

Aus der  
Chirurgischen Klinik I  
(Viszeral-, Thorax-, und Gefäßchirurgie)  
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. H.J. Buhr  
Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

## **DISSERTATION**

Bakterielle Permeation und epheliale Barriereveränderungen bei Patienten mit chronisch  
entzündlichen Darmerkrankungen

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae ( Dr. med. )

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Nicole Steenfatt  
aus Berlin

Dekanin: Prof. Dr. med. A. Grütters-Kieslich

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. A. J. Kroesen  
2. Priv.-Doz. Dr. med. M. Ruwaleit  
3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Brüwer

Datum der Promotion: 14.06.2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	10
1.1.	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	10
1.2.	Inzidenz und Prävalenz für CED	10
1.3.	Colitis ulcerosa	11
1.4.	Morbus Crohn	13
1.5.	Das intestinale Immunsystem und die residentelle Darmflora	14
1.6.	Darmepithel als Barriere	16
1.7.	Histologischer Aufbau des Verdauungskanals	16
1.7.1.	Epithelzelle und Aufbau des intestinalen Immunsystems	21
1.8.	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Bakterien	21
1.9.	Herleitung der Hypothese	22
1.10.	Ziel der Arbeit	24
<b>2.</b>	<b>Patienten, Material und Methoden</b>	25
2.1.	Versuchsprinzip	25
2.2.	Aufbau der Ussing – Kammer	25
2.3.	Verwendete Lösungen	27
2.4.	Zusammensetzung der Versuchslösung (Natriumthioglykolatlösung)	27
2.5.	Charakterisierung - Bacteroides fragilis	28
2.6.	Selektiver Nachweis von Bacteroides fragilis	29
2.7.	Anzucht von Bacteroides fragilis	29
2.8.	Herstellung der Agarplatten	29
2.9.	Dekontamination des zu untersuchenden Darmepithels	29
2.10.	Selektive in-vitro-Bakterien-Permeation von Bacteroides fragilis	30
2.11.	Der Messplatz für die bakterielle Permeation	31
2.12.	Wachstumsverhalten des Anaerobiers Bacteroides fragilis unter verschiedenen Begasungsvarianten	32
2.13.	Patientenkollektiv	33
2.14.	Aufarbeitung der menschlichen Darmpräparate	35
2.15.	Durchführung der Experimente	36
2.16.	Histologische Untersuchung der Präparate	37
2.17.	Statistik	38
2.18.	Patienten und Präparate	38
2.18.1.	Kontroll-Gruppe	38
2.18.1.1.	Terminales Ileum	38
2.18.1.1.2.	Terminales Ileum: Permeation Bacteroides fragilis	39
2.18.1.2.	Colon	39
2.18.1.2.1.	Colon: Permeation Bacteroides fragilis	39
2.18.2.	Morbus Crohn	39
2.18.2.1.	Terminales Ileum	39
2.18.2.2.	Terminales Ileum: Permeation Bacteroides fragilis	42
2.18.2.3.	Colon: Permeation Bacteroides fragilis	43
2.18.3.	Colitis ulcerosa	43
2.18.3.1.	Terminales Ileum: Permeation Bacteroides fragilis	45
2.18.3.2.	Colon: Permeation Bacteroides fragilis	46

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	47
3.1.	Kontroll-Gruppe	47
3.1.1.	Terminales Ileum	47
3.1.1.1.	Permeation – Bacteroides fragilis	47
3.1.1.2.	Elektrischer Widerstand der Epithelien	47
3.1.1.3.	Histologie	48
3.1.1.4.	Praeoperative Therapie	48
3.1.1.4.1.	Cortison	48
3.1.1.4.2.	Antibiotika	48
3.1.1.4.3.	Totale parenterale Ernährung	48
3.1.1.4.4.	Postoperative septische Komplikationen	48
3.1.2.	Colon	49
3.1.2.1.	Permeation – Bacteroides fragilis	49
3.1.2.2.	Elektrischer Widerstand der Epithelien	50
3.1.2.3.	Histologie	50
3.1.2.4.	Praeoperative Therapie	50
3.1.2.4.1.	Cortison	50
3.1.2.4.2.	Antibiotika	51
3.1.2.4.3.	Totale parenterale Ernährung	51
3.1.2.4.4.	Postoperative septische Komplikationen	51
3.2.	Morbus Crohn	51
3.2.1.	Terminales Ileum	51
3.2.1.1.	Permeation – Bacteroides fragilis	51
3.2.1.2.	Elektrischer Widerstand der Epithelien	53
3.2.1.3.	Korrelation von Permeation und Widerstand	54
3.2.1.4.	Histologie	54
3.2.1.5.	Praeoperative Therapie	55
3.2.1.5.1.	Cortison	55
3.2.1.5.2.	Antibiotika	55
3.2.1.5.3.	Totale parenterale Ernährung	55
3.2.1.5.4.	Postoperative septische Komplikationen	55
3.2.2.	Colon	56
3.2.2.1.	Permeation – Bacteroides fragilis	56
3.2.2.2.	Elektrischer Widerstand der Epithelien	57
3.2.2.3.	Korrelation von Permeation und Widerstand	58
3.2.2.4.	Histologie	58
3.2.2.5.	Praeoperative Therapie	59
3.2.2.5.1.	Cortison	59
3.2.2.5.2.	Antibiotika	59
3.2.2.5.3.	Totale parenterale Ernährung	59
3.2.2.5.4.	Postoperative septische Komplikationen	59
3.3.	Colitis ulcerosa	60
3.3.1.	Terminales Ileum	60
3.3.1.1.	Permeation - Bacteroides fragilis	60
3.3.1.2.	Elektrischer Widerstand der Epithelien	61
3.3.1.3.	Korrelation von Permeation und Widerstand	62
3.3.1.4.	Histologie	62
3.3.1.5.	Praeoperative Therapie	63
3.3.1.5.1.	Cortison	63
3.3.1.5.2.	Antibiotika	63

3.3.1.5.3.	Totale parenterale Ernährung	63
3.3.1.5.4.	Postoperative septische Komplikationen	63
3.3.2.	Colon	64
3.3.2.1.	Permeation – Bacteroides fragilis	64
3.3.2.2.	Elektrischer Widerstand der Epithelien	65
3.3.2.3.	Korrelation von Permeation und Widerstand	66
3.3.2.4.	Histologie	66
3.3.2.5.	Praeoperative Therapie	67
3.3.2.5.1.	Cortison	67
3.3.2.5.2.	Antibiotika	67
3.3.2.5.3.	Totale parenterale Ernährung	67
3.3.2.5.4.	Postoperative septische Komplikationen	67
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1.1.	Herleitung der Hypothese	68
4.1.2.	Methode	68
4.1.3.	Indirekter/ Direkter Nachweis der Bakterien Permeation	69
4.1.4.	Bakterielle Translokation beim Menschen	72
4.1.5.	Schädigung der Darmschleimhaut durch enterotoxinbildenden Bacteroides fragiles als obligater Anaerobier der intestinalen Mikroflora	72
4.1.6.	Selektion eines Ampicillin/ Sulbactam resistenten Bacteroides fragiles	76
4.1.7.	Messung des elektrischen Widerstands als Parameter für die Intaktheit des Darmepithels	76
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	77
4.2.1.	Permeation von Bacteroides fragiles im term. Ileum und Colon bei Morbus Crohn	77
4.2.1.2.	Elektrischer Widerstand der Epithelien	82
4.2.1.3.	Korrelation von Permeation und Widerstand	83
4.2.1.4.	Histologie	83
4.2.1.5.	Präoperative Therapie	84
4.2.1.5.1.	Cortison	84
4.2.1.5.2.	Antibiotika	84
4.2.1.5.3.	Totale parenterale Ernährung	85
4.2.1.5.4.	Postoperative septische Komplikationen	85
4.2.2.1.	Permeation von Bacteroides fragiles im term. Ileum und Colon bei Colitis ulcerosa	86
4.2.2.2.	Elektrischer Widerstand der Epithelien	87
4.2.2.3.	Korrelation von Pemeation und Widerstand	87
4.2.2.4.	Histologie	87
4.2.2.5.	Präoperative Therapie	88
4.2.2.5.1.	Cortison	88
4.2.2.5.2.	Antibiotika	88
4.2.2.5.3.	Totale Parenterale Ernährung	88
4.2.2.5.4.	Postoperative septische Komplikationen	88
4.2.3.	Vergleich Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	89

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	90
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	93
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	101
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	102

## Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1	Aufbau des Darmepithels	17
Abbildung 2	Die epitheliale Barriere	17
Abbildung 3	Epithelzelle und Aufbau des intestinalen Immunsystems	20
Abbildung 4	Schematisierte Darstellung des Prinzips einer Ussingkammer	25
Abbildung 5	Container für Darmpräparate zur Analyse in der miniaturisierte Ussingkammer	26
Abbildung 6	Schematischer Aufbau der Darmwand	36
Abbildung 7	Schematische Wiedergabe des Versuchsaufbaus	37
Abbildung 8	Anzahl der koloniebildenden Einheiten im Zeitverlauf für das permeierte Epithel aufgetragen	47
Abbildung 9	Widerstände der Epithelien im Bacteroides-Versuch für das terminale Ileum nach 180 Minuten (n.s.)	49
Abbildung 10	Verlauf des elektrischen Widerstandes bei Kontrollen	50
Abbildung 11	Verlauf des Bakterienzuwachses bei der Bacteroides fragilis Permeation	52
Abbildung.12	Widerstände der Epithelien im Bacteroides-Versuch für das terminale Ileum nach 180 Minuten	53
Abbildung 13	Relation der serosalseitigen Kolonie bildenden Einheiten zum totalen Gewebewiderstand des terminalen Ileum bei M. Crohn	54
Abbildung 14	Verlauf des Bakterienzuwachses im Zeitverlauf	57
Abbildung 15	Verlauf des elektrischen Widerstandes bei M. Crohn und Kontrollen	57
Abbildung 16	Relation von serosalseitigen Kolonie bildenden Einheiten und totalen Gewebewiderstand des Colon ascendens bei M. Crohn	58
Abbildung 17	Dynamik der Permeation und die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten für die 4 Epithelien der Colitis ulcerosa Ileum Gruppe	61
Abbildung 18	Für das terminale Ileum Widerstände der Epithelien	61
Abbildung 19	Relation von serosalseitigen Kolonie bildenden Einheiten und totalem Gewebewiderstand des terminalen Ileum bei Colitis ulcerosa	62
Abbildung 20	Verlauf des Bakterienzuwachses im Zeitverlauf	65
Abbildung 21	Verlauf des elektrischen Widerstandes über die Zeit bei Kontrollen, Colitis ulcerosa und M. Crohn.	65
Abbildung 22	Relation von serosalseitigen Kolonie bildenden Einheiten und totalen Gewebewiderstand des Colon ascendens bei Colitis ulcerosa	66

## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	Zusammensetzung der Versuchslösung	28
Tabelle 2	Vergleich der verschiedenen Begasungsarten der Ussingkammer für die Exposition unter <i>Bacteroides fragilis</i>	33
Tabelle 3	Charakteristika der untersuchten Patienten der Ileum- <i>Bacteroides fragilis</i> - Versuche	34
Tabelle 4	Charakteristika der untersuchten Patienten der Colon- <i>Bacteroides fragilis</i> -Versuche	35
Tabelle 5	Charakteristika der untersuchten Kontroll Patienten der Ileum- <i>Bacteroides fragilis</i> -Versuche	39
Tabelle 6	Charakteristika der untersuchten Kontroll Patienten der Colon- <i>Bacteroides fragilis</i> Versuche	39
Tabelle 7	Wiener Klassifikation des Morbus Crohn	41
Tabelle 8	Charakteristika der untersuchten Patienten der Ileum- <i>Bacteroides fragilis</i> -Versuche Colon	42
Tabelle 9	Charakteristika der untersuchten Patienten der Colon- <i>Bacteroides fragilis</i> -Versuche	43
Tabelle 10	True Love Klassifikation	44
Tabelle 11	Charakteristika der untersuchten Patienten der Ileum- <i>Bacteroides fragilis</i> -Versuche	45
Tabelle 12	Charakteristika der untersuchten Patienten der Colon- <i>Bacteroides fragilis</i> -Versuche	46
Tabelle 13	Kontroll-Ileum-Präparate und die Häufigkeit der bakteriellen Permeation von <i>Bacteroides fragilis</i>	47
Tabelle 14	Kontroll-Gruppe und die Häufigkeit der bakteriellen Permeation von <i>Bacteroides fragilis</i>	49
Tabelle 15	Die Häufigkeit der bakteriellen Permeation von <i>Bacteroides fragilis</i> bei der Kontroll, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Gruppe	51
Tabelle 16	Verteilung der Colon-Präparate auf die verschiedenen Gruppen und die Häufigkeit der bakteriellen Permeation von <i>Bacteroides fragilis</i>	56
Tabelle 17	Verteilung der Ileum-Präparate auf die verschiedenen Gruppen und die Häufigkeit der bakteriellen Permeation von <i>Bacteroides fragilis</i>	60
Tabelle 18	Häufigkeit der bakteriellen Permeation von <i>Bacteroides fragilis</i> und die Verteilung der Colon-Präparate auf die verschiedenen Gruppen	64

## Verzeichnis der Abkürzungen

ANCA	Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
BFT	Bacteroides fragiles Toxin
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
GALT	Gut Associated Lymphatic Tissue
HE	Hämatoxylin - Eosin
KBE	Koloniebildene Einheiten
n	Fallzahl
n.s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit

## **1. Einleitung**

### **1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Zur Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zählen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, in 10 % spricht man von einer Colitis indeterminata, bei der man weder zu Morbus Crohn noch zu Colitis ulcerosa eine Zuordnung treffen kann (M. Guindi et al 2004<sup>47</sup>). Die Ätiologie dieser Erkrankungen ist bisweilen noch ungeklärt. Ein multifaktorielles Modell wird für die Pathogenese der CED verantwortlich gemacht, bei dem eine erbliche Veranlagung, die Ernährung, Störungen des Immunsystems, psychosomatische Faktoren und infektiöse Pathogene wie möglicherweise die intestinale Mikroflora eine Rolle spielen. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind durch eine schubweise verlaufende Entzündungsreaktion der Lamina propria mukosae gekennzeichnet. Es kommt bei der Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zu einer Infiltration der intestinalen Lamina propria der Mukosa mit Granulozyten und mononukleären Phagozyten, die durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen, Proteasen sowie anderen Mediatoren eine direkte Gewebsschädigung verursachen können. Bei der Colitis ulcerosa ist nur die Mukosa und Submukosa betroffen. Dagegen ist bei Morbus Crohn die Entzündung transmural, disproportioniert von der Mukosa zur Serosa zunehmend. Die Häufigkeit der Lokalisation der Entzündungsreaktionen des Morbus Crohns und der Colitis ulcerosa erstreckt sich vor allem auf das terminale Ileum und das gesamte Colon. Diese Bereiche unterscheiden sich von anderen Darmabschnitten dadurch, dass sie deutlich stärker mit Darmbakterien besiedelt sind.

