

4 Ergebnisse

4.1 Semiquantitative Auswertung immunhistochemischer Untersuchungen

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde ein Score entwickelt, der Aussagen über die zelluläre und subzelluläre Lokalisation der zu bewertenden Proteine in den Zellen der einzelnen Schichten der Darmwand ermöglicht und gleichzeitig eine semiquantitative Aussage über die Stärke der Immunreaktivität (IR) zulässt.

Die Dickdarmwand ist ein sehr komplexes Gewebe, dessen verschiedene Schichten funktionell zur Gewährleistung der sekretorischen und resorptiven Aufgaben des Darmepithels interagieren. Abbildung 4-3 zeigt die Parameter, die in den immunhistochemischen Score einbezogen wurden und die Kriterien für deren Bewertung. Entlang der Kryptenachse kann die aktuelle Lokalisation einer Epithelzelle einer entsprechenden Differenzierung und Funktion zugeordnet werden. Diesem Zeit-Funktions-Verlauf wurde bei der Score-Erarbeitung durch Einteilung der Lamina epithelialis in 4 Kryptenkompartimente von luminal nach basal Rechnung getragen. In der Lamina propria wurde die IR in Fibrozyten und Myofibroblasten, sowie in mobilen Zellen erfasst. Für die mobilen Zellen wurde zusätzlich noch die Höhenlokalisierung innerhalb der Lamina propria berücksichtigt. Für die aufgeführten Zelltypen der Tunica mucosa wurde die IR auf subzellulärer Ebene erfasst. Dafür wurde die an zytoplasmatische Membranen gebundene (ZM) und die diffus im Zytoplasma (Z) verteilte IR, sowie eine IR der Kernmembran (KM) und des Kerns (K) getrennt hinsichtlich ihrer Häufigkeit und Intensität bewertet. Die gleichen Parameter wurden für Endothelzellen erfasst. Für die Tunica muscularis mucosae, die Tela submucosa sowie die Tunica muscularis erfolgte keine Bewertung der subzellulären Verteilung der IR. Es wurde lediglich ausgewertet, wie häufig sich in diesen Schichten positive Zellen befinden und wie stark diese immunreaktiv sind. Für den Plexus myentericus wurde bewertet, ob positive Zellen existieren.

Die Werte für den Score ergaben sich aus der Multiplikation der Häufigkeit und der Intensität der IR und lagen in einem Bereich zwischen 0 und 12 Score-Punkten.

Mit zunehmender Entartung beziehungsweise Entzündung des Gewebes verliert sich der typische Schichtenbau der Darmwand. Das entstehende Kryptenkonvolut macht die Einteilung der Krypten in lumennahe und -ferne Abschnitte unmöglich. In diesem Fall wurden Durchschnittswerte für die IR über die gesamte Lamina epithelialis gebildet.

Vor Anwendung des Scores wurden alle Proben histologisch charakterisiert und der Grad der Differenzierung bzw. Entzündung beurteilt.

Tunica mucosa															
<i>Lamina epithelialis mucosae</i>															
1. Kryptenviertel				2. Kryptenviertel				3. Kryptenviertel				4. Kryptenviertel			
ZM	Z	KM	K	ZM	Z	KM	K	ZM	Z	KM	K	ZM	Z	KM	K
H	I	H	I	H	I	H	I	H	I	H	I	H	I	H	I
<i>Lamina propria mucosae</i>															
Fibrozyten / Myofibroblasten								mobile Zellen							
ZM	Z	KM	K	ZM	Z	KM	K	Lokalisation							
H	I	H	I	H	I	H	I	1	2						
Lamina muscularis mucosae:								H I							
Tela submucosa:								H I							
Tunica muscularis:								H I							
Plexus myentericus:								0 1							
Endothel (Tunica mucosa, Tela submucosa)															
ZM	Z	KM	K												
H	I	H	I												

- ZM membrangebunden im Zytoplasma
- Z diffus im Zytoplasma
- KM Kernmembran
- K Kern

H	Häufigkeit der IR:	% aller Zellen (außer mobile Zellen)	mobile Zellen: Infiltration mit positiven Zellen		
		0	negativ	0	negativ
		1	1-10 %	1	schwach
		2	11-50 %	2	mäßig
		3	51-75 %	3	stark
4	76-100 %				
I	Intensität der IR:	0	negativ		
		1	schwach		
		2	mäßig / normal		
		3	stark		

Abb. 4-3: Immunhistochemischer Score

4.2 Kolorektale Tumore und CED des Menschen

4.2.1 Histologische Klassifikation der Tumorproben

Bei den untersuchten sporadischen Tumoren und denen von FAP-Patienten handelte es sich ausschließlich um epitheliale kolorektale Tumore. Um Veränderungen im Expressionsmuster der ausgewählten Proteine im Verlauf der Entdifferenzierung untersuchen zu können, wurden die Gewebeproben anhand histologischer Parameter klassifiziert und entsprechend ihrer Differenzierung den Graden G1 bis G4 zugeordnet.

Im Vergleich zum Normalbefund (Abb. 4-1 a) zeigt das Stadium G1 (Abb. 4-1 b) geringgradige morphologische Veränderungen der Dickdarmschleimhaut. Auffällig sind beginnende Unregelmäßigkeiten in der Kryptenarchitektur mit überwiegend hyperplastischen Krypten und Aufzweigungen der Krypten. Die Anzahl der Becherzellen ist nicht vermindert, tendenziell eher erhöht. Die Zellkerne der Epithelzellen erscheinen dunkler, vergrößert und weisen eine erhöhte Mitoserate auf. Vereinzelt sind Kryptitiden nachweisbar. In der Lamina propria findet sich vermehrt entzündliches Infiltrat als Begleitentzündung mit Ödem und ersten Anzeichen einer vermehrten Gefäßsprossung. Beim Übergang zum Stadium G2 (Abb. 4-1 c) kommt es im histologischen Bild zum Verlust der vertikalen Kryptenorientierung. Das erschwert die morphologische Zuordnung definierter Kryptenquerschnitte entsprechend dem Achsen-Funktions-Verlauf. Die Kryptenquerschnitte sind unregelmäßig und aufgetrieben. Die Anzahl der Becherzellen nimmt deutlich ab. In einzelnen Krypten kommt es zum vollständigen Becherzellverlust. Vereinzelt zeigen Epithelzellen bereits pleomorphe Kerne und eine hohe Mitoseaktivität. In der Lamina propria ist das lymphoplasmazytäre Infiltrat sowie die Summe der Gefäßquerschnitte vermehrt. Ein Großteil des funktionellen Gewebes ist erhalten. Im Verlauf der weiteren Entdifferenzierung kommt es zum Verlust dieses funktionellen Gewebes. Im HE-Präparat erscheinen die verbliebenen Kryptenquerschnitte optisch kompakter; eine Widerspiegelung des nunmehr vollständigen Verlustes der Becherzellen und einer Verdichtung und Vergrößerung der Zellkerne. Insgesamt vermittelt das Schnittbild einen unregelmäßigen Eindruck mit stark variierenden, entrundeten Kryptenquerschnitten. In Einzelfällen wird bereits der bindegewebige Ersatz der Epithelzellschicht erkennbar. Ab diesem Stadium ist eine Zuordnung eines Kryptenquerschnittes zum Achsen-Funktions-Verlauf nicht mehr möglich. Die Lamina propria erscheint sehr zellreich und ebenfalls verdichtet. Eine steigende Anzahl von Entzündungszellen sowie Einblutungen treten auf. Präparate dieses Entdifferenzierungsgrades wurden unter der Kategorie G3 zusammengefasst (Abb. 4-1 d). Alle Proben, die eine weiter fortgeschrittene Entdifferenzierung aufwiesen, wurden dem Stadium G4 zugeordnet (Abb. 4-1 e). Dabei kommt es zu einem fast vollständigen Verlust des Epithelzellverbundes. Nur inselartige

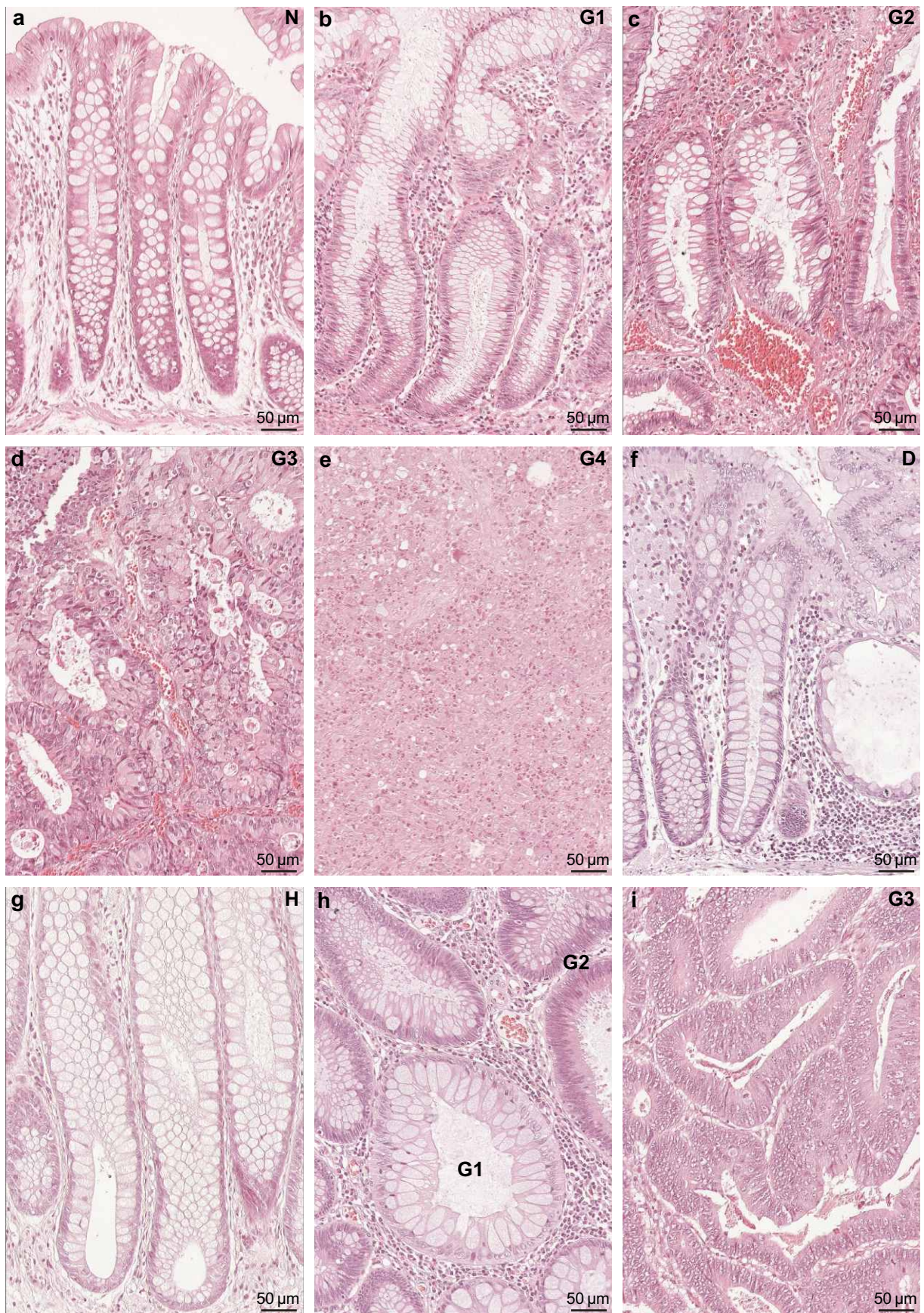


Abb. 4-1: Dickdarm, human, H&E-Färbung;
a morphologisch intaktes Gewebe (N);
b-e ST, Differenzierungsgrade: **b** G1, **c** G2, **d** G3, **e** G4;
f-i FAP, Differenzierungsgrade: **f** Dysplasie (D), **g** Hyperplasie (H), **h** G1 / G2, **i** G3

Kryptenrudimente mit deutlichen Zeichen progressiver bindegewebiger Substitution sind noch nachweisbar. Im Zuge dieses Prozesses

kommt es zur Herausbildung eines kompakten, faserreichen, relativ zellarmen und mäßig gefäßreichen Bindegewebes mit leicht erhöhter lymphozytärer Infiltration. Die Stadien G3 und G4 sind als hochgradig maligne einzustufen (Otto und Remmele, 1996).

Die sporadischen Tumore waren Adenokarzinome vom tubulären, tubulovillösen und muzinösen Typ. Bei den Tumoren der FAP-Patienten handelte es sich hauptsächlich um polypoide Neubildungen, die als tubuläre und tubulovillöse Adenome eingestuft wurden. Insgesamt waren diese Tumore weniger stark entdifferenziert. Die Grade der Differenzierung reichten von G1 bis G3. Die Schleimhautproben von FAP-Patienten wiesen zusätzlich häufig hyperplastische (H) und dysplastische (D) Veränderungen einzelner Krypten auf. Sie wurden in die Auswertung einbezogen (Abb. 4-1 f-i).

4.2.2 Histologischer Score zur Beurteilung des Entzündungsgrades bei CED

Für die Evaluierung der Expressionsmuster ausgewählter Proteine in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad bei CED, wurde der Schweregrad der Entzündung anhand histomorphologischer Befunde eingestuft. Der Score wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Geboes und Dalle (2002) und Kruschewski et al. (2001) entwickelt.

Die gewählten Parameter widerspiegeln wichtige, charakteristische Veränderungen der Darmwand in Abhängigkeit von Zeit, Verlauf und Schwere der Entzündung. Im Stadium der akuten Exazerbation, dem schwersten Entzündungsgrad (Abb. 4-2 c) kommt es zu Veränderungen in der Tunica mucosa und Tela submucosa, die luminale Oberfläche verliert ihre Integrität. Es entstehen Erosionen von oberflächlichen Blutungen bis hin zu tiefen Ulzerationen, Fibrin- und Eiterablagerungen. Die Kryptenarchitektur ist deutlich verändert. Die Krypten fehlen teilweise, sind irregulär und entrundet. Die Zahl der Becherzellen ist stark gesenkt. In der Lamina propria findet sich ein starkes lymphoplasmazytäres Infiltrat mit einem überproportional erhöhten Anteil an Granulozyten. Die entzündlichen Veränderungen setzen sich bis in die Epithelzellige fort und manifestieren sich dort als Kryptitis bis hin zum Kryptenabszess. Während der gesamten akuten Phase weisen Mukosa und Submukosa Ödeme und verschiedentlich Einblutungen auf. Im Verlauf der Remission kommt es zur Wiederherstellung der Schleimhautintegrität mit Neubildung eines epithelialen Narbengewebes. Die Kryptenarchitektur erscheint verändert, die Krypten werden wieder dichter, ihre Gestalt ist jedoch nach wie vor unregelmäßig. Auch in symptomfreien Stadien erscheint die Schleimhaut morphologisch auffällig. Diese Befunde wurden im Score berücksichtigt.

Der Entzündungsgrad wurde anhand streng morphologischer Kriterien bestimmt (Tab. 4-1). Auf eine zusätzliche Einteilung in akute oder chronische Verlaufsformen wurde verzichtet.

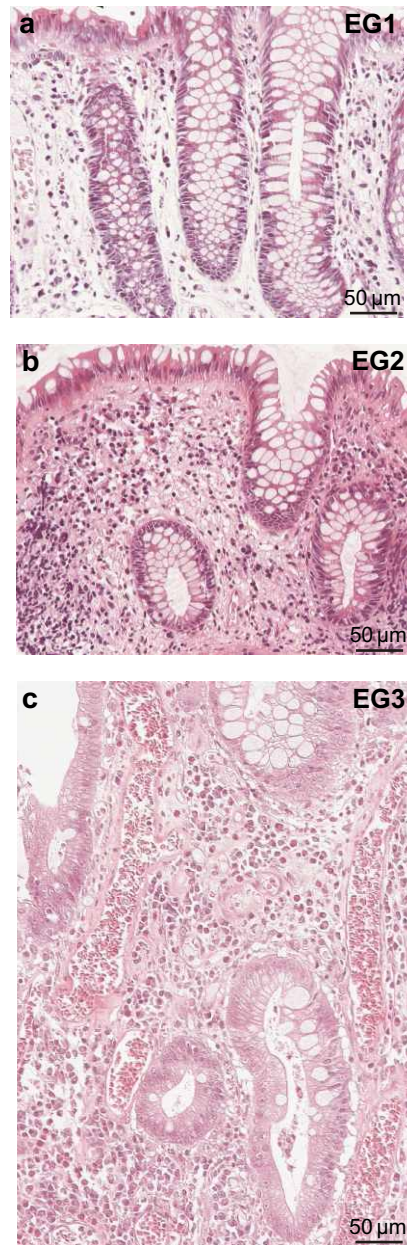


Abb. 4-2: Dickdarm, human, Entzündungsgrade CU, H&E-Färbung; **a** EG1, **b** EG2, **c** EG3

Je nach Schweregrad und Wichtigkeit der entzündlichen Veränderung wurden Punktzahlen vergeben, deren Summation ein Grading von 0-3 ermöglichte. Es wurden maximal 18 Punkte vergeben.

Tab. 4-1: Histologischer Entzündungs-Score, CED

Parameter	Bewertung
Schleimhautintegrität	0 intakt 2 Erosionen 4 floride Ulzerationen
Kryptenarchitektur	0 intakt 1 irregulär 2 deutlich gestört
Becherzellverlust	0 ohne 1 mäßig 2 stark
lymphoplasmazytäres Infiltrat in der Lamina propria	0 normal 1 mäßig 2 stark
Granulozyten in der Lamina propria	0 normal 1 mäßig 2 stark
Entzündliches Infiltrat in den Krypten	1 im Oberflächenepithel 2 Kryptitis 3 Kryptenabszesse
Ödem der Mukosa / Submukosa	1 vorhanden
Fibrose	1 vorhanden
Granulome	1 vorhanden

Die Entzündungsgrade (EG) wurden wie folgt eingeteilt:

- 0-1 Punkte: keine Entzündung,
 2-6 Punkte: leichtgradige Entzündung EG1,
 7-12 Punkte: mittelgradig schwere Entzündung EG2,
 13-18 Punkte: hochgradige Entzündung EG3.

In Abbildung 4-2 a-c sind die drei Entzündungsgrade beispielhaft dargestellt.

4.2.3 Immunhistochemie: deskriptive und semiquantitative Auswertung

In diesem Abschnitt des Ergebnisteils sind Befunde zur Verteilung der 15-LOX-1, 15-LOX-2, COX-1, COX-2, iNOS und GI-GPx ausgewiesen. Befunde histologisch intakter Gewebeproben (N) von Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren wurden mit denen

von sporadischen (ST) und hereditären (FAP) kolorektalen Tumoren in den einzelnen Differenzierungsgraden (D, H, G1-G4) und denen von CED mit unterschiedlichen Graden der Entzündung (EG1-EG3) verglichen.

In den Boxplots, die die IR in der Lamina epithelialis darstellen, ist für die Entdifferenzierungsgrade G2-G4 z.T. nur eine Box im 3. Kryptenviertel aufgetragen. Diese Darstellung wurde gewählt, wenn im Gewebe keine Orientierung nach basal und luminal mehr möglich war und deshalb ein Durchschnittswert für die gesamte Lamina epithelialis gebildet wurde. Die Befunde für Kolon- und Rektumgewebe wurden im folgenden gemeinsam dargestellt. Wenn Abweichungen in der Immunreaktivität zwischen beiden Darmabschnitten auftraten, wurden diese extra ausgewiesen.

4.2.3.1 15-LOX-1

4.2.3.1.1 Morphologisch intaktes kolorektales Gewebe

In morphologisch intaktem Dickdarmgewebe zeigten ausschließlich mobile Zellen der Lamina propria eine diffuse und auch z. T. strukturgebundene 15-LOX-1 IR im Zytoplasma. Bei diesen Zellen handelte es sich, wie Doppelmarkierungen belegen konnten, um Eosinophile. Das Enzym war dagegen nicht in Makrophagen nachweisbar (persönliche Mitteilung Dr. Gräbner). Die Anzahl der 15-LOX-1 positiven Zellen war insgesamt gering, sie verteilten sich über die gesamte Lamina propria (Abb. 4-4, 4-5 a, a1). Positiv stellten sich ebenfalls Zellen des Plexus myentericus dar (Abb. 4-5 b). Vereinzelt wurde 15-LOX-1 positives Zell-Infiltrat im Muskel in der Nähe des Plexus myentericus nachgewiesen.

4.2.3.1.2 Sporadische kolorektale Tumore

Kolorektale Tumore nicht geklärter Genese zeigten im Vergleich zu morphologisch intaktem Gewebe ein signifikant verstärktes Vorkommen von 15-LOX-1 positiven mobilen Zellen in der Lamina propria. Die stärkste 15-LOX-1 IR war im Stadium G1 nachweisbar. Mit fortschreitender Entdifferenzierung nahm die Zahl der positiven Zellen wieder ab (Abb. 4-4, 4-5 c-e). Die immunreaktiven Zellen im Tumorstroma waren zum Teil größer und intensiver gefärbt. Positive Zellen fanden sich in der gesamten Lamina propria, überwiegend jedoch in der Nähe der Lamina muscularis mucosae. Im Epithel konnte auch im Verlauf der Entdifferenzierung keine 15-LOX-1 IR detektiert werden.

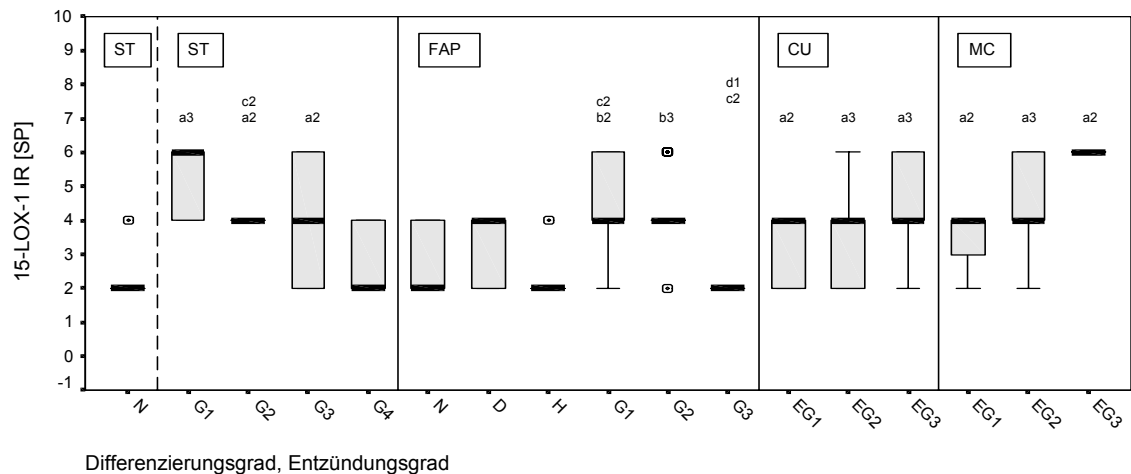


Abb. 4-4: 15-LOX-1 IR, Kolorektum, human; Lamina propria; mobile Zellen, Zytoplasma; morphologisch intaktes Gewebe; Differenzierungsgrade ST, FAP; Entzündungsgrade CU, MC; **a** signifikant verschieden von N-ST, **b** signifikant verschieden von N-FAP, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungs- bzw. Entzündungsgrad; **d** signifikant verschieden von ST mit gleichem Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

4.2.3.1.3 Rektumgewebe von FAP-Patienten

Morphologisch intakte Schleimhaut von FAP-Patienten zeigte im Vergleich zu der von Patienten mit sporadischen Tumoren eine leicht verstärkte Infiltration mit 15-LOX-1 positiven Zellen in der Lamina propria. In den Polypen war mit zunehmendem Entdifferenzierungsgrad ein signifikant verstärktes Auftreten von 15-LOX-1 positiven Eosinophilen im Stroma zu beobachten. Die stärkste IR trat im Grad G1 und G2 auf (Abb. 4-4, 4-5 f-h). Positive Zellen waren über das gesamte Polypenstroma verteilt, mit einem leichtem Übergewicht in der basalen Lamina propria.

4.2.3.1.4 Kolorektales Gewebe von CED-Patienten

Sowohl bei CU als auch bei MC nahm die Anzahl der 15-LOX-1 positiven mobilen Zellen in der Lamina propria und auch der Tela submucosa mit Zunahme der Entzündung von Grad 1 nach 3 zu. Auch bei CED trat 15-LOX-1 in Eosinophilen auf (Abb. 4-4, 4-5 i-k). Vereinzelt 15-LOX-1 positive Zellen in den Krypten im Entzündungsgrad 3 waren nicht epithelialen Ursprungs sondern stellten ein Zell-Infiltrat dar (Abb. 4-5 l, l1).

4.2.3.2 15-LOX-2

4.2.3.2.1 Morphologisch intaktes kolorektales Gewebe

In einigen wenigen Epithelzellen des Dickdarms war eine IR gegen 15-LOX-2 in den beiden untersten Kryptenvierteln einzelner Krypten nachzuweisen. In diesen Zellen markierten sich feinste ringförmige Membranstrukturen im Zytoplasma direkt unterhalb der luminalen

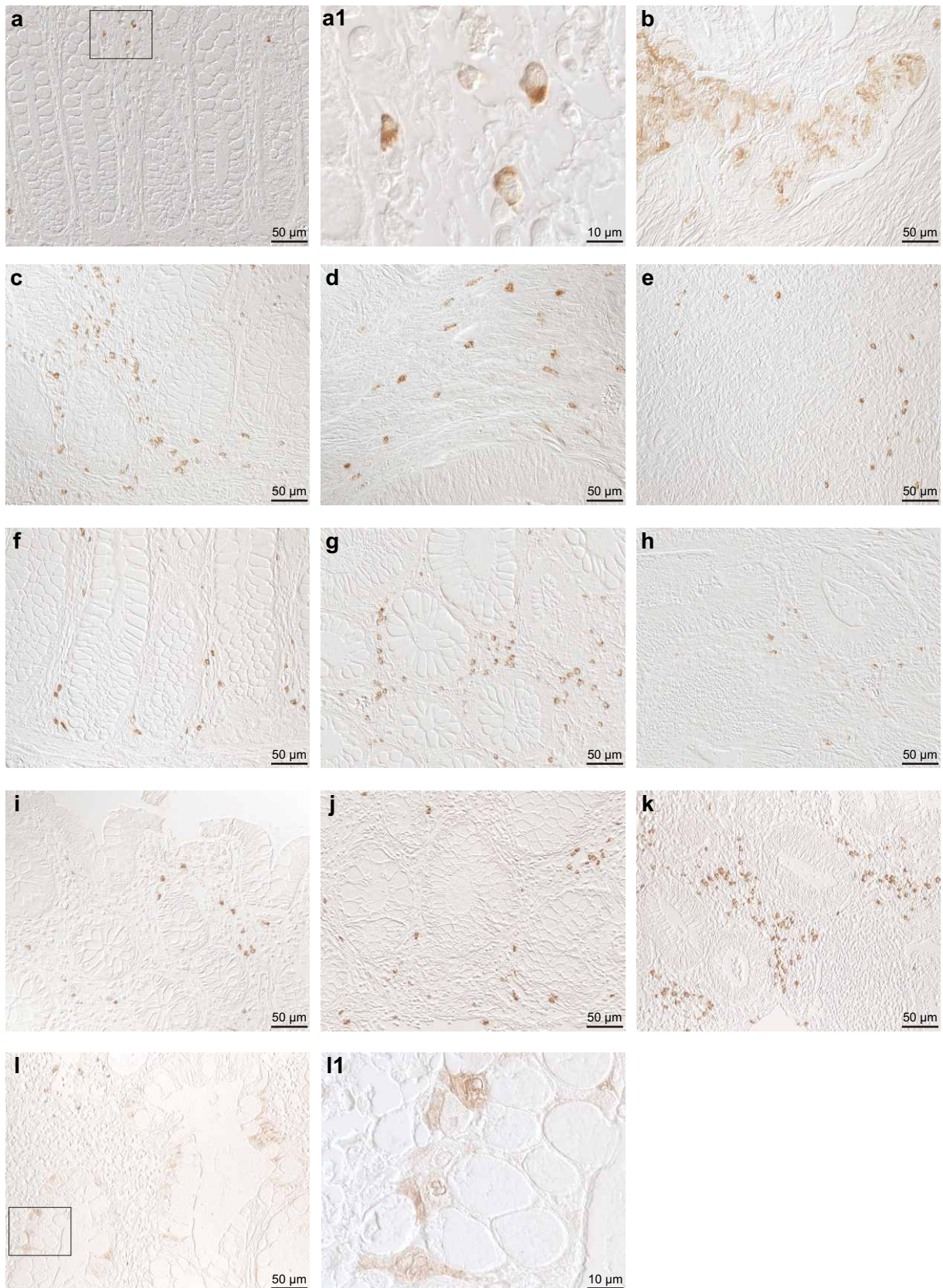


Abb. 4-5: **15-LOX-1 IR**, Dickdarm, human;
a-b morphologisch intakt: **a, a1** Lamina propria, mobile Zellen, **b** Plexus myentericus;
c-e Differenzierungsgrade ST: **c** G1, **d** G3, **e** G4;
f-h Differenzierungsgrade FAP: **f** morphologisch intakt, **g** G1/G2, **h** G3;
i-l1 Entzündungsgrade CU: **i** EG1, **j** EG2, **k-l1** EG3;
i-k Lamina propria; **l, l1** Lamina epithelialis, Zell-Infiltrat

Plasmamembran. In den oberen beiden Kryptenvierteln waren nur selten 15-LOX-2 positive Zellen zu beobachten (Abb. 4-6 A, B; 4-7 b, b1). Im Zytoplasma mobiler und fixer Zellen in der Lamina propria markierten sich ringförmige Strukturen, die wiederum zusammengelagert erschienen, auch eine diffus zytoplasmatische IR trat auf (Abb. 4-7 a-a2; 4-8). Vereinzelt waren 15-LOX-2 positive Zellen in der Tela submucosa detektierbar. Dort markierten sich auch Zellen in der Muskelschicht einzelner Gefäße (Abb. 4-7 c, c1).

4.2.3.2.2 Sporadische kolorektale Tumore

Vereinzelt zeigten hyperplastische Krypten eine starke strukturgebundene 15-LOX-2 IR in den unteren Kryptenvierteln (Abb. 4-7 d, d1). Im Grad G1 war eine leichte Zunahme von 15-LOX-2 positiven Strukturen in den unteren zwei Kryptenvierteln einiger weniger Krypten nachweisbar (Abb. 4-6 A; 4-7 f, f1). Vereinzelt konnte in Epithelzellen im 2. Kryptenviertel zusätzlich eine schwache, diffus zytoplasmatische 15-LOX-2 IR apikal vom Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 4-6 B; 4-7 e, e1). Ab G2 nahm die IR im Epithel ab und verlor sich nach G4 (Abb 4-6 A, B; 4-7 h).

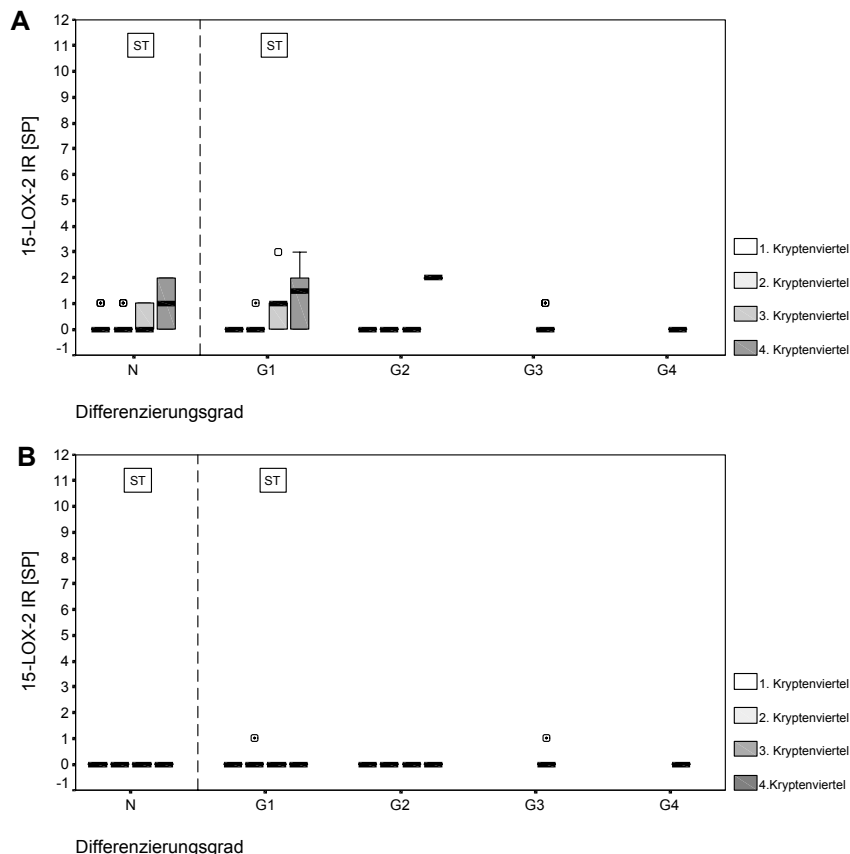


Abb. 4-6: 15-LOX-2 IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; Zytoplasma, **A** strukturgebunden, **B** diffus; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade ST

Im Tumorstroma markierten sich fokal gehäuft mobile und auch fixe Zellen. Die Art und Weise der Markierung war vielgestaltig. Die IR erschien zum Teil granulär oder diffus im

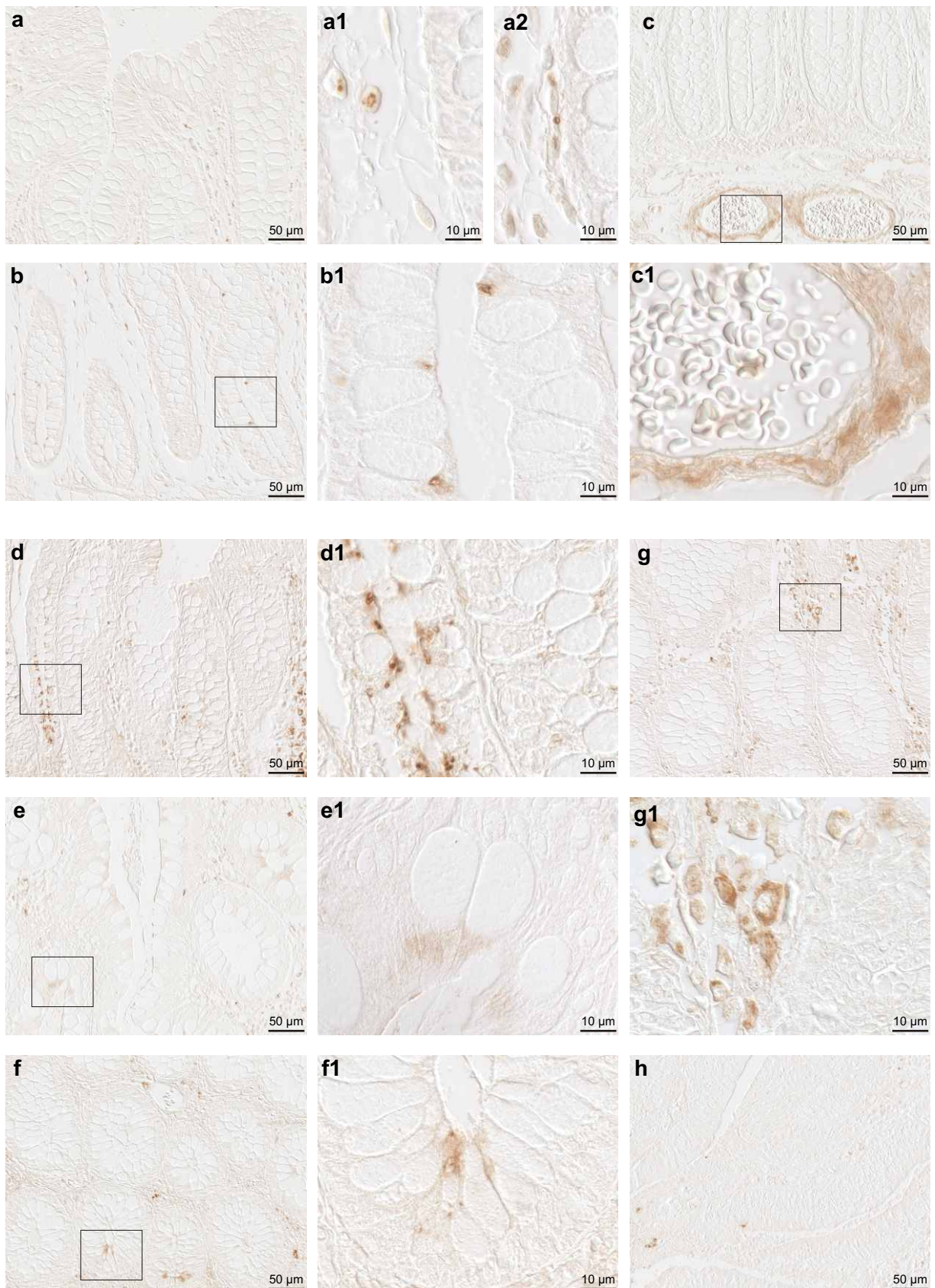


Abb. 4-7: **15-LOX-2 IR**, Dickdarm, human, N und ST;
a-c1 N: **a** 1.,2. Kryptenviertel, Lamina propria, **b** 3., 4. Kryptenviertel, **c** Tela submucosa, Gefäße;
d-h ST: **d** Hyperplasie, **e** G1, 1. 2. Kryptenviertel, **f** G1, 3., 4. Kryptenviertel, **g** G1, Lamina propria, **h** G3

gesamten Zytoplasma verteilt. Es färbten sich einzelne oder mehrere zusammengelagerte Ringstrukturen pro Zelle. Die Anzahl 15-LOX-2 positiver Stromazellen war im Tumorgewebe im Stadium G1 und G2 am höchsten und nahm über G3 nach G4 wieder ab (Abb. 4-7 g, g1; 4-8).

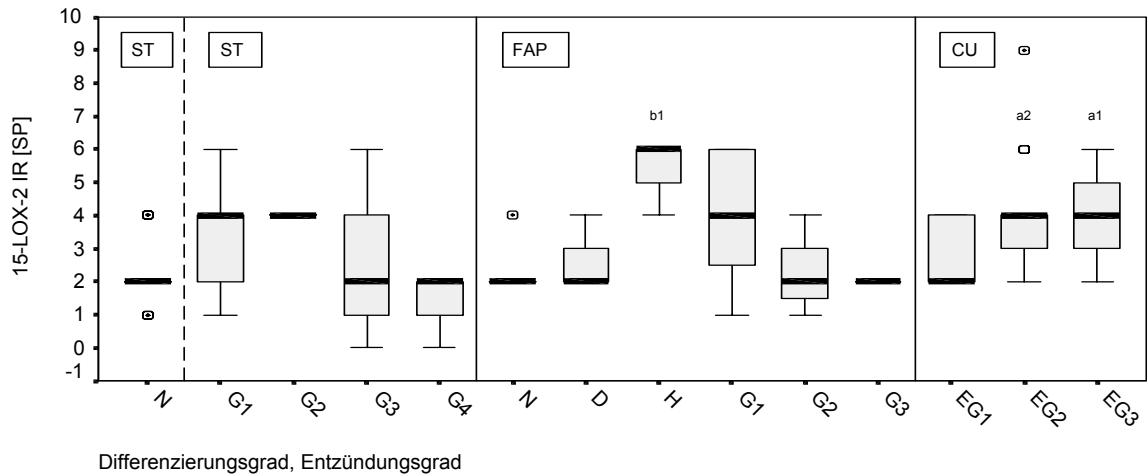


Abb. 4-8: 15-LOX-2 IR, Kolorektum, human; Lamina propria; fixe und mobile Zellen, Zytoplasma; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade ST, FAP; Entzündungsgrade CU; **a** signifikant verschieden von N-ST, **b** signifikant verschieden von N-FAP (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$)

4.2.3.2.3 Rektumgewebe von FAP-Patienten

Morphologisch intakte Krypten zeigten äußerst selten in einzelnen lumennahen Zellen und in Zellen am Kryptengrund eine diffuse, z. T. auch leicht strukturebundene IR im Zytoplasma apikal vom Zellkern (Abb. 4-9 A, B; 4-10 a-b1).

Im Stadium der Hyperplasie und noch stärker im Stadium G1 war die intensivste 15-LOX-2 IR nachweisbar. Sie war besonders deutlich in den oberen beiden Kryptenvierteln ausgeprägt und überwiegend diffus im Zytoplasma verteilt. Z. T. trat sie auch membrangebunden auf. Die unteren beiden Kryptenviertel wiesen in diesem Stadium eine sehr viel schwächere 15-LOX-2 IR auf (Abb. 4-9 A, B; 4-10 c-e1). Mit zunehmender Entdifferenzierung verlor sich die IR im Epithel vollständig (Abb. 4-9 A, B; 4-10 f-g).

Auch im Tumorstroma traten 15-LOX-2 positive Zellen im Stadium der Hyperplasie und im Stadium G1 am häufigsten auf (Abb. 4-8; 4-10 c-d1).

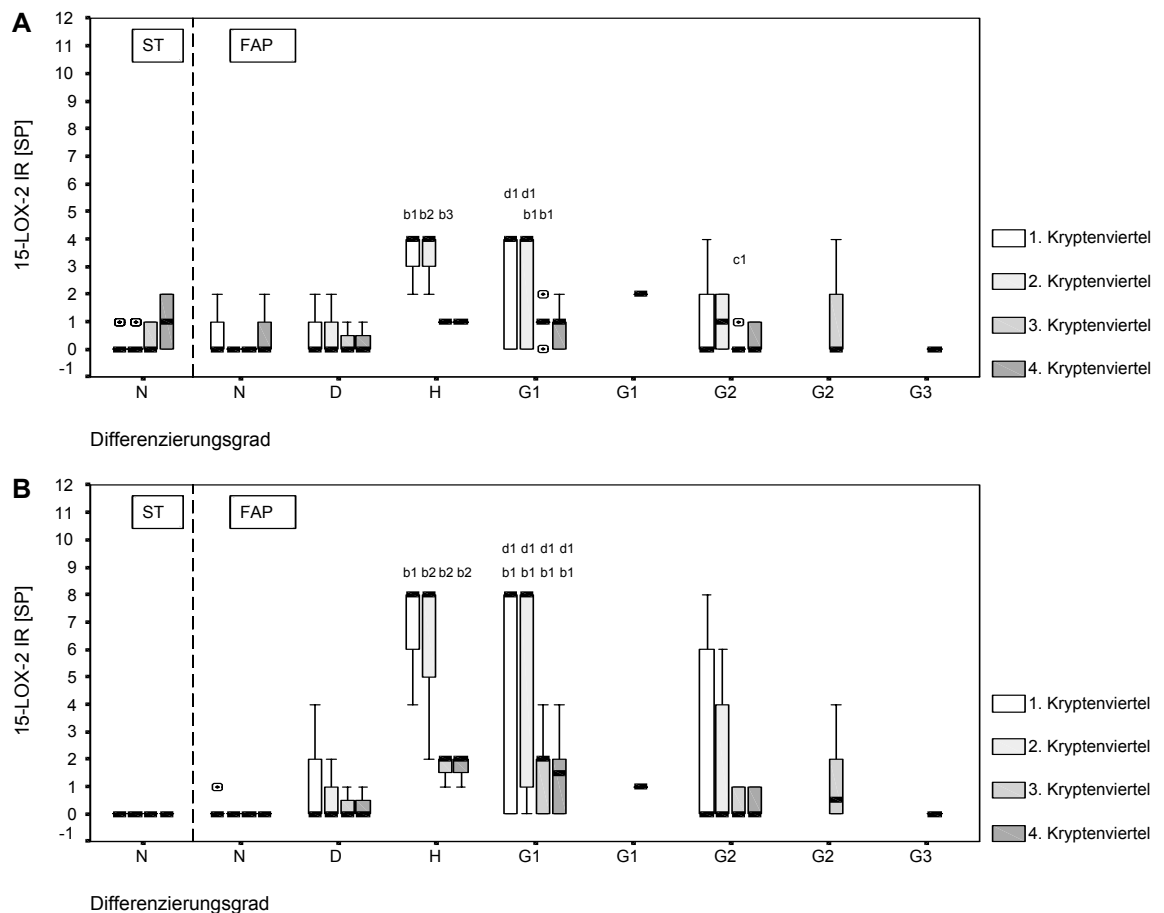


Abb. 4-9: 15-LOX-2 IR, Kolorektum/Rektum, human; Lamina epithelialis; Zytoplasma, **A** strukturegebunden, **B** diffus; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade FAP; **b** signifikant verschieden von N-FAP, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungsgrad; **d** signifikant verschieden von ST mit gleichem Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

4.2.3.2.4 Kolorektales Gewebe von CED-Patienten

In Dickdarmproben von Patienten mit CU war im Entzündungsstadium 1 keine 15-LOX-2 IR nachweisbar. Ab Stadium 2 war eine leichte Zunahme der IR in Einzelzellen am Kryptengrund und in weiter luminal gelegenen Kryptenabschnitten demonstrierbar. Sie trat apikal vom Zellkern auf und war vorwiegend ringförmig strukturegebunden (Abb. 4-11 A, B; 4-12 a-a2). Eine weitere Verstärkung der 15-LOX-2 IR trat im Stadium 3 auf. Sowohl die strukturegebundene als auch die diffuse IR im Zytoplasma trat häufiger und mit gesteigerter Intensität auf und breitete sich in einzelnen Krypten weiter in Richtung Lumen aus (Abb. 4-11 A, B; 4-12 b-b2). Vergleichende Untersuchungen von Kolon- und Rektumproben belegten, dass die 15-LOX-2 IR im Kolon tendenziell stärker ausgeprägt war, als im Rektum.

