

**NEUROPEPTIDGEGHALT DER BOVINEN  
LABMAGENWAND IN ABHÄNGIGKEIT VON  
RASSE UND VERLAGERUNGSZUSTAND**

**MARLENE SICKINGER**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique**  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine  
(Innere Medizin und Chirurgie)  
und dem  
Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Betreuer: Prof. Dr. K. Doll  
Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser**

# **Neuropeptidgehalt der bovinen Labmagenwand in Abhängigkeit von Rasse und Verlagerungszustand**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von  
**Marlene Sickinger**  
Tierärztin aus Heilbronn

Gießen 2007

gefördert durch ein Stipendium der Engemann-Stiftung

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher**

**Gutachter: Prof. Dr. K. Doll  
Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser**

**Tag der Disputation: 25. Juni 2007**

# **Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis .....	4
Tabellenverzeichnis .....	5
<b>1 Einleitung und Zielsetzung der Studie .....</b>	<b>6</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Innervation des Labmagens .....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Extrinsisches Nervensystem.....	10
2.1.2 Intrinsisches Nervensystem.....	11
<b>2.2 Neuropeptide.....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Substanz P .....	16
2.2.2 Vasoaktives Intestinales Polypeptid.....	19
2.2.3 Neurofilament 200.....	22
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Untersuchte Tiere und Probenentnahmen.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Untersuchungsmethoden .....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Fixierung der Proben und Anfärbung der histologischen Schnitte .....	26
3.2.2 Immunhistochemie .....	26
3.2.2.1 Allgemeines zur Methode (ABC-Methode).....	26
3.2.2.2 Verwendete Antikörper und durchgeführte Kontrollen .....	27
3.2.2.3 Immunhistochemische Färbeprotokolle zum Peptidnachweis .....	31
3.2.2.4 Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin.....	35
3.2.2.5 Lichtmikroskopische Auswertung und digitale Erfassung der Bilder .....	35
3.2.3 Morphometrie.....	35
3.2.3.1 Multiple Image Alignment (MIA).....	35
3.2.3.2 Festlegung der Messpunkte für die Schichtdickenvermessung.....	36
3.2.3.3 Vermessung der immunreaktiven Flächen.....	36
<b>4 Statistische Auswertung.....</b>	<b>37</b>
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1 Ergebnisse der Schichtdickenvermessung .....</b>	<b>38</b>
<b>5.2 Ergebnisse der SP-Färbung.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3 Ergebnisse der VIP-Färbung .....</b>	<b>44</b>
<b>5.4 Ergebnisse der NF 200-Färbung .....</b>	<b>47</b>
<b>5.5 Verhältnisse der IR-Flächen für SP zu den IR-Flächen für VIP bei Proben von         Holstein-Kühen mit und von solchen ohne Labmagenverlagerung.....</b>	<b>50</b>
<b>5.6 Anteile der IR-Flächen für SP und für VIP an der IR-Fläche für NF 200         (Gesamtnervenfärbung) .....</b>	<b>51</b>
<b>5.7 Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung von Labmagenbiopstat-         Schnitten aus Kühen mit experimentell induzierter Labmagen-Dilatation.....</b>	<b>54</b>

<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>60</b>
<b>6.1</b>	<b>Kritische Anmerkungen zur Methode.....</b>	<b>60</b>
<b>6.2</b>	<b>Bedeutung der Ergebnisse der Immunhistochemie .....</b>	<b>62</b>
6.2.1	Schichtdickenvermessung .....	62
6.2.2	Neuropeptidgehalt der Labmagenwand .....	63
6.2.3	Schlussfolgerungen .....	70
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Summary .....</b>	<b>74</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>93</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
Ak	Antikörper
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan-3-triethoxysilylpropylamin
BE	Base Excess
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclic Adenosine MonoPhosphate, cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CCK	Cholecystokinin
cGMP	cyclic Guanosine MonoPhosphate, cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat
DFV	Deutsches Fleckvieh
DH	Deutsche Holsteins
d. h.	das heißt
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENS	Enterisches Nervensystem
Fa.	Firma
GRF	Growth hormone-Releasing Factor
i.m.	intramuskulär
IR	immunreaktiv
i.v.	intravenös
kd	Kilodalton
LM	Labmagen
LMV	Labmagenverlagerung
MIA	Multiple Image Alignment
MMC	Migrating Myoelectric Complex
mRNA	messenger RiboNucleic Acid, messenger Ribonukleinsäure
N.	Nervus
NANC	Non Adrenerg Non Cholinerg

NEP	Neutrale Endopeptidase
NF 200	Neurofilament 200
NPY	Neuropeptid Y
OP	Operation
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PAPX	Paramediane Abomasopexie
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PHI	Peptid mit Histidin am N-Terminus und Isoleucin am C-Terminus
PP	Pankreatisches Polypeptid
RIA	RadioImmunoAssay
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SF	Streufaktor
SP	Substanz P
STC	Slow Transit Constipation
Tab.	Tabelle
TN	Tiernummer
UC	Ulcerative Colitis
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
VPAC	VIP-Rezeptor
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Einheiten

a	Jahr
cm	Zentimeter
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
I.E.	Internationale Einheit
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Monat
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{m}^2$	Quadratmikrometer
$\mu\text{l}$	Mikroliter

# Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Lokalisation des Magenbandes am Labmagen</i>	25
<i>Abbildung 2: Schema der indirekten Immunhistochemie</i>	27
<i>Abbildung 3: Positivkontrolle für die Färbung auf SP</i>	29
<i>Abbildung 4: Positivkontrolle für die Färbung auf VIP</i>	29
<i>Abbildung 5: Positivkontrolle für die Färbung auf NF 200</i>	30
<i>Abbildung 6: Negativkontrolle an Labmagengewebe</i>	30
<i>Abbildung 7: Spezifität des polyklonalen VIP-Antikörpers (Peptidblockierung)</i>	31
<i>Abbildung 8: Vermessung der Einzelflächen</i>	37
<i>Abbildung 9: Gesamtdicke der Labmagenwand</i>	40
<i>Abbildung 10: Anfärbung von SP in der Tunica muscularis</i>	42
<i>Abbildung 11: SP-IR-Flächen im Rassenvergleich</i>	43
<i>Abbildung 12: SP-IR-Flächen bei DH-Kühen mit und bei solchen ohne LMV</i>	43
<i>Abbildung 13: Anfärbung von VIP in der Tunica muscularis</i>	45
<i>Abbildung 14: VIP-IR-Flächen im Rassenvergleich</i>	45
<i>Abbildung 15: VIP-IR-Flächen bei DH-Kühen mit und bei solchen ohne LMV</i>	46
<i>Abbildung 16: Anfärbung von NF 200 in der Tunica muscularis</i>	48
<i>Abbildung 17: NF 200-IR-Flächen im Rassenvergleich</i>	48
<i>Abbildung 18: NF 200-IR-Flächen bei DH-Kühen mit und bei solchen ohne LMV</i>	49
<i>Abbildung 19: Verhältnis der IR-Flächen für SP und VIP zueinander</i>	51
<i>Abbildung 20: Anteil der IR-Flächen für SP und VIP an der NF 200-IR-Fläche</i>	53
<i>Abbildung 21: SP-IR-Flächen bei 3 DH-Kühen mit und ohne Magenband (MB)</i>	55
<i>Abbildung 22: SP-IR-Flächen bei DH-Kühen mit MB und bei solchen mit LMV</i>	58
<i>Abbildung 23: VIP-IR-Flächen bei DH-Kühen mit MB und bei solchen mit LMV</i>	59
<i>Abbildung 24: Entwicklung des Base Excess nach Magenband-OP</i>	97

# Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Antisera für die Immunhistochemie</i>	28
<i>Tabelle 2: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von SP</i>	32
<i>Tabelle 3: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von VIP</i>	33
<i>Tabelle 4: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von NF 200</i>	34
<i>Tabelle 5: Angaben zu den 20 Kühen der Rasse Deutsches Fleckvieh, bei denen nach der Schlachtung Labmagen-Bioptate entnommen wurden (Datenblatt zur Probenentnahme I)</i>	93
<i>Tabelle 6: Angaben zu den 20 Kühen der Rasse Deutsche Holsteins, bei denen nach der Schlachtung Labmagen-Bioptate entnommen wurden (Datenblatt zur Probenentnahme II)</i>	94
<i>Tabelle 7: Angaben zu den 20 Kühen der Rasse Deutsche Holsteins, bei denen während einer paramedianen Abomasopexie zur Behebung einer linksseitigen Labmagenverlagerung Bioptate aus dem Labmagen entnommen wurden (Datenblatt zur Probenentnahme während der Operation)</i>	95
<i>Tabelle 8: Angaben zu den 3 Kühen der Rasse Deutsche Holsteins, bei denen vor und 72 Stunden nach experimentellem Anlegen eines Magenbandes Bioptate aus dem Labmagen entnommen wurden (Datenblatt zur Probenentnahme bei den Holstein-Kühen mit Magenband)</i>	96
<i>Tabelle 9: Verwendetes Verbrauchsmaterial für die OP</i>	101

# 1 Einleitung und Zielsetzung der Studie

Labmagenverlagerungen bei Rindern wurden erstmals in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts in bemerkenswerter Anzahl beobachtet (Begg 1950, Müller 1953, Moore et al. 1954, Dirksen 1961a, b). Seither hat ihre Häufigkeit kontinuierlich zugenommen (Dirksen 2002). Untersuchungen in hessischen Holstein-Herden ergaben eine mittlere Laktationsinzidenz von 2,3 % (Doll 2007). Aus norddeutschen Betrieben werden durchschnittliche Inzidenzen von 1,6 % mitgeteilt (Wolf et al. 2001a, b), aus den neuen Bundesländern solche von 1,75 %, mit Höchstwerten in einzelnen Betrieben bis zu 7,5 % (Poike und Fürll 1998). In Nordamerika gilt inzwischen das Auftreten einer Labmagenverlagerung bei bis zu 3 % der Kühe pro Laktation als „normal“ (Whitmore 2004). Die durchschnittliche Laktationsinzidenz liegt dort mittlerweile bei 5 %, in einzelnen Herden aber auch schon deutlich über 10 %, in Extremfällen sogar über 20 % (Dawson et al. 1992; Pehrson und Stengärde, 1998).

Anhand epidemiologischer und experimenteller Studien wurden eine Reihe von Risikofaktoren identifiziert, welche das Auftreten von Labmagenverlagerungen begünstigen, doch ist die eigentliche Ursache nach wie vor unbekannt. Bereits Dirksen (1961a, b), und nach ihm eine Vielzahl weiterer Autoren, hatte postuliert, dass der Aufgasung des Labmagens eine Motilitätsstörung – im Sinne einer Hypo- oder Atonie – vorausgeht. Diese soll verhindern, dass das mit dem Vormageninhalt in den Labmagen übertretende oder hier selbst gebildete Gas über den Psalterkanal zurück in die Vormägen entweicht bzw. über den Pylorus in den Dünndarm weitertransportiert wird. Die Gasblase bewirkt, dass der Labmagen-Fundus unter dem Schleudermagen und ventralen Pansenblindsack hindurch auf die linke Seite gleitet und den Labmagen mit zunehmender Gasfüllung (wie einen Luftballon) zwischen Pansen und Bauchwand nach oben zieht (Dirksen 2002).

Betroffen sind vor allem die klassischen Milchrassen, wie Holstein Friesian und Deutsche Holsteins (Geishauser et al. 1996, Martin et al. 1978, Wolf et al. 2001a, b), Simmental-Red-Holstein-Kreuzungen (Eicher et al. 1999), Brown Swiss, Ayrshire und Guernsey (Constable et al. 1992) sowie Jerseys (Jubb et al. 1991). Deutlich seltener finden sich Labmagenverlagerungen bei den Mastrinderrassen sowie bei Deutschen Fleckvieh-Kühen (Doll 2007), beim Schweizerischen Braunvieh (Eicher et al. 1999) und beim Schwedischen Rotvieh (Stengärde u. Pehrson 2002).

Inzwischen gilt es als weitgehend gesichert, dass beim Auftreten von Labmagenverlagerungen – neben Fütterungseinflüssen (Fürll und Krüger 1999, Jakobsen und Riddell 1995, Neu-Zuber

2005, Shaver 1997, Stengärde und Pehrson 2002, Van Winden et al. 2003), Stoffwechselstörungen (Holtenius et al. 1998 u. 2000, Kuiper 1991, Pravettoni et al. 2004, Smith et al. 1997, Sustronck 1998, Van Winden et al. 2003) und verschiedenen Belastungssituationen (Poike und Fürll 1998, Wolf et al. 2001 a, b, Stengärde und Pehrson 2002) – vor allem genetischen Komponenten eine sehr wesentliche Bedeutung zukommt (Jubb et al. 1991, Lyons et al. 1991, Constable et al. 1992, Uribe et al. 1995, Geishauser et al. 1996, Wolf et al. 2001a, b, Ricken et al. 2004). In verschiedenen Studien wurden meist Heritabilitäten in der Größenordnung von  $h^2 = 0,2$  bis  $0,3$  geschätzt. Nur wenige Autoren, wie etwa Van Dorp et al. (1998), konnten diesbezüglich keinen Zusammenhang nachweisen.

Nach wie vor ist allerdings nicht geklärt, welches anatomische oder funktionelle Korrelat dieser Disposition einzelner Rassen und Individuen für eine Labmagenverlagerung zugrundeliegt. Bisherige Studien konnten weder bezüglich der Innervation des Labmagens noch hinsichtlich der Dicke der Labmagenwandmuskulatur signifikante Unterschiede bei Tieren mit und solchen ohne Labmagenverlagerung feststellen (Clausen 1999, Geishauser 1995b). Ein Rassenvergleich hinsichtlich dieses Kriteriums wurde allerdings Literaturangaben zufolge bisher offensichtlich noch nicht durchgeführt. Immunhistologische Studien am Magen-Darm-Trakt von Wiederkäuern liegen nur in begrenztem Umfang vor (Balemba et al. 1999, Baltazar et al. 1998, Groenewald 1994, Guilloteau et al. 1997, Kitamura et al. 1986 und 1987, Myojin et al. 2000, Pfannkuche et al. 2002a, b und 2003, Soehartono et al. 2001 und 2002, Teixeira et al. 1998, Vassileva et al. 1987, Yamamoto et al. 1994 a, b). Über die physiologische Bedeutung der Neuropeptide „Vasoaktives Intestinales Polypeptid“ (VIP) und „Substanz P“ besteht speziesübergreifend jedoch weitgehend Einigkeit (Costa et al. 1987, Dockray 1987, Fahrenkrug 1993).

Es war daher das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit, anhand histomorphometrischer und immunhistochemischer Untersuchungen mögliche Faktoren zu ermitteln, welche die beobachteten Rassenunterschiede wie die interindividuell variierende Disposition hinsichtlich des Auftretens von Labmagenverlagerungen erklären könnten. Als Mittel der Wahl für die Darstellung der Nervenfasern in der Tunica muscularis des Labmagens und die in den Fasern enthaltenen Neuropeptide wurde die Immunhistochemie gewählt. Damit sollten immunreaktive Fasern für Substanz P als exzitatorisches und für VIP als inhibitorisches Neuropeptid nachgewiesen werden. Der Gesamtgehalt an Nervenfasern wurde durch eine immunhistochemische Färbung des Neurofilament 200 ermittelt.

Durch die Gegenüberstellung der Gesamtnervendichte und der Dichte immunreaktiver Fasern für SP und VIP sollte die Frage untersucht werden, ob bei verlagertem Labmagen eine abweichende peptiderge Versorgung der Nervenstrukturen in der Labmagenwand vorliegt.

Die histomorphometrischen Untersuchungen erstreckten sich auf die Dicke der Labmagenwandschichten und die Flächenbestimmung der für Neuropeptide immunreaktiven Nervenfasern im Vergleich zur gesamten Fläche der Nervenfasern.

Zusammenfassend sollten mit dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

Bestehen Unterschiede in der peptidergen Innervation des Labmagens zwischen Kühen der Rassen Deutsche Holsteins und Deutsches Fleckvieh?

Unterscheidet sich die peptiderge Innervation des Labmagens von Deutschen-Holstein-Kühen mit Labmagenverlagerung von solchen ohne Labmagenverlagerung?

Bestehen hinsichtlich der Schichtdicken der Labmagenwand Unterschiede zwischen den beiden Rassen oder zwischen gesunden Kühen im Vergleich zu solchen mit einer Labmagenverlagerung?

Handelt es sich bei den eventuell nachzuweisenden Unterschieden um die Ursache oder eher um die Folge einer Labmagenverlagerung?

In welchem Umfang werden die Ergebnisse durch die Art der Entnahmetechnik (nach Schlachtung vs. bei Operation) beeinflusst?

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Innervation des Labmagens

Die Innervation des Magen-Darm-Traktes wird über das vegetative, extrinsische Nervensystem und das enterische, intrinsische Nervensystem bewerkstelligt. Dabei übertrifft die Zahl der intrinsischen Nervenzellen die der extrinsischen Nervenzellen bei weitem. Im enterischen Nervensystem (ENS) treten folgende Typen von Nervenzellen auf: Sensorische Neurone für mechanische und chemische Reize und für die Weiterleitung an das ZNS bzw. innerhalb des ENS, Interneurone zur Kommunikation innerhalb des ENS und Motoneurone, die sich wiederum weiterunterteilen lassen in Muskel-, Sekreto- und Vaso-Motoneurone. Letztere dienen der Innervation der Effektorsysteme (Schemann 2000).

Das vegetative Nervensystem besteht aus übergeordneten, im Zwischenhirn lokalisierten Zentren, aus primären Zentren im Mittelhirn und in der Medulla oblongata sowie in der Pars intermedia der grauen Substanz des Rückenmarks, und schließlich aus dem peripheren vegetativen System (Böhme 1992, Diener 2000).

Hier werden drei funktionelle Teile unterschieden: das intramurale, das sympathische und das parasympathische System. Sympathikus und Parasympathikus bestehen aus zwei Neuronenketten, nämlich aus dem sympathischen Thorakolumbalstrang mit Ganglien und den parasympathischen Fasern aus Hirnstamm und Sakralmark (Diener 2000). Die zentralen, präganglionären Neurone des Sympathikus und auch diejenigen des Parasympathikus benutzen für die Weiterleitung der Erregung an den Synapsen mit den postganglionären Neuronen Acetylcholin (ACh) als Transmitter. Die Bindung von ACh an den postganglionären Neuronen erfolgt mittels nicotinerger ACh-Rezeptoren (Diener 2000). Während präganglionär sowohl im Sympathikus als auch im Parasympathikus ACh als Transmitter fungiert, erfolgt postganglionär die Übertragung durch verschiedene Transmitter; beim Sympathikus ist der Transmitter Noradrenalin, beim Parasympathikus ACh (Diener 2000). Im Magen-Darm-Trakt führt die Bindung von Noradrenalin an  $\alpha_2$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren zu einer Motilitätshemmung, während die Bindung von ACh an muscarinergen  $M_3$ -Rezeptoren zu einer Motilitätssteigerung führt (Diener 2000).

Wegen einer gewissen Selbständigkeit in funktioneller Hinsicht wird das vegetative Nervensystem auch als autonomes Nervensystem bezeichnet (Böhme 1992).

Die enge Verbindung des autonomen Nervensystems zum ZNS und die dadurch bedingte Beeinflussbarkeit gewährleistet dessen Hauptaufgabe, nämlich die Tätigkeit der inneren Organe den ständig wechselnden Umweltbedürfnissen anzupassen. In seiner Funktion wird das autonome Nervensystem von den endokrinen Drüsen unterstützt. Eine große Gruppe dieser Zellen produziert als Wirkstoffe Neuropeptide, welche als Transmitter auch in Neuronen vorkommen (Böhme 1992).

Die gastrointestinalen endokrinen Zellen kommen in den Oberflächen- und Drüsenepithelien des Magens und des Darmes vor. Sie produzieren physiologisch hochaktive Substanzen, u. a. zahlreiche Polypeptidhormone, welche die Verdauungstätigkeit regulieren und den Kohlenhydratstoffwechsel beeinflussen. Man unterscheidet zwischen offenen und geschlossenen Zelltypen, je nachdem ob die Zelle das Lumen erreicht oder nicht (Mosimann u. Kohler 1990). Bisher konnten über 14 gastrointestinale Endokrinozyten nachgewiesen werden (Rindi et al. 2004).

## **2.1.1 Extrinsisches Nervensystem**

### **Nervus vagus**

Der N. vagus ist mit seinen efferenten Fasern für die motorischen Vorgänge des Magens verantwortlich und erreicht die Bauchhöhle als Truncus vagalis dorsalis und ventralis. Er zeigt beim Wiederkäuer ein wesentlich anderes Aufzweigungsmuster als bei Tieren mit einhöhligen Magen. Beide Hauptstämme sind durch den meist links am Ösophagus gelegenen Ramus communicans miteinander verbunden (Budras u. Wünsche 2002, Church 1988, Hofmann u. Schnorr 1982).

### **Afferente parasymphatische Fasern und Endigungen**

Die motorische Vormagentätigkeit wird reflektorisch durch Reize des Mageninhaltes gesteuert, die über afferente Vagusfasern dem motorischen Zentrum in der Medulla oblongata zugeleitet werden (Hofmann u. Schnorr 1982). In bestimmten Abschnitten der Magenwand treten afferente Nervenendigungen mit Mechano- und Chemorezeptoren in Kontakt, welche

den Dehnungszustand bzw. die Anwesenheit von Substraten und Elektrolyten weiterleiten (Diener 2000, Phillips u. Wingate 2002).

### **Nervus sympathicus**

Die vom Plexus coeliacus kommenden sympathischen Nerven, deren efferenten Fasern eine gewisse hemmende Funktion zugeschrieben wird, erreichen den Magen gemeinsam mit den Arterien (Hofmann u. Schnorr 1982).

### **Sympathische afferente Fasern und Endigungen**

Ganz allgemein gelten die visceroafferenten Fasern des Sympathikus als „Schmerznerve“. Dass dies auch beim Wiederkäuermagen zutrifft, beweisen die überempfindlichen Hautregionen bei Fremdkörpererkrankungen des Rindes, die sogenannten „Head`schen Zonen“ (Hofmann u. Schnorr 1982, Diener 2000).

Die afferenten sympathischen Nerven nehmen ihren Ursprung für den Magen aus Rückenmarkssegmenten (Hofmann u. Schnorr 1982).

## **2.1.2 Intrinsisches Nervensystem**

Das intramurale Nervensystem (Wandnervensystem) besteht aus feinen Nervennetzen, die in Organen bzw. in Organwänden gelegen sind und zahlreiche mikroskopisch kleine Ganglien enthalten (Böhme 1992). Das intrinsische Nervensystem enthält Motoneurone der glatten Muskulatur und der Mukosa. Die Innervation erfolgt durch die postganglionären Fasern des ENS und nicht direkt durch sympathische und parasympathische Fasern, die synaptisch mit den Ganglien des ENS verbunden sind (Phillips u. Wingate 2002).

Die terminalen Plexus und Ganglien sind zwar nicht ausschließlich, aber doch überwiegend Umschaltstellen vom 1. auf das 2. Neuron im parasympathischen System. Sympathische Fasern haben Kontakt zu den Netzen (Böhme 1992).

Das Zusammenspiel zwischen vegetativem System und ENS ist im Sinne einer Impulsmodulation zu verstehen, wobei auch lokale Afferenzen existieren, die kurze, im Organ lokalisierte oder bis zu den Prävertebralganglien des Sympathikus reichende Reflexbögen

herstellen (Böhme 1992). So ziehen sensorische Afferenzen von Mukosa und Muskulatur zum Gangliengeflecht und vermitteln wahrscheinlich Reize, die bei Berührung der Mukosa und bei Dehnung der Muskulatur entstehen. Das enterische Nervensystem besteht also aus einer Vielzahl intrinsischer Neuronen wie auch aus den Fortsätzen sowohl afferenter extrinsischer Neuronen (spinale und craniale sensorische Neuronen) als auch efferenter (sympathische und parasympathische Neuronen) extrinsischer Neuronen (Costa et al. 1987, Phillips u. Wingate 2002).

Das intramurale System im weiteren Sinne findet sich in den meisten inneren Organen. Im engeren Sinne bezieht sich diese Bezeichnung allerdings nur auf die Lokalisation im Magen-Darm-Trakt (Böhme 1992).

Der Plexus entericus mit seinen Ganglien liegt in mehreren miteinander in Verbindung stehenden Schichten als Plexus submucosus (MEISSNER) und Plexus myentericus (AUERBACH) in der Wand des Magen-Darm-Traktes und stellt einen weitgehend selbständigen Reflexapparat dar (Böhme 1992, Schemann 2000).

Die Plexus verleihen diesen Organen eine gewisse Autonomie, werden aber *intra vitam*, ähnlich wie das Reizleitungssystem des Herzens, den Bedürfnissen des Gesamtorganismus entsprechend vom Sympathikus und Parasympathikus gesteuert. Über parasympathische Nerven (N. vagus und N. splanchnicus) werden wahrscheinlich Informationen über muskuläre Bewegungen und Darminhalt geleitet, während die sympathischen (spinalen) Afferenzen zur Übermittlung schädigender Reize (Dehnung, Entzündung) dienen (Böhme 1992; Phillips u. Wingate 2002).

Der Sympathikus vermittelt am Magen-Darm-Trakt eine Hemmung der Peristaltik, während der Parasympathikus die Peristaltik anregt (Böhme 1992).

Gängige Konzepte betrachten das enterische Nervensystem als ein unabhängiges integratives System mit strukturellen und funktionellen Eigenschaften, die denen des ZNS analog sind. Vom ZNS werden Steuersignale an das enterische Nervensystem entlang von sympathischen und parasympathischen Leitungsbahnen übermittelt. Das ENS funktioniert dabei selbst wie eine Art Gehirn, das die gastrointestinalen Funktionen koordiniert und programmiert (Wood 1987).

Die Komplexität des neuronalen Netzwerkes scheint zu der Vielfalt der gastrointestinalen Funktionen zu passen, die vom ENS gesteuert werden. Die entsprechenden neuronalen

Schaltkreise befinden sich im ENS, da diese Funktionen auch dann gewährleistet sind, wenn der Gastrointestinaltrakt vom ZNS getrennt ist. Die Koordination intrinsischer und extrinsischer neuronaler Reflexe resultiert in einem adäquaten Durchsatz des luminalen Inhaltes durch die verschiedenen Abschnitte des Verdauungssystems (Costa et al. 1987).

## 2.2 Neuropeptide

Neuropeptide sind Peptide, die im Perikaryon synthetisiert werden und langsame, langanhaltende endo- und parakrine Effekte vermitteln (Sehmsdorf 2001).

Die Bedeutung der klassischen Neurotransmitter Acetylcholin und Noradrenalin ist schon seit längerer Zeit bekannt. Des Weiteren wurde entdeckt, dass im Magen-Darm-Trakt auch non-adrenerge non-cholinerge Neurotransmitter vorkommen. Die ersten überzeugenden Hinweise stammen aus pharmakologischen Studien, in denen inhibitorische synaptische Potentiale durch elektrische Stimulation erzeugt wurden und diese sich als resistent gegen Antagonisten der cholinergen und adrenergen Übertragung erwiesen (Faustini 1976, Grider et al. 1985, Vassileva et al. 1978).

Bei der weitaus größten Gruppe potentieller Transmitter im enterischen Nervensystem handelt es sich um Neuropeptide, welche eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Verdauungsfunktionen spielen. Der Nachweis solcher Neuropeptide in Neuronen durch Immunhistochemie war dabei in vielerlei Hinsicht Ausgangspunkt dafür, sie als potentielle Transmitter in Betracht zu ziehen (Costa et al. 1987, Dockray 1987, Wood 1987).

In den enterischen Neuronen finden sich mindestens 9 verschiedene Gruppen chemisch charakterisierter Peptide. Sie werden durch Depolarisationsstimuli freigesetzt und lösen dann biologische Effekte aus, die in verschiedenen Abstufungen bekannte physiologische Vorgänge nachahmen. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist eine ganze Gruppe von Neuropeptiden an der Kontrolle der wichtigsten gastrointestinalen Funktionen (Sekretion, Motilität und Absorption) beteiligt (Dockray 1987, Phillips u. Wingate 2002).

Sekretin war das erste Neurohormon, das in einem Bioassay entdeckt und von Mayliss und Starling im Jahr 1905 beschrieben wurde (Phillips u. Wingate 2002). Auf diese Entdeckung und die damit verbundene Erkenntnis der Beeinflussbarkeit des Magen-Darm-Traktes durch Peptide folgten weitere Untersuchungen.

Bis zum Jahre 1970 galten Gastrin, Sekretin und Cholecystokinin (CCK) als die verantwortlichen Substanzen für die Kontrolle der Darmfunktion. Nach der Entdeckung weiterer Peptide wurden Konzentrationsveränderungen dieser „Darmhormone“ im Plasma als Hauptkontrollmechanismen für die sekretorische und motorische Funktion des Darmes angesehen. Heute geht man aber davon aus, dass die Konzentrationsveränderungen vieler Peptide im Plasma eher Funktionsänderungen der Magen-Darm-Funktion widerspiegeln als diese zu bewirken (Phillips und Wingate 2002).

Nachfolgend eine Auflistung der wichtigsten bislang bekannten Regulatorpeptide oder gastrointestinalen Hormone sowie deren Funktion (Phillips u. Wingate 2002):

- Gastrin stimuliert im Magen die Sekretion von Salzsäure (Belegzellen) und Pepsinogen (Hauptzellen).
- Somatostatin hemmt die Ausschüttung von Gastrin und einer Reihe weiterer Hormone; es moduliert dadurch u. a. die Belegzellenreaktion.
- Cholecystokinin (CCK) führt zur Kontraktion der Gallenblase und wirkt wahrscheinlich sowohl im Darm als auch im Gehirn als Neurotransmitter.
- Das pankreatische Polypeptid (PP) hemmt die Hydrogencarbonat- und Enzymsekretion des exokrinen Pankreas; es gilt als Marker für dessen vagale Stimulation.
- Substanz P ist ein wichtiger Neurotransmitter im ENS.
- Motilin spielt möglicherweise eine Rolle für die Entstehung des kontraktilel Mustere der Phase III der MMC im Magen und Duodenum.
- Das VIP (Vasoaktives Intestinales Polypeptid) ist ein wichtiger Neuromodulator oder Neurotransmitter des Darmes; so sind u. a. beim Menschen die Krankheiten Morbus Hirschsprung (enges Darmsegment infolge kongenitaler Aganglionose ohne Peristaltik mit konsekutiver prästenotischer Dilatation) und Achalasie (neuromuskuläre Störung von glattmuskulären Hohlorganen) durch einen lokalen Mangel an VIP-enthaltenden Neuronen charakterisiert (Pschyrembel 2004).
- Neuropeptid Y ist ein in Gehirn und Darm vorkommendes Regulatorpeptid; es ist wahrscheinlich von Bedeutung für die Regulation von Appetit und Sättigungsgefühl.
- Serotonin (5-HT; 5-Hydroxytryptamin) ist ein wichtiger Neurotransmitter und / oder Neuromodulator im ENS.

Die bloße Anwesenheit eines Peptids in einem Neuron gilt allerdings noch nicht als Beweis für dessen funktionelle Bedeutung als Messenger-Molekül. Zum Beweis der Messengerfunktion eines bestimmten Peptids oder eines anderen Moleküls ist der Nachweis erforderlich, dass diese durch einen physiologischen Stimulus freigesetzt werden und dass das Peptid als Ligand für einen Rezeptor der Zielzelle fungiert (Wood 1987).

Nach Dockray (1987) kann eine Substanz als Neurotransmitter in Betracht gezogen werden, wenn sie folgende Kriterien erfüllt:

1. Die Substanz findet sich in Neuronen, und es existieren Mechanismen für deren Biosynthese in diesen Neuronen.
2. Sie tritt in den Nervenendigungen konzentriert auf und kann aus ihnen durch depolarisierende Stimuli mittels eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Mechanismus freigesetzt werden.
3. Die Applikation der Substanz verursacht einen Effekt, welcher verdoppelt wird, wenn endogenes Material freigesetzt wird.
4. Antagonisten zeigen ähnliche Wirkung auf endogenes und exogenes Material.
5. Es gibt Mechanismen für den Ausfall, die Wiederaufnahme oder für das Entfernen der Substanz.

Im Großen und Ganzen werden diese Kriterien von verschiedenen der hauptsächlich auftretenden Neuropeptide zufriedenstellend erfüllt (Dockray 1987).

Zwei oder mehr potentielle Transmitter können in einer Zelle gefunden werden (Costa et al. 1987, Dockray 1987, Pfannkuche 2002a, 2002b und 2003, Vittoria et al. 2000).

Gastrointestinale Peptide gehören häufig einer ausgedehnten Peptidfamilie an, deren Mitglieder Hormone und Transmitter mit den verschiedensten Eigenschaften umfassen können. Einzelne Peptide könnten sowohl als Hormone als auch als Transmitter fungieren (Dockray 1987).

### **Peptid-Biosynthese**

Die Proteinsynthese in den Neuronen erfolgt im Zellkörper. Die Peptide werden in Granula gepackt und intraaxonal zu den Nervenendigungen transportiert, wo sie gespeichert und bei Bedarf freigesetzt werden (Knipping 2003, Sehmsdorf 2001). Alle Peptide werden zuerst als große Vorläufermoleküle synthetisiert, die durch Spaltung und andere Modifikationsschritte

in das aktive Produkt überführt werden (Sehmsdorf 2001). Es können zwei oder auch mehr offensichtlich nicht miteinander in Verbindung stehende Peptide oder klassische Transmitter nebeneinander in ein und demselben Neuron produziert werden (Dockray 1987, Fahrenkrug 1993).

