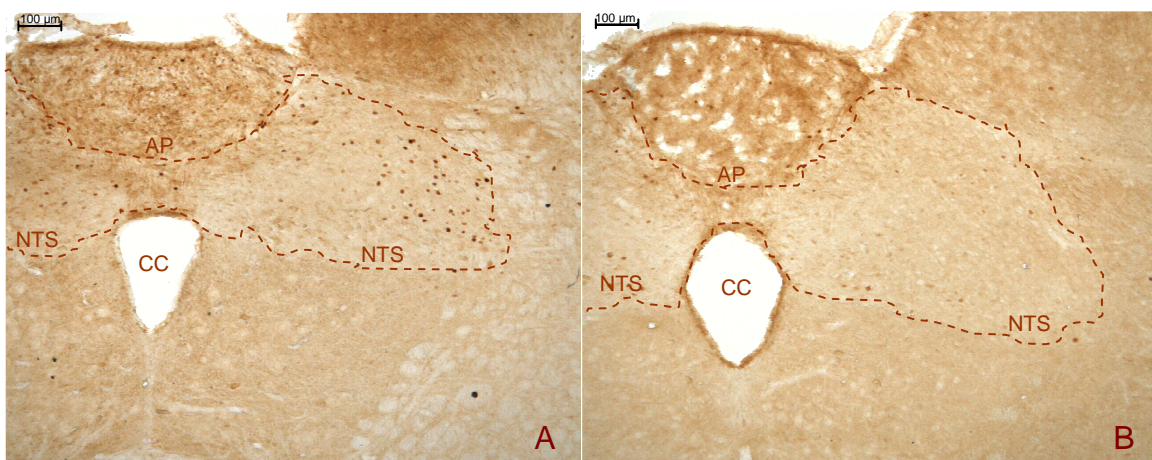
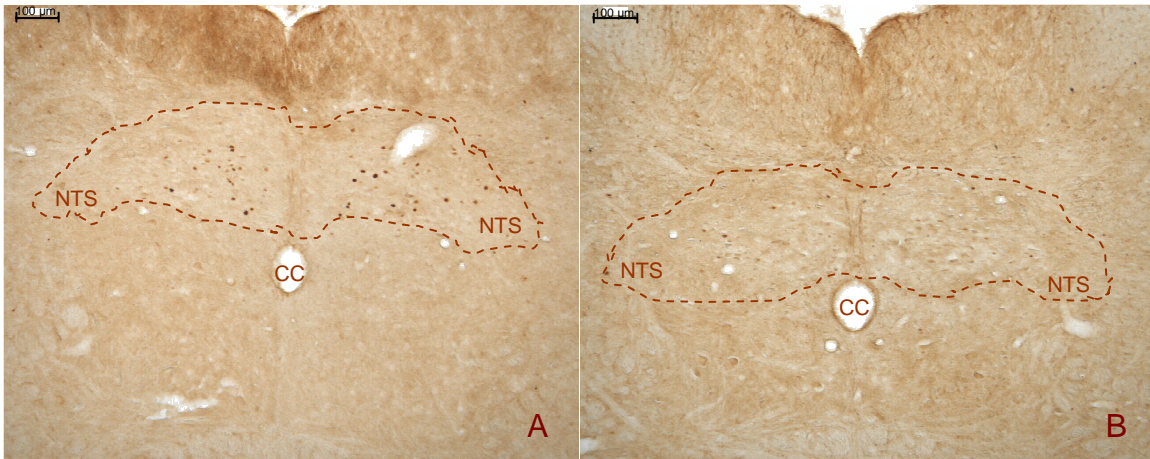


Abb. 16: Fos-Immunohistochemie bei **intrajejunaler** LPS-Gabe (A) versus Kontrolle (B) bei **14.3 mm** kaudal des Bregma

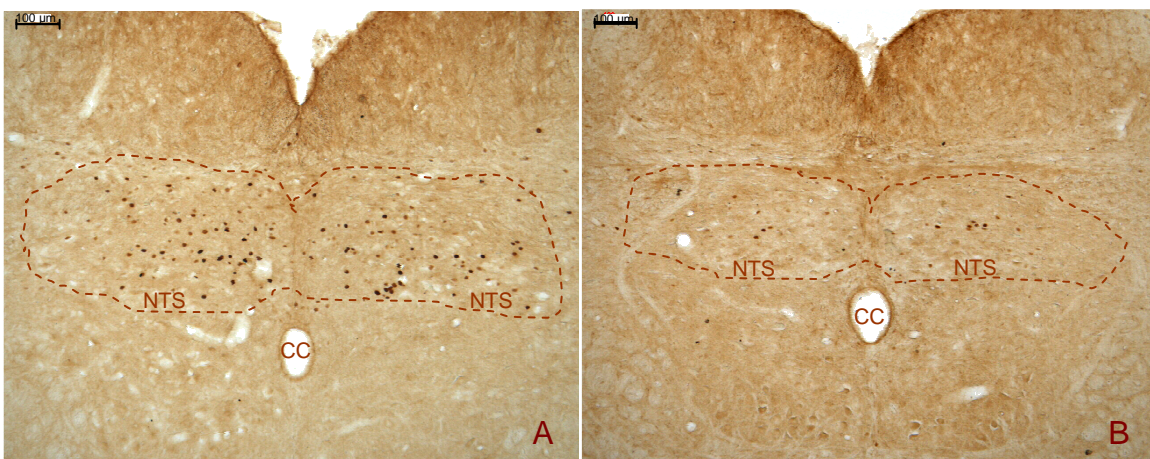


Abkürzungen:

CC: Zentralkanal

NTS: Nucleus tractus solitarius

Abb. 17: Fos-Immunohistochemie bei **systemischer** LPS-Gabe (A) versus Kontrolle (B) des NTS bei **14.3 mm** kaudal des Bregma



4. Diskussion

4.1 Material und Methoden

Die Studie hatte zum Ziel die Wirkung bakterieller Lipopolysaccharide auf die neuronale Aktivität in Strukturen des Hirnstammes zu untersuchen. Des Weiteren sollten Korrelationen zwischen der LPS-Serumkonzentration und den Ergebnissen der Fos-Immunohistochemie aufgezeigt werden.

Aus diesen Zielen ergibt sich, dass folgende Anforderungen an die Versuchstiere erfüllt sein müssen:

1. Die zu untersuchenden anatomischen Strukturen des Hirnstammes sollten sowohl in Aufbau und Lage als auch in ihren zellulären Eigenschaften weitestgehend mit denen des Menschen vergleichbar sein.
2. Der Verdauungstrakt muss hinsichtlich Aufbau und Physiologie dem des Menschen ähneln.

Diese Voraussetzungen können bei den verwendeten männlichen Wistar-Ratten als weitestgehend erfüllt angesehen werden. Zudem ist die Fos-Immunohistochemie eine im Tiermodell zur Anwendung kommende Methode und eine primär nicht bei menschlichem Gewebe eingesetzte Technik.

Die Implantation des Jejunalkatheters erfolgte distal der Flexura duodenojejunalis. Zur Überprüfung der Dichtigkeit der Eintrittsstelle in den Darm erfolgte nach Versuchsabschluss die Gabe der nicht-resorbierbaren Tintenfarbe Indian Ink [4]. Wurde ein Austritt von Tintenfarbe in die Bauchhöhle festgestellt, so wurde der Versuch an dieser Stelle beendet. Es bleibt aber bei dieser

Versuchsanordnung jedoch unklar, wie weit die intraluminal verabreichten Substanzen nach distal weitertransportiert werden, so dass über den genauen Wirkungsort keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. Allerdings ist anzunehmen, dass in den proximalen Dünndarmabschnitten am ehesten ein Effekt der intrajejunalen LPS-Gabe zu erwarten ist [13]. Eine Alternative zu diesem OP-Verfahren stellt die sogenannte „thiry-vella loop“-Technik dar, bei der der proximale Teil der Dünndarmschlinge blind verschlossen wird und das distale Ende in die Haut des Tieres eingepflanzt wird. Zwar bietet dieses Verfahren den Vorteil, dass eine genauere Aussage über den Ort der Resorption getroffen werden kann. Allerdings wurde dieses Verfahren aufgrund der in der Literatur teilweise beschriebenen inakzeptabel hohen Mortalitätsrate der Tiere nicht verwandt [93].

Da nach jeder Manipulation des Darms eine Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen im NTS induziert werden kann, wurde eine Zeitspanne von 4 Tagen zwischen Implantation des Jejunalkatheters und dem Abschlussexperiment gewählt [8]. Ebenso wurde im Rattenmodell gezeigt, dass Stressfaktoren, wie formalin-induzierter Schmerz der Haut, zu einer Aktivierung von Neuronen im NTS führen können [70]. Deshalb wurde während der Durchführung der Versuche grösster Wert darauf gelegt, dass die Tiere einem möglichst geringen Stress ausgesetzt waren.

Die Fos-Immunohistochemische Färbung wurde nach der Avidin-Biotin Komplex-Methode durchgeführt. Diese stellt unter den Immunperoxidaseverfahren eine der neueren Entwicklungen dar. Sie ermöglicht die Darstellung einer großen Vielzahl von Antigenen auf formalinfixierten Präparaten. Die ersten Arbeiten mit dieser Methode befassten sich hauptsächlich mit der Identifizierung von Hypophysenhormonen in normalem und neoplastischem Gewebe [11]. Außerdem können Markermoleküle an Zelloberflächen, virale Proteine oder auch Intermediärfilamente in Zellen

dargestellt werden. Es kann Avidin oder Streptavidin verwandt werden, wobei Streptavidin aus Streptokokken gewonnen wird und eine höhere Affinität als Avidin besitzt [76]. Nach Bindung des Primärantikörpers an das darzustellende Antigen erfolgt die Bindung des biotinylierten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper. Der Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex führt unter Gabe eines chromogenen Substrates zur Bildung eines farblichen Reaktionsproduktes, welches sich im Fall der positiven Fos-Färbung als dunkelbraunes Reaktionsprodukt des Zellkerns zeigt (s. Abb. 4). Das Glykoprotein Streptavidin besitzt eine hohe Affinität zum Vitamin Biotin mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-19} M. Es kann physikalisch 4 Biotinmoleküle binden und zeichnet sich damit im Vergleich zu direkten und indirekten Methoden der Antigendarstellung durch eine höhere Sensitivität aus [40].