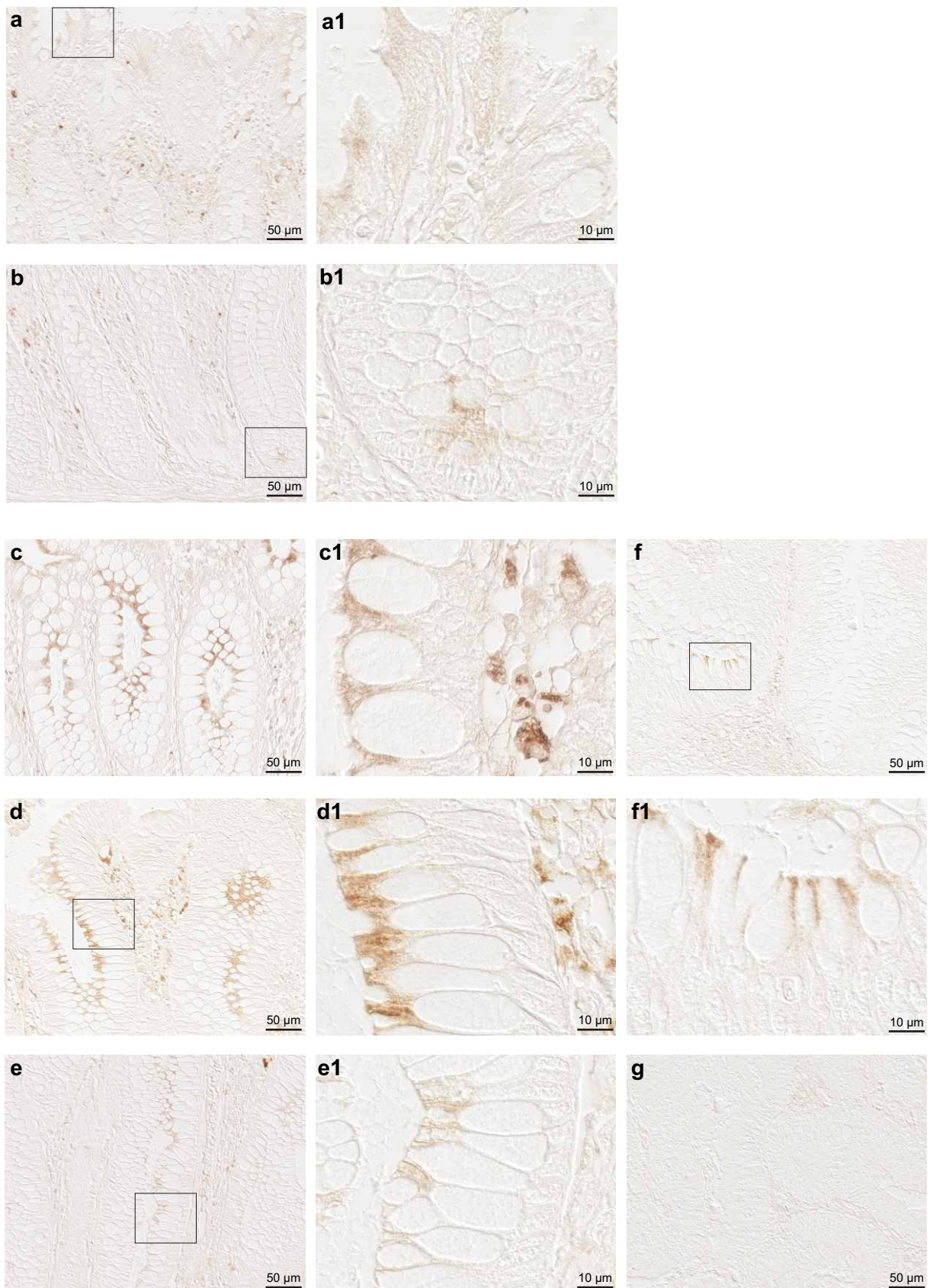


Abb. 4-10: **15-LOX-2 IR**, Dickdarm, human, FAP;
a-b1 N: **a** 1.,2. Kryptenviertel, **b** 3., 4. Kryptenviertel;
c-g Differenzierungsgrade: **c** Hyperplasie, 1., 2. Kryptenviertel,
d G1, 1.,2. Kryptenviertel, **e** G1, 3., 4. Kryptenviertel, **f** G2, **g** G3

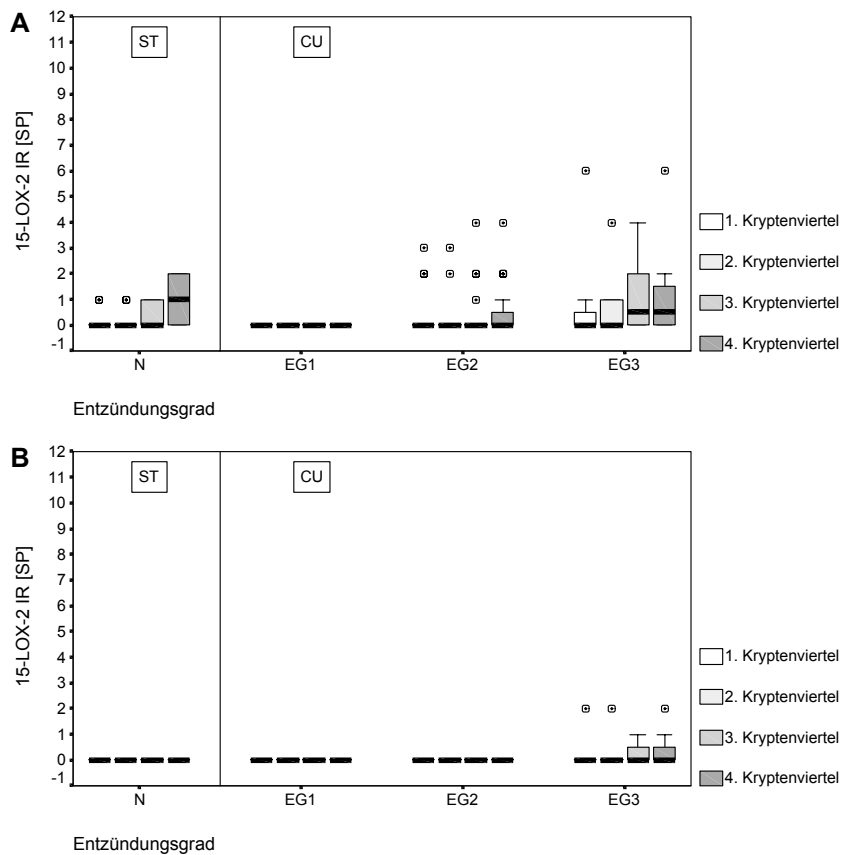


Abb. 4-11: 15-LOX-2 IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; Zytoplasma, **A** strukturgebunden, **B** diffus; morphologisch intaktes Gewebe, Entzündungsgrade CU

In den Zellen der Lamina propria war mit zunehmendem Entzündungsgrad eine signifikant verstärkte Anzahl 15-LOX-2 positiver Zellen nachweisbar (Abb. 4-8; 4-12 a, b-b2).

4.2.3.3 COX-1

4.2.3.3.1 Morphologisch intaktes kolorektales Gewebe

COX-1 positive Zellen fanden sich selten in einzelnen Krypten, vorrangig in den unteren drei Kryptenvierteln (Abb. 4-13 A; 4-14 a, b-b2). Bei diesen Zellen könnte es sich sowohl um Zellen epithelialen Ursprungs, als auch um Zell-Infiltrate handeln. Gehäuft trat diese IR in direkter Nähe von Lymphfollikeln auf (Abb. 4-14 c, c1). In der Lamina propria ließen sich COX-1 positive Strukturen im Zytoplasma vereinzelter Fibrozyten und Myofibroblasten nachweisen. Die Lamina propria war schwach mit COX-1 positiven mobilen Zellen infiltriert (Abb. 4-14 a-a2; 4-15). Am konstantesten war eine starke COX-1 IR in der Lamina muscularis mucosae und der Tunica muscularis nachweisbar (Abb. 4-14 b, b1, e, e1).

Positive Endothelzellen wurden in einzelnen Gefäßen der Tela submucosa nachgewiesen. Seltener stellten sich Gefäße der Tunica mucosa positiv dar (Abb. 4-14 a2, d, d1).

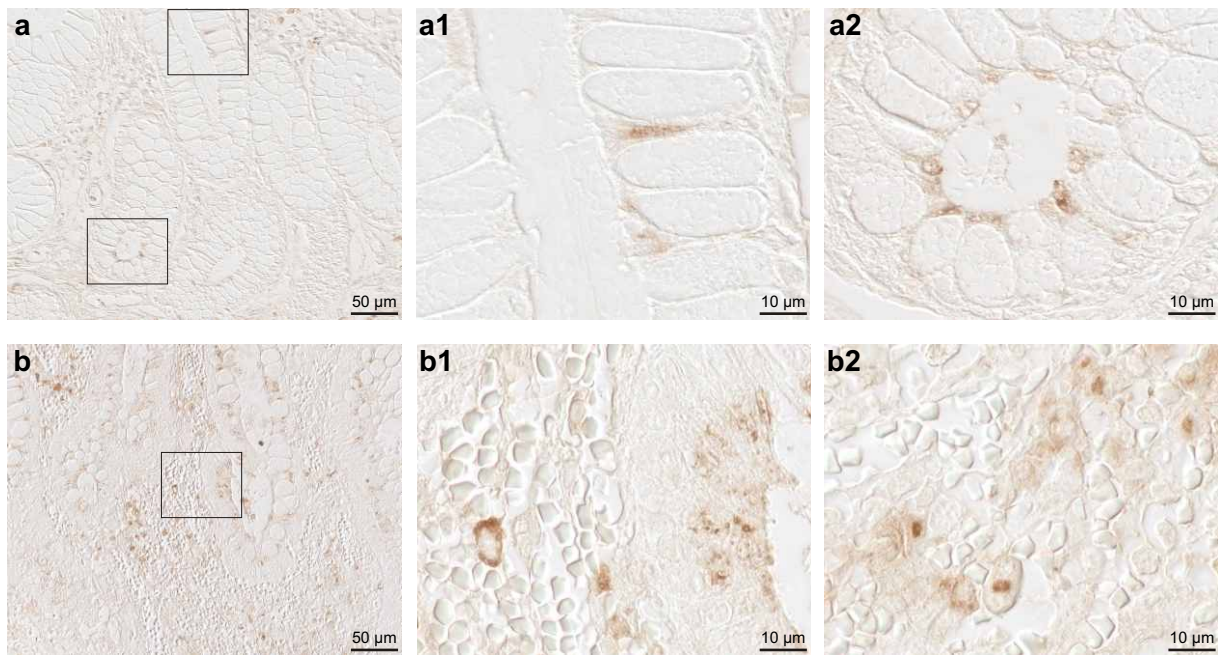


Abb. 4-12: **15-LOX-2 IR**, Dickdarm, human, CU;
a EG2, 2.-4. Kryptenviertel;
b EG3, **b1** 2.-4. Kryptenviertel, **b2** Lamina propria

In allen positiven Zellen markierten sich feinste membranartig zusammengelagerte Strukturen, die den Kern umgaben oder auch im Zytoplasma verteilt lagen.

4.2.3.3.2 Sporadische kolorektale Tumore

Im Stadium G1 war die Anzahl der typischen COX-1 positiven Zellen in einzelnen Kryptengründen geringfügig erhöht. Ab Stadium G2 traten diese Zellen nur noch sporadisch in einzelnen Tumorkrypten auf (Abb. 4-13 A; 4-16 b, b1).

Selten konnte in einzelnen dysplastischen Krypten im Stadium G1 und G3 zusätzlich eine schwache strukturgebundene COX-1 IR apikal vom Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 13 B; 4-16 c, c1). Diese Muster sind vergleichbar mit denen der COX-2 pc IR.

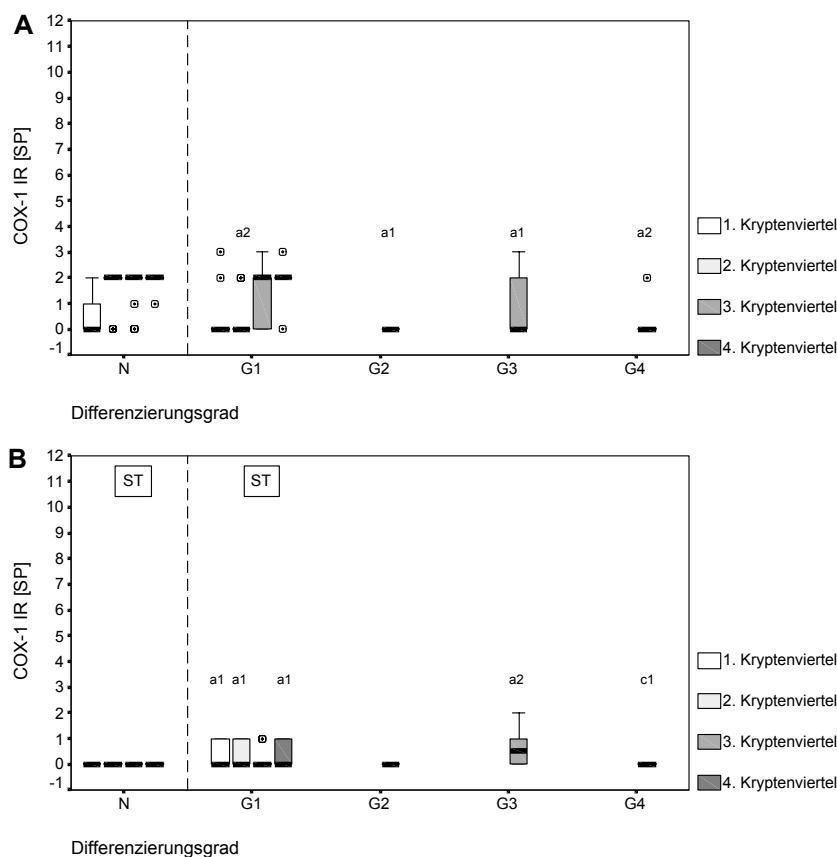


Abb. 4-13: COX-1 IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; **A** perinukleär, **B** strukturgebunden apikal vom Zellkern; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade ST; **a** signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$)

Im Stadium G1 und 3 fanden sich gehäuft COX-1 positive Zellen im Randbereich des Tumorstromas (Abb. 4-15; 4-16 a, a1, d, d1).

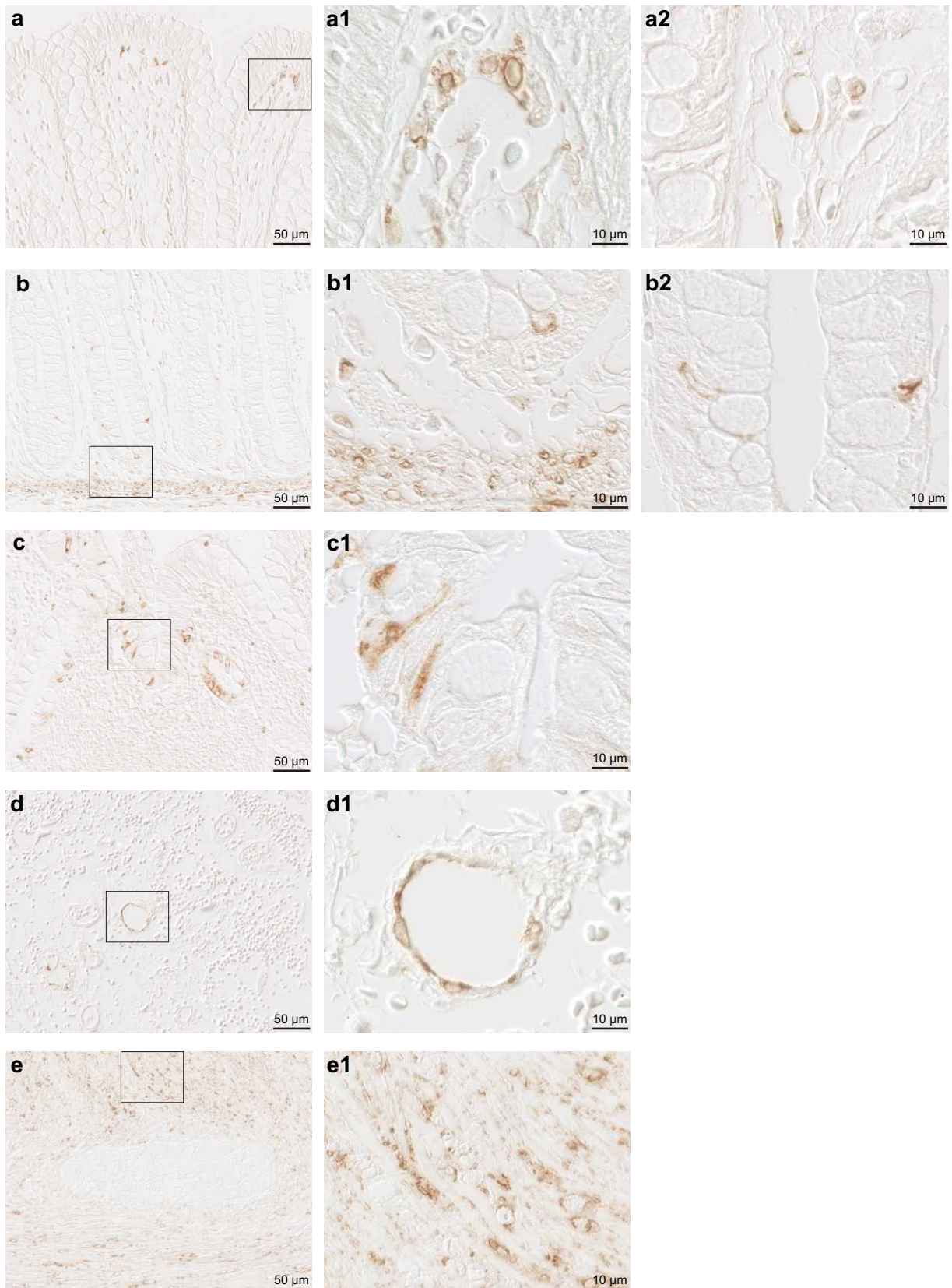


Abb. 4-14: **COX-1 IR**, Dickdarm, human, morphologisch intaktes Gewebe;
a 1., 2. Kryptenviertel, Lamina propria, **a1** mobile und fixe Zellen, **a2** Endothel;
b 3., 4. Kryptenviertel, **b1** Lamina muscularis mucosae, **b2** Lamina epithelialis;
c Lymphfollikel, Lamina epithelialis; **d** Tela submucosa, Endothel; **e** Tunica muscularis

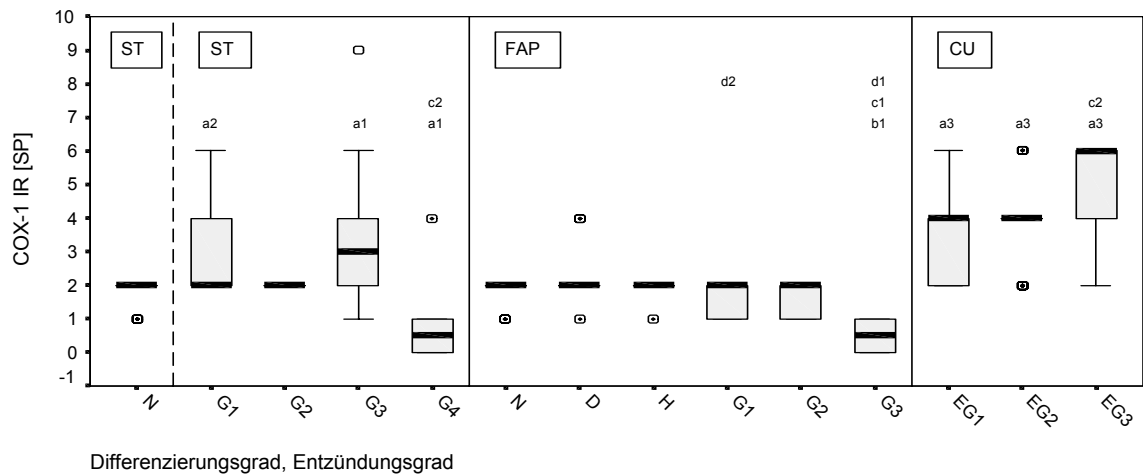


Abb. 4-15: COX-1 IR, Kolorektum, human; Lamina propria; mobile und fixe Zellen, Zytoplasma; morphologisch intaktes Gewebe; Differenzierungsgrade ST, FAP; Entzündungsgrade CU; **a** signifikant verschieden von N-ST, **b** signifikant verschieden von N-FAP, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungs- bzw. Entzündungsgrad; **d** signifikant verschieden von ST mit gleichem Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

4.2.3.3.3 Rektumgewebe von FAP-Patienten

Die COX-1 IR in morphologisch intaktem Gewebe von FAP-Patienten unterschied sich kaum vom Normalbefund. Nur in wenigen Proben waren, zusätzlich zur perinukleären COX-1 IR, immunreaktive Strukturen apikal über dem Zellkern im Saumepithel der Krypten nachweisbar (Abb. 4-17 A, B; 4-18 a-c1).

In frühen dysplastischen Veränderungen und in Einzelkrypten im Stadium G1 und G2 war eine leichte Häufung der perinukleär COX-1 positiven Kryptenzellen in mehr basaler Lokalisation demonstrierbar (Abb. 4-17 A, 4-18 d-e1).

In allen Stadien außer G3 konnte in Einzelkrypten zusätzlich eine schwache strukturgebundene IR apikal vom Zellkern nachgewiesen werden (Abb. 4-17 B, 4-18 f, f1).

Die COX-1 IR in den Stromazellen veränderte sich im Verlauf der Entdifferenzierung kaum. Positive Zellen waren bevorzugt in der Nähe des Lumens lokalisiert (Abb. 4-15, 4-18 g, g1).

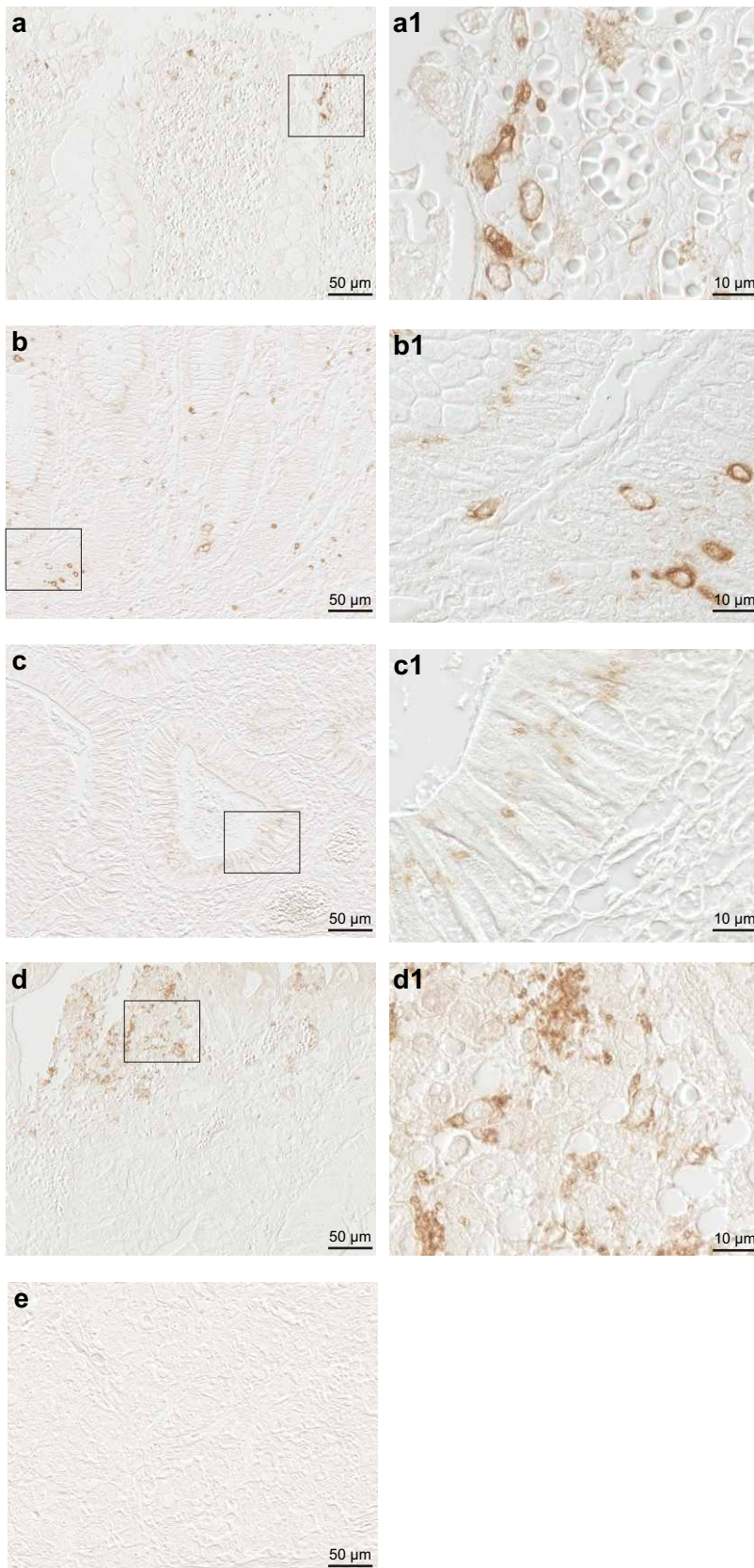


Abb. 4-16: **COX-1 IR**, Dickdarm, human, Differenzierungsgrade ST;
a G1, 1., 2. Kryptenviertel, Lamina propria;
b G1, 3., 4. Kryptenviertel, perinukleär und strukturgebunden apikal vom Zellkern;
c G3, Epithel, strukturgebunden apikal vom Zellkern;
d G3, Lamina propria, luminale Oberfläche, **e** G4

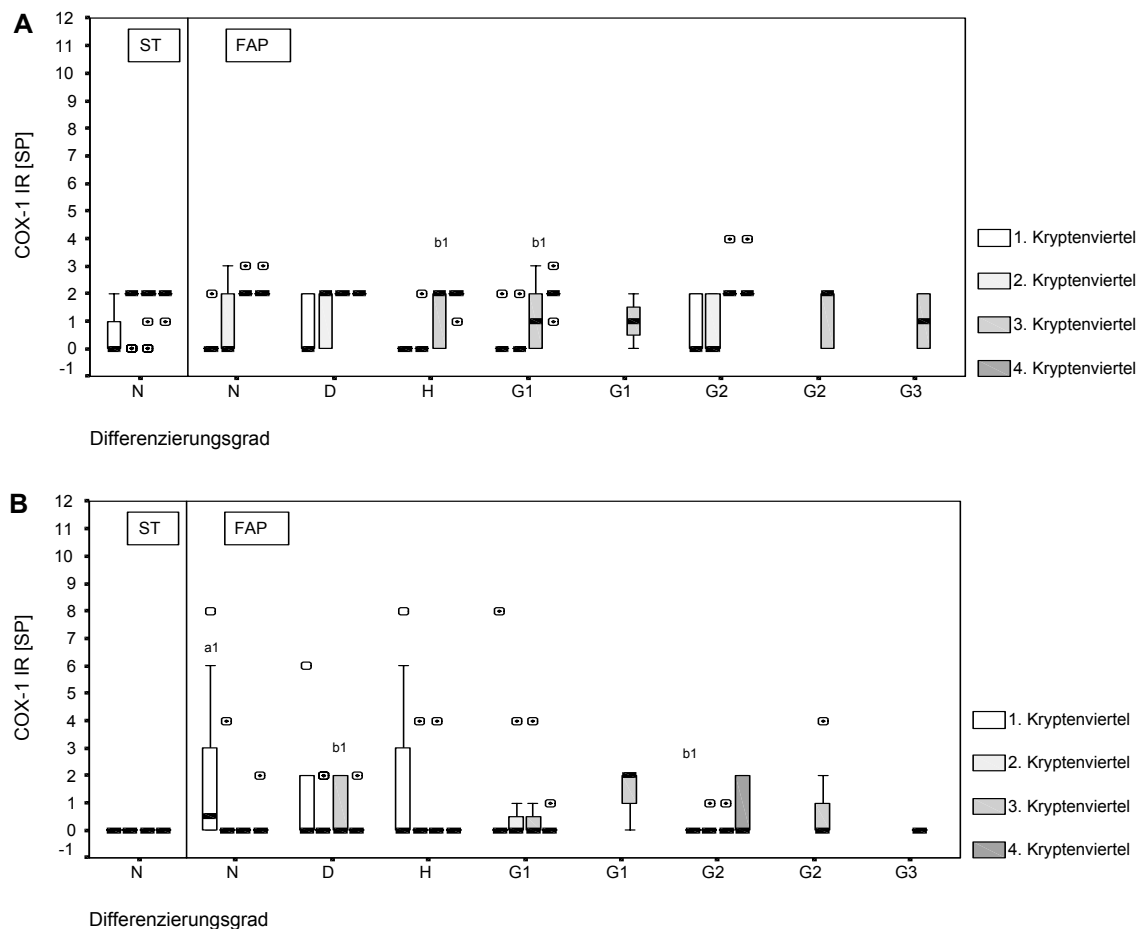


Abb. 4-17: COX-1 IR, Kolorektum/Rektum, human; Lamina epithelialis; **A** perinukleär, **B** strukturegebunden apikal vom Zellkern; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade FAP; **a** signifikant verschieden von N-ST, **b** signifikant verschieden von N-FAP (1 $p < 0,05$)

4.2.3.3.4 Kolorektales Gewebe von CED-Patienten

Die Anzahl der typischen, perinukleär COX-1 positiven Zellen in der Lamina epithelialis war in allen Entzündungsstadien bei CU vermindert (Abb. 4-19 A).

Vereinzelt zeigten Epithelzellen eine diffus granuläre IR im Zytoplasma, wie sie auch für die COX-2 pc detektiert wurde (Abb. 4-20 b3). Einige Proben aus dem Kolon mit Entzündungsgrad 2 und 3 wiesen in unterschiedlicher Lokalisation innerhalb der Krypten außerdem eine schwache COX-1 IR in Strukturen apikal vom Zellkern auf (Abb. 4-19 B, 4-20 d, d1).

In der Lamina propria der CU-Proben war eine signifikant verstärkte COX-1 IR im Vergleich zum Normalbefund nachweisbar. Sie war im Stadium 3 am stärksten ausgeprägt. Positive Zellen traten bevorzugt in der Nähe des Lumens auf (Abb. 4-15, 4-20 a-c1).

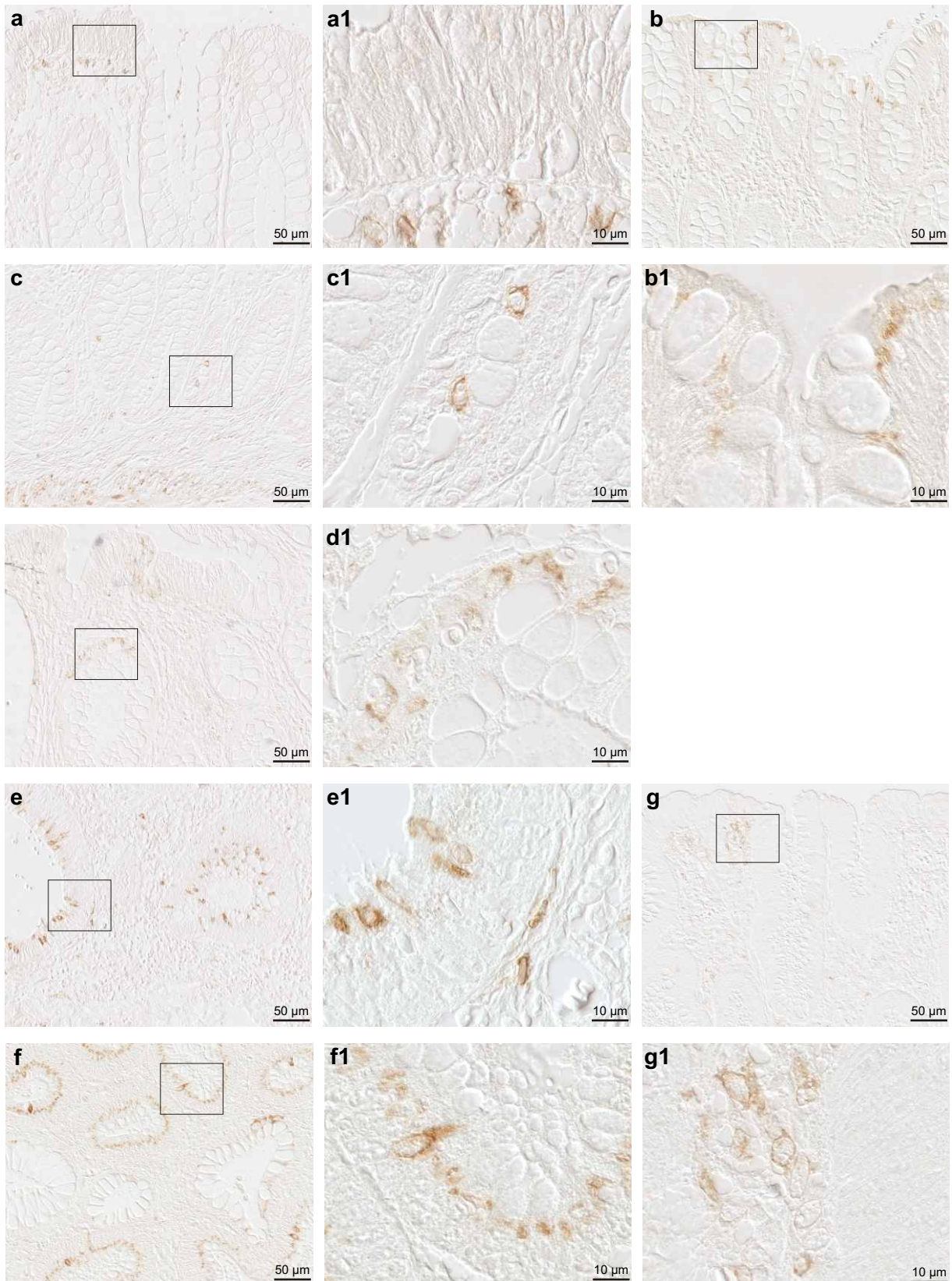


Abb. 4-18:

COX-1 IR, Dickdarm, human, Differenzierungsgrade FAP;

a-b1 morphologisch intaktes Gewebe: **a** 1., 2. Kryptenviertel, Lamina propria;

b 1., 2. Kryptenviertel, strukturgebunden apikal vom Zellkern;

c 3., 4. Kryptenviertel, perinukleär, Lamina muscularis mucosae;

d-g1 Differenzierungsgrade: **d** Dysplasie, 1., 2. Kryptenviertel, perinukleär;

e G2, Epithel, perinukleär; **f** G1/G2, Epithel, perinukleär und strukturgebunden apikal vom Zellkern;

g G2/G3, Lamina propria, luminale Oberfläche

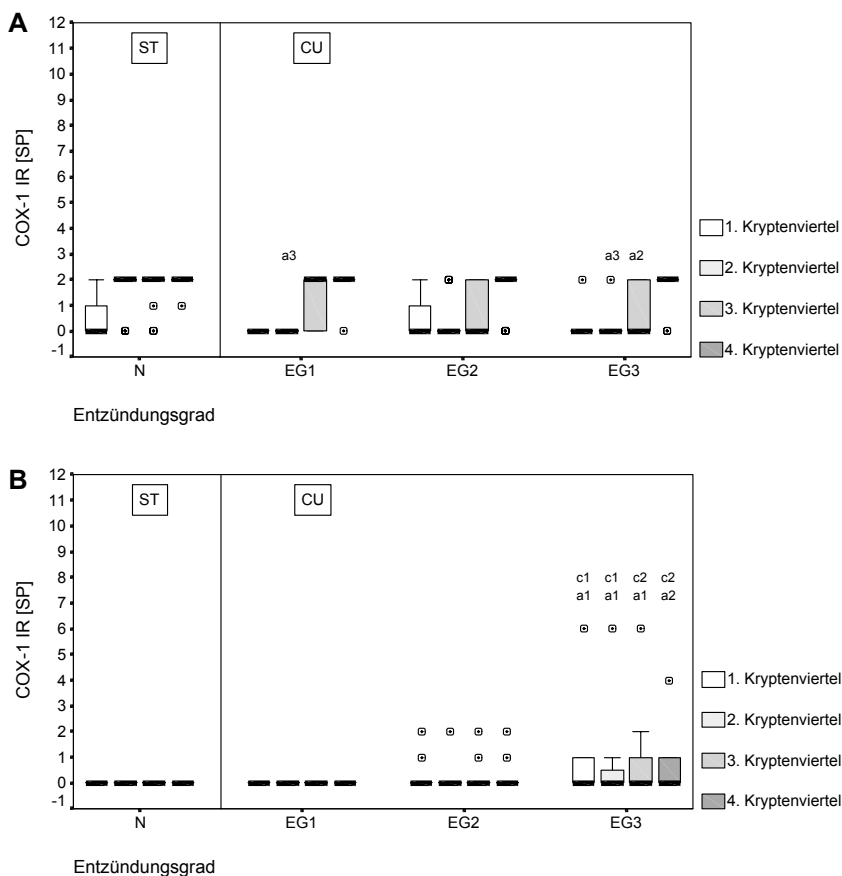


Abb. 4-19: COX-1 IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; **A** perinukleär; **B** strukturegebunden apikal vom Zellkern; morphologisch intaktes Gewebe, Entzündungsgrade CU; **a** signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Entzündungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

4.2.3.4 COX-2

In den nachfolgenden Abschnitten werden Ergebnisse über die zelluläre und intrazelluläre Verteilung der COX-2 beschrieben, die mit einem monoklonalen (mc) und einem polyclonalen (pc) COX-2-Antikörper erhoben wurden. Mehrere COX-2-Antikörper wurden verwendet, um Hinweise auf zusätzlich existierende Isoformen zu erhalten.

4.2.3.4.1 Morphologisch intaktes kolorektales Gewebe - COX-2 mc

In den Krypten morphologisch intakter kolorektaler Schleimhaut konnten nur vereinzelt COX-2 immunreaktive Zellen mit dem monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden. Sie waren bevorzugt in den unteren drei Kryptenvierteln lokalisiert (Abb. 4-21, 22 b-b2). Diese Zellen stellen möglicherweise Infiltrate dar. Auffällig war eine erhöhte Anzahl COX-2 immunreaktiver Zellen in den Krypten in unmittelbarer Nachbarschaft von Lymphfollikeln (Abb. 4-22 c, c1).

In der Lamina Propria waren sowohl fixe, als auch mobile Zellen immunreaktiv. Fibrozyten und Myofibroblasten färbten sich selten und nicht regelmäßig an. Die Infiltration mit COX-2

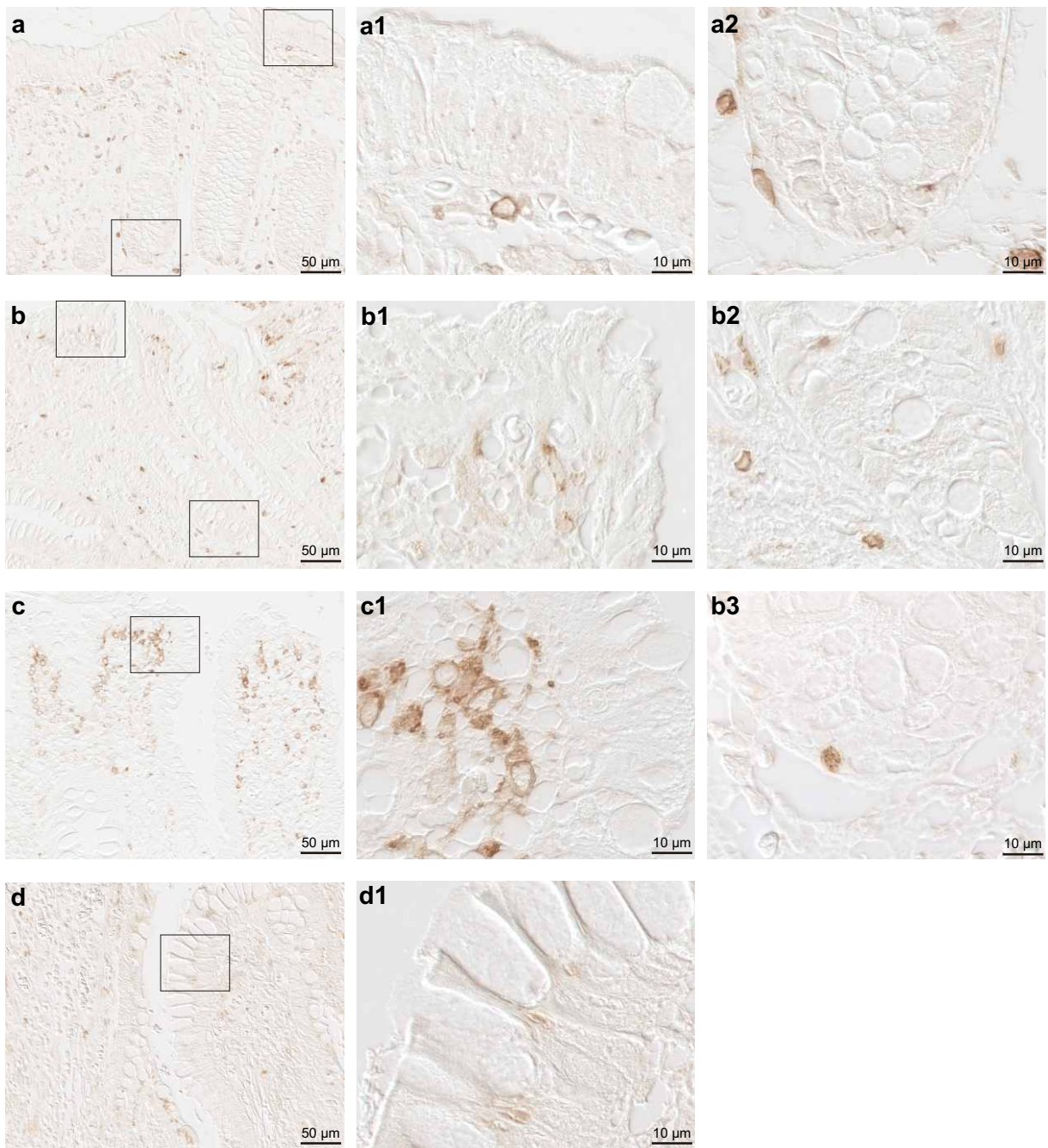


Abb. 4-20: **COX-1 IR**, Dickdarm, human, Entzündungsgrade CU;
a EG1, **b** EG2, **c**, **d** EG3
a1, **a2**, **b1**, **b2**, **c1** Lamina propria;
b3 4. Kryptenviertel, diffus granulär;
d, **d1** 1., 2. Kryptenviertel, strukturegebunden apikal vom Zellkern

positiven Zellen war insgesamt gering (Abb. 4-22 a-a2; 4-23). Subzellulär markierten sich in allen Zelltypen membranartige Strukturen im Zytoplasma, die dem Zellkern teilweise direkt aufgelagert waren, sich aber auch weiter ins Zytoplasma fortsetzten.

Der Hauptanteil der COX-2 immunreaktiven Zellen war in der Lamina muscularis mucosae und der Tunica muscularis lokalisiert. Der Plexus myentericus zeigte keine Färbung (Abb. 4-22 b, b1, e, e1). Außerdem ließ sich eine COX-2 IR in den Endothelzellen einzelner Gefäße in der Tela submucosa und der Lamina propria nachweisen (Abb. 4-22 d, d1).

4.2.3.4.2 Sporadische kolorektale Tumore - COX-2 mc

Kolorektale Adenokarzinome im Stadium G1 wiesen in einzelnen dysplastischen Krypten eine leichte Häufung typischer COX-2 positiver Zellen auf (Abb. 4-24 b, b1). Dieser Befund war im Kryptengrund in Arealen mit hoher Infiltrationsdichte COX-2 positiver Zellen ausgeprägt. Mit fortschreitender Entdifferenzierung verlor sich die COX-2 IR in den Krypten (Abb. 4-21, 4-24 c, d).

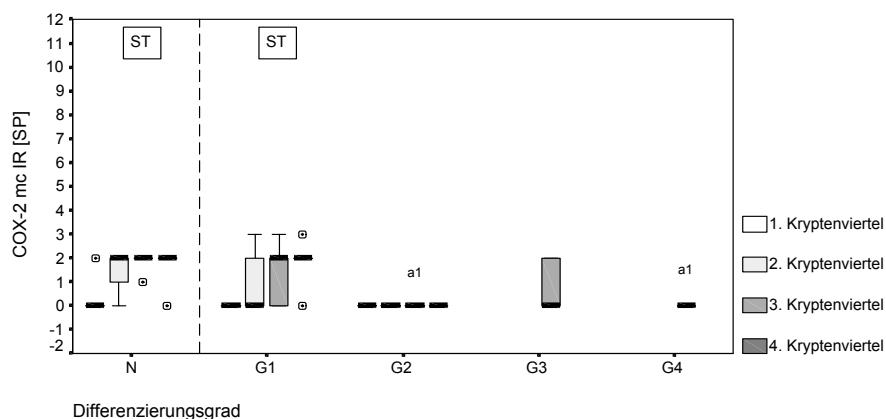


Abb. 4-21: COX-2 mc IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; perinukleär; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade ST; **a1** signifikant verschieden von N-ST ($p < 0,05$)

Dagegen traten im Verlauf der Entdifferenzierung signifikant häufiger COX-2 positive mobile und fixe Zellen im Randbereich des Tumorstromas auf (Abb. 4-23; 4-24 a, a1, c, c1).