### **1.2 Inzidenz und Prävalenz für CED**

In den westlichen Ländern verzeichnet man einen jährlichen Zuwachs an Colitis ulcerosa und Morbus Crohn von sieben bis zwölf neuen Fällen pro 100.000 Einwohnern (Russel MG et al. 2001<sup>105</sup>). Seit einigen Jahren wird in den westlichen Industrieländern eine Zunahme der Morbus Crohn Erkrankungen beobachtet. Schweden hat beispielsweise, die höchste Erkrankungsrate zu verzeichnen. In Deutschland tritt Morbus Crohn mit einer Häufigkeit von 5.2 pro 100 000 Einwohnern auf. Bei der Colitis ulcerosa rechnet man derzeit in Deutschland mit 180.000 Patienten (DCCV e.V. 2006). Die Zahl der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen insgesamt in Deutschland, wird von der deutschen Crohn und Colitis Vereinigung mit ca. 320 000 (DCCV e.V. 2006) angegeben. Neuere Studien zeigen, dass die Inzidenz von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zunehmend steigend ist. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen kommen in den sogenannten Entwicklungsländern im Vergleich zu westlichen Industrieländern seltener vor.

Die Inzidenzrate für beide Erkrankungen ist in Grosstädten mit zunehmenden Lebensstandard höher als in ländlichen Bezirken, dass man durch Faktoren wie Tabakkonsum und Bildung teilweise erklären kann. Es besteht sowohl ein epidemiologisches Nord-Süd als auch ein geringeres West-Ost Gefälle in Europa (Karlinger et al. 2000<sup>55</sup>). Altersabhängige Inzidenzen gelten für beide Geschlechter, beim Morbus Crohn vor allem für Frauen und bei der Colitis ulcerosa für Männer. Nach dem zehntem Lebensjahr zeigen beide Erkrankungen eine steigende Tendenz. Wobei epidemiologische Studien zeigen, dass die Erstdiagnose heutzutage sich mehr zum höheren Lebensalter hin verschiebt. Die altersabhängige (10 – 19 jährige) Inzidenz in Nordamerika von Morbus Crohn beträgt 3.5 auf 100.000 Einwohnern. In Europa treten jährlich zwei bis vier Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern auf. Bei Asiaten kommt Morbus Crohn seltener vor. Die Inzidenzen bei jüdischen Personen sind häufiger. Das Verhalten zwischen ethnischer Zugehörigkeit und Auftreten der Erkrankung in den verschiedenen Ländern, bietet interessante Daten die die genetische, die Umwelt und Verhaltensweisen bezügliche Faktoren der Ätiopathogenese widerspiegeln könnten (Karlinger et al. 2000<sup>55</sup>). Bei Frauen ist die Inzidenz 1.1 bis 1.8 mal höher als bei Männern. Bei Kindern ist es genau umgekehrt. Jungen haben eine höhere Inzidenz als Mädchen. 25 - 30 % aller Morbus Crohn Patienten präsentieren sich vor dem 20 Lebensjahr. Die Prävalenz von Colitis ulcerosa schwankt zwischen 28 und 117 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Sandler et al. 2000<sup>11</sup>). Die Prävalenz des Morbus Crohns liegt bei etwa 1/500 bis 1/800. Für die Geschlechtsverteilung besteht ein leichtes Überwiegen der Männer (w:m=1:1.4) (Shivananda et al. 1996<sup>126</sup>). Frauen haben in nordeuropäischer und englisch sprachiger Bevölkerung eine 30%ige höhere Gefahr, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung zu entwickeln. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose beträgt 39.5 Jahre. Insgesamt gibt es drei Peaks für CED: der erste und höchste Peak ist zwischen dem 20 bis 24. Lebensjahr, bei Frauen im Durchschnitt schon vier bis fünf Jahre früher, der zweite Peak zwischen dem 40. und 44. Lebensjahr und der dritte Peak zwischen dem 60. und 64. Lebensjahr. Es gibt sowohl eine familiäre, als auch eine ethnische Häufung. Weiße erkranken etwa vier mal häufiger an Colitis ulcerosa als Farbige. Bei Morbus Crohn wurde eine familiäre als auch eine ethnische Häufung beobachtet. Weiße erkranken etwa doppelt so häufig wie Farbige an Morbus Crohn.

### **1.3 Colitis ulcerosa**

Die Colitis ulcerosa Erkrankung ist eine chronisch entzündliche, meist in Schüben verlaufende Entzündung der Mukosa des Darmes. Sie verläuft chronisch rezidivierend oder chronisch kontinuierlich. In 85 % verläuft die Colitis ulcerosa chronisch und schubweisend. Zehn Prozent

der Patienten haben keine beschwerdefreie Entzündungsintervalle. Die Manifestation ist vor allem kontinuierlich vom Rektum ausgehend und unterschiedlich weit nach kranial ausbreitend. In Abhängigkeit vom Befallsmuster erfolgt eine Einteilung in:

Eine distale Colitis zu 50 %, eine linksseitige Colitis zu 30 % und in 20 % eine subtotale Colitis sowie eine totale Colitis und eine totale Colitis in Kombination mit einer Backwash-Ileitis. Das kontinuierliche und auf dem Dickdarm beschränkte Ausbreitungsmuster grenzt die Colitis ulcerosa gegenüber dem Morbus Crohn ab. Auslösende Faktoren in der Ätiopathogenese der CED sind derzeit noch unklar. Bei der Colitis ulcerosa bestehen ebenso Hinweise auf eine genetische Prädisposition. Verwandte ersten Grades von Patienten mit Colitis ulcerosa haben, im Vergleich zur Gesamtbevölkerung ein 5 bis 35 % erhöhtes Risiko an CED zu erkranken. Bei eineiigen Zwillingen findet sich im Gegensatz zum Morbus Crohn mit 67% nur eine Konkordanz von 20 % für die Colitis ulcerosa (Montgomery et al. 2002<sup>79</sup>). Dem Morbus Crohn vergleichbar lässt sich eine Assoziation mit den HLA-Antigenen B5, BW52 und DR 2 feststellen. Wie auch beim Morbus Crohn lassen sich nur tendenzielle Risikofaktoren aufzeigen. Eindeutige kausale Zusammenhänge bestehen nicht (Sugimura et al. 2001<sup>135</sup>). Neben allgemeinen den erhöhten Lebensstil betreffende Faktoren, gibt es auch tendenzielle Risikofaktoren, die einen Einfluß auf den Ausbruch der Erkrankung haben. Exogene Faktoren wie Rauchen gelten im Gegensatz zum M. Crohn als protektiver Faktor. Sandborn et al. 1997<sup>110</sup> zeigte, dass transdermal verabreichtes Nikotin eine Besserung der klinischen Symptome bei Patienten mit leichter bis mäßig stark aktiver Colitis macht. Die Beeinflussung der Darmflora bei der Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch Kontrazeptiva ist derzeit umstritten. Es gibt Studien, die zeigen das Frauen die die Kontrazeptiva sechs Monate vor Krankheitsausbruch genommen haben, keinen erhöhten Risiko ausgesetzt waren als Patienten die die Pille nicht genommen hatten (Corrao et al. 1998<sup>21</sup>). Menschen, die als Säugling nicht gestillt wurden erkranken häufiger an Colitis ulcerosa (Corrao et al. 1998<sup>21</sup>).

#### 1.4. Morbus Crohn

Morbus Crohn « Ileitis terminalis » wurde 1932 erstmals durch Dr. Burril Bernard Crohn, Dr. Gordon Oppenheimer und Dr. Leon Ginzburg als „regional ileitis“ beschrieben (Crohn et al. 1932<sup>22</sup>). In den 60er Jahren wurde bekannt, dass sich die Erkrankung nicht nur auf das Ileum beschränkt, sondern im gesamten Magen-Darm-Trakt diskontinuierlich segmental auftreten kann. Die klinische Präsentation ist abhängig von dem Ort und dem Ausmass der Erkrankung. Am häufigsten ist sie jedoch im Übergangsbereich vom Dünndarm zum Dickdarm lokalisiert. Bevorzugt betroffen sind: Das terminale Ileum zu 35 %, das Ileocolon in ca. 40 %, Dickdarm und Analkanal in ca. 20 %. Zu 5% betrifft sie andere Bereiche des gesamten Magen- Darm-Traktes. Mehr als die Hälfte dieser Patienten haben ebenso eine Entzündung in variablen Abschnitten des Colons, vor allem das Colon ascendens. Bei der Mehrheit der Kinder 50–70 % ist das terminale Ileum betroffen. Annähernd 10-20 % der Kinder haben eine isolierte Colitis und bei weiteren 10-15 % kommt eine diffuse Dünndarmentzündung, die vor allem das proximale Ileum oder das Jejunum betreffen hinzu. Unter 5 % tritt eine isolierte gastroduodenale Krankheit auf. Charakteristisch ist die transmurale Entzündung der Darmwand, die zu Verwachsungen, Stenosen, Fistel- und Abzessbildung führen können. Die Krankheit verläuft schubweise, es wechseln akute Schubphasen mit Remissionsphasen (Phasen mit vorübergehender Beruhigung) ab. Auslösende Faktoren für die Entstehung des Morbus Crohns sind nach wie vor unbekannt. Man nimmt an, dass mehrere Faktoren zusammen wirken müssen. Diese Annahme stützt sich auf folgende Beobachtungen:

- Erbliche Veranlagerung, z.B. NOD 2 Gen
- Störung des Immunsystems
- Ernährungsfaktoren und Nahrungsbestandteile,
- erhöhter Gebrauch von raffinierten Zucker, wird über eine Veränderung der Darmflora, zugunsten pathogener Organismen diskutiert
- Umweltfaktoren: Schadstoffe und Infekte
- Bakterien: z.B. physiologische Darmflora

Bei Morbus Crohn Kranken wird ein um 50 – 250 % erhöhter Zuckerkonsum beobachtet. Die möglichen zuckerbedingten pathophysiologischen Veränderungen sind eine epitheliale Permeabilitätsstörung und eine Änderung der intestinalen Keimbildung mit Bildung von toxischen Metaboliten. Interessanterweise konnten Studien mit zuckerfreier Diät keinen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf nachweisen (Brandes and Lorenz-Meyer 1981<sup>15</sup>).

Kasper beschrieb, dass eine hohe Zuckerkonzentration im Blut zu einem Anstieg von gelösten Stoffen wie gelöste Salze und Glucose im Darmlumen zu einer gesteigerten Osmolarität führen. Eine hohe Osmolarität verstärkt die Durchlässigkeit der Darmschleimhaut. Die Folge hiervon ist ein veränderter Stoffwechsel der Dün- sowie Dickdarmflora und eine Steigerung der Resorption von artfremden Stoffen u.a. Antigenen aus dem Darmlumen. Schliesslich sammeln sich Bakterien und die von ihnen ausgehenden Toxine in hohen Mengen an und es kommt zu einer massigen Vermehrung der Bakterien im Inneren des Darms und somit zu einer unphysiologischen Dünndarmbesiedlung. Die Beeinträchtigungen der Dünndarmpassage durch Stenosen, Fisteln sowie Strikturen verstärkt die Vermehrung der schädigenden Bakterien (Kasper et al. 2000<sup>56</sup>). Es ist bekannt, dass das Stillen die Entwicklung der intestinalen Darmflora beeinflusst. Menschen die als Säugling nicht gestillt wurden, erkrankten häufiger an Colitis ulcerosa (Beckmann et al. 1998<sup>9</sup>). Antibiotika haben mit einem vermehrtem Wirkungsspektrum gegen anaerobe Bakterien eine gute Wirksamkeit bei anorektalem Fistelleiden und bei der postoperativen Rezidivprophylaxe (Borody et al. 2002<sup>13</sup>). Das Wechselspiel zwischen Bakterien und Immunsystem ist in letzter Zeit im wachsenden Zentrum klinischen Interesse. Sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen herrscht hier eine intensive Forschungstätigkeit. Der Passageweg und die direkte Auseinandersetzung zwischen Mukosa und Bakterien ist derzeit noch nicht bekannt.