Die Bestimmung der Serum-LPS Konzentration wurde mittels LAL Chromogenic Endpoint Assay durchgeführt. Diese Messmethode geht zurück auf Beobachtungen von Frederick Bang aus dem Jahre 1956. Danach vermag LPS im Lysat von *Limulus polyphemus*, einer amerikanischen Krabbenart, eine intravasale Koagulation auslösen. Der LAL-Test stellt eine weit verbreitete, semiquantitative Methode zur Bestimmung der LPS-Konzentration in menschlichen und tierischen Untersuchungsmaterialien dar. Beim LAL-Assay wird nach Gabe des LAL-Reagenzes und anschließender Gabe eines chromogenen Substrates eine Farbreaktion ausgelöst (s. Material und Methoden). Diese ergibt nach spektrophotometrischer Messung bei 405 nm und Vergleich mit einer Standardextinktionskurve die Konzentration von LPS im Untersuchungsmaterial. Da herkömmliche Untersuchungsmaterialien mit Lipopolysacchariden kontaminiert sein können, ist es erforderlich, spezielle endotoxinfreie Materialien zu verwenden. Ein weiterer wesentlicher Störfaktor dieser Assays stellen Proteine im Untersuchungsmaterial dar, die einen hemmenden Effekt auf die oben beschriebene Reaktion haben. Sie können durch vorheriges Erhitzen der Proben inaktiviert werden [1].

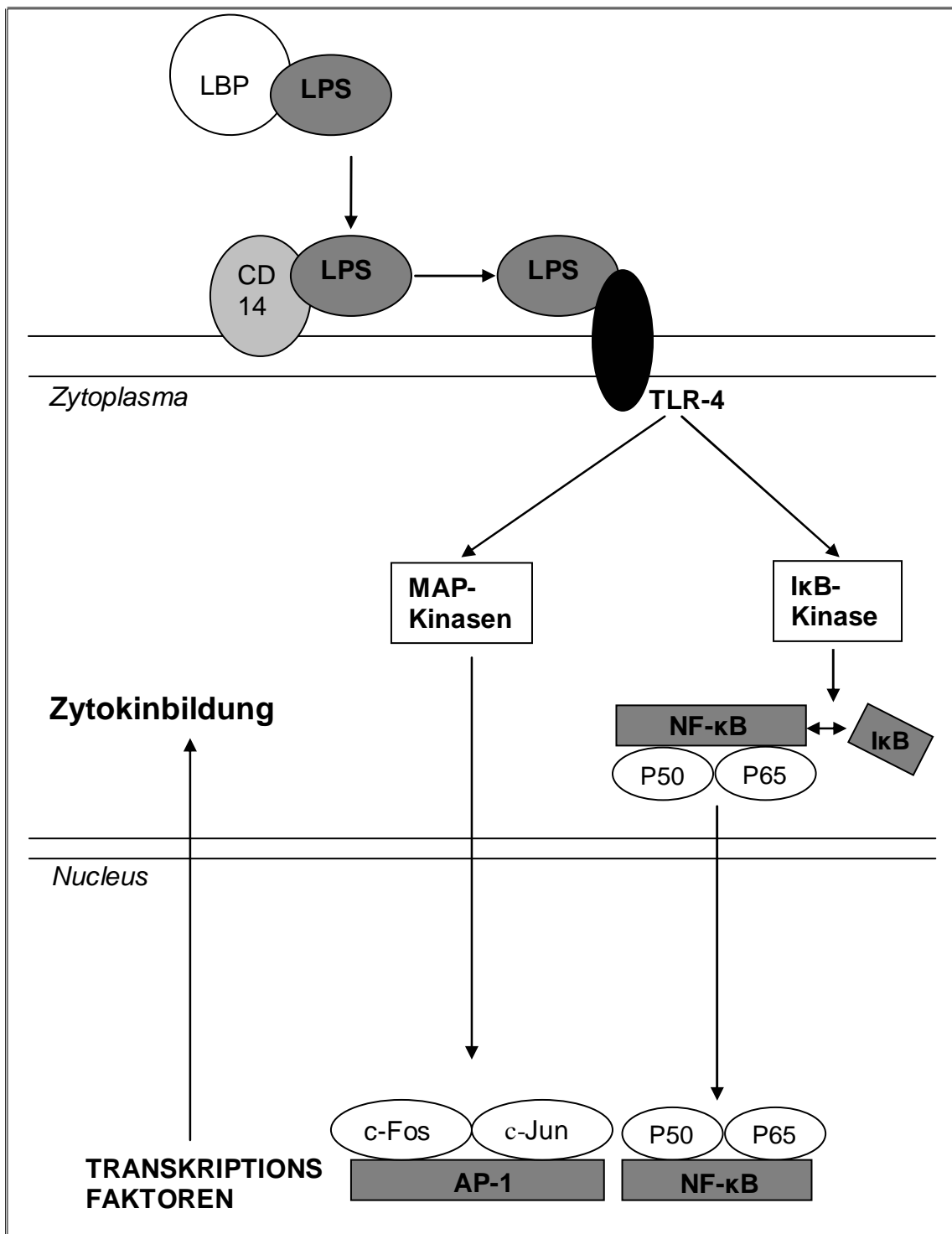
Zur Induktion einer Aktivierung von Neuronen wurde das Lipopolysaccharidmodell angewandt. Lipopolysacchride sind Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien. Ihre Freisetzung erfolgt nach Lyse der Zellwand des Bakteriums. Nach systemischer Gabe wird LPS im Plasma an das LPS-bindende Protein (LBP) gebunden. Monozyten sind in der Lage an LBP gebundene LPS-Moleküle über das CD14-Membranprotein zu detektieren. Dieser Komplex aktiviert das transmembranäre Protein TLR-4. In der Folge wird über eine intrazelluläre Signalkette, welche die Aktivierung des Nukleären Faktors- κ B (NF- κ B) und verschiedener mitogen-aktivierter Kinasen beinhaltet (MAP-K), eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren induziert, zu denen auch das c-Fos-Gen zählt. Sie regulieren im weiteren Verlauf die Bildung von Zytokinen [29]. Diese Beobachtungen auf molekularer Ebene werden auch durch tierexperimentelle Arbeiten von Hermann et al. unterstützt. Sie konnten zeigen, dass systemisch appliziertes LPS zur Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen im NTS und in der Area postrema im Rattenmodell führt [33].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Zeitraum von 180 Minuten nach intrajejunaler LPS-Gabe und Beendigung des Experiments gewählt. Bei den pharmakologischen Versuchen erfolgte die Gabe von Naproxen oder Aminoguanidin 30 Minuten vor LPS-Gabe. Diesbezüglich haben Mascarucci et al. zeigen können, dass nach intraperitonealer Gabe von LPS die Anzahl an Fos-positiven Zellen nach 2-3 Stunden am höchsten und eine Hemmung mit Aminoguanidin und Naproxen ungefähr 30 Minuten vor LPS-Gabe am effektivsten ist [57].

Das c-Fos Gen ist ein Transkriptionsfaktor, welcher zu den sogenannten „immediate-early genes“ zählt, die während eines akuten Entzündungsgeschehens aktiviert werden. Als Folge wird das 62000 Dalton schwere Fos-Protein gebildet, dessen Bildung sehr schnell, jedoch nur für kurze Zeit erfolgt. Das Fos-Protein bildet zusammen mit dem 39000 Dalton schweren

Jun-Protein einen dimeren Proteinkomplex. Dieser Komplex bindet mit hoher Affinität an die AP-1 Bindungsstelle der DNA, die für die Transkription von Proteinen für Zellwachstum und Zelldifferenzierung in Neuronen zuständig ist. Der Fos-Jun Proteinkomplex besitzt zwei für seine Funktion bedeutsame Bindungsstellen. Für die Bildung des Fos-Jun-Heterodimers ist die Leuzin-Zipper Proteindomäne zuständig, wohingegen die sogenannte Basisregion des Heterodimers für die Bindung an die AP-1 Bindungsstelle der DNA sorgt. In der Folge werden dann unter Ablauf einer Proteinkaskade Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und der Nukleäre Faktor- κ B (NF- κ B) aktiviert. NF- κ B stellt einen Transkriptionsfaktor dar, welcher nach vorheriger Aktivierung durch LPS eine Zytokinkaskade induzieren kann. Die Freisetzung einer Vielzahl von vasodilatatorisch wirksamen Zytokinen führt schlussendlich zum klinisch fassbaren Krankheitsbild des septischen Schocks [29].

Abb.18: Schema der intrazellulären Aktivierung von c-Fos nach LPS-Gabe



4.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach intrajejunaler Gabe von LPS im Rattenmodell zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen des NTS kommt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es nach intraluminaler Gabe von LPS zu keiner signifikanten Zunahme der Serum-LPS Konzentration kommt. Dies legt den Schluss nahe, dass die Aktivierung von Neuronen im NTS durch afferente Nervenfasern erfolgt, die von intraluminalem LPS im Darm stimuliert werden. Diese Hypothese wird auch durch die Daten aus der Auswertung der Area postrema unterstützt, die keine signifikante Zunahme der Fos-Aktivität nach luminaler LPS-Gabe zeigte. Die Area postrema ist eine dorsal des 4. Ventrikels gelegene Hirnregion, die keine effektive Blut-Hirn Schranke besitzt [86]. Dies bedeutet, dass Substanzen, wie Endotoxine, hier leicht von der Blutbahn in das ZNS gelangen können.

Weiterhin konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass systemisch appliziertes LPS zu einer Zunahme der Fos-Aktivität im NTS führt, welche auch in der Area postrema erfolgt. Gleichzeitig zeigte sich eine starke Zunahme der Serum-LPS Konzentration. Dies wiederum würde bedeuten, dass LPS auch über den Blutweg zu einer Aktivierung Fos-positiver Zellen führen kann, die sich innerhalb der Blut-Hirn Schranke befinden. Die Modulation dieser Aktivierung durch spezifische Inhibitoren der induzierbaren NO-Synthase und Cyclooxygenase deutet auf die Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussbarkeit dieser Aktivierungsprozesse hin, wobei die Hemmung der Cyclooxygenase in der vorliegenden Arbeit zwar zu einer Abnahme der Fos-Anzahl im NTS führte, welche allerdings statistisch nicht signifikant war. Zusammenfassend lässt sich aus den vorliegenden Daten schlussfolgern, dass LPS sowohl nach systemischer als auch intraluminaler Gabe Neuronen im NTS aktiviert.

Es stellt sich nun die Frage, über welche Mechanismen die Wirkung von LPS auf Fos-positive Neuronen nach systemischer und intrajejunaler Gabe vermittelt wird.