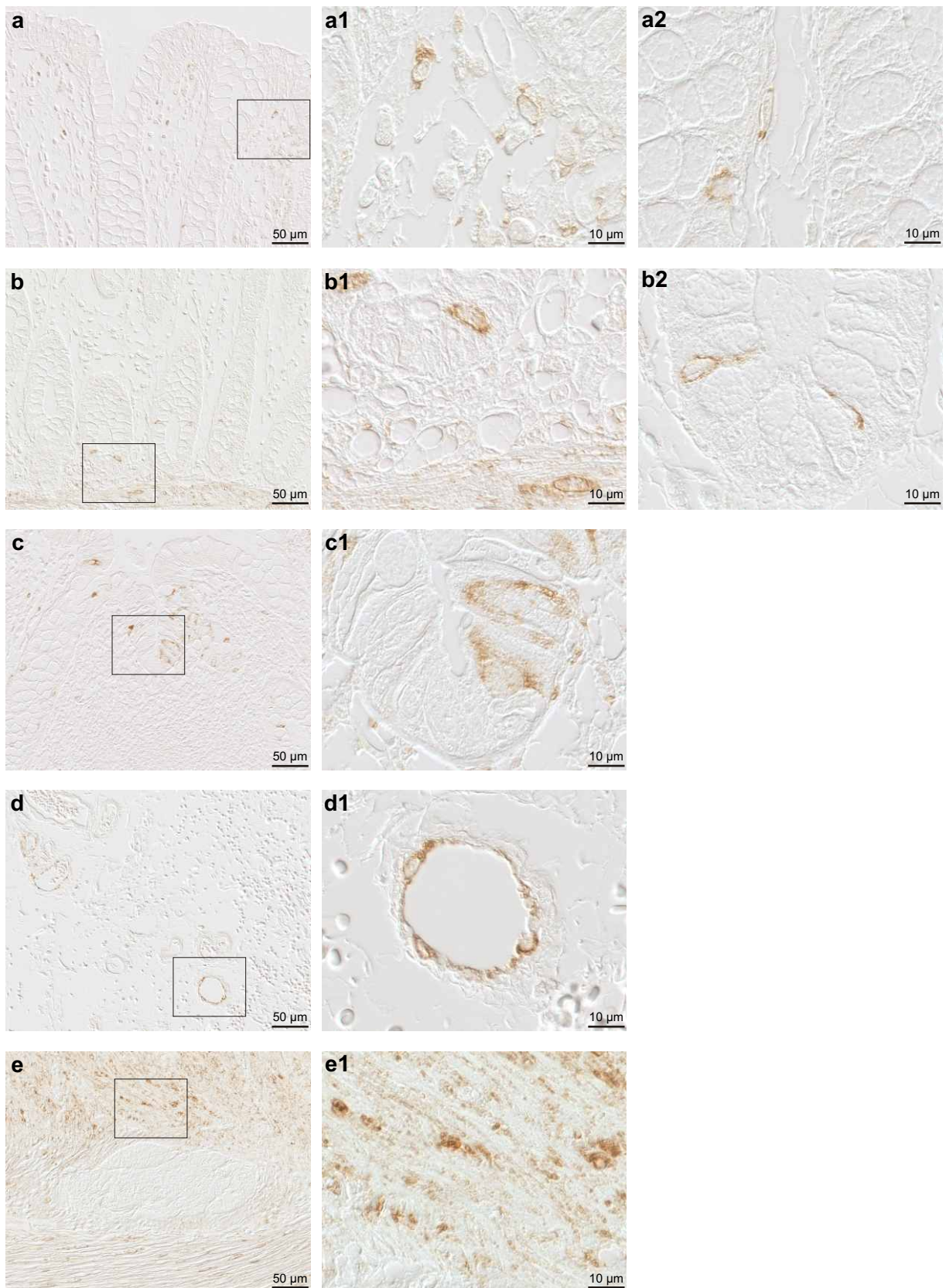


Abb. 4-22: **COX-2 mc IR**, Dickdarm, human, morphologisch intaktes Gewebe;
a 1., 2. Kryptenviertel, Lamina propria - mobile und fixe Zellen;
b 3., 4. Kryptenviertel, Lamina muscularis mucosae;
c Lymphfollikel, Lamina epithelialis; **d** Tela submucosa, Endothel; **e** Tunica muscularis

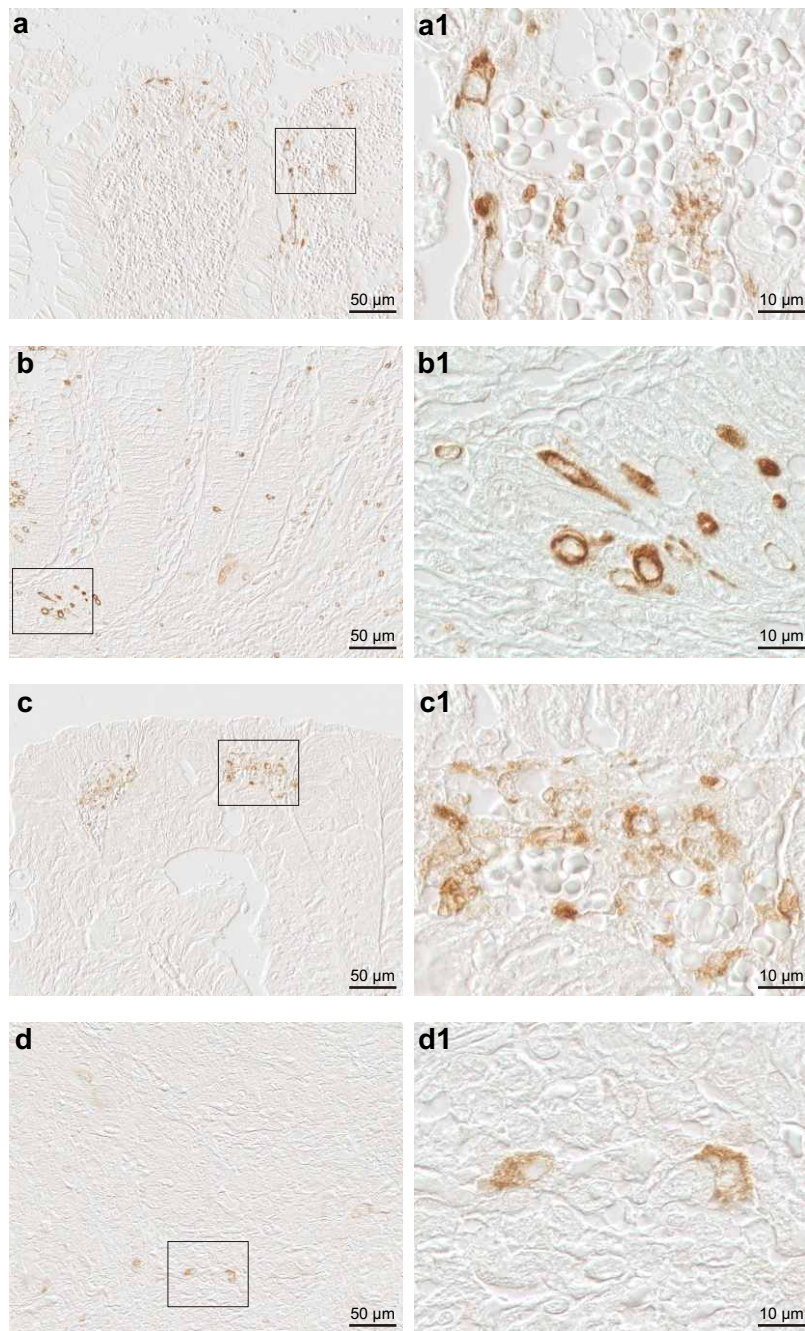


Abb. 4-24: **COX-2 mc IR**, Dickdarm, human, Differenzierungsgrade ST;
a G1, 1., 2. Kryptenviertel, Lamina propria;
b G1, 3., 4. Kryptenviertel;
c G3, Lamina propria, luminale Oberfläche; **d** G4, Lamina propria

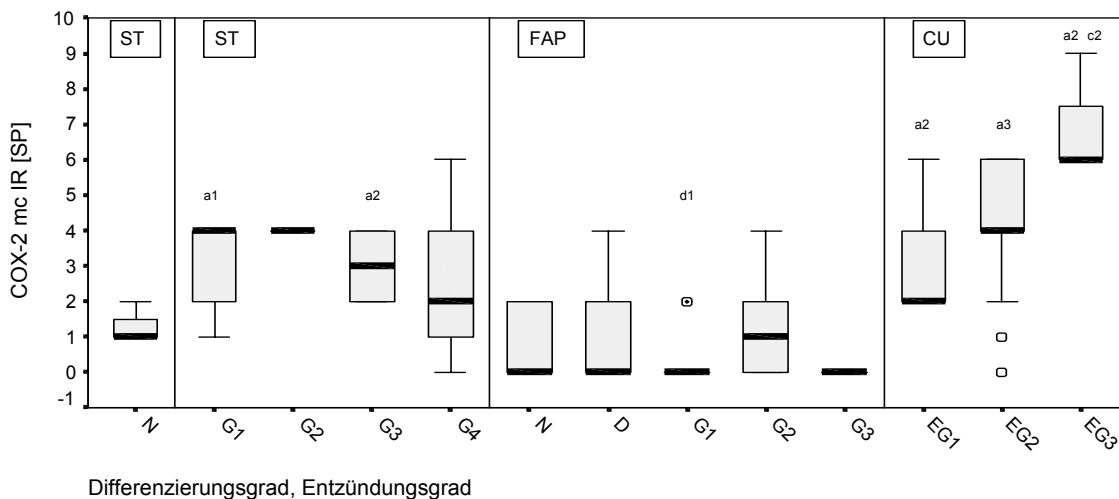


Abb. 4-23: COX-2 mc IR, Kolorektum, human; Lamina propria; mobile und fixe Zellen, Zytoplasma; morphologisch intaktes Gewebe; Differenzierungsgrade ST, FAP; Entzündungsgrade CU; **a** signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungs- bzw. Entzündungsgrad; **d** signifikant verschieden von ST mit gleichem Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

4.2.3.4.3 Rektumgewebe von FAP-Patienten - COX-2 mc

Das Verteilungsmuster der COX-2 in morphologisch intaktem Gewebe von FAP-Patienten entsprach annähernd dem in Normalgewebe von Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren (Abb. 4-25, 4-26 a, a1). Ähnlich wie bei sporadischen Tumoren im Stadium G1 war eine seltene Häufung COX-2 positiver Zellen in einzelnen dysplastischen Krypten und in Einzelkrypten von Polypen in den Stadien G1 und G2 zu beobachten. Im Verlauf der Entdifferenzierung verloren sich diese Zellen (Abb. 4-25, 4-26 b-c1). Die COX-2 IR im Stroma im Randbereich der Polypen war im Vergleich zu sporadischen Tumoren gering (Abb. 4-23, 4-26 d, d1).

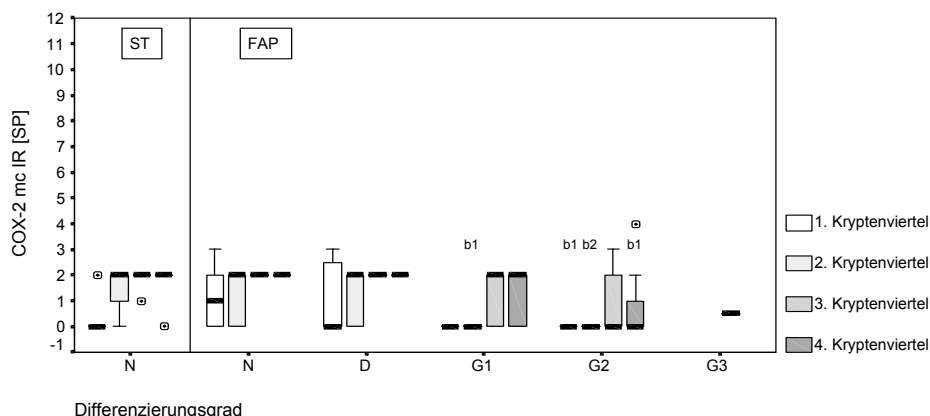


Abb. 4-25: COX-2 mc IR, Kolorektum/Rektum, human; Lamina epithelialis; perinukleär; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade FAP; **b** signifikant verschieden von N-FAP (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$)

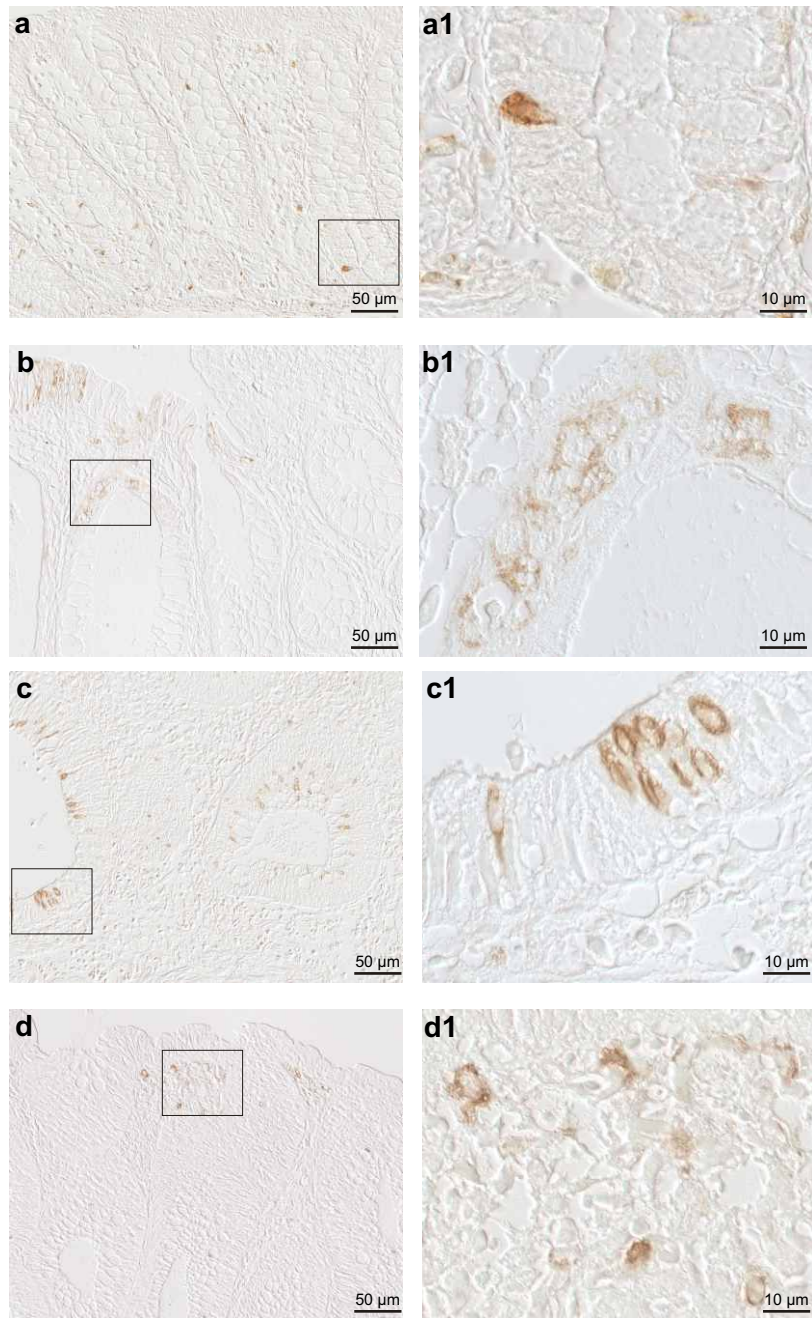


Abb. 4-26: **COX-2 mc IR**, Dickdarm, human; Differenzierungsgrade FAP;
a morphologisch intaktes Gewebe, 1.-4. Kryptenviertel;
b Dysplasie, 1., 2. Kryptenviertel; **c** G2, Epithel;
d G3, Lamina propria, luminale Oberfläche

4.2.3.4.4 Kolorektales Gewebe von CED-Patienten - COX-2 mc

Im Entzündungsgrad 1 und 2 in Gewebe von CU-Patienten waren die typischen COX-2 positiven Zellen in den Krypten (Abb. 4-28 b2) im Vergleich mit dem Normalbefund vermindert. Im Grad 3 wurden keine COX-2 positiven Zellen in den Krypten detektiert (Abb. 4-27).

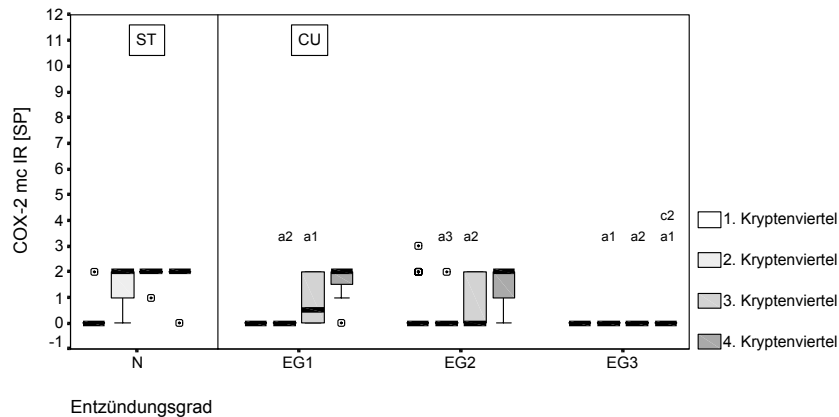


Abb. 4-27: COX-2 mc IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; perinukleär; morphologisch intaktes Gewebe, Entzündungsgrade CU; **a** signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Entzündungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

In der Lamina propria ließ sich dagegen in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad eine signifikante Zunahme COX-2 positiver Zellen nachweisen. Der Hauptanteil dieser Zellen befand sich direkt unterhalb des Saumepithels. Die IR war am stärksten in der Nähe von Erosionen und Ulzerationen im Stadium 3 ausgeprägt (Abb. 4-23, 4-28 a-c1). In diesem Stadium fanden sich auch in der Tela submucosa verstärkt COX-2 positive Zellen.

4.2.3.4.5 Morphologisch intaktes kolorektales Gewebe – COX-2 pc

Mit dem polyclonalen COX-2-Antikörper konnten positive Signale in intakter kolorektaler Mukosa hauptsächlich im Saumepithel an membranartigen Strukturen direkt apikal über dem Zellkern nachgewiesen werden. Die COX-2 IR variierte hinsichtlich der Anzahl positiver Zellen und der Intensität der Färbung. Am intensivsten war sie in der Faltung des Saumepithels und in unmittelbarer Nähe von Lymphfollikeln ausgeprägt. In wenigen Krypten trat diese IR auch in Einzelzellen am Kryptengrund auf (Abb. 4-29 A; 30 a-b1). Im Kolon war die IR tendenziell stärker ausgeprägt als im Rektum. Im 4. und 3. Kryptenviertel, seltener im 2., zeigten Einzelzellen – wahrscheinlich neuroendokrine Zellen - eine diffus granuläre IR (Abb. 4-29 B; 4-30 b2).

In der Lamina propria waren einzelne fixe und mobile Zellen schwach COX-2 positiv. Es markierten sich Strukturen im Zytoplasma (Abb. 4-31, 4-30 a, a2).

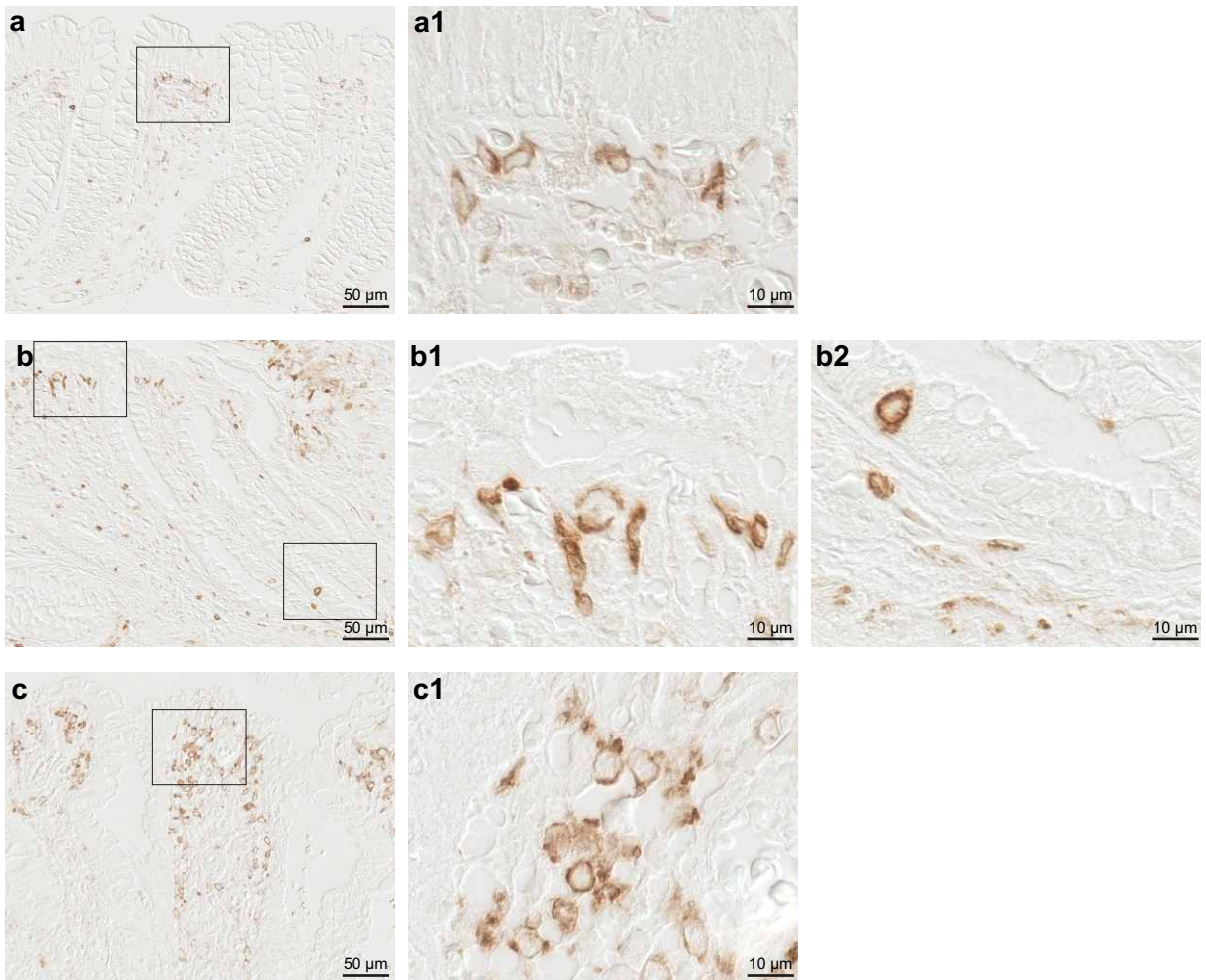


Abb. 4-28: **COX-2 mc IR**, Dickdarm, human, Entzündungsgrade, CU;
a EG1, **b** EG2, **c** EG3;
a1, b1, c1 Lamina propria, luminale Oberfläche;
b2 Lamina epithelialis, Lamina propria, Lamina muscularis mucosae

4.2.3.4.6 Sporadische kolorektale Tumore – COX-2 pc

Bereits im frühen G1-Stadium trat die typische strukturegebundene COX-2 IR im Zytoplasma der Epithelzellen nicht mehr nur betont im Saumepithel sondern bis tief in die Krypte hinein auf. In unmittelbarer Nähe der Lamina muscularis mucosae war das Epithel besonders intensiv COX-2 immunreaktiv.

Die stärksten strukturegebundenen COX-2 Signale im Epithel lagen in den Stadien G1 und G2 vor. Sie verloren sich mit zunehmender Entdifferenzierung ab G3 (Abb. 4-29; 4-30 c-f1). Im Stadium G4 konnte auch eine diffus im Zytoplasma verteilte COX-2 IR in einzelnen Zellen beobachtet werden. Die diffus granuläre COX-2 IR einzelner Epithelzellen war ab Stadium G1 vermindert (Abb. 4-29 B).

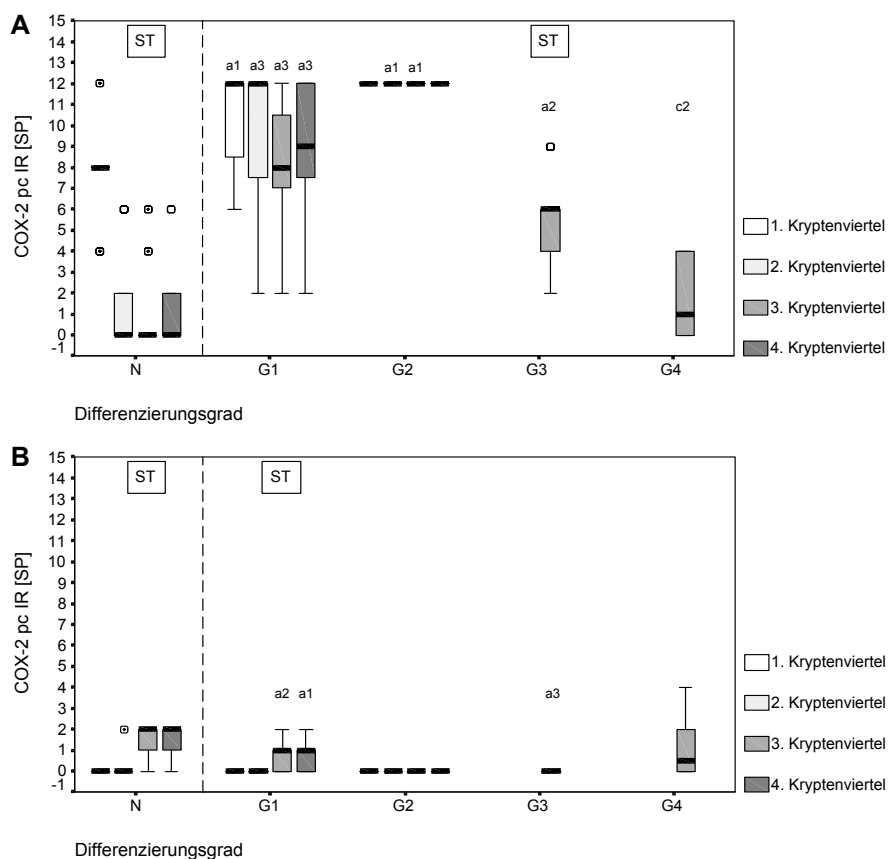


Abb. 4-29: COX-2 pc IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; Zytoplasma, **A** strukturegebunden apikal vom Zellkern, **B** diffus granulär; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade ST; **a** signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

In der Lamina propria waren im Stadium G1 sehr selten immunreaktive Zellen unterhalb des Saumepithels zu finden. Ab Stadium G2 traten im Randsaum des Tumorstromas signifikant häufiger stark COX-2 positive Zellen auf (Abb. 4-31, 4-30 g).

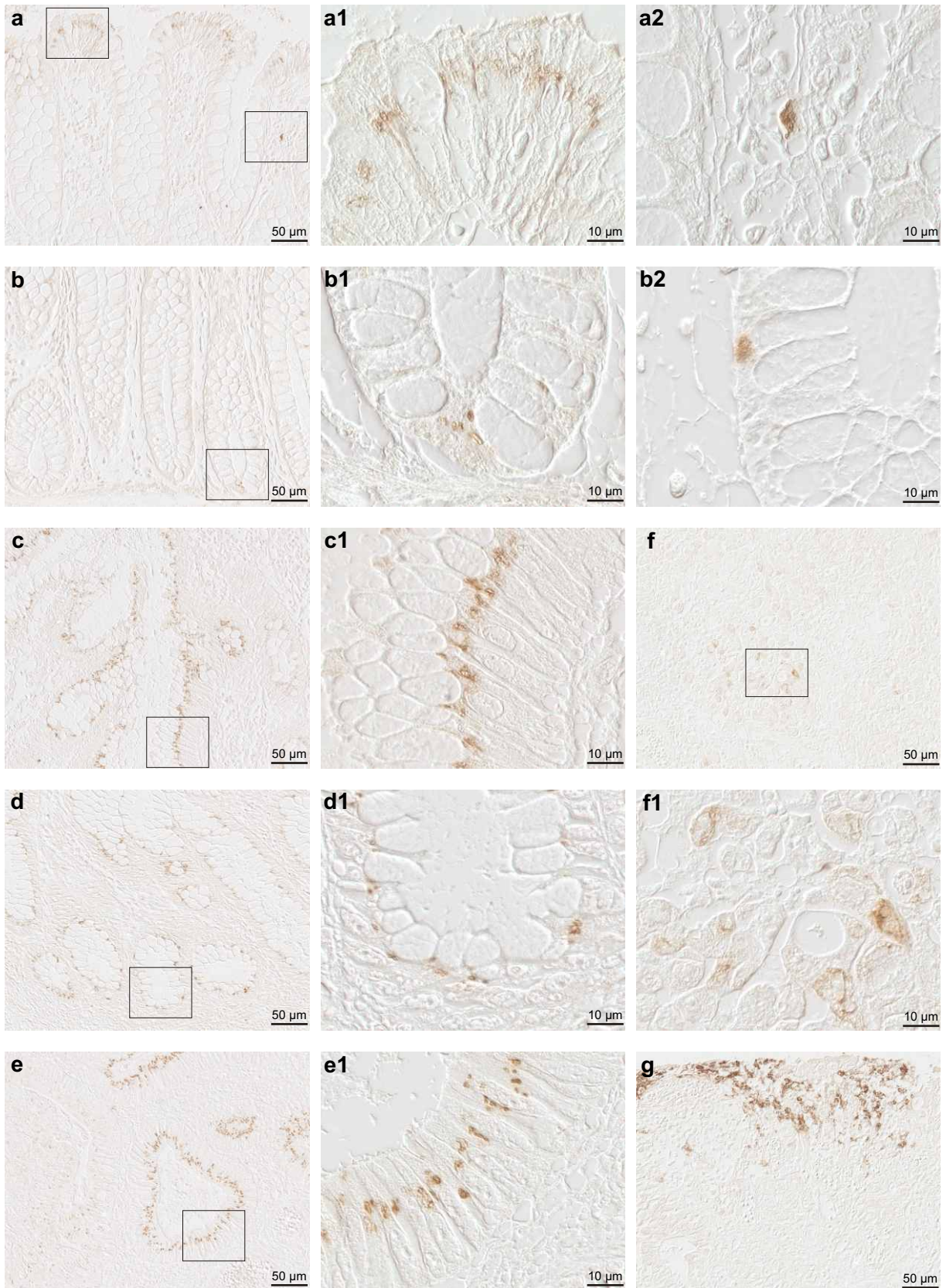


Abb. 4-30: **COX-2 pc IR**, Dickdarm, human, morphologisch intaktes Gewebe und Differenzierungsgrade ST;
a-b2 morphologisch intaktes Gewebe: **a** 1., 2. Kryptenviertel, Lamina propria, **b** 3., 4. Kryptenviertel;
c-g Differenzierungsgrade: **c** G1, 1., 2. Kryptenviertel, **d** G1, 3., 4. Kryptenviertel, **e** G3, Lamina epithelialis, **f** G4, Lamina epithelialis, **g** G4, Lamina propria, luminale Oberfläche

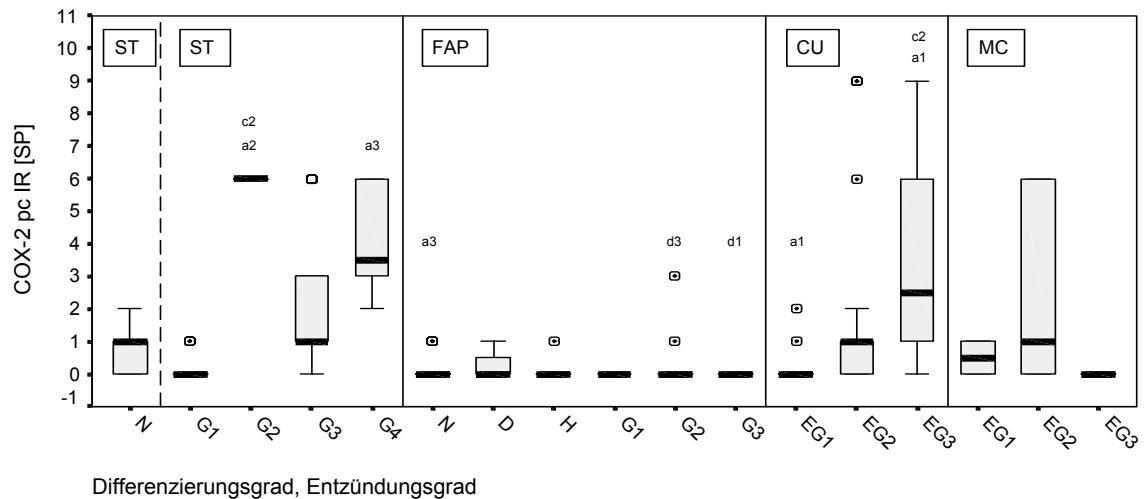


Abb. 4-31: COX-2 pc IR, Kolorektum, human; Lamina propria; mobile und fixe Zellen, Zytoplasma; morphologisch intaktes Gewebe; Differenzierungsgrade ST, FAP, Entzündungsgrade CU, MC;
a signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungs- bzw. Entzündungsgrad; **d** signifikant verschieden von ST mit gleichem Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

4.2.3.4.7 Rektumgewebe von FAP-Patienten – COX-2 pc

Mit dem polyclonalen COX-2-Antikörper ließen sich deutlichere Unterschiede als mit dem monoclonalen Antikörper in der COX-2 IR in Dickdarmgewebe von Patienten mit FAP und mit sporadischen Tumoren nachweisen.

In morphologisch unauffälligem Gewebe traten die typischen, direkt apikal über dem Zellkern gelegenen COX-2 positiven Strukturen im Saumepithel häufiger und intensiver gefärbt auf als in vergleichbarem Kontrollgewebe. In einzelnen Krypten zog sich diese IR tief in die Krypte hinein. Immunreaktive Epithelzellen wurden auch in einzelnen Kryptengründen nachgewiesen (Abb. 4-32 A, 4-33 a-b1). Die strukturgebundene COX-2 IR im Epithel nahm bereits in frühen hyperplastischen und dysplastischen Veränderungen der Schleimhaut stark zu. Eine weitere Verstärkung war in allen Kryptenabschnitten im Stadium G1 feststellbar. Ab dem späten Stadium G2 nahm die IR ab (Abb. 4-32 A, 4-33 c-e1). Häufig war innerhalb der Polypen eine Abnahme der IR von der Polypenbasis zum Rand zu beobachten.

Die Anzahl diffus granulär COX-2 positiver Zellen war in hyperplastischen und dysplastischen Arealen dem Normalbefund vergleichbar. Ab Differenzierungsgrad G2 konnten diese Signale nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 4-32 B).

Im Polypenstroma wurden nur vereinzelt schwach COX-2 positive Zellen gefunden (Abb. 4-31). Diese waren überwiegend an der Polypenoberfläche lokalisiert.

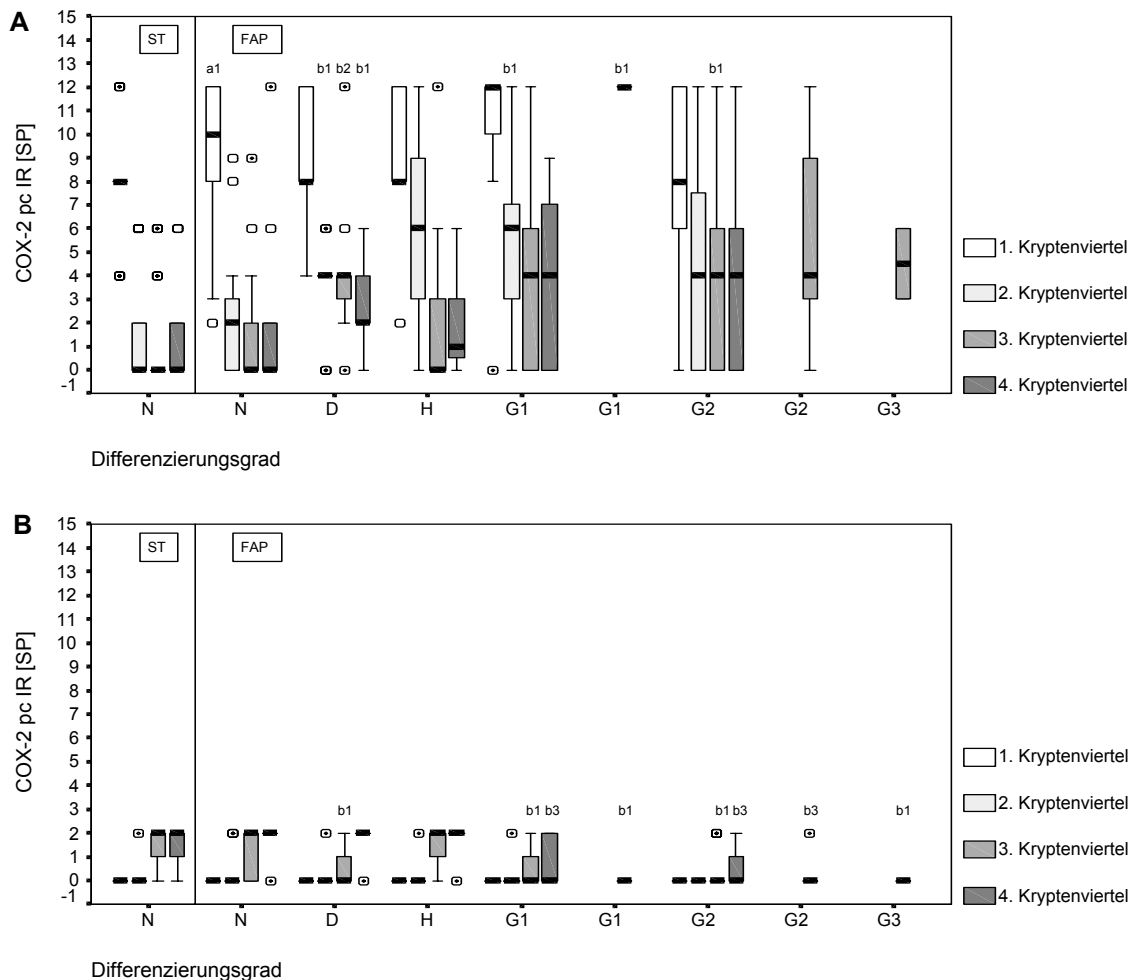


Abb. 4-32: COX-2 pc IR, Kolorektum/Rektum, human; Lamina epithelialis; Zytoplasma, **A** strukturegebunden apikal vom Zellkern, **B** diffus granulär; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade FAP; **a** signifikant verschieden von N-ST, **b** signifikant verschieden von N-FAP (**1** $p < 0,05$, **2** $p < 0,01$, **3** $p < 0,001$)

4.2.3.4.8 Kolorektales Gewebe von CED-Patienten – COX-2 pc

Veränderungen der COX-2 IR waren bei Patienten mit CED sowohl in den Epithelzellen als auch in den Zellen der Lamina propria und Tela submucosa nachweisbar.

Mit zunehmendem Entzündungsgrad trat eine verstärkte IR im Saumepithel in der typischen strukturegebundenen Lokalisation auf. Sie war nicht mehr nur auf das Saumepithel begrenzt sondern zog sich bis tief in die Krypten hinein und war in einzelnen Krypten zusätzlich betont am Kryptengrund zu finden. Die IR war am stärksten im Entzündungsgrad 3 ausgeprägt (Abb. 4-34 A, 4-35 a-d1). Proben aus dem Kolon wiesen eine stärkere IR auf als Proben aus dem Rektum. Die Anzahl der Epithelzellen mit diffus granulärer COX-2 IR nahm mit zunehmendem Entzündungsgrad ab (Abb. 4-34 B).

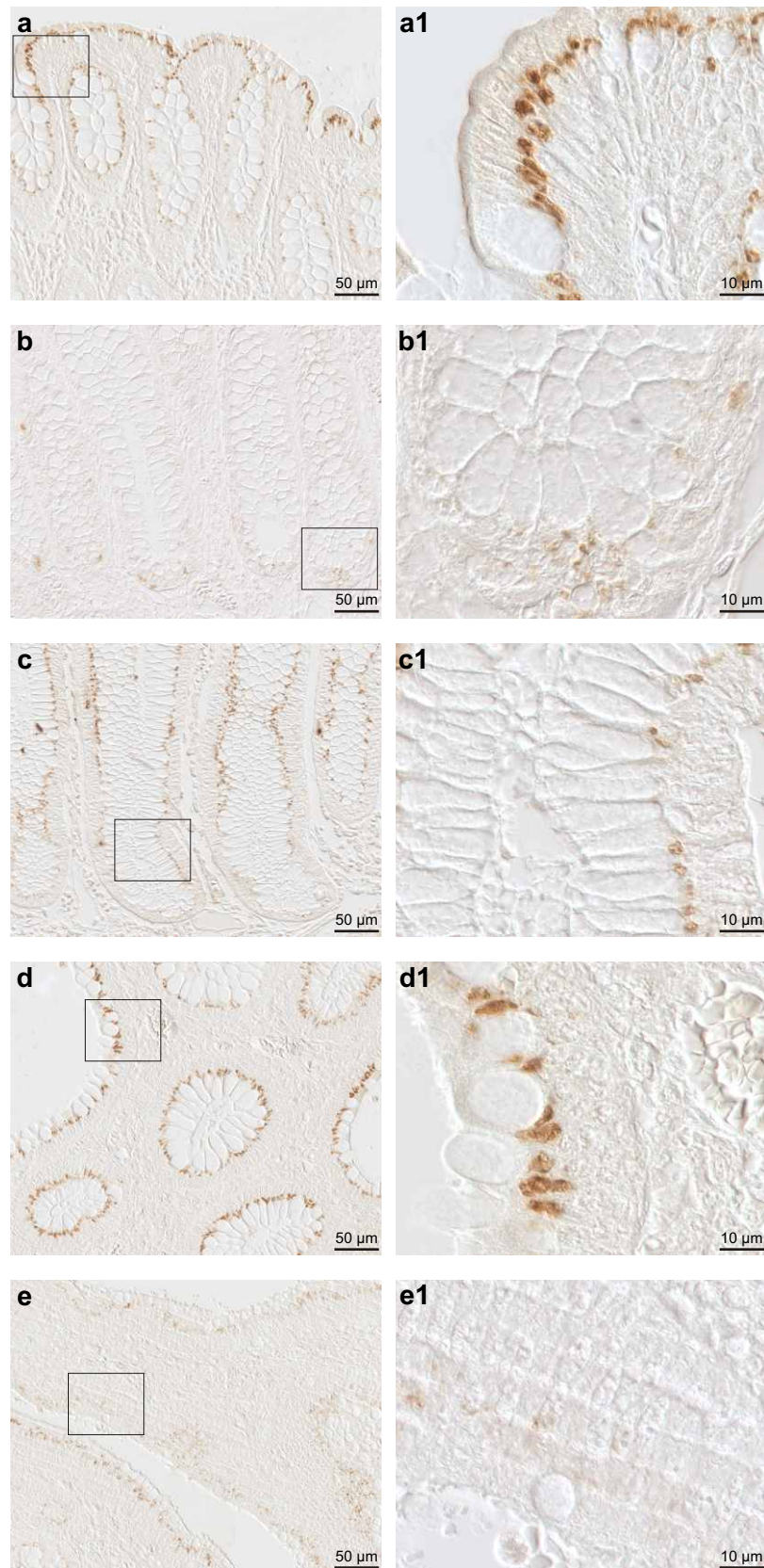


Abb. 4-33: **COX-2 pc IR**, Dickdarm, human, Differenzierungsgrade FAP;
a,b morphologisch intaktes Gewebe: **a** 1., 2. Kryptenviertel, **b** 3., 4. Kryptenviertel;
c-e1 Differenzierungsgrade: **c** Hyperplasie, 3., 4. Kryptenviertel,
d G1/G2, Lamina epithelialis, **e** G3, Lamina epithelialis

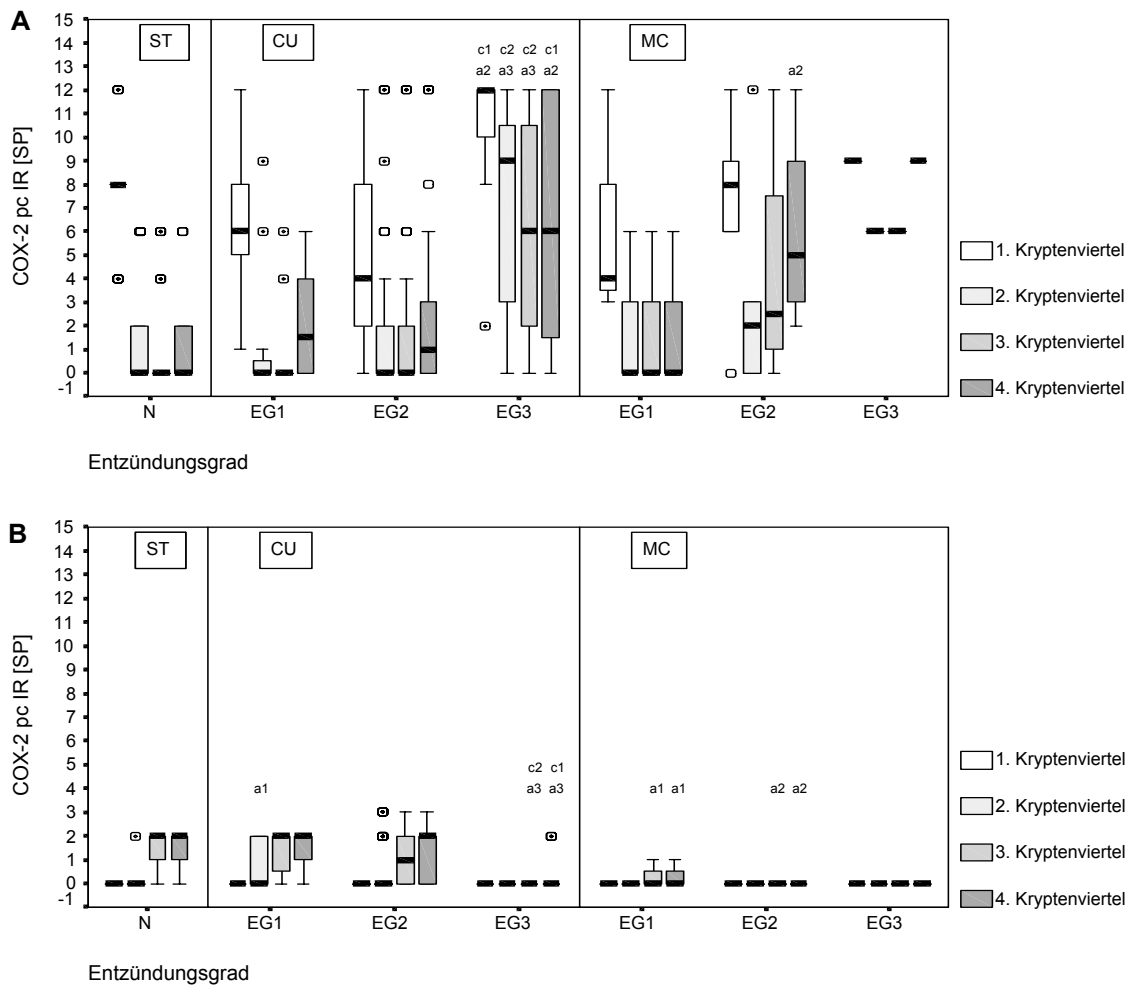


Abb. 4-34: COX-2 pc IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; Zytoplasma, **A** strukturegebunden apikal vom Zellkern, **B** diffus granulär; morphologisch intaktes Gewebe, Entzündungsgrade CU, MC; **a** signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Entzündungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

Im luminalen Bereich der Lamina propria, direkt unterhalb des Saumepithels, fanden sich in einigen Proben fokal gehäuft stark COX-2 positive Zellen. Besonders intensiv war dieser Befund in der Nähe von Erosionen und Ulzerationen im Stadium 2 und 3. In den positiven Zellen markierten sich membranartige Strukturen im Zytoplasma (Abb. 4-31, 4-35 e, e1). Auch in der Tela submucosa waren mit steigendem Entzündungsgrad vermehrt COX-2 positive Zellen nachweisbar.