Offensichtlich fungiert keines der Peptide, die in den Neuronen und Nervenfasern des Magen-Darm-Trakts lokalisiert sind, ausschließlich als enterischer Neurotransmitter. Alle finden sich auch an anderen Stellen des Körpers in Neuronen oder in endokrinen Zellen (Baltazar et al. 1998, Bishop et al. 1982, Corcoran et al. 2000, Nishi et al. 2000). Peptide, wie z. B. Substanz P, treten sowohl in Nerven als auch in den endokrinen Zellen des Magen-Darm-Trakts auf (Myojin et al. 2000, Pearson 1994).

Die Wirkungsmechanismen der Neuropeptide sind prinzipiell dieselben wie die aller anderen Transmitter und Peptidhormone. Sie binden zuerst an Zelloberflächenrezeptoren und können danach entweder eine Öffnung oder auch einen Verschluss von Ionenkanälen, eine Änderung des cyclischen Nucleotidlevels oder der intrazellulären Calciumkonzentration und des damit verbundenen Phosphatidylinositol-Systems bewirken (Dockray 1987, Schemann 2000).

## **Peptid-Familien**

Die wichtigsten Familien der gastrointestinalen Peptide sind die Tachykinine (SP, Neurokinin A und Neurokinin B), die VIP / PHI-Gruppe, die Opiode, die Bombesine, Gastrin, CCK, NPY und das Pankreatische Polypeptid (Dockray 1987, Sehmsdorf 2001).

### **2.2.1 Substanz P**

Das Undecapeptid SP wurde 1931 als das erste gastrointestinale Neuropeptid der Tachykinin-Familie von v. Euler und Gaddum in Extrakten aus Pferdedärmen entdeckt (Dockray 1987, Sehmsdorf 2001).

Dieselbe Substanz wurde auch im Gehirn gefunden und zeigte potente vasodilatatorische Eigenschaften (Cuello et al. 1979, Dockray 1987, Faustini 1976).

Ein wichtiger Hinweis für das Vorkommen in Magennerven wurde dadurch erbracht, dass in aganglionären Segmenten des Colon bei Morbus Hirschsprung eine verminderte Substanz-P-Bioaktivität entdeckt wurde (Dockray 1987).

SP kommt im Gehirn und im Rückenmark ebenso weitverbreitet vor wie in den gastrointestinalen Nerven und in den mukösen endokrinen Zellen. Die höchsten Konzentrationen von SP finden sich allerdings in intrinsischen Neuronen, etwas weniger auch in den afferenten Fasern (Baltazar 1998, Cuello et al. 1979, Dockray 1987, Improta u. Broccardo 2006).

Chang und Leeman (1971) isolierten das Peptid aus dem bovinen Hypothalamus und ermittelten die Sequenz.

Die Aminosäuresequenz von Substanz P aus dem Gehirn und aus dem Gastrointestinaltrakt von Rindern ist identisch mit der Sequenz des Peptids aus dem Magen-Darm-Trakt des Pferdes (Dockray 1987).

Erspamer (1949) isolierte aus der Haut verschiedener Amphibienspezies einzelne Peptide mit ähnlicher biologischer Aktivität: Physalamin, Eleudoisin, Kassinin, Phyllomedusin, Uperolein, Hylambatin. Er bezeichnete diese Peptide als Tachykinine, da sie schnelle Kontraktionen der glatten Muskulatur im Magen-Darm-Trakt hervorrufen.

### **Freisetzung und Metabolismus von Substanz P**

Substanz P wird zum größten Teil von afferenten gastrointestinalen Neuronen freigesetzt. Die Freisetzung erfolgt nach Depolarisation dieser Neuronen durch einen  $Ca^{2+}$ -abhängigen Exozytose-Prozess. Zusätzlich kann SP aus enterochromaffinen Zellen des gastrointestinalen Epithels, aus Immunzellen oder auch aus glatten Muskelzellen selbst freigesetzt werden (Improta u. Broccardo 2006). Die Freisetzung aus enterischen Neuronen kann durch mechanische (Dehnung der Magenwand), chemische (Entzündungsmediatoren oder pH-Wert-Erniedrigung) oder elektrische Stimuli ausgelöst werden. Der Abbau der Tachykinine erfolgt durch membranständige oder zirkulierende Peptidasen (Improta u. Broccardo 2006).

## **Rezeptoren für Substanz P**

Die Tachykinin-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Sehmsdorf 2001). Sie werden unterteilt in die Subtypen NK 1, NK 2 und NK 3, wobei Substanz P die stärkste Affinität zum NK 1-Rezeptor besitzt (Sehmsdorf 2001).

Alle drei Rezeptor-Subtypen werden im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren exprimiert. Während der Rezeptor-Subtyp NK 1 im Allgemeinen sowohl an den Effektorzellen (glatte Muskulatur, Cajal-Zellen, Enterozyten und Drüsenzellen) als auch an Neuronen auftritt, treten NK 2-Rezeptoren nur an Effektorzellen (glatte Muskelzellen) und NK 3-Rezeptoren ausschließlich an Neuronen auf. Diese schematische Darstellung der Rezeptorenverteilung kann Spezies- und Lokalisations-abhängig variieren (Improta u. Broccardo 2006).

## **Wirkungen von Substanz P**

Substanz P führt zur Kontraktion der glatten gastrointestinalen Muskulatur (Angel et al. 1983b); es erhöht den Blutfluss im Magen-Darm-Trakt, bindet an spezifische Rezeptoren des Pankreas in Verbindung mit der Enzymsekretion, und es vermindert die Säuresekretion und die intestinale Absorption (Severini et al. 2002).

Die Interpretation der Daten bezüglich der möglichen Neurotransmittereffekte von Substanz P im Verdauungstrakt wird kompliziert durch die Tatsache, dass das Peptid nicht nur in intrinsischen Neuronen vorkommt, sondern auch in den peripheren Endigungen der sensorischen Neuronen (Dockray 1987). So kann Substanz P unter bestimmten Voraussetzungen auch zu einer Hemmung der gastralen Motilität führen. Diese Hemmung erfolgt entweder durch Interaktion mit dem ZNS, durch Aktivierung sympathischer extrinsischer Leitungsbahnen oder aber durch Aktivierung intramuraler inhibitorischer Komponenten des NANC-Systems (Improta u. Broccardo 2006, Schmidt u. Holst 2000).

Die Wirkung von SP auf die Magenentleerungsrate ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt (Schmidt u. Holst 2000). Diesbezügliche Studien an Ratten haben widersprüchliche Ergebnisse ergeben (Erhöhung, Erniedrigung bzw. keinen Effekt auf die Magenentleerung durch SP). Diese Ergebnisse waren jedoch das Resultat unterschiedlicher Applikationsformen von SP. Zusätzlich konnte die Verminderung der Magenentleerung durch die Gabe von Atropin in eine erhöhte Magenentleerungsrate umgewandelt werden (Holzer 1985, Mangel u. Koegel 1984, Chang et al. 1999).

Trotz der möglichen inhibitorischen Wirkung von SP kann also die direkte Wirkung des Peptids auf die glatte Muskulatur des Magen-Darm-Traktes im Sinne einer Motilitätssteigerung als gesichert gelten (Schmidt u. Holst 2000).

Substanz P fungiert demnach als Neurotransmitter in der Motilitätskontrolle und spielt dabei besonders bei der Regulation der Peristaltik eine Rolle (Dockray 1987). Inwieweit SP dabei zur Magenentleerung beiträgt, ist nach wie vor unklar (Schmidt u. Holst 2000).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass es sich bei Substanz P um eines der bislang am intensivsten untersuchten Neuropeptide handelt. Aufgrund der Hinweise, die bis heute über die Freisetzung und die Wirkungen dieser Substanz verfügbar sind, kann ihre Rolle als exzitatorischer Transmitter innerhalb des myenterischen Plexus an cholinergen Neuronen und ebenso direkt an glatter Muskulatur während des peristaltischen Reflexes als gesichert gelten. Zu einer Freisetzung von Substanz P kommt es erst bei einer längerdauernden synaptischen Exzitation des Neurons; die Wirkung dieses Neuropeptids steht daher in Verbindung mit einer anhaltenden Erhöhung des Muskeltonus (Schemann 2000, Wood 1987).

## **2.2.2 Vasoaktives Intestinales Polypeptid**

Said und Mutt (1970) identifizierten und isolierten aus Schweinedärmen ein 28 Aminosäuren umfassendes Peptid mit potenten vasodilatatorischen Eigenschaften. Sie nannten die Substanz Vasoaktives Intestinales Polypeptid oder kurz VIP.

Ein weiteres Peptid, das isoliert werden konnte, war PHI (Peptid mit Histidin am N-Terminus und Isoleucin am C-Terminus). VIP und PHI haben viele ähnliche biologische Aktivitäten und stammen vom selben biosynthetischen Vorläufermolekül ab (Said 1984, Tatemoto u. Mutt 1981). Zusammen mit anderen Peptiden, wie z. B. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP), Sekretin, Glukagon und Growth hormone-releasing factor (GRF) bildet VIP eine Familie von strukturell ähnlichen Peptiden (Groneberg 2004, Harmar et al. 1998).

Bei Säugetieren findet sich VIP in großem Umfang in Neuronen innerhalb des Magen-Darm-Traktes, des Gehirns, des Rückenmarks und des Urogenitaltraktes; in endokrinen Zellen des Magen-Darm-Traktes kommt es dagegen nicht vor (Dockray 1987).

Ende der 70er und Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts sind bovines (Carlquist et al. 1979), ovines, caprines, canines, humanes VIP (Carlquist et al. 1982) sowie solches von Ratten und Kaninchen isoliert und sequenziert worden. Seine Sequenz ist bei allen diesen

Säugetieren identisch mit der des ursprünglich vom Schwein isolierten Peptids (Dockray 1987, Fahrenkrug 1993, Said 1984). Insgesamt deuten diese strukturellen Informationen auf ein hochgradig konserviertes Molekül hin, welches eine bedeutende biologische Funktion ausübt (Dockray 1987).

### **Freisetzung und Metabolismus von VIP**

Die Freisetzung dieses Neuropeptids erfolgt neuronal aus myenterischen inhibitorischen Motoneuronen und submukösen Sekretomotoneuronen (Guilloteau et al. 1997). Die elektrische Stimulation extrinsischer Nerven, welche zu einer Vielzahl von Organen hinziehen, löste Freisetzung von VIP aus. Hexamethonium blockiert diese Freisetzung, was impliziert, dass cholinerge nicotinerge Synapsen in die Leitungsbahn eingeschaltet sind (Dockray 1987, Fahrenkrug 1993). Durch ebensolche Elektrostimulationsversuche konnten Angel et al. (1983a) zeigen, dass die Freisetzung von VIP aus Neuronen  $Ca^{2+}$ -abhängig erfolgt. Stimulation von Muskelpräparaten in  $Ca^{2+}$ -freien Medien konnte hierbei zum einen keine Muskelrelaxation auslösen, und zum anderen wurde kein Anstieg von VIP im Medium verzeichnet (Angel et al. 1983a).

Eine Stimulation des Nervus splanchnicus verhindert die vagal induzierte Freisetzung durch einen Mechanismus, an dem  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren beteiligt sind (Dockray 1987, Sjoqvist et al. 1988). Edwards et al. (1978) konnten nach Unterbrechung einer derartigen Hemmung durch Durchtrennung der Nervi splanchnici beim Kalb einen signifikanten Anstieg der VIP-Konzentration im arteriellen Plasma nachweisen. Die Freisetzung von VIP erfolgte nach elektrischer Stimulation beider Vagusäste und hatte neben der Freisetzung von VIP in das Blut auch einen Anstieg der VIP-Konzentration in der Lymphe der Kälber zur Folge (Edwards et al. 1978).

Die Inaktivierung von VIP erfolgt durch Enzyme wie Neutrale Endopeptidase (NEP) oder Mastzell-Tryptase (Groneberg et al. 2004). Die schnelle Inaktivierung des Peptids durch die genannten Enzyme, durch katalytische Antikörper und auch durch spontane Hydrolyse, haben die sehr kurze Halbwertszeit von VIP im Blut (wenige Minuten) zur Folge (Sethi et al. 2005).

## **Rezeptoren für VIP**

Für VIP wurden zwei Klassen von Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäts- und Spezifitätsgraden beschrieben (Fahrenkrug 1993, Guilloteau 1997). Es handelt sich dabei um G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen (Groneberg et al. 2004, Guilloteau 1997), welche sich VIP mit dem Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide (PACAP) teilt (Severi et al. 2006). Diese Rezeptoren der VIP/PACAP-Familie werden nach der neuesten Nomenklatur als VPAC<sub>1</sub> und VPAC<sub>2</sub> bezeichnet (Harmar et al. 1998). Beide Rezeptorsubtypen sind über G-Proteine sowohl an den cAMP- als auch an den cGMP-Signalweg angeschlossen (Severi et al. 2006).

Die Interaktion von VIP mit seinen spezifischen Zelloberflächen-Rezeptoren wurde intensiv am Pankreas, der Magen-Darm-Schleimhaut und der glatten Muskulatur untersucht. In jedem Fall ist die VIP-Bindung sättigbar, reversibel, temperaturabhängig und spezifisch (Le Meuth et al. 1991, Zimmerman et al. 1989). Espat et al. (1995) konnten z. B. am Dünndarm von Ratten zeigen, dass VIP-Rezeptor-Antagonisten zu einem schnelleren postoperativen Wiedereinsetzen von MMCs führen.

## **Wirkungen von VIP**

VIP besitzt ein weites Wirkungsspektrum. Als wichtigste gastrointestinale Effekte, welche vermutlich durch neurales VIP vermittelt werden, gelten diejenigen auf das Pankreas, auf die intestinale Sekretion, auf den Blutfluss und auf die Motilität (Dockray 1987).

Am Magen findet sich VIP in intrinsischen Neuronen, welche hauptsächlich die glatten Muskelschichten innervieren (Fahrenkrug 1993). VIP relaxiert viele verschiedene glattnuskuläre Präparationen. Nachgewiesen wurde dieser Effekt an Präparaten aus dem Fundus des Meerschweinchens (Grider et al. 1985 und 1992) und an solchen aus dem Magenantrum bzw. aus dem Colon des Hundes (Allescher et al. 1989, Angel et al. 1983a und 1983b). VIP hat einen direkten relaxierenden Effekt auf isolierte glatte Muskelzellen. Dadurch bewirkt es u. a. in der Pylorusregion einen merklichen Anstieg der transpylorischen Passagezeit (Fahrenkrug 1993). Andererseits vermittelt VIP beim Meerschweinchen im Plexus myentericus des Ileums einen exzitatorischen Effekt. Es führt hier zu einer Kontraktion der Längsmuskelschicht durch einen Mechanismus, welcher die Freisetzung von ACh beinhaltet (Gordon et al. 1990).

Pharmakologische Experimente von Grider et al. (1985 und 1992) mit Antagonisten und Antiseren gegen ATP und VIP lassen den Schluss zu, dass VIP als der primäre Transmitter der gastralen Relaxation fungiert.

Die Projektion myenterischer VIP-Neuronen von oral nach anal führt zu einer absteigenden Inhibition der Motilität im Magen-Darm-Trakt. Das Peptid trägt somit zur Aufrechterhaltung der peristaltischen Wellen bei (Dockray 1987). Dies steht in Einklang mit den Untersuchungen von Schemann et al. (2001), welche nach Blockade der cholinergen Übertragung und elektrischer Stimulation absteigender Leitungsbahnen in der Magenmuskulatur eine Relaxation nachweisen konnten. Dieser relaxierende Effekt war vor der Blockade der nicotineren Übertragung durch eine Kontraktion der Muskelpräparate überlagert, welche durch die Aktivierung cholinergischer Interneurone vermittelt wurde (Schemann et al. 2001). Severi et al. (2006) untersuchten den relaxierenden Effekt von VIP an Muskelpräparaten aus dem Fundus und dem Magenantrum des Menschen. Dabei zeigte sich, dass VIP im Antrum eine sehr viel stärkere relaxierende Wirkung vermittelt als dies im Fundus der Fall ist. Sie führten diesen Effekt im Antrum auf eine höhere Expression von VPAC<sub>2</sub>-Rezeptoren in dieser Lokalisation zurück. VPAC<sub>1</sub>-Rezeptoren konnten nicht nachgewiesen werden (Severi et al. 2006).

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist – unter Berücksichtigung der Mechanismen der Freisetzung und der Wirkung von VIP – davon auszugehen, dass diesem Peptid eine Transmitterfunktion bei der Kontrolle der pankreatischen und intestinalen Sekretion, bei der gastrointestinalen Relaxation und bei der Regulierung des Blutflusses im Magen-Darm-Trakt zukommt (Fahrenkrug 1993).

### **2.2.3 Neurofilament 200**

Neurofilamente sind Bestandteile des Zytoskeletts in zentralen und peripheren Neuronen und in Nervenfasern (Bishop et al. 1985). Mit einem Durchmesser von näherungsweise 10 nm gehören sie zu den Intermediärfilamenten. Innerhalb der Neurofilamente unterscheidet man hauptsächlich drei Proteine mit Molekulargewichten von 200 Kilodalton (kd), 160 kd und 70 kd (Nakamura et al. 1987).

Antikörper gegen das Neurofilament 200 wurden bereits in verschiedenen Studien am Gastrointestinaltrakt von Rindern und kleinen Wiederkäuern als genereller Nervenmarker eingesetzt (Balemba et al. 1999, Teixeira et al. 1998, Yamamoto et al. 1994a).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Untersuchte Tiere und Probenentnahmen

Ziel des ersten Teils der Arbeit war ein Vergleich der peptidergen Innervation und der Schichtdicken der Labmagenwand von Kühen der Rasse Deutsche Holsteins mit solchen der Rasse Deutsches Fleckvieh. Hierzu wurden bei jeweils 20 klinisch gesunden Kühen dieser Rassen innerhalb von 20 Minuten nach der Schlachtung je zwei ca. 1 cm<sup>2</sup> große Biopsieproben aus der Labmagenwand entnommen, und zwar jeweils aus den gleichen Bereichen der Parietalfläche von Corpus abomasi und Pars pylorica. Die Probenentnahmestellen lagen auf einer gedachten Mittellinie zwischen kleiner und großer Krümmung des Labmagens. Vor der Biopsie wurde an der betreffenden Stelle ein Haltezügel (Monosyn<sup>®</sup> metric 4, Fa. Aesculap) durch alle Schichten der Labmagenwand gezogen, diese damit angehoben und der betreffende Wandabschnitt mit Hilfe einer Schere exstirpiert.

Einbezogen wurden nur Kühe im Alter zwischen 3 und 5 Jahren; ausschlaggebend war dabei das Alter des Tieres zum Zeitpunkt der jeweiligen Probenentnahme. Als Altersnachweis galt das Geburtsdatum laut Rinderpass. Die genauen Daten der verwendeten Tiere sind den Tabellen 2 bis 5 im Anhang zu entnehmen.

Zur Abklärung möglicher Unterschiede hinsichtlich der vorstehend genannten Parameter zwischen Deutschen Holstein-Kühen mit Labmagenverlagerung und solchen ohne Labmagenverlagerung wurde bei 20 Klinikpatienten dieser Rasse, welche derselben Altersgruppe angehörten, während der Operation zur Reposition und Fixation des nach links verlagerten Labmagens ebenfalls eine Biopsie an den oben genannten Lokalisationen durchgeführt.

Bei der Operationstechnik handelte es sich um die erstmals von Straiton und McIntee (1959) beschriebene paramediane Abomasopexie. Hierzu wurden die Patienten mit Hilfe des hydraulischen Operationstisches der Fa. Bartmann (Lübbecke) in Rückenlage abgelegt, das Operationsfeld rasiert, gereinigt und desinfiziert, und es wurde eine Infiltrationsanästhesie der Bauchwand mit Procain 2% durchgeführt. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden die zur Biopsie vorgesehenen Bereiche im Corpus abomasi und im Antrum pylori vorverlagert, die Biopsiebezirke mit einer Tabaksbeutelnaht (Suprylon<sup>®</sup> metric 4, Fa. Vömel) umstochen, anschließend wie bereits oben beschrieben ein Haltezügel angelegt und die alle Schichten der Labmagenwand umfassenden Proben entnommen. Um das Austreten von Labmageninhalt zu verhindern, wurde die Biopsiestelle durch unverzügliches Zuziehen der Tabaksbeutelnaht

verschlossen und anschließend noch mit einer modifizierten Lembertnaht (Cushingnaht, Monosyn<sup>®</sup> metric 4, Fa. Aesculap) überdeckt.

Die weiteren Schritte entsprachen dem Routineverfahren: Zur Rezidivprophylaxe Anheftung eines etwa 8 cm langen Abschnitts der Labmagenwand mittels einfacher fortlaufender Naht (Suprylon<sup>®</sup> metric 6, Fa. Vömel) an Bauchfell und Innenblatt der Rektusscheide, anschließend Verschluss der Bauchwand in 3 Schichten (Adaptation von Peritoneum, Faszien und Bauchmuskulatur durch fortlaufende Matratzennaht mit Supramid<sup>®</sup> metric 8 (Fa. WDT), zusätzliche Überbördelung der äußeren Rektusscheide sowie Adaptation der Subkutis mit Synthesorb<sup>®</sup> metric 7 (Fa. Vömel) und fortlaufende semikutane Hautnaht mit (Monosyn<sup>®</sup> metric 4, Fa. Aesculap). Die Wundabdeckung erfolgte mittels eines Tegaderm<sup>™</sup> + Pad-Pflasters (9 cm x 35 cm; Fa. 3M Health Care).

Nach der Operation wurde den Kühen einmalig ein Analgetikum (Flunixin-Meglumin, 2,2 mg / kg KM i.v.; Finadyne<sup>®</sup>, Fa. Essex Tierarznei) sowie über 4 Tage Procain-Penicillin G (Fa. aniMedica) in einer Dosis von 30.000 I.E. / kg KM s.c. zur Infektionsprophylaxe verabreicht.

Dieses Tierversuchsvorhaben, in das nur Patienten einbezogen wurden, deren Besitzer nach entsprechender Aufklärung ihr Einverständnis erteilt hatten, wurde dem Regierungspräsidium Gießen angezeigt und von diesem genehmigt (Gz: V 54-19c 20/15c GI 18/15).

Zur Abklärung der Fragestellung, ob die Ergebnisse möglicherweise auch durch die Entnahmetechnik (nach Schlachtung vs. bei Operation) beeinflusst werden und um des weiteren abzuklären, ob es sich bei den bei Labmagenpatienten gegebenenfalls nachzuweisenden Veränderungen um die Ursache oder aber eher um eine Folge der Verlagerung handelt, wurde bei 3 gesunden Versuchskühen der Rasse Deutsche Holsteins (Alter 4, 4,5 und 5 Jahre) nach der Biopotentnahme im Rahmen einer ersten, wie oben beschrieben durchgeführten Laparotomie ein „Magenband“ unmittelbar proximal des Pylorus um den Labmagen gelegt (Abb. 1).

Dieses Magenband bestand aus einer Linton-Nachlas Sonde (Fa. Rüscher, Kernen), die in einen PVC-Schlauch als Widerlager eingebettet war. Durch Instillation bzw. Aspiration von Wasser in den bzw. aus dem Ballon der Sonde konnte die Pars pylorica von außen in ihrer Weite reguliert werden. Das Ende der Sonde mit dem Ventil wurde durch die Bauchwand rechts ventral nach außen geführt. Die aufgrund der Passagestörung entstehende Alkalose wurde durch die Bestimmung des Base Excess im venösen Blut im Abstand von jeweils 4 Stunden kontrolliert und auf einen Richtwert von +15 mmol/l eingestellt (Abb. 24). Postoperativ

wurden auch diese Tiere analgetisch mit Flunixin-Meglumin (2,2 mg pro kg KM i.v) und antibiotisch mit Procain-Penicillin G (30.000 I.E. pro kg KM und Tag s.c.) behandelt.

Die zweite Probenentnahme erfolgte bei diesen Probanden 72 Stunden nach der ersten Operation. Hierzu wurden die Tiere nochmals wie oben beschrieben in Rückenlage laparotomiert und in unmittelbarer Nähe der ersten Biopsiestellen wiederum Proben aus der Labmagenwand entnommen. Unmittelbar danach wurden die Kühe mit 5 ml Rompun® 2% i.v. (Fa. Bayer; Dosis entspricht 100 mg Xylazin) sediert. Etwa 2 Minuten nach dieser Sedation erfolgte die Euthanasie mit 70 ml T 61 ad us vet i.v. (Fa. Intervet).

Dieses Tierversuchsvorhaben wurde durch das Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Gz: V 54-19c 20-15 (1) GI 18/15 - Nr. 44/2006).

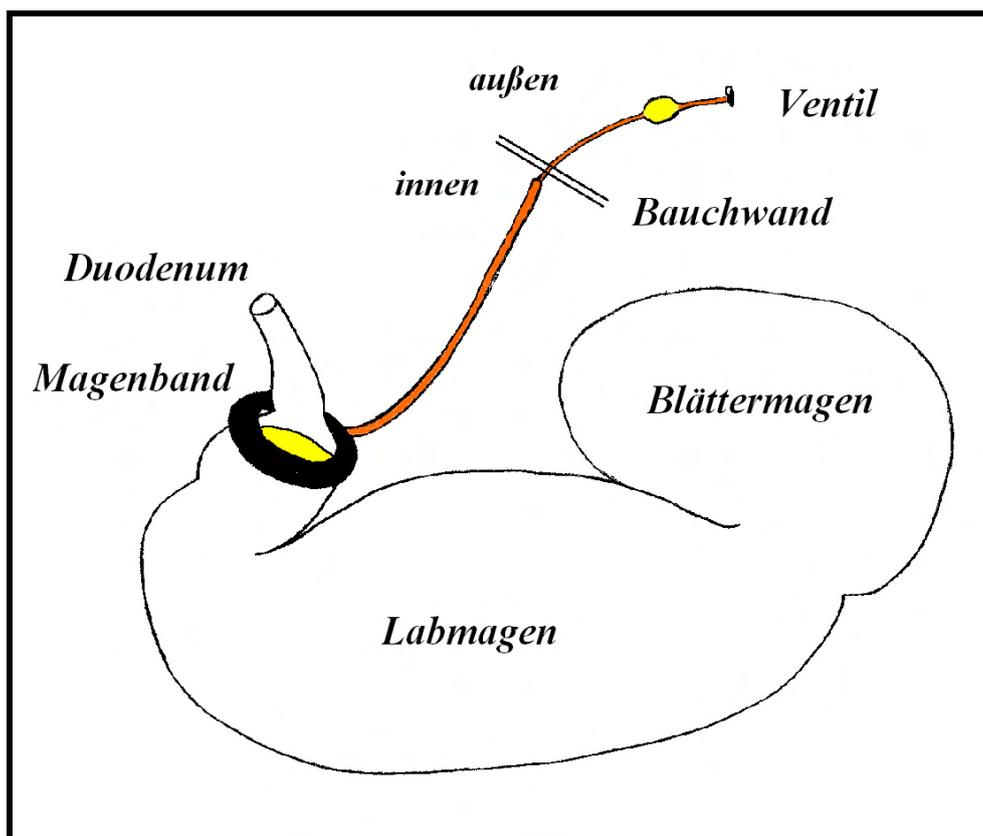


Abbildung 1: Lokalisation des Magenbandes am Labmagen

## **3.2 Untersuchungsmethoden**

### **3.2.1 Fixierung der Proben und Anfärbung der histologischen Schnitte**

Die Proben wurden direkt nach der Entnahme in vorbereitete Probengefäße überführt und in 4 %iger gepufferter Formaldehydlösung fixiert. Die Fixationsdauer betrug 24 Stunden, wobei die Fixationslösung einmal gewechselt wurde und die Proben in eine für die Einbettung geeignete Form gebracht wurden.

Im Anschluss an die Fixation wurden die Proben in 3 Wechseln von PBS-Puffer gewaschen und anschließend über Nacht im Kühlschrank in PBS eingelegt.

Es folgte die Entwässerung für 10 min in 50 % Alkohol, danach in 70 % Alkohol für 3 x 20 min.

Nach der gründlichen Entwässerung in der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Proben in Paraffin eingebettet.

Für die folgenden Untersuchungen wurden Paraffinschnitte von ca. 6 µm Dicke angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und entsprechend der Untersuchungstechnik immunhistologisch gefärbt und mit Hämatoxylin gegengefärbt. Schließlich wurden die Schnitte mit einer protektiven Substanz (Glyceringelatine) abgedeckt, um die Farbreaktionen nicht durch Umwelteinflüsse abzuschwächen.

Je Tier und Lokalisation wurden 3 Schnitte angelegt, von denen jeweils der am besten Erhaltene in die Auswertung einging.

Die Bearbeitung der Proben und die digitale Erfassung der Bilder erfolgte im Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Ausgewertet wurden die Bilder mittels halbautomatischer Analysesoftware (AnalySIS, Fa. Olympus) in der Klinik für Wiederkäuer und Schweine (Innere Medizin und Chirurgie) der Justus-Liebig-Universität Gießen.

### **3.2.2 Immunhistochemie**

#### **3.2.2.1 Allgemeines zur Methode (ABC-Methode)**

Verwendet wurde eine Zweistufen- bzw. eine indirekte immunhistochemische Färbemethode. Der Primärantikörper bindet hierbei an das nachzuweisende Epitop. Dieser Antigen-

Antikörper-Komplex wird danach von einem biotinylierten Sekundärantikörper markiert, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Unter Ausnutzung der hohen Affinität von Avidin für Biotin erfolgt eine weitere Markierung mit einem Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex. Die eigentliche Farbreaktion besteht in einer enzymatischen Umsetzung des letztlich zugesetzten Chromogens. Hier wurde ein AEC-Substrat-Kit (3-Amino-9-ethylcarbazol) zur Sichtbarmachung der Immunreaktion verwendet, welches in einer roten Farbreaktion das nachzuweisende Epitop anzeigt (Abb. 2) (Romeis 1989).

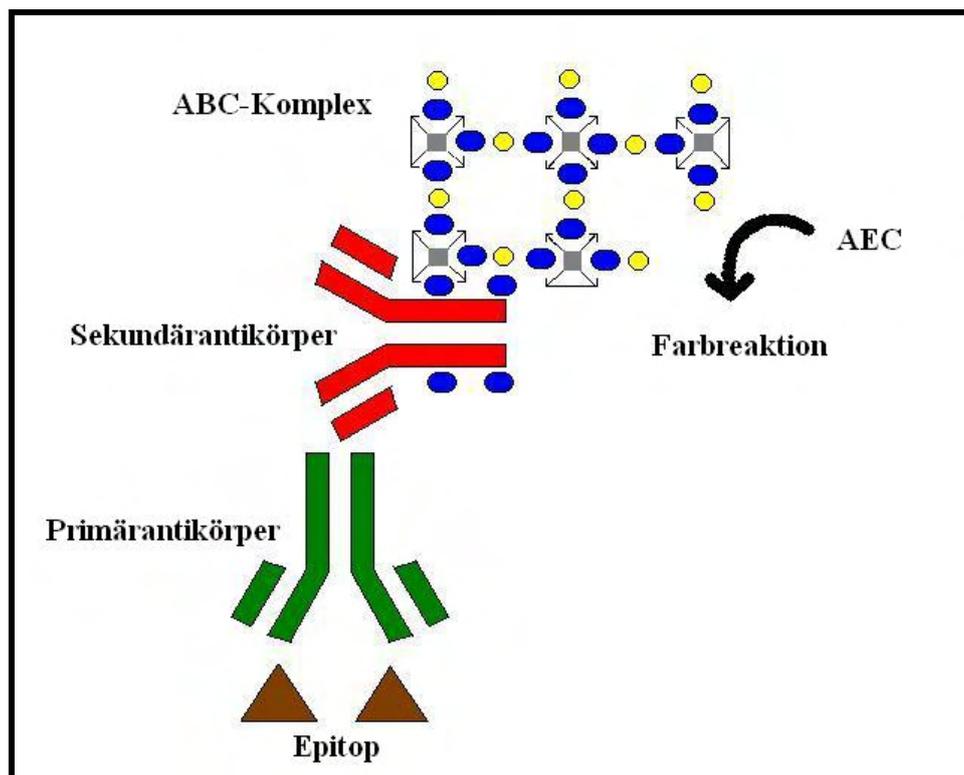


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bindungsreaktionen bei der indirekten Immunhistochemie (ABC-Methode)

### 3.2.2.2 Verwendete Antikörper und durchgeführte Kontrollen

Die genauen Bezeichnungen der verwendeten Antikörper sind der folgenden Tabelle 1 und den entsprechenden Färbeprotokollen zu entnehmen.

Zur Kontrolle der Spezifität des polyklonalen Anti-VIP-Antikörpers wurde eine Vorinkubation des Antikörpers mit dem entsprechenden Peptid durchgeführt. Die

Vorinkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur, um die Bindungsstellen des Antikörpers mit Peptid zu blockieren (Abb. 7).

Die Spezifität der monoklonalen Antikörper wurde bereits in anderen Studien nachgewiesen (Cuello et al. 1979, Debus et al. 1982).

Bei jeder Färbung erfolgte sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde jeweils Gewebe von der Ratte mitgeführt, welches die nachzuweisende Substanz sicher enthielt [Rückenmark (SP) (Abb. 3), Duodenum (VIP) (Abb. 4) und Mesencephalon (NF 200) (Abb. 5)]. Als Negativkontrollen wurden Labmagenschnitte verwendet (Abb. 6), bei deren Färbung der Primärantikörper durch Puffer ersetzt wurde.