### **1.5. Das intestinale Immunsystem und die residente Darmflora**

Das Immunsystem der Schleimhäute stellt ein gegen das systemische Immunsystem ein abgegrenztes immunologisches Kompartiment dar. Mehr als 500 Bakterienarten bilden zusammen die Darmflora. Ist sie intakt, können sich schädliche Mikroorganismen nicht dauerhaft im Darm einnisten. Unter normalen physiologischen Umständen besteht ein Gleichgewicht zwischen der Darmflora und dem Wirt. Dieses Gleichgewicht wird sowohl von Interaktionen zwischen den Bakterien, als auch von Interaktionen zwischen dem Wirt und den Bakterien beeinflusst. In dem normalen physiologischen Zustand entfaltet die Mikroflora des Darms günstige Effekte auf den Wirt (Sonnenborn et al.1991<sup>129</sup>), (Berg et al.1995<sup>11</sup>). Verschiedene Untersuchungen deuten daraufhin, dass bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein erhöhter Aktivierungszustand des intestinalen Immunsystems im Vergleich zum peripheren Immunsystem besteht. Die klinische und pathologische Manifestierung des hyperaktivierten Immunsystems im Darm könnte durch nicht pathogene Mikroorganismen der eigenen Intestinalflora oder spezifische Bakterien als Trigger der Autoimmunstimulation wirken (Lehmann et al. 2003<sup>67</sup>). Das terminale Ileum, Zökum und

Rektum sind Abschnitte mit relativer Stase, die zu einem verlängerten Kontakt der Mukosa mit dem luminalen Darminhalt führen. Die Interaktion zwischen Mikroben mit dem Immunsystem könnte gestört sein und eine nicht adäquate Antwort des intestinalen Immunsystems könnte folgen. Dies könnte zu einem Ungleichgewicht zwischen Toleranz und Immunaktivierung im Darm führen. Am keimfreien Rattenmodell wurden verschiedene Bakterienstämme, die in der Mikroflora des gesunden Menschen einen hohen Anteil bilden, auf ihre immunstimulierende Wirkung überprüft. Die bisher auf der Basis der lokalen und systemischen Bakterien spezifischen Immunglobulinfreisetzung erhaltenen Befunde zeigen eine Abhängigkeit der Immunreaktivität von der bakteriellen Zelloberflächenstruktur. Die Studienergebnisse von Macpherson et al. zeigten das bei dem aktiven Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa erhöhte mukosale IgG Konzentrationen als Folge gegen zytoplasmatisches Protein von Bakterien der eigenen Darmflora bestehen. Ein Zusammenbruch der Toleranz gegen die eigene physiologische Darmflora könnte folgen (Macpherson et al. 1996<sup>71</sup>). Demzufolge könnte man behaupten, dass immunologische Veränderungen durch bisher unbekannte Antigene, wie Bakterien bedingt sein könnten. Studienergebnisse von Offermann et al.<sup>90</sup> verdeutlichen diese Theorien, dass ein möglicher Antigenkontakt zwischen Bakterien, deren Toxinen und den Bakterienwandbestandteilen über zahlreiche immunologische Prozesse in der Mukosa der Darmzelle verläuft und somit ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von CED sein könnte (Offermann et al. 2003<sup>90</sup>). In einer Tierversuchmodellreihe von Linskens et al. 2001<sup>69</sup> wurde gezeigt, dass eine bakterienfreie Umwelt keine Darmentzündung verursacht. Betrachtet man die protektiven Funktionen der Darmflora sind die Kolonisierungsresistenz, die Förderung des Epithelstoffwechsels, die Stimulation der Darmperistaltik sowie die Ausbildung des darmassoziierten Immunsystems von wichtiger Bedeutung für die physiologische Darmfunktion (Batt et al. 1996<sup>7</sup>). Der Terminus „Kolonisierungsresistenz“ impliziert, dass die normale physiologische Darmflora des Darmes verhindert das durch exogene z.B. durch Nahrung zugeführte, in der Regel aerobe Bakterien den Magen-Darm-Trakt besiedeln (Rotimi et al. 1981<sup>103</sup>). In tierexperimentellen Studien wurde gezeigt, dass insbesondere die obligat anaeroben Bakterien, wie Bacteroidesspezies für die Kolonisierungsresistenz verantwortlich sind. Nachteilige Effekte von der physiologischen Darmflora sind die Konkurrenz um Nährstoffe, und das Potential die Darmschleimhaut zu schädigen. Die physiologische Regulation der intraluminalen Bakterien kann dementsprechend gestört sein, so dass es zum verstärkten Wachstum der physiologischen luminalen Bakterien oder dementsprechend pathogener Bakterien kommt. Die pathophysiologische Konsequenz könnte sein, dass in Abhängigkeit vom Potential der Bakterien eine Schädigung der intestinalen Mukosa erfolgt. Somit könnte es zu einer Schädigung der

intestinalen mukosalen Barriere und einer daraus resultierenden verstärkten Passage von Bakterien führen (Batt et al.1996<sup>7</sup>). Neben diesen Bakterien-Bakterien-Interaktionen sind auch eine Reihe von Wirtsfaktoren, die vom Immunsystem produziert werden, bei der Kontrolle der Zusammensetzung der Darmflora beteiligt. Beispielsweise werden mehr als fünf Gramm sekretorische Immunglobulin-A-Antikörper von B-Lymphozyten des intestinalen Immunsystem pro Tag auf mukosalen Schleimhautoberflächen transportiert (Chandra et al. 1992<sup>19</sup>). Von der Mukosa sezerniertes IgA bindet luminale Bakterien und es kommt zu einer Bakterienaggregation. Studienergebnisse zeigten, dass somit eine bakterielle Translokation verhindert wird (Albanese et al.1994a<sup>4</sup>).

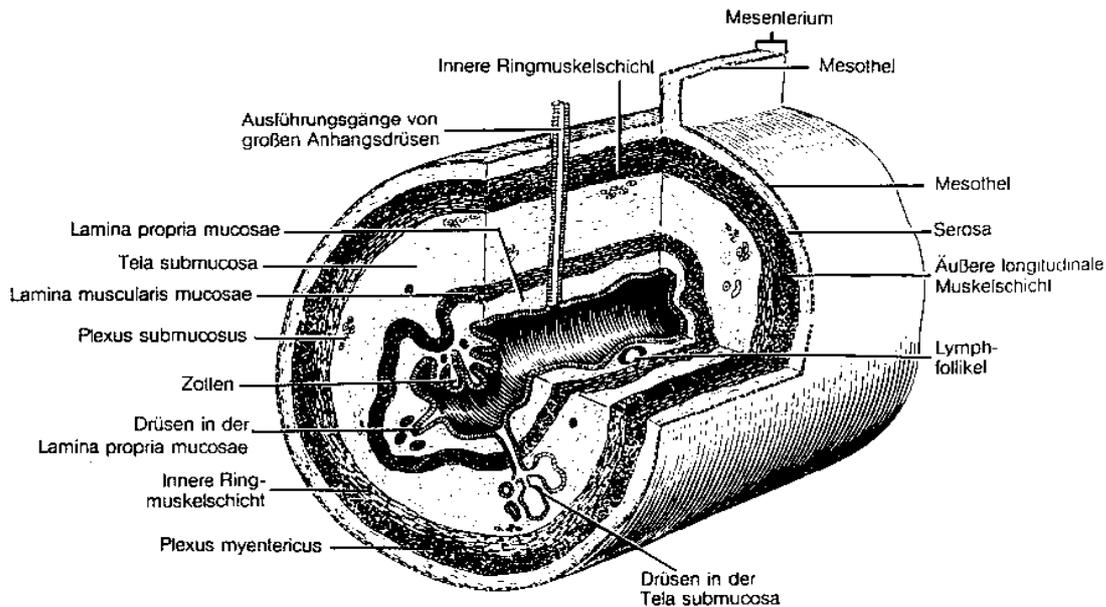
Daraus könnte sich die Fragestellung ergeben, ob eine veränderte Funktion der Darmflora oder ein pathologisch verändertes Darmepithel eine bakterielle Permeation begünstigen könnte?

## **1.6. Darmepithel als Barriere**

Epithelien bilden die Grenzfläche zwischen der Aussenwelt und dem Interstitium (Zwischenraum zwischen Körperorganen oder – gewebe) des Körpers. Die intestinale Schleimhaut des Menschen hat eine Oberfläche von 300m<sup>2</sup>. Ihre Grundfunktionen sind die, der Abgrenzung (Barriere) und der Stoffaustausch (Transport). Das Darmepithel ist für die Integrität des Gesamtorganismus die entscheidende Barriere zur Aussenwelt

## **1.7. Histologischer Aufbau des Verdauungskanals**

- I Tunica mucosa:
  - 1 Epithelium mucosae
  - 2 Lamina propria mucosae
  - 3 Lamina muscularis mucosae
- II Tela submucosa
- III Tunica muscularis:
  - 4 Stratum circulare
  - 5 Stratum longitudinale
- IV Tunica adventitia
- V Tunica serosa:
  - 6 Lamina propria serosae
  - 7 Lamina epithelialis

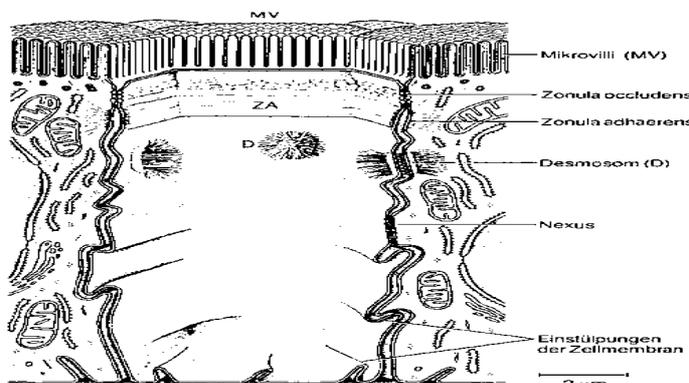


Schema zum prinzipiellen Aufbau des Verdauungskanal. [Neu gezeichnet und wiedergegeben mit Erlaubnis von Bevelander G (1971) Outline of histology, 7th edn. Mosby, St. Louis]

## Abbildung 1 Aufbau des Darmepithels

Maßgeblich für die mechanische Integrität der Mukosa ist eine kontinuierliche, intakte Epithelzellschicht. Sie verhindert die ungerichtete Invasion einer Vielzahl von bakteriellen luminalen Antigenen, die normalerweise in kontrollierter Form vom im Epithel eingebetteten Microfold Zellen (Zellen, die Lymphozyten umschliessen und vermutlich für die Resorption antigener und immunogener Substanzen spezialisiert sind) gezielt an darunterliegende lymphatische Strukturen weitergereicht werden. Die epitheliale Barriere setzt sich aus der apikalen und basolateralen Membran, das Zellinnere, dem Interzellulärspalt und der die benachbarten Epithelzellen abdichtende Schlussleiste (Tight junction) zusammen.

## Abbildung 2 Die epitheliale Barriere



Der **Interzellulärspalt** wiederum setzt sich aus interzellulären Zellverbindungen zusammen. Interzelluläre Verbindungen sind spezielle Strukturen an der Oberfläche korrespondierender Zellen, die unter anderem der Zellhaftung dienen.

Zu unterscheiden sind:

1. **Haftverbindungen** „Desmosomen“, die die Zellen mechanisch zusammenhalten
2. **Undurchlässige Verbindungen**, die den parazellulären Stofftransport beeinflussen: Zonula occludens „Tight junctions“ = die äußere Schicht einer Zellmembran verschmilzt mit der benachbarten Zelle. Tight junctions, bestehen aus einem Netzwerk aus Proteinsträngen und kommen im wesentlichen bei Epithelien von Oberflächen vor.  
Sie treten auf als: -gürtelförmige Zonulae occludentes,  
-streifenförmige Fasciae occludentes oder  
-fleckförmige Maculae occludentes
3. **Kommunizierende Verbindungen** „Gap junctions, Nexus“

Um die Epithelschicht zu passieren, gibt es prinzipiell zwei Wege:

Den **parazellulären Weg** durch die Tight junction (engl. = enge Zellverbindung) über den parazellulären Spalt und den **transzellulären Weg** durch die Epithelzelle hindurch.

Das Epithel, speziell die Mukosa, funktioniert als semipermeable Membran zwischen Lumen und Epithel. Die Barrierefunktion der Epithelien erfordert die Abdichtung des parazellulären Weges durch Tight junctions. Bei entzündlichen Darmerkrankungen kommt es zu Störungen der dynamischen Regulation der Tight junctions. Die Breite der Tight junctions wird verkleinert (Schmitz et al.1999<sup>116</sup>). Permeabilität definiert man als: Durchlässigkeit einer Barriere für niedermolekulare lösliche Substanzen und Wasser. Die Durchlässigkeit für Makromoleküle bezeichnet man als „Porosität“ (Permeabilität). Permeabilität und Porosität können gleichsinnig oder ungleichsinnig verändert sein. Unter physiologischen Bedingungen permieren Makromoleküle nicht oder nur in sehr geringer Menge das Darmepithel (Fromm et al.1994<sup>36</sup>). Studienergebnisse bei Colitis ulcerosa Patienten zeigten nach Kolektomie bei Darmepithelien, eine verstärkte Permeabilität von C14-Mannitol und Ovalbumin (Glykoproteid). Die verstärkte Permeabilität von Ovalbumin als Makromolekül impliziert, das luminale bakterielle Produkte oder andere antigene Substanzen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verstärkt

intestinal die Darmwand durchwandern können (Nejdfors et al.1998<sup>85</sup>). Solche Störungen der gastrointestinalen Barriere können zum Ausbruch der CED beitragen. Die mechanische Epithelbarriere ist vor und während eines aktiven Entzündungsschubes bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa defekt, so dass es zu einer Steigerung der intestinalen Permeabilität für Makromoleküle kommt. Vermutlich ist dieses Phänomen die Folge einer Epithelzellschädigung durch Entzündungsmediatoren. Eine erhöhte primär (Defekt in der Mukosa ohne schädigendes Agens) oder sekundär (infolge schädigendes Agens) bedingte Permeabilitätssteigerung könnte zur Invasion der normalen bakteriellen Flora in die intestinale Lamina propria führen. Die Darmschleimhaut ist normalerweise eine gute Barriere gegen Mikroorganismen und Endotoxine. Die Epithelzellen des Darmes wurden bis vor kurzen, als blosse Barrierezellen mit sekretorischen oder resorptiven Aufgaben angesehen. Heute ist jedoch klar, dass die Epithelzellen des Darmes neben diesen Aufgaben wichtige Funktionen für die Infektabwehr besitzen (Eckermann et al.1995<sup>31</sup>). Diese natürliche Barrierefunktion kann bei schweren Verlaufsformen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verloren gehen, so dass eine Bakteriämie und Endotoxinämie auftreten kann. Eine verstärkte mukosale Absorption von verschiedenen Bakterien und deren Produkte ist in CED gefunden worden (Linskens et al. 2001<sup>69</sup>). So kann der Kontakt von Epithelzellen mit pathogenen Bakterien dazu führen, dass die Epithelzellen chemotaktische pro-inflammatorische Zytokine produzieren. Auf diese Weise können in der Frühphase von Infektionen inflammatorische Zellen in den Darm rekrutiert werden und eine bakterielle Translokation begünstigen.