Die Proben von Patienten mit MC zeigten tendenziell ähnliche Befunde zur COX-2 pc Verteilung (Abb. 4-31; 4-34; 4-35 f, f1).

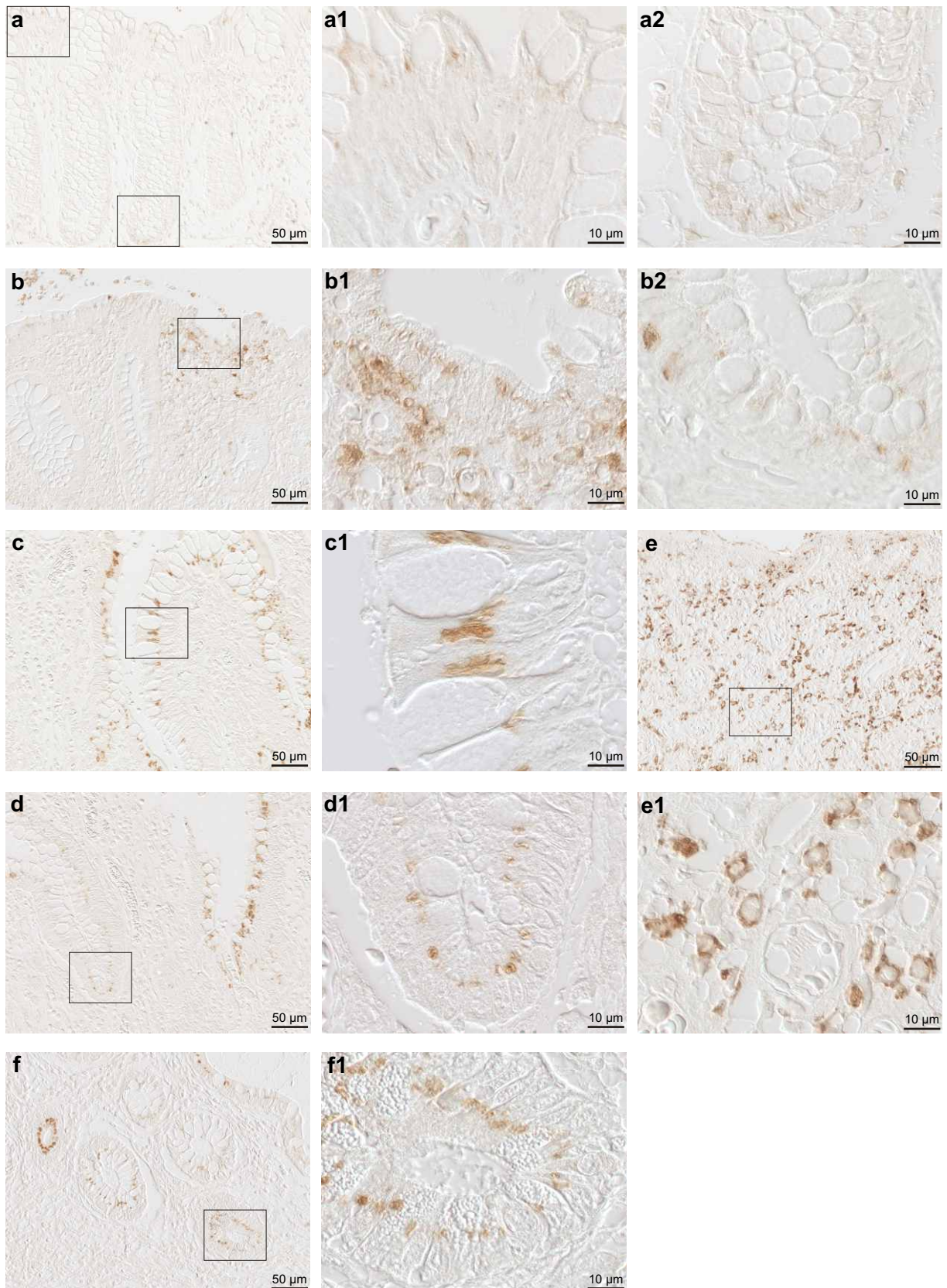


Abb. 4-35: **COX-2 pc IR**, Dickdarm, human, Entzündungsgrade CED;
a-e1 CU: **a** EG1; **b** EG2; **c-e** EG3,
a1, b1, c1 1. Kryptenviertel, **a2, b2, d1** 4. Kryptenviertel, **e** Lamina propria, Ulzeration;
f MC, EG3, 3., 4. Kryptenviertel

4.2.3.5 iNOS

4.2.3.5.1 Morphologisch intaktes kolorektales Gewebe

iNOS konnte vorwiegend im Saumepithel der Tunica mucosa nachgewiesen werden. Die IR war an zytoplasmatischen Membranen direkt apikal vom Zellkern lokalisiert und trat fokal gehäuft auf. In der Tiefe der Faltung des Saumepithels und in direkter Nähe von Lymphfollikeln war diese IR verstärkt. In den tiefer gelegenen Kryptenvierteln fand sich eine IR nur in einzelnen Epithelzellen (Abb. 4-36, 4-37 a-b1). Diese IR war im Kolon tendenziell stärker ausgeprägt als im Rektum.

Sehr selten konnte ein schwach iNOS positives Zell-Infiltrat in der Lamina propria und der Tela submucosa detektiert werden. In diesen Zellen markierte sich das Zytoplasma granulär (Abb. 4-37 c, c1).

4.2.3.5.2 Sporadische kolorektale Tumore

Bereits im frühen Stadium der Dysplasie war eine verstärkte iNOS IR im Zytoplasma des Epithels nachweisbar. Die Lokalisation immunreaktiver Strukturen beschränkte sich nicht mehr nur auf das Zytoplasma des Saumepithels sondern erstreckte sich bis tief in die Krypte hinein. Im Stadium G1 und G2 waren die Zellen der Lamina epithelialis oft über die gesamte Kryptenachse immunreaktiv. Mit fortschreitender Entdifferenzierung ab G3 war eine Abnahme der Anzahl positiver Strukturen einhergehend mit einer verminderten Färbungsintensität in den Epithelzellen feststellbar (Abb. 4-36, 4-37 d-g1).

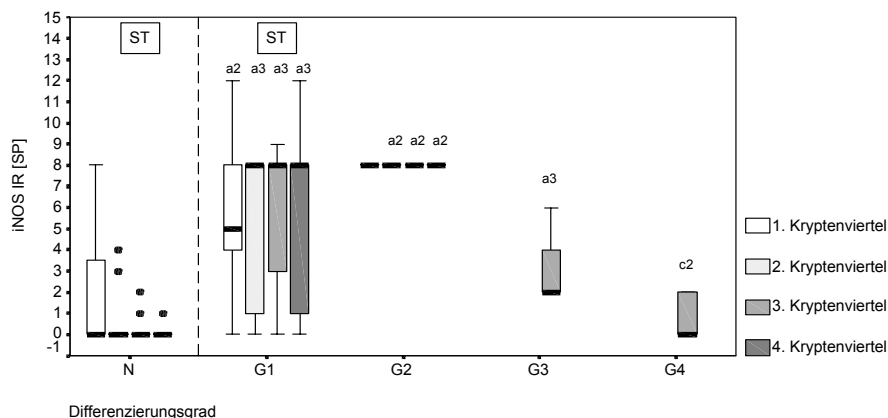


Abb. 4-36: iNOS IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; strukturgebunden apikal vom Zellkern; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade ST; **a** signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungsgrad (**2** $p < 0,01$, **3** $p < 0,001$)

Mobile iNOS positive Zellen konnten in der Lamina propria bereits im frühen G1-Stadium signifikant häufiger nachgewiesen werden. Ihre Anzahl nahm bis zum Stadium G3 weiter zu (Abb. 4-38). Positive Zellen fanden sich in den Gefäßlumina, am luminalen Rand des Tumorstromas und Epithel-assoziiert.

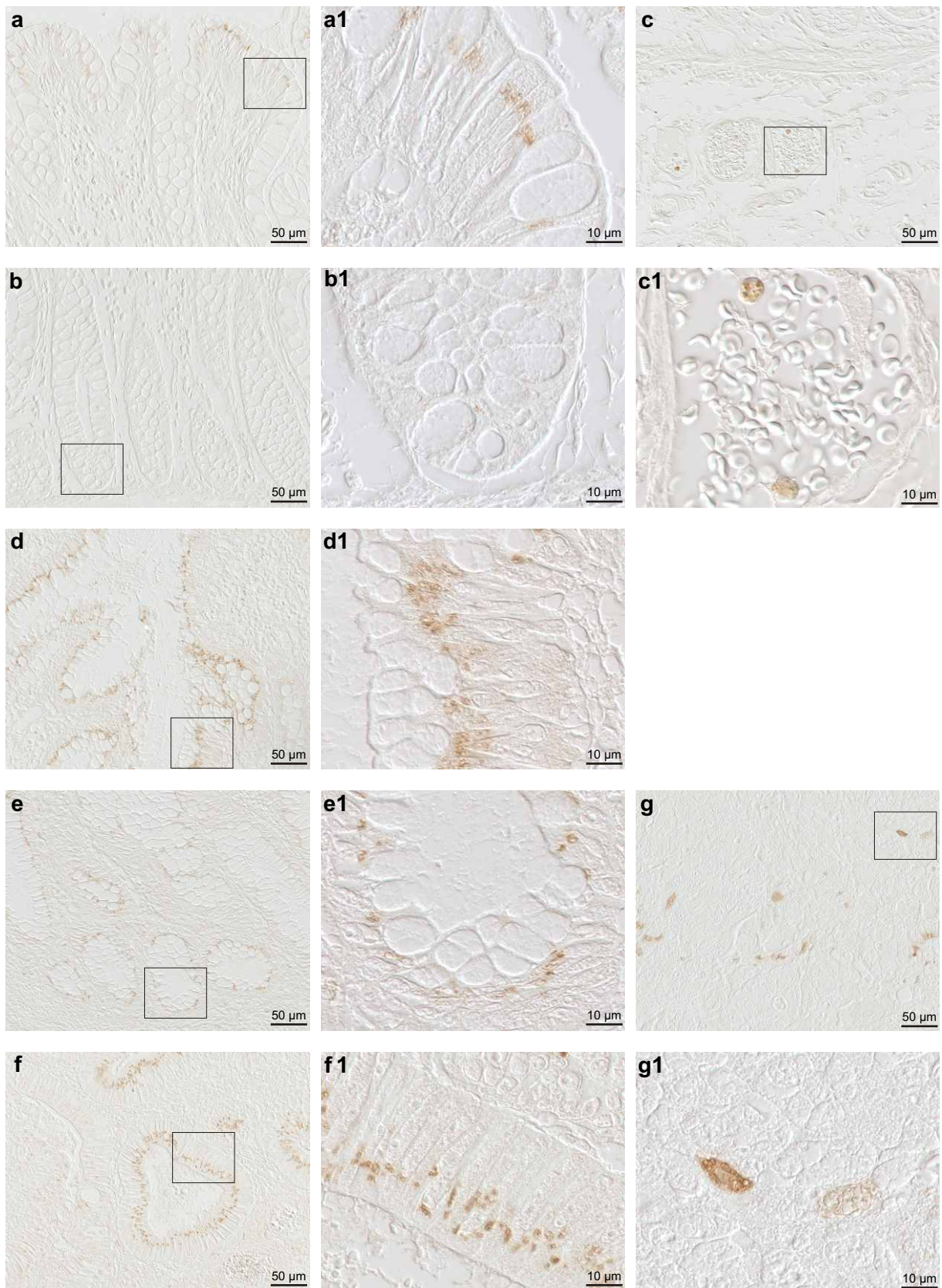


Abb. 4-37: **iNOS IR**, Dickdarm, human, morphologisch intaktes Gewebe und Differenzierungsgrade ST;
a-c1 morphologisch intaktes Gewebe: **a** 1., 2. Kryptenviertel, **b** 3., 4. Kryptenviertel, **c** Tela submucosa, mobile Zellen;
d-g1 Differenzierungsgrade: **d** G1, 1., 2. Kryptenviertel, **e** G1, 3., 4. Kryptenviertel, **f** G3, Lamina epithelialis, **g** G4 Lamina propria

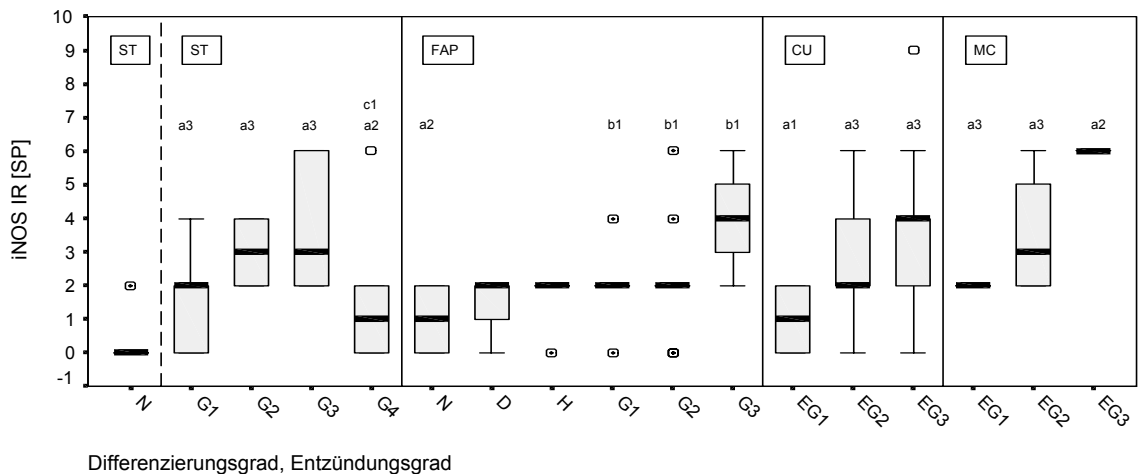


Abb. 4-38: iNOS IR, Kolorektum, human; Lamina propria; mobile Zellen, Zytoplasma; morphologisch intaktes Gewebe; Differenzierungsgrade ST, FAP; Entzündungsgrade CU, MC; **a** signifikant verschieden von N-ST, **b** signifikant verschieden von N-FAP, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

4.2.3.5.3 Rektumgewebe von FAP-Patienten

In morphologisch intakter Schleimhaut von FAP-Patienten trat die iNOS IR in typischer Lokalisation im gesamten Saumepithel signifikant verstärkt auf. Häufiger als in morphologisch intaktem Gewebe von Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren waren immunreaktive Strukturen im 2. Kryptenviertel und auch im Kryptengrund nachweisbar (Abb. 4-39, 4-40 a-b). Bereits in frühen dysplastischen und hyperplastischen Veränderungen der Schleimhaut nahm die Anzahl iNOS immunreaktiver Epithelzellen in den unteren drei Kryptenvierteln deutlich zu. Sie verstärkte sich bis zum Stadium G1 und blieb bis zum Stadium G2 nahezu in gleicher Intensität erhalten. Im Stadium G3 waren nur noch wenige iNOS positive Strukturen in den Epithelzellen nachweisbar (Abb. 4-39, 4-40 c-e1).

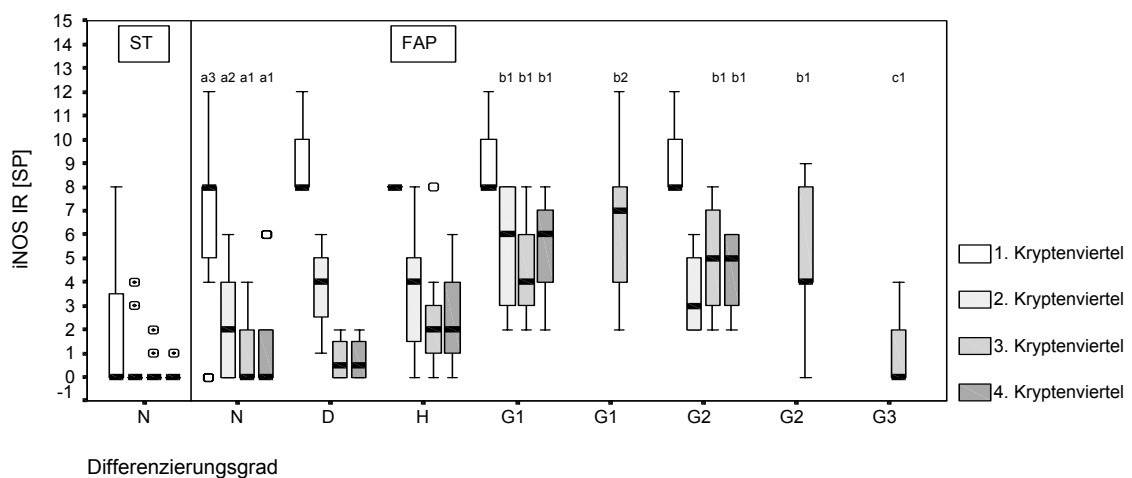


Abb. 4-39: iNOS IR, Kolorektum/Rektum, human; Lamina epithelialis; strukturgebunden apikal vom Zellkern; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade FAP; **a** signifikant verschieden von N-ST, **b** signifikant verschieden von N-FAP, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

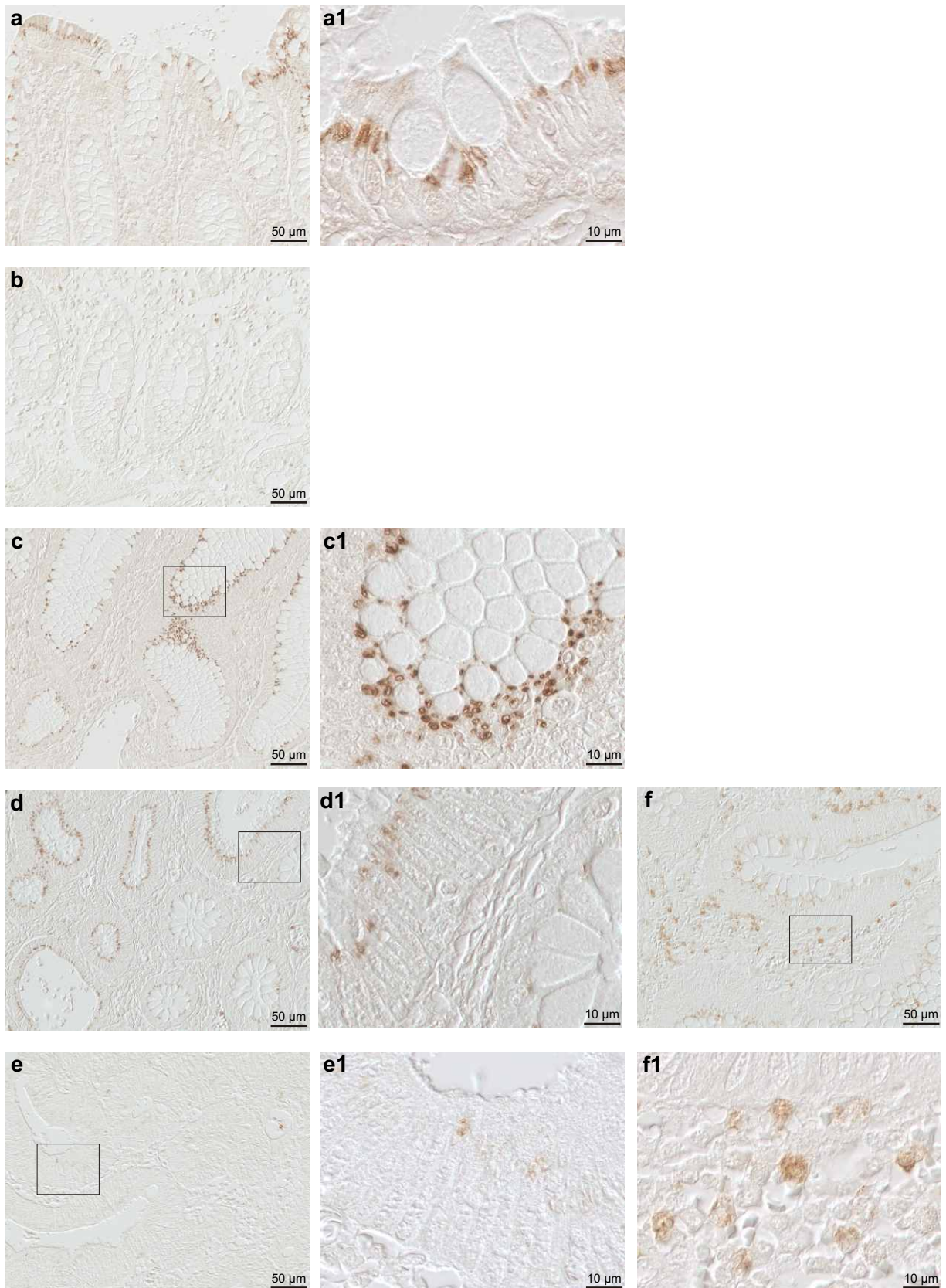


Abb. 4-40: **iNOS IR**, Dickdarm, human, Differenzierungsgrade FAP;
a, b morphologisch intaktes Gewebe: **a** 1., 2. Kryptenviertel, **b** 3., 4. Kryptenviertel;
c-f1 Differenzierungsgrade: **c** Hyperplasie/G1, 2.-4. Kryptenviertel, **d** G1/G2, Lamina epithelialis, **e** G3, Lamina epithelialis, **f** G2, Lamina propria, mobile Zellen

In den Polypen markierten sich die Epithelzellen in der Nähe der Polypenbasis und am Polypensaum besonders intensiv. Die positiven Strukturen erschienen vergrößert bzw. ihre Anzahl pro Zelle erhöht.

Im Polypenstroma war eine leichte Zunahme iNOS positiver mobiler Zellen von intaktem Gewebe über die einzelnen Differenzierungsgrade bis hin zu G3 feststellbar (Abb. 4-38, 4-40 f, f1). Insgesamt war die IR jedoch schwächer als in sporadischen Tumoren ausgeprägt.

4.2.3.5.4 Kolorektales Gewebe von CED-Patienten

Gewebe von Patienten mit CU zeigte bereits im Entzündungsgrad 1 eine signifikant verstärkte iNOS IR im Vergleich zu intaktem kolorektales Gewebe. Die stärkste IR fand sich in den Zellen des Saumepithels. Einzelne Epithelzellen am Kryptengrund und in den mittleren beiden Kryptenvierteln waren ebenfalls iNOS positiv. Mit Zunahme der Entzündung war eine graduelle Verstärkung der IR besonders in den oberen beiden Kryptenvierteln und im Kryptengrund in der typischen strukturegebundenen Markierung nachweisbar (Abb. 4-41, 4-42 a-d1). Die Induktion der iNOS mit zunehmendem Entzündungsgrad war in den Epithelzellen des Kolons tendenziell stärker ausgeprägt als im Rektum.

In der Lamina propria war mit steigendem Grad der Entzündung eine Häufung iNOS positiver mobiler Zellen nachweisbar. Dies war besonders deutlich in den hyperämischen Proben (Abb. 4-38, 4-42 d, d1). Die Proben von MC-Patienten wiesen sowohl im Epithel als auch im Stroma ähnliche Veränderungen in der iNOS IR auf (Abb. 4-38, 4-41, 4-42 e, e1).

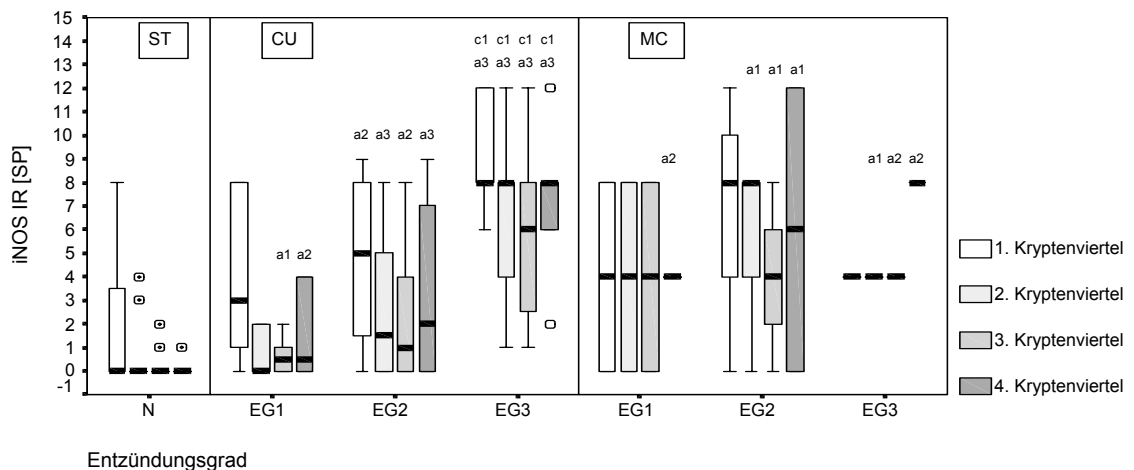


Abb. 4-41: iNOS IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; strukturegebunden apikal vom Zellkern; morphologisch intaktes Gewebe, Entzündungsgrade CU, MC; **a** signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Entzündungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

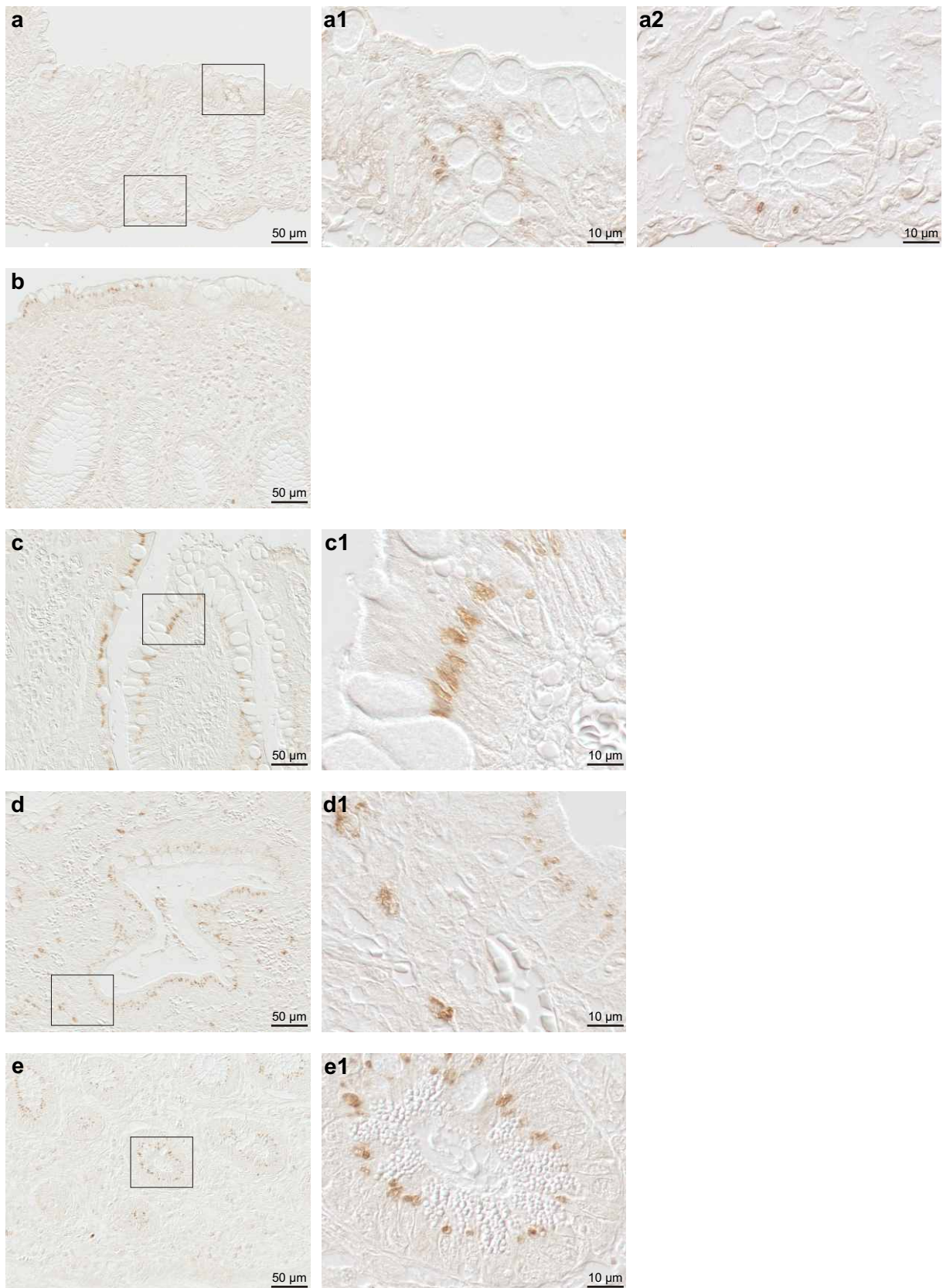


Abb. 4-42: **iNOS IR**, Dickdarm, human, Entzündungsgrade CED;
a-d1 CU: **a** EG1; **b** EG2; **c**, **d** EG3,
a1, **c1** 1.Kryptenviertel, **a2**, **d1** 4. Kryptenviertel, **d1** Lamina propria, mobile Zellen;
e MC: EG3, 3., 4. Kryptenviertel

4.2.3.6 *GI-GPx*

4.2.3.6.1 Morphologisch intaktes kolorektales Gewebe

In nahezu allen Krypten war eine kernständige *GI-GPx* IR in den Zellen am Kryptengrund nachweisbar. Diese verlor sich beginnend im untersten Kryptenviertel in unterschiedlicher Höhe in Richtung Lumen (Abb. 4-43 A; 4-44 b, b1). In Einzelfällen reagierten nicht nur die Kerne sondern auch das Zytoplasma schwach positiv. Sehr selten war in vereinzelt Zellen am Kryptengrund zusätzlich eine strukturebundene IR apikal vom Zellkern zu erkennen. Im Gegensatz dazu wiesen im luminalen Saumepithel bzw. im oberen Kryptenviertel Einzelzellen oder Gruppen von Zellen eine strukturebundene *GI-GPx* IR im Zytoplasma auf. Die markierten Strukturen erschienen als zusammengelagerte membranartige Gebilde, die dem Kern apikal aufgelagert waren. Becherzellen zeigten keine Reaktivität (Abb. 4-43 B, 4-44 a, a1). Die IR war verstärkt in der Faltung des Saumepithels zu beobachten. Krypten in der Nähe von Lymphfollikeln waren oft über die gesamte Achse stark immunreaktiv. Es markierten sich sowohl die Zellkerne als auch Strukturen im Zytoplasma.

In allen anderen Darmschichten wurde keine *GI-GPx* IR nachgewiesen. Lediglich in einer Probe färbten sich zytoplasmatische Strukturen in den Zellen des Plexus myentericus (Abb. 4-44 c, c1).

4.2.3.6.2 Sporadische kolorektale Tumore

Das Muster der *GI-GPx* IR in der Dickdarmschleimhaut wies charakteristische Veränderungen im Verlaufe der Entdifferenzierung auf. Bereits in frühen dysplastischen Veränderungen der Schleimhaut zeigte sich eine Verstärkung der strukturebundenen *GI-GPx* IR in allen Kryptenabschnitten. Im Stadium G1 trat eine signifikant verstärkte IR in den Zellkernen am Kryptengrund auf. Diese nahm in unterschiedlicher Höhe in Richtung Lumen ab und war im obersten Kryptenviertel nicht mehr nachweisbar. Neben der kernständigen IR fand sich in einigen Zellen auch eine diffuse Verteilung der *GI-GPx* im Zytoplasma (Abb. 4-43 A, C, 4-44 e, e1). Während die kernständige *GI-GPx* IR in Richtung Lumen abnahm, verstärkte sich die strukturebundene IR im Zytoplasma. Die strukturebundene *GI-GPx* IR apikal vom Zellkern war im Saumepithel bereits im Stadium G1 hinsichtlich ihrer Häufigkeit und Intensität signifikant stärker. Markierte Strukturen waren nicht nur auf das luminale Kryptenepithel beschränkt, sondern auch in den Epithelzellen bis tief in die Krypte hinein detektierbar (Abb. 4-43 B, 4-44 d-e1). Ab Stadium G3 nahm die strukturebundene IR der *GI-GPx* wieder ab. Dabei schien sie stadienabhängig in eine diffuse, zytoplasmatische sowie eine kernständige Lokalisation überzugehen. Im Stadium G4 war keine strukturebundene *GI-GPx* IR mehr nachweisbar. In verbliebenen Kryptenresten zeigte sich eine schwache, diffus verteilte IR im Zytoplasma und im Zellkern (Abb. 4-43 A-C,

4-44 f-g1). So lange noch eine Orientierung zur Lamina muscularis mucosae vorhanden war, waren die ihr direkt benachbarten Krypten am stärksten immunreaktiv, selbst im Stadium G3. Vereinzelt traten GI-GPx positive Zellen im Tumorstroma auf (Abb. 4-45).

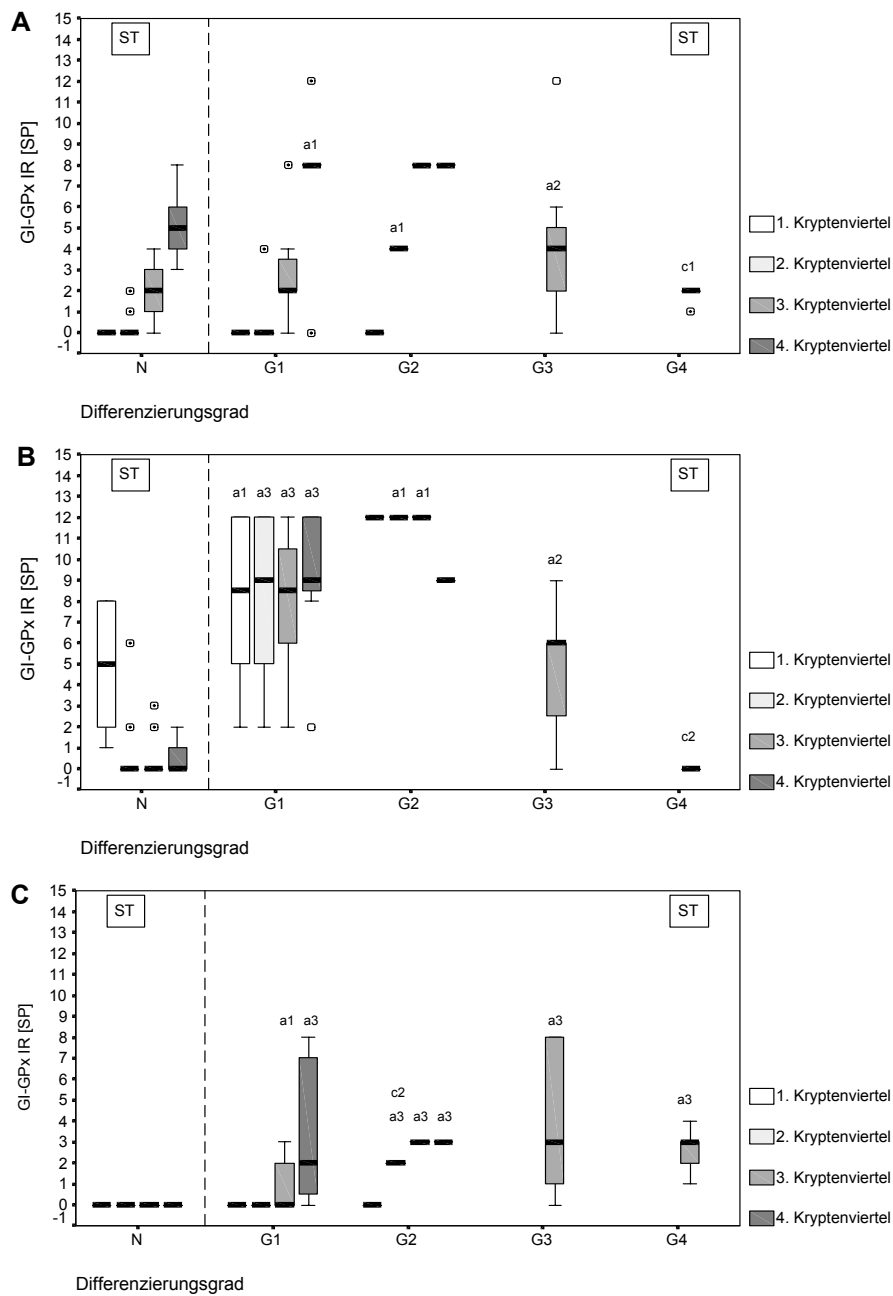


Abb. 4-43: GI-GPx IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; **A** kernständig; Zytoplasma, **B** strukturgebunden apikal vom Zellkern, **C** diffus; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade ST; **a** signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

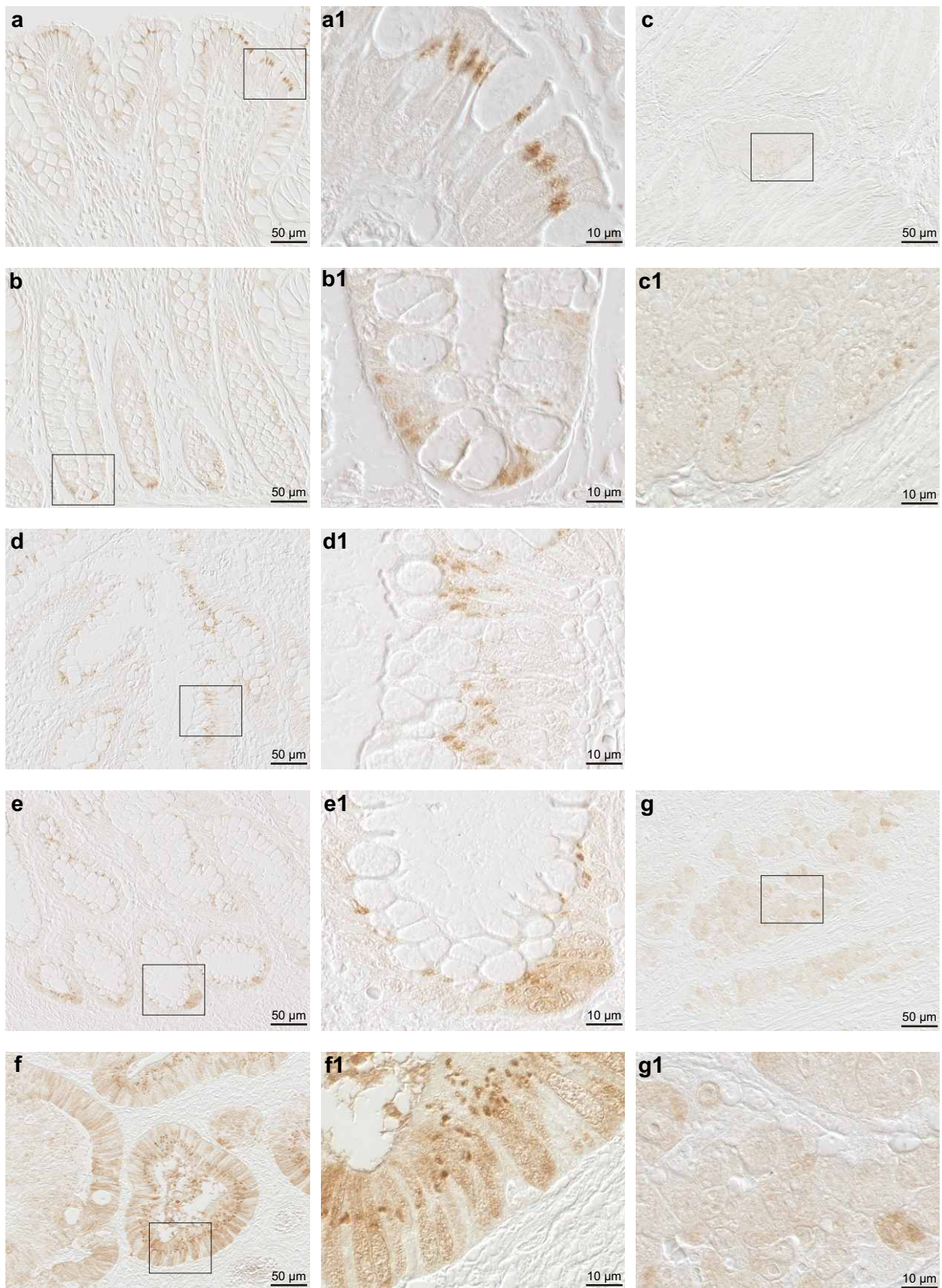


Abb. 4-44: **GI-GPx IR**, Dickdarm, human, morphologisch intaktes Gewebe und Differenzierungsgrade ST;
a-c1 morphologisch intaktes Gewebe: **a** 1., 2. Kryptenviertel, **b** 3., 4. Kryptenviertel, **c** Plexus myentericus;
d-g1 Differenzierungsgrade: **d** G1, 1., 2. Kryptenviertel, **e** G1, 3., 4. Kryptenviertel, **f** G3, Lamina epithelialis, **g** G4 Lamina epithelialis

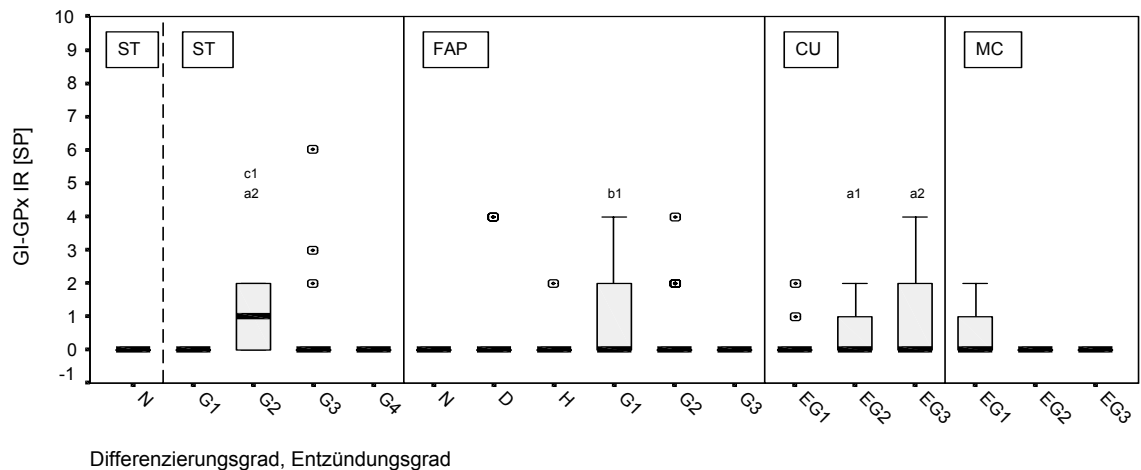


Abb. 4-45: GI-GPx IR, Kolorektum, human; Lamina propria; Zytoplasma, strukturgebunden; morphologisch intaktes Gewebe; Differenzierungsgrade ST, FAP; Entzündungsgrade CU, MC;
a signifikant verschieden von N-ST, **b** signifikant verschieden von N-FAP, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungs- bzw. Entzündungsgrad (**1** $p < 0,05$, **2** $p < 0,01$)

4.2.3.6.3 Rektumgewebe von FAP-Patienten

Die Epithelzellen der Kryptengründe zeigten eine kernständige GI-GPx IR, selten war auch eine strukturgebundene IR apikal vom Zellkern zu beobachten. Die kernständige IR war insgesamt schwächer ausgeprägt als in vergleichbarem Kontrollgewebe. Signifikant verschieden war auch die strukturgebundene IR im luminalen Saumepithel. Sie trat durchgängig auf und war deutlich verstärkt (Abb. 4-46 A, B; 4-47 a-b1). Im Stadium der Dysplasie und Hyperplasie waren GI-GPx positive Strukturen bis tiefer in die Krypte hinein und verstärkt am Kryptengrund detektierbar. Dieser Befund intensivierte sich noch im Stadium G1 (Abb. 4-46 B; c-d1). In diesem Stadium waren sowohl die kernständige als auch die diffus zytoplasmatische GI-GPx IR verstärkt und auch weiter luminal vorhanden. Einhergehend mit einem fortschreitenden Verlust der Becherzellen in den Krypten ab Differenzierungsgrad G2 war ein leichter Verlust der strukturgebundenen Markierung und ein Übergang zu einer mehr kernständigen und zytoplasmatischen Verteilung feststellbar (Abb. 4-46 A-C; 4-47 d-e1). Die subzelluläre Lokalisation der GI-GPx IR blieb erhalten, so lange die Orientierung nach basal und luminal noch vorhanden war.

In der Lamina propria waren in allen Differenzierungsgraden außer G3 vereinzelt GI-GPx positive Zellen nachweisbar (Abb. 4-45; 4-47 f, f1).