Lipopolysaccharide können mesenteriale afferente Nervenfasern aktivieren [55]. Kreis et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass es nach Gabe von intrajejunal applizierten Anaphylatoxinen, wie Hühnerserumalbumin, zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Neuronen im NTS kommt. Sie beschrieben in ihrer Arbeit das Modell der intestinalen Anaphylaxie, wonach es nach luminaler Allergenexposition zu einer Aktivierung und Degranulation von in der Lamina propria des Darms gelegenen Mastzellen kommt, welche nach dem Modell der Typ-I Hypersensitivitätsreaktion erfolgt [50]. Die freigesetzten Mediatoren, wie Histamin und 5-HT, triggern die Aktivierung von Neuronen der Darmwand, und führen zu einer Zunahme der sekretorischen und motorischen Aktivität des Darms, wodurch das Antigen im Lumen schneller wieder ausgeschieden wird [43]. Diese Hypothese wird durch elektrophysiologische Daten gestützt, welche zeigen, dass es zu einer starken Aktivierung mesenterialer afferenter Nervenfasern nach luminaler Exposition mit bestimmten Antigenen kommt [105]. Die Aktivierung mesenterialer afferenter Nervenfasern führt in der Folge zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen im NTS [50]. Einen ähnlichen Signalprozess kann man auch für die Wirkung intraluminal applizierter Lipopolysaccharide annehmen.

Es stellt sich nun die Frage, wie eine Aktivierung enterischer Neurone und intestinaler afferenter Nervenfasern in das ZNS vermittelt wird. Hierbei ist eine Aktivierung über vagale und/oder spinale Fasern in Betracht zu ziehen. In letzter Zeit wurden hierzu Arbeiten veröffentlicht, die den Schluss nahe legen, dass hauptsächlich spinale afferente Nervenfasern Informationen über Toxine, wie LPS, in das zentrale Nervensystem weiterleiten [27]. Periphere Stimuli sind in der Lage, Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks zu aktivieren [41]. Somit

ist es denkbar, dass nach peripherer LPS-Gabe eine Aktivierung des NTS auch über das Rückenmark erfolgen kann. Unterstützung erfährt diese Theorie dadurch, dass es im Rattenmodell nach beidseitiger Vagotomie und anschließender systemischer LPS-Gabe zu keiner signifikanten Abnahme der Anzahl Fos-positiver Zellen des NTS kommt [33].

Systemisch appliziertes LPS führt zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Neuronen des NTS [33, 53]. Es stellt sich auch hier die Frage, wie ein entsprechender Mechanismus aussehen könnte. Hierzu haben Hermann et al. die Hypothese aufgestellt, dass der NTS in der Lage sei, Zytokine zu detektieren [33]. Lipopolysaccharide können eine Vielzahl von Zytokinen, wie TNF-alpha und Interleukin-1 β , aus Immunzellen freisetzen [3]. Dies ist auch im Rattenmodell nach systemischer LPS-Gabe zu vermuten. Aus diesen beiden Aspekten lässt sich ableiten, dass der NTS eine entsprechende Funktion als Detektionsorgan für Zytokine besitzen könnte.

In einem weiteren Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit die Fragestellung untersucht, ob die Aktivierung Fos-positiver Neuronen des NTS nach systemischer LPS-Gabe durch die vorherige Gabe pharmakologischer Substanzen gehemmt werden kann. Dieser Teil der Arbeit wurde nur an Tieren durchgeführt, die systemisch appliziertes LPS erhalten hatten, da hier der mögliche Effekt auf die Fos-Aktivität im NTS für konsistenter erachtet wurde. Prostaglandin E₂-Rezeptoren sind im Intestinum und Gehirn der Ratte vorhanden [31, 109]. Nach Gabe des unspezifischen Cyclooxygenase(COX)-Inhibitors Naproxen kam es in der vorliegenden Arbeit zwar zu einer Abnahme der Anzahl Fos-positiver Zellen im NTS. Allerdings war diese statistisch nicht signifikant. Einen ähnlichen Effekt beschrieben Kreis et al. im Rattenmodell, in dem es nach intrajejunaler Ovalbumingabe und vorheriger Indomethacin-Gabe, einem nicht-selektiven COX-Inhibitor, zu keiner signifikanten Abnahme der Anzahl Fos-positiver Zellen im NTS kam [50]. Zhang et al. zeigten in ihrer

Arbeit, dass die Fos-Aktivität im NTS nach systemischer LPS-Gabe durch die vorherige Gabe eines selektiven Cyclooxygenase-1 Inhibitors (COX-1) gehemmt werden kann, wohingegen spezifische COX-2 Inhibitoren keine Änderung der Fos-Aktivität im NTS hervorriefen [109]. Da Naproxen ein nicht-selektiver COX-Inhibitor ist, lässt sich auf dieser Grundlage eine tendenzielle Abnahme der Anzahl Fos-positiver Neuronen erklären. Eine Erklärung für die nicht vorhandene statistische Signifikanz trotz offensichtlicher Tendenz zur Abnahme könnte auch darin zu sehen sein, dass die Durchführung dieser Experimente an einer größeren Anzahl an Tieren zu einem statistisch signifikanten Ergebnis führen könnte.

Prostaglandin E₂ vermittelt bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) die viszerale Schmerzwahrnehmung [7, 31]. Weiterhin konnten bei IBD-Patienten bestimmte Genpolymorphismen für Toll-like Rezeptoren vom Typ 4 (TLR-4) nachgewiesen werden, die eine erhöhte Bindungsaffinität für Lipopolysaccharide im Vergleich zur Normalpopulation besitzen [20]. TLR-4 sind Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellen des unspezifischen Abwehrsystems, wie zum Beispiel auf Makrophagen [36]. Somit kann alternativ zum Typ-1 Hypersensitivitätsmodell die Hypothese aufgestellt werden, dass es nach systemischer Gabe von LPS über eine Bindung an TLR zu einer Aktivierung von Makrophagen kommt, die ihrerseits eine Freisetzung von Zytokinen, oder auch in der Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems, eine verstärkte Freisetzung von Zytokinen bewirken. Nach Hermann et al. könnte so dann der NTS als Detektionsort für Zytokine aktiviert werden und zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen führen [33].

Als spezifischer Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase wurde Aminoguanidin verwandt [79, 83]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass nach Vorbehandlung mit Aminoguanidin die Anzahl Fos-positiver Zellen des NTS stark zunahm. Es existieren zwei Isoformen der NO-Synthase. Im

physiologischen Zustand wird die konstitutive Isoform von Endothelzellen als sogenannte nNOS exprimiert, welche calciumabhängig ist. Aus der Aminosäure Asparagin wird NO freigesetzt, welches über seine relaxierende Wirkung an glatten Muskelzellen zu einer Vasodilatation führt. NO besitzt ausserdem eine Vielzahl von Funktionen. Es verhindert die Aktivierung der Plättchenaggregation und hat eine hemmende Wirkung auf die Adhäsion und damit die Aktivierung von Leukozyten. Somit ist NO ein wichtiger Bestandteil der Homöostase an Endothelzellen [65]. Im pathologischen Zustand wird die calcium-unabhängige Isoform vermehrt exprimiert, welche auch als induzierbare NO-Synthase bezeichnet wird. Diese wird unter anderem auch durch Lipopolysaccharide induziert. Sie führt zu einer starken Relaxation an der glatten Muskulatur von Blutgefäßen, wie sie während eines septischen Schocks auftritt. Die Gabe von Inhibitoren der iNOS verhinderte im Tierexperiment nach LPS-Gabe das Auftreten einer Hypotension im Rahmen eines septischen Schocks [94].

Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben erhöhte Konzentrationen an NO in der Mukosa [75]. Es muss somit angenommen werden, dass NO im Rahmen von Entzündungsvorgängen im Darm in erhöhter Konzentration freigesetzt wird und die Zytokinfreisetzung induziert. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Makrophagen in der Lage sind, NO während einer akuten oder chronischen Entzündung freizusetzen, welches wiederum stimulierend auf die Freisetzung weiterer Zytokine aus Makrophagen wirkt [5]. Nimmt man nun die Anzahl Fos-positiver Zellen des NTS als Maß für die Stärke eines Entzündungsprozess im Darm, so stehen die Ergebnisse aus dieser Arbeit im Gegensatz zu dieser Theorie. Allerdings hat sich auch gezeigt, dass NO an peripheren Nervenendigungen des Gastrointestinaltraktes als Transmitter wirkt. Es führt nach Freisetzung zu einer Relaxation der Darmwand und damit zu einer Hemmung von durch Entzündungsprozesse induzierten Aktivitätssteigerungen des Darms und besitzt damit protektiven Effekt [65]. Diese Theorie würde wiederum die Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen im NTS erklären.

In standardisierten Modellen einer experimentell-induzierten Colitis bei Ratten konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der iNOS durch Aminoguanidin im späten oder chronischen Entzündungsstadium zu einer Abnahme der inflammatorischen Aktivität im Darm sowie zu einer Besserung der Symptomatik führte [108]. Allerdings hatte die Vorbehandlung mit Aminoguanidin vor Colitis-Induktion bzw. im frühen Entzündungsstadium eine Zunahme der inflammatorischen Aktivität im Darm zur Folge [12, 49]. Dies würde eine Erklärung für die Zunahme der Fos-Zellzahl im NTS nach systemischer LPS-Gabe und Vorbehandlung mit Aminoguanidin liefern.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Ergebnisse nach Aminoguanidin-Gabe basiert auf der Arbeit von Wu et al. Hier kam es nach Vorbehandlung mit Aminoguanidin und anschließender systemischer LPS-Gabe zu einer Zunahme des mittleren arteriellen Blutdrucks im Vergleich zur alleinigen LPS-Gabe. Es wird vermutet, dass Aminoguanidin als iNOS-Inhibitor zu einer Abnahme der Konzentration von NO im Blutkreislauf führt, welches in der Folge eine Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen zeigt. Dies bedeutet, dass es sich hierbei auch um einen zirkulatorischen Effekt handeln könnte, der allerdings aus den gegebenen Daten der Arbeit nicht näher bestimmt werden [107].