**Tabelle 1: Verwendete Antisera für die Immunhistochemie**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-SP AF 1021 [NC 1/34 HL] monoklonal	Medicorp (Canada)	Ratte	1:25
Anti-VIP T 4245 polyklonal	Bachem (UK)	Kaninchen	1:1000
Anti-NF 200 NFM 002 monoklonal	Biologo (Deutschland)	Maus	1:200
<b>Sekundärantikörper</b>			
Anti-Ratte E 0467	Dakocytomation (Denmark)	Kaninchen	1:300
Anti-Kaninchen BA-1000	Vector Laboratories (USA)	Ziege	1:250
Anti-Maus BA-2000	Vector Laboratories (USA)	Pferd	1:250
<b>Blockierungspeptid</b>			
VIP acetate salt H 3775	Bachem (UK)	Mensch, Rind, Schwein, Ratte	

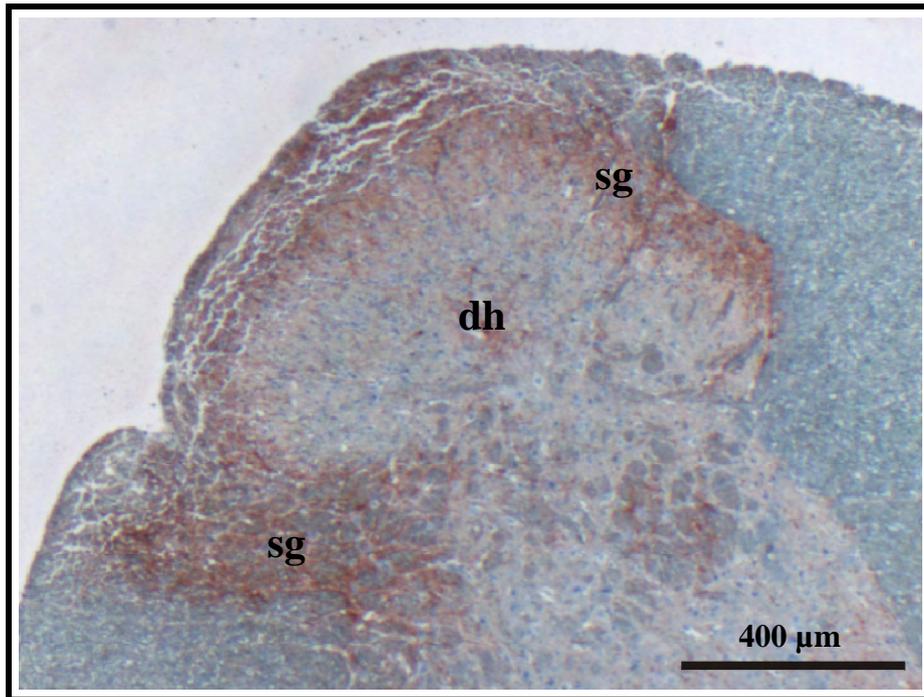


Abbildung 3: Positivkontrolle für die Färbung auf SP am Rückenmark von der Ratte. IR-Flächen für SP zeigen sich am Rückenmark der Ratte am dorsalen Rand des Dorsalhorns (dh) innerhalb der sogenannten Substantia gelatinosa (sg)

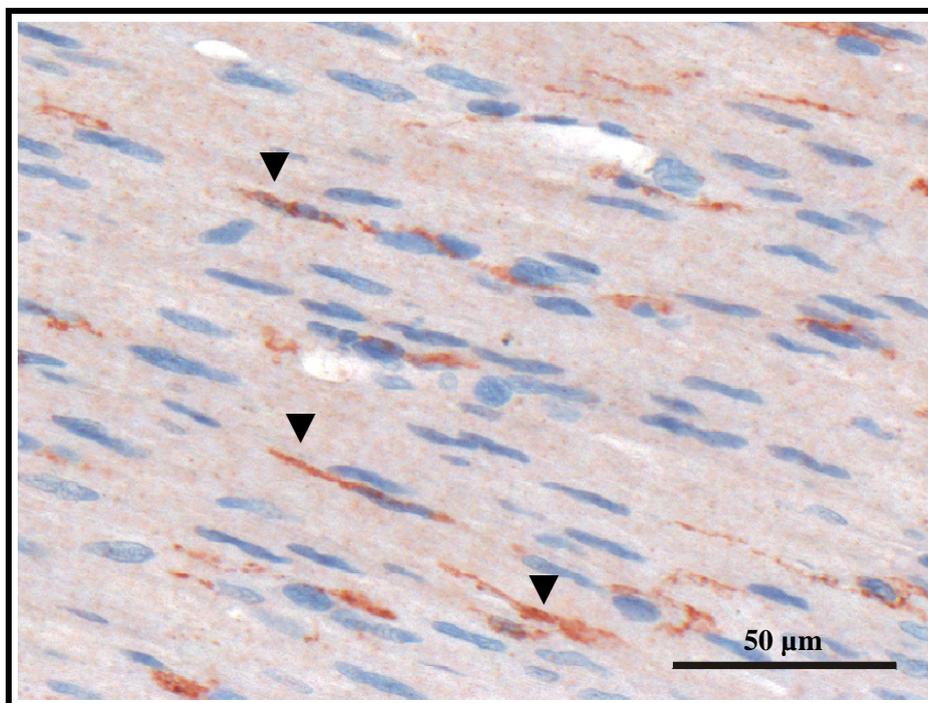


Abbildung 4: Positivkontrolle für die Färbung auf VIP am Duodenum der Ratte. Die positiv gefärbten VIP-Granula in den Nervenfasern der Tunica muscularis des Duodenum sind deutlich zu erkennen (▼).

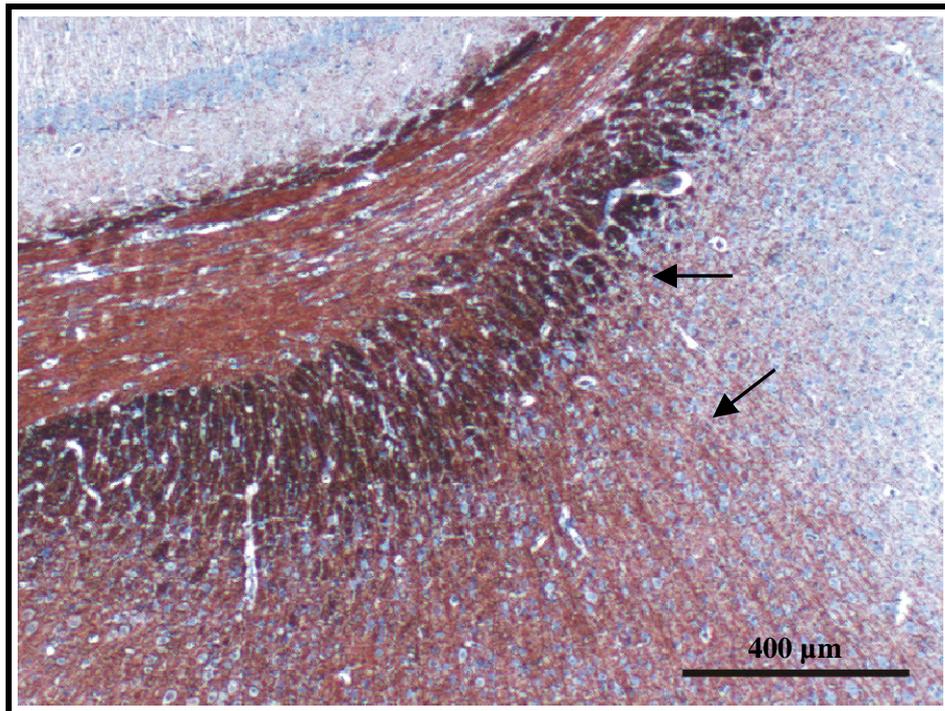


Abbildung 5: Positivkontrolle für NF 200 im Mesencephalon der Ratte (Frontalschnitt auf Höhe der Hypophyse). Deutliche Anfärbung sowohl der Neuronen als auch ihrer Ausläufer (Pfeile).

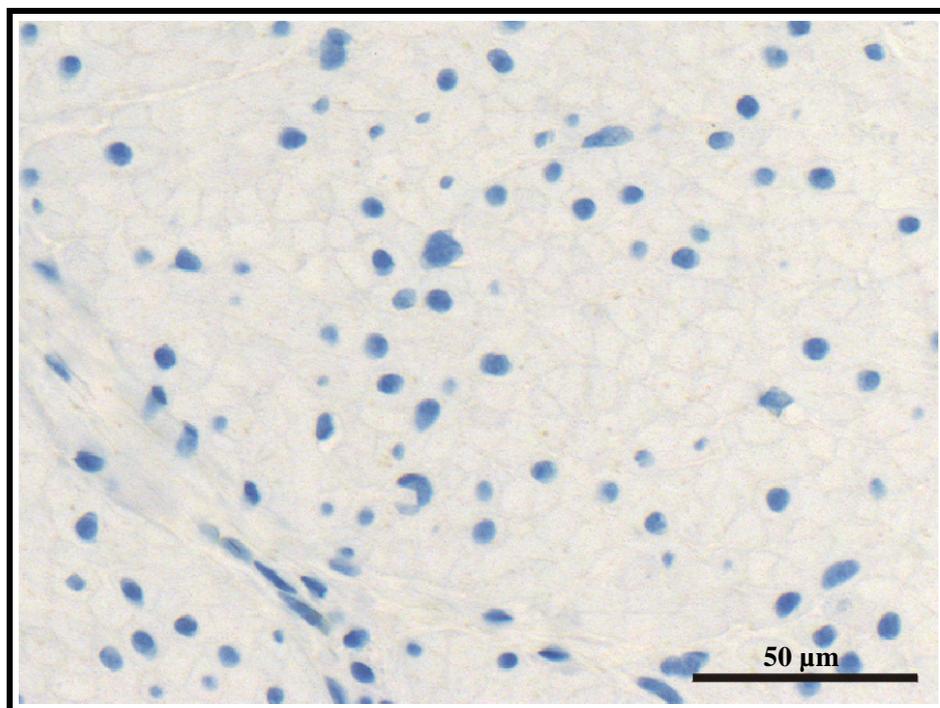
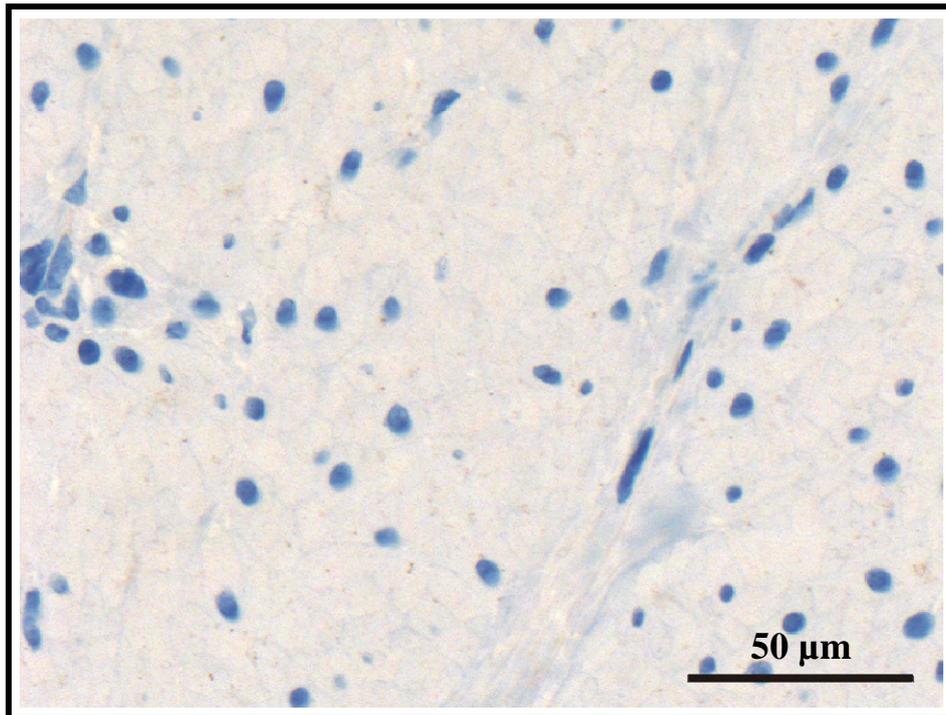


Abbildung 6: Negativkontrolle an der Tunica muscularis des Labmagens. Für die Negativkontrollen wurde der jeweilige Primärantikörper durch Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) ersetzt. Die Sekundärantikörper wurden ohne Änderung des Protokolls aufgetragen.



**Abbildung 7: Peptidblockierung des polyklonalen VIP-Antikörpers an der Tunica muscularis der Labmagenwand. Zum Nachweis der Spezifität des polyklonalen VIP-Antikörpers wurde eine Vorinkubation dieses Antikörpers mit seinem entsprechenden Peptid (VIP) durchgeführt. Da die Bindungsstellen des VIP-Antikörpers durch diese Vorinkubation bereits mit externem VIP besetzt waren, konnte keine Bindung an VIP im Gewebe erfolgen.**

### **3.2.2.3 Immunhistochemische Färbeprotokolle zum Peptidnachweis**

In den nachfolgenden 3 Tabellen (Tabellen 2-4) sind detaillierte Angaben zum immunhistochemischen Nachweis der beiden Neuropeptide Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) und Substanz P (SP) sowie des Gesamtnervenmarkers Neurofilament 200 (NF 200) zu finden.

Diese Färbeprotokolle wurden im Rahmen von Vorversuchen hinsichtlich der Antikörperverdünnung, der Antigendemaskierung und bezüglich der Inkubationszeiten an die Eigenschaften der entsprechenden Antikörper angepasst.

**Tabelle 2: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von SP**

Verwendeter Primärantikörper:

Anti-SP (AF 1021; medicorp; Kanada); Ratte monoclonal (Klon: NC 1/34 HL)

Verdünnung Primärantikörper: 1:25

Verwendeter Sekundärantikörper: Kaninchen Anti-Ratte (E 0467; Dakocytomation)

Verdünnung Sekundärantikörper: 1:300

Testgewebe: Labmagen von Kühen (Corpus und Antrum)

Positivkontrollgewebe: Rückenmark Ratte

Prinzip: indirekte Immunhistochemie (ABC-Methode)

Chromogen: AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol)

Funktion	Chemikalien	Dauer	Vorgehensweise
1. Entparaffinieren	Xylol	10 min	60 °C
	Xylol	2 x 5 min	RT
2. Entwässern	absoluter Alkohol	5 min	
	absoluter Alkohol	5 min	
	96 % Alkohol	5 min	
	70 % Alkohol	5 min	
	Aqua dest.	5 min	
3. Spülen	PBS	5 min	
4. Epitop freilegen	Citratpuffer	20 min bei ca. 95 °C	Mikrowelle / Heizplatte
5. Spülen	PBS	3 x 5 min	Rüttler
6. Blockieren	0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in eiskaltem Methanol	30 min	Küvette
7. Spülen	PBS	3 x 5 min	Küvette
8. Proteinblock	5 % Kaninchenserum in PBS	30 min	Feuchte Kammer
9. Inkubation	Primärantikörper in PBS (SP 1:25)	über Nacht im Kühlschrank	Feuchte Kammer
10. Spülen	PBS	3 x 5 min	Küvette
11. Inkubieren	Sekundärantikörper (Kaninchen Anti-Ratte biotinyliert)	30 min	Feuchte Kammer
12. Spülen	PBS	3 x 5 min	Küvette
13. Inkubieren	<sup>1</sup> ABC-Elite-Kit (Vectastain)	40 min	RT; feuchte Kammer
14. Spülen	PBS	3 x 5 min	Küvette
15. Detektion	<sup>2</sup> AEC (Biologo)	ca. 30 min	RT; feuchte Kammer
16. Spülen	Aqua dest.	3 x 5 min	Küvette
17. Gegenfärben	Hämatoxylin instant	10 sec	Spritzflasche
18. Bläuen	fließendes Wasser	10 min	Waschbecken
19. Eindeckeln	Glyceringelatine (Merck)		

<sup>1</sup> **ABC-Kit:** 5 ml PBS + 2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B

<sup>2</sup> **AEC-Kit:** 900 µl Substratpuffer + 3 Tropfen AEC-Lösung (ausreichend für etwa 6-8 Schnitte)

**Tabelle 3: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von VIP**

Verwendeter Primärantikörper:	Anti-VIP (T 4245; Bachem; UK); Kaninchen polyclonal
Verdünnung Primärantikörper:	1:1000
Verwendeter Sekundärantikörper:	Ziege Anti-Kaninchen (BA-1000; Vector)
Verdünnung Sekundärantikörper:	1:250
Testgewebe:	Labmagen von Kühen (Corpus und Antrum)
Positivkontrollgewebe:	Dünndarm Ratte (Duodenum)
Prinzip:	indirekte Immunhistochemie (ABC-Methode)
Chromogen:	AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) <span style="float: right;">Avidin-Biotin-Blockierungskit!</span>

Funktion	Chemikalien	Dauer	Vorgehensweise
1. Entparaffinieren	Xylol	10 min	60 °C
	Xylol	10 min	RT
2. Entwässern	absoluter Alkohol	5 min	
	96 % Alkohol	5 min	
	80 % Alkohol	5 min	
	70 % Alkohol	5 min	
	Aqua dest.	5 min	
3. Spülen	PBS	5 min	
4. Epitop freilegen	Citratpuffer	20 min bei ca. 95 °C	Mikrowelle / Heizplatte
5. Spülen	PBS	3 x 5 min	Rüttler
6. Blockieren	0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in eiskaltem Methanol	30 min	Küvette
7. Spülen	PBS	2 x 5 min	Küvette
8. Permeabilisieren	<sup>1</sup> PBS / BSA / Triton X 100	5 min	Küvette
9. Proteinblock	5 % Ziegenserum in Blockpuffer + Avidin D	30 min	Feuchte Kammer
10. Inkubation	Primärantikörper in Blockpuffer (VIP 1:1000) + Biotin	über Nacht im Kühlschrank	Feuchte Kammer
11. Spülen	PBS	3 x 5 min	Küvette
12. Inkubieren	Sekundärantikörper (Ziege Anti-Kaninchen biotinyliert)	30 min	Feuchte Kammer
13. Spülen	PBS	3 x 5 min	Küvette
14. Inkubieren	<sup>2</sup> ABC-Elite-Kit (Vectastain)	40 min	RT; feuchte Kammer
15. Spülen	PBS	3 x 5 min	Küvette
16. Detektion	<sup>3</sup> AEC (Biologo)	ca. 12-15 min	RT; feuchte Kammer
17. Spülen	Aqua dest.	3 x 5 min	Küvette
18. Gegenfärben	Hämatoxylin instant	10 sec	Spritzflasche
19. Bläuen	fließendes Wasser	10 min	Waschbecken
20. Eindeckeln	Glyceringelatine (Merck)		

<sup>1</sup> **Blockpuffer:** PBS / 0,03 % TRX / 1,5 % BSA: 21 µl TRX + 1 g BSA + 70 ml PBS

<sup>2</sup> **ABC-Kit:** 5 ml PBS + 2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B

<sup>3</sup> **AEC-Kit:** 900 µl Substratpuffer + 3 Tropfen AEC-Lösung (ausreichend für etwa 6-8 Schnitte)

**Tabelle 4: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von NF 200**

Verwendeter Primärantikörper: Anti-NF 200 (NFM 002; Biologo);  
Maus monoclonal [RT 97]  
Verdünnung Primärantikörper: 1:200  
Verwendeter Sekundärantikörper: Pferd Anti-Maus (BA-2000; Vector)  
Verdünnung Sekundärantikörper: 1:250  
Testgewebe: Labmagen von Kühen (Corpus und Antrum)  
Positivkontrollgewebe: Gehirn Ratte (Mesencephalon)

Prinzip: indirekte Immunhistochemie (ABC-Methode)  
Chromogen: AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol)

Funktion	Chemikalien	Dauer	Vorgehensweise
1. Entparaffinieren	Xylol	5 min	60 °C
	Xylol	2 x 5 min	RT
2. Entwässern	absoluter Alkohol	5 min	
	absoluter Alkohol	5 min	
	96 % Alkohol	5 min	
	70 % Alkohol	5 min	
	Aqua dest.	5 min	
3. Spülen	PBS	5 min	
4. Epitop freilegen	Proteinase K	10 min	RT; feuchte Kammer
5. Spülen	PBS	3 x 5 min	Rüttler
6. Blockieren	0,3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in eiskaltem Methanol	30 min	Küvette
7. Spülen	PBS	2 x 5 min	Küvette
8. Permeabilisieren	<sup>1</sup> PBS / BSA / Triton X 100	5 min	Küvette
9. Proteinblock	5 % Pferdeserum in Blockpuffer	über Nacht	Feuchte Kammer
10. Inkubation	Primärantikörper in Blockpuffer (NF 1:200)	3 h	RT; feuchte Kammer
11. Spülen	PBS	3 x 5 min	Küvette
12. Inkubieren	Sekundärantikörper (Pferd Anti-Maus biotinyliert)	30 min	Feuchte Kammer
13. Spülen	PBS	3 x 5 min	Küvette
14. Inkubieren	<sup>2</sup> ABC-Elite-Kit (Vectastain)	40 min	RT; feuchte Kammer
15. Spülen	PBS	3 x 5 min	Küvette
16. Detektion	<sup>3</sup> AEC (Biologo)	ca. 10-15 min	RT; feuchte Kammer
17. Spülen	Aqua dest.	3 x 5 min	Küvette
18. Gegenfärben	Hämatoxylin instant	10 sec	Spritzflasche
19. Bläuen	fließendes Wasser	10 min	Waschbecken
20. Eindeckeln	Glyceringelatine (Merck)		

<sup>1</sup> **Blockpuffer:** PBS / 0,03 % TRX / 1,5 % BSA: 21 µl TRX + 1 g BSA + 70 ml PBS

<sup>2</sup> **ABC-Kit:** 5 ml PBS + 2 Tropfen Reagenz A + 2 Tropfen Reagenz B

<sup>3</sup> **AEC-Kit:** 900 µl Substratpuffer + 3 Tropfen AEC-Lösung (ausreichend für etwa 6-8 Schnitte)

### **3.2.2.4 Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin**

Um eine bessere Detailerkennbarkeit der Schnitte zu erreichen, wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnitte für 10 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff und reagiert mit den sauren Bestandteilen der Zellen. Es führt so zu einer blauen Anfärbung der Zellkerne. Dieser blaue Farbstoff entsteht erst allmählich durch Oxidation über Hämatein (vgl. Arbeitsschritt „Bläuen“ in den immunhistochemischen Protokollen).

### **3.2.2.5 Lichtmikroskopische Auswertung und digitale Erfassung der Bilder**

Die wie oben beschrieben gefärbten Schnitte wurden zunächst unter einem Lichtmikroskop qualitativ begutachtet. Je Tier und Lokalisation wurde ein Schnitt für die digitale Erfassung ausgewählt.

Für die Vermessung der immunreaktiven Flächen wurden pro Schnitt 5 Blickfelder mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen und anschließend ausgewertet. Diese Blickfelder wurden zufällig ausgewählt; die Fläche eines solchen Blickfeldes betrug  $92843 \mu\text{m}^2$ .

## **3.2.3 Morphometrie**

Die morphometrischen Untersuchungen wurden mit Hilfe eines computergestützten halbautomatischen Bildanalyse-Systems (analySIS<sup>®</sup>) und einer digitalen Mikroskopkamera des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

### **3.2.3.1 Multiple Image Alignment (MIA)**

Diese Bezeichnung steht für eine Funktion der verwendeten Analysesoftware, mit der einzelne Bilder zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden können. Da die Labmagenschnitte auch in der kleinsten Vergrößerung (2,5-fach) nicht innerhalb eines

mikroskopischen Blickfeldes dargestellt werden konnten, musste diese Funktion verwendet werden, um die Gesamtdicke der Labmagenwand vermessen zu können.

### **3.2.3.2 Festlegung der Messpunkte für die Schichtdickenvermessung**

An diesen mittels MIA erstellten Übersichtsaufnahmen wurden 3 Schichtdickenmesswerte ermittelt:

Der erste Messwert stellte die Dicke der Tunica muscularis mit ihren beiden Schichten dar, der zweite die Dicke der Schleimhautmuskelschicht (Lamina muscularis mucosae), und ein dritter Messwert stand für die Gesamtdicke aller Schichten.

### **3.2.3.3 Vermessung der immunreaktiven Flächen**

Zur Ermittlung der Neuropeptid-IR-Flächen wurden die angefärbten Bereiche auf den 5 zufällig erfassten Bildern mit Hilfe eines Graphiktablets und eines Eingabestiftes möglichst genau umfahren (Abb. 8). Die Größe der so gekennzeichneten Flächen wurde von der beschriebenen Software bestimmt, und die Werte wurden aufgezeichnet. Die auf diese Weise pro Bild vermessenen Einzelflächen wurden zu einer Zwischensumme addiert. Anschließend wurde aus den 5 Zwischensummen durch Addition die Gesamtfläche der jeweiligen Färbung je Tier und Lokalisation gebildet. Diese Fläche wurde in  $\mu\text{m}^2$  angegeben.

Da für die jeweiligen Anfärbungen immer die sich entsprechenden Folgeschnitte der einzelnen Lokalisationen verwendet wurden, wurde ein Vergleich der beiden Neuropeptidfärbungen miteinander und mit der Gesamtnervenfärbung (Neurofilament 200) möglich. Während NF 200 die Dichte der Nervenfasern auf den vermessenen Schnitten darstellte, konnten durch die Färbungen auf Substanz P und VIP die jeweiligen IR-Strukturen innerhalb dieser Nervenfasern dargestellt werden.

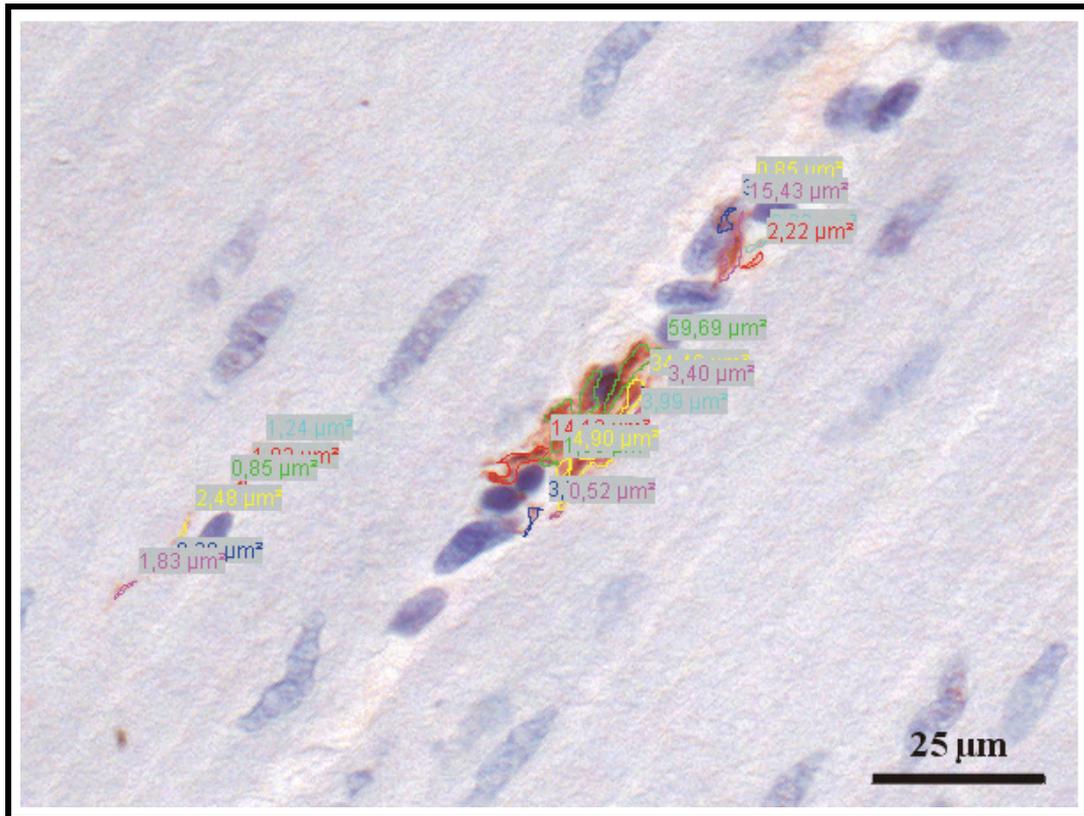


Abbildung 8: Vermessung der Einzelflächen auf einem Bild mittels des Software-Programms analySIS

## 4 Statistische Auswertung

Hierzu wurden zunächst die Varianzen der Variablen zwischen den Gruppen mit Hilfe des Levene-Tests miteinander verglichen. Ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede, wurde anschließend ein Mittelwertvergleich mit dem gewöhnlichen t-Test (t-Test bei gleicher Varianz) vorgenommen. Bei ungleichen Varianzen wurde der t-Test mit separater Varianzschätzung verwendet.

Für die Auswertung der Schichtdickenmessdaten wurde zunächst eine einfaktorielle ANOVA (analysis of variation) durchgeführt. Anschließend erfolgte ein many-to-one-Vergleich mit dem Dunnett-Test.

Die statistische Auswertung der Daten der 3 gesunden Kühe, bei denen durch Anlegen eines Magenbandes experimentell eine Labmagendilatation induziert wurde, erfolgte mittels t-Test für abhängige bzw. unabhängige Stichproben (abhängig bei dem Vergleich zwischen den beiden Operationszeitpunkten mit jeweils  $n = 3$ ; unabhängig bei dem Vergleich zu Versuchs-

bzw. Kontrollgruppe mit  $n = 20$ ). Für den Vergleich der Daten aus der Magenbandgruppe zum Zeitpunkt der ersten bzw. der zweiten OP mit den Holstein-Kühen ohne bzw. mit Labmagenverlagerung wurde die Beschreibung der Abweichungen zwischen den Datengruppen durch den mittleren Quotienten der Gruppenmediane ausgedrückt. Um die Genauigkeit dieser Abschätzung bewerten zu können, wurde zusätzlich das 95 % Konfidenzintervall für den wahren mittleren Quotienten angegeben. Wenn dabei das Konfidenzintervall genau den Wert 1 (= neutraler Quotient) annimmt, bedeutet dies, dass kein statistisch signifikanter Mittelwertsunterschied zwischen den Datengruppen vorliegt.

Bei allen statistischen Analysen wurden Werte für  $p < 0,05$  als statistisch signifikant und solche für  $p < 0,001$  als statistisch hochsignifikant interpretiert.

Alle diese statistischen Berechnungen wurden unterstützt durch die Arbeitsgruppe für Biomathematik und Datenverarbeitung (Dr. Failing) des Fachbereichs Veterinärmedizin. Hierbei fand das Programm BMDP3D Anwendung.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Ergebnisse der Schichtdickenvermessung**

Die Vermessung der Schichtdicken der Labmagenwand ergab für die Tiere der Rasse Deutsches Fleckvieh eine mittlere Gesamtdicke ( $\bar{x} \pm s$ ) von  $13134 \pm 2825 \mu\text{m}$  im Antrum-Bereich und  $10901 \pm 2166 \mu\text{m}$  im Corpus-Bereich. Bei den Tieren der Rasse Deutsche Holsteins ohne Labmagenverlagerung betrug dieser Wert  $12260 \pm 2607 \mu\text{m}$  im Antrum- und  $10459 \pm 1282 \mu\text{m}$  im Corpus-Bereich. In der Gruppe der Holstein-Kühe mit verlagertem Labmagen wurde im Antrum-Bereich eine Gesamtdicke von  $12774 \pm 3279 \mu\text{m}$  und im Corpus-Bereich eine solche von  $10789 \pm 2982 \mu\text{m}$  gemessen (Abb. 9). Die Unterschiede bezüglich dieses Kriteriums zwischen den 3 genannten Gruppen erwiesen sich als nicht signifikant.

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bestanden hinsichtlich der Stärke der Tunica muscularis zwischen den 3 Gruppen: Hier ergaben sich für die Fleckvieh-Kühe  $7268 \pm 1895 \mu\text{m}$  im Antrum- und  $5846 \pm 1428 \mu\text{m}$  im Corpus-Bereich. Die Werte für die Holstein-Kühe ohne LMV lagen bei  $6907 \pm 2109 \mu\text{m}$  (Antrum) bzw. bei  $6445 \pm 1325 \mu\text{m}$

(Corpus). Bei den Patienten mit verlagertem Labmagen betrug die Stärke der Tunica muscularis  $6672 \pm 2145 \mu\text{m}$  im Antrum- bzw.  $6989 \pm 1999 \mu\text{m}$  im Corpus-Bereich.

Die Lamina muscularis mucosae wies im Antrum-Bereich bei den Tieren der Rasse Deutsches Fleckvieh eine Dicke von  $369 \pm 156 \mu\text{m}$  auf. Bei den Holstein-Kühen ohne Verlagerung betrug sie  $283 \pm 100 \mu\text{m}$  und bei denjenigen mit Verlagerung  $222 \pm 74 \mu\text{m}$  (Unterschiede nicht signifikant). Im Corpus-Bereich ergaben sich folgende Verhältnisse: Bei den Fleckviehkühen war die Lamina muscularis mucosae  $221 \pm 92 \mu\text{m}$  dick, während bei den Deutschen Holsteins ohne Verlagerung  $201 \pm 93 \mu\text{m}$  und in der Gruppe mit LMV  $186 \pm 111 \mu\text{m}$  gemessen wurden.

Wie bereits erwähnt, ergaben sich für keine der vermessenen Schichten statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Gruppe oder der Lokalisation.