### 1.7.1. Epithelzelle und Aufbau des intestinalen Immunsystems

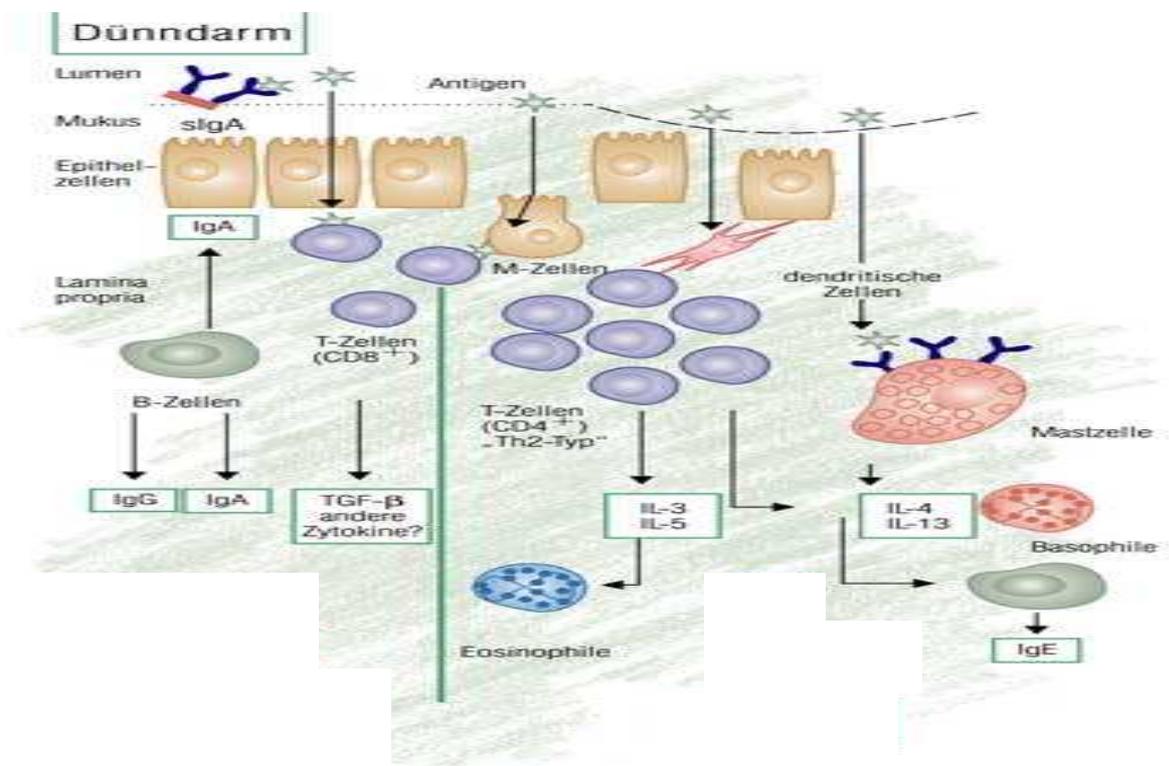


Abbildung 3 Epithelzelle und Aufbau des intestinalen Immunsystems

Die für die inflammatorische Zellproduktion verantwortlichen Immunzellen der Darmwand befinden sich vor allem innerhalb des Epithels, in der Lamina propria und submukös in Lymphfollikel. Im Epithel bilden die T-Zellen den Großteil von immunkompetenten Zellen. Innerhalb des Epithelzellverbandes, der die Abgrenzung zum intestinalen Lumen darstellt, finden sich intestinale epithelzellähnliche Zellen, M-Zellen (Mikrofold). M-Zellen sind spezialisierte intestinale Epithelzellen und befinden sich in den Peyer Plaques (Anhäufung von v.a. Lymphozyten und retikulären Bindegewebe im Dünndarm). Die Aufgabe der M-Zellen sind, selektierte Antigene durch Transzytose den darunterliegenden immunologischen Strukturen zur Reaktion anzubieten. Sie arbeiten als Antigen Sammelsystem und sind für eine funktionelle Eröffnung der Epithelbarriere zuständig (Kucharizik et al. 2000<sup>64</sup>). Sie scheinen einen geringen Anteil an der Epithelbarriere zu haben. Im physiologischen Zustand stehen sie im Gleichgewicht zwischen Antigenpräsentation und Immunantwort. Eine geringe Anzahl von M- Zellen in der Lamina propria im Gastrointestinaltrakt und der direkte Kontakt zu den Abwehrzellen in der Lamina propria verhindern im physiologischen Zustand die Inflammation der Mukosa. Durch die M-Zellen verfügt das GALT über einen Selektionsmechanismus für Antigene, die eine

kontrollierte Stimulation von Immunzellen in den Peyer Plaques ermöglichen. Bei chronischer intestinaler Entzündung kommt es zu einer Zunahme der M-Zellen. Eine M-Zell Schädigung scheint zu einer vermehrten Aufnahme von Mikroorganismen zu führen (Kucharzik et al. 2000<sup>64</sup>). Eine alternative Route für die mukosale bakterielle Invasion sind dendritische Zellen in der Lamina propria, die die Tight junctions zwischen den Epithelzellen öffnen und Dendriten aussenden, um direkt Bakterien oder bakterielle Produkte einzusammeln (Rescigno et al. 2001<sup>96</sup>). Es könnte zu einer Permeabilitätsstörungen der gastrointestinale Barriere führen. Inwieweit diese Permeabilitätsstörungen der gastrointestinalen Barriere genetisch verankert sind oder ob sie durch Umweltfaktoren bedingt sind, muss noch weiter geklärt werden.

### **1.8. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und *Bacteroides fragiles***

Die Zusammensetzung der intestinalen Flora ist bei CED im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe verändert. Bei Morbus Crohn sind die Konzentrationen von *Bacteroides*, Eubakterien und Peptostreptokokken erhöht, wobei die Konzentrationen von Bifidobakterien reduziert sind. Bei der Colitis ulcerosa ist die Konzentration von fakultativen Anaerobiern erhöht (Linskens et al. 2001<sup>69</sup>). Enterotoxin bildende *Bacteroides fragiles* Organismen wurden in der Faeces in der aktiven Entzündungsphase bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nachgewiesen. Dagegen fand man keine enterotoxinbildenden Bacteroidestypen in der Faeces von gesunden Patienten in der Kontrollgruppe (Prindville et al. 2000<sup>94</sup>). Ubiquitäre anaerobe Bakterien und deren Zellwandbestandteile sind an der Aufrechterhaltung der Crohnschen Erkrankungen sowie bei begleitenden zahlreichen extraintestinalen Manifestationen involviert. Für die Colitis ulcerosa ist die Datenlage weniger eindeutig. Einen grossen Beitrag zur bakteriellen Ätiopathogenese erbrachte die Arbeitsgruppe Fujita et al. 2002<sup>38</sup>. *Bacteroides vulgatus* und *E.coli* wurden bei CED vermehrt perivaskulär und in der Lamina propria nachgewiesen. Die Anzahl der Bakterien zeigt keine Korrelation zum Entzündungsgrad. Ein Zusammenhang zwischen Auslösung und Unterhaltung eines Entzündungsschubes durch Bakterien der intestinalen Flora könnte angenommen werden. Auf der mukosalen Oberfläche von CED Patienten ist eine vermehrte bakterielle Besiedlung nachgewiesen worden. Im Colon von Colitis ulcerosa und Ileum vom Morbus Crohn wurde eine vermehrte mukosale Invasion von Bakterien nachgewiesen. Im Colon von Colitis ulcerosa wurde eine verschiedene Zusammensetzung von Enterobakterien, *Bacteroides* und Clostridien mittels in situ Hybridization nachgewiesen (Klessen et al. 2002<sup>60</sup>). Ein normaler Darm mit einer intakten mucosalen Barriere und einer ausgeglichenen Immunfunktion reagiert nicht auf die residente luminale bakterielle Flora. Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hingegen scheinen Störungen der mucosalen

Barriere, oder der Immunregulation zur intestinalen Inflammation zu führen. Ein vorübergehender Zusammenbruch der mucosalen Barriere durch eine sich selbst limitierende Infektion schaden dem normalen Wirt nicht und die Defekte heilen ohne Folgen ab. Unter Umständen kann aber der gleiche Trigger durch Dauerstimulation in Gestalt luminaler Bakterien bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zur chronischen Inflammation führen. Ebenso kann ein genetisch determinierter Defekt der mucosalen Barriere oder der epithelialen Restitution eine überschießende Aufnahme von luminalen Bakterien bewirken. In Anbetracht dieser engen Verflechtung zwischen dem Zustand der epithelialen Barriere und der Interaktion der Mucosa mit bakteriellen Bestandteilen ist es von essentieller Bedeutung, die Kenntnisse hierüber zu erweitern. Die vorliegende Forschungsarbeit soll daher dazu beitragen, über die Analyse der Barriere und der bakteriellen Permeation das Verständnis für diese Problematik zu erweitern. Eine vermehrte mukosale Absorption von Bakterien und deren Produkte wird beschrieben. Antikörper im Serum und im Mucin der Mukosa sowie T- Lymphozyten, die luminalen Bakterien erkennen, sind nachgewiesen worden. Es gibt Hinweise, dass das Immunsystem hyperaktiv gegen die normale intestinale Flora, als auch auf die veränderte Mikroflora bei CED reagiert (Linskens et al. 2001<sup>69</sup>). Bakterien scheinen eine zentrale Bedeutung für die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu haben. Ob es einen spezifischen bakteriellen Auslöser der Erkrankungen gibt, muss derzeit noch geklärt werden. Die CED scheint eine Autoimmunantwort auf die eigene unveränderte intestinale Mikroflora zu sein (Schultz et al. 2000<sup>117</sup>). Die bakterielle Last und Mukosazerstörung korreliert potential mit dem Entzündungsgrad der akuten Kolitis. Die Rolle der intestinalen Mikroflora bei der Pathogenese der CED ist in der akuten Phase höher als in der chronisch reaktiven Phase (Hernandez GA et al. 2003<sup>51</sup>). Man fand heraus das in CED ein höhere Konzentration von intestinalen Bakterien, sowohl im entzündeten als auch im nicht entzündeten Darmabschnitt nachgewiesen wurde (Swidsinski et al. 2002<sup>136</sup>). Probiotische Bakterien modulieren die intestinale Flora und modulieren somit die Autoimmunantwort (Heller et al. 2003<sup>50</sup>).

## **1.9. Herleitung der Hypothese**

Bislang existieren verschiedene Theorien über die bakterielle Ätiopathogenese bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Man geht von Störungen der intestinalen Barriere der Darmschleimhaut aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die These favorisiert, das ein Bakterium eine Initiierung bzw. eine Unterhaltung eines hyperaktivierten Immunsystems durch bakterielle Permeation auslösen könnte. Das charakteristische Resultat ist eine Veränderung der intestinalen Mukosa. Die Erstellung und Optimierung der Ausführung dieser Arbeitshypothese erfolgte in

mehreren Schritten, die im folgenden nacheinander vorgestellt werden. Das NOD2 Gen (Gen auf Chromosom 16) spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Dieses Gen befindet sich in der Verbindungsregion auf Chromosom 16q12 und aktiviert als Antwort auf bakterielle Lipopolysaccharide den Nuclear Factor  $\kappa$ B. Diesem Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B wird im Verlauf akuter und chronischer Entzündungen im Darm eine zentrale Funktion bei der Induktion und Regulation entzündungsrelevanter Gene zugesprochen. Durch die Entdeckung der Insertionsmutation im Exon 11 auf Chromosom 16 (Hampe et al. 2001<sup>49</sup>) des NOD2 Gens kommt es zu einer verstärkten Aktivierung des NF $\kappa$ B Factors. Hiernach könnte Morbus Crohn darauf beruhen, dass bestimmte pathogene Komponenten der Bakterien, die normalerweise der Immunabwehr entgehen bei Crohn Kranken zu einer exzessiven Abwehrreaktion führen. Neben den immunologischen Veränderungen kommt der beeinträchtigten Barriere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine grosse Bedeutung zu. Es ist bekannt, dass bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Störungen der gastrointestinalen Barriere auftreten können, die zum Ausbruch von CED beitragen können. Eine defekte intestinale epitheliale Barriere führt zu einer verstärkten Aufnahme von luminalen Bakterien, die zu einer Stimulierung des darmassoziierten Immunsystems führen (Santos et al. 2001<sup>113</sup>). Andererseits gibt es Hinweise, dass die orale Toleranz gegen die eigene intestinale Flora gestört ist oder dass eine persistierende intestinale Toxinwirkung durch bestimmte Bakterien ausgelöst, eine hyperreaktive Antwort des darmassoziierten Immunsystems bewirkt. Ob die Störung der Barriere erst den vermehrten Eintritt und den Kontakt mit den Bakterien ermöglicht, oder ob die genetisch bedingten Veränderungen der immunologischen Steuerung die Barriere bereits verändern, kann gegenwärtig noch nicht festgelegt werden. Die bisher nachgewiesenen immunologischen Regulationsstörungen sind derzeit der eigentliche Angriffspunkt der antientzündlichen Therapiestrategien. Möglich wäre auch eine Antigen unabhängige sich selbst unterhaltende Entzündung, die nach initialer Auslösung vor allem durch eine genetisch determinierte Störung der Toleranz gegen die eigene Darmflora gekennzeichnet ist. Dies würde dann zunehmend die Therapiestrategien gegen den entzündlichen Prozeß verändern. Die akute Entzündung intestinaler Schleimhäute bei CED als Reaktion auf eine noch unklare Noxe, könnte in einer bislang nicht bewiesenen Infektion durch spezifische Erreger bestehen. Die intestinale Flora umfaßt 95 % der totalen Anzahl an Zellen im Körper. Sie sind befähigt das Immunsystem zu stimulieren und gleichzeitig eine Barriere gegen pathogene Keime darzustellen (Dunne et al. 1999<sup>29</sup>). Diese Barriere ist bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gestört. Die letztendliche Ursache für diese Störung ist weiterhin unklar. Die intestinale mikrobielle Flora könnte eine auslösende Rolle bei der Ätiopathogenese der CED