4.3 Überlegungen zu Brain-Gut-Interaktionen und Möglichkeiten der Modulation von Aktivierungsprozessen im ZNS

Die sensorische Signalentstehung und Signalverarbeitung im Gastrointestinaltrakt kann durch verschiedene Faktoren moduliert werden. Mesenteriale afferente Nervenfasern können über eine Vielzahl an chemischen Mediatoren stimuliert werden. Ihre Aktivierung kann im Prinzip über drei verschiedene Prozesse erfolgen. Erstens können Mediatoren direkt durch Öffnen von Ionenkanälen an den terminalen Nervenendigungen der afferenten Nervenfasern ein Aktionspotential und damit eine direkte Erregung auslösen. Bei

Fehlen einer direkten Aktivierung der Nervenfasern können durch andere Mediatoren eine Sensibilisierung der afferenten Nervenfasern gegenüber anderen mechanischen oder chemischen Stimuli erzielt werden. Schliesslich können Mediatoren Änderungen des Phänotyps an der afferenten Nervenfasern bewirken. Sie können als Liganden Änderungen in der Öffnungswahrscheinlichkeit von Ionenkanälen erzielen und damit eine Erregung von afferenten Nervenfasern durch andere direkte Stimuli modulieren [48]. Weiterhin können Rezeptoren an afferenten Nervenfasern nach Aktivierung Mediatoren, wie Calcitonin-gene regulated peptide (CGRP) und Substanz P, an ihren Nervenendigungen freisetzen, welche durch ihre parakrine Wirkung an unmittelbar in der Nähe vorhandenen afferenten Nervenfasern eine Sensibilisierung induzieren [48]. Die dadurch erzielte Rekrutierung von afferenten Nervenfasern wird als Grundlage des Modells der „neurogenen Entzündung“ im Darm diskutiert [23, 68]. Chemische Mediatoren können somit einen oder mehrere dieser verschiedenen Aktivierungswege dazu nutzen, ihre spezifische Wirkung an afferenten Nervenfasern zu vermitteln. Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob eine Hemmung der Entstehung nozizeptiver Signale im Darm eine Auswirkung auf die Aktivität Fos-positiver Neuronen des NTS hat.

Bei der Behandlung der IBS und IBD stellt eine pharmakologische Manipulation dieser Prozesse ein therapeutisches „Target“ in der Behandlung von viszeralen Sensationen bei diesem Patientenkollektiv dar. Im Folgenden werden aus der grossen Vielfalt an chemischen Mediatoren exemplarisch einige aufgeführt, welche in den Aktivierungsprozess mesenterialer afferenter Nervenfasern involviert sein können [48].

Es konnte gezeigt werden, dass mechanische und chemische Stimuli im Lumen des Gastrointestinaltraktes, wie bakterielle Enterotoxine, in der Lage sind, extrinsische afferente Nervenfasern über bestimmte Zellen der Mukosa zu

sensibilisieren. Zusätzlich zeigte sich, dass enterochromaffine (EC) Zellen des Darms in der Lage sind, als Folge eines „luminalen Tastings“ von intraluminalen Substanzen 5-HT (Serotonin) freizusetzen. 5-HT kann in der Folge über 5-HT₃ Rezeptoren Nervenendigungen vagaler Neurone in der Lamina propria aktivieren [24, 39]. Die Weiterleitung dieser Informationen in das ZNS kann prinzipiell sowohl durch vagale als auch spinale Nervenbahnen erfolgen [27]. Elektrophysiologische Daten legen die Vermutung nahe, dass die Wirkung von 5-HT über spezifische Subpopulationen von vagalen afferenten Nervenfasern in das ZNS vermittelt wird [38]. Jedoch konnte im gleichen Jahr durch Fu et al. gezeigt werden, dass 5-HT₃ Rezeptoren offenbar auch an viszerale spinale afferente Nervenendigungen vorkommen [21]. Somit ist es vorstellbar, dass intraluminal applizierte Lipopolysaccharide über einen ähnlichen Signalweg eine Aktivierung von Neuronen des NTS bewirken können. Folglich wäre in weiteren Versuchen die Fragestellung zu untersuchen, ob nach vorheriger Blockierung von 5-HT-Rezeptoren intrajejunal applizierte Lipopolysaccharide zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Neuronen im NTS führen. Die Hemmung der serotonergen Projektion viszerale Afferenzen in die Area postrema, welche das Brechzentrum im ZNS darstellt, ist heutzutage in der Klinik ein wichtiges pharmakologisches Ziel bei zytostatikainduziertem Erbrechen [35, 86].

Nozizeptoren der Darmwand können aber auch über andere chemische Mediatoren aktiviert werden. In vitro Versuche belegen, dass im physiologischen Zustand Bradykinin (BKK) über Bradykinin-B₂-Rezeptoren mesenteriale spinale Afferenzen aktivieren kann. Eine Hemmung von B₂-Rezeptoren führt im akuten Stadium zu einer Abnahme der viszerale Nozizeption, wohingegen bei chronischen Schmerzzuständen eine Hemmung über induzierbare B₁-Rezeptoren eine bedeutendere Rolle spielt [9]. Hieraus lässt sich ableiten, dass der Einsatz entsprechender Rezeptorantagonisten bei Erkrankungen mit viszerale Hypersensibilität einen therapeutischen Nutzen haben könnte.

Prostaglandine interagieren mit verschiedenen Prostaglandinrezeptoren (EP-Rezeptoren) im Gastrointestinaltrakt. Eine direkte Aktivierung von mukosalen mesenterialen Afferenzen wird über EP₁-Rezeptoren vermittelt, wohingegen EP₂-Rezeptoren eine sensibilisierende Wirkung an Nozizeptoren haben [31]. Über einen solchen Mechanismus ist es vorstellbar, dass „silente Nozizeptoren“ nach mechanischer oder chemischer Stimulation im Entzündungsmodell aktiviert werden und über vagale und spinale Aktivierungswege ihre Wirkung im ZNS haben. COX-1 wird als konstitutive Form exprimiert und ist beteiligt an der „baseline visceral afferent sensitivity“. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Naproxen im Nativgewebe zu einer Reduktion der Stärke der Antwort nach vorheriger Bradykinin-Gabe führt [59]. Weiterhin wurde gezeigt, dass es bei Colitiden zu einer Hochregulation der COX-2 kommt [62, 87]. Chronischer Schmerz könnte so im Rahmen einer Colitis durch diesen Mechanismus aufrechterhalten werden. Die Gabe COX-2-Inhibitoren führt jedoch häufig bei Patienten mit IBD zu einer Exazerbation ihrer Beschwerden [58, 100]. Somit ist anzunehmen, dass Prostaglandine eine wichtige Funktion bei Reparaturvorgängen der Darmwand haben.

Nach intravenöser Gabe von Adenosin kommt es zu einer Zunahme der mesenterialen afferenten Aktivität, welche mit einer Zunahme der intraluminalen Drucks im Darm verbunden ist [47]. Somit scheint eine Adenosin-vermittelte Zunahme der mesenterialen Aktivität von Neuronen einen Regulationsmechanismus darzustellen, welcher zu einer efferenten Antwort der Darmmuskulatur führt, die sich als intraluminale Druckzunahme zeigt.

Ebenso vermag mechanische Dehnung oder Kontraktion der Darmwand eine Aktivierung vagaler und spinaler Afferenzen auszulösen. Hierbei werden über vagale Fasern Änderungen innerhalb des physiologischen Spektrums des Tonus der Darmwand in das ZNS weitergeleitet, wohingegen spinale Afferenzen wahrscheinlich ein breiteres und dynamischeres Spektrum an

pathologischen Informationen weiterleiten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen bestimmte Nozizeptoren keine Aktivierung zeigen und erst nach Entzündung oder Traumen aktiviert werden [22].

Auf Hirnstammebene ist ein vago-vagaler Regulationmechanismus anzunehmen. Vagale afferente Nervenfasern sind mit Neuronen des NTS assoziiert sind [27]. Sie besitzen Glutamat als Neurotransmitter [88]. Glutamat vermittelt seine Wirkung im ZNS über NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren [106]. Der NTS kann über efferente exzitatorische glutamaterge und inhibitorische GABAerge (γ -Aminobuttersäure) Bahnen zum motorischen Nucleus dorsalis des N.vagus (DMNV) auf gastrointestinale Funktionen, wie Motilität und sekretorische Aktivität, Einfluss nehmen [82].

NTS und DMNV stellen damit funktionell eine Einheit dar. Sie werden daher auch als Dorsal Vagal Complex (DVC) bezeichnet. Der DVC enthält weiterhin Afferenzen von der AP, welche keine effektive Blut-Hirn Schranke enthält. Er ist somit in der Lage humorale Signale, wie Zytokine, aus der Peripherie zu detektieren [33]. Diese können über den oben beschriebenen Mechanismus zusätzlichen Einfluss auf die Regulation gastrointestinaler Funktionen ausüben [81].

Nach Gabe von intraperitoneal appliziertem LPS kommt es zu einer Zunahme der Konzentrationen von Glutamat und Interleukin-1 in den Neuronen des NTS [57]. Die intraperitoneale Gabe von LPS führt zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Neurone in hypothalamischen (Nucleus supraopticus und paraventricularis) und noradrenergen Hirnstammregionen (A1/A2-Region), welche mit Neuronen des NTS eng assoziiert sind. Die Gabe des NMDA-Antagonisten MK801 führte zu einer Abnahme der Fos-Zellzahl in diesen Regionen [101]. Es ist somit vorstellbar, dass eine systemische LPS-Applikation über einen vagalen glutamatergen Mechanismus zu einer Zunahme der Fos-

Aktivität im NTS führt und durch die Gabe von NMDA-Rezeptorantagonisten gehemmt werden kann.

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) kann von Neuronen und Gliazellen gebildet werden. Er hat sowohl eine zytotoxische Wirkung als auch eine zytokin-induzierende Wirkung. Zudem ist TNF- α in der Lage, die Blut-Hirn Schranke zu passieren und deren Endothel zu aktivieren. In der Folge kommt es zu einer Zunahme von Inhibitor Faktor- κ B (I κ B), welcher ein wichtiger Bestandteil der intrazellulären Signalkaskade der c-Fos-Aktivierung ist [72].

TNF- α führt zu einer Zunahme der Fos-Aktivität im NTS [67]. Die Wirkung von TNF- α im NTS wird über Glutamat vermittelt [18]. TNF- α verstärkt zusätzlich die Wirkung von afferenten glutamatergen Neuronen und erhöht die Fos-Aktivität im Rückenmark nach direkter Rückenmarksinjektion [34]. Somit ist denkbar, dass TNF- α einer der Mediatoren ist, über die die neuronale Aktivierung im Hirnstamm nach LPS-Gabe erfolgt.