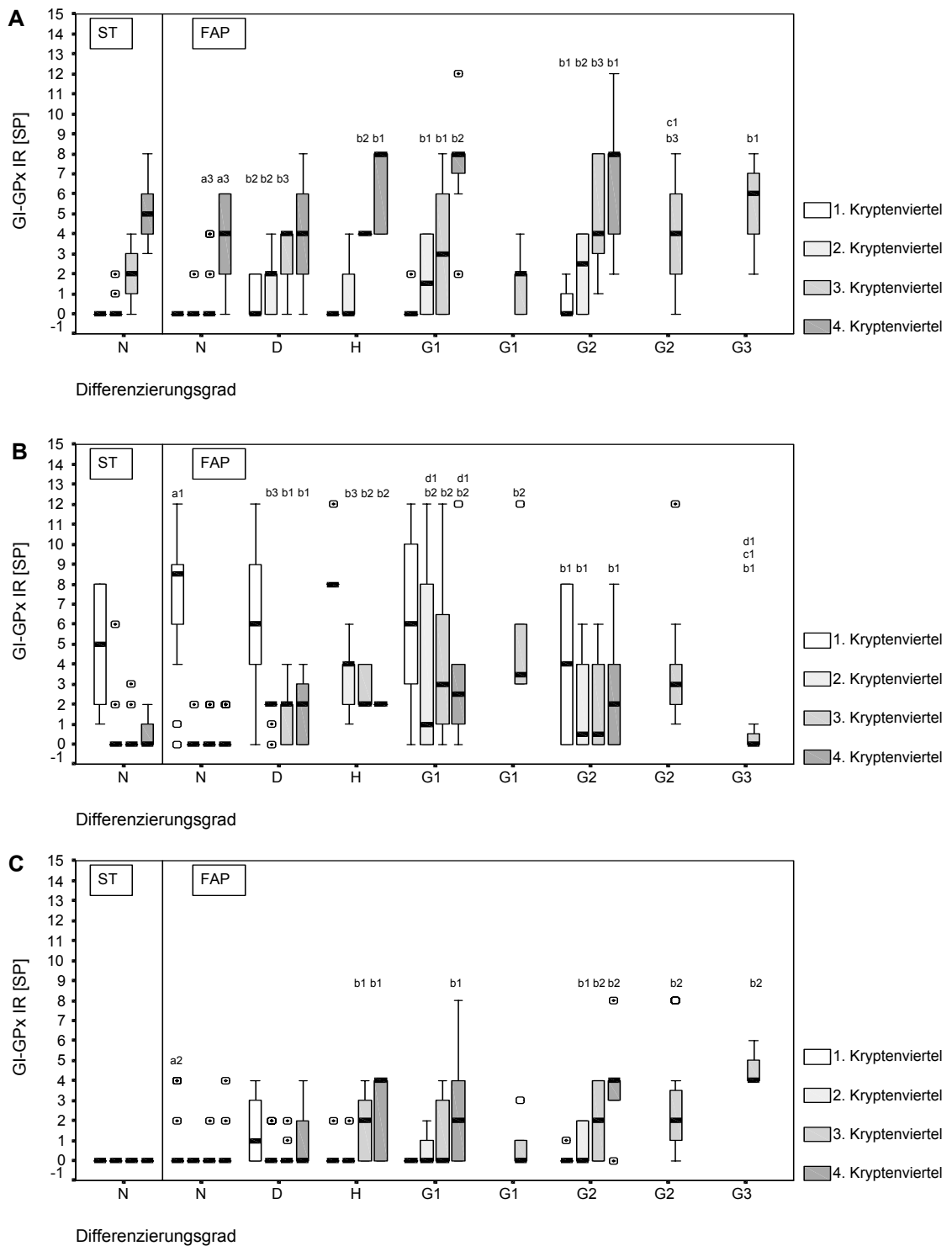


Abb. 4-46: GI-GPx IR, Kolonrektum/Rektum, human; Lamina epithelialis; **A** kernständig, Zytoplasma, **B** strukturgebunden apikal vom Zellkern, **C** diffus; morphologisch intaktes Gewebe, Differenzierungsgrade FAP; **a** signifikant verschieden von N-ST, **b** signifikant verschieden von N-FAP, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Differenzierungsgrad; **d** signifikant verschieden von ST mit gleichem Differenzierungsgrad (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$, 3 $p < 0,001$)

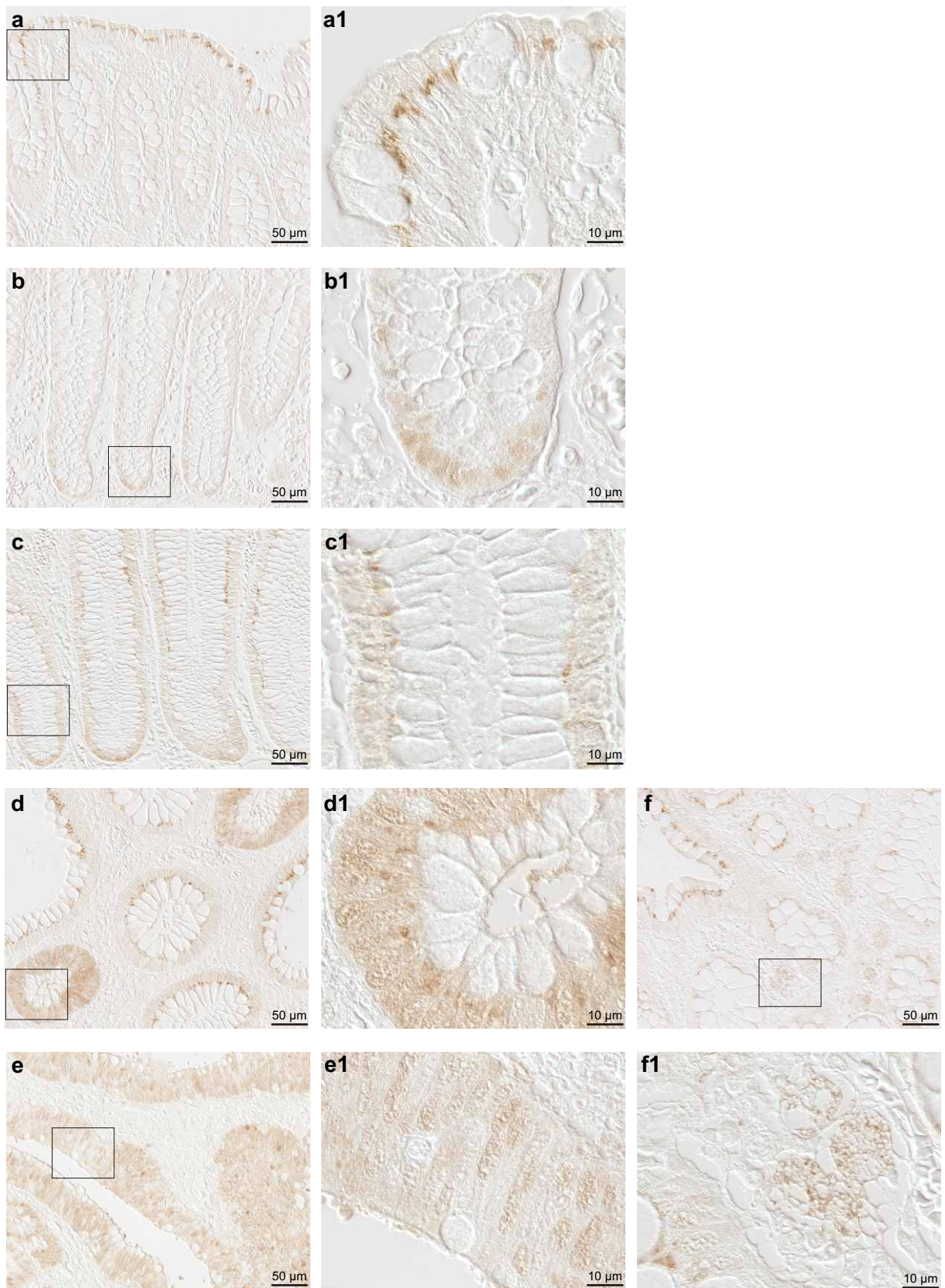


Abb. 4-47: **GI-GPx IR**, Dickdarm, human, Differenzierungsgrade, FAP;
a-b1 morphologisch intaktes Gewebe: **a** 1., 2. Kryptenviertel, **b** 3., 4. Kryptenviertel;
c-f1 Differenzierungsgrade: **c** Hyperplasie, **d** G1/G2, Lamina epithelialis,
e G3, Lamina epithelialis, **f** G1, Lamina propria, mobile Zellen

4.2.3.6.4 Kolorektales Gewebe von CED-Patienten

Im Stadium 1 der Entzündung war eine kernständige GI-GPx IR im untersten Kryptenviertel und in geringerem Maße im 3. Kryptenviertel nachzuweisen. Dort zeigte sich auch eine schwache, diffuse IR im Zytoplasma, selten eine strukturegebundene IR apikal vom Zellkern. Das Saumepithel wies fokale strukturegebundene IR auf (Abb. 4-48 A-C; 4-49 a-a2). Die strukturegebundene und die kernständige IR waren im Entzündungsgrad 1 schwächer, die diffus zytoplasmatische IR war stärker ausgeprägt als im Normalbefund. Mit zunehmendem Grad der Entzündung zog sich die typische strukturegebundene Enzymlokalisierung tiefer in die Krypten hinein. Auch die kernständige und diffus zytoplasmatische IR in den Kryptengründen waren in Stadium 2 und 3 verstärkt und nach luminal ausgedehnt (Abb. 4-48 A-C; 49 b-d1). Dieser Befund war im Kolon tendenziell stärker ausgeprägt als im Rektosigmoid. In der Lamina propria und der Tela submucosa ließen sich mit fortschreitender Entzündung GI-GPx positive Zellen nachweisen. In diesen Zellen färbten sich ebenfalls ringförmige Strukturen innerhalb des Zytoplasmas (Abb. 4-45; 49 e, e1). Proben von MC-Patienten zeigten eine tendenziell ähnliche GI-GPx IR (Abb. 4-48 A-C; 4-49 f-f2).

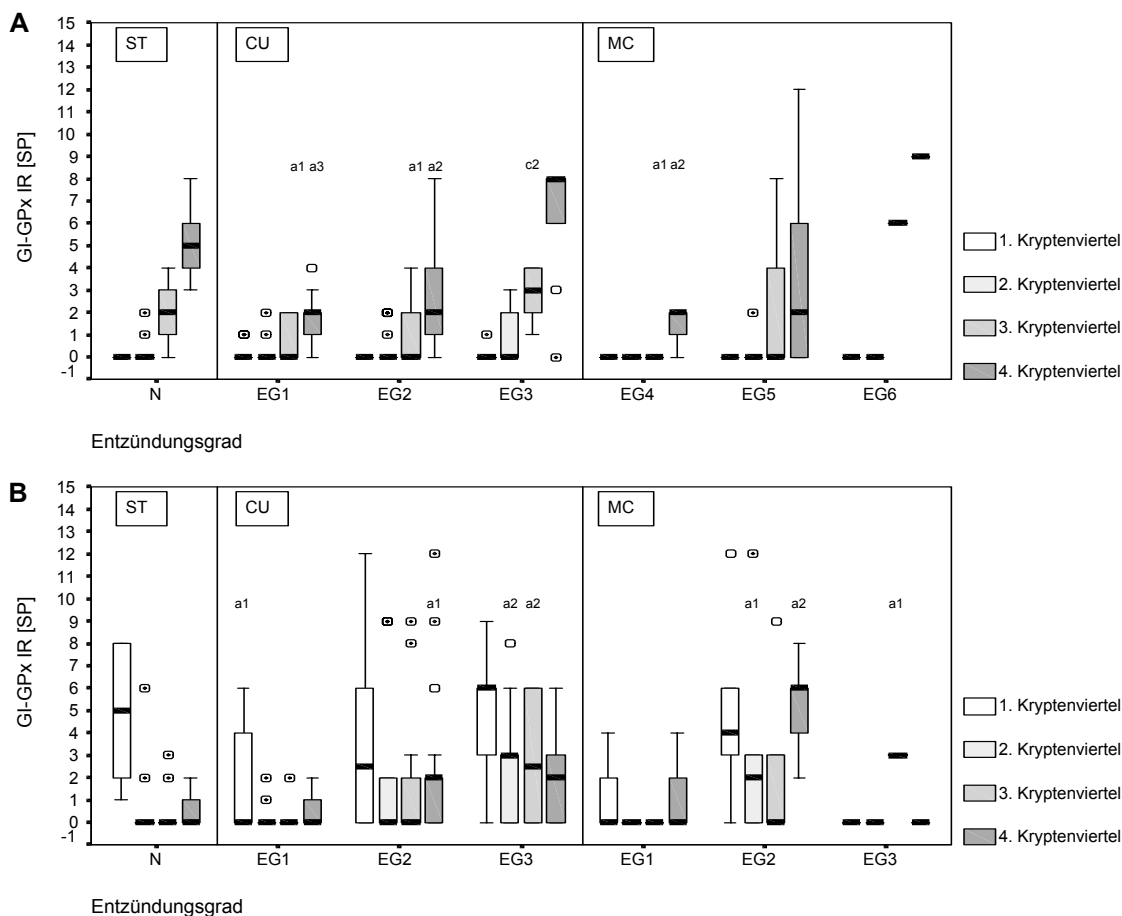


Abb. 4-48: Fortsetzung auf der folgenden Seite

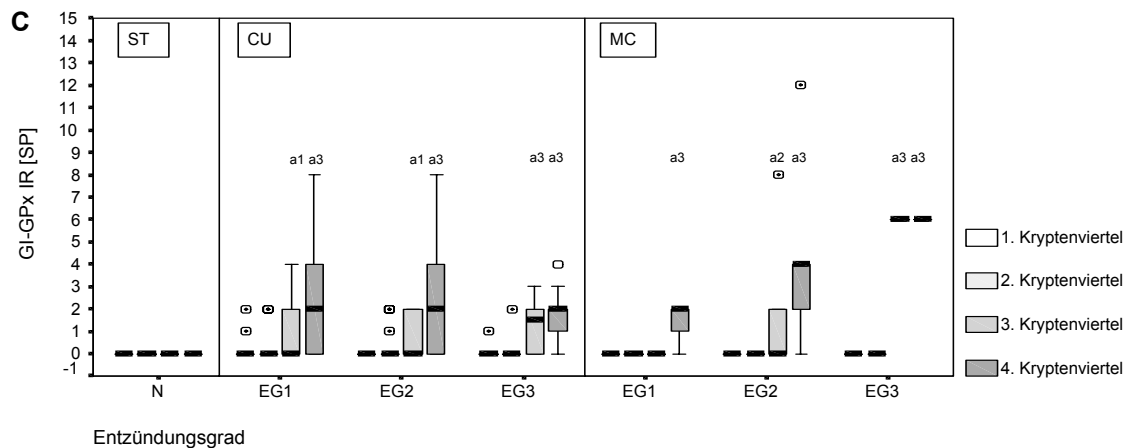


Abb. 4-48: GI-GPx IR, Kolorektum, human; Lamina epithelialis; **A** kernständig, Zytoplasma, **B** strukturgebunden apikal vom Zellkern, **C** diffus; morphologisch intaktes Gewebe, Entzündungsgrade CU, MC; **a** signifikant verschieden von N-ST, **c** signifikant verschieden vom vorhergehenden Entzündungsgrad (**1** $p < 0,05$, **2** $p < 0,01$, **3** $p < 0,001$)

4.2.3.6.5 Subzelluläre Lokalisation der GI-GPx

Es wurde vermutet, dass die strukturgebundene GI-GPx Fraktion apikal vom Zellkern der Epithelzellen im Golgi Apparat lokalisiert ist. Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungsexperimente mit dem GI-GPx-Antiserum und Antikörpern gegen die Golgi-Marker β -COP, TGN 38 (Trans-Golgi Netzwerk) und das Golgi p58K Protein bestätigten dies nicht (Abb. 4-50 a-c).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die strukturgebundene Enzymfraktion im selben Zellkompartiment exprimiert wird wie Calnexin. Calnexin ist ein integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums (Abb. 4-50 e-j).

4.3 DMH-Tumormodell der Ratte

4.3.1 DMH-Modell und RS III: Inzidenz und Verteilung der Tumore

Nach wöchentlicher 1,2-DMH-Injektion mit 20 mg/kg Körpergewicht über 20 Wochen entwickelten 5 von 12 Kontrolltieren jeweils einen, ein Tier 2 Tumore im Kolon. In der Gruppe mit RS III konnte bei keinem von 8 Tieren eine Tumorentwicklung nachgewiesen werden ($p < 0,05$).

Die durchschnittliche Tumorgöße betrug $3,3 \text{ mm} \pm 2,6$. Die Verteilung der Tumore entlang des Kolons und ihre Dignität ist aus Tabelle 4-2 zu entnehmen. Die Tumore waren überwiegend tubuläre und muzinöse Adenokarzinome (Abb. 4-51 d, i).

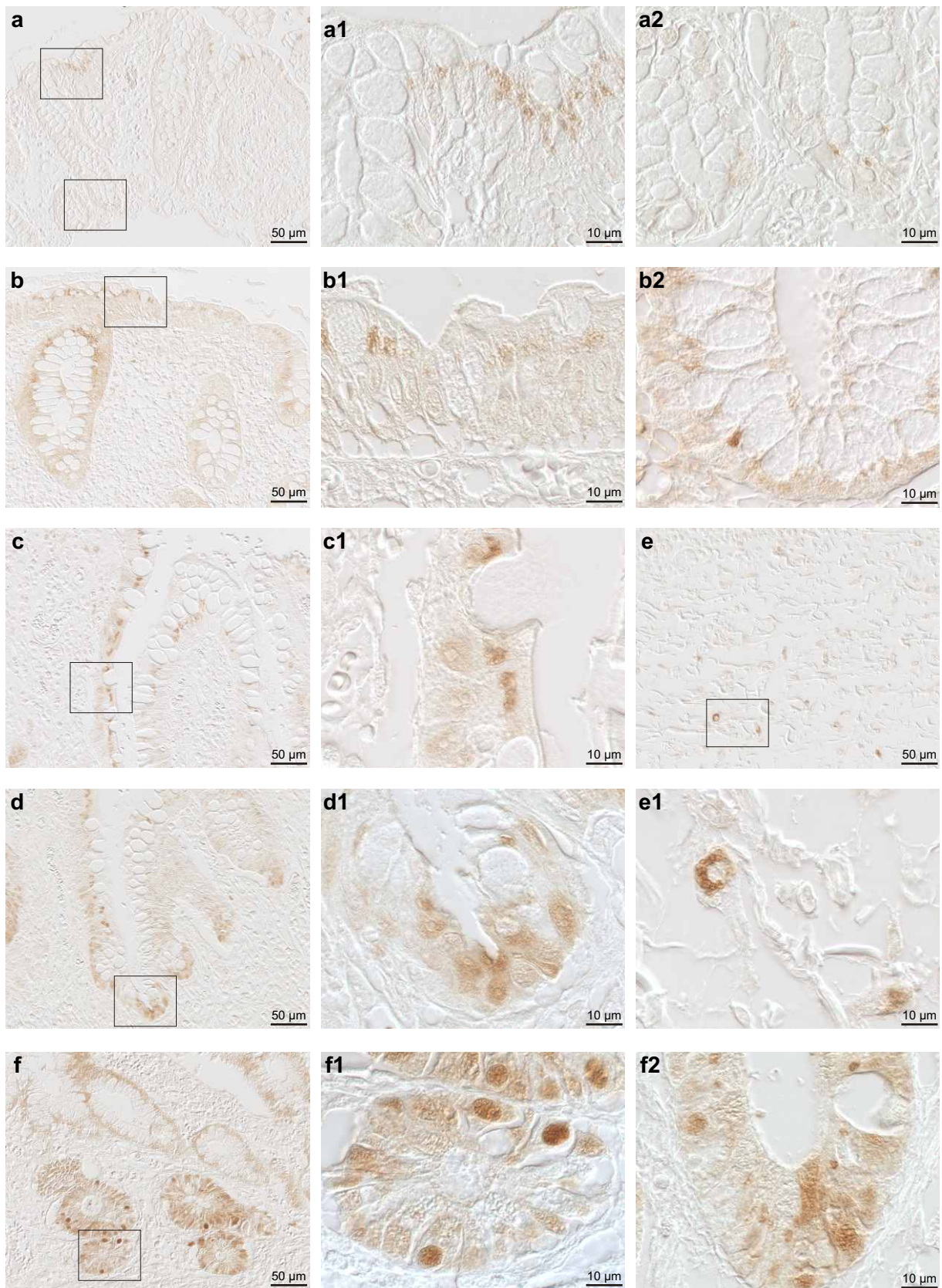


Abb. 4-49: **GI-GPx IR**, Dickdarm, human, Entzündungsgrade CED;
a-e1 CU: **a** EG1; **b** EG2; **c-e1** EG3,
a1, b1, c1 1.Kryptenviertel, **a2, b2, d1** 4. Kryptenviertel, **e** Tela submucosa;
f MC: EG3, 3., 4. Kryptenviertel

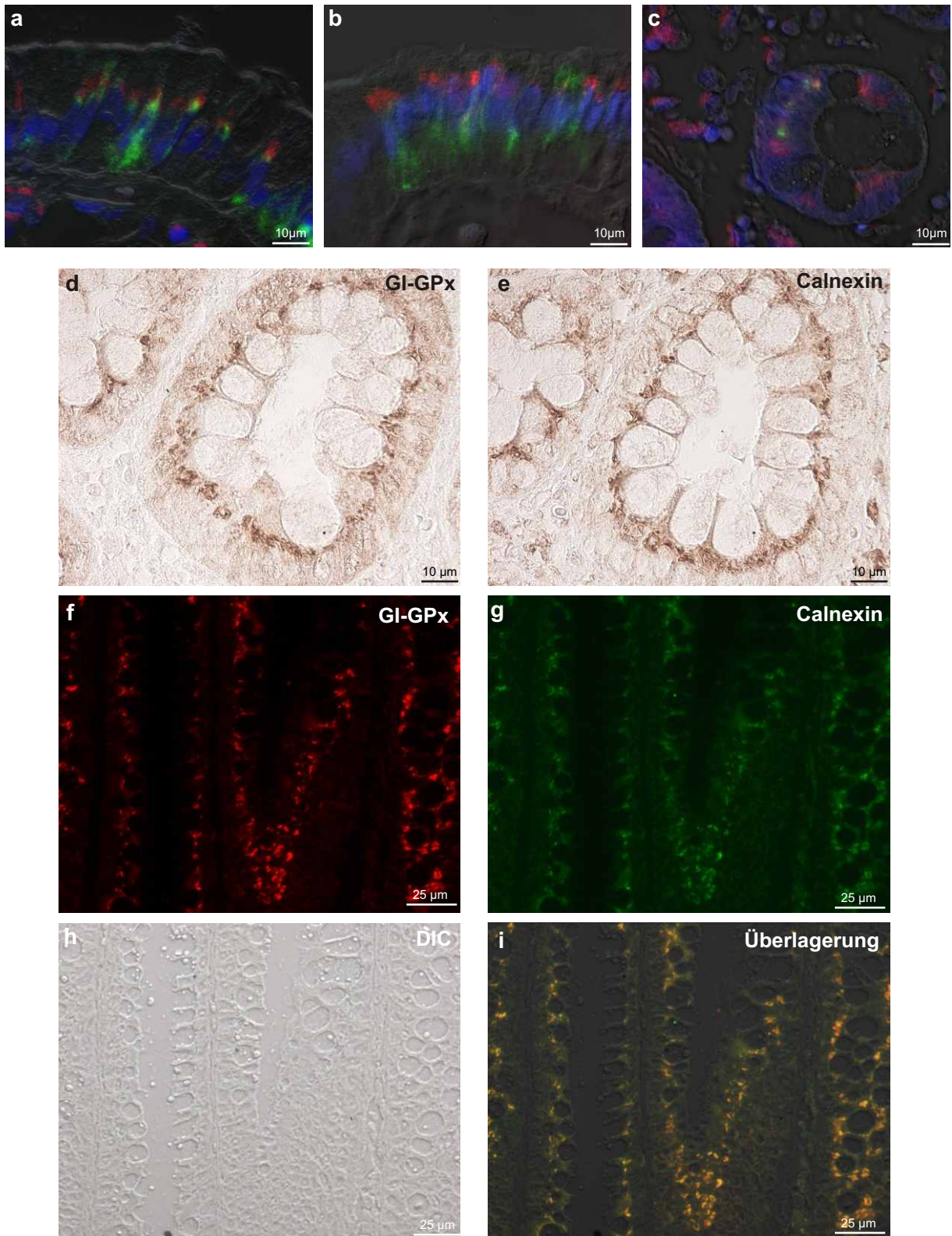


Abb. 4-50: **subzelluläre Lokalisation der GI-GPx**; Dickdarm, human;
a-c morphologisch intakte Mukosa; überlagerte Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie; Doppelmarkierung der GI-GPx (Cy3, rot) mit verschiedenen Golgi-Markern: **a** -COP (Cy2, grün), **b** TGN38 (Cy2, grün), **c** Golgi 58K Protein (Cy2, grün); Kernfärbung, Hoechst (blau); **d-i** ST, G1; **e, f** Einfachmarkierung: **e** GI-GPx, **f** Calnexin; **f-i** Doppelmarkierung: **f** GI-GPx (Cy3, rot), **g** Calnexin (Cy2, grün), **h** Durchlicht/DIC, **i** Überlagerung von f, g, h; GI-GPx co-lokalisiert mit Calnexin im endoplasmatischen Retikulum.

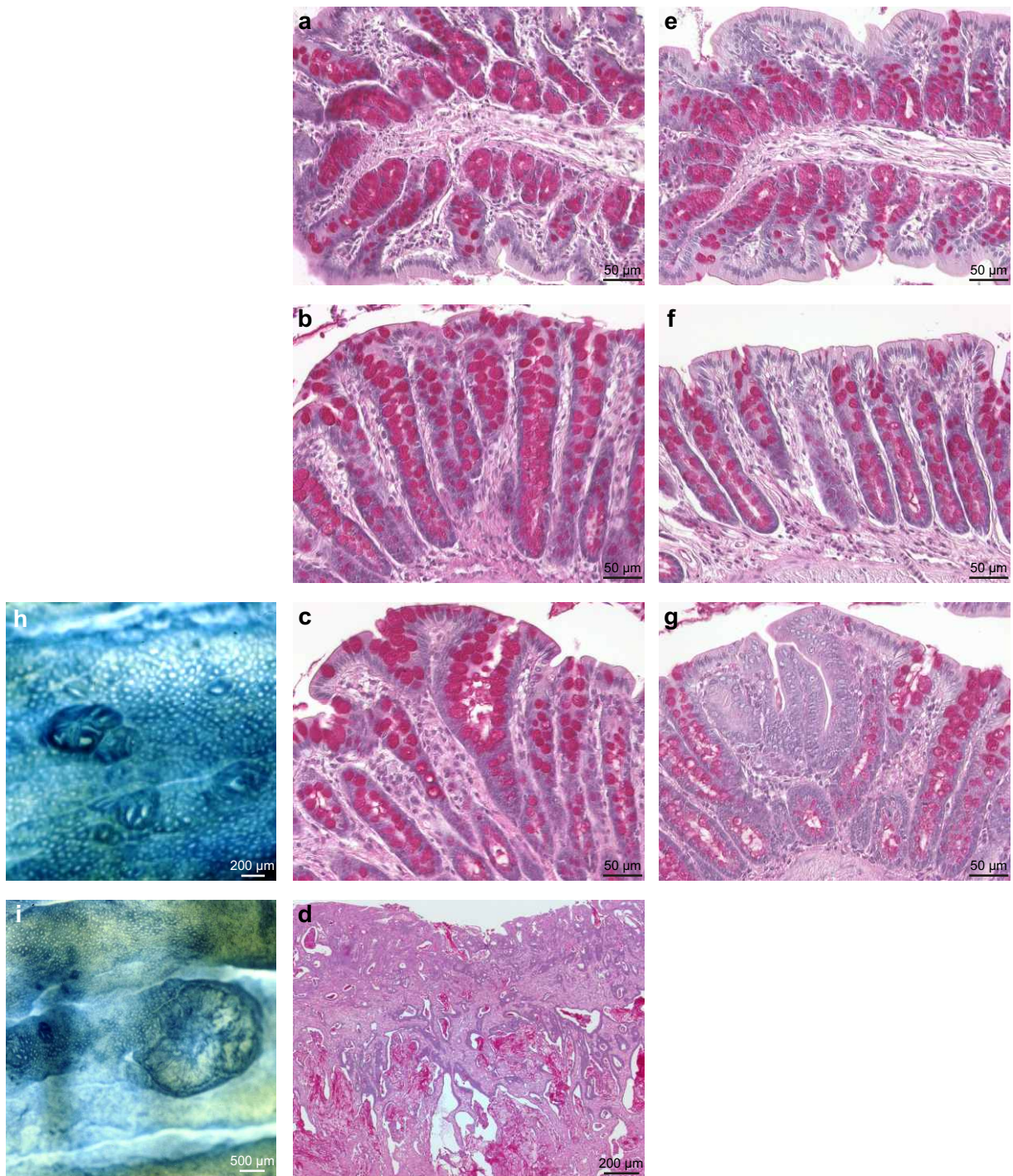


Abb. 4-51: **DMH-Modell**, Ratte, Kolon;
a-d, h, i Kontrollgruppe, **e-g** RS-Gruppe;
a, e proximal, **b, f** distal intakt; **c, g** distal ACF, **d** Adenokarzinom; PAS-Färbung;
h ACFs, **i** Adenokarzinom, Aufsicht auf den eröffneten Darm, Methylenblau-Färbung;

Tab. 4-2: Tumorverteilung entlang des Kolons in der Kontrollgruppe

Tumore	Prozent der Darmlänge									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Adenome				1						
Adenokarzinome			1		1	3	1			

Sowohl in der Kontroll- als auch in der RS-Gruppe entwickelten sich im distalen Kolon aberrante Kryptfoci (ACFs) (Abb. 4-51 c, g, h). Anzahl und Größe der ACFs waren nach RS III-Gabe tendenziell vermindert. Hyperplastische und zystische Veränderungen der Schleimhaut traten nicht auf.

4.3.2 DMH-Modell und RS III: Immunhistochemie

Im folgenden Kapitel sind die Befunde der immunhistochemischen Untersuchungen zur Verteilung der 8-LOX, COX-, NOS-Isoenzyme, der GI-GPx und des Hitzeschockproteins 25 (HSP25) im Dickdarm von DMH-Ratten in der Kontroll- und der RS-Gruppe ausgewiesen. Morphologisch intaktes proximales und distales Kolongewebe wurde vergleichend untersucht. Die Befunde für ACFs und Tumorgewebe wurden mit denen von umliegendem, intaktem distalen Gewebe verglichen. Es wurden je 4 Tiere pro Futtergruppe untersucht.

4.3.2.1 8-LOX

8-LOX ist das murine Homolog der 15-LOX-2. Das Enzym war im proximalen Kolon in mobilen Zellen in Gefäßen und in Gefäßnähe in der Tela submucosa nachweisbar. In der Lamina propria färbten sich sehr selten mobile Zellen. Die IR war diffus verteilt oder strukturegebunden im Zytoplasma angeordnet. Vereinzelt war eine schwach diffuse und z. T. auch strukturegebundene IR im Zytoplasma einzelner Saumzellen detektierbar (Abb. 4-52 A, B; 4-53 a, a1).

Im distalen Kolon war die IR im Saumepithel leicht verstärkt, einzelne Zellen traten hervor. In wenigen Krypten fand sich auch eine IR bis ins 2. Viertel hinein bzw. am Kryptengrund. In der Tiefe der Faltung des Saumepithels war das Signal häufig verstärkt. Die IR in den Stromazellen entsprach der im proximalen Kolon (Abb. 4-52 A, B; 4-53 b-b3).

Aberrante Krypten zeigten keine signifikanten Unterschiede in der 8-LOX IR im Vergleich zum umliegenden intakten Gewebe (Abb. 4-52 A, 4-53 c). Auch im Tumorepithel war keine signifikante Veränderung in der 8-LOX IR feststellbar. Im Tumorstroma waren tendenziell weniger positive Zellen nachweisbar (Abb. 4-52 A, B; 4-53 d, d1).

Die Gabe von RS hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilungsmuster der 8-LOX (Abb. 4-52 A, B, 4-53 e-g).

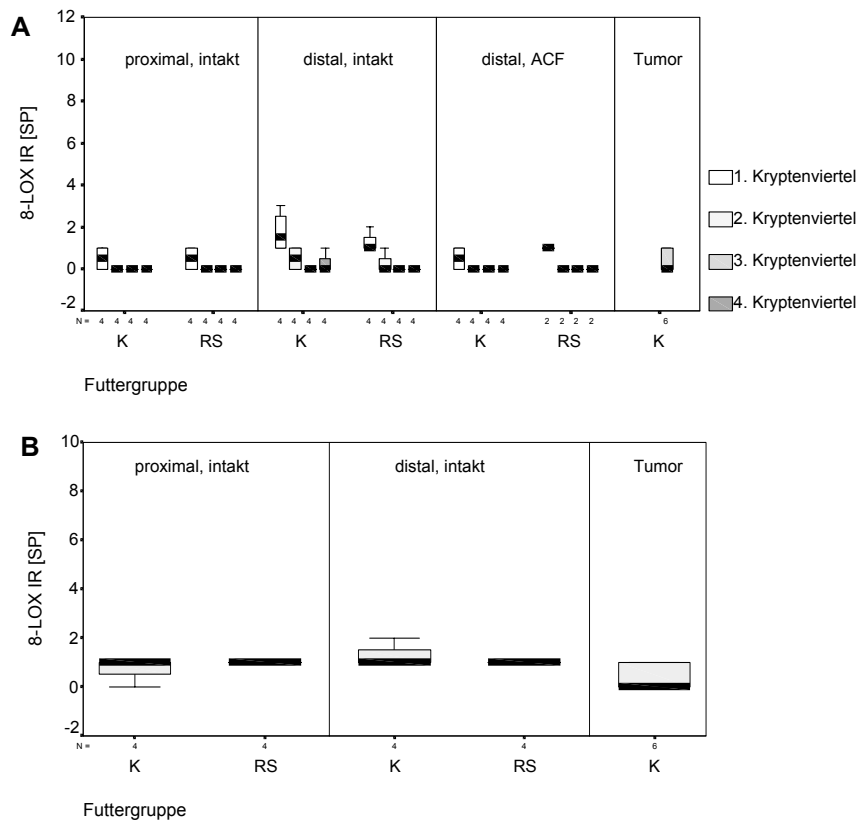


Abb. 4-52: 8-LOX IR, DMH-Modell, Ratte, Kolon; morphologisch intakte proximale und distale Mukosa, ACFs, Tumore; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); **A** Epithel, Zytoplasma; **B** Lamina propria, mobile und fixe Zellen, Zytoplasma

4.3.2.2 COX-1

Im Epithel des proximalen Kolons waren keine COX-1 immunreaktiven Zellen nachweisbar. In der Lamina propria waren mobile Zellen - hauptsächlich in der Nähe der luminalen Oberfläche - COX-1 positiv (Abb. 4-54 A, B; 4-55 a, a1). Selten markierten sich in dieser Schicht Fibrozyten und Myofibroblasten. Die stärkste COX-1 IR zeigten Zellen der Tunica muscularis und der Lamina muscularis mucosae (Abb. 4-55 a2). Das Endothel kleinerer Gefäße in der Lamina propria und auch der Tela submucosa war immunreaktiv. Es markierten sich in allen positiven Zellen membranartige Strukturen, die dem Zellkern auflagen oder auch im Zytoplasma verteilt waren.

In den Krypten des distalen Kolons wurden bevorzugt in den oberen beiden Kryptenvierteln immunreaktive Zellen nachgewiesen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Zell-Infiltrate. In direkter Nähe von Lymphfollikeln traten gehäuft COX-1 positive Zellen auf. In allen anderen Darmschichten entsprachen die Befunde denen des proximalen Kolons (Abb. 4-54 A, B; 4-55 b-b2, h, h1).

Die COX-1 IR in ACFs unterschied sich nicht wesentlich vom umliegenden intakten Gewebe (Abb. 4-54 A, 4-55 c). Im Tumorepithel entsprach das Muster positiver Zellen dem in

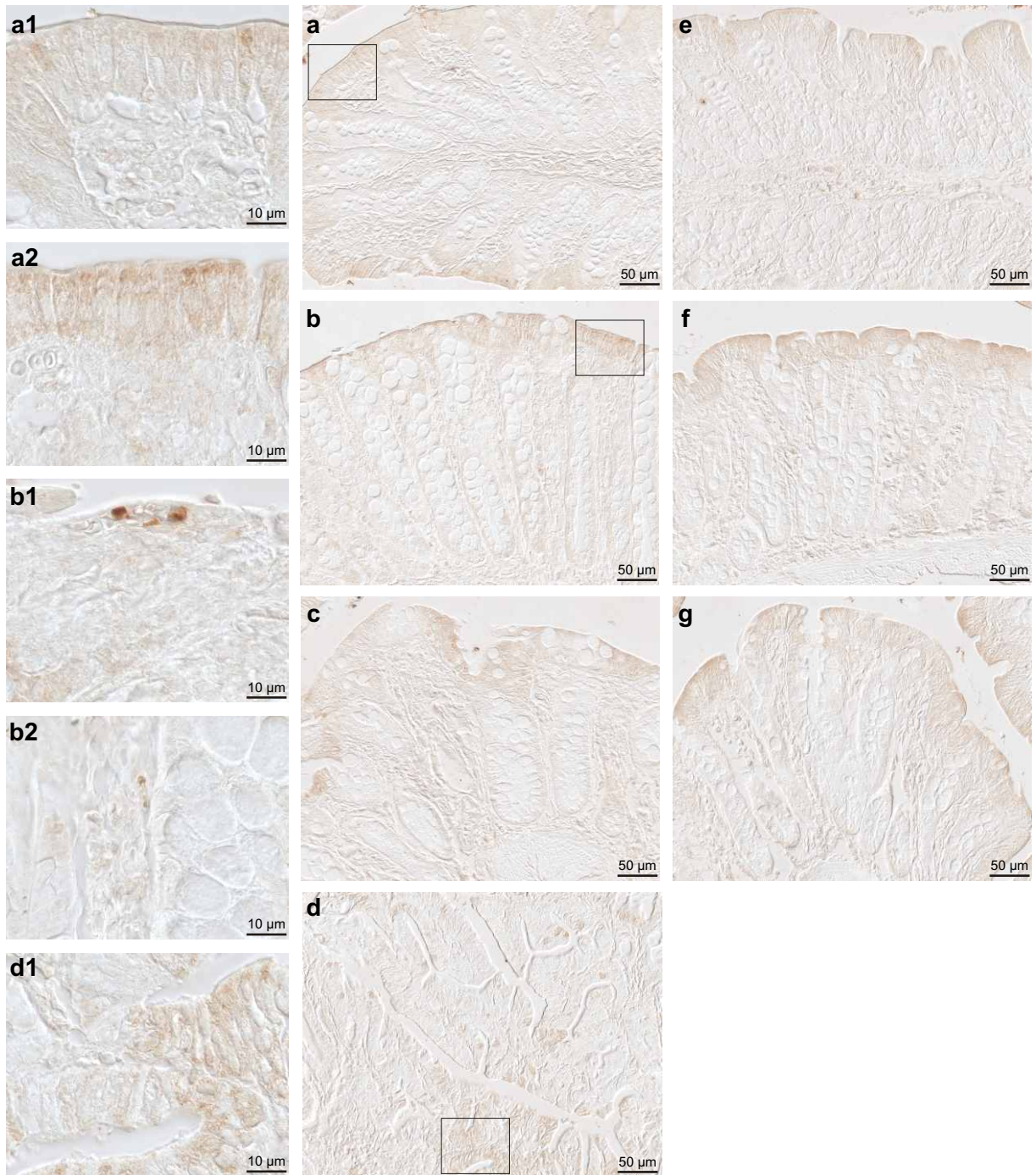


Abb. 4-53: **8-LOX IR**, DMH-Modell, Ratte, Kolon;
a-d Kontrollgruppe, **e-g** RS-Gruppe;
a, e proximal, **b, f** distal intakt, **c, g** distal ACF, **d** Tumor;
a1, a2 1. Kryptenviertel, **b1** Lamina propria, mobile Zellen, **b2** Lamina propria, fixe Zellen, **d** Tumor, Lamina epithelialis

Normalgewebe. Das Tumorstroma wies hingegen eine signifikant stärkere COX-1 IR auf, besonders am luminalen Tumorrand (Abb. 4-54 A, B; 4-55 d, d1).

Unter RS traten sowohl im proximalen als auch im distalen Kolon signifikant häufiger COX-1 positive Zellen in den Krypten und der Lamina propria auf als in der Kontrollgruppe (Abb. 4-54 A, B, 4-55 e-g). Zellen der Lamina muscularis mucosae, der Tunica muscularis und das Endothel reagierten in beiden Darmabschnitten vergleichsweise intensiver.

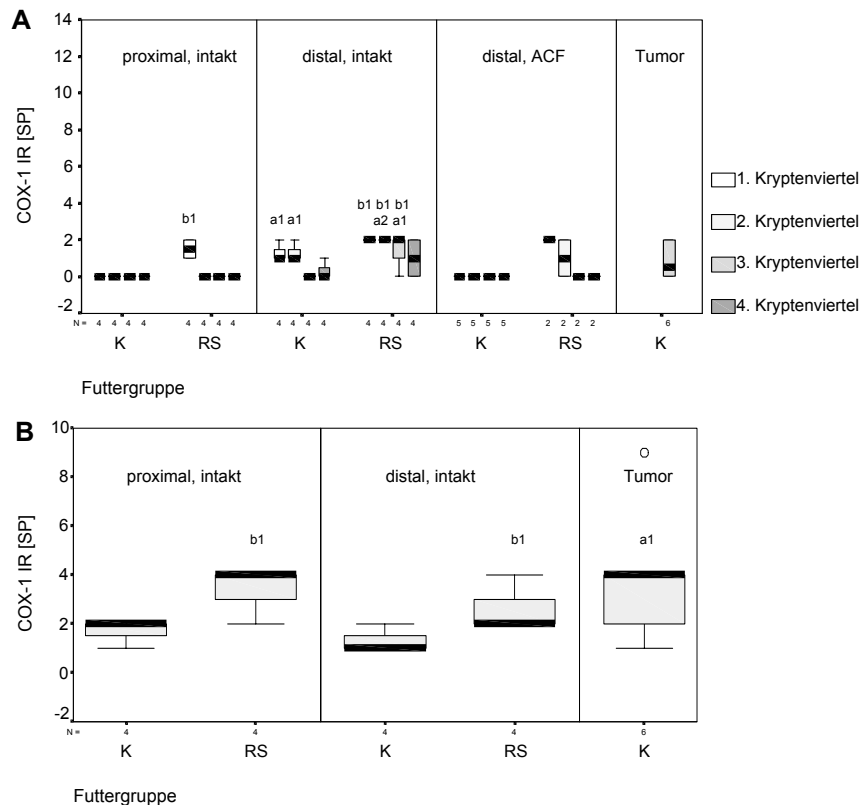


Abb. 4-54: COX-1 IR, DMH-Modell, Ratte, Kolon; morphologisch intakte proximale und distale Mukosa, ACFs, Tumore; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); **A** Epithel, Zytoplasma; **B** Lamina propria, mobile und fixe Zellen, Zytoplasma; **a** signifikant verschieden innerhalb derselben Futtergruppe, **b** RS-Gruppe signifikant verschieden von der Kontrollgruppe (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$)

4.3.2.3 COX-2

Die Verteilung der COX-2 wurde an seriellen Schnitten mit einem monoclonalen (mc) und einem polyclonalen (pc) Antikörper untersucht.

COX-2 mc

In den Krypten des proximalen Kolons konnten nur sehr vereinzelt immunreaktive Zellen nachgewiesen werden. Sie fanden sich bevorzugt in den oberen 3 Kryptenvierteln. Möglicherweise handelt es sich dabei um Zell-Infiltrate (Abb. 4-56 A). In der Lamina propria waren große Rundzellen, besonders in der Nähe des Lumens, immunreaktiv. Seltener färbten sich Fibrozyten und Myofibroblasten. Die Markierung der immunpositiven Zellen war

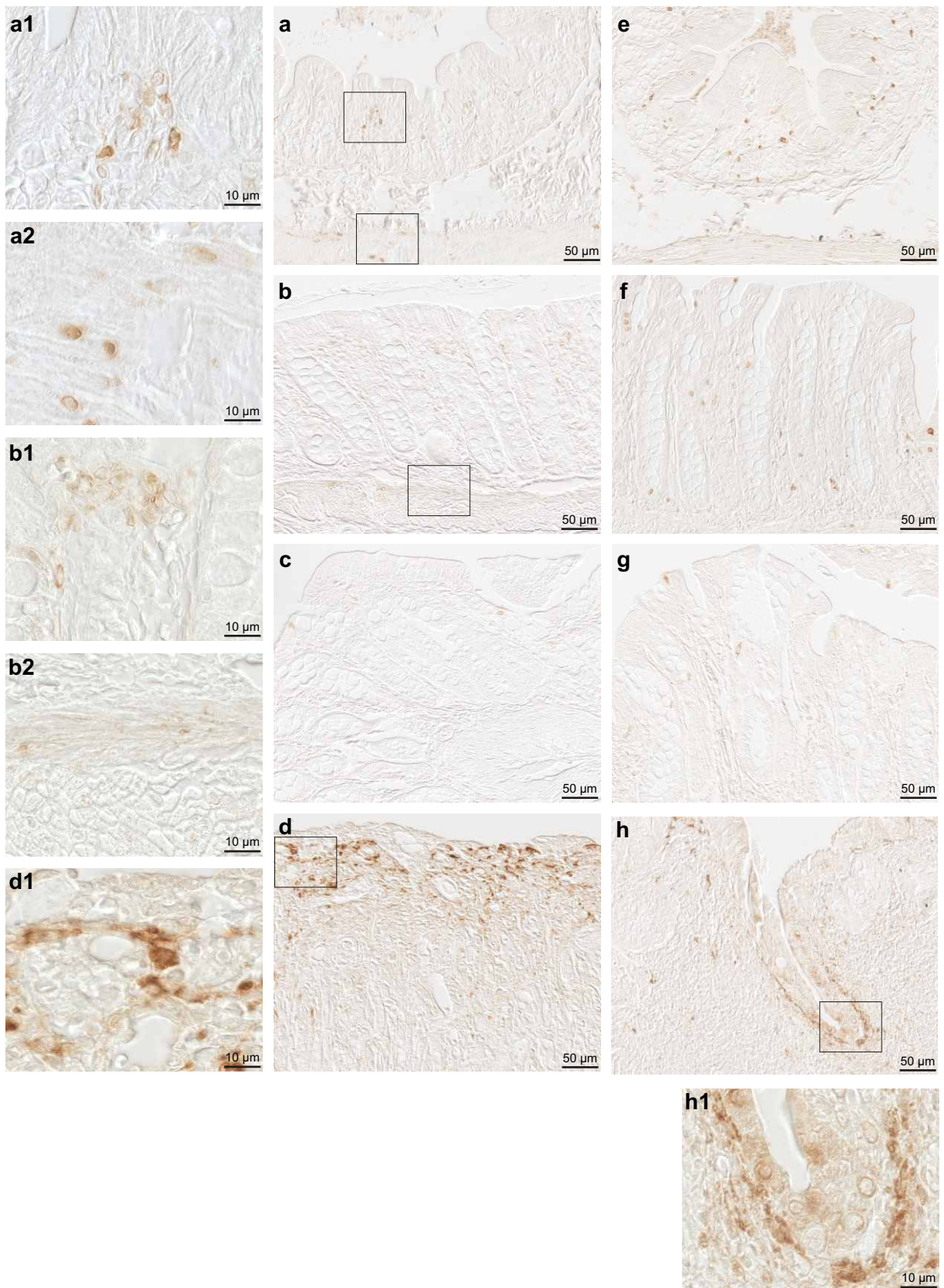


Abb. 4-55: **COX-1 IR**, DMH-Modell, Ratte, Kolon;
a-d Kontrollgruppe, **e-g, h** RS-Gruppe;
a, e proximal, **b, f** distal intakt, **c, g** distal ACF, **d** Tumor; **h** Lymphfollikel;
a1, b1, d1 Lamina propria, **a2** Tunica muscularis, **b2** Lamina muscularis mucosae,
h1 Lymphfollikel, Lamina epithelialis

strukturgebunden, perinukleär bzw. in vesikelartigen Strukturen im Zytoplasma in Kernnähe (Abb. 4-56 B; 4-57 a, a1). Ohne Regelmäßigkeit färbten sich Endothelzellen in der Lamina propria und der Tela submucosa (Abb. 4-57 a2). Starke Signale fanden sich in den Zellen der Tunica muscularis und in geringerem Maße in der Lamina muscularis mucosae. Auch hier war eine strukturgebundene zytoplasmatische IR nachweisbar (Abb. 57 a, a3). Im Plexus myentericus waren ebenfalls immunreaktive Zellen detektierbar.