sein (Dunne et al. 1999<sup>29</sup>). Bacteroidaceae und andere Anaerobier stellen den vorherrschenden Teil der physiologischen Darmflora dar. Die Gesamtzahl der Anaerobier beträgt das 1000fache im Colon der dort vertretenden Menge vorhandener Aerobier, wie u.a E.coli (Hahn et al. 1994<sup>48</sup>). Man nimmt an, dass Bacteroides fragiles eine auslösende Rolle bei der Entstehung der CED haben könnte. Enterotoxin bildende Bacteroides fragiles Organismen wurden in der Faeces in der aktiven Entzündungsphase bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa nachgewiesen. Dagegen fand man keine enterotoxinbildenden Bacteroidesstämme in der Faeces von gesunden Patienten in der Kontrollgruppe (Prindville et al. 2000<sup>94</sup>). Bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa hat man in der Serologie Antikörper gegen Bacteroides und E.coli nachgewiesen. pANCA Antikörper reagieren mit Ton-B Außenmembranproteine in der Bakterienwand. Enterotoxin produzierender Bacteroides fragiles können durch die Expression von IL8 und TGFβ in intestinalen Epithelzellen eine entzündliche Reaktion auslösen, die die Integrität und Funktion der Darmschleimhaut beeinträchtigen. Man vermutet das der nachgewiesene Effekt einen durchaus ernstzunehmenden Effekt bei der Entstehung und Unterhaltung des intestinalen Entzündungsprozesses bei CED haben könnten (Sanfilippo et al.2000<sup>112</sup>). Eine Studie von Shiba et al. 2003<sup>125</sup> aus Japan belegt diese Annahme. Bifidobacterium infantis führt zu einem verminderten Wachstum des Anaerobiers Bacteroides. Folglich entsteht ein Schutz der intestinalen epithelialen Schicht, gegen die Invasion von Bacteroides. Es kommt zu einer verminderten systemischen Antwort des Immunsystems (Shiba T et al.2003<sup>125</sup>).

### **1.10. Ziel der Arbeit**

**Ziel der Arbeit** war, den Passageweg von enterotoxinbildenden Bacteroides fragiles als Auslöser oder als persistierendes Agens für die chronisch intestinale Entzündung bei Patienten mit chronisch entzündliche Darmerkrankungen, mit gesunden Darm von Patienten einer Kontrollgruppe im in-vitro-ex-vivo-Bakterientranslokationsversuch zu vergleichen.

#### **Zusammenfassend stellt sich die Frage:**

Besteht bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu darmgesunden Kontrollen eine erhöhte Permeabilität für Bacteroides fragiles ?

Drei Zielsetzungen sollten diese Fragestellung beantworten:

1. Kommt es zu einer verstärkten Bacteroides fragiles Permeation bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen der Permeation und dem Entzündungsmuster des Darmepithels bei CED Patienten ?

3. Gibt es klinisch relevante Faktoren, die eine Permeation von *Bacteroides fragiles* beeinflussen können ?

## 2. Patienten, Material und Methoden

### 2.1. Versuchsprinzip

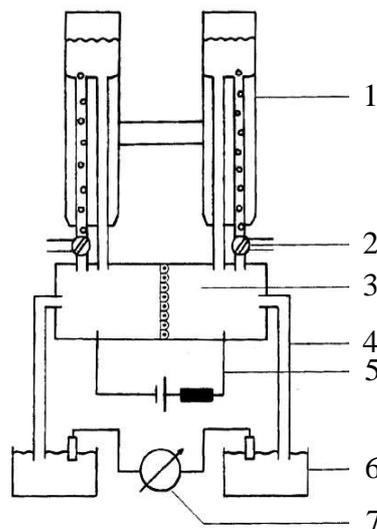
Die verschiedenen Fragestellungen dieser Arbeit werden durch eine wesentliche Methode bearbeitet:

Untersucht wurde dabei die bakterielle Permeation von *Bacteroides fragiles* mit dem in-vitro-Bakterien-Translokations-Nachweis in der Ussing-Kammer. Dabei wurde frisch entnommenes menschliches Darmepithel vom operativen Darmpräparat von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn Patienten als trennende Membran zwischen zwei Flüssigkeitsräume einspannt

### 2.2. Aufbau der Ussing – Kammer

Die Untersuchungen erfolgten in der Ussingkammer (Ussing et al. 1951<sup>143</sup>).

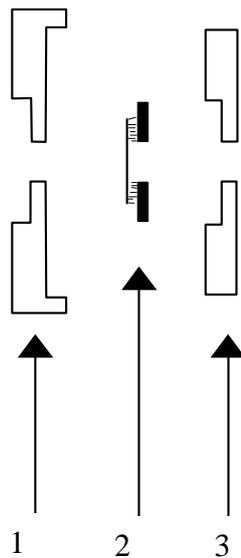
Den prinzipiellen Aufbau der Ussingkammer zeigt **Abbildung 4**.



**Abbildung 4 Schematisierte Darstellung des Prinzips einer Ussingkammer:**

1. Glascontainer zur Wasserzirkulation; 2. Zufluß-Abriegelung; 3. Serosaseitige Kammerhälfte; 4. Agarbrücken; 5. Stromappikator; 6. KCL-gefüllte Behälter; 7. Voltmeter.

Die Ussingkammer besteht aus zwei miteinander verschraubbaren Plexiglaskammerhälften, die im Inneren einen Hohlraum bilden. Serosale und mukosale Kammerhälfte waren aus Plexiglaszylindern gefertigt, die mit einem Stativ zusammengepresst wurden und von einer elektrischen Abschirmung umgeben waren.



**Abbildung 5** Container für Darmpräparate zur Analyse in der miniaturisierten Ussing-Kammer:

1. Mucosaseitige Hälfte des Darmpräparat-Containers; 2. Makrobiopsie mit Histoacrylkleber auf eine Plexiglasscheibe aufgebracht; 3. Serosaseitige Hälfte des Containers

Zwischen diesen Containern wurde das Darmepithel eingespannt. Sowohl mukosal (apikal = Lumenseite), als auch serosal (basolateral = Blutseite) wurde das Gewebe von einer Pufferlösung umspült. Die Kammerhälften und die Lösungen wurden durch einen temperierten, zirkulierenden Wasserkreislauf konstant auf 37°C gehalten. Die Pufferlösungen, die sich in der jeweiligen Kammerhälfte befanden, konnten über eine Öffnung in der Kammer gewechselt werden. Ebenso liessen sich über diese Öffnung verschiedene Substanzen applizieren. Über zwei am Kammerboden befindliche Gasleiter konnten Gewebe und Pufferlösung kontrolliert begast werden. Dies führte dazu, dass zum einen das Gewebe ausreichend mit Sauerstoff versorgt wurde, zum anderen blieb durch die Begasung der pH Wert der Pufferlösung konstant bei 7.4. Um die elektrischen Parameter bestimmen zu können, wurde ein gewebe nah und ein gewebe fern platziertes Elektrodenpaar jeweils über Agarbrücken (5% Agar in Parsons- Lösung) mit der Kammer verbunden. Bei den gewebe nahen Elektroden handelte es sich um Kalomelektroden (= Spannungselektroden, Typ 303-S7, Fa. Ingold, Steinbach). Über diese Elektroden wurde die Potentialdifferenz (PD) zwischen der mukosalen und serosalen Seite des Gewebes bestimmt. Mit Hilfe von Stromelektroden ( Silbernitrat 95%) konnte gewebe fern ein definierter Strom in das Kolonepithel gespeist werden. Anschließend wurde mit Gewebekleber (Histoacryl®, B. Braun Melsungen AG) der Containerring serosal auf das Epithel aufgeklebt und aus dem

Gesamtpräparat ausgeschnitten. Der Ring wurde dann über den Silikonring der zentralen Öffnung des Containerunterteils gestülpt und mit dem Oberteil verschlossen. Die Proben wurden auf eine Plexiglasscheibe mit Histoacrylkleber aufgebracht und in den Container eingespannt. Die ringförmigen Stromelektroden wurden einige Millimeter vor dem Epithel positioniert, um ein homogenes elektrisches Feld über diesem zu erzeugen. Durch die Mitte der Stromelektrodenringe und in Stromrichtung wurden die Spannungselektroden geführt, die aus KCl-gefüllten Glaskapillaren und Ag/AgCl-Mikroelektrodenhaltern (MEH3SF, WP-Instruments, New Haven, CT, USA) bestanden.

### **2.3.            Verwendete Lösungen**

Die Badlösung beinhaltete (jeweils in mmol/l angegeben): Na<sup>+</sup>140; Cl<sup>-</sup>123,8; K<sup>+</sup>5,4; Ca<sup>2+</sup> 1,2; Mg<sup>2+</sup> 1,2; HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup> 2,4; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>21; D(+)-Glucose 10; D(+)-Mannose 10; Glutamin 2,5; β-OH-Butyrat 0,5. Die Lösung wurde mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> begast. Die Temperatur wurde auf 37°C mittels eines „Gas-Lifts“ und einer ausserhalb der Ussingkammer befindlichen Wärmepumpe konstant gehalten. Der pH Wert betrug für alle Experimente 7,4.

In den beiden Flüssigkeitsräumen der oben beschriebenen Ussingkammer befanden sich jeweils 7.5 ml physiologische Elektrolytlösung. Der Zellstoffwechsel wurde durch kontinuierliche Begasung mit einem Gemisch aus Sauerstoff aufrechterhalten.

### **2.4.            Zusammensetzung der Versuchslösung ( Natriumthioglykolatlösung )**

Als Medium zur selektiven Anzucht des gegen Ampicillin und Sulbactam resistenten enterotoxinproduzierenden, gramnegativen Anaerobier „Bacteroides fragiles“ wurde eine Kombination aus verschiedenen Antibiotika zusammengestellt. Diese bestand aus einem Aminoglycosid-Antibiotikum aus Streptomyceten, das „Kanamycin“ zur Wachstumshemmung von gramnegativen Aerobier sowie Vancomycin, ein Antibiotikum der Glykopetid-Antibiotika zur Wachstumshemmung von grampositiven Bakterien. Zur erweiterten Hemmung im grampositiven – und gramnegativen Spektrum wurde zusätzlich noch ein Aminopenicillin = Ampicillin in Kombination mit einem β-Laktamaseinhibitor Sulbactam hinzugefügt. Am Versuchsbeginn gelang die Trennung von Bakterien und Nährflüssigkeit durch Zentrifugation bei 70% (25.000 U/min). Anschließend wurde der flüssige Überstand abpipettiert. Während des Versuchs wurden die Epithelien mit der Badlösung, eine Standardlösung nach Fromm und Schultz (1981) umspült und ernährt. Die im folgenden aufgelisteten Salze wurden in destillierten Wasser gelöst und die Lösung anschließend auf einen pH Wert von 7,4 eingestellt.

**Tabelle 1                      Zusammensetzung der Versuchslösung**

NaCl	113,6 mmol/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2,4 mmol/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,6 mmol/l
KCl	5,4 mmol/l
NaHCO <sub>3</sub>	21,0 mmol/l
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,2 mmol/l
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,2 mmol/l
Glucose- Monohydrat	2,0 mg/l
Kanamycin	2,0 ml/l
Vancomycin	1,0 ml/l
Ampicillin + Sulbactam	1,0 ml/l

Nach Zugabe der Glucose in die Standardlösung mit Hilfe von Sterilfiltern, wurde die Standardlösung in zuvor bei 120° C dampfsterilisierte Glasflaschen zugegeben. Anschließend wurde die entsprechende Menge Kanamycin, Vancomycin, Ampicillin und Sulbactam mittels einer sterilen Einmalspritze hinzugefügt. Die Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst und bei 120°C dampfsterilisiert.

## **2.5.                      Charakterisierung von *Bacteroides fragiles***

1898 wurde *Bacteroides* erstmalig in der Flora des Menschen als pleomorph gram negativer, obligat anaerober Wirt von Veillon und Zuber beschrieben (Veillon et al. 1898<sup>145</sup>). Er gehört somit zur Gruppe der nicht sporenbildenden, gramnegativen und obligat anaeroben Stäbchenbakterien. Es sind kleine 0,4-0,8 µm messende, meist mit einer ausgeprägten Pleomorphie aufweisende Stäbchen, bei denen häufig zentrale oder endständige Aufschwellungen, filamentöse Formen sowie ungleichmäßige Anfärbbarkeit beobachtet werden. Es werden insgesamt 10 *Bacteroides*- Arten beschrieben, von denen *Bacteroides fragiles* ein Subtyp, und einer am häufigsten vorkommender Infektionserreger ist. *Bacteroides fragiles* wird in der *Bacteroides* Gruppe mit der grössten Virulenz beschrieben.

Die Untersuchungen erfolgten mit einem Ampicillin/Sulbactam resistenten, Enterotoxin produzierenden Wildtyp der Gattung *Bacteroides fragilis*.