Mastzellen in der intestinalen Mukosa sind mit afferenten vagalen Nervenfasern eng assoziiert [105]. Die Arbeit von Jiang et al. zeigte, dass Mastzellmediatoren, wie Histamin und Serotonin, nach Freisetzung mesenteriale afferente Nervenfasern stimulieren können [43]. Die Gabe von H₁-Rezeptorantagonisten führt im Gegensatz zu H₂-Rezeptorantagonisten zu einer Abnahme der Anzahl Fos-positiver Zellen im Nucleus supraopticus und paraventricularis, welche, wie oben beschrieben, eng mit dem NTS verbunden sind [101]. Somit bedarf es weiterer Versuche zur Klärung der Frage, ob eine Vorbehandlung mit H₁-Rezeptorantagonisten zu einer Abnahme der Fos-Aktivität im NTS nach intrajejunaler bzw. systemischer LPS-Gabe führt.

5-HT (Serotonin) kann sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Effekte an vagalen präganglionären Neuronen erzielen, wobei über 5-HT_{1A} Rezeptoren die exzitatorische Antwort weitergeleitet wird [102]. Neuronen des NTS können über vagale Afferenzen, welche 5-HT Rezeptoren haben, aktiviert oder

gehemmt werden. Ebenso können kardiale vagale Afferenzen Neuronen des NTS über 5-HT Rezeptoren aktivieren [103]. Dies legt nahe, dass eine Aktivierung vagaler Afferenzen durch LPS über 5-HT vermittelt sein kann.

4.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Es wird angenommen, dass es bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, zu einem Verlust der Immuntoleranz gegenüber luminalen Antigenen, wie bakteriellen Toxinen, kommt [14, 45]. Dieser Verlust geht einher mit einer chronischen Entzündungsreaktion und den sich daraus ableitenden klinischen Folgen wie Blutungen, Tenesmen und Diarrhöen [19]. Weiterhin konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass chronische Stressexposition die epitheliale Permeabilität in der Mukosa für makromolekulare Substanzen erhöht [30, 99]. Gleichzeitig zeigte sich, dass ein Fehlen von Mastzellen bei chronischer Stressexposition bei knock-out Ratten im Gegensatz zum Wildtyp eine Adhäsion und Penetration von Bakterien in Epithelzellen des Darms verhinderte und die inflammatorische Aktivität im Darm senkte [89]. Somit ist es wahrscheinlich, dass Lipopolysaccharide bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen als Folge der chronischen Entzündung in grösseren Mengen in die Mukosa eindringen können [84]. Lipopolysaccharide von *E. coli* könnten hier eine besondere Rolle spielen, da *E. coli* als Kommensalen und Hauptkeime in der Darmflora vorkommen. Bedingt durch das dynamische Gleichgewicht zwischen Zellverlust und Zellteilung werden große Menge an LPS ständig in das Lumen freigesetzt, die im physiologischen Zustand durch eine Immuntoleranz keine pathologische Bedeutung erlangen [13]. Tatsächlich wiesen Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine erhöhte Konzentration von Endotoxinen im Blut im Vergleich zu gesunden Probanden auf [10, 71].

Es gibt im Tiermodell Hinweise darauf, dass Neurone des Plexus myentericus während einer Entzündung im Darm einem ständigen Einfluss von Zytokinen, wie Interleukin-1, unterworfen sind [66]. Stresssituationen können bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen den Entzündungsprozess im Darm unterhalten oder sogar aggravieren können [58, 60, 64]. Deshalb wird vermutet, dass das Nervensystem bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine modulierende Rolle spielt.

Patienten auf Intensivstationen leiden häufig an einer Sepsis [46]. Eine Minderperfusion des Darms in Stresszuständen, wie sie im Rahmen von Schockzuständen, nach operativen Eingriffen oder nach parenteraler Ernährung vorkommt, kann zu einer bakteriellen Translokation im Darm führen. Hierbei werden grosse Mengen an Lipopolysacchariden in den systemischen Kreislauf eingeschwemmt. Als Folge entwickelt sich dann ein septischer Schock, der wiederum die Minderperfusion des Darms verstärkt [37]. Dieses pathophysiologische Konzept wird belegt durch die Beobachtung, dass Patienten mit einem nachweisbaren Titer an LPS eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit haben als Patienten mit fehlendem Nachweis von LPS [73].

In einer weiteren Studie von Ziegler et al. zeigte sich, dass die Gabe von LPS-Antikörpern bei Patienten mit septischem Schock, welche nach vorheriger Vakkzinierung von gesunden Probanden gewonnen wurden, die Überlebenswahrscheinlichkeit erhöht [110]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Serum-LPS Konzentration eine prognostische Bedeutung bei der Sepsis hat. Zudem hatte die Durchführung einer Endotoxinelimination durch Hämooperfusion bei operierten Patienten mit SIRS (systemic inflammatory response syndrome) eine Verbesserung der Organfunktionen zur Folge [98].

Zusammenfassend stellt somit transloziertes LPS in der Sepsis einen wesentlichen pathophysiologischen Mechanismus dar, der die Situation des

Patienten erheblich beeinträchtigen kann. Basierend auf den Ergebnissen der Studie ist vorstellbar, dass systemisch aufgenommenes LPS den generalisierten „septischen Response“ über eine zentralnervöse Aktivierung triggert. Die Tatsache, dass diese zentrale Aktivierung des Hirnstamms pharmakologisch manipulierbar ist, eröffnet die Möglichkeit, diesen Mechanismus zu hemmen, um schädliche septische Reaktionen zu vermeiden.

Funktionelle Erkrankungen, zu denen das Reizdarmsyndrom (IBS) gehört, zeigen eine Vielzahl von Symptomen ohne wesentliche pathologische Korrelate. Patienten mit Reizdarmsyndrom leiden häufig an schweren gastrointestinalen Symptomen mit viszeraler Hyperalgesie und Hypersensibilität [63, 78]. Ebenso bestehen Diarrhoe und Obstipation in unterschiedlicher Ausprägung [92]. Die Ätiologie des IBS ist bis heute nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass nach abgelaufener Campylobacter-Enteritis bis zu 25% der Patienten ein Reizdarmsyndrom entwickeln. Nach Entnahme von Biopsiematerial des Rektums bei diesen Patienten fand sich eine erhöhte Anzahl an EC-Zellen und T-Lymphozyten in der Mukosa. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität des Darms erhöht war [90]. Biopsien aus den tiefen Schichten des proximalen Jejunums bei Patienten mit IBS zeigten eine Invasion von Lymphozyten in die myenterischen Plexus [97].

Vergleicht man den Schweregrad der abdominellen Schmerzsymptomatik bei IBS-Patienten mit Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) und korreliert diese Ergebnisse mit den entsprechenden histopathologischen Veränderungen der Darmwand, so zeigt sich überraschenderweise, dass bei IBS-Patienten trotz der vergleichsweise unauffälligen histopathologischen Befunde eine ausgeprägtere viszerale Schmerzsymptomatik besteht [6, 61, 85].

Etwa 5-10% aller IBS-Erkrankungen entstehen nach bakteriellen Gastroenteritiden. Dieses post-infektiös auftretende Reizdarmsyndrom (PI-IBS)

geht typischerweise mit Diarrhoe einher. Zudem ist das post-infektiös auftretende Reizdarmsyndrom im Verhältnis zu anderen IBS-Formen mit weniger psychischen Symptomen assoziiert und hat eine bessere Langzeitprognose [16].

Somit ist es denkbar, dass LPS, bedingt durch eine erhöhte Permeabilität des Darmepithels nach einer Infektion, zu einer Aktivierung von Neuronen des Darms führt. Die Weiterleitung dieser Aktivierung in Regionen, wie dem NTS, könnte den chronischen Entzündungsprozess im Sinne des Modells der neurogenen Entzündung aufrechterhalten.

Ein therapeutischer Ansatz in der Behandlung des Reizdarmsyndroms stellt auf dem Hintergrund einer EC-Zellhyperplasie die Gabe von 5-HT Rezeptorantagonisten dar. Tatsächlich führt die Gabe von 5-HT Rezeptorantagonisten zu einer Reduktion der viszeralen Schmerzsymptomatik [25, 91]. Zusätzlich verbessern 5-HT₃ Rezeptorantagonisten die Diarrhoesympptomatik beim postinfektiösen Reizdarmsyndrom [44, 56]. 5-HT₄-Rezeptoragonisten haben hingegen einen günstigen therapeutischen Einfluss bei Patienten mit im Vordergrund stehender obstipierender Symptomatik (C-IBS) [52, 92]. Eine pathophysiologische Erklärung für die unterschiedliche Symptomatik bei Patienten mit PI-IBS und C-IBS liefert die Arbeit von Dunlop et al. Sie zeigten, dass bei Patienten mit PI-IBS der Abbau von 5-HT zum Metaboliten 5-HIAA vermindert war. Gleichzeitig war bei Patienten mit C-IBS die Freisetzung von 5-HT postprandial geringer als bei Patienten mit PI-IBS [17].

Unter der Annahme einer Entzündung bei Patienten mit PI-IBS wäre zu erwarten, dass es nach Gabe potenter antiinflammatorischer Medikamente zu einer Besserung des Beschwerdebildes käme. Allerdings zeigte sich, dass Prednisolon bei Patienten mit PI-IBS trotz einer signifikanten Reduktion der T-Lymphozyten-Zellzahl weder zu einer Änderung der Anzahl enterochromaffiner

Zellen in Rektumbiopsien noch zu einer Besserung der Symptomatik führte [15].

Stellt man die Theorie einer EC-Zellhyperplasie in den Vordergrund der Überlegungen über einen möglichen Pathomechanismus, so zeigt sich, dass trizyklische Antidepressiva mit 5-HT₃ antagonistischer Wirkung zu einer Verbesserung der Symptomatik führen. Hier muss allerdings diskutiert werden, ob dieser therapeutische Ansatz nicht auch durch eine Besserung des vorhandenen krankheitsbedingten depressiven Zustandsbildes bedingt ist. Der Einsatz spezifischer 5-HT₃ Antagonisten, wie Alosetron, führt jedoch zu einer Besserung der viszeralen Schmerzsymptomatik und Stuhlnunregelmäßigkeiten bei Patienten mit im Vordergrund stehender Diarrhoe-Symptomatik [91].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine intensive Interaktion von LPS mit dem Nervensystem stattfinden kann, weshalb sich ein Mechanismus für das postinfektiöse Reizdarmsyndrom hypothetisch ableiten lässt. Insbesondere wird deutlich, dass Bakterienbestandteile, wie LPS, eine zentrale neuronale Aktivierung vom Darm aus hervorrufen können. Dies könnte die Grundlage für die typische „Hypersensibilität“ beim Reizdarmsyndrom bilden.