Im distalen Kolon konnten häufiger COX-2 positive Zellen in allen Kryptenabschnitten in der bereits beschriebenen strukturgebundenen Lokalisation festgestellt werden. In der Nähe von Lymphfollikeln war diese IR noch verstärkt (Abb. 4-56 A; 5-57 b, b1, e, e1). Zusätzlich zeigten einige Saumzellen eine schwach diffus zytoplasmatische IR. Im distalen Kolon wurden signifikant weniger immunreaktive Zellen in der luminalen Lamina propria nachgewiesen (Abb. 4-56 B). Zellen der Lamina muscularis mucosae (Abb. 4-57 b2) zeigten eine leicht verstärkte, Zellen der Tunica muscularis eine schwächere IR als im proximalen Kolon.

Aberrante Krypten unterschieden sich in der COX-2 mc-Expression nicht wesentlich vom umliegenden intakten Gewebe (Abb. 4-56 A; 4-57 c). Das Tumorepithel zeigte im Verlauf der Entdifferenzierung kein verändertes COX-2-Muster. Am luminalen Rand des Tumorstromas konnten jedoch signifikant häufiger stark COX-2 positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4-56 A, B; 4-57 d, d1).

Unter dem Einfluss der RS-Diät traten in den Krypten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. In den Zellen der proximalen Lamina propria war eine signifikant geringere COX-2 IR feststellbar (Abb. 4-56 A, B; 4-57 e-g).

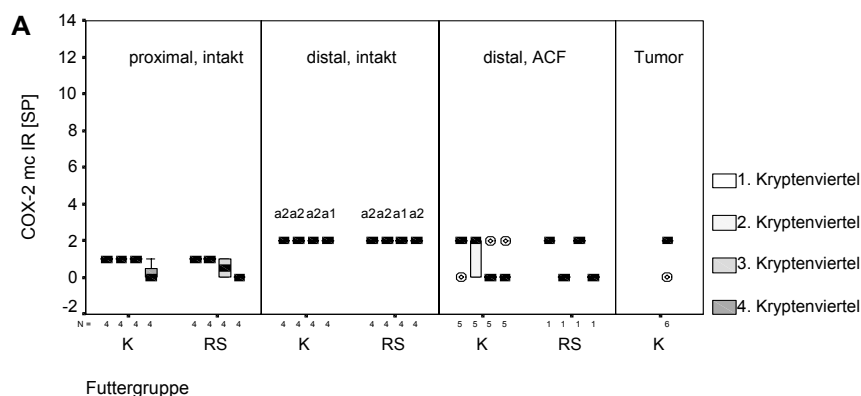


Abb. 4-56: Fortsetzung auf der folgenden Seite

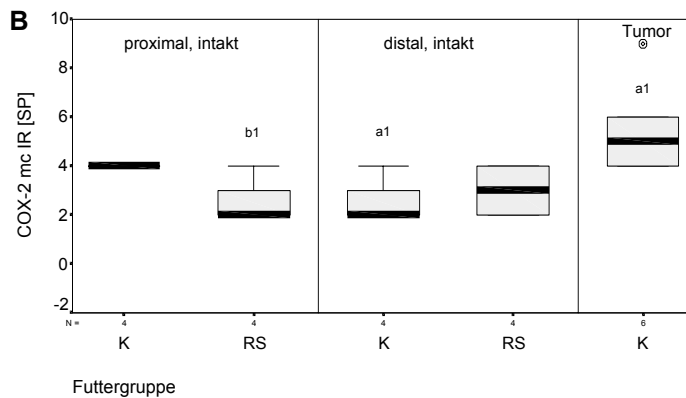


Abb. 4-56: COX-2 mc IR, DMH-Modell, Ratte, Kolon; morphologisch intakte proximale und distale Mukosa, ACFs, Tumore; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); **A** Epithel, Zytoplasma; **B** Lamina propria, mobile und fixe Zellen, Zytoplasma; **a** signifikant verschieden innerhalb derselben Futtergruppe, **b** RS-Gruppe signifikant verschieden von der Kontrollgruppe (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$)

COX-2 pc

Im proximalen Kolon von Kontrolltieren war eine COX-2 pc IR am häufigsten in den Zellen am Kryptengrund nachweisbar. Die IR nahm in Richtung Lumen ab. Es markierten sich feinste membranartige ringförmige Strukturen im Zytoplasma, oft Becherzellvakuolen umgebend. Im Saumepithel traten deutlich weniger COX-2 pc immunreaktive Zellen auf. Hier zeigten Einzelzellen oder Gruppen von Zellen sowohl eine strukturgebundene als auch eine stark diffus zytoplasmatische Färbung (Abb. 4-58 A, B; 4-59 a-a2). Vereinzelt konnte in mobilen Zellen der Lamina propria eine strukturgebundene zytoplasmatische IR festgestellt werden (Abb. 4-58 C). Sehr selten waren positive Signale in Myofibroblasten und Fibrozyten. Im Gegensatz dazu wurden im distalen Kolon nur vereinzelt COX-2 pc immunreaktive Zellen im Saumepithel und seltener in den unteren 3 Kryptenvierteln nachgewiesen. Eine verstärkte IR trat in den Krypten in direkter Nähe von Lymphfollikeln auf. Auch hier markierten sich ringförmige Strukturen, die wiederum zusammengelagert erschienen. Seltener fand sich im Saumepithel eine diffus zytoplasmatische IR (Abb. 4-58 A, B; 4-59 b, b1, h, h1). In den Zellen der Lamina propria waren seltener Signale detektierbar als in entsprechendem proximalen Gewebe (Abb. 4-58 C).

Aberrante Krypten waren durch eine ähnliche COX-2 pc IR charakterisiert wie intakte Krypten des distalen Dickdarms (Abb. 4-58 A, B; 4-59 c). In mäßig bis schlecht differenziertem Tumorepithel konnten keine Signale nachgewiesen werden. Die IR in den Zellen des Tumorstromas unterschied sich kaum von der in vergleichbarem, intaktem Gewebe (Abb. 4-58 A-C; 4-59 d, d1).

Unter dem Einfluss von RS änderte sich die COX-2 pc IR nicht signifikant. Im proximalen Dickdarm waren tendenziell mehr immunreaktive Epithelzellen am Kryptengrund sowie eine leicht vermehrte Anzahl stärker immunreaktiver Zellen im Saumepithel zu verzeichnen.

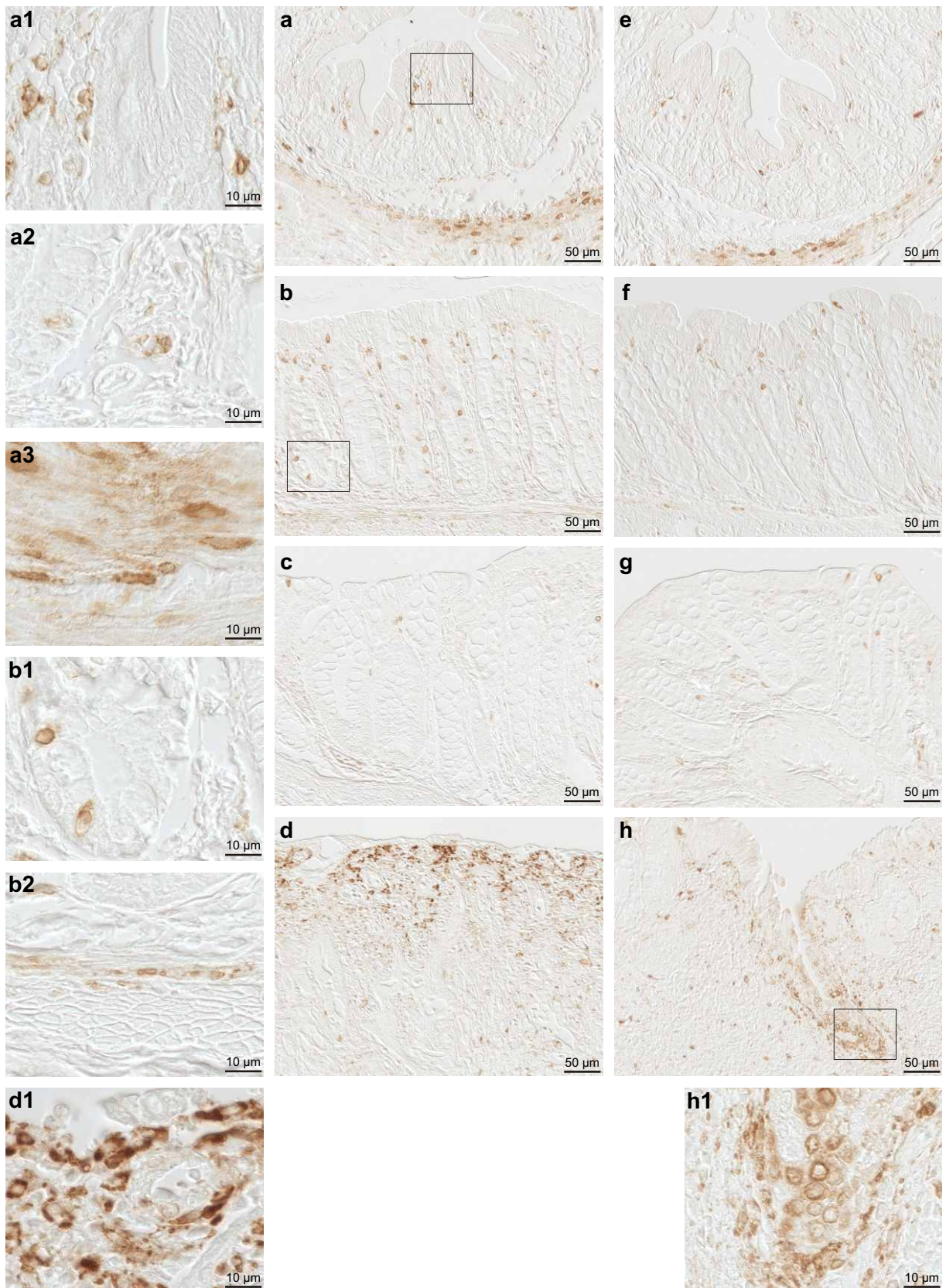


Abb. 4-57: **COX-2 mc IR**, DMH-Modell, Ratte, Kolon;
a-d Kontrollgruppe, **e-g, h** RS-Gruppe;
a, e proximal, **b, f** distal intakt, **c, g** distal ACF, **d** Tumor, **h** Lymphfollikel;
a1, a2 Lamina propria, **a3** Tunica muscularis, **b1 4.** Kryptenviertel, **b2** Lamina muscularis mucosae, **d1** Tumor, Lamina propria, **h1** Lymphfollikel, Lamina epithelialis

Distal konnte ebenfalls eine Häufung COX-2 pc positiver Zellen im Saumepithel beobachtet werden (Abb. 4-58 A-C; 4-59 e, f, f1, g).

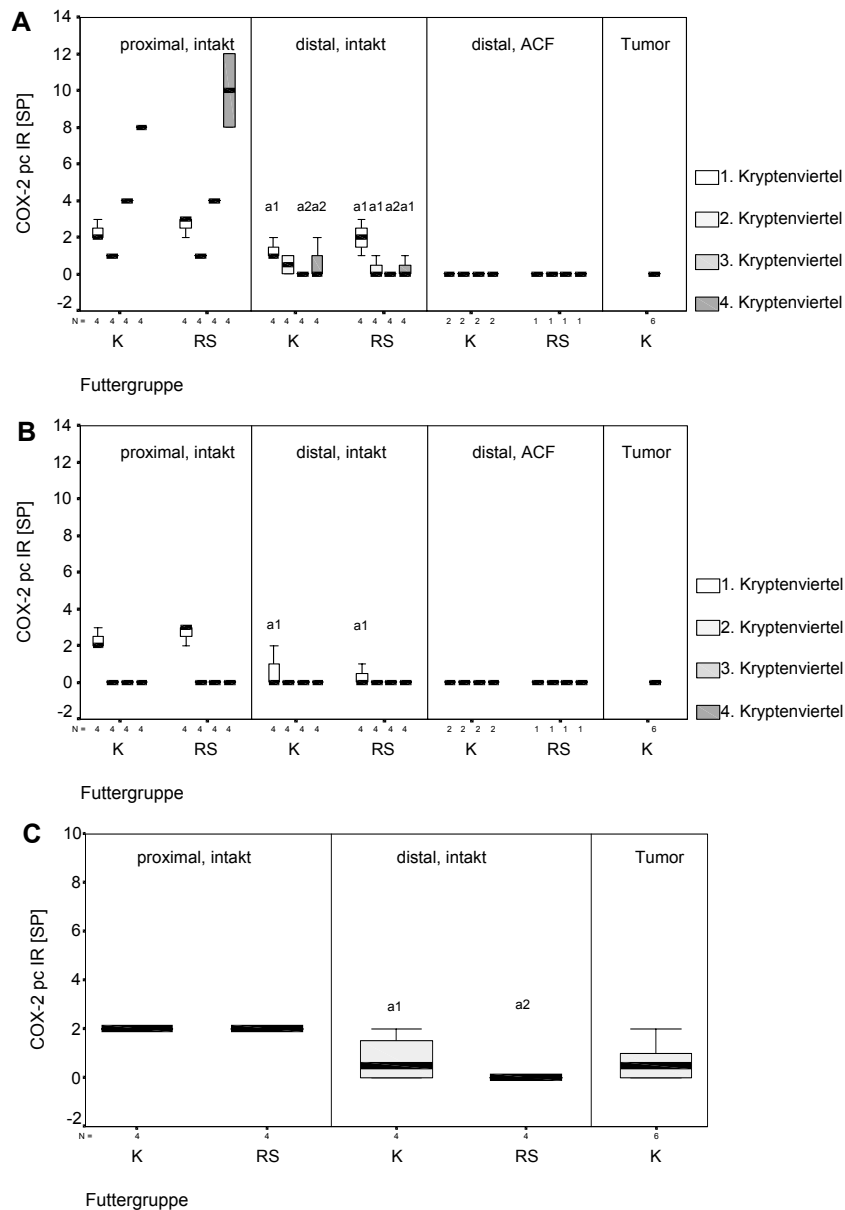


Abb. 4-58: COX-2 pc IR, DMH-Modell, Ratte, Kolon; morphologisch intakte proximale und distale Mukosa, ACFs, Tumore; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); Epithel, Zytoplasma, **A** strukturgebunden, **B** diffus; **C** Lamina propria, mobile Zellen, Zytoplasma; **a** signifikant verschieden innerhalb derselben Futtergruppe (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$)

4.3.2.4 iNOS

Im proximalen Kolon fand sich die intensivste iNOS IR am Kryptengrund. Es markierten sich ringförmige Strukturen im Zytoplasma der Epithelzellen. Diese IR war seltener im 3. und 2. Kryptenviertel zu finden. Im Saumepithel zeigten Zellen einzeln und auch fokale gehäuft eine IR. Diese war diffus zytoplasmatisch oder strukturgebunden (Abb. 4-60 A, B; 4-61 a-a2). Vereinzelt markierten sich membranartige zytoplasmatische Strukturen in mobilen Zellen der Lamina propria und auch in Zellen des Plexus myentericus (Abb. 4-60 C; 4-61 a3).

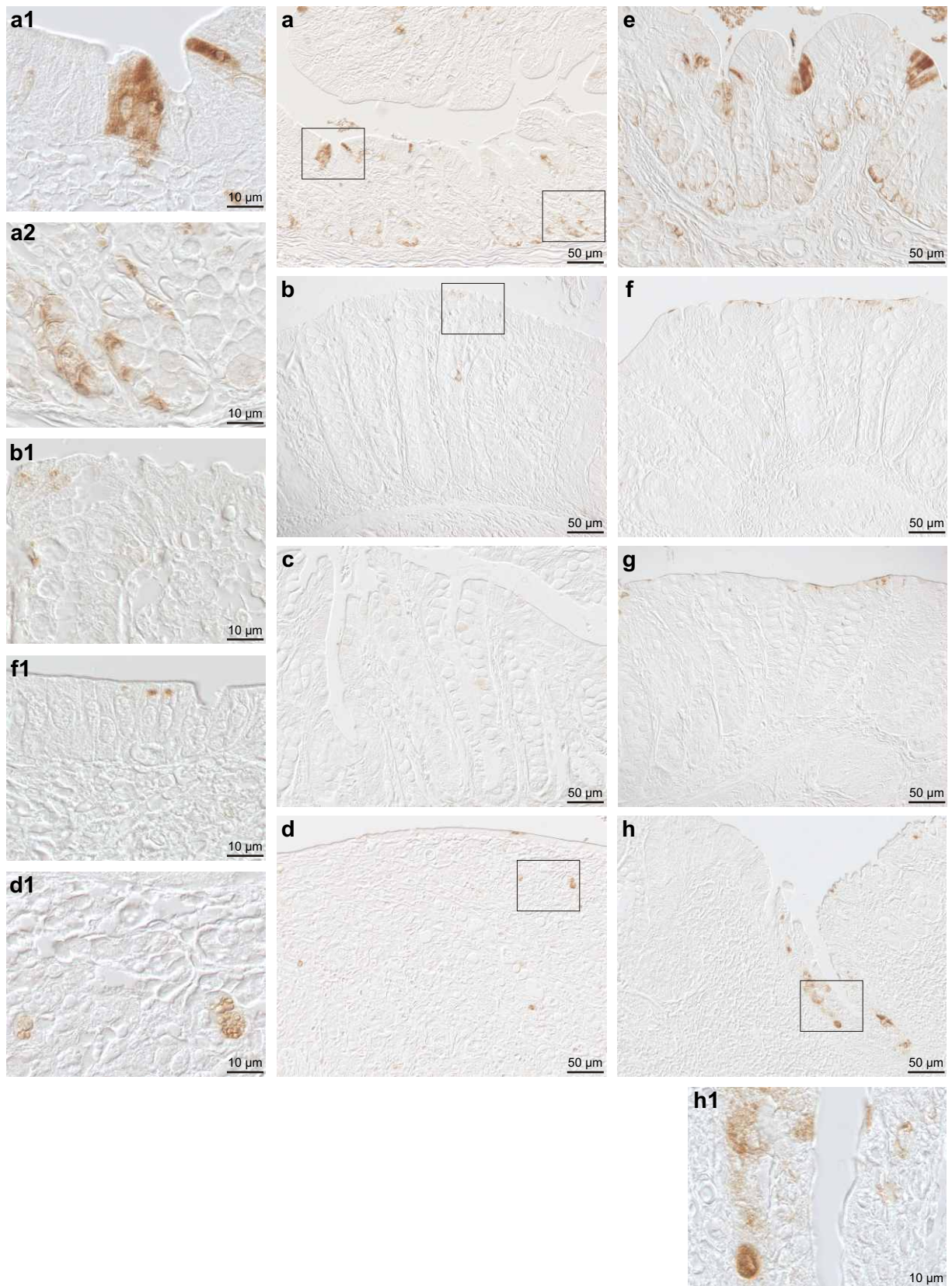


Abb. 4-59: **COX-2 pc IR**, DMH-Modell, Ratte,
 Kolon; **a-d** Kontrollgruppe, **e-g, h** RS-Gruppe;
a, e proximal, **b, f** distal intakt, **c, g** distal ACF, **d** Tumor, **h** Lymphfollikel;
a1, b1, f1 1. Kryptenviertel, **a2** 4. Kryptenviertel, **d1** Tumor, Lamina propria,
h1 Lymphfollikel, Lamina epithelialis

Demgegenüber war die iNOS IR im distalen Kolon im 2.–4. Kryptenviertel signifikant geringer. Es markierten sich ausschließlich Einzelzellen und Gruppen von Zellen im Saumepithel. Die IR war verstärkt in der Faltung des Saumepithels und in direkter Nachbarschaft von Lymphfollikeln zu beobachten, auch hier überwiegend strukturgebunden apikal des Zellkerns (Abb. 4-60 A, B; 4-61 b, b1, h, h1).

Die iNOS IR in aberranten Krypten war nicht wesentlich verändert (Abb. 4-60 A, B; 4-61 c, c1). Auch im Tumorepithel war die IR ähnlich wie in umliegenden intakten Krypten. Eine IR war nur in einzelnen Zellen am Tumorsaum dedektierbar. Demgegenüber fanden sich im Tumorstroma gehäuft größere iNOS positive mobile Zellen (Abb. 4-60 A-C; 4-61 d, d1).

Unter dem Einfluss von RS konnte kein signifikanter Unterschied in der iNOS IR im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 4-60 A-C; 4-61 e-g1).

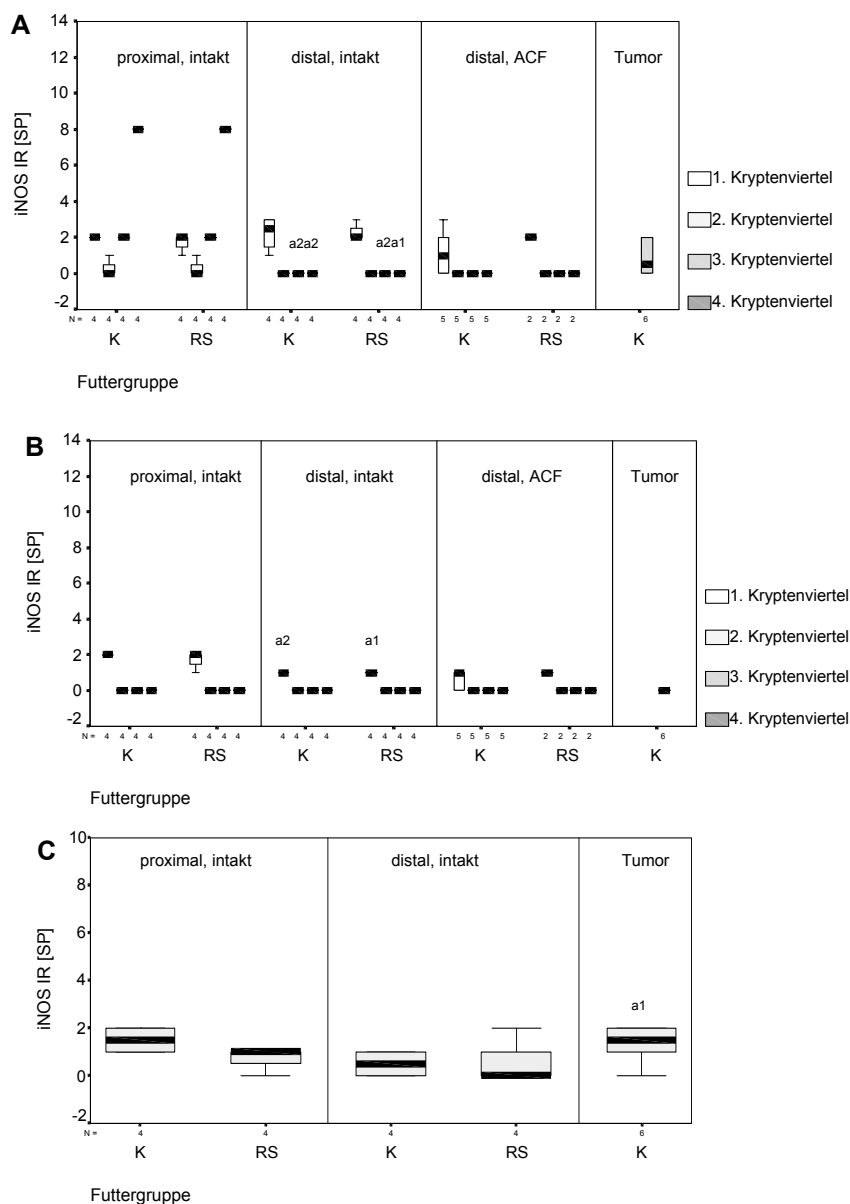


Abb. 4-60: iNOS IR, DMH-Modell, Ratte, Kolon; morphologisch intakte proximale und distale Mukosa, ACFs, Tumore; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); Epithel, Zytoplasma, **A** strukturgebunden, **B** diffus; **C** Lamina propria, mobile Zellen, Zytoplasma; **a** signifikant verschieden innerhalb derselben Futtergruppe (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$)

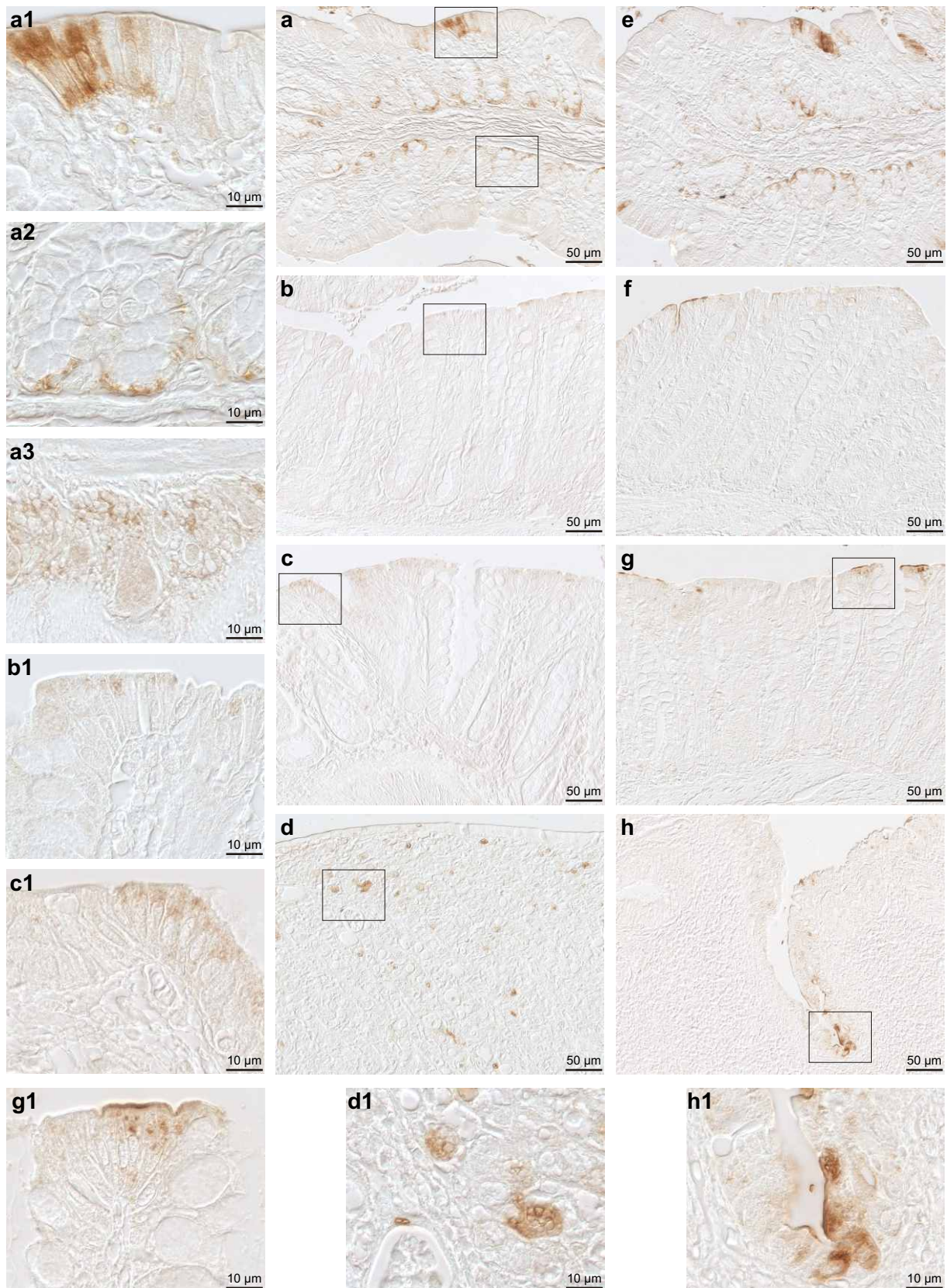


Abb. 4-61: **iNOS IR**, DMH-Modell, Ratte, Kolon;
a-d Kontrollgruppe, **e-g** RS-Gruppe;
a, e proximal, **b, f** distal intakt, **c, g** distal ACF, **d** Tumor, **h** Lymphfollikel;
a1, b1, c1, g1 1. Kryptenviertel, **a2** 4. Kryptenviertel, **a3** Plexus myentericus,
h1 Lymphfollikel, Lamina epithelialis

4.3.2.5 nNOS

Eine IR gegen nNOS konnte ausschließlich im Epithel, in allen Kryptenvierteln, jedoch mit unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden. Im proximalen Kolon waren die Epithelzellen im 1. Kryptenviertel am stärksten und durchgängig immunreaktiv. Die Intensität der IR nahm vom Kryptengrund in Richtung Lumen zu. Es markierten sich membranartige, ringförmige Strukturen im Zytoplasma. Am Kryptengrund waren diese Strukturen über das Zytoplasma verteilt. Im Verlaufe der Differenzierung veränderte sich die Lokalisation und befand sich nun direkt apikal vom Zellkern (Abb. 4-62; 4-63 a-a2).

Im distalen Kolon glich die IR im Saumepithel der im proximalen Kolon. Im Gegensatz dazu fand sich eine deutlich verstärkte IR in den Epithelzellen am Kryptengrund. Vom 4. zum 3. Kryptenviertel war ein Abfall der IR zu verzeichnen, ein Anstieg erfolgte wieder vom 2. Viertel zum Saumepithel (Abb. 4-62; 4-63 b-b2). In direkter Nähe von Lymphfollikeln war die Markierung meistens über die gesamte Kryptenachse verstärkt.

Die nNOS IR in aberranten Krypten unterschied sich signifikant vom umliegenden intakten Gewebe. ACFs wiesen oft über die gesamte Kryptenachse eine ähnlich intensive nNOS IR auf, wie sie sonst nur im Saumepithel detektierbar war (Abb. 4-62, 4-63 c-c2).

Morphologisch intakte Krypten in Tumornähe waren meistens über die gesamte Krypte immunreaktiv. Es war eine deutliche Verstärkung der nNOS IR über ACFs, Hyperplasien, bis hin zu G1 und G2 zu beobachten. Die Immunreaktivität variierte sehr stark zwischen den einzelnen Tumoren (Abb. 4-62; 4-63 d, d1).

Unter dem Einfluss von RS traten keine signifikanten Veränderungen in der nNOS IR auf (Abb. 4-62; 4-63 e-g).

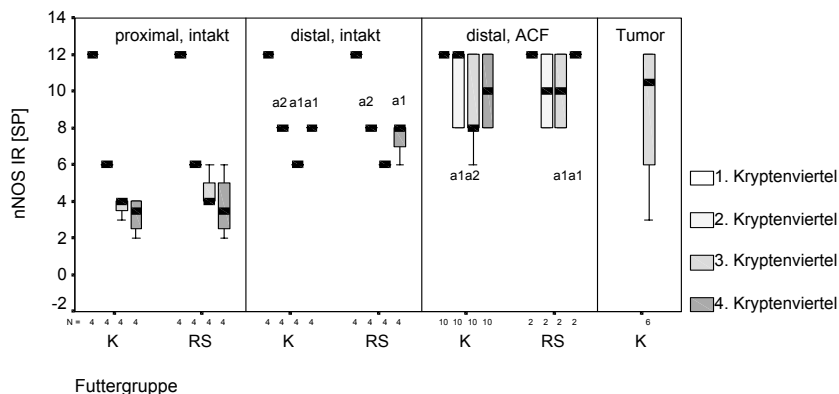


Abb. 4-62: nNOS IR, DMH-Modell, Ratte, Kolon; morphologisch intakte proximale und distale Mukosa, ACFs, Tumore; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); Epithel, Zytoplasma; a signifikant verschieden innerhalb derselben Futtergruppe (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$)

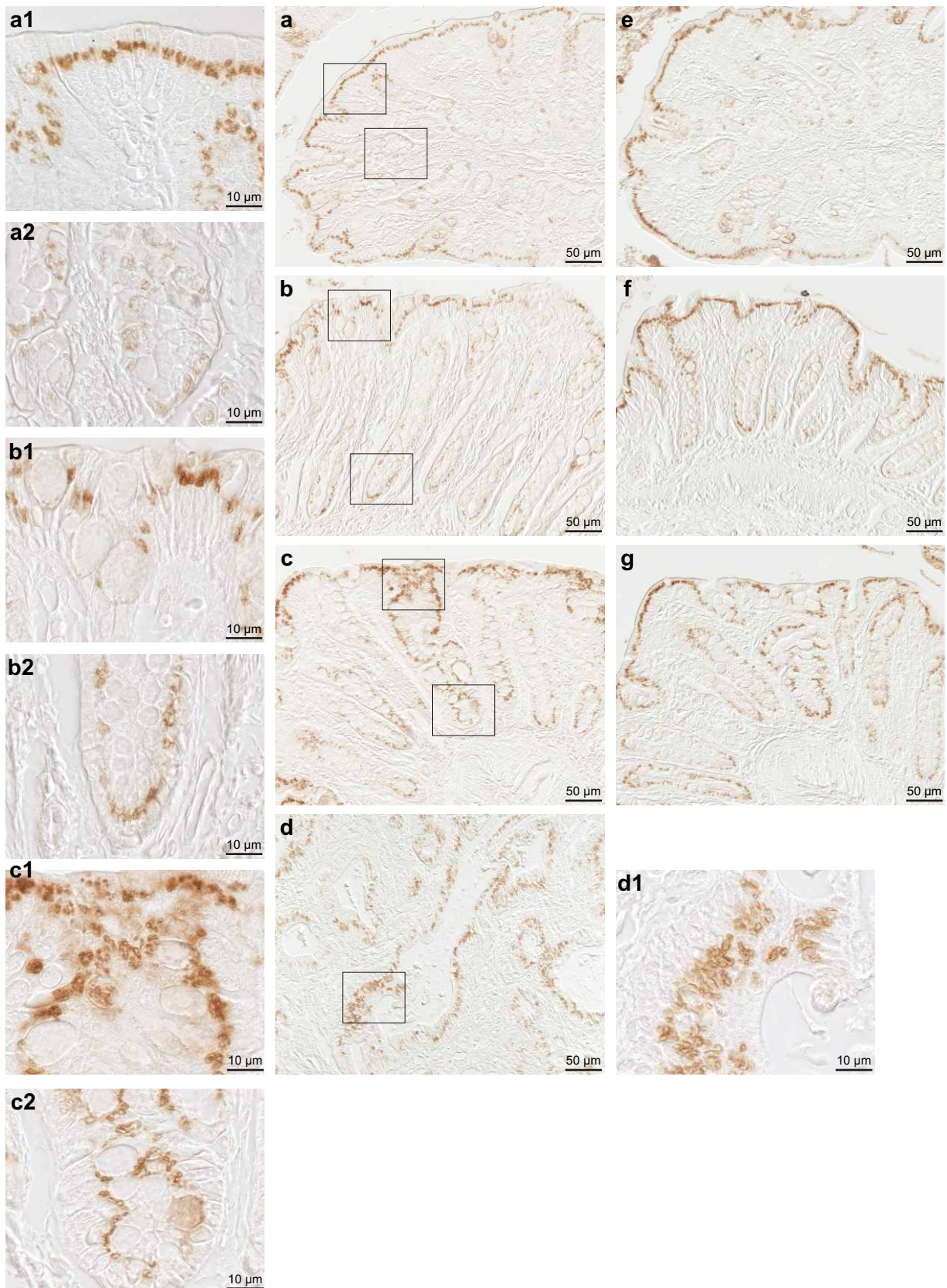


Abb. 4-63: **nNOS IR**, DMH-Modell, Ratte, Kolon;
a-d Kontrollgruppe, **e-g** RS-Gruppe;
a, e proximal, **b, f** distal intakt, **c, g** distal ACF, **d** Tumor;
a1, b1, c1 1. Kryptenviertel; **a2, b2, c2** 4. Kryptenviertel, **d1** Tumor, Lamina epithelialis

4.3.2.6 *GI-GPx*

Die *GI-GPx* IR war im proximalen Kolon von Kontrolltieren insgesamt sehr schwach ausgeprägt. Im Saumepithel wurde eine durchgängige schwach diffus zytoplasmatische IR gefunden. In der Proliferationszone des proximalen Kolons, im 3. Kryptenviertel, zeigten einzelne Zellkerne schwache Signale. Sehr selten war dies am Kryptengrund der Fall. Am Kryptengrund (3./4. Kryptenviertel) traten strukturgebundene Signale im Zytoplasma von Einzelzellen auf (Abb. 4-64 A-C; 4-65 a-a2).

Demgegenüber war im distalen Kolon die *GI-GPx* IR signifikant stärker. Die intensivste IR, diffus zytoplasmatisch verteilt, wurde im Saumepithel festgestellt. Eine ebenfalls deutlich stärkere IR fand sich in den Zellkernen am Kryptengrund. Nicht jede Krypte zeigte positive Kerne, und die IR verlor sich in den verschiedenen Krypten in unterschiedlicher Höhe im 3. und 2. Kryptenviertel in Richtung Lumen. In Zellen, in denen der Zellkern positiv war, imponierte teilweise auch das Zytoplasma diffus positiv. Die IR in den unteren Kryptenvierteln war insgesamt sehr unregelmäßig. Eine verstärkte IR war entlang der gesamten Kryptenachse in direkter Nachbarschaft von Lymphfollikeln zu beobachten (Abb. 4-64 A-C; 4-65 b-b2).

Aberrante Krypten des distalen Kolons unterschieden sich in ihrer *GI-GPx* IR nicht signifikant von morphologisch intakten Krypten. Die diffus zytoplasmatische IR war im 2. und 3. Kryptenviertel tendenziell verstärkt (Abb. 4-64 A-C, 4-65 c). Im Verlauf der Entdifferenzierung war eine Ausdehnung von positiven Kernen in Richtung Lumen zu beobachten. Im Epithel mäßig bis schlecht differenzierter Tumoreareale trat sowohl die kernständige als auch die diffus zytoplasmatische IR verstärkt auf (Abb. 4-64 A-C, 4-65 d, d1).

Nach Gabe von RS war die diffus zytoplasmatische IR im 3. und 4. Kryptenviertel des distalen Kolons signifikant, im 1. Kryptenviertel tendenziell vermindert. Die kernständige IR war im 3. und 4. Kryptenviertel leicht vermindert und auf diese beiden Kryptenviertel beschränkt (Abb. 4-64 A-C, 4-65 e-g).

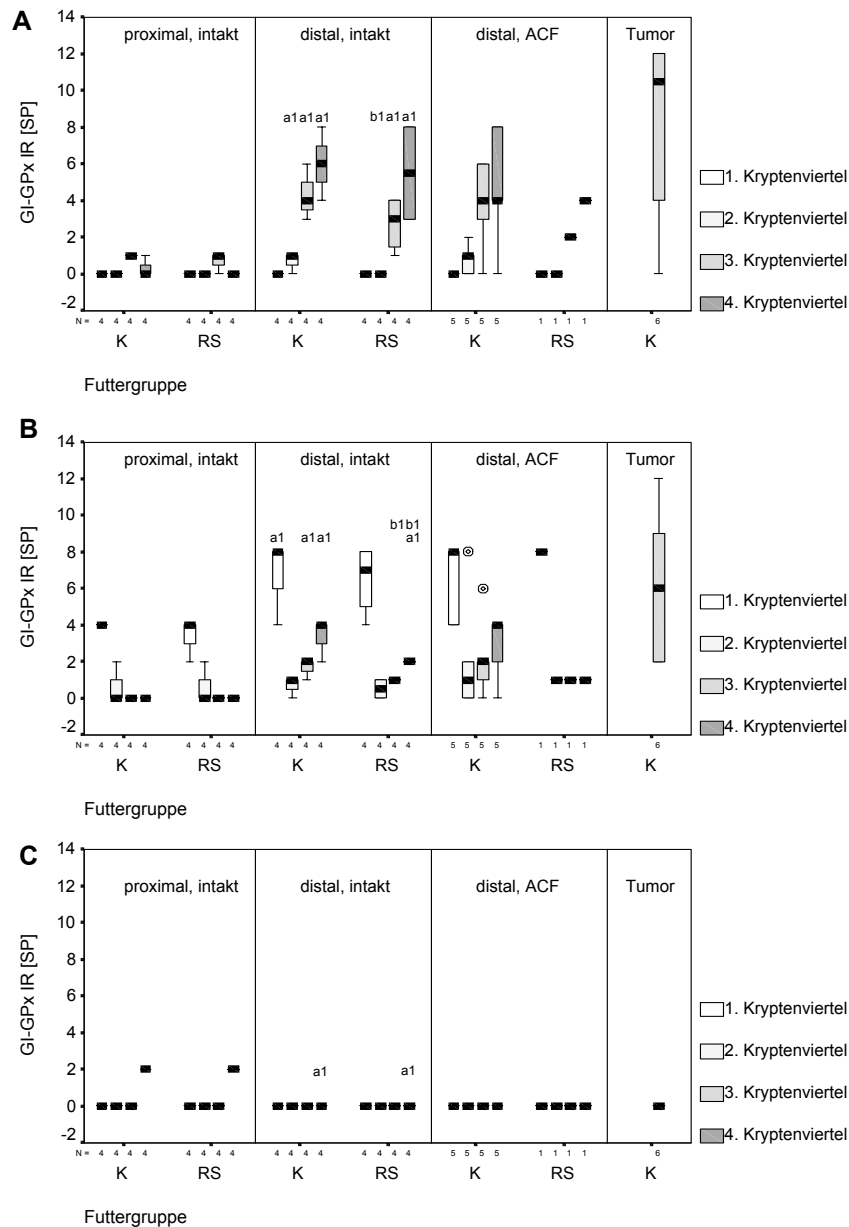


Abb. 4-64: GI-GPx IR, DMH-Modell, Ratte, Kolon; morphologisch intakte proximale und distale Mukosa, ACFs, Tumore; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); Epithel; **A** kernständig, Zytoplasma **B** diffus, **C** strukturgebunden; **a** signifikant verschieden innerhalb derselben Futtergruppe, **b** RS-Gruppe signifikant verschieden von der Kontrollgruppe (**1** $p < 0,05$, **2** $p < 0,01$)

4.3.2.7 HSP25

HSP25 konnte in allen Schichten des proximalen Kolons mit Ausnahme der Lamina epithelialis immunhistochemisch nachgewiesen werden. Am stärksten färbte sich die Muskelschicht von Gefäßen in der Tela submucosa und in geringerem Maße in der Lamina propria. In der Lamina propria waren auch schwach positive fixe und mobile Zellen zu finden. Des weiteren konnte eine IR in der Lamina muscularis mucosae und der Tunica muscularis beobachtet werden. Auch die Zellen des Plexus myentericus waren immunreaktiv. Die IR war überwiegend diffus im Zytoplasma verteilt (Abb. 4-66 A, B; 4-67 a-a3).