## **2.6.. Selektiver Nachweis von Bacteroides fragiles**

Die Arbeiten begannen mit der Herleitung einer geeigneten Methode für den selektiven Nachweis des zu untersuchenden Bacteroides fragiles. Zur selektiven Untersuchung des Bacteroides fragiles musste zunächst ein geeignetes Chemotherapeutikum gefunden werden. Nachdem die physiologische Darmflora der zu untersuchenden Darmpräparate mit der oben genannten Antibiotikumkombination eradiziert worden war, erfolgte die Selektion des gegen Ampicillin und Sulbactam resistenten enterotoxinproduzierenden Bacteroides fragiles für die selektive Untersuchung der bakteriellen Translokation. Dieser gefundene Wildtyp wurde freundlicherweise von Frau Dr. Wagner aus dem Mikrobiologischen Institut des Universitätsklinikum Benjamin Franklin in Berlin für unsere Experimente zur Verfügung gestellt.

## **2.7. Anzucht von Bacteroides fragilis**

Zur Anzucht von obligat anaeroben Bakterien wurden für jeden Versuch 24 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Natrium-Thioglykolat-Bouillon, als flüssiges Medium zur Wachstumsbeschleunigung mit Vitamin K 1% (0,1 ml/l), Haemin 0,5% (1 ml/l) und NaHCO<sub>3</sub> (1g/l) für 24 Stunden bei 37°C im Schüttelbad angezchtet.

## **2.8. Herstellung der Agarplatten**

Für die Herstellung der Agarplatten wurde 15g Agar in 1l Columbia Agar gelöst. Diese Lösung wurde bei 120°C dampfsterilisiert . Der heiße flüssige Agar wurde auf 40°C abgekühlt und unter der Flowkammer nach Zugabe von: Vitamin K 1% (1 ml/l), Schafsblut 5%, Kanamycin ( 100 mg/l), Vancomycin (5 mg/l) und Ampicillin (16 mg/l) und Sulbactam (8 mg/l) in Petrischalen portioniert ausgegossen.

## **2.9. Dekontamination des zu untersuchenden Darmepithels**

Vor Versuchsbeginn mit der Ussingkammer musste der Darm dekontaminiert sein, damit man selektiv nur den zu untersuchenden enterotoxinbildenden Bacteroides fragiles untersuchen kann. Es galt zu prüfen, welche Kombination von Antibiotika zu benutzen sind. Zur antibiotischen Abdeckung der Enterobakterien wurden insgesamt 10 Versuche mit Darmepithelien von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten in sechs Ussingkammern durchgeführt:

<b>Kammer 1</b>	Badlösung	+	Ampicillin + Sulbactam (= Aminopenicillin + $\beta$ Lactmasehemmer)
<b>Kammer 2</b>	Badlösung	+	Clindamycin (= Lincosamin)
<b>Kammer 3</b>	Badlösung	+	Metronidazol (= Nitroimidazole)
<b>Kammer 4</b>	„	+	Kanamycin (= Aminoglykosid + Vancomycin)
<b>Kammer 5</b>	„	+	Vancomycin (= Glykopeptid)
<b>Kammer 6</b>	„	+	Vancomycin + Ciprofloxacin (= Gyrasehemmer)

Es erfolgten Probeentnahmen von jeweils 100  $\mu$ l aus mukosaler und serosaler Badlösung. Unmittelbar vor und nach der Darmepithelzugabe und nachfolgend im Abstand von 60 Minuten bis zum Versuchsende nach vier Stunden. 100  $\mu$ l der serosalen Badlösung wurden jeweils unverdünnt mittels Drigalskispatele auf Vancomycin, Kanamycin, Ampicillin und Sulbactam enthaltenden Columbia-Agarplatten ausgestrichen. Die entnommene Probe wurde mit der Badlösung  $1 \cdot 10^6$  verdünnt. 100  $\mu$ l der letzten Verdünnungsstufe wurden auf die oben genannten Platten ausgestrichen. Das Ergebnis der Agarplattenbebrühtung ergab in allen 10 Versuchen, nach 24 und 48 Stunden, ein Wachstum von Bakterien mukosal und serosal in Kammer 2,3,4,5 und 6. In Kammer 1 erfolgte in 1/10 durchgeführten oben beschriebenen Versuchen ein Wachstum auf der serosalen Seite. Es folgte eine Fortsetzung der Versuchsreihe mit einer Kombination von Ampicillin, Sulbactam, Vancomycin und Sulbactam. Bei keinen der 10 durchgeführten Versuche ergab sich ein Wachstum serosal. Somit konnten alle in der menschlichen Darmflora vorkommenden Keime erfasst werden. Ich wählte daher einen gegen ein Breitspektrumantibiotikum resistenten Keim, um selektiv den zu untersuchenden *Bacteroides fragilis* serosalseitig identifizieren zu können.

## **2.10. Selektive in-vitro-Bakterien-Permeation von *Bacteroides fragilis***

Untersucht wurde die Permeation eines toxinproduzierenden Wildtyps der Gattung *Bacteroides fragilis*, der von menschlichen Blutkulturen isoliert wurde und sich als resistent gegen Ampicillin und Sulbactam erwies. Als entscheidender Faktor für diese Versuchsdurchführung, gilt die Resistenz gegen die oben genannten Antibiotika, damit während des Versuchs eine selektive Anzucht von *Bacteroides fragilis* möglich wurde. Diese von unserer Arbeitsgruppe für den Menschen neu etablierte Methode diente dazu, im in-vitro-ex-vivo-Versuch die bakterielle Permeation von Bakterien durch normale (Kontroll Gruppe) und von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa befallene Darmepithelien nachzuweisen. Der Versuchsaufbau basierte auf der oben beschriebenen Ussingkammer, die für diesen Versuchsabschnitt als Vehikel zum bakteriellen Permeationsnachweis zur Verfügung stand. Eine ähnliche Versuchsanordnung wurde für den Tierversuch von den Gruppen Albanese, Go und Spiller beschrieben (Albanese et al. 1994a<sup>4</sup>,

Go et al. 1994<sup>45</sup>, Goddard and Spiller 1997<sup>46</sup>). In den Versuchsanordnungen dieser Autoren wurde jedoch immer ein gegen Ampicillin resistenter E. coli-Laborstamm verwandt. Für den geplanten Versuchsaufbau kam dies allerdings nicht in Betracht, da durch Ampicillin nicht alle in der menschlichen Darmflora vorkommenden Keime erfasst werden und das Bakterium somit nicht nach seinem Durchtritt auf die serosale Seite des Medium identifizierbar ist. Wir wählten daher einen gegen ein Breitspektrumantibiotikum resistenten Keim, um nur diesen Keim letztendlich serosalseitig identifizieren zu können. In der Ussingkammer wurden die frisch entnommenen Darmepithelien als trennende Membran zwischen zwei Flüssigkeitsräumen eingespannt und von beiden Seiten mit der gleichen Menge einer körperwarmen physiologischen Elektrolytlösung umspült. Durch kontinuierliche Oxygenierung der Badlösung wurde der für den Zellstoffwechsel notwendige Sauerstoff zur Verfügung gestellt und gleichzeitig eine Umwälzung der Flüssigkeit erreicht. Auf beiden Seiten des Epithels waren je eine Strom- und eine Spannungselektrode plaziert. Die kontinuierliche Messung der elektrophysiologischen Parameter erlaubte Rückschlüsse auf die Intaktheit und Viabilität des Gewebes. Zum Nachweis der bakteriellen Permeation wurden der mucosalen Badlösung eine definierte Menge von *Bacteroides fragilis* im Mittel 250 KBE/100 µl zugesetzt. Im Verlauf der Versuche wurden stündlich Proben der serosalen Badlösung entnommen und mikrobiologisch auf Bakterienwachstum untersucht. Auf diese Weise konnte ein Übertritt der Bakterien über das Epithel qualitativ und quantitativ erfasst werden.

### **2.11. Messplatz – Bakterielle Permeation**

Mit Hilfe von Stromelektroden (Silberdraht 95% ig) und Spannungselektroden (Kalomel, Typ 303-S7, Fa. Ingold, Steinbach) wurde die Verbindung zwischen den Agarbrücken und dem Messplatz hergestellt, indem die Elektroden mit den entsprechenden Agar-Brücken gemeinsam in ein Töpfchen mit gesättigter KCl-Lösung tauchten. Die Messungen erfolgten mit einem CVC 6 Messplatz (Fa. Fiebig, Berlin). Zur Datenaufnahme am CVC 6 Messplatz diente das Programm Analogon (Fa. Fiebig, Berlin). Ussingkammern, Container, Containerringe, Absaug- und Einfüllschläuche wurden gassterilisiert (Formalin). Die Verbindungsschlauchstücke zwischen Ussingkammern und Wärmetauschern, zwischen Wärmetauschern und Begasungskanülen sowie zwischen Begasungskanülen und den das Gasgemisch zuführenden Schlauchleitungen wurden bei 120°C dampfsterilisiert. Die Durchführung der Versuche erfolgte in der Abluft- (Flow-) Kammer, in der durch kontinuierliche Absaugung die Luft weitgehend keimfrei gehalten wurde. Die Ussingstände wurden etwa eine Stunde vor Versuchsbeginn in der Flowkammer aufgebaut. Zuerst wurden die Wärmetauscher befestigt und über

Schlauchverbindungen an das Wasserbad angeschlossen. Dann wurden die Ussingkammern vorsichtig mit den Agarbrücken verbunden, mit leerem Container in ihrer Mitte in den Versuchsstand eingesetzt und an den Messplatz angeschlossen. Nach Einsatz der Begasungskanülen wurde die Begasung des Systems begonnen und die zuvor steril filtrierte Badlösung eingefüllt. Nach Erwärmung der Badlösung auf 37°C startete die Messung. Ein Problem bestand darin, dass sich zwischen epithelnahen Elektroden und Epithel noch eine etwa 2 mm dicke Schicht von Badlösung befand, deren Ohmscher Widerstand durch die Dicke dieser Schicht und den Volumenwiderstand der Badlösung bestimmt war. Der zwischen den Spitzen der Spannungselektroden gemessene Spannungsabfall erfolgte somit nicht nur über dem eingespannten Gewebe, sondern auch über die in der Messstrecke gelegene Badlösung. Zur Bestimmung der transepithelialen Spannung musste der Spannungsabfall über der Badlösung von dem zwischen den beiden Spannungselektroden gemessenen Wert abgezogen werden. Zur Durchführung dieser „Badkorrektur“ wurde zu Beginn jeden Experiments an der mit Badlösung gefüllten, präparatfreien Messkammer der Ohmsche Widerstand der zwischen den Spannungselektroden gelegenen Badlösung bestimmt. Dieser Wert wurde gespeichert und dann bei der Messung während des Versuchs berücksichtigt. Als weiterer Korrekturwert wurde vor jedem Experiment die durch die Asymmetrie der Elektroden bedingte Potentialdifferenz gemessen und gespeichert. Auch dieser Wert wurde bei jeder Messung während des ganzen Experimentes beachtet. Im eigentlichen Experiment wurde der Klemmstrom zur Widerstandsmessung alle 60 Sekunden kurz eingestellt und ansonsten im „open-circuit“-Modus gemessen.

## **2.12. Wachstumsverhalten des Anaerobiers *Bacteroides fragilis* unter verschiedenen Begasungsvarianten**

Bei *Bacteroides fragilis* handelt es sich um einen obligaten Anaerobier. Die Ussingkammer benötigt zur Aufrechterhaltung eines pH von 7,4 und ausreichender O<sub>2</sub>-Versorgung für das Gewebe, ein Gas-Gemisch aus 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>. Es galt zunächst zu überprüfen, welches Wachstumsverhalten der gewählte *Bacteroides fragilis* Wildtyp unter verschiedenen Begasungen aufweist.

In **Tabelle 2** sind die verschiedenen Begasungsvarianten und deren Einfluss auf den totalen Gewebewiderstand und die Wachstumskinetik des *Bacteroides fragilis* aufgezeigt.

<b>Begasungsart:</b>	<b><math>\Delta\text{-R}^t</math></b>	<b><math>\Delta\text{-KBE}</math></b>
<b>mucosal : serosal</b>	<b>nach 3 Stunden</b>	<b>nach 3 Stunden</b>
<b>N<sub>2</sub> : N<sub>2</sub></b>	-9,2±1,2 $\Omega\cdot\text{cm}^2$	+120,2±13,2
<b>N<sub>2</sub> : O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub></b>	-9,1±0,9 $\Omega\cdot\text{cm}^2$	+125,2±18,5
<b>O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> : O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub></b>	-8,9±0,8 $\Omega\cdot\text{cm}^2$	+118,4±15,2

**Tabelle 2** Vergleich der verschiedenen Begasungsarten der Ussingkammer für die Exposition unter *Bacteroides fragilis*.

Zusätzlich stellt sie Ergebnisse der Differenz des totalen Widerstandes ( $\Delta\text{-R}^t$ ) und der Kolonie bildenden Einheiten der mucosalen Ussingkammer Seite ( $\Delta\text{-KBE}$ ) dar. Unter allen Begasungszuständen fanden sich die gleichen Veränderungen. Es bestanden keine Unterschiede der drei  $\Delta\text{-KBE}$  und  $\text{R}^t$  Werte. *Bacteroides* gilt als meist O<sub>2</sub> toleranter Anaerobier. Er ist in der Lage atmosphärische Konzentrationen von Sauerstoff für bis zu drei Tage zu tolerieren (Tally et al. 1975<sup>138</sup>). Zwei Hauptantioxidative Stress Gene, die für die Induktion für Enzyme, wie Catalase und Dismutase sowie 28 weitere Sauerstoff reduzierende Proteine, werden dafür verantwortlich gemacht (Rocha et al.1995<sup>98</sup>). Aktuelle Ergebnisse einer Studie von Baughn et al. 2004<sup>8</sup> belegen, das *Bacteroides fragiles* als strikter Anaerobier Sauerstoff über ein integriertes Membran Elektronen Transport System verstoffwechseln kann. Zusätzlich hat es eine Cytochrome bd Oxidase System (Baughn et al.2004<sup>8</sup>). Diese Begasungsversuche an je drei humanen Colonpräparaten belegten, dass keine strikten anaeroben Verhältnisse für eine suffiziente Vermehrung von *Bacteroides* erforderlich waren, so dass wir für die Versuche eine O<sub>2</sub> /CO<sub>2</sub> : O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Begasung wählten, um eine optimale Oxygenierung der eingespannten Epithelien zu gewährleisten.