5. Zusammenfassung

Mesenteriale afferente Nervenfasern des Darms sind mit Mastzellen assoziiert. Mastzellmediatoren, wie Histamin und Serotonin, sind in der Lage, mesenteriale afferente Nervenfasern zu sensibilisieren. Afferente Nervenfasern sind über vagale und spinale Bahnen mit Hirnstammstrukturen, wie dem NTS und der Area postrema, vernetzt. Nach intrajejunaler Gabe von allergisierenden Substanzen kommt es zu einer Aktivierung von Fos-positiven Neuronen des NTS, woraus sich eine Aktivierung des NTS über vagale afferente Nervenfasern ableiten lässt. Es gibt weiterhin Hinweise dafür, dass physiologische Signale aus dem Intestinum über den Vagus und nozizeptive respektive pathologische Stimuli über spinale Fasern ihren Eingang in das ZNS finden.

Lipopolysaccharide sind Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien und werden nach Zellyse freigesetzt. Sie können die Freisetzung von Zytokinen und Mediatoren aus Immunzellen induzieren mit der Folge des klinisches Bildes einer Sepsis. Weiterhin zeigen elektrophysiologische Daten, dass Lipopolysaccharide in der Lage sind, mesenteriale afferente Nervenfasern zu aktivieren. Ziel der vorliegenden Studie war es zu untersuchen, ob es nach intrajejunaler und systemischer Gabe von LPS im Rattenmodell zur Aktivierung von Neuronen im NTS kommt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob diese Aktivierungsprozesse pharmakologisch beeinflussbar sind und inwieweit diese Prozesse bei lokaler LPS-Gabe durch eine systemische Aufnahme von Lipopolysacchariden bedingt sind.

Die Experimente wurden an männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Hierbei wurde nach operativer Anlage eines Jejunalkatheters LPS entweder lokal über den Katheter oder systemisch durch intraperitoneale Injektion appliziert. Zur Untersuchung der pharmakologischen Beeinflussbarkeit der neuronalen Aktivierung im Hirnstamm wurde in Subgruppen vor systemischer LPS-Gabe

der Cyclooxygenasehemmer Naproxen oder der iNOS-Inhibitor Aminoguanidin intraperitoneal appliziert. Zudem wurden die Serum-LPS Konzentrationen nach systemischer und intrajejunaler LPS-Gabe mittels LAL-Chromogenic Endpoint Assay bestimmt. Die neuronale Aktivierung im NTS wurde mittels c-Fos Immunohistochemie in den Höhen 13.3 mm, 13.8 mm und 14.3 mm kaudal vom Bregma untersucht. Die Area postrema wurde auf Höhe 13.8 mm kaudal vom Bregma ausgewertet.

In der vorliegenden Arbeit führte sowohl die intrajejunale Applikation von LPS (20 mg ml^{-1} , Volumen: 2 ml) als auch die systemische Gabe (1 mg kg^{-1}) zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen im NTS. Die Gabe des iNOS-Inhibitors Aminoguanidin (15 mg kg^{-1}) vor systemischer LPS-Gabe führte zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen des NTS. Hingegen hatte die Gabe des nichtselektiven Cyclooxygenasehemmers Naproxen (10 mg kg^{-1}) vor systemischer LPS-Gabe keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl Fos-positiver Zellen im NTS. Es liess sich allerdings eine deutliche Tendenz zur Abnahme der Fos-Zellzahl feststellen (s. Abb.8). Die systemische Gabe von LPS führte im Vergleich zur intrajejunalen Gabe zu einer Zunahme der Anzahl Fos-positiver Zellen in der Area postrema. Nach systemischer Gabe von LPS zeigte sich im Gegensatz zur intrajejunalen Gabe eine deutliche Zunahme der Serum-LPS Konzentration.

In Zusammenschau der Fos-Ergebnisse und der Ergebnisse der Bestimmung der Serum-LPS Konzentration lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivierung von Neuronen im NTS wahrscheinlich durch direkte Interaktion mit darmassoziierten Neuronen erfolgt, welche zuvor durch LPS stimuliert worden sind. Denkbar ist in diesem Zusammenhang eine Aktivierung über vagale und spinale Neurone. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Auswertung der Area postrema unterstützt, welche im Gegensatz zur systemischen Gabe keinen signifikanten Unterschied bei intrajejunaler LPS-Gabe aufzeigen konnte.

Es lässt sich weiter schlussfolgern, dass eine relevante systemische Aufnahme von LPS nach intrajejunaler Applikation unwahrscheinlich erscheint und nicht zur zentralen Aktivierung beiträgt.

Zur pharmakologischen Beeinflussbarkeit lässt sich aus den vorliegenden Daten ableiten, dass in der Regulation dieser Prozesse NO einen hemmenden Effekt auf die Bildung von Fos-Protein nach LPS-Gabe hat, während sich ein permissiver Effekt der Cyclooxygenase nicht eindeutig nachweisen liess.

6. Abbildungen und Tabellen

Abbildungen:

Abb. 1: Versuchsablauf bei intrajejunaler LPS-Gabe anhand eines Zeitstrahls	8
Abb. 2: Versuchsablauf bei systemischer LPS-Gabe anhand eines Zeitstrahls	9
Abb. 3: Schematische Versuchsanordnung im Abschlussexperiment bei intrajejunaler LPS-Applikation	10
Abb. 4: Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der Streptavidin-Biotin Komplexreaktion	14
Abb. 5: Schematische Darstellung der LPS-Struktur.....	16
Abb. 6: Standardextinktionskurve des LAL Chromogenic Endpoint Assay.....	17
Abb. 7: Pipettierschema Mikrotiterplatte mit 96 Wells	18
Abb. 8: Fos-positive Zellen im NTS nach intrajejunaler LPS-Applikation	27
Abb. 9: Fos-positive Zellen im NTS nach systemischer LPS-Applikation	29
Abb. 10: Fos-positive Zellen in der Area postrema.....	31
Abb. 11: Ergebnisse der Serum-LPS-Bestimmung	32
Abb. 12: Fos-Immunohistochemie bei intrajejunaler LPS-Gabe (A) versus Kontrolle (B) des NTS bei 13.3 mm kaudal des Bregma	33
Abb. 13: Fos-Immunohistochemie bei systemischer LPS-Gabe (A) und Kontrolle (B) des NTS bei 13.3 mm kaudal des Bregma	33
Abb. 14: Fos-Immunohistochemie bei intrajejunaler LPS-Gabe (A) und Kontrolle (B) des NTS bei 13.8 mm kaudal des Bregma und Area postrema....	34
Abb. 15: Fos-Immunohistochemie bei systemischer LPS-Gabe (A) versus Kontrolle (B) des NTS bei 13.8 mm kaudal des Bregma und Area postrema	34
Abb. 16: Fos-Immunohistochemie bei intrajejunaler LPS-Gabe (A) versus Kontrolle (B) bei 14.3 mm kaudal des Bregma.....	35
Abb. 17: Fos-Immunohistochemie bei systemischer LPS-Gabe (A) versus Kontrolle (B) des NTS bei 14.3 mm kaudal des Bregma	35
Abb. 18: Schema der intrazellulären Aktivierung von c-Fos nach LPS-Gabe...	41

Tabellen:

Tab. 1: Summe der Fos-positiven Zellen in den drei definierten Schnittebenen des NTS bei intrajejunaler LPS-Gabe (Mittelwert \pm Standard Error of Mean=SEM)	26
Tab. 2: Summe der Fos-positiven Zellen in den drei definierten Schnittebenen des NTS bei systemischer LPS-Gabe und Pharmakologie (Mittelwert \pm SEM)	28
Tab. 3: Anzahl Fos-positiver Zellen in der Area postrema bei intrajejunaler und systemischer LPS-Gabe (Mittelwert \pm SEM)	30
Tab. 4: Serum-LPS Konzentration in pg ml^{-1}	32

7. Literaturverzeichnis

1. Aasen, A.O., 1993, LPS Plasma Levels in Patients, in Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure. First Edition, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, p. 417-26.
2. Alexander, J.W., Boyce, S.T., Babcock, G.F., Gianotti, L., Peck, M.D., Dunn, D.L., Pyles, T., Childress, C.P., Ash, S.K., 1990, The process of microbial translocation. *Ann Surg*, 212: 496-510.
3. Andersson, J., Nagy, S., Björk, L., Abrams, J., Holm, S., Andersson, U., 1992, Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. *Immunol Rev*, 127: 69-96.
4. Armstrong, C.P., Taylor, T.V., Torrance, H.B., 1985, Pressure, volume and the pancreas. *Gut*, 26(6): 615-24.
5. Berdeaux, A., 1993, Nitric oxide: an ubiquitous messenger. *Fundam Clin Pharmacol*, 7(8): 401-11.
6. Bernstein, C.N., Niazi, N., Robert, M., Mertz, H., Kodner, A., Munakata, J., Naliboff, B., Mayer, E.A., 1996, Rectal afferent function in patients with inflammatory and functional intestinal disorders. *Pain*, 66(2-3): 151-61.
7. Bley, H.R., Hunger, J.C., Eglen, R.M., Smith, J.A.M., 1998, The role of EP receptors in hyperalgesia. *Trends Pharmacol Sci*, 19: 141-147.
8. Bonaz, B., Plourde, V., Tache, Y., 1994, Abdominal surgery induces Fos immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol*, 349(2): 212-22.
9. Bueno, L., Fioramonti, J., Garcia-Villar, R., 2000, Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications III. Visceral afferent pathways: a source of new therapeutic targets for abdominal pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278(5): G670-676.
10. Caradonna, L., Amati, L., Magrone, T., Pellegrino, N.M., Jirillo, E., Caccavo, D., 2000, Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res*, 6(3): 205-14.
11. Childs, G., Unabia, G., 1982, Application of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method to the light microscopic localization of pituitary hormones. *J Histochem Cytochem*, 30(7): 713-6.
12. Dikopoulos, N., Nussler, A.K., Liptay, S., Bachem, M., Reinshagen, M., Stiegler, M., Schmid, R.M., Adler, G., Weidenbach, H., 2001, Inhibition of nitric oxide synthesis by aminoguanidine increases intestinal damage in the acute phase of rat TNB-colitis. *Eur J Clin Invest*, 31(3): 234-9.
13. Donaldson, R.M., 1973, The Relation of Enteric Bacterial Populations to Gastrointestinal Function and Disease, in *Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*, First Edition, W.B. Saunders Company: Philadelphia, p. 70-82.