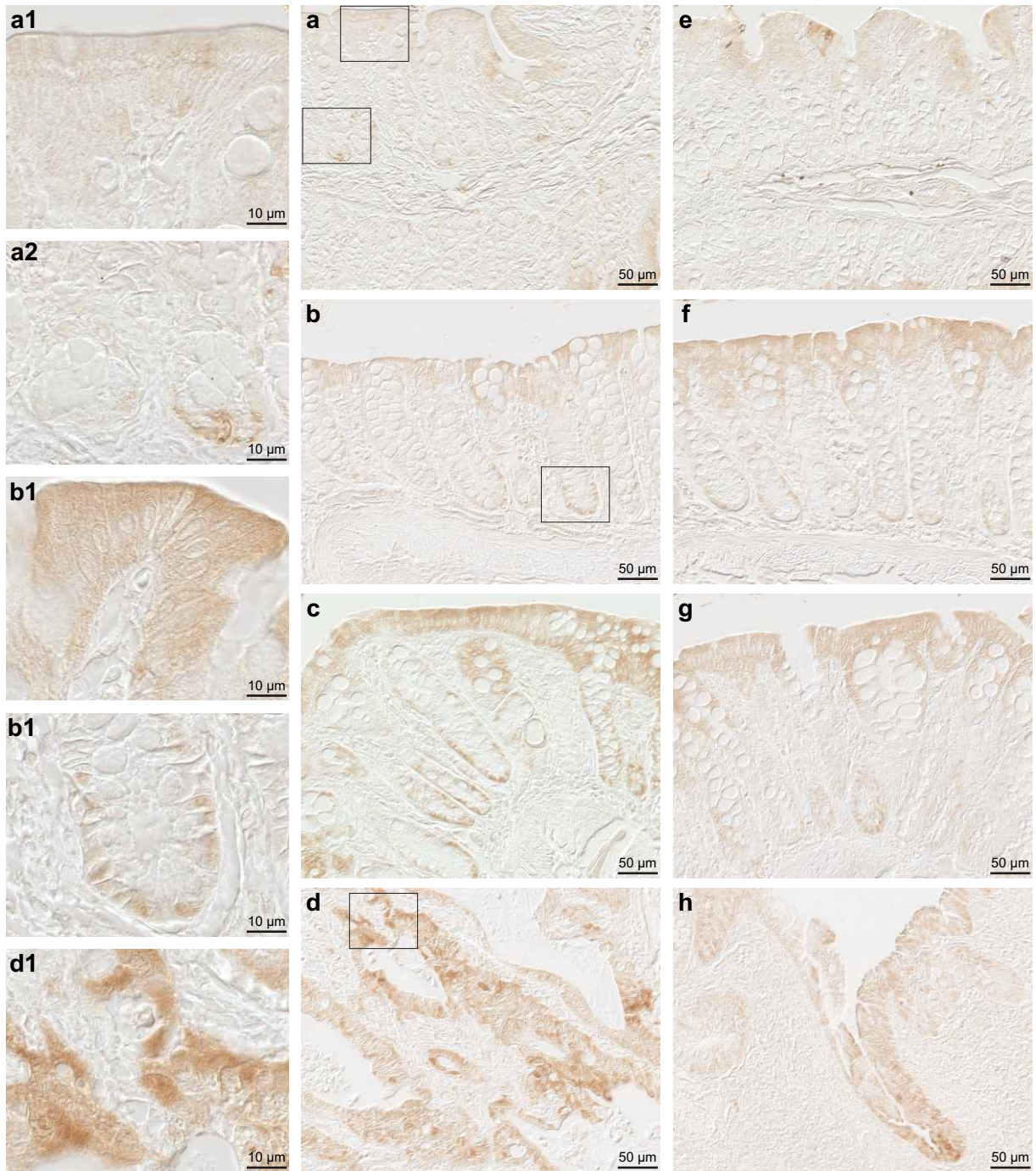


Abb. 4-65: **GI-GPx IR, DMH-Modell, Ratte, Kolon;**
a-d Kontrollgruppe, **e-g, h** RS-Gruppe;
a, e proximal, **b, f** distal intakt, **c, g** distal ACF, **d** Tumor, **h** Lymphfollikel;
a1, b1 1. Kryptenviertel: diffus zytoplasmatisch;
a2, b2 4. Kryptenviertel: **a2** strukturgebunden zytoplasmatisch, **b2** Zellkern,
diffus zytoplasmatisch; **d1** Tumor, Lamina epithelialis, Zellkern, diffus zytoplasmatisch

Im distalen Kolon zeigte sich eine signifikant stärkere IR in den Gefäßen der Lamina propria als proximal. Außerdem traten in dieser Schicht verstärkt diffus zytoplasmatisch positive mobile und fixe Zellen auf. Die Lamina muscularis mucosae war wenig immunreaktiv. Zusätzlich fanden sich im distalen Kolon vereinzelt positive Zellen im Saumepithel (2-8 Zellen pro Darmquerschnitt). Die IR war in diesen Zellen diffus im Zytoplasma verteilt und trat wiederum in direkter Nähe von Lymphfollikeln gehäuft auf (Abb. 4-66 A, B; 4-67 b). Aberrante Krypten unterschieden sich nicht wesentlich vom umgebenden intakten Gewebe (Abb. 4-66 A, 4-67 c). Im Laufe der Entdifferenzierung traten gehäuft HSP25 positive Zellen im Tumorstroma auf (Abb. 4-66 B; 4-67 d-d2).

Auffällig war eine signifikant höhere Anzahl stärker HSP25 positiver Saumzellen im distalen Kolon unter RS (17 – 120 Zellen pro Darmquerschnitt) im Vergleich zur Kontrollgruppe (2-8 Zellen pro Darmquerschnitt) (Abb. 4-67 f1). Auch in der Lamina propria waren im proximalen Kolon verstärkt HSP25 positive Zellen nachweisbar. In allen anderen Darmschichten konnten unter RS keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 4-66 A, B; 4-67 e-g).

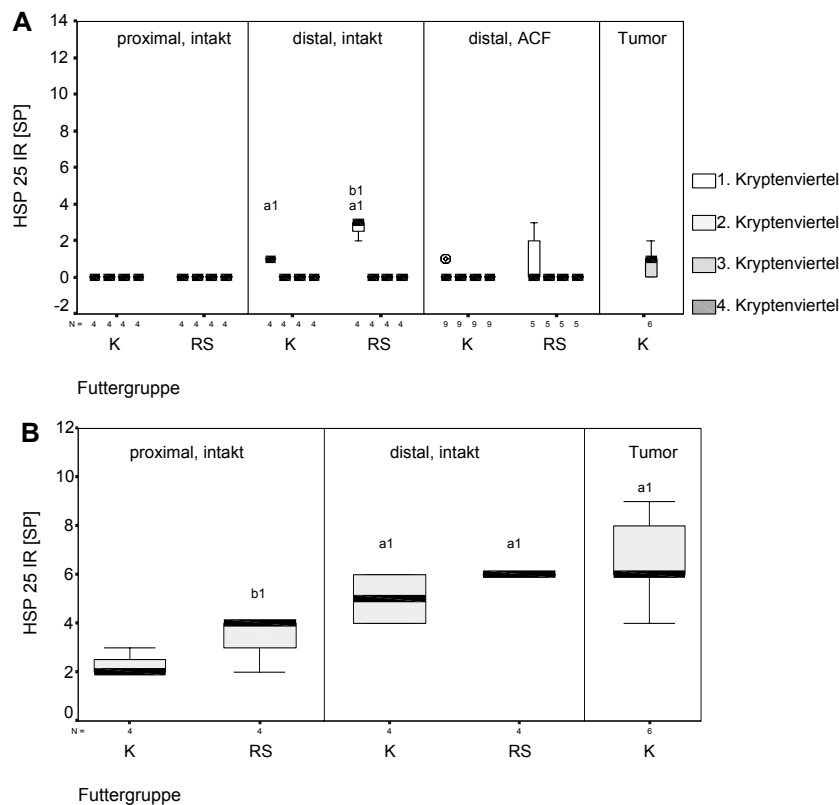


Abb. 4-66: HSP25 IR, DMH-Modell, Ratte, Kolon; morphologisch intakte proximale und distale Mukosa, ACFs, Tumore; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); **A** Epithel, Zytoplasma; **B** Zellen der Lamina propria; **a** signifikant verschieden innerhalb derselben Futtergruppe, **b** RS-Gruppe signifikant verschieden von der Kontrollgruppe (1 p<0,05)

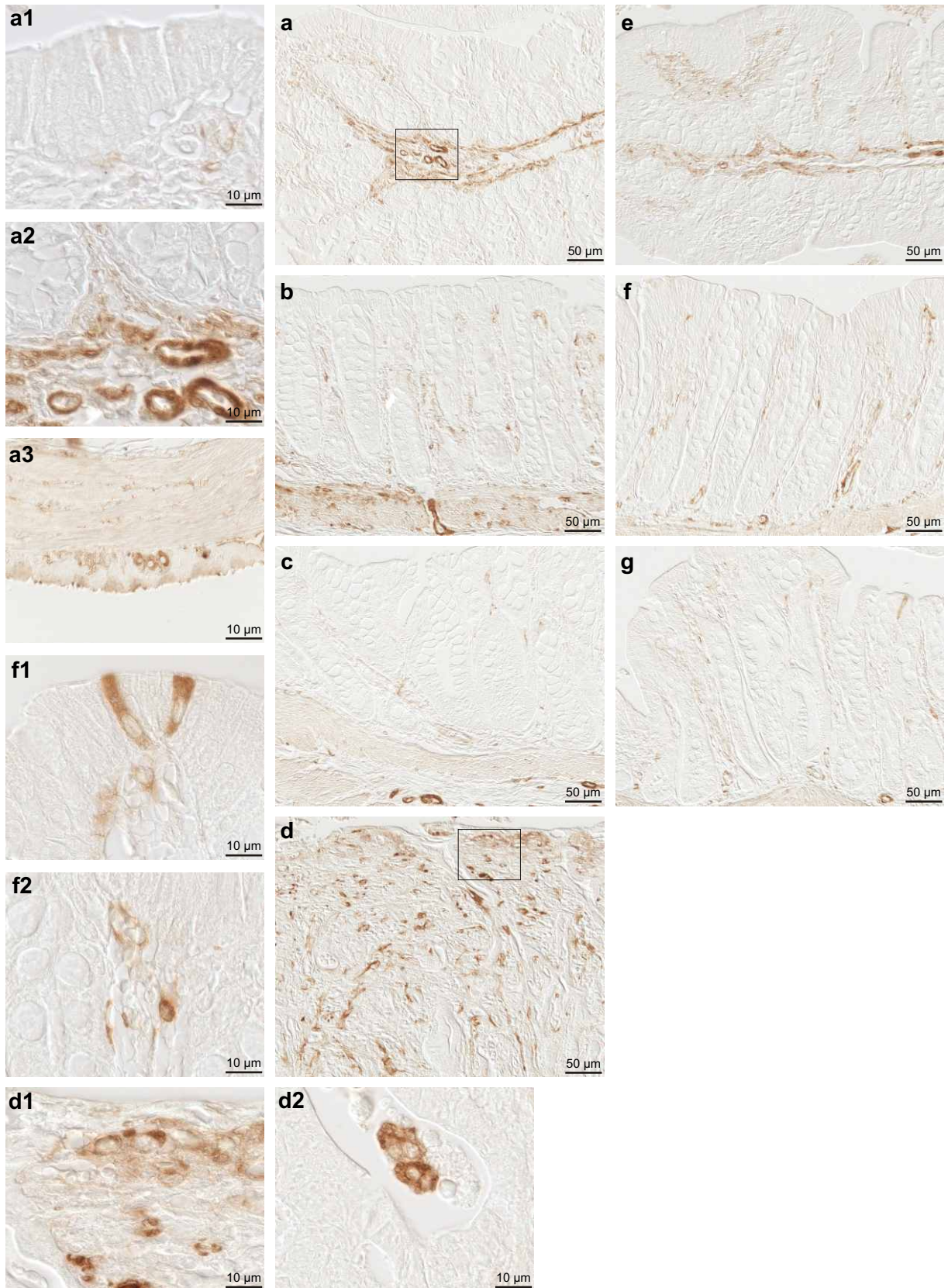


Abb. 4-67: **HSP25 IR**, DMH-Modell, Ratte, Kolon;
a-d Kontrollgruppe, **e-g** RS-Gruppe;
a, e proximal, **b, f** distal intakt, **c, g** distal ACF, **d** Tumor;
a1, f2 Lamina propria, **a2** Tela submucosa, GefäÙe, **a3** Tunica muscularis, Plexus myentericus, **f1** 1. Kryptenviertel, **d1** Tumor, Lamina propria, **d2** Tumor, Zell-Infiltrat

4.4 TNBS-Kolitismodell der Ratte

4.4.1 Score zur Beurteilung des Entzündungsgrades bei TNBS-induzierter Kolitis

Im Modell der TNBS-induzierten Kolitis in der Ratte wird eine lokale Schädigung der Darmwand durch einen einmaligen Einlauf mit dem kontaktsensibilisierenden Allergen TNBS gesetzt. In den folgenden Tagen kommt es zu einer akuten Entzündungsreaktion und einem kompletten Schleimhautverlust in den betroffenen Arealen. Das Gewebe regeneriert nahezu vollständig innerhalb von 3 Wochen.

Zur Charakterisierung des Erkrankungsgrades und Verlaufs der TNBS-Kolitis sowie zur Überprüfung eines therapeutischen Effekts von RS wurde ein Entzündungs-Score entwickelt, der die Besonderheiten dieses Modells berücksichtigt. Der Score orientiert sich an den Arbeiten von Kruschewski et al. (2001) und Geboes und Dalle (2002). Es wurden klinische Daten, makroskopische und auch mikroskopische Veränderungen des Kolongewebes erfasst (Tab. 4-3). Die Daten wurden jeweils vor der Kolitis-Induktion (Tag 0), sowie am 4., 11. und 21. Tag nach Induktion erhoben, um den Verlauf der Entzündung beurteilen zu können.

Tab. 4-3: TNBS-Kolitis-Score

Kriterium (Score-Punkte)	ja	nein
Klinische Daten:		
Gewichtsverlust	1	0
Stuhlverfärbung / Blut im Stuhl	1	0
Veränderung der Stuhlkonsistenz / Diarrhöe	1	0
Makroskopie:		
Sichtbare Veränderungen des Kolons bei Entnahme	1 leicht 2 mäßig 3 stark nekrotisch	0
Mikroskopie:		
Ödem der Mukosa / Submukosa	1	0
Einblutungen in die Mukosa / Submukosa	1	0
Mukosa-Verlust	1 mäßig 2 stark	0
Verlust der Kryptenarchitektur	1 gestört	0
entzündliches Infiltrat	1 schwach 2 mäßig 3 stark	0

Für jedes Tier wurden 5 Gewebeschnitte aus den betroffenen Dickdarmsegmenten histologisch untersucht und die resultierenden Punktzahlen dieser Untersuchungen gemittelt. Nach Addition mit den übrigen Kriterien wurde eine maximale Punktzahl von 14 vergeben. Die Einteilung des Schweregrades der Entzündung setzte sich wie folgt zusammen:

0 – 2	Punkte:	normal
3 – 5	Punkte:	leichte Entzündung
6 – 10	Punkte:	mittelgradige bis schwere Entzündung
11 – 14	Punkte:	hochgradige Entzündung.

4.4.2 TNBS-Kolitis und RS III: Entzündungsverlauf

Am 4. Tag nach Kolitis-Induktion war sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der RS-Gruppe die Entzündung am stärksten ausgeprägt. Am 11. Tag war die Entzündung in beiden Futtergruppen bereits abgeschwächt und nach 21 Tagen entsprachen die Befunde annähernd Normwerten.

RS-Gabe resultierte in einer abgeschwächten Entzündungsreaktion am 4. und 11. Tag (Abb. 4-68). Unterschiede zwischen der Kontroll- und der RS-Gruppe zeigten sich sowohl klinisch-makroskopisch als auch anhand histologischer Parameter.

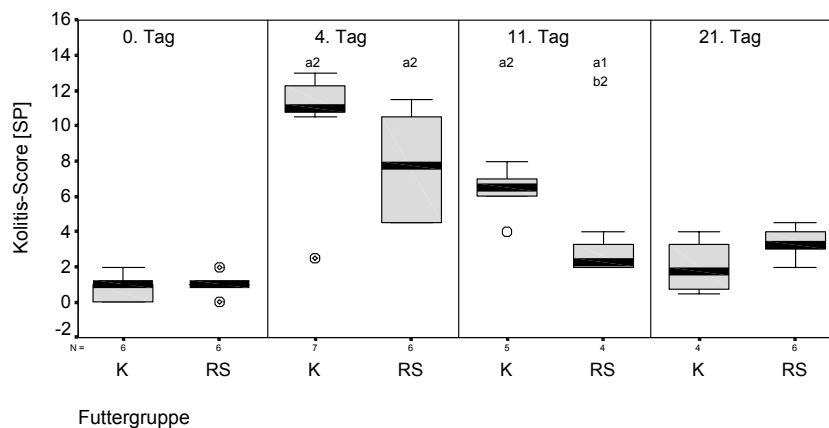


Abb. 4-68: Kolitis-Score, TNBS-Kolitis, Ratte; Tag 0, 4, 11 und 21; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); **a** signifikant verschieden vom Tag 0 innerhalb derselben Futtergruppe, **b** RS-Gruppe signifikant verschieden von der Kontrollgruppe am selben Tag (**1** $p < 0,05$, **2** $p < 0,01$)

4.4.3 TNBS-Kolitis und RS III: Histologische Befundbeschreibung

Vor Verabreichung der Noxe am Tag 0 zeigte sich in der Kontrollgruppe ein regulärer Aufbau der Darmwand (Abb. 4-69 a). Am Tag 4 nach Kolitis-Induktion fanden sich entlang der exponierten Oberfläche gelb verfärbte nekrotische Schleimhautreste, unter denen sich ein Ödem mit starker lymphozytärer und granulozytärer Infiltration erstreckte. Die Muskelschicht war verdickt. Am Rand dieser Ulzerationszone (UZ) waren bereits Einsprossungen stark proliferierender, zum Teil hyperplastischer Krypten mit vermindertem Becherzellgehalt (Regenerationszone, RZ) zu beobachten (Abb. 4-69 b). Am 11. Tag nach Induktion waren keine nekrotischen Kryptenreste mehr vorhanden. Die ödematöse Bindegewebsschicht bildete in der ursprünglichen Nekrosezone einen luminalen Abschluss. Die Infiltration mit Entzündungszellen war wieder verringert. Die Ulzerationszone war durch

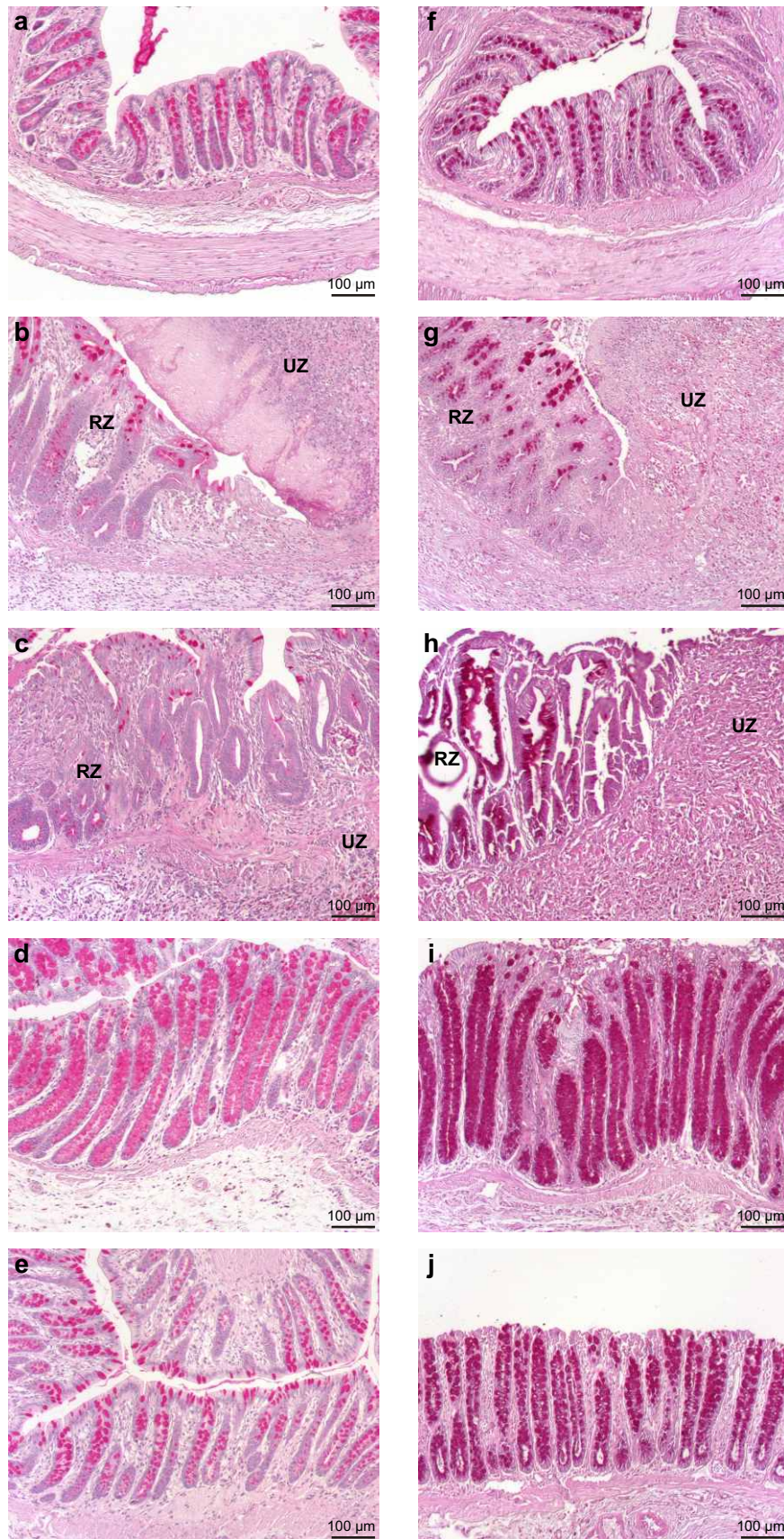


Abb. 4-69: **TNBS-Kolitis**, Ratte, Kolon; PAS-Färbung; **a, f** Tag 0, **b, g** 4, **c, d, h, i** 11 und **e, j** 21; **a-e** Kontrollgruppe, **f-j** RS-Gruppe; **b, g, c, h** Tag 4/11, Ulzerationszone (UZ), direkt benachbarte Regenerationszone (RZ); **d, i** Tag 11, bereits morphologisch intaktes Gewebe in weiterer Entfernung von der UZ

Einsprossung neuer Epithelzellverbände weitgehend geschlossen. Die Architektur der Krypten in der Regenerationszone war sehr unregelmäßig und durch Kryptbranching, leichte Hyperplasie und einen stark verminderten Becherzellgehalt gekennzeichnet. (Abb. 4-69 c). In weiterer Entfernung von der Ulzeration hatten die neugebildeten Krypten wieder einen regulären Aufbau, waren jedoch noch immer leicht hyperplastisch und wiesen nunmehr einen deutlich gesteigerten Becherzellgehalt auf (Abb. 4-69 d). In der den neugebildeten Krypten unterliegenden Tela submucosa und in geringerem Maße der Lamina propria fanden sich noch ein leichtes Ödem und geringfügig vermehrt entzündliche Infiltrate. Waren die Ulzerationen an diesem Tag bereits abgeheilt und das Ödem zurückgebildet, konnte ein Kontakt mit der Noxe durch verbliebene gelbliche Zellreste in der Tela submucosa und der Lamina propria nachgewiesen werden.

Am 21. Tag erreichte die Integrität der Schleimhaut fast wieder das Ausgangsniveau (Abb. 4-69 e). Die Anzahl der Becherzellen war normalisiert, nur noch wenige Krypten zeigten ein leicht gesteigertes Kryptbranching. Vereinzelt fanden sich noch entzündliches Infiltrat und gelblich verfärbte Zellreste in der Tela submucosa.

Unter RS waren die entzündlichen Veränderungen der Schleimhaut qualitativ ähnlich, aber weniger stark ausgeprägt.

Am Tag vor der Kolitis-Induktion (Abb. 4-69 f) wurden in der RS-Gruppe verlängerte Krypten mit einem gesteigerten Becherzellgehalt nachgewiesen. Am 4. Tag (Abb. 4-69 g), in der Akutphase der Entzündung, unterschieden sich die Befunde von Kontroll- und RS-Gruppe kaum. Nach 11 Tagen (Abb. 4-69 h) war die Geweberegeneration unter RS weiter fortgeschritten als in der Kontrollgruppe. Die Krypten zeigten ein intensives Kryptbranching. Bereits intakte, leicht hyperplastische Krypten wiesen einen gesteigerten Becherzellgehalt auf (Abb. 4-69 i). Einblutungen, Schleimhautödeme und Infiltration waren im Vergleich zur Kontrollgruppe seltener zu beobachten. Am 21. Tag (Abb. 4-69 j) wies die Schleimhaut in der Stärkegruppe noch vermehrt regenerationsaktive Krypten auf. Auffällig war außerdem eine erhöhte Kryptenlänge.

Die PAS-Färbung stellte das Becherzellmucin an allen Tagen in der Kontrollgruppe pink/rosa, in der Gruppe mit RS purpurrot dar (Abb. 6-69 a-j). PAS positive Mukosubstanzen färben sich je nach Menge rosa bis purpurrot. Dieser Befund ist ein Hinweis auf einen Anstieg des Muzingehalts nach RS-Gabe.

4.4.4 TNBS-Kolitis und RS III: Immunhistochemie

Im folgenden Kapitel sind die Befunde zur Verteilung der COX-Isoenzyme, NOS-Isoenzyme, der GI-GPx und des HSP25 in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad und der Diät ausgewiesen.

Am 4. Tag wurde das Epithel der Regenerationszone (RZ) am Übergang zur Ulzeration untersucht. Befunde für die Lamina propria, Lamina muscularis mucosae, Tela submucosa und Tunica muscularis stammen ebenfalls aus diesem, der Ulzeration direkt benachbartem oder dem darunterliegenden Bereich (Abb. 4-69 b, g). Am 11. Tag wurden zwei Regenerationsphasen unterschieden - Gewebe in direkter Nachbarschaft der Ulzeration (RZ) (Abb. 4-69 c, h) und in weiterer Entfernung von der Ulzeration (intakt) (Abb. 4-69 d, i).

4.4.4.1 COX-1

Vor Kolitis-Induktion ließen sich in den Krypten der Darmschleimhaut von Kontrolltieren nur vereinzelt schwach COX-1 immunreaktive Zellen nachweisen. Sie waren bevorzugt in den oberen beiden Kryptenvierteln lokalisiert. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Zell-Infiltrate. In der Lamina propria waren nur wenige COX-1 positive Zellen, hauptsächlich in der lumennahen Lamina propria, demonstrierbar (Abb. 4-70 A, B; 4-71 a, a1). Äußerst selten reagierten in dieser Schicht Fibrozyten und Myofibrozyten positiv. Es färbte sich das Endothel einzelner Gefäße in der Tela submucosa. Eine schwache COX-1 IR zeigten auch einzelne Zellen der Tunica muscularis (Abb. 4-71 a, a2) und in geringerem Maße die der Lamina muscularis mucosae. In allen positiven Zellen markierten sich membranartige Strukturen, die dem Zellkern direkt aufgelagert oder auch ringförmig im Zytoplasma angeordnet waren.

Am 4. und am 11. Tag nach Kolitis-Induktion waren in den neugebildeten Krypten im Randbereich zur Ulzeration keine COX-1 positiven Zellen nachweisbar. Morphologisch intakte Krypten am 11. Tag und 21. Tag zeigten eine ähnliche COX-1 IR wie am Tag 0 (Abb. 4-70).

Deutliche Veränderungen im COX-1-Muster traten in den Stromazellen auf. Lamina propria und Tela submucosa zeigten am 4. Tag eine starke Infiltration mit positiven Zellen unterhalb und am Rand der Nekrose/Ulzeration. Diese nahmen über den 11. Tag bis hin zum 21. Tag ab, wo sie fast das Ausgangsniveau erreichten (Abb. 4-70 B, C; 4-71 b-e). Dabei handelte es sich um ein- sowie mehrkernige Zellen, die positive ringförmige Strukturen im Zytoplasma oder auch eine diffuse Färbung aufwiesen. Im Vergleich mit COX-2 mc positiven Zellen war die Anzahl COX-1 positiver Zellen jedoch gering.

Zellen der Lamina muscularis mucosae und der Tunica muscularis zeigten im Verlauf der 21 Tage keine signifikanten Veränderungen in der COX-1 IR. Am Tag 4 waren Zellen des Plexus myentericus in der Nähe der Ulzeration immunreaktiv.

In der Gruppe mit RS traten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abb. 4-70 A-C; 4-71 f-j).

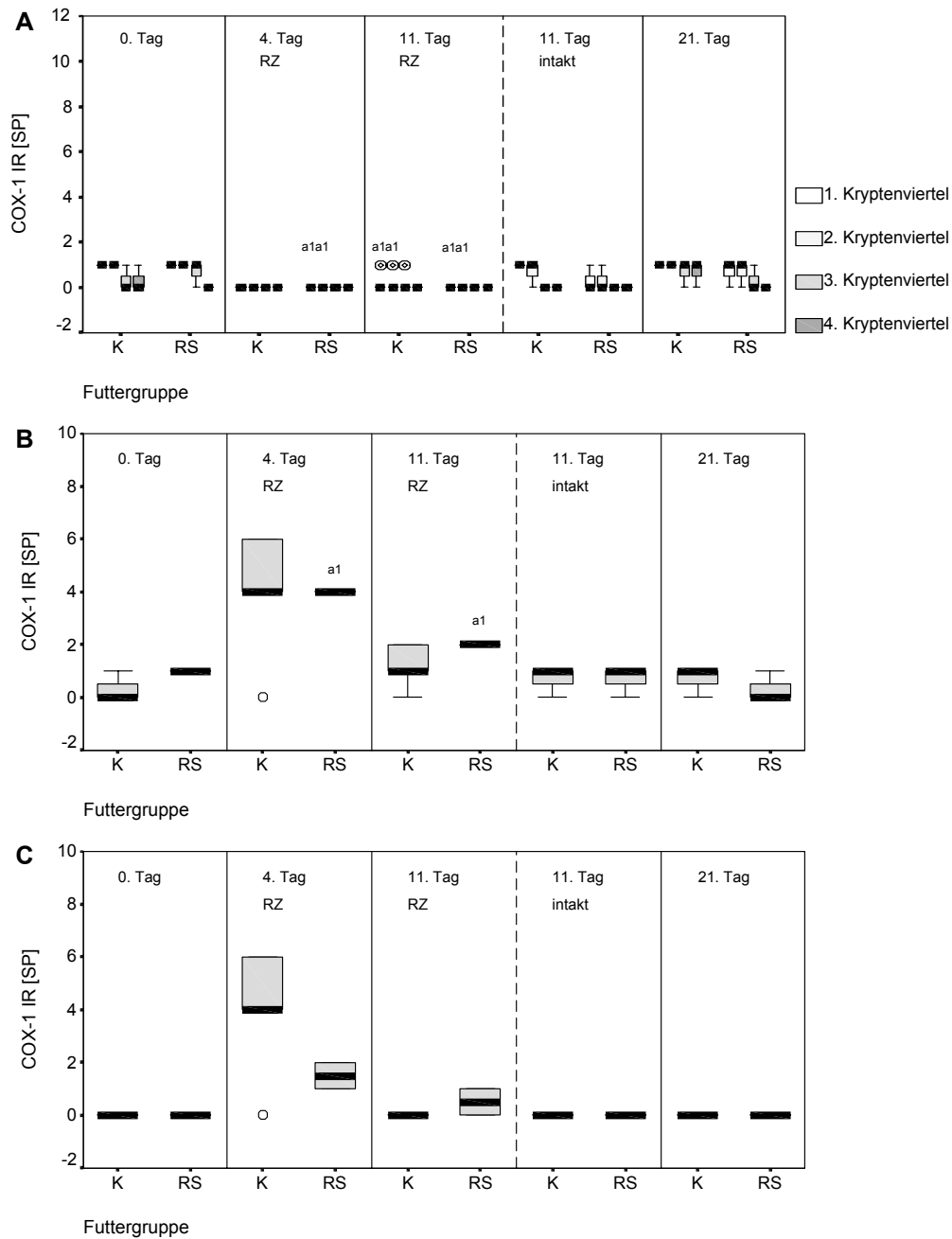


Abb. 4-70: COX-1 IR, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon, Tag 0, 4, 11 und 21; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); **A** Lamina epithelialis; **B** Lamina propria; **C** Tela submucosa, **a1** signifikant verschieden vom Tag 0 innerhalb derselben Futtergruppe ($p < 0,05$)

4.4.4.2 COX-2

Die Befunde zur COX-2-Verteilung wurden an seriellen Schnitten mit einem polyclonalen (pc) und einem monoclonalen (mc) Antikörper erhoben.

COX-2 mc

Vor der Kolitis-Induktion konnten in der Kontrollgruppe in allen Kryptenvierteln des Kolons vereinzelt COX-2 mc immunreaktive Zellen nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich

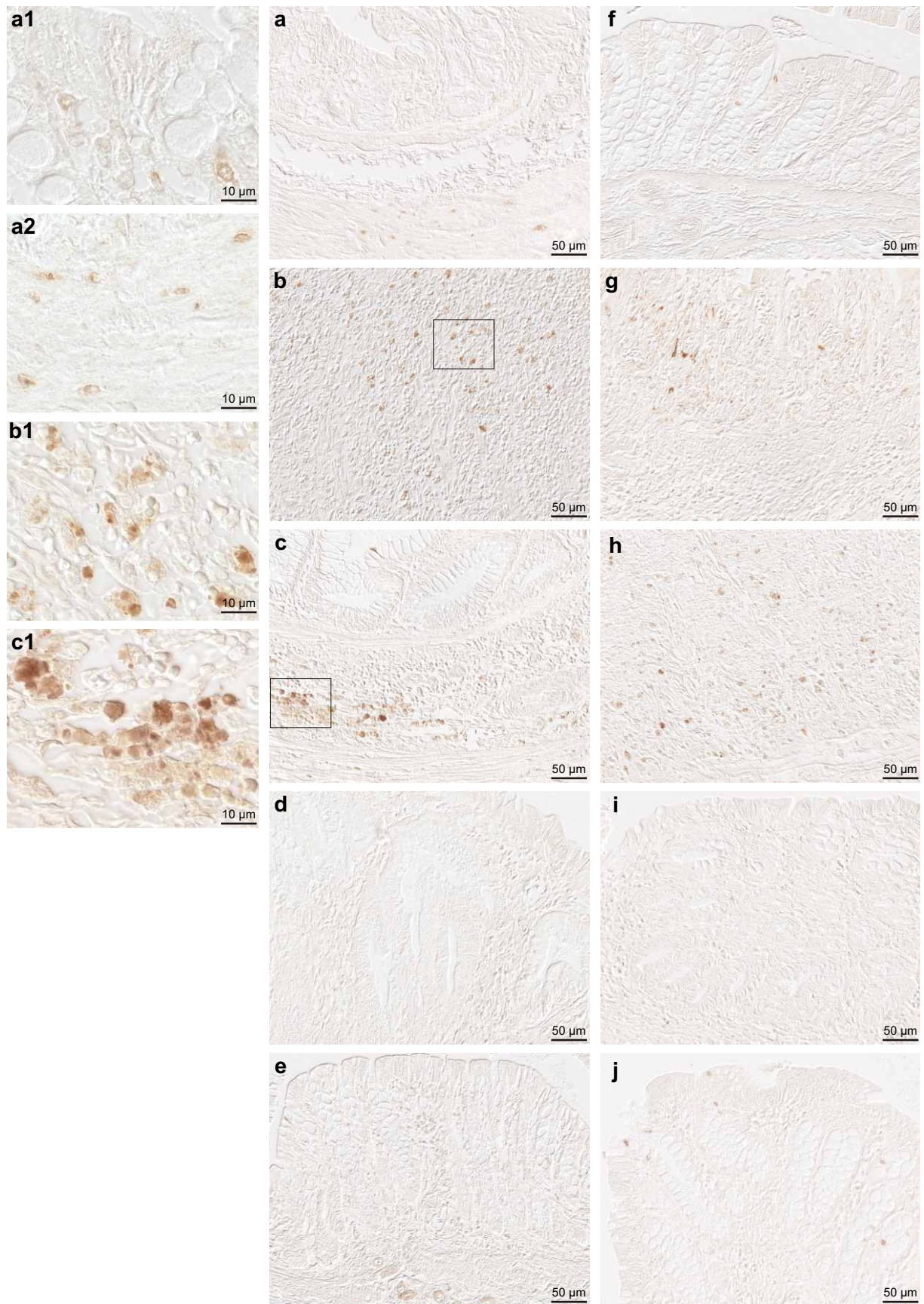


Abb. 4-71: **COX-1 IR, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon;**
a, f Tag 0, **b, g** 4 UZ, **c, h** 11 UZ, **d, i** 11 RZ und **e, j** 21; **a-e** Kontrollgruppe, **f-j** RS-Gruppe;
a1 Lamina propria, **a2** Tunica muscularis; **b1** Lamina propria, UZ;
c1 Tela submucosa, RZ

wahrscheinlich um infiltrierende Zellen. In der Lamina propria waren große mobile Zellen, besonders in der Nähe des Lumens, immunreaktiv (Abb. 4-72 B; 4-73 a, a1). Sehr selten markierten sich in dieser Darmschicht Fibrozyten und Myofibroblasten. Ohne Regelmäßigkeit färbte sich das Gefäßendothel in der Lamina propria und der Tela submucosa. Zellen der Lamina muscularis mucosae und der Tunica muscularis waren fokal immunreaktiv (Abb. 4-72 C). Subzellulär markierten sich perinukleäre Membranen und membranartige Strukturen im Zytoplasma (Abb. 4-73 a1).

Am 4. Tag nach Kolitis-Induktion ließen sich signifikant weniger COX-2 positive Signale in den neugebildeten Krypten am Übergang zur Ulzerationszone nachweisen. Dies war auch in den regenerationsaktiven Krypten am 11. Tag der Fall. In neugebildeten morphologisch intakten Krypten näherte sich die IR bereits wieder dem Ausgangsniveau. Am 21. Tag unterschied sich die IR im Epithel nicht von der vor Induktion der Kolitis (Abb. 4-72 A).

Auch die IR in den fixen und mobilen Zellen der Lamina propria war am Tag 4 und in geringerem Maße am Tag 11 nach Induktion signifikant verändert (Abb. 4-72 B). In der Lamina propria, hauptsächlich im Grenzgebiet zu Ulzerationen und in geringerem Maße luminal zwischen den neu gebildeten Krypten, war eine erhöhte Anzahl stärker immunreaktiver Zellen feststellbar (Abb. 4-73 b, b1). COX-2 positive Zellen überlagerten die Ulzeration/Erosion in Richtung Lumen (Abb. 4-73 c, c1). Am 4. Tag markierten sich auch mobile Zellen in der nekrotischen Schleimhaut und in der Tela submucosa unterhalb dieser Areale (Abb. 4-73 c2). Am 21. Tag war das Ausgangsniveau wieder erreicht (Abb. 4-73 e).

Eine signifikante Verstärkung der COX-2 mc IR war am 4. Tag in Zellen der Lamina muscularis mucosae direkt neben und unterhalb von Ulzerationen festzustellen. Auch die Tunica muscularis und der Plexus myentericus wiesen in diesen Gebieten am Tag 4 und 11 eine gesteigerte IR auf (Abb. 4-72 C).

In der RS-Gruppe konnte außer einer verringerten IR in den Zellen der Lamina propria am Tag 11 kein signifikanter Unterschied im Vergleich mit der Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 4-72 A-C; 4-73 f-j).

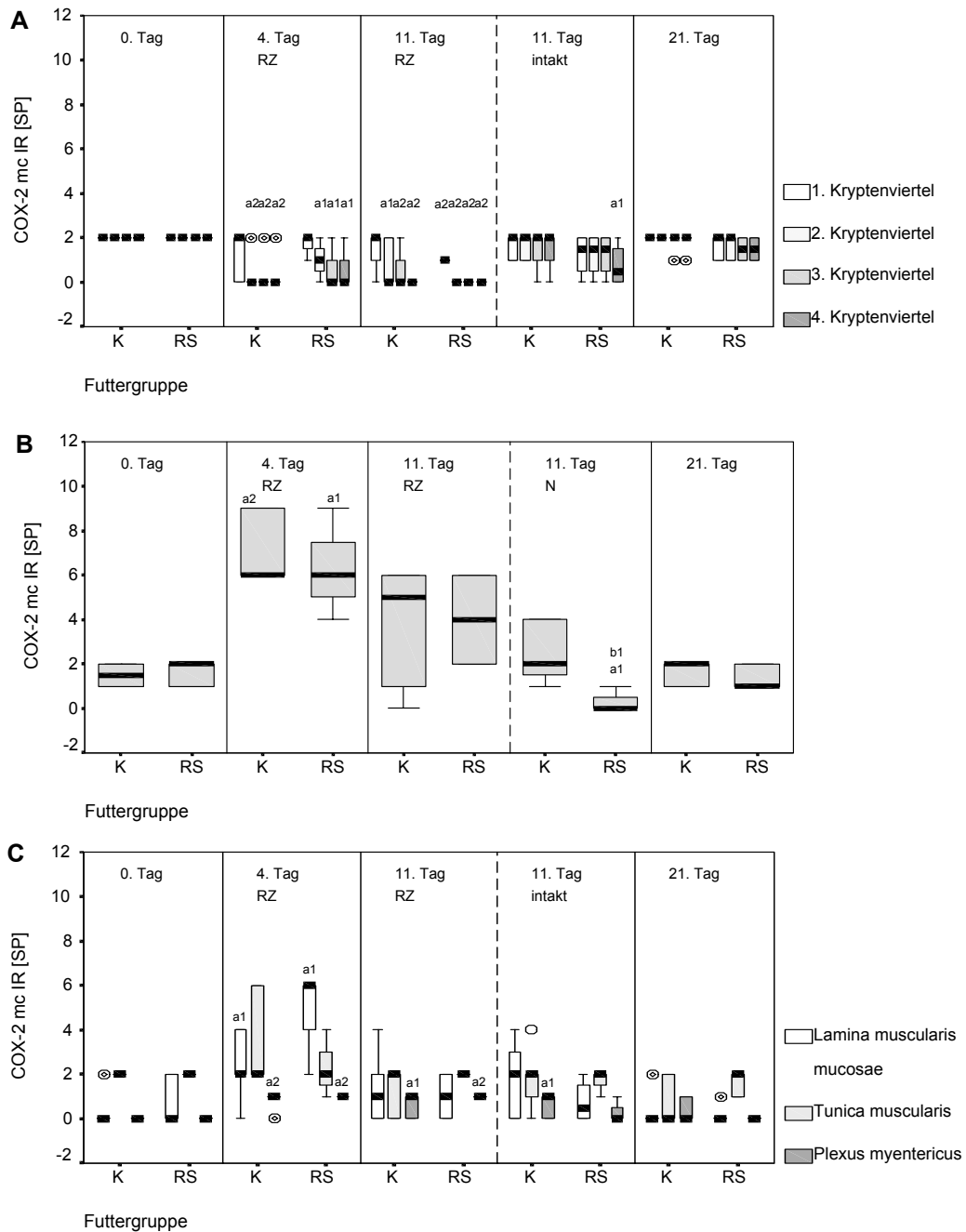


Abb. 4-72: COX-2 mc IR, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon, Tag 0, 4, 11 und 21; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); **A** Lamina epithelialis; **B** Lamina propria; **C** Lamina muscularis mucosae, Tunica muscularis, Plexus myentericus; **a** signifikant verschieden vom Tag 0 innerhalb derselben Futtergruppe, **b** RS-Gruppe signifikant verschieden von der Kontrollgruppe am selben Tag (**1** $p < 0,05$, **2** $p < 0,01$)

COX-2 pc

In der Kontrollgruppe war vor Kolitis-Induktion in einzelnen Zellen des Saumepithels eine schwache COX-2 pc IR an feinsten ringförmigen Strukturen im Zytoplasma, apikal vom Zellkern, nachweisbar. In allen anderen Darmschichten trat keine COX-2 pc IR auf (Abb. 4-74 A-C, 4-75 a, a1).

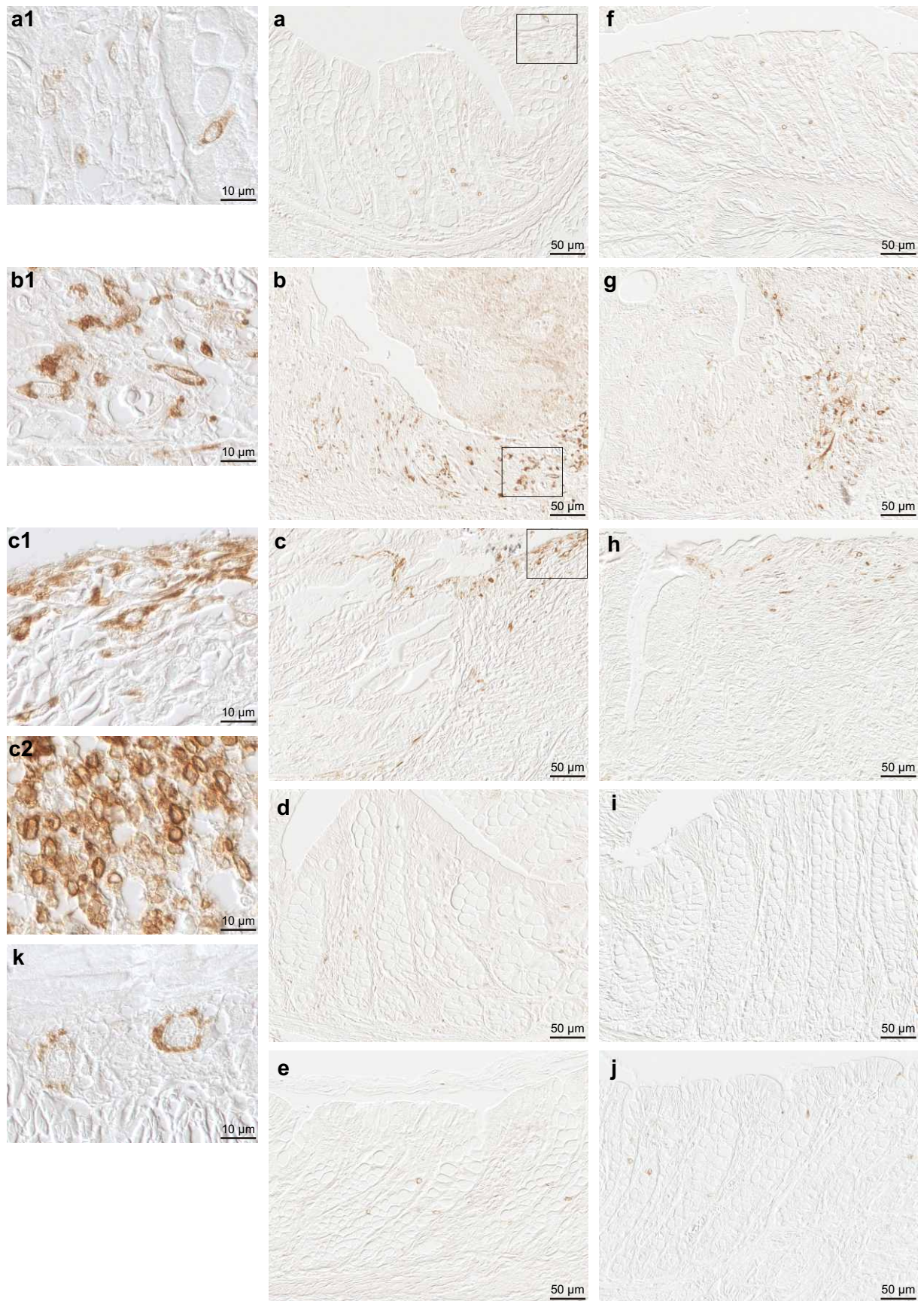


Abb. 4-73: **COX-2 mc IR**, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon;
a, f Tag 0, **b, g** 4 RZ/UZ, **c, h, k** 11 RZ/UZ, **d, h, i** 11 intakt und **e, j** 21;
a-e, k Kontrollgruppe, **f, j** RS-Gruppe; **a1** Lamina epithelialis, Lamina propria;
b1, c1, c2 Lamina propria, RZ/UZ; **k** Plexus myentericus, RZ/UZ

Am 4. Tag war eine leichte fokale Zunahme COX-2 positiver Zellen, hauptsächlich im Saumepithel und im Kryptengrund, feststellbar. Auffällig war eine signifikant erhöhte Anzahl positiver mobiler Zellen in der Lamina propria an der Grenze zu bzw. in der Tela submucosa direkt unterhalb von nekrotischen Arealen. In diesen Zellen markierten sich ebenfalls Strukturen im Zytoplasma (Abb. 4-74 A-C; 4-75 b, b1).