### **2.13. Patientenkollektiv**

Das Patientenkollektiv der allgemeinen chirurgischen Abteilung bei denen man Darmepithelien entnahm umfasste 41 Patienten und wurde in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bestand aus jeweils elf Patienten mit Colitits ulcerosa, bei denen man eine Coloproktomukosektomie durchführte und jeweils neun Ileum und elf Colonabschnitte entnahm. Die zweite Gruppe setzte

sich aus 14 Morbus Crohn Patienten zusammen, bei denen man nach Segmentresektionen jeweils 14 x Ileum und 13 x Colonabschnitte entnahm. Die letzte Gruppe setzte sich aus der Kontrollgruppe bestehend aus 16 Colon Carcinom Patienten zusammen, bei denen wegen eines kolorektalen Karzinoms, 16 x Colon und zwölf mal Ileum eine Resektion des betroffenen Darmschnittes notwendig war. Die Charakteristika der operierten Patienten für die Ileum- und Colon-Versuche sind in **Tabelle 3** und **4** dargestellt. Weitere Charakteristika werden im Ergebnisteil im Rahmen der Determinanten einer bakteriellen Permeation aufgeführt und bearbeitet.

	Kontrollen	Colitis ulcerosa	M. Crohn
n	12	9	14
Alter (Jahre)	59,2±8,5	37,2±3,9	33,2±6,6
Geschlecht (w : m)	7 : 5	6 : 3	6 : 8
Praeoperative Erkrankungsdauer (Jahre)	-	7,2±2,9	4,3±2,2
Alter bei Erkrankungsbeginn (Jahre)	-	21,3±2,6	20,9±5,3
Cortison bei OP < 20 mg (n)	-	3	6
Cortison bei OP > 20 mg (n)	-	4	4

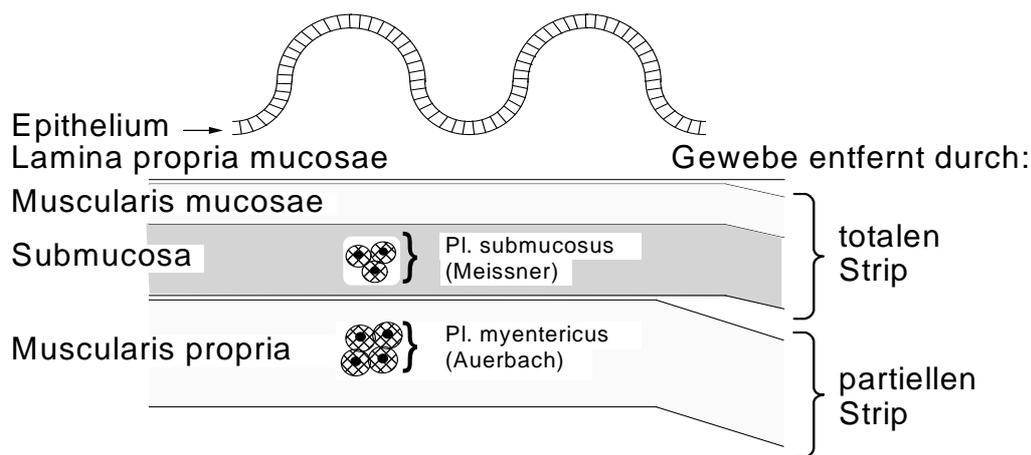
**Tabelle 3**                      **Charakteristika der untersuchten Patienten der Ileum-Bacteroides fragilis- Versuche**

	Kontrollen	Colitis ulcerosa	M. Crohn
n	16	11	13
Alter (Jahre)	60,4±7,1	39,2±2,7	32,7±4,4
Geschlecht (w : m)	9 : 7	5 : 7	9 : 4
Praoperative Erkrankungsdauer (Jahre)	-	5,4±3,8	5,8±2,1
Alter bei Erkrankungsbeginn (Jahre)	-	22,4±2,6	19,9±4,9
Cortison bei OP < 20 mg (n)	-	4	4
Cortison bei OP > 20 mg (n)	-	5	7

**Tabelle 4 Charakteristika der untersuchten Patienten der Colon-Bacteroides fragilis-Versuche**

#### **2.14. Aufarbeitung der menschlichen Darmpräparate**

Mit der Unterstützung von Herrn Prof. Dr. med. Buhr wurde die unmittelbare Entnahme von Darmpräparaten im Operationssaal ermöglicht. Kurz nachdem der erkrankte Darmabschnitt reseziert worden war erfolgte die Entnahme von etwa 1 cm<sup>2</sup> große Proben der Darmwand mittels Schere und Pinzette und wurde sofort in die eisgekühlte, zuvor oxygenierte Badlösung gelagert. Nach einer Verzögerung von fünf bis zehn Minuten Transport in den Versuchsraum erfolgte dort die sofortige Präparation des Epithels. Das Präparat wurde zur Präparation mit der mucosalen Seite nach unten auf eine Silikonplatte gelegt, und mit Stecknadeln wurden Epithel und Submucosa durch mechanischen Zug etwas gedehnt und auf der Platte festgesteckt. Die Trennung von Muscularis propria und Submucosa, war makroskopisch bereits zu erkennen (Abbildung 6). Die Muscularis propria wurde etwas angehoben und unter Spannung mit einem scharfen Skalpell abgetrennt. Man bezeichnet diese Art der Präparation als „partieller Strip“. Dabei bleibt der Plexus submucosus Meissner erhalten

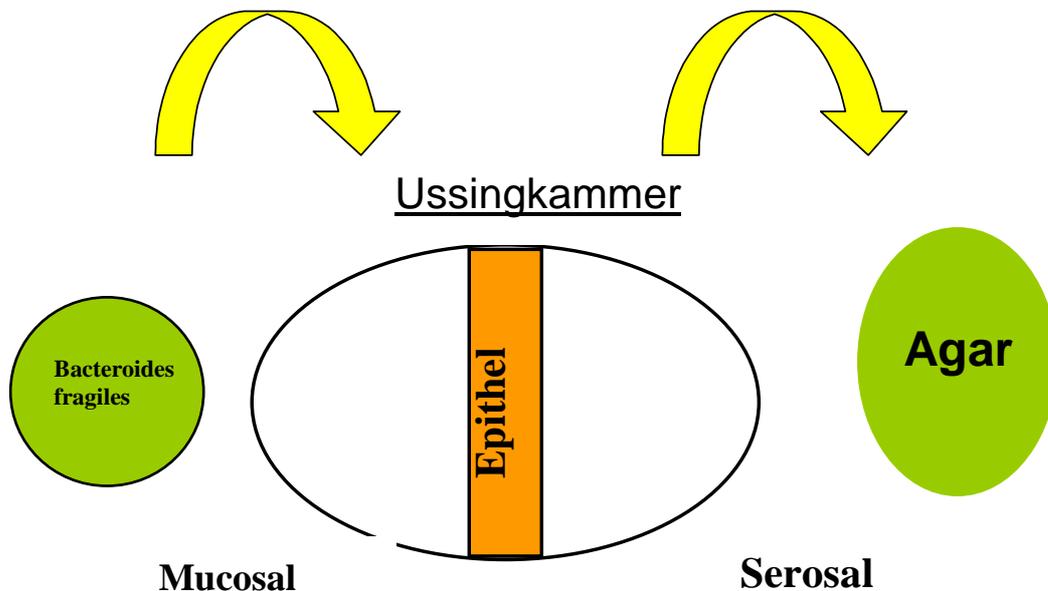


**Abbildung 6 Schematischer Aufbau der Darmwand** (modifiziert nach Hegel und Fromm 1990) und der Gewebeschichten, die beim partiellen und totalen Strippen erfasst werden. Nach der Präparation wurde mit einem Gewebekleber (Histoacryl®, B. Braun Melsungen AG) der Containerring serosal auf das Epithel aufgeklebt und aus dem Gesamtpräparat ausgeschnitten. Anschließend wurde der Ring über den Silikonring der zentralen Öffnung des Containerunterteils gestülpt und mit dem Oberteil verschlossen.

## 2.15. Durchführung der Experimente

Das präparierte Epithel wurde mit einem Container bestückt. Vor Bakterienzugabe, d.h. 20 Minuten nach Einspannen des mit dem Epithel bestückten Containers wurden je 100 µl der mukosalen und serosalen Badlösung entnommen und mittels Drigalskispatel auf Agarplatten ausgestrichen. Diese Proben sollten dazu dienen, dass sich zu Versuchsbeginn keine Vancomycin, Kanamycin, Ampicillin und Sulbactam resistenten Keime in der Badlösung befinden. Anschließend erfolgte die Zugabe der Bakterien. Hierfür wurden 1000 µl der mukosalen Badlösung entnommen, um darin die zuvor abzentrifugierten Bakterien mittels „Vortex“ zu resuspendieren. Die gewonnene Bakteriensuspension wurde der mukosalen Badlösung zugegeben und dieser Zeitpunkt als 0' festgelegt. Anschließend unmittelbar nach Bakterienzugabe und nachfolgend im Abstand von 60 Minuten bis zum Versuchsende nach vier Stunden erfolgten Probenentnahmen von je 100 µl aus mukosaler und serosaler Badlösung. Es wurde jeweils unverdünnt 100 µl der serosalen Badlösung mittels Drigalskispateln auf Vancomycin, Kanamycin, Ampicillin und Sulbactam enthaltenden Columbia-Agarplattenausgestrichen. Die entnommene Probe wurde mit der Badlösung 1·10<sup>6</sup> verdünnt. Daraufhin wurden 100 µl der letzten Verdünnungsstufe auf die oben genannten Platten

ausgestrichen. Die Wahl der Verdünnungsstufe beruht auf Ergebnisse von Vorversuchen, die regelmäßig eine Bakterienzahl von 10<sup>9</sup>/ml ergeben hatten, entsprechend einer Zahl von 255 KBE auf den mit dieser Verdünnungsstufe bebrüteten Agarplatten. Die Agarplatten wurden in einem Wärmeschrank bei 37,2°C bebrütet und nach 48 Stunden wurden die gewachsenen Kolonie bildenden Einheiten ausgezählt (**Abbildung 7**).



**Abbildung 7** Schematische Wiedergabe des Versuchsaufbaus. Eine definierte Menge von *Bacteroides fragilis* wurde der mucosaseitigen Hälfte der Ussingkammer zugegeben. Nach 0, 30, 60, 120, 180 Minuten wurden serosaseitige Proben von 100µl entnommen und auf eine Agarplatte aufgebracht. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die KBE's auf den Agarplatten ausgezählt. Als positive Permeation bewertete man, sobald mindestens eine koloniebildende Einheit des zugegebenen *Bacteroides fragilis* im Ausstrich der serosalen Badlösung nachzuweisen war.

## 2.16. Histologische Untersuchung der Präparate

Nachdem die Experimente beendet waren, wurden die Präparate aus den Containern der Ussingkammern entnommen. Anschließend wurde das Epithel aus dem Container herausgetrennt und nach Fixierung in Formalinlösung über eine Alkoholverdünnungsreihe in Paraffin eingebettet (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin). Die mikroskopische Begutachtung erfolgte nach dem Schneiden und Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Zusätzlich erfolgte eine Fluoreszenz – in-situ – Hybridisierung zur Lokalisation des permeierten *Bacteroides fragilis* innerhalb der Mukosa. Dabei wurde das Darmgewebe vom terminalen Ileum

und Colon von insgesamt 24 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, davon zwölf mit aktiver Colitis ulcerosa und zwölf mit aktiven Morbus Crohn und 14 Kontrollpatienten mit der in situ Hybridierung die bakterielle Gewebsinvasion untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden insgesamt auf der Oberfläche von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn Gruppe auf den Darmepithelzellen mehr Bakterien nachgewiesen ( $P < 0.05$ ). Die bakterielle Mukosainvasion bei der Colitis ulcerosa betrug 83.3 Prozent im Kolon. Bei Morbus Crohn betrug die mukosale bakterielle Invasion im Ileum 55.6 Prozent und im Kolon 25 Prozent.

## **2.17. Statistik**

Alle Ergebnisse wurden soweit nicht im Text anders angegeben als Mittelwerte mit □ Standardirrtum (SEM) angegeben. Da es sich bei allen Untersuchungen um Mehrgruppenvergleiche handelte, wurde der Student-Newman-Keuls-Test nach Rejektion der Nullhypothese über den Friedman-Test verwandt. Das Signifikanz-Niveau wurde für  $p < 0,05$  festgelegt. Die Korrelationsanalysen erfolgten mittels der Formel für die lineare Regressionsanalyse.

## **2.18. Patienten und Präparate**

Die Ethikkommission erteilte ein Votum für die unten genannten Patientengruppen.

### **2.18.1. Kontroll - Gruppe**

#### **2.18.1.1. Terminales Ileum**

Die Operationspräparate der zu untersuchenden menschlichen Darmepithelien stammten von Patienten, die durch Hemicolektomie rechts wegen eines nicht stenosierenden Colon ascendens Karzinoms operiert wurden. Aus den letzten fünf cm des terminalen Ileum wurde die Entnahmestelle gewählt. Zwischen Entnahme des Resektats und dem Einspannen des Präparats betrug die Zeitspanne 20 Minuten.

### 2.18.1.1.2. Terminales Ileum: Permeation Bacteroides fragilis

Im tabellarischen Anhang **Tabelle 5** sind die klinischen Besonderheiten der operierten Kontroll-Patienten für die Ileum -Versuche dargestellt.