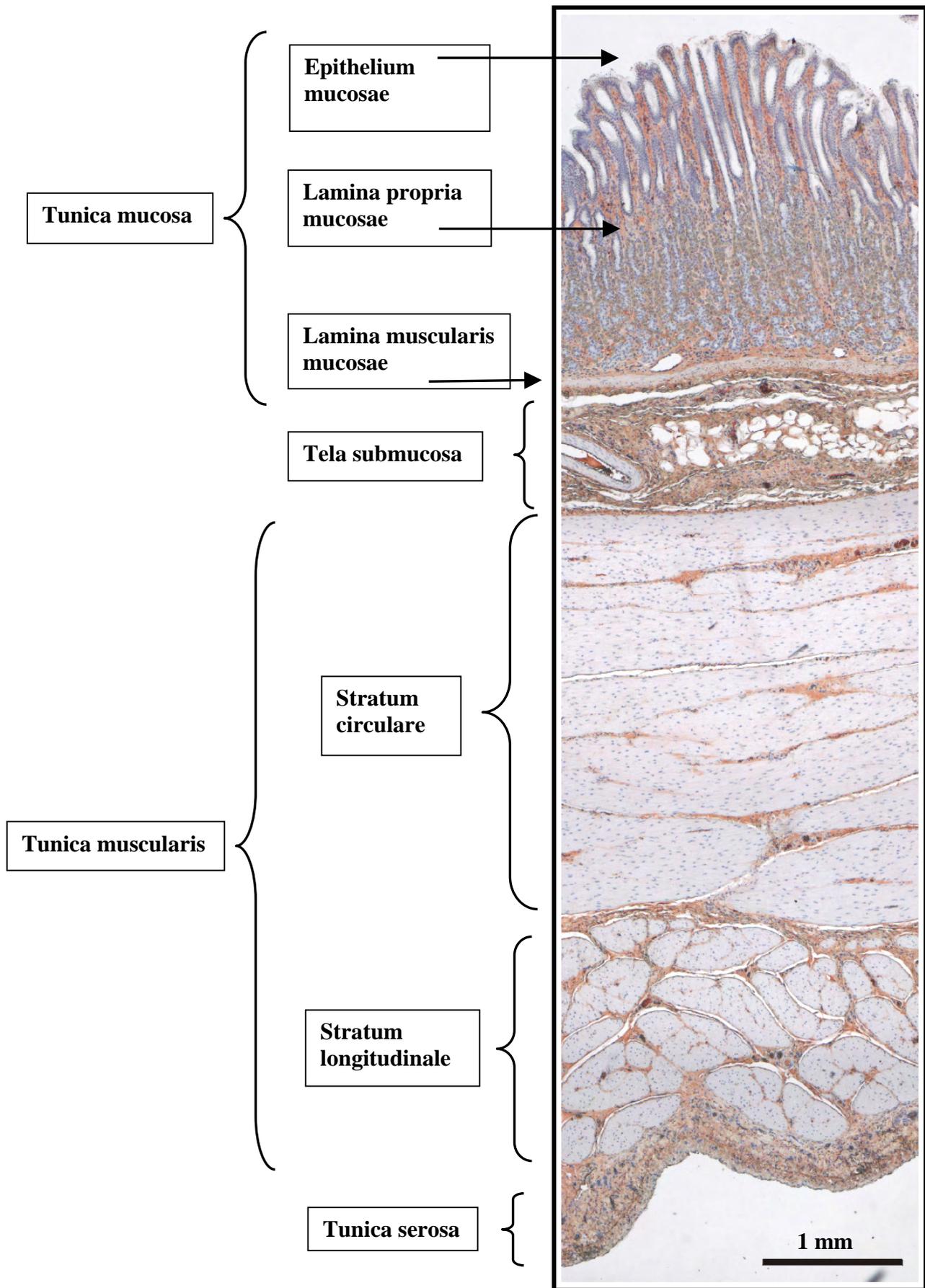


Abbildung 9: Gesamtdicke der Labmagenwand bei Kuh „OP 11“ im Corpus (MIA-Übersichtsbild)

## 5.2 Ergebnisse der SP-Färbung

Deutsches Fleckvieh:

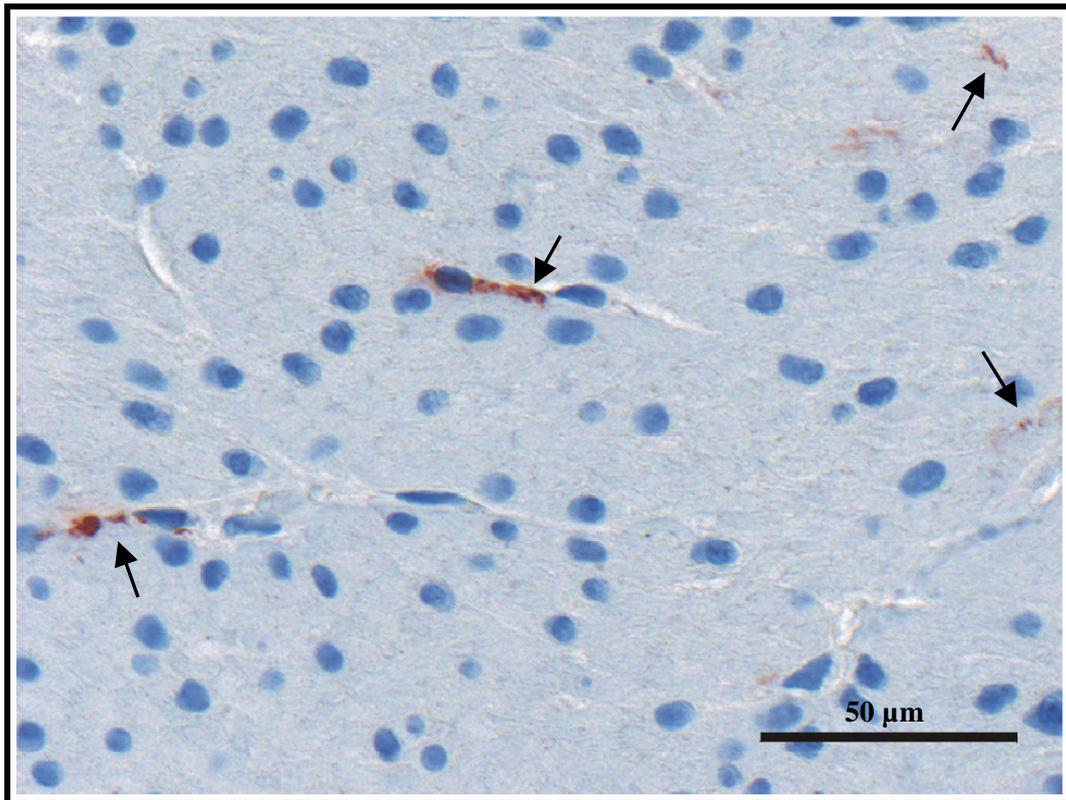
Die Auswertung der derart angefärbten Labmagenschnitte ergab – bezogen auf die ermittelten immunreaktiven (IR) Gesamtflächen – bei der Fleckvieh-Gruppe eine mittlere SP-IR-Fläche ( $\bar{x} \pm s$ ) von  $1085 \pm 605 \mu\text{m}^2$  im Antrum-Bereich und eine solche von  $1133 \pm 480 \mu\text{m}^2$  im Bereich des Corpus abomasi.

Deutsche Holsteins ohne LMV (Abb. 10):

Bei den Biopтатаen aus dem Antrum pylori der Holstein-Kühe ohne LMV betrug die SP-IR-Fläche  $975 \pm 602 \mu\text{m}^2$ , im Corpus wurden  $821 \pm 607 \mu\text{m}^2$  gemessen.

Vergleich der beiden Rassen bezüglich der IR-Flächen nach SP-Färbung:

In dieser Hinsicht ließen sich im Antrum-Bereich keine signifikanten Unterschiede zwischen Deutschen Holsteins und Deutschem Fleckvieh nachweisen. Im Corpus abomasi erwies sich diese IR-Fläche für Substanz P bei der Rasse Deutsche Holsteins jedoch als signifikant kleiner als bei den Fleckviehkühen ( $p = 0,025$ ; t-Test bei gepoolter Varianz) (Abb. 11).



**Abbildung 10: Anfärbung von SP innerhalb von Nervenfasern in der Tunica muscularis im Antrum pylori bei einer Kuh der Rasse Deutsche Holsteins (Tier-Nummer 23). SP-IR-positiv angefärbte Granula sind mit Pfeilen markiert.**

Deutsche Holsteins mit LMV:

In dieser Gruppe betrug die Größe der IR-Fläche für SP  $314 \pm 161 \mu\text{m}^2$  im Antrum-Bereich und  $297 \pm 143 \mu\text{m}^2$  im Corpus-Bereich.

Vergleich der IR-Flächen nach SP-Färbung zwischen Kühen mit und solchen ohne LMV:

Bezüglich dieses Kriteriums ergaben sich sowohl für den Antrum-Bereich als auch für den Bereich des Corpus abomasi hochsignifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ( $p$  jeweils  $< 0,0001$ ; t-Test bei gepoolter Varianz). Wie in der nachfolgenden Abbildung 12 dargestellt, war die IR-Fläche für Substanz P bei den Labmagenpatienten an beiden Lokalisationen weitaus kleiner als bei den Tieren ohne Labmagenverlagerung.

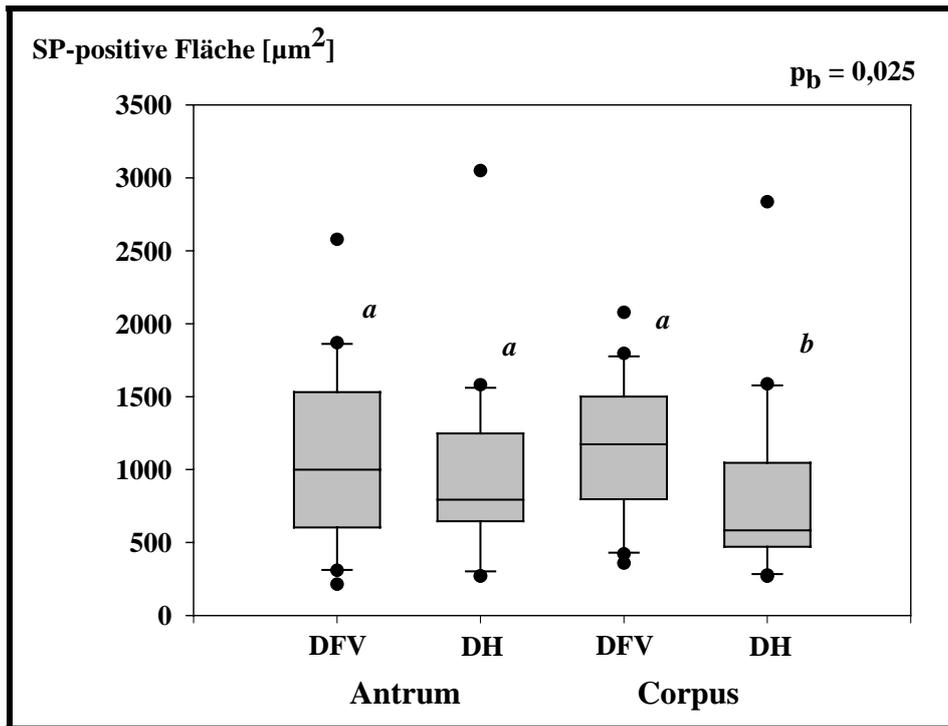


Abbildung 11: Vergleich der IR-Flächen für SP zwischen Kühen der Rassen Deutsches Fleckvieh und Deutsche Holsteins (mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant)

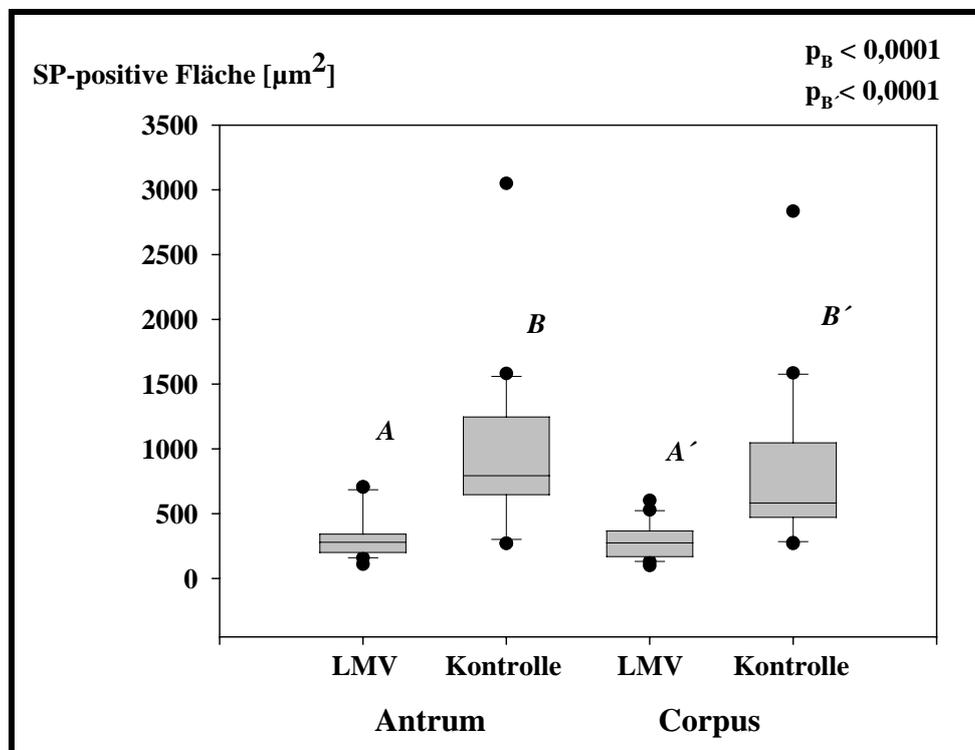


Abbildung 12: Vergleich der IR-Flächen für SP bei Kühen der Rasse Deutsche Holsteins mit und bei solchen ohne LMV (mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant)

### 5.3 Ergebnisse der VIP-Färbung

Deutsches Fleckvieh:

Die Auswertung der VIP-IR-Flächen auf den ausgewerteten histologischen Schnitten aus dem Antrum pylori der Fleckviehkühe ergab eine mittlere VIP-IR-Fläche in einer Ausdehnung von  $1120 \pm 642 \mu\text{m}^2$ . Im Corpus-Bereich betrug die Größe der derart ermittelten Fläche  $1617 \pm 730 \mu\text{m}^2$ .

Deutsche Holsteins ohne LMV:

Bei den Biopaten aus dem Antrum pylori der Holstein-Kühe ohne LMV zeigte sich eine mittlere VIP-IR-Fläche von  $1491 \pm 684 \mu\text{m}^2$ . Die entsprechende Fläche im Corpus-Bereich hatte eine Größe von  $1661 \pm 732 \mu\text{m}^2$ .

Eine Anfärbung der VIP-IR-positiven Strukturen ist beispielhaft in Abbildung 13 dargestellt. Bei dieser Abbildung handelt es sich um eines der 5 Blickfelder, welche in die Auswertung der IR-Flächen für VIP im Antrum pylori bei den Holstein-Kühen ohne Labmagenverlagerung eingegangen sind.

Vergleich der beiden Rassen bezüglich der IR-Flächen nach VIP-Färbung:

In dieser Hinsicht ließen sich in den Lokalisationen Antrum pylori und Corpus abomasi keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Rassen nachweisen. Wie in Abbildung 14 ersichtlich, ist jedoch eine klare Tendenz dahingehend zu erkennen, dass bei den Tieren der Rasse Deutsche Holsteins der Antrum-Bereich einem höheren hemmenden Einfluss zu unterliegen scheint als dies bei den Deutschen Fleckvieh-Kühen der Fall ist. Statistisch erscheint der Unterschied jedoch als knapp nicht signifikant ( $p = 0,054$ ; t-Test bei gepoolter Varianz).

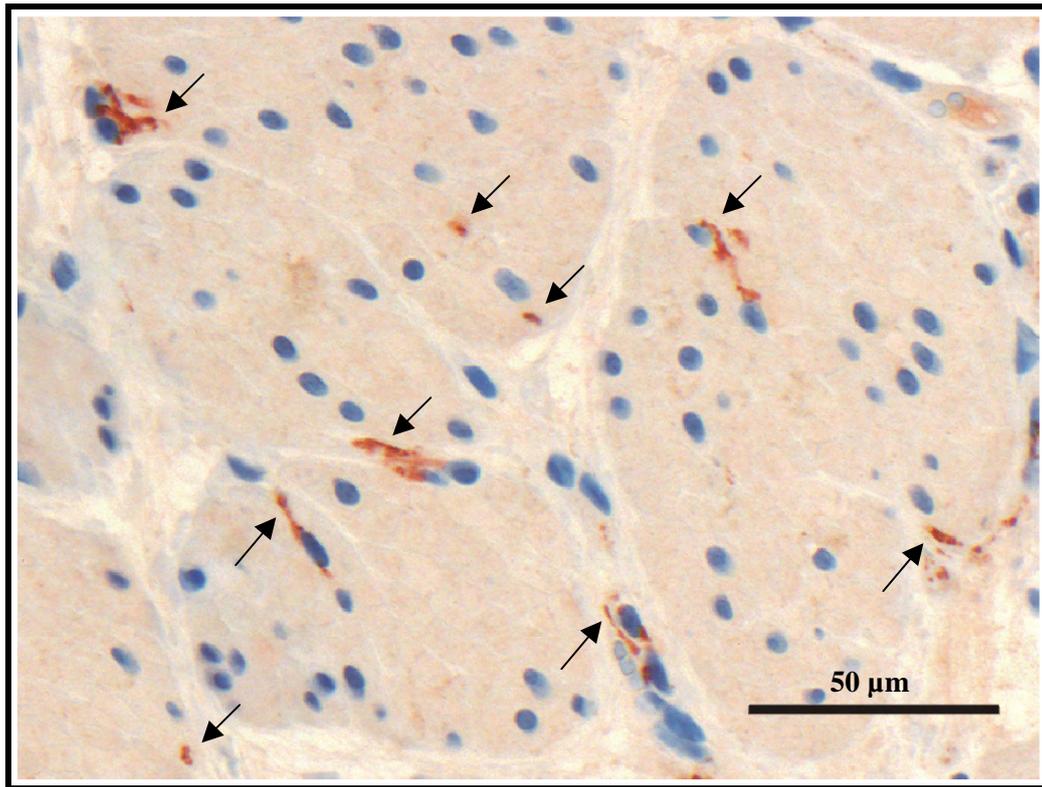


Abbildung 13: Anfärbung von VIP innerhalb von Nervenfasern in der Tunica muscularis im Antrum pylori bei einer Kuh der Rasse Deutsche Holsteins (Tier-Nummer 3). VIP-IR-positiv angefärbte Granula in den Nervenfasern sind mit Pfeilen markiert.

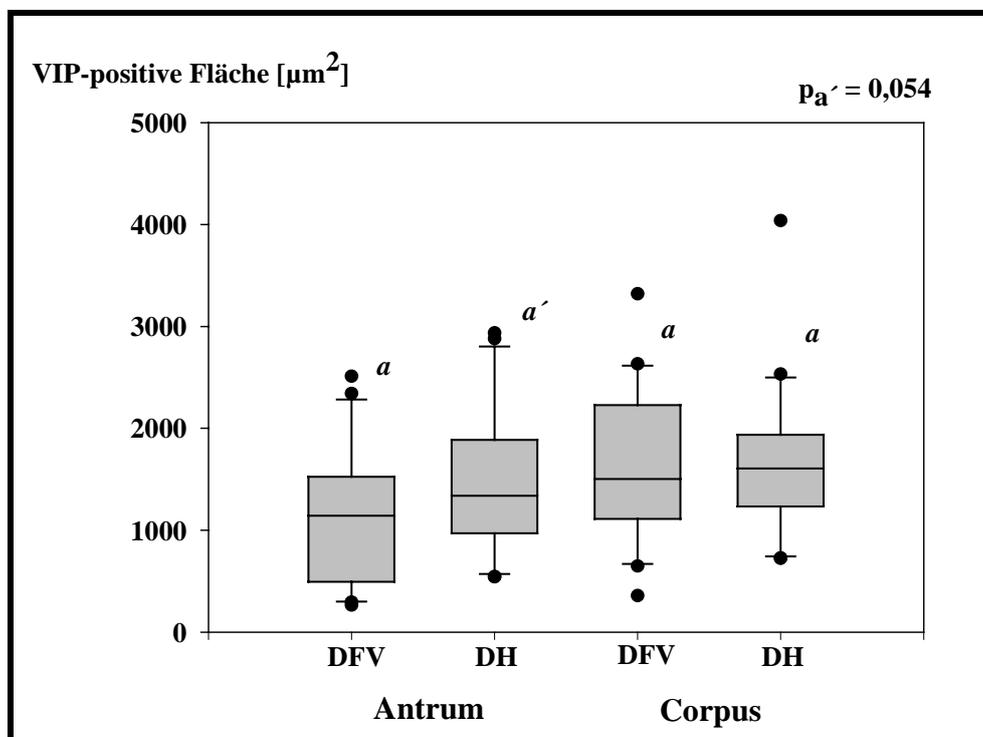


Abbildung 14: Vergleich der IR-Flächen für VIP bei Kühen der Rassen Deutsches Fleckvieh und Deutsche Holsteins (mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant)

Deutsche Holsteins mit LMV:

Die Auswertung der Bioplatprobenschnitte von Patienten der Klinik ergab für die Anfärbung auf VIP eine IR-Fläche in der Größe von  $493 \pm 228 \mu\text{m}^2$  im Antrum und  $466 \pm 235 \mu\text{m}^2$  im Corpus.

Vergleich der IR-Flächen nach VIP-Färbung zwischen Kühen der Rasse Deutsche Holsteins mit und zwischen solchen ohne Labmagenverlagerung:

Bezüglich dieses Kriteriums ergaben sich - wie schon bei der SP-Färbung - sowohl für den Antrum-Bereich als auch für den Bereich des Corpus abomasi hochsignifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ( $p$  jeweils  $< 0,0001$ ; t-Test bei gepoolter Varianz).

Wie in der nachfolgenden Abbildung 15 veranschaulicht, zeigen die Probenschnitte von Tieren aus der OP-Gruppe eine deutlich geringere IR-Anfärbbarkeit, als dies bei Proben der gesunden Tiere der Fall war.

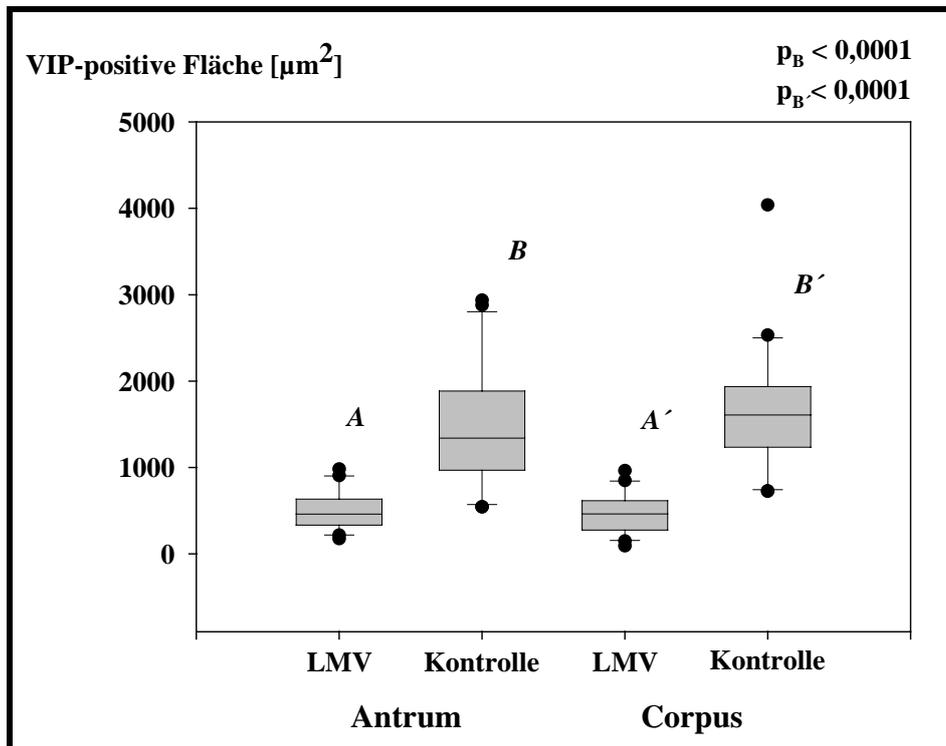


Abbildung 15: Vergleich der IR-Flächen für VIP bei Kühen der Rasse Deutsche Holsteins mit und bei solchen ohne LMV (mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant)

## 5.4 Ergebnisse der NF 200-Färbung

Deutsches Fleckvieh:

Bei der Auswertung der Gesamtnervenfärbung NF 200 innerhalb der zusammen 464215  $\mu\text{m}^2$  großen 5 Bildflächen ergab sich für den Antrum-Bereich eine IR-Fläche für NF 200 in der Größe von  $3732 \pm 1829 \mu\text{m}^2$ . Im Corpus-Bereich betrug dieser Wert  $3911 \pm 1885 \mu\text{m}^2$ .

Deutsche Holsteins ohne LMV:

Bei der entsprechenden Auswertung der Antrumschnitte der Holstein-Kühe ohne LMV wurde eine IR-Fläche von  $4997 \pm 1379 \mu\text{m}^2$  gemessen, im Corpus-Bereich eine solche von  $5475 \pm 3086 \mu\text{m}^2$ .

Eine Anfärbung der NF 200-IR-positiven Strukturen ist beispielhaft in Abbildung 16 dargestellt. Bei dieser Abbildung handelt es sich um eines der 5 Blickfelder, welche in die Auswertung der IR-Flächen für NF 200 im Antrum pylori bei den Holstein-Kühen ohne Labmagenverlagerung eingegangen sind.

Vergleich der beiden Rassen bezüglich der IR-Flächen nach NF 200-Färbung:

In bezug auf die gemessene IR-Fläche für Neurofilament 200 als Kriterium für die Gesamtnervationsdichte ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Rassen nachweisen (Abb. 17). Während in den Biopaten aus der Labmagenwandmuskulatur des Antrum-Bereichs von Kühen der Rasse Deutsche Holsteins ein Wert von  $4997 \pm 1379 \mu\text{m}^2$  ermittelt wurde, betrug dieser bei den Fleckviehkühen lediglich  $3732 \pm 1829 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0,0052$ ). Dieser Unterschied war auch im Bereich des Corpus abomasi nachweisbar, wenn auch in geringerer Ausprägung (Deutsche Holsteins  $5475 \pm 3086 \mu\text{m}^2$ , Deutsches Fleckvieh  $3911 \pm 1885 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,056$ ).

Die oben geschilderten Befunde deuten somit darauf hin, dass die Labmagenwand bei den Kühen der Rasse Deutsche Holsteins zumindest im Bereich des Antrum pylori stärker innerviert war als bei den Fleckviehkühen.

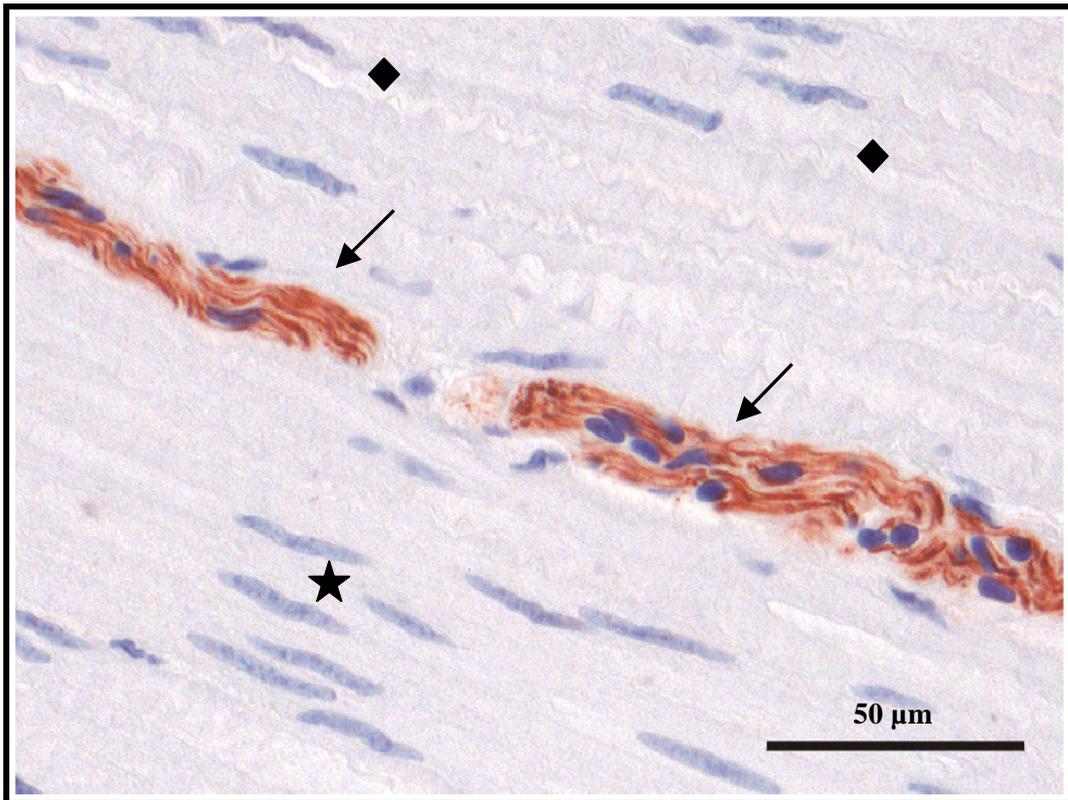


Abbildung 16: Anfärbung der Nervenfasern mittels NF 200 in der Tunica muscularis im Antrum pylori bei einer Kuh der Rasse Deutsche Holsteins (Tier-Nummer 19). Die rot angefärbten Nervenfaserbündel (Pfeile) heben sich deutlich von den blau angefärbten Muskelzellen (Stern) und dem eingelagerten Bindegewebe (Rauten) ab.

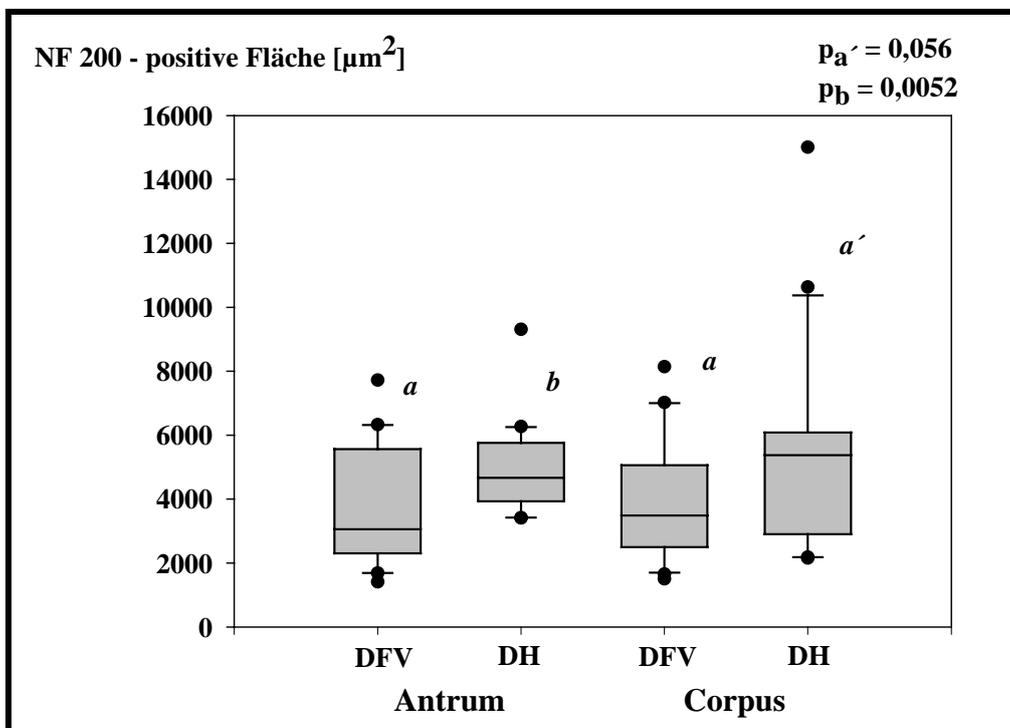


Abbildung 17: Vergleich der IR-Flächen für NF 200 bei Kühen der Rassen Deutsches Fleckvieh und Deutsche Holsteins (mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant)

Deutsche Holsteins mit LMV:

Bei den Tieren mit LMV erstreckte sich die IR-Fläche für NF 200 im Antrum über  $3900 \pm 1859 \mu\text{m}^2$  und im Corpus über  $3516 \pm 1681 \mu\text{m}^2$ .

Vergleich der IR-Flächen nach NF 200-Färbung zwischen Kühen mit und solchen ohne LMV: Auch beim Vergleich der Daten für die Tiere der Rasse Deutsche Holsteins mit und ohne LMV konnten Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden (Abb. 18). Während in den Biopaten aus der Labmagenwandmuskulatur des Antrum-Bereichs bei den Holstein-Kühen ohne LMV ein Wert von  $4997 \pm 1379 \mu\text{m}^2$  ermittelt wurde, betrug dieser bei den Holstein-Kühen mit Labmagenverlagerung lediglich  $3900 \pm 1859 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0,008$ ; t-Test bei gepoolter Varianz). Dieser Unterschied war auch im Bereich des Corpus abomasi nachweisbar, wenn auch in etwas geringerer Ausprägung (Deutsche Holsteins ohne LMV  $5475 \pm 3086 \mu\text{m}^2$ , Deutsche Holsteins mit LMV  $3516 \pm 1681 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,01$ ; t-Test bei gepoolter Varianz).

Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Labmagenwand bei Tieren mit LMV statistisch signifikant schwächer innerviert war als bei den Kontrolltieren.