Am 11. Tag nach Kolitis-Induktion konnte nur im Saumepithel einzelner neugebildeter Krypten in der Regenerationszone eine IR nachgewiesen werden. Morphologisch intakte Krypten zeigten keine IR (Abb. 4-74 A; 4-75 c-d). In der Lamina propria war die Anzahl positiver mobiler Zellen nur noch leicht erhöht. In der Tela submucosa konnten keine positiven Signale mehr detektiert werden (Abb. 4-74 B, C).

Am 21. Tag war die COX-2 IR in allen Darmschichten wieder mit der IR vor Kolitis-Induktion vergleichbar (Abb. 4-74 A-C; 4-75 e, e1).

In der RS-Gruppe glich die IR in den Krypten am Tag 0 sowie 4 und 21 nach Kolitis-Induktion der IR in der Kontrollgruppe. Am Tag 11 zeigte sich in regenerationsaktiven Krypten und in geringerem Maße in morphologisch intakten Krypten eine leicht erhöhte Anzahl immunreaktiver Zellen (Abb. 4-74 A; 4-75 f-j).

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe war die COX-2 IR in den mobilen Zellen der Lamina propria am 4. Tag geringer, am 11. Tag stärker ausgeprägt. In der Tela submucosa traten keine Unterschiede auf (Abb. 4-74 B, C).

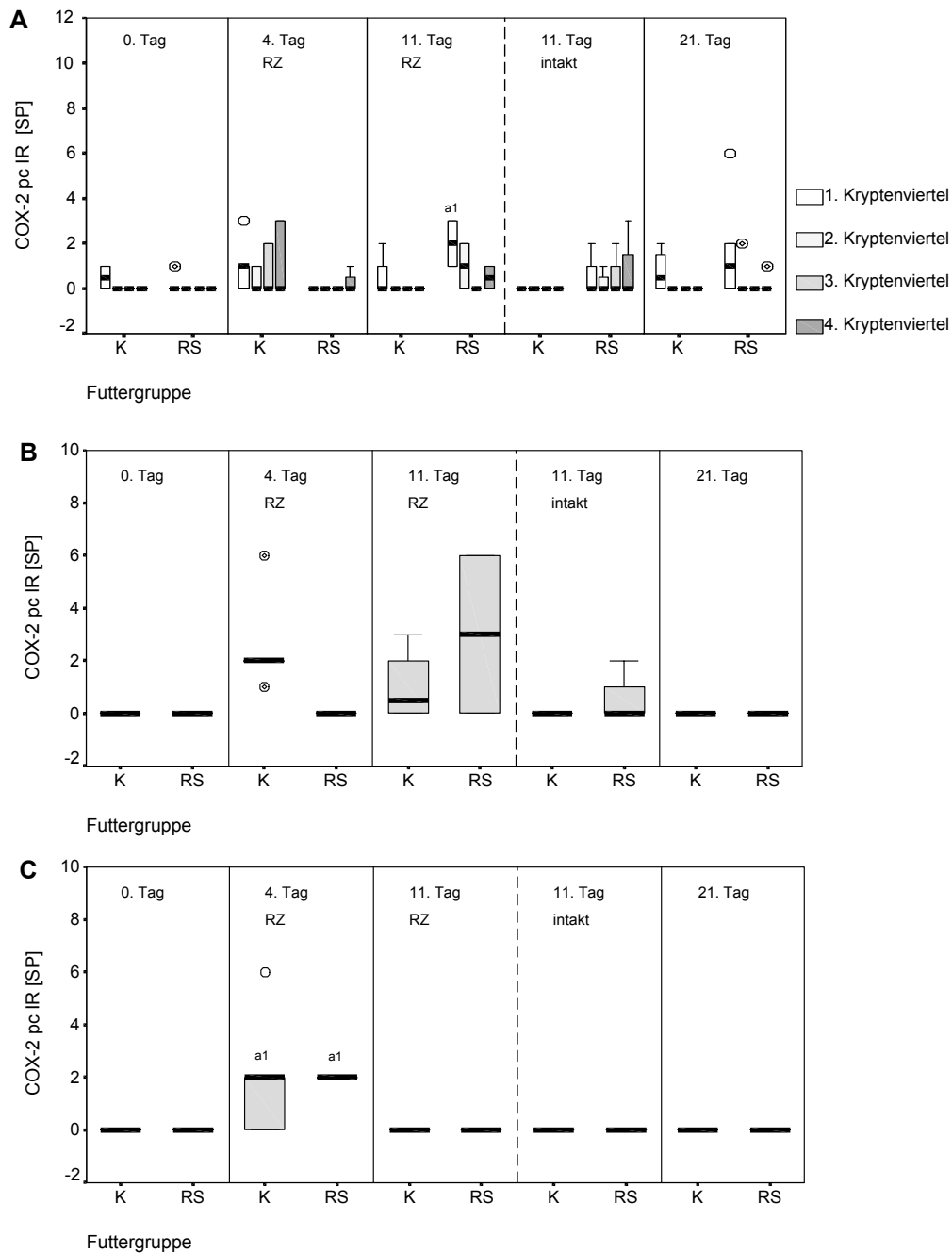


Abb. 4-74: COX-2 pc IR, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon, Tag 0, 4, 11 und 21; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); **A** Lamina epithelialis; **B** Lamina propria; **C** Tela submucosa; **a** signifikant verschieden vom Tag 0 innerhalb derselben Futtergruppe, **b** RS-Gruppe signifikant verschieden von der Kontrollgruppe am selben Tag (**1** $p < 0,05$, **2** $p < 0,01$)

4.4.4.3 iNOS

Vor Kolitis-Induktion war in der Kontrollgruppe eine iNOS IR in Einzelzellen in den Krypten - hauptsächlich im Saumepithel – feststellbar. Stark vereinzelt wiesen mobile Zellen der Lamina propria eine IR auf. In allen positiven Zellen markierten sich feinste vesikelartige Strukturen im Zytoplasma (Abb. 4-76 A, B; 4-77 a, a1).

Am Tag 4 lagen in den Krypten der Regenerationszone keine positiven Signale vor. Ab Tag 11 traten wieder vereinzelt iNOS positive Zellen im Epithel auf (Abb. 4-76 A; 4-77 c-e).

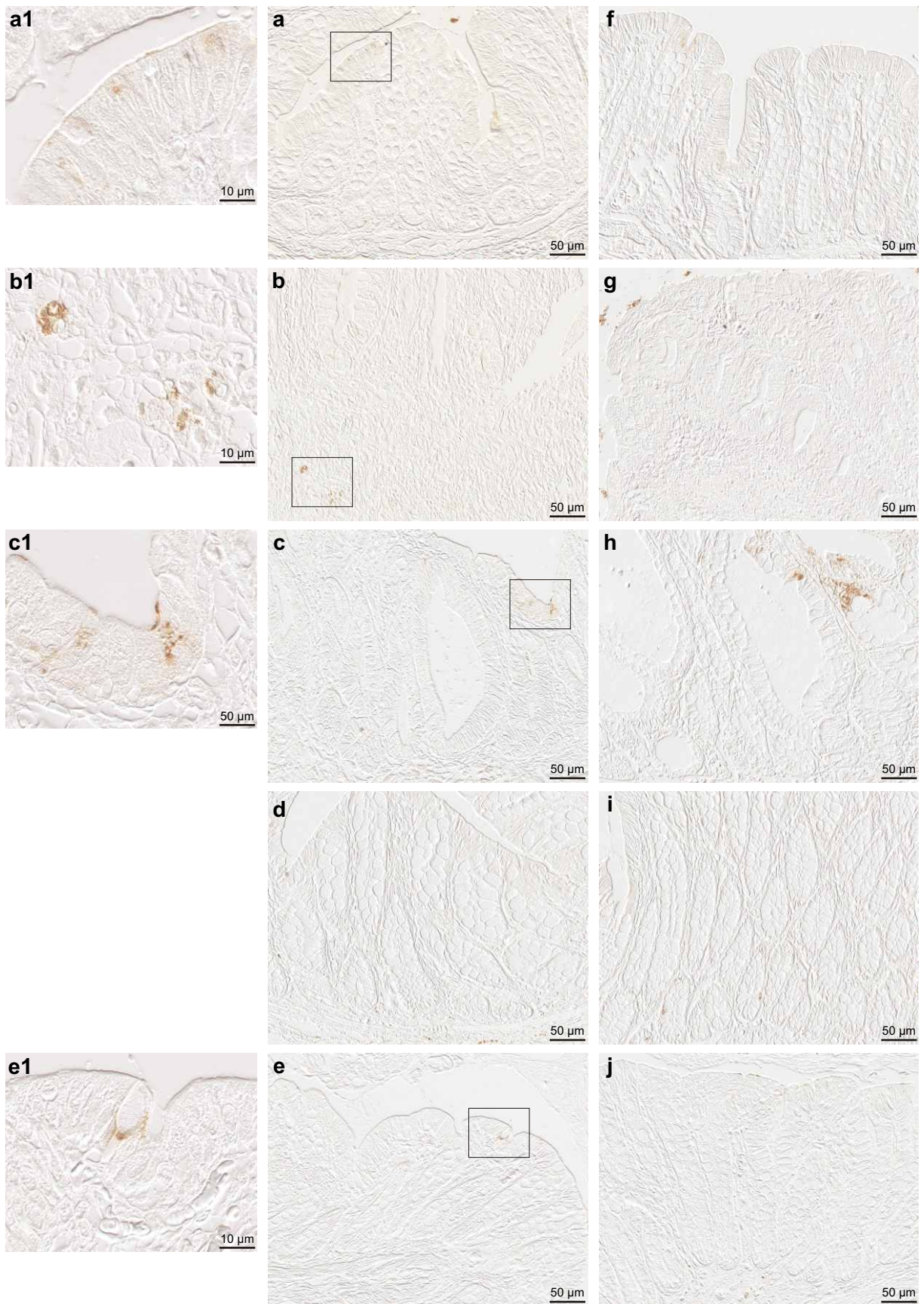


Abb. 4-75: **COX-2 pc IR**, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon; **a, f** Tag 0, **b, g** 4 RZ/UZ, **c, h** 11 RZ, **d, i** 11 intakt und **e, j** 21; **a-e** Kontrollgruppe (K), **f-j** RS-Gruppe (RS); **a1, c1, e1** Lamina epithelialis, 1. Kryptenviertel, Zytoplasma; **b1** Lamina propria, UZ, mobile Zellen

Auffällig war eine dichte Infiltration der basalen Lamina propria und in geringerem Maße der Tela submucosa mit iNOS positiven mobilen Zellen – wahrscheinlich Granulozyten - an der Grenze zu und unterhalb von Ulzerationen am 4. Tag nach Induktion. Am 11. Tag erreichte diese IR fast wieder das Ausgangsniveau (Abb. 4-76 B, C; 4-77 b).

In der RS-Gruppe traten keine signifikanten Unterschiede in der iNOS IR im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. (Abb. 4-76 A-C; 4-77 f-j).

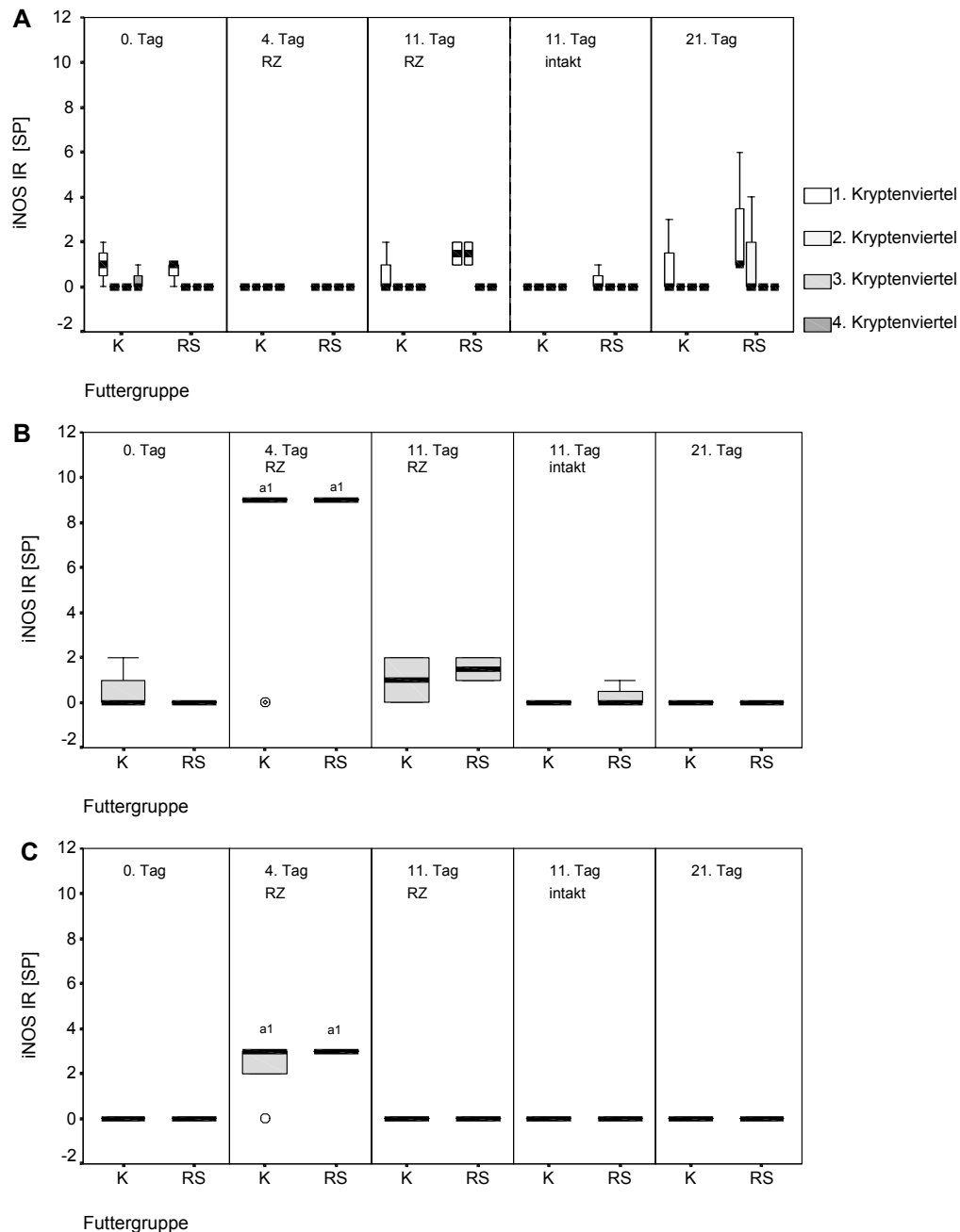


Abb. 4-76: iNOS IR, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon, Tag 0, 4, 11 und 21; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); **A** Lamina epithelialis; **B** Lamina propria; **C** Tela submucosa; **a1** signifikant verschieden vom Tag 0 innerhalb derselben Futtergruppe ($p < 0,05$)

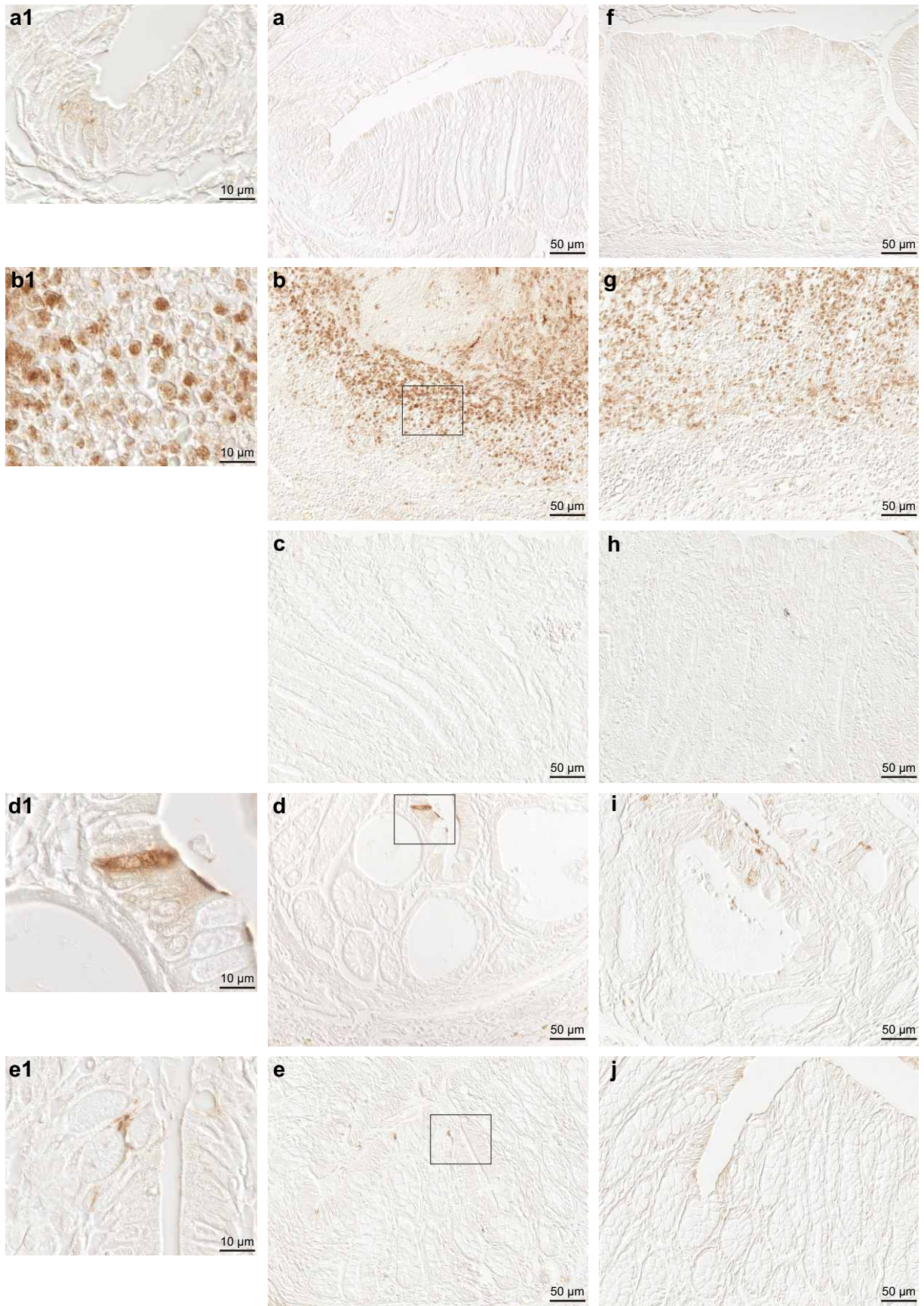


Abb. 4-77: **iNOS IR**, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon;
a, f Tag 0, **b, g** 4 UZ, **c, h** 4 RZ, **d, i** 11 RZ und **e, j** 21; **a-e** Kontrollgruppe, **f-j** RS-Gruppe;
a1, d1, e1 Lamina epithelialis, 1. Kryptenviertel, Zytoplasma, diffus und struktur-
gebunden, Lamina propria; **b, b1, g** Lamina propria/Tela submucosa, Granulozyten

4.4.4.4 nNOS

Im Normalbefund konnte in der Kontrollgruppe eine IR gegen nNOS ausschließlich im Epithel entlang der gesamten Krypte, jedoch mit unterschiedlicher Intensität, festgestellt werden. Die Zellen des Saumepithels waren am stärksten und durchgängig immunreaktiv. Eine ähnlich starke IR wurde in den Zellen am Kryptengrund nachgewiesen. Im 2. und 3. Kryptenviertel fanden sich wenige, schwach positive Zellen. Es markierten sich Strukturen im Zytoplasma apikal vom Zellkern (Abb. 4-78; 4-79 a-a2).

Am 4. Tag und 11. Tag nach Kolitis-Induktion war eine deutliche Verstärkung der nNOS IR im 2., 3., und 4. Viertel in den der Ulzeration direkt benachbarten, proliferierenden Krypten zu verzeichnen (Abb. 4-78; 4-79 b, c). Leicht hyperplastische und morphologisch intakte Krypten waren in diesem Stadium bereits mit dem Normalbefund vergleichbar (Abb. 4-78; 4-79 d). Zusätzlich wurden am 4. Tag vereinzelt positive mobile Zellen in der Lamina propria, der Tela submucosa sowie in der Tunica muscularis nachgewiesen.

Unter der RS-angereicherten Diät war die nNOS IR am 11. Tag im Saumepithel und am Kryptengrund tendenziell schwächer ausgeprägt. An allen anderen Tagen entsprach die IR den Befunden in der Kontrollgruppe (Abb. 4-78; 4-79 f-j).

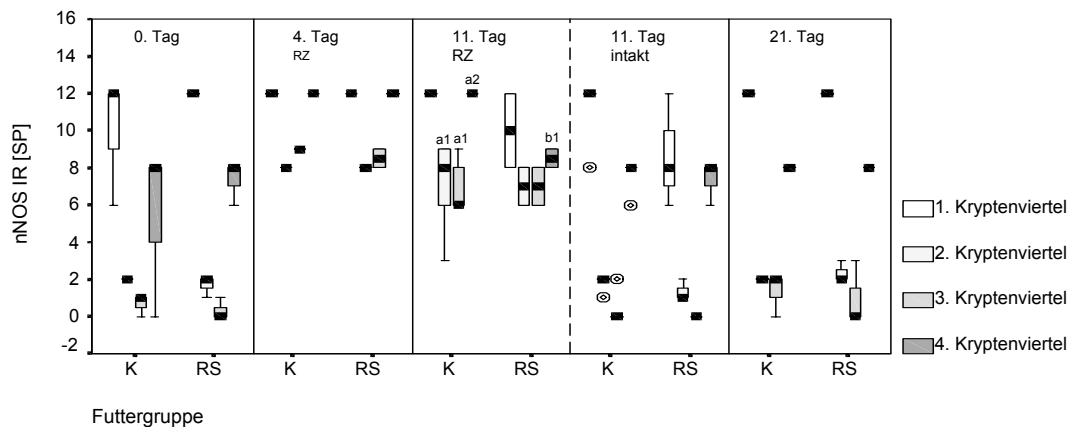


Abb. 4-78: nNOS IR, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon, Tag 0, 4, 11 und 21; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); Lamina epithelialis; **a** signifikant verschieden vom Tag 0 innerhalb derselben Futtergruppe, **b** RS-Gruppe signifikant verschieden von der Kontrollgruppe am selben Tag (**1** $p < 0,05$, **2** $p < 0,01$)

4.4.4.5 GI-GPx

Unter der Kontrolldiät konnte vor Kolitis-Induktion in den Zellen am Kryptengrund eine kernständige GI-GPx IR demonstriert werden. Demgegenüber wiesen Zellen des Saumepithels eine durchgängige diffus zytoplasmatische IR in ähnlicher Intensität auf (Abb. 4-80 A, B; 4-81 a-a2). In der Nähe von Lymphfollikeln waren Krypten, oft über die gesamte Achse, stärker immunreaktiv.

Am 4. und 11. Tag nach Induktion war eine deutlich verstärkte IR in den Zellkernen am Kryptengrund in der Regenerationszone zu verzeichnen. Die Lokalisation positiver Kerne war

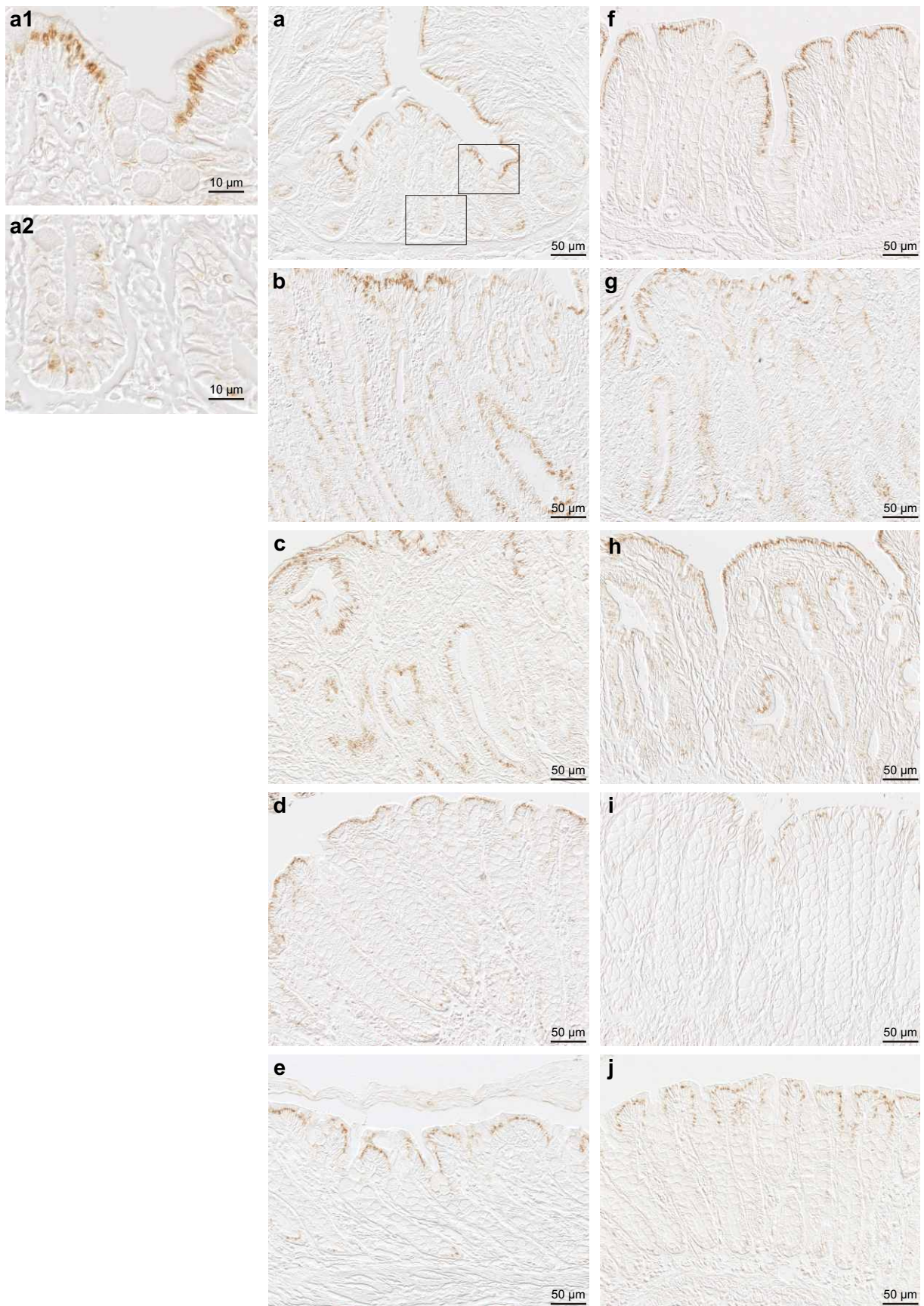


Abb. 4-79: **n** NOSIR, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon;
a, f Tag 0, **b, g** 4 RZ, **c, h** 11 RZ, **d, i** 11 intakt und **e, j** 21;
a-e Kontrollgruppe, **f-j** RS-Gruppe;
a1 1. Kryptenviertel, **a2** 4. Kryptenviertel

nicht mehr auf den Kryptengrund beschränkt; es erfolgte eine Ausdehnung in Richtung Lumen. In morphologisch intakten Krypten entsprach die IR am Tag 11 bereits dem Normalbefund (Abb. 4-80 A; 4-81 b-e).

Auch die diffus zytoplasmatische GI-GPx IR wies im Verlauf des Heilungsprozesses Veränderungen auf. Sie war am Tag 4 und 11 nach Gabe der Noxe besonders im 1. und 2. Kryptenviertel der Regenerationszone verstärkt. Morphologisch intakte Krypten zeigten zu diesem Zeitpunkt nur eine leicht gesteigerte IR im Saumepithel. Die IR am 21. Tag glich wieder dem Ausgangsniveau (Abb. 4-80 B; 4-81 b-e).

Am 4. Tag wiesen einzelne Stromazellen eine strukturegebundene zytoplasmatische IR auf. Am 11. Tag waren Zellen des Plexus myentericus in der Nähe von Ulzerationen immunreaktiv (Abb. 4-81 k, k1).

Unter RS wurden vor der Kolitis-Induktion auch positive Zellkerne im 3. Kryptenviertel festgestellt. Die diffus zytoplasmatische IR zog sich tiefer ins 2. Kryptenviertel hinein. Sowohl zytoplasmatisch als auch kernständig war die IR am 4. Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas verringert, am 11. Tag tendenziell erhöht. Am 21. Tag entsprach die IR den Ausgangswerten (Abb. 4-80 A, B; 4-81 f-j).

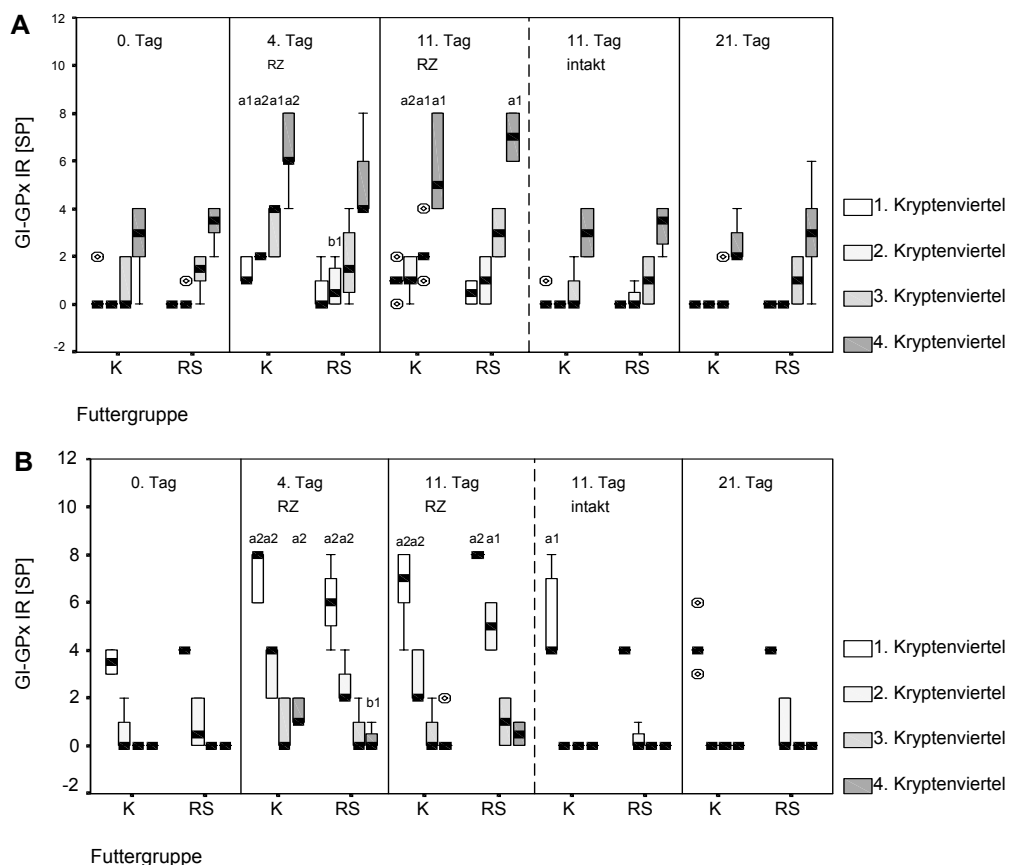


Abb. 4-80: GI-GPx IR, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon, Tag 0, 4, 11 und 21; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); Lamina epithelialis, **A** kernständig, **B** Zytoplasma, diffus; **a** signifikant verschieden vom Tag 0 innerhalb derselben Futtergruppe, **b** RS-Gruppe signifikant verschieden von der Kontrollgruppe am selben Tag (1 $p < 0,05$, 2 $p < 0,01$)

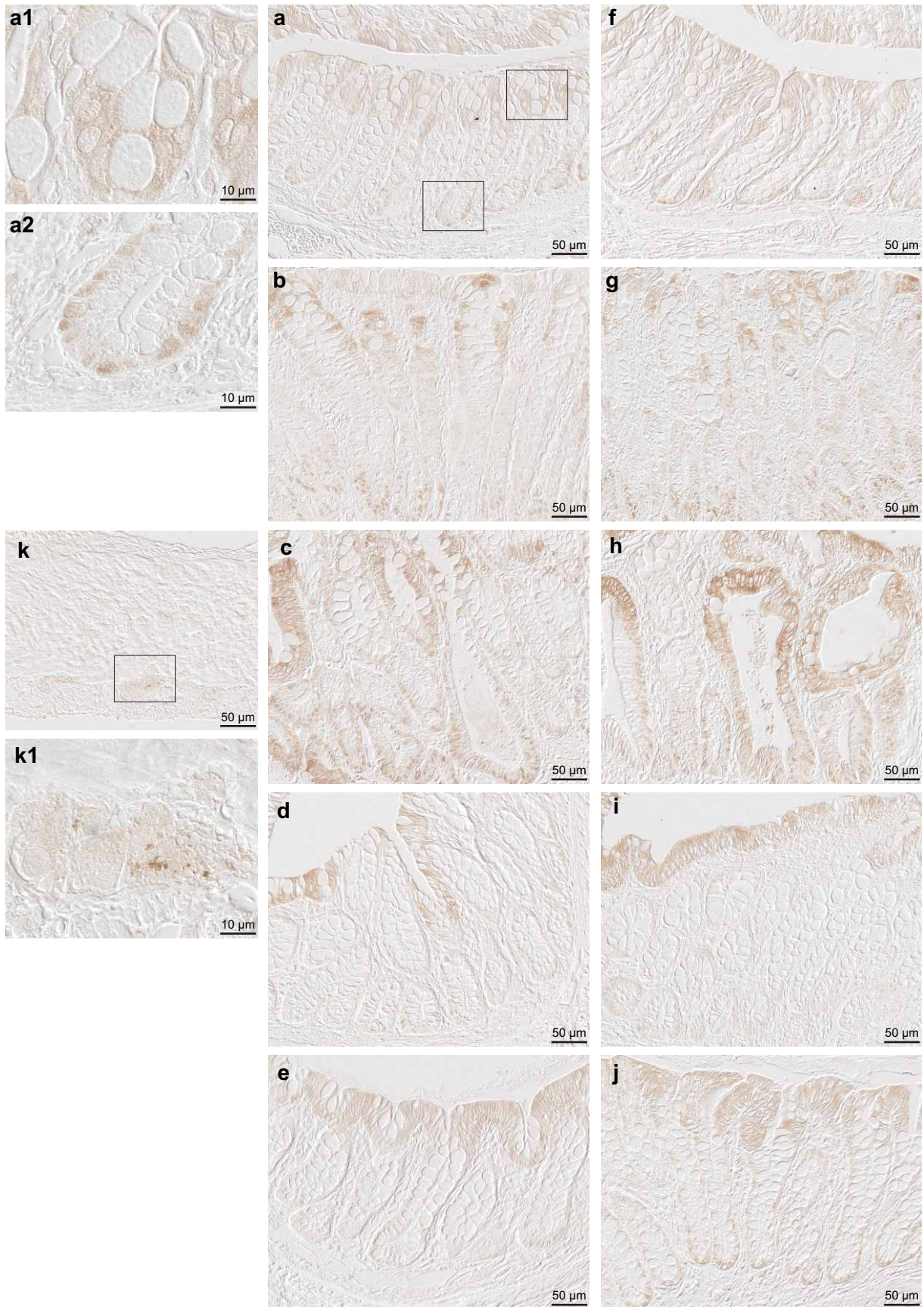


Abb. 4-81: **GI-GPxIR**, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon;
a, f Tag0, **b, g** 4 RZ, **c, h, k** 11 RZ, **d, i** 11 intakt und **e, j** 21;
a-e, k Kontrollgruppe, **f-j** RS-Gruppe; **a1** 1. Kryptenviertel, diffus zytoplasmatisch,
a2 4. Kryptenviertel, kernständig; **k, k1** Plexus myentericus, RZ/UZ

4.4.4.6 HSP25

Vor Kolitis-Induktion konnte in der Kontrollgruppe in allen Schichten des Kolons, außer in der Lamina epithelialis, eine HSP25 IR nachgewiesen werden. Am stärksten färbte sich die Wandung großer Gefäße in der Tela submucosa (Abb. 4-83 a, a2). Auch in der Lamina propria markierten sich Gefäße. In dieser Schicht reagierten ebenfalls mobile Zellen und Fibrozyten schwach positiv (Abb. 4-82 A; 4-83 a, a1). Des Weiteren konnte eine IR in der Lamina muscularis mucosae und der Tunica muscularis beobachtet werden (Abb. 4-82 B; 4-83 a). Auch die Zellen des Plexus myentericus waren immunreaktiv. Die Lokalisation der IR war teilweise strukturgebunden, aber auch diffus zytoplasmatisch verteilt.

Am 4. Tag nach Kolitis-Induktion konnten in der ödematösen Tela submucosa und der Lamina propria im Randgebiet von Ulzerationen eine vermehrte Anzahl HSP25 positiver Gefäße beobachtet werden. Am 11. Tag zeigte sich bereits weitgehend wieder ein Normalbefund. In der Lamina propria der Regenerationszone waren die typischen HSP25 positiven Zellen (Abb. 4-83 a1) am Tag 4 und 11 nicht nachweisbar. Deren Anzahl erreichte aber am 21. Tag wieder das Ausgangsniveau (Abb. 4-82 A; 4-83 b-e).

Neben und unterhalb von Ulzerationen zeigten sowohl Zellen der Lamina muscularis mucosae, in geringerem Maße auch Zellen der Tunica muscularis und des Plexus myentericus am 4. Tag eine deutlich verstärkte HSP25 IR; diese war am 11. Tag noch immer leicht erhöht und erst am 21. Tag wieder normalisiert (Abb. 4-82 B; 4-83 c, c1).

Unter dem Einfluß von RS veränderte sich die HSP25 IR nicht signifikant (Abb. 4-82 A, B; 4-83 f-j).

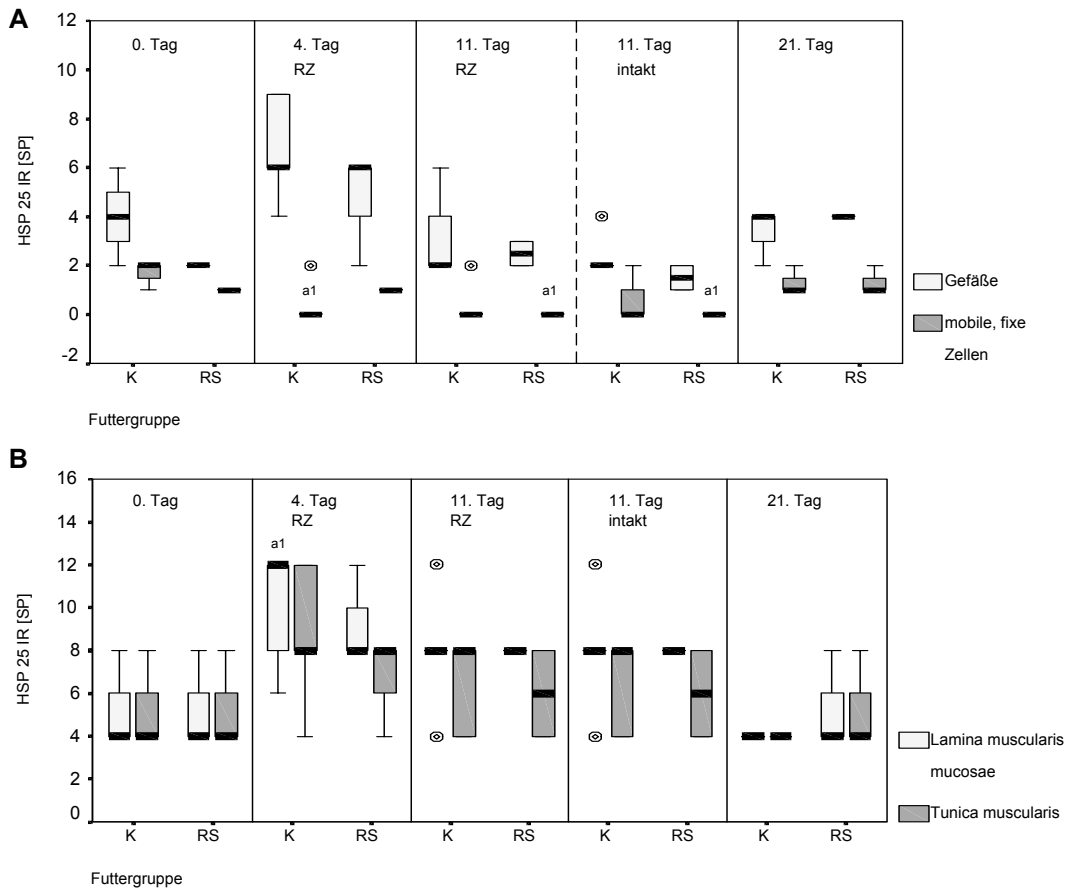


Abb. 4-82: HSP25 IR, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon, Tag 0, 4, 11 und 21; Kontrollgruppe (K), RS-Gruppe (RS); **A** Lamina propria, Gefäße, mobile und fixe Zellen; **B** Lamina muscularis mucosae, Tunica muscularis; **a1** signifikant verschieden vom Tag 0 innerhalb derselben Futtergruppe ($p < 0,05$)

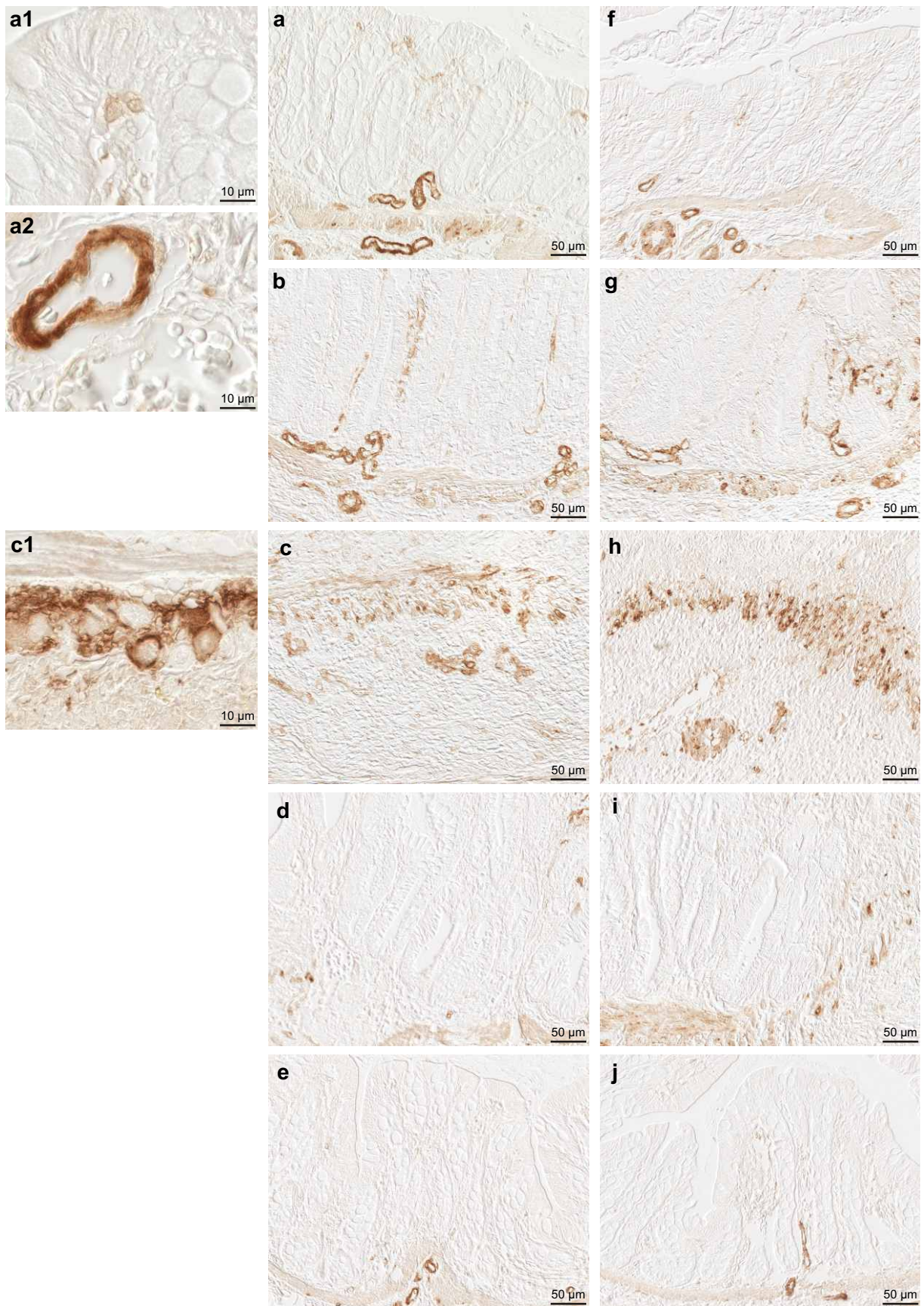


Abb. 4-83: **HSP25 IR, TNBS-Kolitis, Ratte, Kolon;**
a, f Tag 0, **b, g** 4 RZ, **c, h** 11 UZ, **d, i** 11 RZ und **e, j** 21;
a-e Kontrollgruppe, **f-j** RS-Gruppe;
a1 Lamina propria, **a2** Tela submucosa, Gefäß; **c1** Plexus myentericus