14. Duchmann, R., Kaiser, I., Hermann, E., Mayet, W., Ewe, K., Meyer zum Buschenfelde, K.H., 1995, Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*, 102(3): 448-55.
15. Dunlop, S.P., Jenkins, D., Neal, K.R., Naesdal, J., Borgaonker, M., Collins, S.M., Spiller, R.C., 2003 a, Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of prednisolone in post-infectious irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, 18(1): 77-84.
16. Dunlop, S.P., Jenkins, D., Spiller, R.C., 2003 b, Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*, 97(7): 1578-83.
17. Dunlop, S.P., Coleman, N.S., Blackshaw, L.A., Perkins, A.C., Singh, G., Marsden, C., Spiller, R.C., 2005, Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 3(4): 349-57.
18. Emch, G.S., Hoffmann, G.E., Rogers, R.C., 2001, TNF-alpha-induced c-Fos generation in the nucleus of the solitary tract is blocked by NBQX and MK-801. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281(5): R1394-1400.
19. Fiocchi, C., 1998, Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, 115(1): 182-205.
20. Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Deviere, J., Rutgeerts, P., 2004, Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR-4) Asp299-gly polymorphism is associated with Crohn's Disease and ulcerative colitis. *Gut*, 53: 987-992.
21. Fu, L., Longhurst, J., 1998, Role of 5-HT₃ receptors in activation of abdominal sympathetic C fibre afferents during ischaemia in cats. *J Physiol*, 509(Pt3): 729-40.
22. Gebhart, G., 2000, Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and the therapeutic implications IV. Visceral afferent contributions to the pathobiology of visceral pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 278(6): G834-8.
23. Geppetti, P., Trevisani, M., 2004, Activation and sensitisation of the vanilloid receptor: role in gastrointestinal inflammation and function. *Br J Pharmacol*, 141(8): 1313-20.
24. Gershon, M.D., 1999, Review article: roles played by 5-HT in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther*, 13 Suppl 2: 15-30.
25. Gershon, M.D., 2005, Nerves, reflexes, and the enteric nervous system: pathogenesis of the irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol*, 39(4 Suppl 3): S184-93.
26. Glatzle, J., Kreis, M.E., Kawano, K., Raybould, H.E., Zittel, T.T., 2001, Postprandial neuronal activation in the nucleus of the solitary tract is

- partly mediated by CCK-A receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281(1): R222-R229.
27. Grundy, D., 2002, Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut*, 51(Suppl 1): i2-5.
 28. Grundy, D., 2004, What activates visceral afferents? *Gut*, 53(Suppl 2): ii5-8.
 29. Guha, M., Mackman, N., 2001, LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signaling*, 13(2): 85-94.
 30. Hart, A., Kamm, M.A., 2002, Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Aliment Pharmacol Ther*, 16(12): 2017-28.
 31. Haupt, W., Jiang, W., Kreis, M.E., Grundy, D., 2000, Prostaglandin EP receptor subtypes have distinctive effects on jejunal afferent sensitivity in the rat. *Gastroenterology*, 119(6): 1580-9.
 32. Herdegen, T., Leah, J.D., 1998, Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev.*, 28(3): 370-490.
 33. Hermann, G.E., Emch, G.S., Tovar, C.A., Rogers, R.C., 2001, c-Fos generation in the dorsal vagal complex after systemic endotoxin is not dependent on the vagus nerve. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280(1): R289-99.
 34. Hermann, G.E., Rogers, R.C., Bresnahan, J.C., Beattie, M.S., 2001, Tumor-necrosis factor-alpha induces c-Fos and strongly potentiates glutamate-mediated cell death in the rat spinal cord. *Neurobiol Dis.*, 8(4): 590-9.
 35. Herrstedt, J., Koeller, J.M., Roila, F., Hesketh, P.J., Warr, D., Rittenberg, C., Dicato, M., 2005, Acute emesis: moderately emetogenic chemotherapy. *Support Care Cancer*, 13(2): 97-103.
 36. Heumann, D., Roger, T., 2002, Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*, 323(1-2): 59-72.
 37. Hiki, N., Mimura, Y., Ogawa, H., Kojima, J., Hatao, F., Kaminishi, M., 2001, Pathophysiological relevance of the CD 14 receptor in surgical patients: biological activity of endotoxin is regulated by the CD 14 receptor. *J Endotoxin Res*, 7(6): 461-6.
 38. Hillsley, K., Grundy, D., 1998 a, Serotonin and cholecystokinin activate different populations of rat mesenteric vagal afferents. *Neurosci Lett*, 255(2): 63-6.
 39. Hillsley, K., Kirkup, A.J., Grundy, D., 1998 b, Direct and indirect actions of 5-hydroxytryptamine on the discharge of mesenteric afferent fibers innervating the rat jejunum. *J Physiol*, 506(Pt 2): 551-61.
 40. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H., 1981, Use of avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics: a comparison between ABC and

- unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29(4): 577-580.
41. Hunt, S.P., Pini, A., Evan, G., 1987, Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328(6131): 632-4.
 42. Hurley, J.C., Tosolini, F.A., Louis, W.J., 1991, Quantitative Limulus lysate assay for endotoxin and the effect of plasma. *J Clin Pathol*, 44(10): 849-54.
 43. Jiang, W., Kreis, M.E., Eastwood, C., Kirkup, A.J., Humphrey, P.P., Grundy, D., 2000, 5-HT(3) and histamine(1)receptors mediate afferent nerve sensitivity to intestinal anaphylaxis in rats. *Gastroenterology*, 119(5): 1267-75.
 44. Johansson, J.F., 2004, Options for patients with irritable bowel syndrome contrasting traditional and novel serotonergic therapies. *Neurogastroentol Motil*, 16(6): 701-11.
 45. Jump, R.L., Levine, A.D., 2004, Mechanisms of natural tolerance in the intestine: implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 10(4): 462-78.
 46. Kelly, J.L., O'Sullivan, C., O'Riordain, M., O'Riordain, D., Lyons, A., Doherty, J., Mannick, J.A., Rodrick, M.L., 1997, Is circulating endotoxin the trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury? *Ann Surg*, 225(5): 530-41.
 47. Kirkup, A.J., Eastwood, C., Grundy, D., Chessell, I.P., Humphrey, P.P., 1998, Characterization of adenosine receptors evoking excitation of mesenteric afferents in the rat. *Br J Pharmacol*, 125(6): 1352-60.
 48. Kirkup, A.J., Brunsdon, A.M., Grundy, D., 2001, Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. I. Receptors on visceral afferents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280(5): G787-94.
 49. Kolios, G., Valatas, V., Ward, S.G., 2004, Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, 113(4): 427-37.
 50. Kreis, M.E., Muller, M., Zittel, T.T., Glatzle, J., Grundy, D., 2000, Mediators of neuronal activation in the rat brainstem following intestinal anaphylaxis. *Neurosci Lett*, 289(1): 45-8.
 51. Larson, H.E., Price, A.B., Honour, P., Borriello, S.P., 1978, Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet*, 1(8073): 1063-6.
 52. Layer, P., Keller, J., Mueller-Lissner, S., Ruegg, P., Löffler, H., 2005, Tegaserod: long-term treatment for irritable bowel syndrome patients with constipation in primary care. *Digestion*, 71(4): 238-44.
 53. Lin, H.C., Wan, F.J., Kang, B.H., Wu, C.C., Tseng, C.J., 1999, Systemic administration of lipopolysaccharide induces release of nitric oxide and

- glutamate and c-fos expression in the nucleus tractus solitarii of rats. *Hypertension*, 33(5): 1218-24.
54. Lindsay, G.K., Roslansky, P.F., Novitsky, T.J., 1989, Single-step, Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay for Endotoxin. *J Clin Microbiol*, 27(5): 947-51.
 55. Liu, C.Y., Jiang, W., Muller, M.H., Grundy, D., Kreis, M.E., 2005, Sensitization of mesenteric afferents to chemical and mechanical stimuli following systemic bacterial lipopolysaccharide. *Neurogastroenterol Motil*, 17(1): 89-101.
 56. Mach, T., 2004, The brain-gut axis in irritable bowel syndrome. *Med Sci Monit*, 10(6): RA 125-31.
 57. Mascarucci, P., Perego, S., Terrazino, S., De Simoni, M., 1998, Glutamate release in the Nucleus Tractus Solitarius induced by peripheral lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. *Neuroscience*, 86(4): 1285-1290.
 58. Matuk, R., Crawford, J., Abreu, M.T., Targan, S.R., Vasiliauskas, E.A., Papadakis, K.A., 2004, The spectrum of gastrointestinal toxicity and effect on disease activity of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 10(4): 352-6.
 59. Maubach, K.A., Grundy, D., 1999, The role of prostaglandins in the bradykinin-induced activation of serosal afferents of the rat jejunum in vitro. *J Physiol*, 515(1): 277-85.
 60. Mawdsley, J.E., Rampton, D.S., 2005, Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, 54(10): 1481-91.
 61. Mayer, E.A., Berman, S., Suyenobu, B., Labus, J., Mandelkern, M.A., Chang, L., 2005, Differences in brain responses to visceral pain between patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *Pain*, 115(3): 398-403.
 62. McCartney, S.A., Mitchell, J.A., Fairclough, P.D., Farthing, M.J., Warner, T.D., 1999, Selective COX-2 inhibitors and human inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 13(8): 1115-7.
 63. Mertz, H., 2002, Role of the brain and sensory pathways in gastrointestinal sensory disorders in humans. *Gut*, 51: i29-i33.
 64. Mittermaier, C., Dejaco, C., Waldhoer, T., Oefflerbauer-Ernst, A., Miehsler, W., Beier, M., Tillinger, W., Gangl, A., Moser, G., 2004, Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom Med*, 66(1): 79-84.
 65. Moncada, S., Higgs, A., 1993, The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 329: 2002-12.