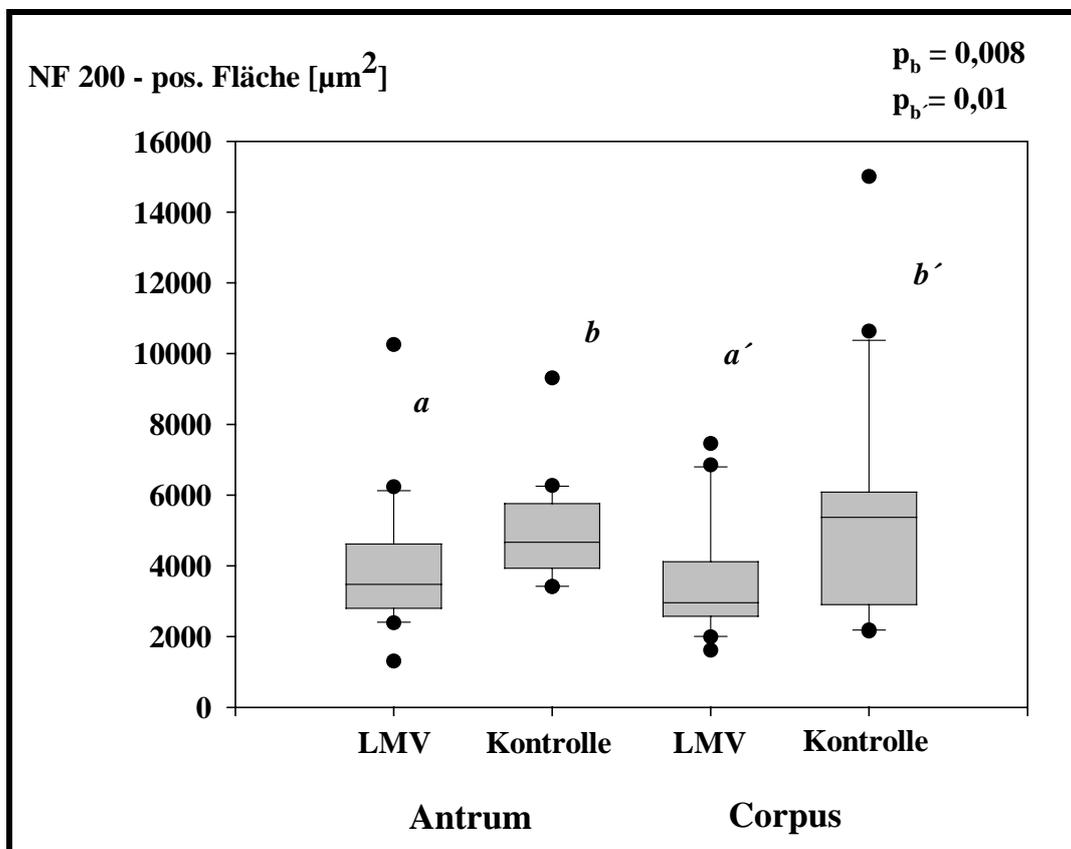


Abbildung 18: Vergleich der IR-Flächen für NF 200 bei Kühen der Rasse Deutsche Holsteins mit und bei solchen ohne LMV (mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant)

## **5.5 Verhältnisse der IR-Flächen für SP zu den IR-Flächen für VIP bei Proben von Holstein-Kühen mit und von solchen ohne Labmagenverlagerung**

Da wie bereits erwähnt (Kap. 2.2) mehrere Neuropeptide im selben Neuron bzw. in derselben Nervenfasern auftreten können, war das Verhältnis der IR-Flächen für die beiden immunhistochemisch nachgewiesenen Neuropeptide SP und VIP in der Gruppe der Holstein-Kühe mit und in derjenigen ohne Labmagenverlagerung von Interesse. Dabei sollte geklärt werden, ob sich das Verhältnis der IR-Fläche für Substanz P zu der IR-Fläche für VIP zwischen den beiden Gruppen dahingehend unterscheidet, dass sich das Verhältnis bei den labmagengesunden Holstein-Kühen im Vergleich zu den Werten bei den Kühen der Rasse Deutsche Holsteins mit Labmagenverlagerung in eine bestimmte Richtung verschiebt. Eine solche Verschiebung hätte in Richtung der stimulierenden Substanz P oder aber in Richtung des hemmenden VIP stattfinden können.

Für diesen Vergleich mussten die gemessenen Werte bezüglich der IR-Flächen für SP bzw. VIP in der Gruppe Deutsche Holsteins mit Labmagenverlagerung und in derjenigen ohne LMV logarithmisch transformiert werden, um die gemessenen Werte annähernd in eine Normalverteilung zu überführen. Das Verhältnis der derart in Logarithmen umgewandelten Flächenwerte für SP und VIP wurde als Differenz der Logarithmen angegeben.

Hierbei ergab sich bei den Schnitten aus dem Antrum pylori von Kühen der Rasse Deutsche Holsteins ohne LMV für das Verhältnis der IR-Fläche für SP zu derjenigen für VIP – dargestellt als Differenz der Logarithmen – ein Wert von  $-0,203 \pm 0,305$  ( $\bar{x} \pm s$ ); im Corpus-Bereich betrug dieser Wert  $-0,353 \pm 0,31$ . Bei den Patienten mit Labmagenverlagerung betrug dieses Flächenverhältnis im Bereich des Antrum pylori  $-0,197 \pm 0,29$ , wohingegen im Bereich des Corpus abomasi ein Wert von  $-0,183 \pm 0,299$  ermittelt wurde.

Bezüglich des Verhältnisses der IR-Flächen der beiden Neuropeptide SP und VIP ergaben sich zwischen Holstein-Kühen ohne Labmagenverlagerung und solchen mit einer Verlagerung dieses Organs für keine der beiden untersuchten Lokalisationen signifikante Unterschiede ( $p = 0,95$  im Antrum-Bereich und  $p = 0,08$  im Corpus-Bereich; in beiden Fällen wurde der t-Test bei gepoolter Varianz verwendet).

Wie in der nachfolgenden Abbildung 19 dargestellt, war das Verhältnis der beiden Neuropeptide zueinander zwischen den beiden untersuchten Gruppen (Deutsche Holsteins mit und solche ohne LMV) sowohl im Antrum- als auch im Corpus-Bereich sehr ausgeglichen.

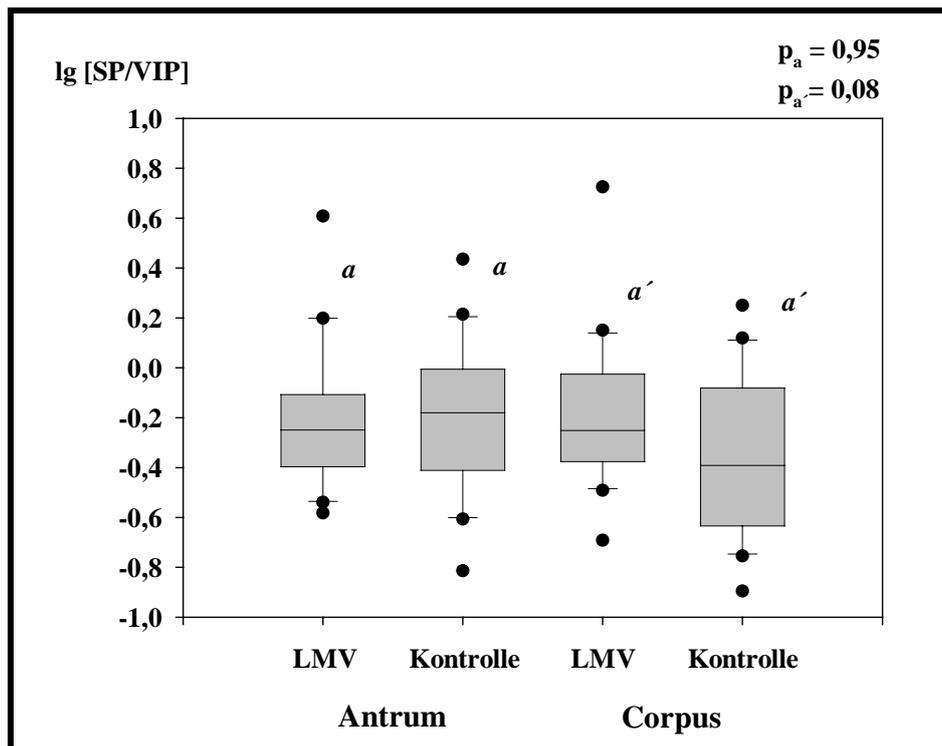


Abbildung 19: Verhältnis der IR-Flächen für SP und VIP (dargestellt als Differenz der Logarithmen) bei Kühen der Rasse Deutsche Holsteins mit und bei solchen ohne LMV (mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant)

## 5.6 Anteile der IR-Flächen für SP und für VIP an der IR-Fläche für NF 200 (Gesamtnervenfärbung)

Die Neuropeptide Substanz P und VIP werden in Neuronen gebildet und entlang der Axone bzw. Nervenfasern zu den Effektorzellen transportiert (vgl. Kap. 2.2). Die vermessenen IR-Flächen für diese Neuropeptide bilden somit entsprechende Anteile an der IR-Fläche für Neurofilament 200, welches zur Darstellung der Gesamtnervendichte des jeweiligen ausgemessenen Schnittes verwendet wurde.

Zur Klärung der Frage, ob sich die Gruppen der Holstein-Kühe mit und diejenige ohne Labmagenverlagerung bezüglich der Anteile der IR-Fläche für SP und derjenigen für VIP an der IR-Fläche für NF 200 unterscheiden, wurden die Werte der ausgemessenen IR-Flächen aus diesen Anfärbungen logarithmisch transformiert. Nach dieser Transformation lagen die Daten annähernd als Normalverteilung vor.

Die zu vergleichenden Anteile der IR-Flächen für SP und VIP an der IR-Fläche für NF 200 wurden als Differenzen der Logarithmen ausgedrückt.

Hierbei ergaben sich bei den Holstein-Kühen ohne Labmagenverlagerung für den Anteil der SP-IR-Fläche an der NF 200-IR-Fläche folgende Werte: Im Antrum-Bereich konnte ein Wert von  $-0,76 \pm 0,24$  ermittelt werden, während dieser Wert im Bereich des Corpus abomasi  $-0,85 \pm 0,37$  betrug. Bei den Patienten mit Labmagenverlagerung konnte eine solche Differenz in Höhe von  $-1,1 \pm 0,22$  im Bereich des Antrum pylori, und eine solche in Höhe von  $-1,08 \pm 0,25$  im Corpus-Bereich ermittelt werden.

Bei der statistischen Auswertung dieser Daten mittels t-Test bei gepoolter Varianz ergab sich im Bereich des Antrum pylori ein hochsignifikanter Unterschied bezüglich des Anteils der SP-IR-Fläche an der IR-Fläche für NF 200 zwischen den Kühen der Rasse Deutsche Holsteins mit und solchen ohne Labmagenverlagerung ( $p < 0,0001$ ). Ein solcher Unterschied war auch im Corpus abomasi nachweisbar, wenn auch in etwas geringerer Ausprägung ( $p = 0,025$ ; t-Test bei gepoolter Varianz).

Bezüglich des Anteils der VIP-IR-Fläche an der IR-Fläche für NF 200 ergaben sich bei den Holstein-Kühen ohne LMV folgende Werte: Im Bereich des Antrum pylori wurde ein Wert von  $-0,557 \pm 0,185$  errechnet, während im Corpus-Bereich  $-0,496 \pm 0,23$  verzeichnet wurde.

Bei den Kühen der Rasse Deutsche Holsteins mit Labmagenverlagerung konnte im Antrum pylori ein solcher Anteil als eine Differenz in Höhe von  $-0,906 \pm 0,246$  berechnet werden. Der Wert bei den Proben aus dem Corpus-Bereich lag in dieser Gruppe bei  $-0,902 \pm 0,298$ .

Bezüglich des Anteils der VIP-IR-Fläche an der IR-Fläche für NF 200 ergaben sich sowohl für den Antrum-Bereich als auch für den Bereich des Corpus abomasi hochsignifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ( $p$  jeweils  $< 0,0001$ ).

Wie in der nachfolgenden Abbildung 20 dargestellt, waren die Anteile der Neuropeptid-IR-Flächen an der IR-Fläche für NF 200 bei den Labmagenpatienten in beiden Lokalisationen deutlich geringer als bei den Tieren ohne Labmagenverlagerung.



## **5.7 Ergebnisse der immunhistochemischen Anfärbung von Labmagenbiopsat-Schnitten aus Kühen mit experimentell induzierter Labmagen-Dilatation**

### **Untersuchungsergebnisse vor Anlegen des Magenbandes:**

Die Anfärbung der Labmagenbiopsat-Schnitte von Proben aus den 3 Versuchskühen, welche während der ersten Operation – also vor Anlegen des Magenbandes – gewonnen wurden, ergab im Antrum-Bereich eine SP-IR-Fläche von  $(\bar{x} \pm s)$   $1102 \pm 317 \mu\text{m}^2$ . Im Bereich des Corpus abomasi betrug die Größe dieser IR-Fläche  $587 \pm 83 \mu\text{m}^2$ .

Bezüglich der VIP-IR-Fläche konnten  $2197 \pm 256 \mu\text{m}^2$  im Bereich des Antrum pylori und  $1418 \pm 929 \mu\text{m}^2$  im Corpus-Bereich gemessen werden.

Die Gesamtinnervation in den entnommenen Labmagenbiopsaten wurde mittels Anfärbung des Neurofilament 200 bestimmt. Hierbei ergab sich im Bereich des Antrum pylori eine NF 200-IR-Fläche in der Größe von  $3229 \pm 1016 \mu\text{m}^2$ . Die Größe der entsprechenden IR-Fläche im Bereich des Corpus abomasi lag bei  $3894 \pm 1161 \mu\text{m}^2$ .

### **Untersuchungsergebnisse 72 Stunden nach Anlegen des Magenbandes:**

In den Proben, welche 72 Stunden nach Anlegen des Magenbandes und dadurch induzierter Labmagenanschoppung entnommen wurden, wurde nach der immunhistochemischen Anfärbung von Substanz P eine SP-IR-Fläche von  $555 \pm 187 \mu\text{m}^2$  im Antrum-Bereich und eine solche von  $256 \pm 54 \mu\text{m}^2$  im Bereich des Corpus abomasi ermittelt.

Die Anfärbung von VIP auf den entsprechenden Schnitten resultierte im Bereich des Antrum pylori in einer VIP-IR-Fläche von  $1223 \pm 496 \mu\text{m}^2$ . Im Corpus-Bereich konnten  $1010 \pm 193 \mu\text{m}^2$  gemessen werden.

Nach der Anfärbung NF 200-IR-positiver Strukturen wiesen diese im Bereich des Antrum pylori eine Fläche von  $4095 \pm 320 \mu\text{m}^2$  auf. Die NF 200-IR-Fläche im Corpus-Bereich betrug  $3103 \pm 673 \mu\text{m}^2$ .

**Vergleichende Betrachtung der IR-Flächen in den Labmagenbiopsaten aus der ersten mit denjenigen aus der zweiten Operation:**

Nach SP-Färbung:

Obwohl sich die SP-IR-Fläche im Bereich des Antrum pylori nach dem Anlegen des Magenbandes für 72 Stunden im Mittel um den Faktor 2,01 verkleinerte, konnte dieser Unterschied aufgrund der interindividuellen Variation der Werte (SF = 1,84) und vor allem auch aufgrund der geringen Fallzahl statistisch nicht abgesichert werden ( $p = 0,19$ ).

Im Bereich des Corpus abomasi zeigte sich dagegen ein signifikanter Unterschied zwischen den SP-IR-Flächen vor und nach dem Anlegen des Magenbandes ( $p = 0,027$ ) (Abb. 21). Die SP-IR-Fläche war nach dem Anlegen des Magenbandes im Mittel um den Faktor 2,31 kleiner (SF = 1,278).

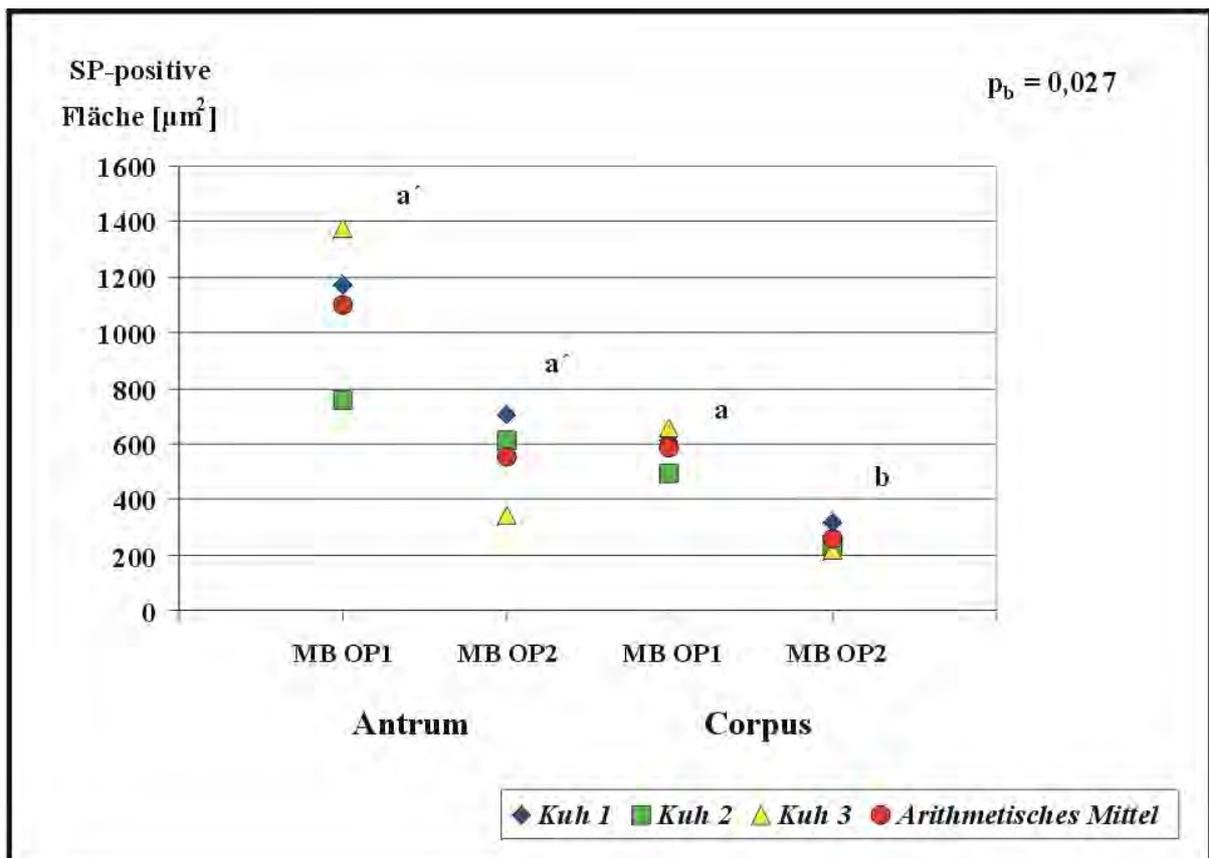


Abbildung 21: Vergleich der IR-Flächen für SP zwischen Kühen der Rasse Deutsche Holsteins vor (OP1) und nach (OP2) Anlegen eines Magenbandes für 72 Stunden (mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant)

Nach VIP-Färbung:

Bezüglich der IR-Flächen für VIP konnten weder im Antrum- noch im Corpus-Bereich signifikante Unterschiede zwischen den Proben vor und nach Magenband festgestellt werden ( $p = 0,19$  im Antrum;  $p = 0,57$  im Corpus). Trotzdem ist dabei zu beachten, dass die Größe der IR-Fläche für VIP in beiden Lokalisationen abnahm (im Antrum um den Faktor 1,91 und im Corpus um den Faktor 1,22).

Nach Neurofilament 200-Färbung:

Bezüglich der Anfärbung der Nervenstrukturen mittels NF 200 konnten beim Vergleich der Daten von Proben vor und von solchen nach Magenband in beiden Lokalisationen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden ( $p = 0,37$  im Antrum;  $p = 0,28$  im Corpus). Die Gesamtnervationsdichte lag hierbei im Bereich des Antrum pylori nach dem Anlegen des Magenbandes geringfügig über derjenigen vor Anlegen des Magenbandes (Faktor 0,76). Im Corpus-Bereich war die IR-Fläche für NF 200 dagegen nach Anlegen des Magenbandes etwas kleiner als vor diesem Eingriff (Faktor 1,23).

**Vergleich der IR-Flächen in den ersten Labmagenbiopstaten aus der Magenbandgruppe (vor induzierter Labmagenanschoppung) mit denjenigen von Deutschen Holsteins ohne Labmagenverlagerung:**

Nach SP-Färbung:

Bezüglich der Anfärbung von Substanz P in den Nervenfasern und Ganglien der Labmagenwand konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den 3 labmagenegesunden Holstein-Kühen der Magenbandgruppe zum Zeitpunkt der ersten Operation und den 20 Deutschen Holsteins ohne Labmagenverlagerung nachgewiesen werden. Ein solcher Unterschied bestand weder im Bereich des Antrum pylori ( $p = 0,48$ ) noch im Corpus-Bereich ( $p = 0,67$ ). Das 95 % Konfidenzintervall (KI) hatte im Antrum-Bereich eine Ausdehnung von 0,63 bis 2,55; im Corpus-Bereich eine solche von 0,41 bis 1,8.

Nach VIP-Färbung:

Auch bezüglich der Anfärbung von VIP konnten in beiden Lokalisationen keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden zwischen den Größen der VIP-IR-Flächen in Proben von Holstein-Kühen ohne Labmagenverlagerung und in denjenigen, die von labmagengesunden Holsteinkühen während der ersten Operation, also vor Anlegen des Magenbandes, entnommen wurden ( $p = 0,1$ ; 95 % KI [0,9; 2,96] im Antrum-Bereich und  $p = 0,41$ ; 95 % KI [0,45; 1,41] im Corpus-Bereich).

Nach NF 200-Färbung:

Der Vergleich der IR-Flächen für Neurofilament 200 zwischen den beiden genannten Gruppen ergab im Bereich des Corpus abomasi keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,45$ ; 95 % KI [0,41; 1,51]). Im Bereich des Antrum pylori ließ sich jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen ( $p = 0,01$ ; 95 % KI [0,46; 0,9]). Dieser Unterschied bestand in einer größeren NF 200-IR-Fläche bei den Kühen der Rasse Deutsche Holsteins ohne Labmagenverlagerung.

### **Vergleich der IR-Flächen bei Labmagenbiopsaten nach induzierter Labmagendilatation (Magenband für 72 Stunden angelegt) mit denjenigen von Labmagenpatienten:**

Nach SP-Färbung:

Die Größe der SP-IR-Fläche war im Bereich des Antrum pylori bei den Holstein-Kühen mit Labmagenverlagerung im Mittel signifikant kleiner als dies bei den Kühen mit 72-stündig angelegtem Magenband der Fall war ( $p = 0,04$ ; 95 % KI [1,04; 3,4]). Im Bereich des Corpus abomasi war ein solcher Unterschied nicht nachzuweisen ( $p = 0,87$ ; 95 % KI [0,51; 1,78]). In Abbildung 22 sind jeweils die geometrischen Mittelwerte  $\bar{x}_g$  sowie das Minimum und Maximum der beiden Gruppen veranschaulicht.

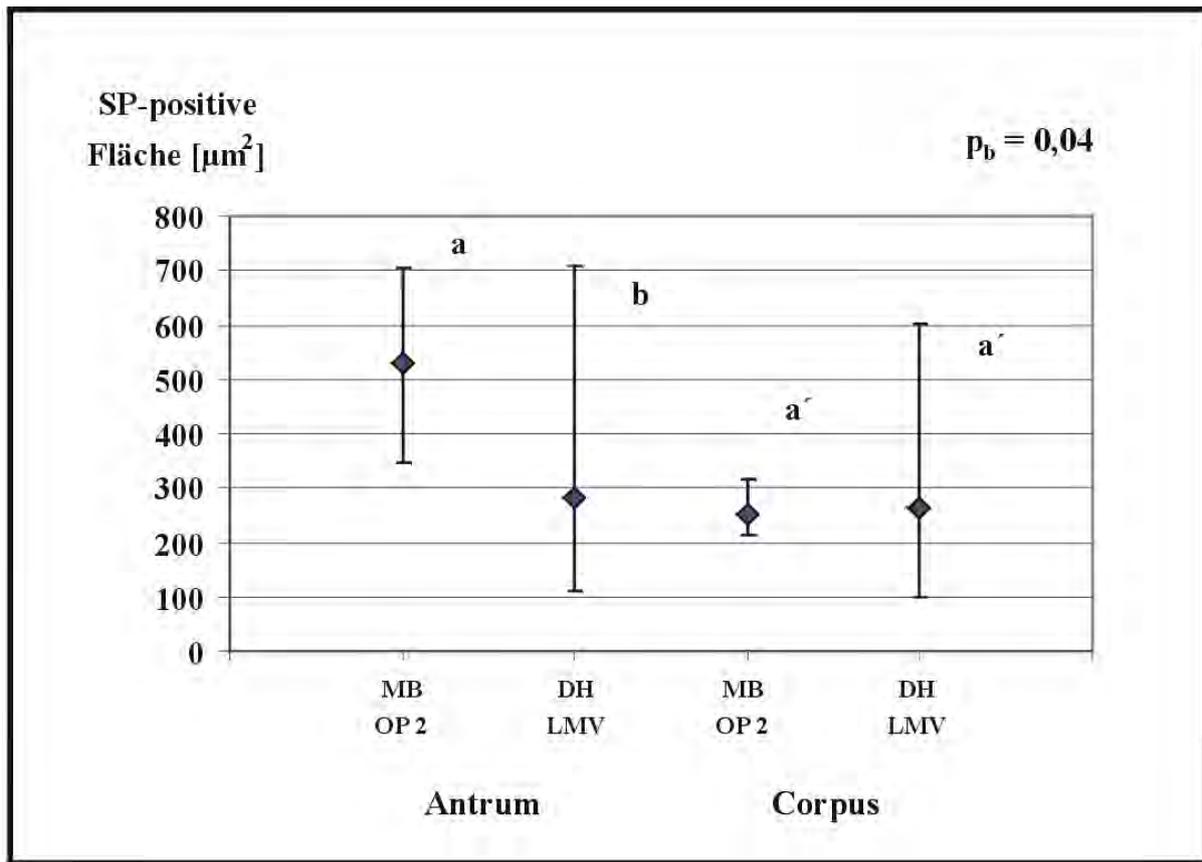


Abbildung 22: Vergleich der IR-Flächen für SP zwischen Kühen der Rasse Deutsche Holsteins nach Anlegen eines Magenbandes für 72 Stunden und solchen mit Labmagenverlagerung. Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte  $\bar{x}_g$  (Raute), Minimum und Maximum der jeweiligen Gruppe in den Lokalisationen Antrum pylori und Corpus abomasi (mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant).

Nach VIP-Färbung:

Bezüglich der Anfärbung VIP-immunreaktiver Strukturen in der Labmagenwand von Deutschen Holstein-Kühen mit Labmagenverlagerung und von solchen mit künstlich erzeugter Labmagedilatation (Magenband für 72 Stunden) ließen sich sowohl im Antrum- ( $p = 0,004$ ; 95 % KI [1, 4; 4,7]) als auch im Corpus-Bereich ( $p = 0,02$ ; 95 % KI [1,2; 5,2]) signifikante Unterschiede in der Größe der VIP-IR-Flächen nachweisen. Hierbei waren die VIP-IR-Flächen bei den Holstein-Kühen mit Labmagenverlagerung in beiden Lokalisationen im Mittel kleiner als bei den Holstein-Kühen, bei denen mittels Magenband eine Labmagedilatation experimentell erzeugt worden war (Abb. 23).

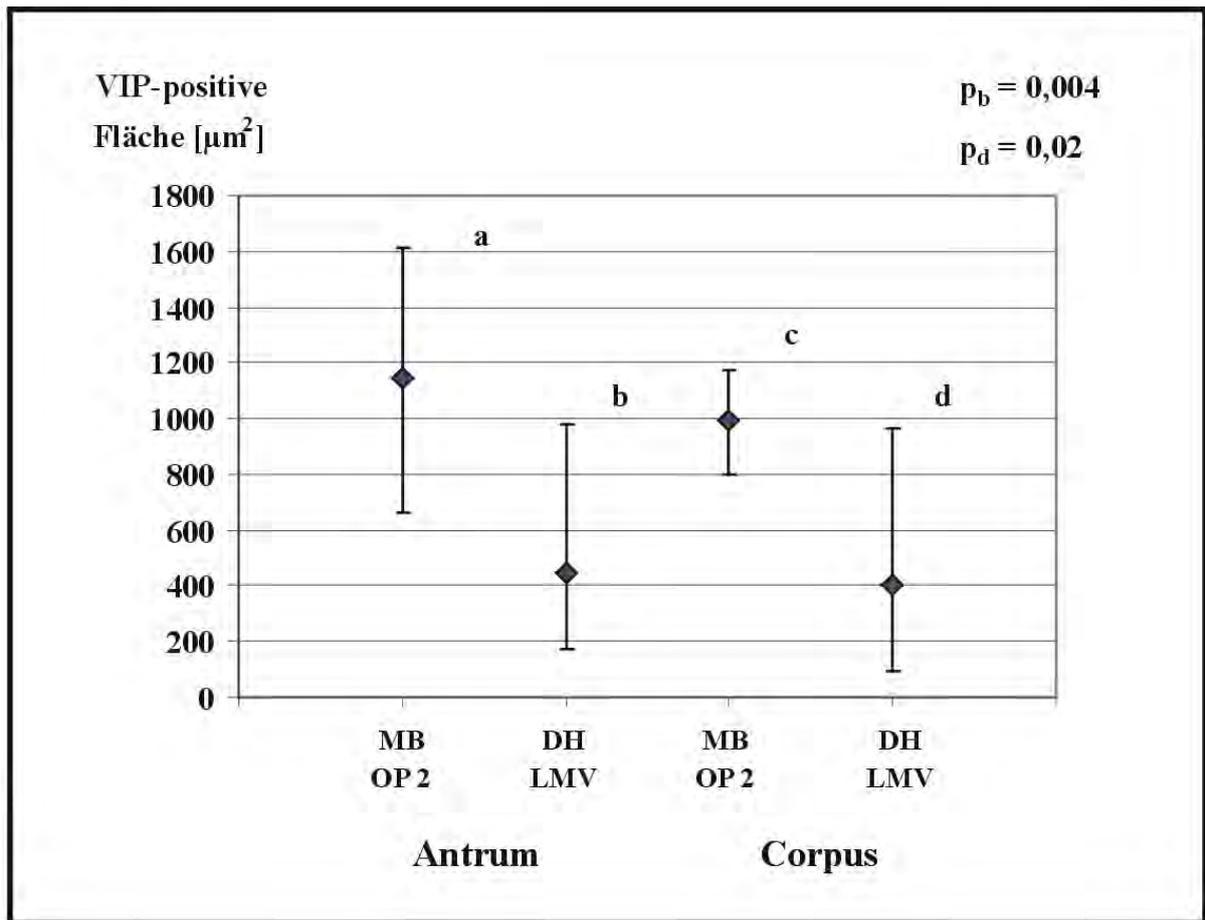


Abbildung 23: Vergleich der IR-Flächen für VIP zwischen Kühen der Rasse Deutsche Holsteins nach Anlegen eines Magenbandes für 72 Stunden und solchen mit Labmagenverlagerung. Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte  $\bar{x}_g$  (Raute), Minimum und Maximum der jeweiligen Gruppe in den Lokalisationen Antrum pylori und Corpus abomasi (mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant).

Nach NF 200-Färbung:

Die Gesamtinnervationsdichte der Labmagenwand wurde durch Anfärbung des Neurofilament 200 dargestellt. Die Größe der IR-Fläche für NF 200 unterschied sich in beiden untersuchten Lokalisationen nicht statistisch signifikant zwischen den Holstein-Kühen mit Labmagenverlagerung und denen mit künstlich erzeugter Labmagendilatation ( $p = 0,59$ ; 95 % KI [0,69; 1,9] im Antrum-Bereich und  $p = 0,85$ ; 95 % KI [0,57; 1,6] im Bereich des Corpus abomasi).

## 6 Diskussion

### 6.1 Kritische Anmerkungen zur Methode

Immunhistochemische Anfärbungen werden bereits seit 40 Jahren angewendet, um vorhandene antigene Strukturen im Gewebe nachzuweisen. Dabei hat sich das Interesse der jeweiligen Forschergruppen im Laufe der Jahre dahingehend verändert, dass neben der bloßen Anwesenheit einer solchen antigenen Struktur weitaus mehr Interesse an der Frage besteht, wie viel der nachgewiesenen Substanz im Gewebe enthalten ist (Taylor u. Levenson 2006, Walker 2006). Es ist jedoch zu beachten, dass immunhistochemische Methoden von einer Vielzahl exogener Einflussfaktoren in ihrer Qualität verändert werden können. Beginnend mit der Dauer der Fixation des Gewebes über die Schnittdicke der untersuchten Proben bis hin zu Dauer und Art der Antigen-Demaskierung, unterliegen immunhistochemische Färbungen einer ganzen Reihe von Variablen, die eine Quantifizierung dieser Methode erheblich erschweren. Einer der Hauptkritikpunkte hierbei ist das Fehlen eines Referenzstandards zur Kalibrierung der Meßsysteme. Auch die qualitativ hochwertigsten Anfärbungen von Kontrollgeweben wurden im Vorfeld für ihre Anfärbung fixiert und in einer Weise mit weiteren Chemikalien aufbereitet, die es unmöglich macht, absolute Angaben für den Gehalt eines Antigens im Gewebe zu machen (Taylor u. Levenson 2006).

Die quantitative Auswertung immunhistologischer Färbungen bleibt zu einem gewissen Grad von der Erfahrung und der Aufmerksamkeit des Auswertenden abhängig (Walker 2006).

Für die quantitative Auswertung solcher Färbungen können z. B. IR-positive Strukturen pro definierter Fläche gezählt werden (Llewellyn-Smith et al. 1988, Pearson 1994, Schemann et al. 2001, Schneider et al. 2001). In anderen Arbeiten wird ein Punkteschema (scoring) angewendet, welches zur Einstufung der Intensität der Anfärbung oder aber auch zur Einstufung der Häufigkeit nachgewiesener Strukturen dient (Groenewald 1994, Myojin et al. 2000, Porter et al. 1998). Mittlerweile wird versucht, den Einfluss des Untersuchers mittels technischer Hilfsmittel zu minimieren, um die Auswertung zumindest teilweise zu objektivieren. Für die quantitative Beurteilung immunhistologischer Färbungen kommen spezielle Softwareprogramme zum Einsatz, die es ermöglichen, der Farbintensität eines angefärbten Schnittes einen Zahlenwert zuzuordnen. In den Arbeiten von Vento und Soynila (1999) und von Vento et al. (2001) werden beispielsweise Intensitätsschwellenwerte festgesetzt, die von den Proben zu überschreiten sind, um einen Unterschied zu Kontrollschnitten aufzuweisen. Diese Methode basiert allerdings auf der Anwendung von

Immunfluoreszenzfärbungen, da bei diesen Färbungen Farbstoffe verwendet werden, die Licht bestimmter Wellenlängen (Farben) aussenden, welche dann auch in ihrer Intensität gemessen werden können (Taylor u. Levenson 2006). Eine weitere Methode zur quantitativen Auswertung immunhistochemischer Färbungen ist die Bestimmung der optischen Dichte in den interessierenden Regionen des Schnittes. Hierbei wird mit Hilfe eines entsprechenden Computerprogramms die durchschnittliche Zusammensetzung eines Bildes dieser Region aus roter, grüner und blauer Farbe (RGB) berechnet (De Matos et al. 2006).

In der eigenen Studie wurde eine weitere Methode der semiquantitativen Analyse angewendet. Die positiv gefärbten Nervenfasern und Ganglien wurden wie bei Lee et al. (2002) beschrieben in ihrer Fläche vermessen. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, dass größere Nervenfasern mit einem höheren Gehalt an Neuropeptidgranula auch einen größeren Beitrag zur Gesamtfläche leisten können. Bei einem einfachen Auszählen der positiven Strukturen würden hier Informationen verloren gehen. Eine Intensitätsschwelle festzulegen, erschien für den Zweck der eigenen Arbeit nicht das Mittel der Wahl, da die Nervenfasern sich im Gewebe räumlich verteilen und daher auch in der Anfärbung in tieferen Ebenen schwächer gefärbt erscheinen. Außerdem unterliegt die Intensität der Färbung auch bei größter angewendeter Sorgfalt, wie bereits erwähnt, einer Vielzahl exogener Einflussfaktoren (Taylor u. Levenson 2006).

Genauere quantitative Verfahren, wie z. B. der ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) oder der Radioimmunoassay (RIA), leisten gute Dienste bei der Bestimmung von Plasmauntersuchungen auf bestimmte Peptide (Sen et al. 2002). Durch diese Art der Untersuchung kann jedoch die Lokalisation der Substanz im Gewebe nicht ermittelt werden. Da es sich bei der hier vorliegenden Arbeit um den ersten Versuch eines quantitativen Vergleichs handelt, war eine visuelle Kontrolle der Ergebnisse im Gewebe erforderlich. Daher wurde die von Lee et al. (2002) beschriebene Methode verwendet.

## 6.2 Bedeutung der Ergebnisse der Immunhistochemie

### 6.2.1 Schichtdickenvermessung

Massig bescheinigte der Labmagenwand des Rindes bereits 1907 eine schwache Wandmuskulatur, woraus sich eventuell eine schwache Motilität ableiten ließe. Da sich die Rinderrassen von damals bis heute stark verändert haben, und vor allem auch Kühe der Rasse Deutsche Holsteins mit Labmagenverlagerung im Mittel größer und schwerer sein sollen als die nicht erkrankte Kontrollpopulation (Geishauser 1995b), wurde die Untersuchung der Labmagenwandschichten in die vorliegende Arbeit miteinbezogen.

In anderen Arbeiten werden Degeneration der Labmagenwandmuskulatur und Bindegewebsproliferation im verlagerten Zustand des Organs beschrieben (Geishauser 1995b, Zamre et al. 1979). Groenewald und Booth berichteten 1992 über eine Verdünnung der Labmagenwand bei Karakul-Lämmern, die einen bestimmten Gendefekt aufweisen. Da bei Deutschen Holsteins eine genetische Prädisposition für die linksseitige Labmagenverlagerung nachgewiesen ist (Ricken 2003, Wolf 2001), sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob die Dicke der Labmagenwand zwischen den Rassen Deutsche Holsteins und Deutsches Fleckvieh wie auch zwischen Holstein-Kühen mit und solchen ohne Labmagenverlagerung differiert.

Mit einer Wanddickenveränderung einhergehende Passagestörungen wurden auch bei anderen Tierarten nachgewiesen; so beschreiben Schusser et al. (2000) eine Verdickung der Caecumwandmuskulatur bei Pferden mit chronischer Blinddarmanschoppung.

Die Vermessung der Labmagenwand in ihren einzelnen Schichten konnte jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Rassen Deutsches Fleckvieh und Deutsche Holsteins zum einen und zwischen Holsteins mit und ohne LMV zum anderen zeigen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von Clausen (1999) und Matthaei (1953). Beide Autoren konnten keine Beziehung zwischen Wandschichtdicken und LMV bzw. Rassezugehörigkeit feststellen. Auch die Hypothese einer eventuell im Verlagerungszustand vermehrten Fetteinlagerung und damit auch Verdickung der Labmagenwand konnte von Tischbirek (1983) widerlegt werden. In-vitro-Untersuchungen über die Spontankontraktilität von Labmagenwandmuskelstreifen ergaben ebenfalls keine Hinweise auf eine diesbezügliche Rasseprädisposition für das Auftreten von Labmagenverlagerungen (Zulauf et al. 2002).

## 6.2.2 Neuropeptidgehalt der Labmagenwand

Bisher beschäftigten sich die meisten immunhistologischen Studien mit dem Auftreten und der Verteilung der nachgewiesenen Peptide im Gastrointestinaltrakt verschiedener Nichtwiederkäuer-Spezies (Balemba et al. 1998 und 2002, Bishop et al. 1982, Brookes et al. 1991 und 1992, Costa et al. 1987, Cuello et al. 1979, Daniel et al. 1985, Ginneken et al. 1996, Keast et al. 1985, Lee et al. 2002, Llewellyn-Smith et al. 1984 und 1988, Matini et al. 1997, Pearson 1994, Porter et al. 1997 und 1998, Schemann et al. 1993 und 2001, Schneider et al. 2001, Schultzberg et al. 1980, Sharkey et al. 1984, Vento et al. 2001).

Entsprechende Studien an Wiederkäuern liegen dagegen in eher begrenztem Umfang vor (Balemba et al. 1999, Baltazar et al. 1998, Groenewald 1994, Guilloteau et al. 1997, Kitamura et al. 1986 und 1987, Myojin et al. 2000, Pfannkuche et al. 2002a, 2002b und 2003, Soehartono et al. 2001 und 2002, Teixeira et al. 1998, Vassileva et al. 1987, Yamamoto et al. 1994a und b). Während sich diese Arbeiten vornehmlich mit der Anwesenheit, Verteilung und Co-Existenz der Neuropeptide im Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern beschäftigten, findet sich bisher jedoch kein Hinweis auf den Versuch eines quantitativen Vergleichs von Rinderrassen bzw. Kühen mit und ohne LMV bezüglich des Neuropeptidgehaltes.

Grundlagen für die Bedeutung der untersuchten Neuropeptide SP und VIP lieferten die Studien von Carlquist (1979), Faustini (1976), Guilloteau (1997), Reid et al. (1988b) und Vassileva et al. (1978). Sie bewiesen die Analogie der Molekülstruktur zu derjenigen bei anderen Spezies und die Effekte der Substanzen auf die glatte Muskulatur des Magen-Darm-Traktes von Wiederkäuern.

Ausgehend von der Hypothese, dass Labmagenverlagerungen mit einer Hypo- oder Atonie des Organs einhergehen (Geishauser 1995a, b, 1998), sollte anhand des quantitativen Nachweises von Neuropeptiden die Hypothese untersucht werden, ob die verminderte Motilität des Labmagens aus einem verminderten Gehalt an stimulierender Substanz P oder aber aus einem erhöhten Gehalt an hemmendem VIP resultieren könnte.

Die in dieser Studie nachgewiesenen diesbezüglichen Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Rassen gehen mit dieser Hypothese konform und könnten eine Erklärung liefern, weshalb bei Deutschen Holstein-Kühen linksseitige Labmagenverlagerungen wesentlich häufiger auftreten als dies bei Deutschen Fleckvieh-Kühen der Fall ist. Nach diesen Untersuchungen haben Fleckviehkühe gegenüber den Deutschen Holsteins den „Vorteil“, dass bei ihnen einerseits der Corpus-Bereich stärkeren stimulierenden Effekten unterliegt,

andererseits aber auch der Antrum-Bereich zumindest tendenziell geringeren hemmenden Einflüssen ausgesetzt ist. Diese Befunde gewinnen noch dadurch an Bedeutung wenn man berücksichtigt, dass die Labmagenwand von Kühen der Rasse Deutsches Fleckvieh in beiden untersuchten Lokalisationen von weniger Nervenfasern durchzogen zu sein scheint, als dies bei den Holstein-Kühen der Fall ist. Obwohl also weniger Nervenfasern in der Labmagenwand enthalten sind, wird die Versorgung der Muskulatur mit Neuropeptiden bei den Fleckviehkühen effizienter bewerkstelligt.

Im Widerspruch zu den eigenen Untersuchungen stehen die Ergebnisse von Zulauf et al. (2002). Diese Arbeitsgruppe konnte anhand der Spontanaktivität glatter Muskelpräparationen aus Schlachtkühen keine Rasseprädisposition für das Auftreten von Labmagenverlagerungen feststellen. Es erscheint jedoch fraglich, ob diese In-vitro-Beobachtungen Rückschlüsse erlauben auf die Neuropeptidkonzentrationen im Gewebe.

Quantitative immunhistochemische Untersuchungen am Magen-Darm-Trakt im Hinblick auf pathologische Zustände der Organe werden vor allem in der Humanmedizin durchgeführt (Lee et al. 2002, Porter et al. 1998, Schneider et al. 2001, Vento et al. 2001). Studien an Material von Patienten mit Ulcerativer Colitis (UC) bzw. Morbus Crohn ergaben hierbei widersprüchliche Ergebnisse. Während Schneider et al. (2001) eine erhöhte Anzahl an VIP-positiven Neuronen in der Darmwand von Patienten mit UC feststellten, gaben Vento et al. (2001) eine erhöhte Immunreaktivität für SP an. Lee et al. (2002) konnten dagegen keine Unterschiede zwischen Erkrankten und Gesunden feststellen. Sind die genannten entzündlichen Erkrankungen der Darmwand beim Menschen eher mit solchen Veränderungen beim Rind zu vergleichen, wie sie häufig als Begleiterkrankung der Labmagenverlagerung auftreten (Labmagenukzera, Abomasitis), so entspricht die bei Labmagenverlagerung angenommene Motilitätsstörung – auf den Menschen bezogen – eher dem Bild der Slow Transit Constipation (STC). Eine diesbezügliche Studie von Porter et al. (1998) ergab einen verminderten Gehalt an Tachykininen in der Darmwand von Patienten mit STC, bei gleicher Innervationsdichte im Vergleich zu Gesunden.

Letztgenannte Ergebnisse stimmen teilweise mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen überein. Auch bei Kühen mit Labmagenverlagerung konnte ein verminderter Gehalt an Substanz P (als Vertreter der Tachykinine) in der Labmagenwand festgestellt werden. Abweichend hiervon war jedoch die Gesamtinnervationsdichte bei den Kühen mit Labmagenverlagerung ebenfalls geringer als bei den Holstein-Kühen ohne LMV. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Soehartono et al. (2001). Diese Autoren konnten eine

verminderte Häufigkeit von Nervenfasern in der Tunica muscularis des Labmagens von Kälbern mit Labmagendilatation oder –anschoppung zeigen.

Im Gegensatz hierzu konnten Clausen (1999) und Geishauser (1995b) in ihren Studien keinen Unterschied in der Innervationsdichte bei Kühen mit im Vergleich zu solchen ohne LMV feststellen. Diese Diskrepanz der Ergebnisse lässt sich aber dadurch erklären, dass in den letztgenannten Studien eine geringere Tierzahl verwendet wurde und daher eventuell die Signifikanzgrenze nicht erreicht werden konnte. Zusätzlich zur Innervationsdichte untersuchte Geishauser (1995b) die Labmagenwand von Kühen mit und ohne LMV auf cholinerge und nitroxege Transmitter in Neuronen. Er konnte jedoch auch hier keinen Unterschied zwischen den Gruppen nachweisen. Die eigenen Untersuchungen zeigten im Bereich der non-cholinergen non-adrenergen Transmitter an Labmagenwandproben von Kühen der Rasse Deutsche Holsteins mit und ohne LMV jedoch starke Unterschiede zwischen den Gruppen. Alle untersuchten Substanzen lagen in den Proben von Kühen mit LMV in deutlich geringerer Konzentration vor als bei Kühen ohne LMV.

Nicht ganz erwartungsgemäß war der Befund, dass bei Kühen mit Labmagenverlagerung sowohl die Konzentrationen des exzitatorischen Transmitters Substanz P als auch die des inhibitorischen Transmitters VIP erniedrigt waren. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass bei Kühen mit LMV auch die Innervationsdichte signifikant niedriger war als bei Kühen ohne LMV. Während das Verhältnis von SP zu VIP in beiden Gruppen annähernd gleich war, unterschied sich jedoch der Anteil von SP bzw. VIP an der Gesamtnervenfärbung NF 200 ebenfalls signifikant zwischen den Gruppen. Ausgehend von der nachgewiesenen Heritabilität für das Auftreten von Labmagenverlagerungen bei Deutschen Holsteins (Geishauser 1995b, Ricken 2003, Wolf 2001), könnte hier das Pendant eines Gendefekts bei Karakul-Lämmern vorliegen, wie er von Groenewald bereits 1994 beschrieben wurde. Groenewald hatte eine signifikant geringere Ausdehnung des Plexus myentericus und eine verminderte Anzahl an Ganglienzellen im Labmagen bei diesen Lämmern gefunden.

Es scheint jedoch unwahrscheinlich, dass die geringere Anzahl an Nervenfasern alleine schon eine Ursache für das Entstehen von Labmagenverlagerungen sein könnte, da auch bei dem bereits besprochenen Vergleich der Rassen Deutsches Fleckvieh und Deutsche Holsteins ein Unterschied in der Innervationsdichte nachgewiesen wurde. Denn würde allein eine geringere Innervationsdichte hierfür ausreichen, so wäre das Auftreten von Labmagenverlagerungen bei Fleckviehkühen häufiger zu erwarten als bei Holsteinkühen.

Unter der Voraussetzung einer gleichen Neurotransmitter-Syntheseleistung der Neuronen (Fahrenkrug 1993) von Holstein-Kühen ohne und solchen mit Labmagenverlagerung, müsste

das Verhältnis der Neuropeptide zur Gesamtnervation zwischen den Gruppen gleich sein. Da dies aber nicht der Fall ist, scheint entweder die Syntheseleistung der Neuronen für die untersuchten Neurotransmitter vermindert zu sein, oder es handelt sich bei den ermittelten Unterschieden nicht um die Ursache, sondern um die Folge der LMV bei den Kühen der Rasse Deutsche Holsteins.

Bei der Dilatation und Torsion des Organes kommt es zur mechanischen Dehnung und eventuell auch Schädigung der neuronalen Strukturen des Labmagens. Dies könnte mit einer vermehrten Ausschwemmung von Neurotransmittern ins Gefäßsystem verbunden sein, da ein normaler Transport der Peptide in den sogenannten dense core vesicles und in den Neurotubuli des Axoplasma (Fahrenkrug 1993, Knipping 2003) gestört sein könnte. Entsprechende Plasmauntersuchungen für Gastrin wurden von Sen et al. 2002 durchgeführt. Ob allerdings hohe Werte an Peptid im Plasma mit einer geringen Konzentration im Gewebe korrelieren, kann durch die vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Ein hoher VIP-Wert im Plasma von Kühen mit LMV, wie er auch bei Hunden mit Magenüberdehnung nachgewiesen wurde (Chayvialle et al. 1980), könnte trotzdem eine Erklärung für den verminderten Gehalt an VIP in den Labmagenwandproben von Kühen mit LMV darstellen. Einen Hinweis für die Wahrscheinlichkeit dieser Überlegung geben die Untersuchungsergebnisse von Edwards et al. (1978) und diejenigen von Reid et al. (1988a). Diese Autoren konnten zeigen, dass nach Reizung des Nervus vagus bei Kälbern und bei Schaflämmern die Plasma-Spiegel für VIP signifikant anstiegen. Eine Reizung des Vagus wird in gewissem Maße auch durch die Drehung des Organes und Zug auf die Nervenfasern bei LMV vermittelt.

Untersuchungen anderer Forscher zu vergleichbaren Themengebieten lieferten ähnliche Ergebnisse, wie sie in der eigenen Studie vorgestellt werden. Meylan et al. (2004) beschreiben eine geringe Konzentration an mRNA adrenerger Rezeptorsubtypen im Magen-Darm-Trakt von gesunden Kühen und verweisen auf weitere Untersuchungen an Kühen mit Motilitätsstörungen, wie z.B. Labmagenverlagerungen. Entsprechende Ergebnisse stehen jedoch noch aus. Für die Verteilung der mRNA adrenerger Rezeptorsubtypen im Darm von Kühen mit Blinddarmdilatation konnten Kobel et al. (2006) eine verminderte Expression dieser Proteine feststellen. Da adrenerge Rezeptoren über ihre Liganden eine Hemmung der Motorik vermitteln, decken sich diese Ergebnisse mit den verminderten VIP-Gehalten bei Kühen mit LMV. Es handelt sich jedoch sowohl bei der in der eigenen Studie verwendeten Immunhistochemie als auch bei der von Meylan et al. und von Kobel et al. verwendeten Methode (Real-time-PCR) um Untersuchungen an Proben von bereits erkrankten Tieren, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei der Probenentnahme zu einem früheren

Zeitpunkt der Erkrankung andere Ergebnisse aufgetreten wären. Weiter ist den genannten Autoren zuzustimmen, dass Stressfaktoren und ein anderer Blutgehalt der Proben Einfluss auf die Ergebnisse der Untersuchungen haben könnten.

Aus diesen Gründen und für die Klärung der Frage, ob es sich bei den gefundenen Unterschieden um die Ursache für die Entstehung oder aber um die Folge der LMV bei Kühen der Rasse Deutsche Holsteins handelt, wurden entsprechende Daten von Tieren mit experimentell induzierter Labmagendilatation erhoben. Ein eventuell bestehender Einfluss der Operation (Stressfaktoren, Manipulation am Organ etc.) konnte durch diesen Versuch ebenso näher beleuchtet werden, wie der Effekt unterschiedlicher Blutgehalte der Proben.

Für die Erhebung der Daten von Tieren mit experimentell erzeugter Labmagenanschoppung wurde der Pylorus bei 3 labmagengesunden Holstein-Kühen in einer ersten Operation mittels Magenband eingengt. Die Labmagenbiopate, welche während dieser Operation vor Anlegen des Magenbandes entnommen wurden, lieferten die entsprechenden Kontrolldaten. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Neuropeptid-IR-Flächen auf den histologischen Schnitten dieser Proben nicht signifikant von denjenigen unterschieden, welche bei den Kühen der Rasse Deutsche Holstein ohne Labmagenverlagerung ermittelt worden waren. Da sich die immunreaktiven Flächen für die Neuropeptide SP und VIP bei den gesunden, operierten Holstein-Kühen nicht signifikant von denjenigen der Holsteingruppe ohne Labmagenverlagerung unterscheiden, lassen sich der Einfluss der Operation und derjenige eines naturgemäß höheren Blutgehaltes im Gewebe bei Proben von lebenden Tieren in diesem Fall als unerheblich ausschließen.

Der Effekt des angelegten Magenbandes wurde klinisch durch die Kontrolle des Base Excess überwacht. Die Entwicklung einer hypochlorämischen, metabolischen Alkalose repräsentierte hierbei die Verschiebung des Säure-Basen-Haushaltes bei anhaltender Passagestörung. Alle 3 Holstein-Kühe entwickelten nach Anlegen des Magenbandes eine Alkalose; der Base Excess stieg hierbei bis zu einem Maximum von  $BE = + 22,6$  mmol/l. In diesem Fall lag der Chloridgehalt im Pansensaft zum Zeitpunkt der zweiten Operation bei 71 mmol/l. Der klinische Nachweis der „Effektivität“ einer solchen mittels Magenband induzierten Passagestörung deckte sich dahingehend mit den Befunden der immunhistochemischen Untersuchung, als in den Proben, welche 72 Stunden nach Anlegen des Magenbandes entnommen wurden, geringere Gehalte für die untersuchten Neuropeptide nachgewiesen werden konnten, als dies vor Anlegen des Magenbandes der Fall war. Das Erreichen der Signifikanzgrenzen für den Vergleich vor und nach Magenband war aufgrund der Fallzahl von 3 Tieren und aufgrund der großen Streuung der Daten zwischen diesen 3 Tieren

allerdings nur für die Anfärbung von Substanz P im Corpus-Bereich möglich. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, dass sich bei längerem Bestehen der Passagestörung noch deutlichere Unterschiede gezeigt hätten, die dann auch in einem signifikanten Unterschied hätten resultieren können. Das Verwenden einer größeren Fallzahl für diesen Tierversuch schien deshalb nicht erforderlich, da zunächst einmal grundlegende Effekte aufgezeigt werden sollten – was auch gelungen ist.

Da das angelegte Magenband also tatsächlich Einfluss auf den Neurotransmittergehalt in der Labmagenwand zu haben schien, wurde ein Vergleich der Befunde bei experimentell induzierter Labmagendilatation mit solchen bei Labmagenverlagerung möglich. Hierbei zeigte sich, dass die Neuropeptidgehalte bei den Patienten mit Labmagenverlagerung signifikant geringer waren als bei den Holstein-Kühen mit Magenband. Für sich betrachtet könnte dieses Ergebnis nun vermuten lassen, dass die geringen Gehalte an Substanz P und VIP bei Patienten mit LMV die Ursache für die Verlagerung des Organes darstellen. Hält man sich aber vor Augen, dass diese Ergebnisse von 3 Kühen stammen, bei denen das Magenband nur für 72 Stunden die Passage behinderte, dann lässt sich nicht ausschließen, dass sich die Konzentrationen der Neuropeptide bei einem Belassen des Magenbandes über einen längeren Zeitraum zwischen den beiden betrachteten Gruppen einander angenähert hätten. In diesem Falle wäre dann durch die künstliche Passagestörung dieselbe geringe Neuropeptidkonzentration hervorgerufen worden, wie dies bei den Patienten mit Labmagenverlagerung der Fall war. Zusätzlich ist noch zu bedenken, dass eine Beteiligung der Neuropeptide Substanz P und VIP bei der Entstehung des postoperativen Ileus bei der Ratte nachgewiesen wurde (Espot et al. 1995, De Winter 1998). Es ist daher nicht grundsätzlich auszuschließen, dass die Veränderungen des Neuropeptidgehalts nach Anlegen des Magenbandes auch auf die Operation an sich und nicht auf die induzierte Passagestörung zurückzuführen sein könnten. Um diesen Aspekt völlig ausschließen zu können, müssten nochmals Kühe der Rasse Deutsche Holsteins im Abstand von 72 Stunden auf dieselbe Weise laparotomiert und dabei Labmagenbiopsatproben entnommen werden, ohne jedoch ein Magenband anzulegen. Die Untersuchung dieser Proben auf die Neuropeptide SP und VIP dürfte dann keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Operationszeitpunkten aufzeigen.

Da die klinischen Parameter (Base Excess, Chloridgehalt im Pansensaft) jedoch für die Effektivität des Magenbandes sprachen, schien es vertretbar, die Veränderungen in der Neuropeptiddichte nach Magenband-Operation mit denjenigen bei natürlich entstandener Labmagenverlagerung zu vergleichen.

Bei den nachgewiesenen Unterschieden bezüglich der Neuropeptiddichte zwischen Deutschen Holsteins mit und solchen ohne LMV scheint es sich offensichtlich um eine Folge der Labmagenverlagerung zu handeln, da ein Abfall der Neuropeptidkonzentration auch künstlich erzeugt werden konnte. In wieweit die Peptide während der Verlagerung des Organs in den Blutkreislauf übertreten, muss Thema weiterer Untersuchungen bleiben. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Vorgangs lässt sich jedoch aufgrund von früheren Studien an Schafen und Pferden vermuten. Moore et al. (1996) und Somjen et al. (1989) untersuchten hierbei die Plasmalevel u. a. für SP und VIP während ischämischer Zustände des Darmes sowie nach Reperfusion dieser Gebiete. Dabei konnten sie sowohl während einer bestehenden Ischämie als auch nach Reperfusion erhöhte VIP-Plasmalevel im venösen Blut nachweisen. Die Plasmalevel für SP waren hierbei zu Beginn der Reperfusion in arteriellem Blut aus Colonarterien erhöht.

Da auch bei einer Labmagenverlagerung ischämische Bereiche in der Labmagenwand entstehen, ist ein solches Übertreten von VIP bzw. SP aus dem Gewebe in den Blutkreislauf denkbar und würde die niedrigen Konzentrationen dieser Neuropeptide in der Labmagenwand von Kühen mit Labmagenverlagerung erklären.

Es spricht also einiges für die aufgrund der eigenen Untersuchungen formulierte Hypothese einer generell verminderten Konzentration an Substanz P und / oder einer vermehrten Konzentration an VIP in der Labmagenwand von Kühen der Rasse Deutsche Holsteins als Ursache der Prädisposition für das Auftreten einer Labmagenverlagerung. Die nachgewiesenen Unterschiede im Neurotransmittergehalt zwischen Holstein-Kühen mit und solchen ohne Labmagenverlagerung dürften jedoch eher die Auswirkungen einer Verlagerung des Organes widerspiegeln.

### 6.2.3 Schlussfolgerungen

Verschiedentlich in der Vergangenheit durchgeführte Untersuchungen über mögliche anatomische oder funktionelle Ursachen für die Prädisposition einzelner Rassen und Individuen hinsichtlich des Auftretens von Labmagenverlagerungen lieferten keine befriedigenden Ergebnisse. So konnten weder bezüglich der Innervation des Labmagens noch hinsichtlich der Dicke der Labmagenwandmuskulatur signifikante Unterschiede zwischen Kühen mit und solchen ohne Labmagenverlagerung festgestellt werden (Clausen 1999, Geishauser 1995b).

Hingegen könnten die in der eigenen Studie ermittelten Unterschiede hinsichtlich der Gehalte an Substanz P und VIP in der Labmagenwand erstmals eine Erklärung dafür liefern, weshalb Deutsche Holsteins wesentlich häufiger an Labmagenverlagerung erkranken als Kühe der Rasse Deutsches Fleckvieh. Denn die Befunde deuten darauf hin, dass bei den Kühen der Rasse Deutsche Holsteins der stimulierende Einfluss auf die Labmagenmotorik geringer und der hemmende Einfluss deutlicher ausgeprägt ist. Dies schließt natürlich nicht aus, dass darüber hinaus auch noch weitere Faktoren in der Ätiopathogenese dieses Krankheitsgeschehens eine Rolle spielen.

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei den dargestellten Unterschieden hinsichtlich SP und VIP zwischen gesunden Kühen und solchen mit einer Labmagenverlagerung innerhalb der Rasse Deutsche Holsteins um eine Ursache der Verlagerung oder aber eher um eine Folge des Verlagerungszustandes handelt, wurde eine Labmagendilatation experimentell induziert. Die Ergebnisse dieser Versuche sprechen bezüglich dieser beiden Neuropeptide eher für letztgenannte Möglichkeit. Allerdings wurde die Gesamtinnervationsdichte durch diese experimentell induzierte Labmagendilatation nicht verändert. Somit könnten die diesbezüglichen Unterschiede zwischen gesunden Holstein-Kühen und solchen mit einer Labmagenverlagerung einen Hinweis liefern zur Erklärung der bekannten interindividuellen Variation innerhalb der Holstein-Rasse im Hinblick auf die Prädisposition für das Auftreten von Labmagenverlagerungen.

## **7 Zusammenfassung**

### **Gegenstand der Arbeit**

Nach derzeitigem Kenntnisstand kommt den Motilitätsstörungen des Labmagens – im Sinne einer Hypotonie oder Atonie – in der Pathogenese von Verlagerungszuständen offensichtlich eine entscheidende Bedeutung zu. In der eigenen Studie sollte daher die mögliche Bedeutung der Neuropeptide VIP (Vasoaktives Intestinales Polypeptid) und SP (Substanz P) im Hinblick auf diese Fragestellung untersucht werden. Bei VIP handelt es sich um einen inhibierenden Neurotransmitter des NANC-Nervensystems, bei SP um einen stimulierenden Transmitter. Sowohl ein verminderter Gehalt an SP als auch ein vermehrtes Vorhandensein von VIP in den Ganglien und Nervenfasern der Labmagenwand könnte eine Ursache für die Verminderung der Labmagenmotilität darstellen.

### **Material und Methoden**

Zur Ermittlung möglicher Rassenunterschiede wurde von jeweils 20 geschlachteten Kühen der Rassen Deutsche Holsteins und Deutsches Fleckvieh im Alter von 3 bis 5 Jahren je ein Biopat aus dem Corpus abomasi und aus dem Antrum pylori des Labmagens entnommen und immunhistochemisch auf VIP, SP und Neurofilament 200 untersucht. Entsprechende Biopatentnahmen und Untersuchungen erfolgten bei 20 Deutschen Holstein-Kühen mit linksseitiger Labmagenverlagerung sowie bei 3 weiteren Kühen dieser Rasse, bei denen experimentell – durch Anlegen eines Magenbandes – eine Labmagedilatation induziert wurde, und zwar vor Anlegen des Magenbandes und ein weiteres Mal nach 72 Stunden.

Die entnommenen Biopate wurden sofort in eine 4 %ige Paraformaldehyd-Lösung überführt und nach Aufbereitung in einer aufsteigenden Alkoholreihe in Paraffin eingebettet. Für die immunhistochemischen Untersuchungen kam ein indirektes Verfahren mit der ABC- / AEC-Methode zur Anwendung. Die dargestellten Peptide wurden quantifiziert, indem die angefärbten Flächen unter Verwendung des halbautomatischen Softwareprogramms AnalySIS (Fa. Olympus) ausgemessen wurden.

### **Ergebnisse**

Bei den gesunden Kühen konnten bezüglich der immunreaktiven Fläche von Substanz P im Antrum-Bereich zwar keine signifikanten Rassenunterschiede nachgewiesen werden (Deutsche Holsteins:  $975 \pm 602 \mu\text{m}^2$ , Deutsches Fleckvieh:  $1085 \pm 605 \mu\text{m}^2$ ), doch war im Bereich des Corpus abomasi diese Fläche bei den Deutschen Holsteins ( $821 \pm 607 \mu\text{m}^2$ )

signifikant kleiner als bei den Fleckviehkühen ( $1133 \pm 480 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,025$ ). Der Vergleich der IR-Flächen für VIP zwischen beiden Rassen ergab zwar für beide Lokalisationen keine signifikanten Unterschiede, doch bestand zumindest im Antrum-Bereich eine deutliche Tendenz zu höheren Werten bei den Deutschen Holsteins ( $1491 \pm 684 \mu\text{m}^2$ , vs.  $1120 \pm 642 \mu\text{m}^2$  bei Fleckvieh Kühen;  $p = 0,054$ ). Ebenso ließen sich in Bezug auf die IR-Fläche für Neurofilament 200, dem Kriterium für die Gesamtinnervationsdichte, signifikante Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Rassen nachweisen. Während in den Biopaten aus dem Antrum-Bereich von Kühen der Rasse Deutsche Holsteins eine Fläche von  $4997 \pm 1379 \mu\text{m}^2$  ermittelt wurde, betrug diese bei den Fleckviehkühen lediglich  $3732 \pm 1829 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0,0052$ ). Ein solcher Unterschied war auch im Bereich des Corpus abomasi nachweisbar, wenn auch in geringerer Ausprägung (Deutsche Holsteins  $5475 \pm 3086 \mu\text{m}^2$ , Deutsches Fleckvieh  $3911 \pm 1885 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,056$ ).

Bei den Kühen mit einer Labmagenverlagerung war sowohl der Gehalt an Substanz P als auch an VIP in den Biopaten im Vergleich zu den Werten der gesunden Holstein-Kühe signifikant vermindert (Substanz P: Antrum  $314 \pm 161$  vs.  $975 \pm 602 \mu\text{m}^2$ , Corpus  $297 \pm 143$  vs.  $821 \pm 607 \mu\text{m}^2$ ; VIP: Antrum  $493 \pm 228$  vs.  $1491 \pm 684 \mu\text{m}^2$ , Corpus  $466 \pm 235$  vs.  $1661 \pm 732 \mu\text{m}^2$ ;  $p$  jeweils  $< 0,0001$ ). Gleiches galt auch hinsichtlich der mittels Neurofilament-200-Färbung ermittelten Gesamtinnervationsdichte (Antrum-Bereich:  $3900 \pm 1859$  vs.  $4997 \pm 1379 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,008$ ; Corpus:  $3516 \pm 1681$  vs.  $5475 \pm 3086 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,011$ ). Dies hatte jedoch keine signifikanten Auswirkungen auf das jeweilige Verhältnis der beiden Neurotransmitter SP und VIP an den beiden Lokalisationen zueinander. Bezogen auf die NF-200-immunreaktive Fläche war jedoch der SP-Anteil bei Labmagenpatienten – im Vergleich zur Kontrollgruppe – signifikant erniedrigt (Antrum-Bereich:  $p < 0,0001$ , Corpus-Bereich:  $p = 0,025$ ). Entsprechendes galt bezüglich VIP ( $p < 0,0001$ ).