66. Morteau, O., More, J., Pons, L., Bueno, L., 1993, Platelet-activating factor and interleukin-1 are involved in colonic dysmotility in experimental colitis in rats. *Gastroenterology*, 104(1): 47-56.
67. Nadeau, S., Rivest, S., 1999, Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view of the blood-brain barrier. *Neuroscience*, 93(4): 1449-64.
68. O'Connor, T.M., O'Connell, J., O'Brien, D.I., Goode, T., Bredin, C.P., Shanahan, F., 2004, The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*, 201(2): 167-80.
69. Pace, F., Molteni, P., Bollani, S., Sarzi-Puttini, P., Stockbrugger, R., Porro, G.B., Drossman, D.A., 2003, Inflammatory bowel disease versus irritable bowel syndrome: a hospital-based, case-control study of disease impact on quality of life. *Scand J Gastroenterol*, 38(10): 1031-8.
70. Palkovits, M., Baffi, J.S., Pacak, K., 1997, Stress-induced Fos-like immunoreactivity in the pons and the medulla oblongata of rats. *Stress*, 1(3): 155-68.
71. Palmer, K.R., Duerden, B.I., Holdsworth, C.D., 1980, Bacteriological and endotoxin studies in cases of ulcerative colitis submitted to surgery. *Gut*, 21: 851-4.
72. Pan, W., Banks, W.A., Kastin, A.J., 1997, Permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to interferons. *J Neuroimmunol*, 76(1-2): 105-11.
73. Parrilo, J.E., Parker, M.M., Natason, C., Suffredini, A.F., Danner, R.L., 1990, Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, vascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med*, 113: 227-42.
74. Paxinos, G., Watson, C., 1986, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second Edition, Academic Press, Sydney
75. Perner, A., Andresen, L., Normark, M., Fischer-Hansen, B., Sorensen, S., Eugen-Olsen, J., Rask-Madsen, J., 2001, Expression of nitric-oxide synthases and effects of L-arginine and L-NMMA on nitric oxide production and fluid transport in collagenous colitis. *Gut*, 49: 387-394.
76. Piran, U., Riordan, W.J., 1990, Dissociation rate constant of the biotin-streptavidin complex. *J Immunol Methods*, 133(1): 141-3.
77. Powley, T.L., 2000, Vagal input to the enteric nervous system. *Gut*, 47(Suppl. 4): iv:30-iv32.
78. Quigley, E.M., 2005, Disturbances of motility and visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome: biological markers or epiphenomenon. *Gastroenterol Clin North Am*, 34(2): 221-33, vi.
79. Riazi, K., Honar, H., Homayoun, H., Demehri, S., Bahadori, M., Dehpour, A.R., 2004, Intestinal inflammation alters the susceptibility to pentylenetetrazole-induced seizure in mice. *J Gastroenterol Hepatol*, 19(3): 270-7.

80. Richards, W., Hillsley, K., Eastwood, C., Grundy, D., 1996, Sensitivity of vagal mucosal afferents to cholecystikinin and its role in afferent signal transduction in the rat. *J Physiol*, 497 (Pt 2): 473-81.
81. Rogers, R.C., McTingue, D.M., Hermann, G.E., 1996, Vagal control of digestion: modulation by central neural and peripheral endocrine factors. *Neurosci Biobehav Rev*, 20(1): 57-66.
82. Rogers, R.C., Hermann, G.E., Travagli, R.A., 1999, Brainstem pathways responsible for oesophageal control of gastric motility and tone in the rat. *J Physiol*, 514(Pt 2): 369-83.
83. Rumi, G., Tsubouchi, R., Nishio, H., Kato, S., Mozsik, G., Takeuchi, K., 2004, Dual role of endogenous nitric oxide in development of dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *J Physiol Pharmacol*, 55(4): 823-36.
84. Santos, J., Yang, P.C., Soderholm, J.D., Benjamin, M., Perdue, M.H., 2001, Role of mast cells in chronic stress induced epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut*, 48(5): 630-6.
85. Schwarz, S.P., Blanchard, E.B., Berreman, C.F., Scharff, L., Taylor, A.E., Greene, B.R., Suls, J.M., Malamood, H.S., 1993, Psychological aspects of irritable bowel syndrome: comparisons with inflammatory bowel disease and nonpatient controls. *Behav Res Ther*, 31(3): 297-304.
86. Shapiro, R.E., Miselis, R.R., 1985, The central neural connections of the area postrema of the rat. *J Comp Neurol*, 234(3): 344-64.
87. Singer, I.I., Kawka, D.W., Schloeman, S., Tessner, T., Riehl, T., Stenson, W.F., 1998, Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 115(2): 297-306.
88. Smith, B.N., Dou, P., Barber, W.D., Dudek, F.E., 1998, Vagally evoked synaptic currents in the immature rat nucleus tractus solitarii in an intact in vitro preparation. *J Physiol*, 512(1): 149-62.
89. Soderholm, J.D., Yang, P.C., Ceponis, P., Vohra, A., Riddell, R., Sherman, P.M., Perdue, M.H., 2002, Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology*, 123(4): 1099-108.
90. Spiller, R.C., Jenkins, D., Thornley, J.P., Hebden, J.M., Wright, T., Skinner, M., Neal, K.R., 2000, Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T-lymphocytes and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut*, 47: 804-11.
91. Spiller, R.C., 2003, Treatment of irritable bowel syndrome. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 6(4): 329-37.
92. Spiller, R.C., 2005, Irritable bowel syndrome. *Br Med Bull*, 72: 15-29.
93. Stenback, A., Meurling, S., Catar, C., Lundholm, M., Wallander, J., Johnsson, C., 2002, The effect of mesenteric lymphadenectomy and Kupffer-cell depletion on bacterial translocation. *J Surg Res*, 102(2): 207-14.

94. Strunk, V., Hahnenkamp, K., Schneuing, M., Fischer, L.G., Rich, G.F., 2001, Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. *Anesth Analg*, 92(3): 681-7.
95. Swanson, L.W., 1992, *Brain Maps: Structure of the Rat Brain*, First Edition, Elsevier: Amsterdam.
96. Tinghitella, T.L., Edberg, S.C., 1991, Agglutination Tests and Limulus Assay for the Diagnosis of Infectious Diseases, in *Manual of Clinical Microbiology*, Fourth Edition, American Society of Microbiology: Washington, D.C., p. 61-72.
97. Törnblom, H., 2002, Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 123: 1972-79.
98. Ueno, T., Sugino, M., Nemoto, H., Shoji, H., Kakita, A., Watanabe, M., 2005, Effect over time of endotoxin adsorption therapy in sepsis. *Ther Apher Dial*, 9(2): 128-36.
99. Velin, A.K., Ericson, A.C., Braaf, Y., Wallon, C., Soderholm, J.D., 2004, Increased antigen and bacterial uptake in follicle associated epithelium induced by chronic psychological stress in rats. *Gut*, 53(4): 494-500.
100. Wallace, J.L., 2001, Prostaglandin biology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 30(4): 971-80.
101. Wan, W., Wetmore, L., Sorensen, C.M., Greenberg, A.H., Nance, D.M., 1994, Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. *Brain Res Bull*, 34(1): 7-14.
102. Wang, Y., Jones, J.F., Ramage, A.G., Jordan, D., 1995, Effects of 5-HT and 5-HT_{1A} receptor agonists and antagonists on dorsal vagal preganglionic neurones in anaesthetized rats: an ionophoretic study. *Br J Pharmacol*, 116(4): 2291-7.
103. Wang, Y., Ramage, A.G., Jordan, D., 1997, In vivo effects of 5-HT hydroxytryptamine receptor activation on rat nucleus tractus solitarius neurones excited by vagal C-fibre afferents. *Neuropharmacology*, 36(4-5): 489-98.
104. Watkins, L.R., Maier, S.F., Goehler, L.E., 1995, Cytokine-to-brain communication: a review and analysis of alternative mechanisms. *Life Sci*, 57(11): 1011-26.
105. Williams, R.M., Berthoud, H.R., Stead, R.H., 1997, Vagal afferent nerve fibres contact mast cells in rat small intestinal mucosa. *Neuroimmunomodulation*, 4(5-6): 266-70.
106. Willis, A., Mihalevich, M., Neff, R., Mendelowitz, D., 1996, Three types of postsynaptic glutamatergic receptors are activated in DMNX neurons upon stimulation of NTS. *Am J Physiol*, 271(6 Pt 2): R614-9.
107. Wu, C.C., Chen, S.J., Szabo, C., Thiemermann, C., Vane, J.R., 1995, Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves

- survival in rodent models of endotoxic shock. *Br J Pharmacol*, 114(8): 1666-72.
108. Yamaguchi, T., Yoshida, N., Ichiishi, E., Sugimoto, N., Naito, Y., Yoshikawa, T., 2001, Differing effects of two nitric oxide synthase inhibitors on experimental colitis. *Hepatogastroenterology*, 48(37): 118-22.
 109. Zhang, J., Rivest, S., 1999, Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation. *Eur J Neurosci*, 11(8): 2651-68.
 110. Ziegler, E.J., McCuthan, J.A., Fierer, J., Glauser, M.P., Sadoff, J.C., Douglas, H., Braude, A.I., 1982, Treatment of gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*. *N Engl J Med*, 307(20): 1225-30.

Lebenslauf

Name: Gakis
Vorname: Georgios
Geburtsdatum: 13.09.1979
Geburtsort: Nürtingen/ Baden-Württemberg
Staatsangehörigkeit: griechisch
Familienstand: ledig
Eltern: Maria und Konstantinos Gakis

Schulbildung:

1986-1990: Besuch der Grundschule in Beuren

1990-1999: Besuch des Max-Planck Gymnasiums in Nürtingen

1986-1995: Besuch der griechischen Schule in Nürtingen

Studium:

10/1999: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls
Universität in Tübingen

04.09.2001: Ärztliche Vorprüfung in Tübingen

29.08.2002: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen

15.09.2004: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen

30.11.2005: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen

Praktisches Jahr:

- 10/2004-02/2005: 1.Tertial des Praktischen Jahres an der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen
- 03/2005-06/2005: 2.Tertial des Praktischen Jahres an der Medizinischen Klinik des Kantonsspitals Aarau/ Schweiz
- 07/2005-09/2005: 3.Tertial des Praktischen Jahres an der Chirurgischen Klinik der Aristoteles-Universität in Thessaloniki/ Griechenland

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

- 12/2001: Beginn der Dissertation an der Universitätsklinik für Allgemein-und Viszeralchirurgie Tübingen (Leitung: PD Dr. med. Martin E.Kreis) mit dem Thema:
„Neuronale Aktivierung im Nucleus Tractus Solitarius nach intrajejunaler und systemischer Lipopolysaccharidgabe im Dünndarm der Ratte“
- 02/2004: Vortrag vor der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität in Tutzing/Deutschland:
„Neuronale Aktivierung im Nucleus Tractus Solitarius nach intrajejunaler und systemischer Lipopolysaccharidgabe im Dünndarm der Ratte“
- 05/2004: Posterpräsentation beim Digestive Disease Week in New Orleans/USA:
“Neuronal activation in the nucleus tractus solitarius following intrajejunal and systemic lipopolysaccharide exposure in rat”
- 09/2004: Posterpräsentation bei der European Society of Neurogastroenterology in Cambridge/Grossbritannien:
“Neuronal activation in the nucleus tractus solitarius following intrajejunal and systemic lipopolysaccharide exposure in rat”