Als Folge der durch Anlegen eines Magenbandes induzierten Labmagenanschoppung kam es innerhalb von 72 Stunden zu einer signifikanten Verminderung der Werte für die IR-Flächen von SP und VIP. Die nach 72 Stunden bei diesen Probanden gemessenen SP-Werte lagen jedoch im Antrum-Bereich immer noch signifikant über denjenigen der Labmagenpatienten (Antrum:  $555 \pm 187$  vs.  $314 \pm 161 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,04$ ; Corpus:  $256 \pm 54$  vs.  $297 \pm 143 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0,87$ ). Bezüglich der VIP-positiven Flächen galt dies für beide Lokalisationen; hier wurden bei den Magenband-Probanden im Antrum-Bereich  $1223 \pm 496 \mu\text{m}^2$  und bei den Patienten mit LMV  $493 \pm 228 \mu\text{m}^2$  gemessen ( $p = 0,004$ ). Für den Corpus-Bereich ergaben sich Werte von  $1010 \pm 193 \mu\text{m}^2$  (Magenbandgruppe) vs.  $466 \pm 235 \mu\text{m}^2$  (Patientengruppe);  $p = 0,02$ .

## **Schlussfolgerungen**

Die ermittelten Unterschiede hinsichtlich der Gehalte an Substanz P und VIP in der Labmagenwand deuten darauf hin, dass bei den Deutschen Holsteins der stimulierende Einfluss auf die Labmagenmotilität geringer und der hemmende deutlicher ausgeprägt ist als bei Kühen der Rasse Deutsches Fleckvieh. Zusätzlich zu anderen Einflussfaktoren könnte dies erklären, warum Holstein-Kühe häufiger an Labmagenverlagerung erkranken.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Probanden mit einer experimentell induzierten Labmagenanschoppung deuten darauf hin, dass es sich bei den ermittelten Unterschieden hinsichtlich Substanz P und VIP zwischen gesunden Holstein-Kühen und solchen mit einer Labmagenverlagerung eher um eine Folge der Verlagerung als um deren Ursache handelt.

Auf die Gesamtinnervationsdichte hatte die induzierte Labmagendilatation dagegen keine Auswirkungen. Die diesbezüglichen Unterschiede zwischen gesunden Holstein-Kühen und solchen mit Labmagenverlagerung könnten daher einen Hinweis geben auf eine mögliche Ursache für die bekannte interindividuelle Variation innerhalb der Holstein-Rasse im Hinblick auf die Prädisposition für das Auftreten einer Labmagenverlagerung.

## 8 Summary

### Objective

Motility disorders of the abomasum, i.e. hypotonia or atonia, play an important role in the pathogenesis of abomasal displacement (AD). The aim of this study was to examine the possible relevance of the neuropeptides vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and substance P (SP) in cows with motility disorders. VIP belongs to the family of inhibiting neurotransmitters of the non adrenergic non cholinergic nerve system, whereas SP belongs to the family of stimulating peptides. Both, a decreased expression of SP and an increase of VIP in the ganglia and nerve fibres (neurofilament 200 positive) of the abomasal wall could cause a decrease of abomasal motility.

### Material and methods

In order to evaluate potential differences between breeds, biopsies of the corpus abomasi and antrum pylori were taken from 20 slaughtered German Holstein cows and 20 German Fleckvieh cows aged 3 to 5 years, respectively. Corresponding biopsies were taken from 20 German Holstein cows suffering from left abomasal displacement as well as from three cows of the same breed, in which an abomasal impaction was artificially induced by gastric banding. In these three cows, biopsies were taken twice, i.e. before and 72 hours after the procedure. All biopsies were immediately fixed in 4 % paraformaldehyde, dehydrated in alcohol and embedded in paraffin. Sections were cut and stained immunohistochemically (ABC-/ AEC-technique), thereby displaying VIP, SP and NF 200. The positive signals were quantified by measuring the stained areas using the semiautomatic software program AnalySIS (Olympus).

### Results

In the healthy cows, the antral immunoreactive (IR) area for substance P showed no significant differences between both breeds (German Holsteins:  $975 \pm 602 \mu\text{m}^2$ , German Fleckvieh:  $1085 \pm 605 \mu\text{m}^2$ ). Nonetheless, the corresponding area in the corpus abomasi was significantly smaller in the German Holsteins ( $821 \pm 607 \mu\text{m}^2$ ) than in the German Fleckvieh cows ( $1133 \pm 480 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0.025$ ). No significant differences between both breeds could be found for both localisations comparing the VIP IR-areas. Even though the stained areas of the antrum pylori tended to display higher values in the German Holsteins ( $1491 \pm 684 \mu\text{m}^2$ ) than in the Fleckvieh cows ( $1120 \pm 642 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0.054$ ). Regarding the IR-areas for NF 200, being

the criteria for the overall nerve density, significant differences between both breeds could be demonstrated. In biopsies taken from the antrum of German Holstein cows NF 200 positive areas of  $4997 \pm 1379 \mu\text{m}^2$  were measured, in comparison to  $3732 \pm 1829 \mu\text{m}^2$  in the German Fleckvieh cows ( $p = 0.0052$ ). The same tendency could be shown in the corpus abomasi (German Holsteins  $5475 \pm 3086 \mu\text{m}^2$ , German Fleckvieh  $3911 \pm 1885 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0.056$ ).

In cows with abomasal displacement, both, the content of substance P and VIP in the biopsies taken were significantly decreased in comparison to the values from healthy Holstein cows (SP: antrum  $314 \pm 161$  vs.  $975 \pm 602 \mu\text{m}^2$ , corpus  $297 \pm 143$  vs.  $821 \pm 607 \mu\text{m}^2$ ; VIP: antrum  $493 \pm 228$  vs.  $1491 \pm 684 \mu\text{m}^2$ , corpus  $466 \pm 235$  vs.  $1661 \pm 732 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0.0001$  each). Equivalent results were seen regarding the overall nerve density identified by staining for NF 200 (antral area:  $3900 \pm 1859$  vs.  $4997 \pm 1379 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0.008$ ; corpus:  $3516 \pm 1681$  vs.  $5475 \pm 3086 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0.011$ ). However, there was no significant impact on the ratio of SP to VIP in both localisations. Relating to the NF 200 IR-area, the fraction of SP was significantly decreased in patients with abomasal displacement in comparison to the control group of healthy animals (antral area:  $p < 0.0001$ , corpus:  $p = 0.025$ ). Equivalent results could be demonstrated for VIP ( $p < 0.0001$ ).

As a consequence of the abomasal impaction induced by gastric banding a significant decrease of the levels of the SP and VIP IR-areas could be seen 72 hours after the procedure. However, SP levels measured in the antrum pylori in these animals after 72 hours were significantly higher than those from patients with displaced abomasum (antrum:  $555 \pm 187$  vs.  $314 \pm 161 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0.04$ ; corpus:  $256 \pm 54$  vs.  $297 \pm 143 \mu\text{m}^2$ ;  $p = 0.87$ ). Equivalent results could be seen concerning the VIP IR-areas in both localisations (antrum pylori:  $1223 \pm 496 \mu\text{m}^2$  (gastric banding) vs.  $493 \pm 228 \mu\text{m}^2$  (AD);  $p = 0.004$  and corpus abomasi:  $1010 \pm 193 \mu\text{m}^2$  (gastric banding) vs.  $466 \pm 235 \mu\text{m}^2$  (AD);  $p = 0.02$ ).

## Conclusions

The differences detected concerning the content of substance P and VIP in the abomasal wall suggest that in German Holsteins the stimulating effects on the motility of the abomasum are smaller and that the inhibiting influence seems to be more distinct than in German Fleckvieh cows. In addition to further influencing factors, this could explain why Holstein cows do suffer from abomasal displacement more frequently than Fleckvieh cows.

The presented data from animals with artificially induced impaction of the abomasum indicate that the decrease of SP and VIP may rather be the result of displacement than being the actual cause.

However, the induced distension of the abomasum had no effect on the overall nerve density. In this regard, differences between healthy Holstein cows and those with abomasal displacement support the hypothesis of an interindividual variation within the Holstein breed concerning predisposition for the occurrence of abomasal displacement.

# Literaturverzeichnis

- 1. ALLESCHER HD, DANIEL EE, DENT J, FOX JET (1989):**  
Inhibitory function of VIP – PHI and galanin in canine pylorus  
Am J Physiol 256 (Gastrointest Liver Physiol 19); G 789-G 797
- 2. ANGEL F, GO VLW, SCHMALZ PF, SZURSZEWSKI JH (1983a):**  
Vasoactive Intestinal Polypeptide: a putative transmitter in the canine gastric muscularis mucosa  
J Physiol 341; 641-654
- 3. ANGEL F, GO VLW, SZURSZEWSKI JH (1983b):**  
VIP, Bombesin, Substance P as putative transmitters in the muscularis mucosae of Canine Colon  
Gastroenterology 84; 1092
- 4. BALEMBA OB, GRØNDAHL ML, MBASSA GK, SEMUGURUKA WD, HAY – SMITH A, SKADHAUGE E, DANTZER V (1998):**  
The organisation of the enteric nervous system in the submucous and mucous layers of the small intestine of the pig studied by VIP and neurofilament protein immunohistochemistry  
J Anat 192; 257-267
- 5. BALEMBA OB, HAY-SCHMIDT A, ASSEY RJ, KAHWA CKB, SEMUGURUKA WD, DANTZER V (2002):**  
An immunohistochemical study of the organization of ganglia and nerve fibres in the mucosa of the porcine intestine  
Anat Histol Embryol 31; 237-246
- 6. BALEMBA OB, MBASSA GK, SEMUGURUKA WD, ASSEY RJ, KAHWA CKB, HAY-SCHMIDT A, DANTZER V (1999):**  
The topography, architecture and structure of the enteric nervous system in the jejunum and ileum of cattle  
J Anat 195; 1-9
- 7. BALTAZAR ET, KITAMURA N, HONDO E, YAMADA J, MAALA CP, SIMBORIO LT (1998):**  
Immunohistochemical study of endocrine cells in the gastrointestinal tract of the Philippine carabao (*Bubalus bubalis*)  
Anat Histol Embryol 27; 407-411
- 8. BEGG H (1950):**  
Diseases of the stomach of the adult ruminant  
Vet Rec 62; 797-808

- 9. BISHOP AE, CARLEI F, LEE V, TROJANOWSKI J, MARANGOS PJ, DAHL D, POLAK JM (1985):**  
Combined immunostaining of neurofilaments, neuron specific enolase, GFAP and S-100  
A possible means for assessing the morphological and functional status of the enteric nervous system  
Histochemistry 82; 93-97
- 10. BISHOP AE, POLAK JM, FACER P, FERRI GL, MARANGOS PJ, PEARSE AGE (1982):**  
Neuron Specific Enolase: A common marker for the endocrine cells and innervation of the gut and pancreas  
Gastroenterology 83; 902-915
- 11. BÖHME G (1992):**  
**in NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E**  
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV; S. 350 ff  
3. Auflage; Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- 12. BROOKES SJH, SONG ZM, STEELE PA, COSTA M (1992):**  
Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum  
Gastroenterology 103; 961-973
- 13. BROOKES SJH, STEELE PA, COSTA M (1991):**  
Calretinin immunoreactivity in cholinergic motor neurones, interneurons and vasomotor neurones in the guinea – pig small intestine  
Cell Tissue Res 263; 471-481
- 14. BUDRAS KD, WÜNSCHE A (2002):**  
Atlas der Anatomie des Rindes – Lehrbuch für Tierärzte und Studierende  
Schlütersche, Hannover
- 15. CARLQUIST M, MCDONALD TJ, GO VL, BATAILLE D, JOHANSSON C, MUTT V (1982):**  
Isolation and amino acid composition of human VIP  
Horm Metab Res 14; 28-29
- 16. CARLQUIST M, MUTT V, JÖRNVALL H (1979):**  
Isolation and characterization of bovine vasoactive intestinal peptide (VIP)  
FEBS Lett. 108; 457-60
- 17. CHANG FY, LEE SD, YEH GH, WANG PS (1999):**  
Rat gastrointestinal motor responses mediated via activation of neurokinin receptors  
J Gastroenterol Hepatol 14; 39-45
- 18. CHANG MM, LEEMAN SE (1971):**  
Amino-acid sequence of substance P  
Nature New Bio 1232; 86-87

- 19. CHAYVIALLE JA, MIYATA M, RAYFORD PL, THOMPSON JC (1980):**  
Release of vasoactive intestinal peptide by distention of the proximal stomach in dogs  
Gut 21; 745-749
- 20. CHURCH DC (1988):**  
The ruminant animal; 23-43  
Library of Congress Cataloging – in – Publication Data  
A Reston book, New Jersey, USA
- 21. CLAUSEN J (1999):**  
Untersuchungen zur Labmagengröße des Rindes in Beziehung zu Körpergröße, Alter,  
Futterzusammensetzung und Milchleistung  
Diss. med. vet. München
- 22. CONSTABLE PD, MILLER GY, HOFFSIS GF, HULL BL, RINGS DM (1992):**  
Risk factors for abomasal volvulus and left abomasal displacement in cattle  
Am J Vet Res 53; 1184-1192
- 23. CORCORAN BM, MAYHEW IG, HAHN CN, PRINCE DR (2000):**  
Expression of vasoactive intestinal peptide, calcitonin gene-related peptide, substance  
P, and intermediate neurofilaments in nasal mucosal nerve fibers of horses without  
nasal disease  
Am J Vet Res 61; 1619-1624
- 24. COSTA M, FURNESS JB, LLEWELLYN-SMITH IJ (1987):**  
Histochemistry of the enteric nervous system  
in: Physiology of the Gastrointestinal Tract; Second Edition;  
Raven Press; New York
- 25. CUELLO AC, GALFRE G, MILSTEIN C (1979):**  
Detection of substance P in the central nervous system by a monoclonal antibody  
Proc Natl Acad Sci USA 76, 3532-3536
- 26. DANIEL EE, COSTA M, FURNESS JB, KEAST JR (1985):**  
Peptide Neurons in the Canine Small Intestine  
J Comp Neurol 237; 227-238
- 27. DAWSON LJ, AALSETH EP, RICE LE, ADAMS GD (1992):**  
Influence of fiber form in a complete mixed ration on incidence of left displaced  
abomasum in postpartum dairy cows  
J Am Vet Med Assoc 200; 1989-1992
- 28. DEBUS E, FLÜGGE G, WEBER K, OSBORN M (1982):**  
A monoclonal antibody specific for the 200K polypeptide of the neurofilament triplet  
EMBO Journal 1; 41-46
- 29. DE MATOS LL, STABENOW E, TAVARES MR, FERRAZ AR, CAPELOZZI VL,  
DA SILVA PINHAL MA (2006):**  
Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared  
to semiquantitative analysis  
Clinics 61; 417-424

- 30. DE WINTER BY, ROBBERECHT P, BOECKXSTAENS GE, DE MAN JG, MOREELS TG, HERMAN AG, PELCKMANS PA (1998):**  
Role of VIP1 / PACAP receptors in postoperative ileus in rats  
Br J Pharmacol 124; 1181-1186
- 31. DIENER M (2000):**  
Vegetatives Nervensystem  
in: ENGELHARDT Wv, BREVES G  
Physiologie der Haustiere; Enke Verlag, Stuttgart
- 32. DIRKSEN G (1961a):**  
Vorkommen, Ursachen und Entwicklung der linksseitigen Labmagenverlagerung (Dislocatio abomasi sinistra) des Rindes  
Dtsch Tierärztl Wschr 68; 8-12
- 33. DIRKSEN G (1961b):**  
Die Erweiterung, Verlagerung und Drehung des Labmagens beim Rind  
Zbl Vet Med 8; 934-1015
- 34. DIRKSEN G (2002):**  
Krankheiten des Labmagens  
in: DIRKSEN G, GRÜNDER HD, STÖBER M (Hrsg.)  
Innere Medizin und Chirurgie des Rindes; Parey Buchverlag, Berlin; 473-514
- 35. DOCKRAY GJ (1987):**  
Physiology of enteric neuropeptides  
in: Physiology of the Gastrointestinal Tract; Second Edition  
Raven Press; New York
- 36. DOLL K (2007):**  
Aktuelles zu den Ursachen der Labmagenverlagerung  
Züchtungskunde 79; 59-69
- 37. DORP VAN RTE, DEKKERS JVM, MARTIN SW, NOORDHUIZEN JPTM (1998):**  
Genetic parameters of health disorders, and relationships with 305-day milk yield and conformation traits of registered Holstein cows  
J Dairy Sci 81; 2264-2270
- 38. EDWARDS AV, BIRCHMAN PM, MITCHELL SJ, BLOOM SR (1978):**  
Changes in the concentration of VIP in intestinal lymph in response to vagal stimulation in the calf  
Experientia 34; 1186-1187
- 39. EICHER R, AUDIGE L, BRAUN U, BLUM J, MEYLAN M, STEINER A (1999):**  
Epidemiologie und Risikofaktoren der Blinddarmdilataion und Labmagenverlagerung bei der Milchkuh  
Schweiz Arch Tierheilk 141; 423-429
- 40. ERSPAMER V (1949):**  
Ricerche preliminari sulla moschatina  
Experientia 5; 79

- 41. ESPAT NJ, CHENG G, KELLEY MC, VOGEL SB, SNINSKY CA, HOCKING MP (1995):**  
Vasoactive Intestinal Peptide and Substance P receptor antagonists improve postoperative ileus  
J Surg Res 58; 719-723
- 42. FAHRENKRUG J (1993):**  
Transmitter Role of Vasoactive Intestinal Peptide  
Pharmacol Toxicol 72; 354-363
- 43. FAUSTINI R (1976):**  
Einfluß einiger Polypeptide auf die Vormagenmotorik beim Wiederkäuer  
Dtsch Tierärztl Wschr 83; 192-198
- 44. FÜLL M, KRÜGER M (1999):**  
Alternative Möglichkeiten zur Prophylaxe der Dislocatio abomasi (DA) beim Rind  
Prakt Tierarzt 80, Colleg vet XXIX; 81-90
- 45. GEISHAUSER T (1995a):**  
Abomasal displacement in the bovine – a review on character, occurrence, aetiology and pathogenesis  
J Vet Med A 42; 229-251
- 46. GEISHAUSER T (1995b):**  
Untersuchungen zur Labmagenmotorik von Kühen mit Labmagenverlagerung  
Habil. med. vet. Gießen
- 47. GEISHAUSER T, DIEDERICHS M, BEUING R (1996):**  
Schätzung der Erbllichkeit von Labmagenverlagerung bei Deutsch-Schwarzbunten Rindern in Hessen  
J Vet Med A 43; 87-92
- 48. GEISHAUSER T, REICHE D, SCHEMANN M (1998):**  
In vitro motility disorders associated with displaced abomasum in dairy cows  
Neurogastroenterol Mot 10; 395-401
- 49. GINNEKEN VAN C, WEYNS A, MEIR VAN F, OOMS L, VERHOFSTAD A (1996):**  
Intrinsic innervation of the stomach of the fetal pig: an immunohistochemical study of VIP-immunoreactive nerve fibres and cell bodies  
Anat Histol Embryol 25; 269-275
- 50. GORDON RK, GRAY RR, CHIANG PK (1990):**  
Vasoactive intestinal polypeptides induce guinea-pig ileum contraction by causing release of endogenous acetylcholine  
Arch Int Pharmacodyn Ther 305; 14-24
- 51. GRIDER JR, CABLE MB, SAID SI, MAKHLOUF GM (1985):**  
Vasoactive intestinal peptide as a neural mediator of gastric relaxation  
Am J Physiol 248; G 73-G 78

- 52. GRIDER JR, MURTHY KS, JIN JG, MAKHLOUF GM (1992):**  
Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 262; G 774-G 778
- 53. GROENEWALD HB (1994):**  
Neuropeptides in the myenteric ganglia and nerve fibres of the forestomach and abomasum of grey, white and black Karakul lambs  
Onderstepoort J Vet Res 61; 207-213
- 54. GROENEWALD HB, BOOTH KK (1992):**  
A comparative study of the thickness of the tunica muscularis in the forestomach and abomasum of grey, white and black Karakul lambs  
Onderstepoort J Vet Res 59; 225-227
- 55. GRONEBERG JDA (2004):**  
Peptiderge Mediatoren und ihr Beitrag zur Pathophysiologie entzündlicher Erkrankungen  
Habil. med. Berlin
- 56. GRONEBERG JDA, RABE KF, WAGNER U, FISCHER A (2004):**  
Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) im Atemtrakt: Physiologie und Pathophysiologie  
Pneumologie 58; 330-338
- 57. GUILLOTEAU P, LE HUEROU-LURON I, CHAYVIALLE JA, TOULLEC R, ZABIELSKI R, BLUM JW (1997):**  
Gut regulatory peptides in young cattle and sheep  
J Vet Med A 44; 1-23
- 58. HARMAR AJ, ARIMURA A, GOZES I, JOURNOT L, LABURTHE M, PISEGNA JR, RAWLINGS SR, ROBBERECHT P, SAID SI, SREEDHARAN SP, WANK SA, WASCHEK JA (1998):**  
Nomenclature of receptors for Vasoactive Intestinal Peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide  
International Union of Pharmacology XVIII  
Pharmacol Rev 50; 265-270
- 59. HOFMANN RR, SCHNORR B (1982):**  
Die funktionelle Morphologie des Wiederkäuermagens: Schleimhaut und Versorgungsbahnen  
Stuttgart; Enke Verlag
- 60. HOLTENIUS K, JACOBSSON SO, HOLTENIUS P (1998):**  
Effects of intravenous infusion of glucose and pancreatic glucagons on abomasal function in dairy cows  
Acta Vet Scand 39; 291-300
- 61. HOLTENIUS K, STERNBAUER K, HOLTENIUS P (2000):**  
The effect of the plasma glucose level on the abomasal function in dairy cows  
J Anim Sci 78; 1930-1935

- 62. HOLZER P (1985):**  
Stimulation and inhibition of gastrointestinal propulsion induced by substance P and substance K in the rat  
Br J Pharmacol 86; 305-312
- 63. IMPROTA G, BROCCARDO M (2006):**  
Tachykinins: Role in human gastrointestinal tract physiology and pathology  
Current Drug Targets 7; 1021-1029
- 64. JACOBSEN KL, RIDDELL MG (1995):**  
Displaced abomasum and thin cows in a component-feed dairy herd  
Compend Contin Educ Pract Vet 17; Supplement 21-27
- 65. JUBB TF, MALMO J, DAVIS GM, VAWSER AS (1991):**  
Left-side displacement of the abomasum in dairy cows at pasture  
Aust Vet J 68; 140-142
- 66. KAZE C, MEVISSSEN M, HIRSBRUNNER G, STEINER A (2004):**  
Effect of endotoxins on contractility of smooth muscle preparations from the bovine abomasal antrum  
Dtsch Tierärztl Wschr 111; 1-48
- 67. KEAST JR, FURNESS JB, COSTA M (1985):**  
Distribution of certain peptide-containing nerve fibres and endocrine cells in the gastrointestinal mucosa in five mammalian species  
J Comp Neurol 236; 403-422
- 68. KITAMURA N, YAMADA J, YAMASHITA T (1986):**  
Immunohistochemical study on the distribution of Neuron-Specific Enolase- and peptide-containing nerves in the reticulorumen and the reticular groove of cattle  
J Comp Neurol 248; 223-234
- 69. KITAMURA N, YAMADA J, YAMASHITA T (1987):**  
Immunohistochemical study on the distribution of Neuron-Specific Enolase- and peptide-containing nerves in the omasum of cattle  
J Comp Neurol 256; 590-599
- 70. KNIPPING S (2003):**  
Untersuchungen zur Regulation der seromukösen Drüsen der respiratorischen Nasenschleimhaut des Menschen  
Habil. med. Halle-Wittenberg
- 71. KOBEL B, ENGEL L, ONTSOUKA E, GRABER HU, BLUM J, STEINER A, MEYLAN M (2006):**  
Verteilung der mRNA für 9 Subtypen von adrenergen Rezeptoren im Darm von Kühen mit Blinddarmdilatation im Vergleich mit gesunden Milchkühen  
Tagungsband des 6. Berlin-Brandenburgischen Rindertages 2006
- 72. KUIPER R (1991):**  
Abomasal diseases  
Bov Pract 26; 111-117

- 73. LEE CMY, KUMAR RK, LUBOWSKI DZ, BURCHER E (2002):**  
 Neuropeptides and nerve growth in inflammatory bowel diseases – a quantitative immunohistochemical study  
 Digestive Diseases and Sciences 47; 495-502
- 74. LE MEUTH V, FARJAUDON N, BAWAB W, CHASTRE E, ROSSELIN G, GUILLOTEAU P, GESPACH C (1991):**  
 Characterization of binding sites for VIP-related peptides and activation of adenylate cyclase in developing pancreas  
 Am J Physiol 260; G 265-G 274
- 75. LLEWELLYN-SMITH IJ, FURNESS JB, GIBBINS IL, COSTA M (1988):**  
 Quantitative ultrastructural analysis of enkephalin-, substance P- and VIP-immunoreactive nerve fibers in the circular muscle of the guinea pig small intestine  
 J Comp Neurol 272; 139-148
- 76. LLEWELLYN-SMITH IJ, FURNESS JB, MURPHY R, O´BRIEN PE, COSTA M (1984):**  
 Substance P-containing nerves in the human small intestine  
 Gastroenterology 86; 421-435
- 77. LYONS DT, FREEMAN AE, KUCK AL (1991):**  
 Genetics of health traits in Holstein cattle  
 J Dairy Sci 74; 1092-1100
- 78. MANGEL AW, KOEGEL A(1984):**  
 Effects of peptides on gastric emptying  
 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 246; G 342-G 345
- 79. MARTIN SW, KIRBY KL, CURTIS RA (1978):**  
 A study of the role of genetic factors in the etiology of left abomasal displacement  
 Can J Comp Med 42; 511-518
- 80. MASSIG P (1907):**  
 Über die Verbreitung des Muskel- und elastischen Gewebes und speziell über den Verlauf der Muskelfasern in der Wand der Wiederkäuermägen  
 Diss. med. vet. Gießen
- 81. MATINI P, MAYER B, FAUSSONE-PELLEGRINI M (1997):**  
 Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life  
 Cell Tissue Res 288; 11-23
- 82. MATTHAEI I (1953):**  
 Mikroskopische Messungen am Labmagen von Rindern und Feststellung von Veränderungen an den Wandschichten unter Berücksichtigung von Rasse, Alter und Ernährung  
 Diss. med. vet. Gießen

- 83. MEYLAN M, GEORGIEVA TM, REIST M, BLUM JW, MARTIG J, GEORGIEVA IP, STEINER A (2004):**  
Distribution of mRNA that codes for subtypes of adrenergic receptors in the gastrointestinal tract of dairy cows  
Am J Vet Res 65; 1142-1150
- 84. MOORE G, RILEY WF, WESTCOTT RW, CONNER GH (1954):**  
Displacement of the bovine abomasum  
Vet Med 49; 49-51
- 85. MOORE RM, CHARALAMBOUS AC, MASTY J (1996):**  
Alterations in colonic arterial and venous plasma neuropeptide concentrations in horses during low-flow ischemia and reperfusion of the large colon  
Am J Vet Res 57; 1200-1205
- 86. MOSIMANN W, KOHLER T (1990):**  
Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere; S. 162 ff  
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- 87. MÜLLER H (1953):**  
Verlagerung und Torsion des Labmagens bei einer Kuh  
Dtsch Tierärztl Wschr 60; 230
- 88. MYOJIN T, KITAMURA N, HONDO E, BALTAZAR ET, PEARSON GT, YAMADA J (2000):**  
Immunohistochemical localization of neuropeptides in bovine pancreas  
Anat Histol Embryol 29; 167-172
- 89. NAKAMURA T, KAWAHARA H, MIYASHITA H, WATARAI K, TAKAGI M, TACHIBANA S (1987):**  
Cross reactive identification of types 1 and 2C fibers in human skeletal muscles with monoclonal anti-neurofilament (200kd) antibody  
Histochemistry 87; 39-45
- 90. NEU-ZUBER A (2005):**  
Myoelektrische Aktivität von Labmagen und proximalem Duodenum bei Milchkühen  
Diss. med. vet. Gießen
- 91. NISHI Y, KITAMURA N, OTANI M, HONDO E, TAGUCHI K, YAMADA J (2000):**  
Distribution of capsaicin-sensitive substance P- and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves in bovine respiratory tract  
Annals of Anatomy 182; 319-326
- 92. PEARSON GT (1994):**  
Structural organization and neuropeptide distributions in the equine enteric nervous system: an immunohistochemical study using whole-mount preparations from the small intestine  
Cell Tissue Res 276; 523-534

- 93. PEHRSON B, STENGÄRDE L (1998):**  
Ursachen der unterschiedlichen Inzidenz von Dislocatio abomasi in den USA sowie in Schweden  
in: FÜRLL M (Hrsg.)  
Proc Internat Workshop über Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik, Prognose, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi; 41-47  
Leipziger Universitätsverlag 2000
- 94. PFANNKUCHE H, REICHE D, HOPPE S, SCHEMANN M (2002a):**  
Cholinergic and noncholinergic innervation of the smooth muscle layers in the bovine abomasum  
Anat Rec 267; 70-77
- 95. PFANNKUCHE H, SCHELLHORN C, SCHEMANN M, ASCHENBACH JR, GÄBEL G (2003):**  
Age-associated plasticity in the intrinsic innervation of the ovine rumen  
J Anat 203; 277-282
- 96. PFANNKUCHE H, SCHEMANN M, GÄBEL G (2002b):**  
Ruminal muscle of sheep is innervated by non-polarized pathways of cholinergic and nitrenergic myenteric neurones  
Cell Tissue Res 309; 347-354
- 97. PHILLIPS SF, WINGATE DL (2002):**  
Funktionelle Darmerkrankungen  
Hans Huber Verlag, Bern, Schweiz
- 98. POIKE A, FÜRLL M (1989):**  
Zur Epidemiologie der Labmagenvorlagerung (dislocatio abomasi) in Mitteldeutschland  
in: FÜRLL M (Hrsg.)  
Proc Internat Workshop über Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik, Prognose, Therapie und Prophylaxe der Dislocatio abomasi; 29-39  
Leipziger Universitätsverlag 2000
- 99. PORTER AJ, WATTCHOW DA, BROOKES SJ, COSTA M (1997):**  
The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon  
Gastroenterology 113; 1916-1923
- 100. PORTER AJ, WATTCHOW DA, HUNTER A, COSTA M (1998):**  
Abnormalities of nerve fibers in the circular muscle of patients with slow transit constipation  
Int J Colorect Dis 13; 208-216
- 101. PRAVETTONI D, DOLL K, HUMMEL M, CAVALLONE ME, RE M, BELLOLI AG (2004):**  
Insulin-resistance associated to abomasal motility disorders detected by post-surgical abomasi-duodenal electromyography in cows with left abomasal displacement  
Am J Vet Res 65; 1319-1324

- 102. PSCHYREMBEL (2004):**  
Klinisches Wörterbuch  
260. Auflage; De Gruyter, Berlin und New York
- 103. REID AM, SHULKESA, TITCHEN DA (1988a):**  
Effects of the vagus nerves on gastric motility and release of Vasoactive Intestinal Polypeptide in the anaesthetized lamb  
J Physiol 396; 11-24
- 104. REID AM, SHULKES A, TITCHEN DA (1988b):**  
The Effects of Vasoactive Intestinal Polypeptide on gastric motility in the lamb  
J Physiol 396; 41-54
- 105. RICKEN MW (2003):**  
Labmagenverlagerung beim Rind: Analyse von genetischen Faktoren und ökonomischen Auswirkungen auf die Milchproduktion  
Diss. med. vet. Hannover
- 106. RICKEN M, HAMANN H, SCHOLZ H, DISTL O (2004):**  
Genetische Analyse der Prävalenz von Labmagenverlagerung und deren Beziehung zu Milchleistungsmerkmalen bei Deutschen Holstein Kühen  
Dtsch Tierärztl Wschr 111; 366-370
- 107. RINDI G, LEITER AB, KOPIN AS, BORDI C, SOLCIA E (2004):**  
The „normal“ endocrine cell of the gut – changing concepts and new evidences  
Ann N Y Acad Sci 1014; 1-12
- 108. ROMEIS B (1989):**  
Mikroskopische Technik  
17., neubearbeitete Auflage; Urban Schwarzenberg, München
- 109. SAID SI (1984):**  
Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP): current status  
Peptides 5; 143-150
- 110. SAID SI, MUTT V (1970):**  
Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine  
Science 169; 1217-1218
- 111. SCHEMANN M (2000):**  
Enterisches Nervensystem und Innervation des Magen-Darm-Traktes  
in: ENGELHARDT Wv, BREVES G  
Physiologie der Haustiere; Enke Verlag, Stuttgart
- 112. SCHEMANN M, REICHE D, MICHEL K (2001):**  
Enteric pathways in the stomach  
Anat Rec 262; 47-57

- 113. SCHEMANN M, SANN H, SCHAAF C, MÄDER M (1993):**  
Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase  
Am J Physiol 265; G 1005-G 1009
- 114. SCHMIDT PT, HOLST JJ (2000):**  
Tachykinins in regulation of gastric motility and secretion  
Cell Mol Life Sci 57; 579-588
- 115. SCHNEIDER J, JEHLE EC, STARLINGER MJ, NEUNLIST M, MICHEL K, HOPPE S, SCHEMANN M (2001):**  
Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non – inflamed rectum of patients with Crohn´s disease  
Neurogastroenterol Mot 13; 255-264
- 116. SCHULTZBERG M, HOKFELT T, LUNDBERG JM, FUXE K, MUTT V, SAID S (1980):**  
Distribution of VIP neurons in the peripheral and central nervous system  
Endocrinol Japon SR 1; 23-30
- 117. SCHUSSER GF, SCHEIDEMANN W, HUSKAMP B (2000):**  
Muscle thickness and neuron density in the caecum of horses with chronic recurrent caecal impaction (Abstract)  
Equine Vet J Suppl 32; 69-73
- 118. SEHMSDORF US (2001):**  
Einfluß von „Calcitonin Gene-Related Peptide“ und „Substance P“ auf die mRNA-Expression und Freisetzung von Zytokinen aus zerebralen Endothelzellen bei Kostimulation mit Pneumokokkenzellwänden  
Diss. med. Berlin
- 119. SEN I, OK M, TURGUT K, BIRDANE FM, GÜZELBEKTAS H (2002):**  
Role of gastrin in the aetiology of abomasal displacement in dairy cows  
Vet Rec 151; 26-27
- 120. SETHI V, ÖNYÜKSEL H, RUBINSTEIN I (2005):**  
Liposomal Vasoactive Intestinal Peptide  
Meth Enzymol 391; 377-395
- 121. SEVERI C, TATTOLI I, CORLETO VD, MASELLI MA, TRISOLINI P, DELLE FAVE G (2006):**  
Vasoactive intestinal peptide receptor subtypes and signalling pathways involved in relaxation of human stomach  
Neurogastroenterol Motil 18; 1009-1018
- 122. SEVERINI C, IMPROTA G, FALCONIERI-ERSPAMER G, SALVADORI S, ERSPAMER V (2002):**  
The tachykinin peptide family  
Pharmacol Rev 54; 285-322

- 123. SHARKEY KA, WILLIAMS RG, DOCKRAY GJ (1984):**  
Sensory Substance P innervation of the stomach and pancreas – demonstration of Capsaicin-sensitive sensory neurons in the rat by combined immunohistochemistry and retrograde tracing  
Gastroenterology 87; 914-921
- 124. SHAVER RD (1997):**  
Nutritional risk factors in the etiology of left displacement in dairy cows; a review  
J Dairy Sci 80; 2449-2453
- 125. SJOQVIST A, FAHRENKRUG J, JODAL M, LUNDGREN O (1988):**  
The effect of splanchnic nerve stimulation and neuropeptide Y on cholera secretion and release of vasoactive intestinal polypeptide in the feline small intestine  
Acta Physiol Scand 133; 289-295
- 126. SMITH TR, HIPPEN AR, BEITZ DC, YOUNG JW (1997):**  
Metabolic characteristics of induced ketosis in normal and obese dairy cows  
J Dairy Sci 80; 1569-1581
- 127. SOEHARTONO RH, KITAMURA N, YAMAGISHI N, TAGUCHI K, YAMADA J, YAMADA H (2002):**  
An immunohistochemical study of endocrine cells in the abomasum of vagotomized calf  
J Vet Med Sci 64; 11-15
- 128. SOEHARTONO RH, YAMADA H, YAMAGISHI N, KITAMURA N, TAGUCHI K (2001):**  
The effects of vagotomy on the abomasum in calves: Radiography and Protein Gene Product 9.5 immunohistochemistry  
J Vet Med Sci 63; 671-674
- 129. SOMJEN G, FLETCHER DR, SHULKES A, HARDY KJ (1989):**  
Experimental mesenteric ischaemia in sheep: gut peptide release and haemodynamic changes  
J Gastroenterol Hepatol 4; 251-258
- 130. STENGÄRDE LU, PEHRSON BG (2002):**  
Effects of management, feeding and treatment on clinical and biochemical variables in cattle with displaced abomasum  
Am J Vet Res 63; 137-142
- 131. STEINER A (1996):**  
Die chirurgische Behandlung der linksseitigen Labmagenverlagerung bei der Kuh: Eine Literaturübersicht  
Schweiz Arch Tierheilk 138; 353-360
- 132. STRAITON EC, INTEE MC DP (1959):**  
Correction of left displaced abomasum  
Vet Rec 71; 871-872

- 133. SUSTRONCK B (1998):**  
Untersuchungen zur Labmagenentleerung bei Rindern  
in: FÜRLL M (Hrsg.)  
Proc Internat Workshop über Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik, Prognose, Therapie  
und Prophylaxe der Dislocatio abomasi; 113-126  
Leipziger Universitätsverlag 2000
- 134. TATEMOTO K, MUTT V (1981):**  
Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new  
member of the glucagon-secretin family  
Proc Natl Acad Sci USA 78; 6603-6607
- 135. TAYLOR CR, LEVENSON RM (2006):**  
Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and  
semiquantitative assessment II  
Histopathology 49; 411-424
- 136. TEIXEIRA AF, WEDEL T, KRAMMER HJ, KÜHNEL W (1998):**  
Structural differences of the enteric nervous system in the cattle forestomach revealed  
by whole mount immunohistochemistry  
Ann Anat 180; 393-400
- 137. TISCHBIREK D (1983):**  
Untersuchungen von Labmagenmuskulaturproben labmagengesunder sowie an  
linksseitiger Labmagenverlagerung erkrankter Kühe auf ihren histologisch  
feststellbaren Fettgehalt  
Diss. med. vet. Hannover
- 138. URIBE HA, KENNEDY BW, MARTIN SW, KELTON DF (1995):**  
Genetic parameters for common health disorders of Holstein cows  
J Dairy Sci 78; 421-430
- 139. VASSILEVA O, STOYANOV I, LOUKANOV Y (1978):**  
Neurotransmitted responses of smooth-muscle strips of complex sheep stomach after  
electrical field stimulation  
Acta Physiol Pharmacol Bulg 4; 11-18
- 140. VENTO P, KIVILUOTO T, KERÄNEN U, JÄRVINEN HJ, KIVILAAKSO E,  
SOINILA S (2001):**  
Quantitative comparison of Growth-associated Protein-43 and Substance P in  
ulcerative colitis  
J Histochem Cytochem 49; 749-757
- 141. VENTO P, SOINILA S (1999):**  
Quantitative comparison of Growth-associated Protein GAP-43, Neuron-specific  
Enolase, and Protein Gene Product 9.5 as neuronal markers in mature human intestine  
J Histochem Cytochem 47; 1405-1415

- 142. VITTORIA A, COSTAGLIOLA A, CARRESE E, MAYER B, CECIO A (2000):**  
Nitric oxide-containing neurons in the bovine gut, with special reference to their relationship with VIP and galanin  
Arch Histol Cytol 63; 357-368
- 143. WALKER RA (2006):**  
Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I  
Histopathology 49; 406-410
- 144. WINDEN VAN SC, JORRITSMA R, MÜLLER KE, NOORDHUIZEN JP (2003):**  
Feed intake, milk yield and metabolic parameters prior to left displaced abomasum in dairy cows  
J Dairy Sci 86; 1465-1471
- 145. WINDEN VAN SCL, KUIPER R (2003):**  
Left displacement of the abomasum in dairy cattle: recent developments in epidemiological and etiological aspects  
Vet Res 34; 47-56
- 146. WHITMORE HL (2004):**  
Displaced abomasum and hypocalcemia – Comments  
LAVA-net homepage; Juli No 1-2
- 147. WOLF V (2001):**  
Populationsgenetische Untersuchung zum Auftreten der Labmagenverlagerung bei Deutschen Holstein Kühen  
Diss. med. vet. Hannover
- 148. WOLF V, HAMANN H, SCHOLZ H, DISTL O (2001a):**  
Einflüsse auf das Auftreten von Labmagenverlagerungen bei Deutschen Holstein Kühen  
Dtsch Tierärztl Wschr 108; 403-408
- 149. WOLF V, HAMANN H, SCHOLZ H, DISTL O (2001b):**  
Systematische Einflüsse auf das Auftreten von Labmagenverlagerungen bei Deutschen Holstein Kühen  
Züchtungskunde 73; 257-265
- 150. WOOD JD (1987):**  
Physiology of the enteric nervous system  
in: Physiology of the Gastrointestinal Tract; Second Edition  
Raven Press, New York
- 151. YAMAMOTO Y, KITAMURA N, YAMADA J, ATOJI Y, SUZUKI Y, YAMASHITA T (1994a):**  
Structure of the enteric nervous system in the sheep omasum as revealed by neurofilament protein-like immunoreactivity  
J Anat 184; 399-405

- 152. YAMAMOTO Y, KITAMURA N, YAMADA J, YAMASHITA T (1994b):**  
Immunohistochemical study of the distributions of the peptide- and catecholamine-containing nerves in the omasum of the sheep  
*Acta Anat* 149; 104-110
- 153. ZAMRE VN, PANDEY SK, SHRIVASTAVA AM, PATEL MR (1979):**  
Gross structural and histopathological changes in experimental abomasal displacement in cow calves  
*Indian J Anim Sci* 49; 895-900
- 154. ZIMMERMAN RP, GATES TS, MANTYH CR, VIGNA SR, WELTON ML, PASSARO EP JR, MANTYH PW (1989):**  
Vasoactive intestinal polypeptide receptor binding sites in the human gastrointestinal tract: localization by autoradiography  
*Neuroscience* 31; 771-783
- 155. ZULAUF M, SPRING C, EICHER R, MEYLAN M, HIRSBRUNNER G, SCHOLTYSIK G, STEINER A (2002):**  
Spontaneous in vitro contractile activity of specimens from the abomasal wall of healthy cows and comparison among dairy breeds  
*Am J Vet Res* 63; 1687-1694

## Anhang

**Tabelle 5: Angaben zu den 20 Kühen der Rasse Deutsches Fleckvieh, bei denen nach der Schlachtung Labmagen-Bioptate entnommen wurden (Datenblatt zur Probenentnahme I)**

TN	Schlachtnr.	Geburtsdatum	Alter	Ohrmarkennummer	Datum
6	1769	21.10.2000	4a 5M	DE 08116 51961	09.03.2005
9	1776	21.07.2000	4a 8M	DE 08913 87731	
10	1778	01.12.2000	4a 3M	DE 08117 61104	
11	1780	04.03.2001	4a 0M	DE 08117 61118	
15	1872	28.06.2001	3a 9M	DE 09345 58950	
16	1874	26.02.2002	3a 1M	DE 09838 53077	
17	1876	25.07.2001	3a 8M	DE 09355 68325	
21	1475	12.06.2001	3a 9M	PL 005007 863849	30.03.2005
22	1487	11.04.2000	4a 11M	PL 005007 866437	
26	1505	02.10.2001	3a 5M	DE 09331 30077	
33	1547	06.07.2000	4a 8M	DE 09343 71661	
34	1550	28.07.2001	3a 8M	DE 09347 32035	
37	1573	23.04.2001	3a 11M	DE 06615 22850	
38	1574	19.11.2001	3a 4M	DE 06616 96003	
39	1580	30.06.2001	3a 9M	DE 06616 95988	
40	1595	27.03.2001	4a 0M	DE 06615 73218	
41	1607	31.12.2001	3a 3M	DE 06618 68047	
46	1713	27.01.2002	3a 2M	DE 14017 30865	13.04.2005
52	1741	28.01.2001	4a 2M	DE 14015 40529	
54	1763	15.05.2000	4a 10M	DE 08117 23221	

**Tabelle 6: Angaben zu den 20 Kühen der Rasse Deutsche Holsteins, bei denen nach der Schlachtung Labmagen-Bioptate entnommen wurden (Datenblatt zur Probenentnahme II)**

TN	Schlachtnr.	Geburtsdatum	Alter	Ohrmarkennummer	Datum
3	1720	14.12.2001	3a 3M	DE 09359 04059	09.03.2005
4	1728	22.01.2001	4a 2M	DE 06616 50112	
12	1786	01.08.2000	4a 7M	DE 08116 62653	
13	1810	06.06.2000	4a 9M	DE 14012 79572	
14	1819	14.03.2002	3a 0M	DE 14019 45206	
18	1890	25.02.2002	3a 1M	DE 09361 54525	
19	1916	28.06.2000	4a 9M	DE 06615 11279	
20	1921	25.07.2001	3a 8M	DE 06617 86091	
23	1489	30.05.2001	3a 10M	PL 005036 969996	30.03.2005
24	1491	06.04.2001	3a 11M	PL 005043 947467	
25	1492	17.04.2001	3a 11M	PL 005054 037422	
27	1514	26.06.2001	3a 9M	DE 14017 82419	
28	1523	22.10.2000	4a 5M	DE 14015 21930	
29	1529	20.07.2000	4a 8M	DE 14009 50295	
31	1532	13.02.2001	4a 1M	DE 14015 64337	
32	1536	07.12.2001	3a 3M	DE 14015 50850	
43	1686	26.03.2002	3a 0M	DE 16014 44780	13.04.2005
44	1687	10.09.2001	3a 6M	DE 16013 79763	
48	1719	08.01.2001	4a 2M	DE 14013 75191	
50	1734	01.03.2001	4a 0M	DE 14015 40166	

**Tabelle 7: Angaben zu den 20 Kühen der Rasse Deutsche Holsteins, bei denen während einer paramedianen Abomasopexie zur Behebung einer linksseitigen Labmagenverlagerung Biopate aus dem Labmagen entnommen wurden (Datenblatt zur Probenentnahme während der Operation)**

OP	Kliniksnr.	Geburtsdatum	Alter	Ohrmarkennummer	Datum
1	547 / 05	30.04.2000	5a 5M	DE 05789 89664	15.09.2005
2	550 / 05	21.04.2001	4a 5M	DE 06615 05653	16.09.2005
3	561 / 05	14.01.2002	3a 8M	DE 03471 77966	22.09.2005
4	584 / 05	08.08.2002	3a 2M	DE 06616 67994	11.10.2005
5	666 / 05	20.09.2002	3a 2M	DE 05795 49817	25.11.2005
6	700 / 05	03.03.2000	5a 9M	DE 06612 12900	12.12.2005
7	14 / 06	29.05.2002	3a 7M	DE 06617 97105	10.01.2006
8	8 / 06	09.09.2000	5a 4M	DE 06612 67187	12.01.2006
9	77 / 06	03.05.2001	4a 9M	DE 06615 72275	04.02.2006
10	81 / 06	18.12.2002	3a 2M	DE 06619 51663	07.02.2006
11	101 / 06	10.08.2002	3a 6M	DE 06618 66329	14.02.2006
12	112 / 06	04.02.2001	5a 0M	DE 06616 18107	20.02.2006
13	145 / 06	04.05.2000	5a 10M	DE 06617 88039	10.03.2006
14	174 / 06	02.07.2000	5a 8M	DE 06613 53388	21.03.2006
15	190 / 06	12.12.2001	4a 3M	DE 06618 03110	28.03.2006
16	256 / 06	04.03.2001	5a 2M	DE 06615 43020	01.05.2006
17	268 / 06	24.08.2000	5a 9M	DE 06612 09738	05.05.2006
18	300 / 06	29.08.2000	5a 9M	DE 06612 21947	17.05.2006
19	319 / 06	30.05.2001	4a 11M	DE 05789 19395	23.05.2006
20	323 / 06	04.09.2002	3a 8M	DE 06618 96765	24.05.2006

**Tabelle 8: Angaben zu den 3 Kühen der Rasse Deutsche Holsteins, bei denen vor und 72 Stunden nach experimentellem Anlegen eines Magenbandes Biopate aus dem Labmagen entnommen wurden (Datenblatt zur Probenentnahme bei den Holstein-Kühen mit Magenband)**

<b>MB</b>	<b>Kliniksnr.</b>	<b>Geburtsdatum</b>	<b>Alter</b>	<b>Ohrmarkennummer</b>	<b>Datum</b>
<b>1</b>	MB 1	27.01.2002	4a 10M	DE 06617 70586	27. / 30.11.06
<b>2</b>	MB 2	19.06.2002	4a 5M	DE 06618 87274	01. / 04.12.06
<b>3</b>	MB 3	02.02.2003	3a 10M	DE 06619 99623	05. / 08.12.06

## Entwicklung des Base Excess nach Anlegen eines Magenbandes

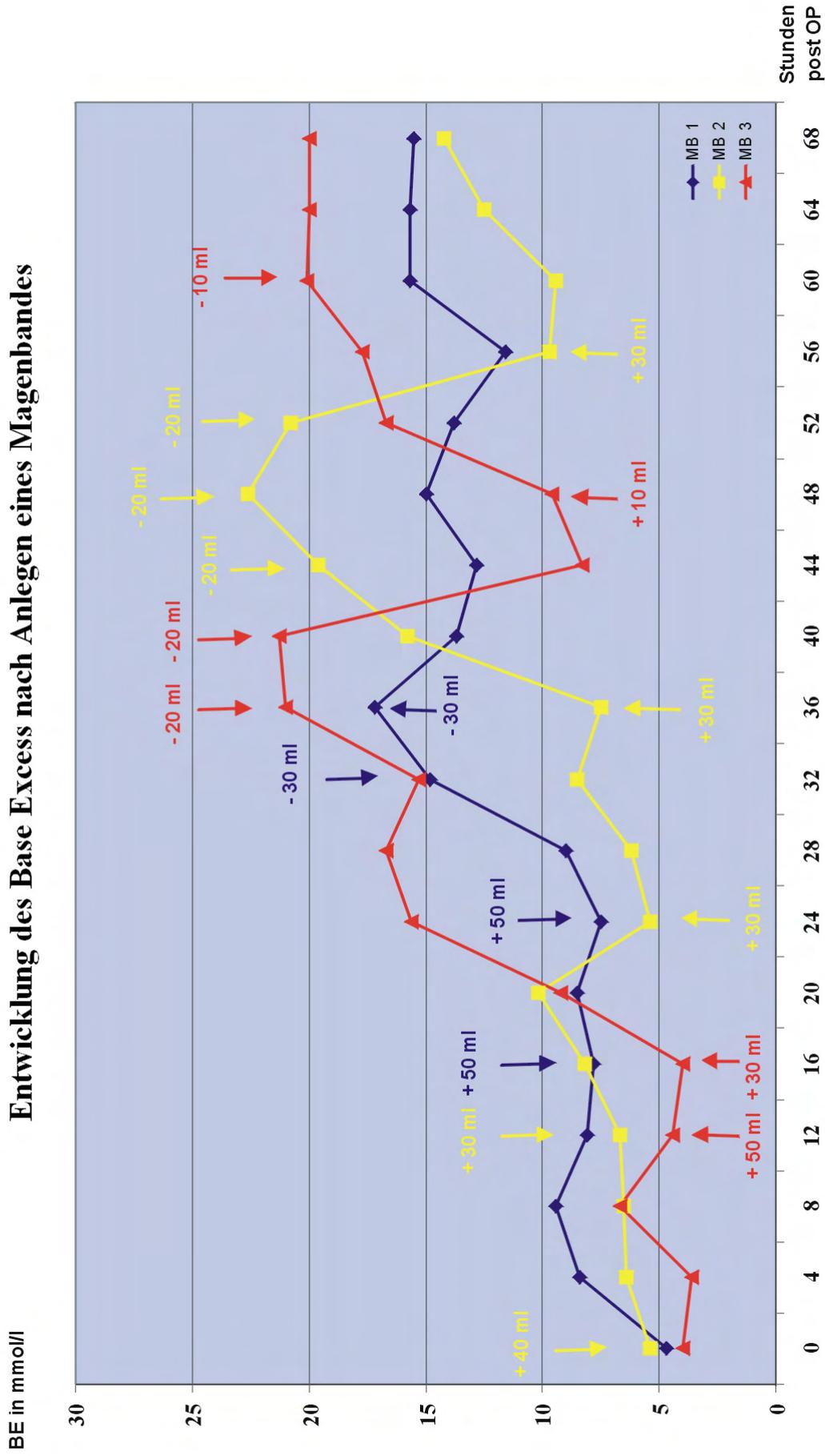


Abbildung 24: Entwicklung des Base Excess nach künstlicher Einengung der Pars pylorica mittels Magenband. Die Milliliterangaben beziehen sich auf die Instillation (+) bzw. Aspiration (-) von Flüssigkeit in das bzw. aus dem Magenband.

## Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

### Immunhistochemie:

- Formamid, 1 l, Art. Nr. 1.09684.1000, Merck, Darmstadt
- Ethanol, Sorte 522, 20 l, Art. Nr. UN 1170, Stockmeier Chemie Dillenburg GmbH & CoKG, Dillenburg
- Paraffin, Gewebeeinbettmedium proWax 56 °C, Sasolwax 0587, 20 kg, Art. Nr. 40-005/B, proLab GmbH, Lollar
- Einbether, Leica TP 1050, Leica Instruments GmbH, D-69226 Nussloch
- Aufblock-Gerät, Leica EG 1160, Kat. Nr. 038621438, Leica Instruments GmbH, D-69226 Nussloch
- Einbettkassetten, Standard ohne Deckel, Art. Nr. 30-10-0266, proLab GmbH, Lollar
- Einbettkassetten, Standard mit Deckel, Art. Nr. 30-10-0113, proLab GmbH, Lollar
- Mikrotom: HM 400 Microm, Leica Instruments GmbH, D-69226 Nussloch
- Objektträger: SuperFrost Objektträger, 76 x 26 mm, geputzt, R. Langenbrinck, Teningen
- APES: (3-Aminopropyl)triethoxysilan, 3-(Triethoxysilyl)propylamin; 100 ml, Chemika 09324, Firma Fluka
- Trockenschrank, Memmert, MAGV Laborbedarf, Rabenau-Londorf
- Glasküvetten, Färbekästen nach Hellendahl, Art. Nr. 190031500, MAGV Laborbedarf, Rabenau-Londorf
- Färbegestell, Glas, H 552.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Feuchte Kammern, Incubation Tray SP0001TR-8, DakoCytomation GmbH, Hamburg
- Xylol, 30 l, Art. Nr. UN 1307, Stockmeier Chemie Dillenburg GmbH & CoKG, Dillenburg
- Aceton rein, 30 l, Art. Nr. UN 1090, Stockmeier Chemie Dillenburg GmbH & CoKG, Dillenburg
- Aqua dest: Seradest S 750, Firma Seral, Kretschmer Medizin- und Labortechnik; Gießen
- Kochsalz, NaCl, 1 kg, Art. Nr. 3957.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1 kg, Art. Nr. 1.06580.1000, Merck, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 kg, Art. Nr. P018.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

- Citronensäure-1-hydrat zur Analyse, 500 g, Art. Nr. 1167068, Merck, Darmstadt
- tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 1 kg, Art. Nr. 3580.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Waage: Mettler Toledo PB3002-S, Delta Range®, SNR 1122510881, Switzerland
- Heiz-/Rührplatte: Heidolph MR 3001, Ser. Nr. 110155520, MAGV Laborbedarf, Rabenau-Londorf
- pH-Meter: WTW inoLab pH 720, MAGV Laborbedarf, Rabenau-Londorf
- Heizplatten: IKA-Combimag RCT + RET, IKA®-Labortechnik Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
- Rüttler: IKA®-Schüttler MTS 2, IKA®-Labortechnik Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
- Vortex: VF 2, IKA®-Labortechnik Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
- Pipetten, Finnpiquette®, Labsystems bzw. Rotilabo®-Mikroliterpipetten Proline® Variabel, 10-100 µl, N468.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Pipettenspitzen, ratiolab®, Ratiolab GmbH, D-63303 Dreieich
- Eppendorfgefäße, Safe-Lock Tubes, 1,5 ml, Art. Nr. 0030102.002, Eppendorf AG, Hamburg
- Eppendorfgefäße, Safe-Lock Tubes, 2 ml, Art. Nr. 0030120.094, Eppendorf AG, Hamburg
- Methanol zur Synthese, 2,5 l, Art. Nr. 8.22283.2500, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
- Normalseren:
  - Ziegen Serum (Normal), 10 ml, DakoCytomation, Code No X0907, Denmark
  - Kaninchen Serum, 10 ml, DakoCytomation, Code No X0902, Denmark
  - Pferd Normal Serum, 20 ml, Vector S-2000, VectorLaboratories Inc., Burlingame, USA
- BovineSerumAlbumin: Albumin Fraktion V, pulv., bovine, 50 g, Art. Nr. 8076.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Triton® X-100 Detergent, 1 kg, Cat. Nr. 648462, Calbiochem, EMD Biosciences, Merck, Darmstadt
- ABC-Kit: Vectastain® ABC Kit Elite, PK-6100 Standard, VectorLaboratories Inc., Burlingame, USA
- AEC-Kit: Peroxidase-Substratkit AEC, Art. Nr. AE002, Biologo Dr. H. Schultheiß e.K., Kronshagen
- Shandon Instant Hematoxylin, REF 6765015, Anatomical Pathology USA, Pittsburgh

- Gelatine: Kaisers Glyceringelatine, Art. Nr. 1.09242.0100, Merck, Darmstadt
- Deckgläser: 18 x 18 mm und 24 x 24 mm, Roth®, Karlsruhe

Auswertung:

- Axiophot Photomikroskop, SIP 64614, Carl Zeiss AG, Oberkochen
- Kamera, CC 12, 20480512, Soft Imaging System GmbH; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
- Software: analySIS Pro 3.2; Seriennummer: A 1824600-44C96013; Soft Imaging System GmbH; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster
- Graphiktablett: Wacom intuos® 3, Wacom Europe GmbH, Krefeld

**Tabelle 9: Verwendetes Verbrauchsmaterial für die OP:**

Produkt	Beschreibung	Hersteller
Operationswagen	hydraulisch; für Rinder	Fa. Bartmann; Lübbecke
Rasierklingen	extra dünn	Rotbart
Lifosan®Soft	Sanfte Waschlotion, 500 ml, Art. Nr. 18593	B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
Freka®NOL	Desinfektionslösung, 1000 ml, Art. Nr. 4916781	Fresenius Kabi AG, D-61346 Bad Homburg
Procasel 2 %	Lokalanästhetikum, 100 ml, selectavet	Dr. Otto Fischer GmbH, D-83629 Weyarn-Holzolling
Luer-Einmalspritzen	20 ml, Art. Nr. 4606205V	B. Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
Einmalinjektionskanüle	14G, 2,1 x 80 mm, Cat. No. 121410	Bovi-VET, Japan
Buster®sterile	OP-Cover, 120 x 180 cm, Prod. Nr. 060201	Kruuse
OP-Handschuhe Gammex® PF	puderfrei, Art. Nr. 351144	Ansell Healthcare Europe NV, B- 1070 Brussels, Belgium
Einmalskalpellklingen	Bayha®-sterile Skalpellklingen, Nr. 22	C. Bruno Bayha GmbH, D-78532 Tuttlingen
Suprylon® metric 4	Filum polyamidicum-6, 50 m, Art. Nr. 13418	Vömel, D-61476 Kronberg
Suprylon® metric 6	Filum polyamidicum-6, 50 m, Art. Nr. 13458	Vömel, D-61476 Kronberg
Supramid® metric 8	Filum polyamidicum-6, 40 m, Art. Nr. 94038	WDT, D-30812 Garbsen
Synthesorb® metric 7	Polyglycolsäure	Vömel, D-61476 Kronberg
Monosyn®	Glyconate monofil, absorbable; HS 37s ½ c, 37 mm, cutting, 70 cm; REF 0022249	B. Braun, Aesculap AG & Co KG, D-78532 Tuttlingen
3M TM Tegaderm™ + Pad	Wundabdeckung, 9 x 35 cm	3M Medica Zweigniederlassung der 3M Deutschland GmbH, Hammfelddamm 11, 41460 Neuss

## Rezepturen für Lösungen und Puffer

### 4 % gepuffertes Formol:

100 ml Formaldehyd (ca. 40 %)

4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

8,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (MG 177,99)

[oder statt letzter Substanz: 6,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wasserfrei (MG 141,96)]

ad 1000 ml

Formaldehyd in eine braune Glasflasche filtern

Puffersubstanzen einzeln abwiegen und in Aqua dest. lösen.

100 ml der gefilterten Formaldehydlösung zugeben und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Aufbewahrung im Kühlschrank.

### PBS-Stammlösung:

41 g NaCl

11 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

2,75 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

ad 1 l Aqua dest.

### PBS-Gebrauchslösung:

Verdünnen der Stammlösung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:5

## **2 %iges APES zur Objektträgerbeschichtung:**

10 ml APES

490 ml Aceton

Objektträger für 20 Sekunden in APES-Lösung tauchen

2 x kurz in Aceton und 2 x in Aqua dest spülen

Objektträger stehend bei 37 °C trocknen lassen

## **Citratpuffer:**

**Lösung A: 0,1 m Zitronensäure**

21,01 g  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$

ad 1000 ml Aqua dest.

**Lösung B: 0,1 m Natriumcitrat**

29,41 g  $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2 H_2O$

ad 1000 ml Aqua dest.

**Pufferansatz:** ca. 5 ml Lösung A

25 ml Lösung B

270 ml Aqua dest.

Lösung B und Aqua dest. zusammengeben und mit Lösung A auf pH 6,0 einstellen

## **Blockpuffer:**

21 µl Triton X

1 g BSA

lösen in 70 ml PBS

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. Doll für die Überlassung des Themas und dafür, dass seine Tür immer offen stand und er sich trotz so manchen Termindrucks immer Zeit genommen hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser für die Bereitschaft, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe zu übernehmen und für die stets herzliche Umsorgung und Aufmunterung während der Zeit des praktischen Teils der Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. K. Failing für die Mithilfe bei der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

Ich danke der Stiftung der Eheleute Engemann für die finanzielle Unterstützung im letzten Jahr dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. H. Kümper, Dr. T. Seeger und Dr. M. Hummel für die Mithilfe bei der Aufnahme der Studienpatienten und der Versorgung der drei Versuchskühe.

Ich danke den Tierpflegern Klaus Lotz, Kurt Lutz, Ira Velten-Bötz, Timo Stein und Alex Coors für die geleistete Mehrarbeit und das Einbringen guter Ideen bei der praktischen Durchführung der Studie.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus Liebig Universität-Giessen für die nette Aufnahme und das gute Arbeitsklima. Besonderer Dank gilt hierbei Sigrid Kettner, Kathrin Wolf und Susanne Schubert-Porth, die mich in so vielfältiger Weise bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke Karen Bücher, Philip Bridger und Matyas Tatar für die fachliche Unterstützung und die kritischen Anregungen vor allem zu Beginn der Arbeit.

Ich danke meinen Mitdoktoranden Almahdi Akraiem, Petrit Berisha, Alexander Nitzschke, Giuseppe Bosco, Katrin Freudenberg, Nils Roloff, Ali F. Ibrahim, Sarah Sibbel, Frauke Schiffmann und den Famulanten Mathias Kretschmer und Verena Schmid für die schöne Zeit in der Klinik für Wiederkäuer.

Ich danke Sabine, Brigitte und Ina für die moralische und organisatorische Unterstützung.

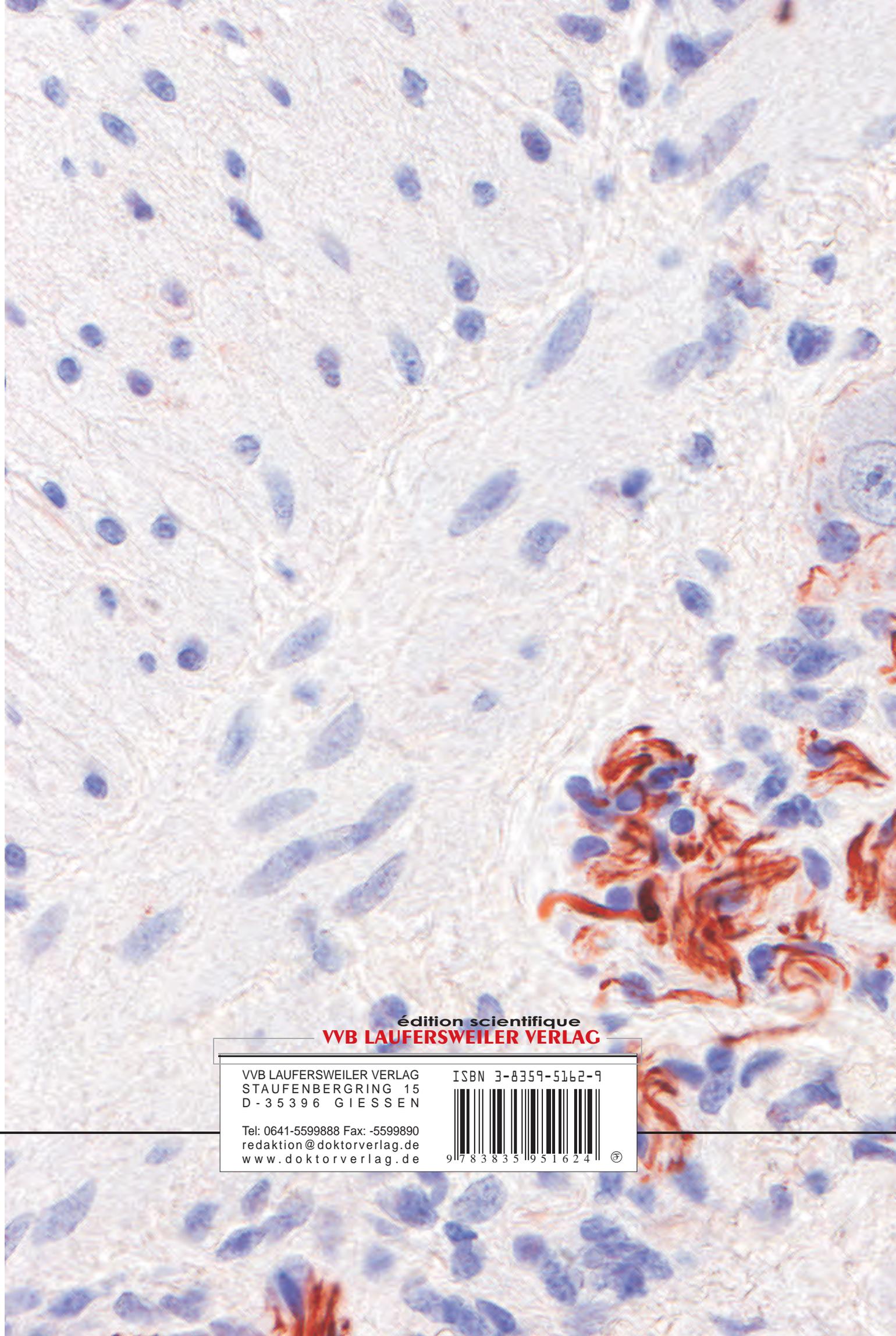
Ich danke Andy für seine Geduld und die liebevolle Unterstützung in der gesamten Zeit.

Ich danke meinen Eltern und Ursula für die finanzielle Unterstützung und den Rückhalt, ohne den diese Arbeit und auch das Studium nicht möglich gewesen wären.

Ich danke Gila, Kati, Ronja, Alex und Ayleen für so manche neue Erfahrung, die seelische Unterstützung in der gesamten Zeit und für ihre Freundschaft.

## **Erklärung**

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D - 35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5162-9



9 783835 951624