	Kontrollen
n	12
Alter (Jahre)	59,2 ± 8,5
Geschlecht (w : m)	7 : 5

**Tabelle 5.** Charakteristika der untersuchten Kontroll Patienten der Ileum-Bacteroides fragilis-Versuche

### 2.18.1.2. Colon

#### 2.18.1.2.1. Colon: Permeation Bacteroides fragilis

Die Basisdaten der operierten Kontroll-Patienten für die Colon-Versuche sind in **Tabelle 6** und im tabellarischen Anhang dargestellt.

	Kontrollen
n	16
Alter (Jahre)	60,4±7,1
Geschlecht (w : m)	9 : 7

**Tabelle 6** Charakteristika der untersuchten Kontroll Patienten der Colon-Bacteroides fragilis Versuche

### 2.18.2. Morbus Crohn

#### 2.18.2.1. Terminales Ileum

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung wurde das terminale Ileum von 14 Patienten, die wegen Morbus Crohn eine Resektion des ileocöcalen Übergangs erhielten untersucht. Das Durchschnittsalter betrug  $33,2 \pm 6,6$  Jahre, die mediane praeoperative Erkrankungsdauer war  $4,3 \pm 2,2$  Jahre Jahre, abdominelle Voroperationen hatten die Patienten im Median 1,2 (0-2). Zwei der Patienten hatten kein Prednisolon zum Zeitpunkt der Operation, sechs erhielten zehn bis 20 mg Prednisolon und zwei mehr als 20 mg Prednisolon. Drei Patienten standen bis zwei Wochen

vor der Operation unter einer Azathioprin-Therapie. In sieben Fällen wurde eine Ileocökalresektion vorgenommen und dreimal eine Nachresektion einer Ileoascendostomie. Eine therapierefraktäre symptomatische Stenose des terminalen Ileum war in allen Fällen die Operationsindikation. Interenterische Fisteln hatten zusätzlich zwei Patienten. Bei allen Resektaten wurde am ileumseitigen Resektionsrand eine 1 cm<sup>2</sup> grosse Probe entnommen und wie oben beschrieben in die Ussingkammer eingebracht. Obwohl beim Morbus Crohn die Entzündung unterschiedliche Muster aufweisen kann, existiert derzeit noch keine entsprechende Übereinstimmung über eine Einteilung der Erkrankung entsprechend der Histologie in Subtypen. Entsprechend der **Wiener Klassifikation** erfolgt eine Unterteilung des M. Crohn in Patientenalter bei Diagnosestellung, Lokalisation der Erkrankung und Verhalten (Gasche et al. 2000<sup>40</sup>).

## **Tabelle 7      Wiener Klassifikation des Morbus Crohn**

(Konsensus der internationalen Arbeitsgruppe für den Weltkongress Gastrenterologie, Wien 1998)

<b>Alter bei Diagnose</b>	1 < 40 Jahre	Zeitpunkt der histologischen, chirurgischen, radiologischen oder endoskopischen Diagnose, kein anamnestisch erruierter Zeitpunkt des Krankheitsbeginns.
<b>Lokalisation</b>	1 = terminales Ileum 2 = Kolon 3 = Ileokolon 4 = Oberer GI-Trakt	Maximale Ausbreitung der Erkrankung zu jedem Zeitpunkt vor einer operativen Resektion. Aphtöse Läsionen oder Ulzerationen jedweder Größe, ein Schleimhauterythem ist nicht genug.
<b>Verhalten</b>	1 = Nicht stenosierend oder penetrierend 2 = Stenosierend 3 = Penetrierend	Entzündliche Tumore, Fisteln, perianale Ulcera werden als penetrierende Läsionen definiert. Postoperative Komplikationen werden ausgeschlossen. Stenosen können chirurgisch, endoskopisch oder radiologisch diagnostiziert sein.

Weitere zu dokumentierende Daten:

- Geschlecht: w/m
- Ethnische Zugehörigkeit: kaukasisch, jüdisch, asiatisch, farbige
- Familienanamnese einer CED: ja/nein
- Verwandte 1. Grades ?
- Extraintestinale Manifestationen: ja/nein

Das Krankheitsverhalten wird als „nicht perforierend“ und „perforierend“ untergliedert. In Anlehnung an die Wiener Klassifikation wurden die untersuchten Präparate der Morbus Crohn-Gruppe in einen perforierenden und nicht perforierenden Typ eingeteilt.

### 2.18.2.2. Terminales Ileum : Permeation Bacteroides fragilis

Die klinischen Besonderheiten der operierten Patienten für die Ileum -Versuche sind in **Tabelle 8** und im tabellarischen Anhang für die Patienten 29-41 dargestellt.

	Kontrollen	M. Crohn
n	12	<b>14</b>
Alter (Jahre)	59,2±8,5	<b>33,2±6,6</b>
Geschlecht (w : m)	7 : 5	<b>6 : 8</b>
Praeoperative Erkrankungsdauer (Jahre)	-	<b>4,3±2,2</b>
Alter bei Erkrankungsbeginn (Jahre)	-	<b>20,9±5,3</b>
Kein Cortison	-	<b>2</b>
Cortison bei OP < 20 mg (n)	-	<b>6</b>
Cortison bei OP > 20 mg (n)	-	<b>2</b>
Verwandte 1 .Grades	-	<b>2</b>
Extraintestinale Manifestationen	-	<b>4</b>
Abdominelle Voroperationen	2	<b>1.2(0-2)</b>
Azathioprintherapie (14 Tage vor OP)	-	<b>3</b>

**Tabelle 8** Charakteristika der untersuchten Patienten der Ileum-Bacteroides fragilis-Versuche

### 2.18.2.3. Colon: Permeation Bacteroides fragilis

Die klinischen Grunddaten der operierten Patienten für die Colon-Versuche sind in **Tabelle 9** dargestellt.

	Kontrollen	M. Crohn
n	16	13
Alter (Jahre)	60,4±7,1	32,7±4,4
Geschlecht (w : m)	9 : 7	9 : 4
Praeoperative Erkrankungsdauer (Jahre)	-	5,8±2,1
Alter bei Erkrankungsbeginn (Jahre)	-	19,9±4,9
Cortison bei OP < 20 mg (n)	-	4
Cortison bei OP > 20 mg (n)	-	7
Verwandte 1 . Grades	-	2
Extraintestinale Manifestation	-	2
Abdominelle Voroperationen	2	3
Azathioprintherapie (14 Tage vor OP)	-	41

**Tabelle 9** – Charakteristika der untersuchten Patienten der Colon-Bacteroides fragilis–Versuche

### 2.18.3. Colitis ulcerosa

Auch die Colitis ulcerosa kann nach verschiedenen Indizes klassifiziert werden, wobei im unterschiedlichen Ausmaß auf subjektive Parameter und objektive Befunde eingegangen wird. So bewertet beispielsweise der klinische Aktivitätsindex neben Laborbefunden und objektiven klinischen Befunden auch das subjektive Befinden des Patienten. Der zusätzliche endoskopische Index im Scoring Index im Scoring System nach RACHMILEWITZ berücksichtigt die Tatsache, dass ähnlich wie bei Morbus Crohn, die klinische Schwere der Colitis ulcerosa nicht immer mit dem endoskopischen Befund korreliert (Adler et al.199<sup>63</sup>). Hauptsächlich verwendet wird die einfach zu handhabende Klassifikation von TRUELOVE und WITTS, nach welcher die Krankheit bezüglich objektiver klinischer und laborchemischer Parameter in einen milden, schweren und sehr schweren bis fulminanten Schub eingeteilt wird (siehe Tabelle).

Klassifikation der Colitis ulcerosa erfolgte nach **Truelove und Witts, 1959**

Variable	Milder Schub	Schwerer Schub	Sehr schwerer Schub
Diarrhöen	< 5 pro Tag	5 -9 pro Tag	> 9 pro Tag
Blutung	Keine oder wenig	Mäßig	Profus
Fieber	Afebril	>37,8°	>38,8°
Hämoglobin	> 10 g %	7.5 – 10 g %	< 7.5 g %
Blutsenkung	< 30 mm/h	30 -50 mm/h	> 50 mm/h
Albumin	> 4 g%	3-4 g %	< 3 g %

**Tabelle 10** True Love Klassifikation

Maximal sind nach diesem Index 18 Punkte erreichbar, in dem für fehlende oder leicht pathologische Befunde 0 bzw. 1 Punkt, für schwere Symptomatik je 2 Punkte und für sehr schwere Befunde jeweils 3 Punkte vergeben werden. Ein Score bis zu 6 Punkten entspricht einem leichten, zwischen 7 und 12 Punkten einem schweren und über 12 Punkte einem sehr schweren Verlauf der Colitis ulcerosa. In dieser Arbeit wurde die Colitis ulcerosa nach dem Index von TRUELOVE und WITTS eingeteilt.

### 2.18.3.1. Terminales Ileum: Permeation Bacteroides fragilis

Die klinischen Grunddaten der operierten Colitis ulcerosa Patienten für die Ileum -Versuche sind in **Tabelle 11** dargestellt.

	Kontrollen	M. Crohn	Colitis ulcerosa
n	12	14	<b>9</b>
Alter (Jahre)	59,2±8,5	33,2±6,6	<b>37,2±3,9</b>
Geschlecht (w : m)	7 : 5	6 : 8	<b>6 : 3</b>
Praeoperative Erkrankungsdauer (Jahre)	-	4,3±2,2	<b>7,2±2,9</b>
Alter bei Erkrankungsbeginn (Jahre)	-	20,9±5,3	<b>21,3±2,6</b>
Cortison bei OP < 20 mg (n)	-	6	<b>3</b>
Cortison bei OP > 20 mg (n)	-	2	<b>4</b>
Verwandte 1 . Grades	-	2	<b>2</b>
Extraintestinale Manifestation	-	4	<b>4</b>
Abdominelle Voroperationen	1	1	<b>3</b>
Azathioprintherapie (14 Tage vor OP)	-	3	<b>1</b>

**Tabelle 11** Charakteristika der untersuchten Patienten der Ileum-Bacteroides fragilis-Versuche

**2.18.3.2. Colon: Permeation Bacteroides fragilis**

Die klinischen Grunddaten der Colitis ulcerosa Patienten für die Colon-Versuche sind in **Tabelle 12** dargestellt.

	Kontrollen	M. Crohn	<b>Colitis ulcerosa</b>
n	16	13	<b>11</b>
Alter (Jahre)	60,4±7,1	32,7±4,4	<b>39,2±2,7</b>
Geschlecht (w : m)	9 : 7	9 : 4	<b>5 : 7</b>
Praeoperative Erkrankungsdauer (Jahre)	-	5,8±2,1	<b>5,4±3,8</b>
Alter bei Erkrankungsbeginn (Jahre)	-	19,9±4,9	<b>22,4±2,6</b>
Cortison bei OP < 20 mg (n)	-	4	<b>4</b>
Cortison bei OP > 20 mg (n)	-	7	<b>5</b>
Verwandte 1 . Grades			
Extraintestinale Manifestation			
Abdominelle Voroperationen			
Azathioprintherapie (14 Tage vor OP)			

**Tabelle 12** Charakteristika der untersuchten Patienten der Colon-Bacteroides fragilis – Versuche

**3 Ergebnisse**  
**3.1. Kontroll-Gruppe**  
**3.1.1. Terminales Ileu**  
**3.1.1.1. Permeation – Bacteroides fragilis**

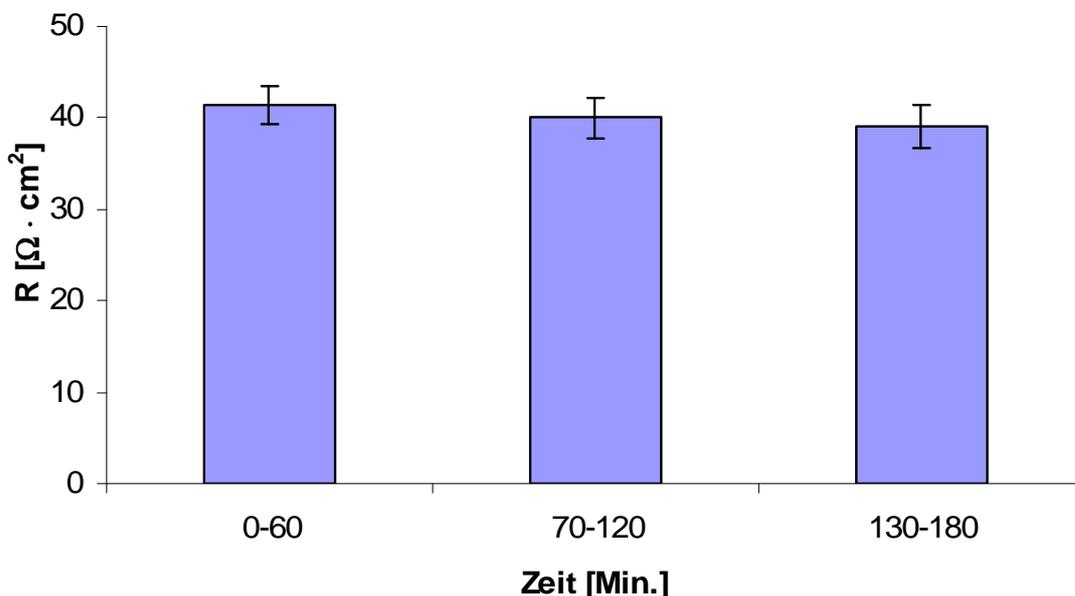
Die zwölf untersuchten Ileum-Präparate der Kontrollgruppe wiesen alle keine Permeation durch das untersuchte Dünndarmepithel auf (**Tabelle 13**).

Ileum	Zahl der Versuche (n)	Permeation	Permeation (%)
Kontrolle	12	0	0

**Tabelle 13** Kontroll-Ileum-Präparate und die Häufigkeit der bakteriellen Permeation von Bacteroides fragilis.

**3.1.1.2. Elektrischer Widerstand der Epithelien**

Die totalen elektrischen Widerstände waren während aller Versuche über den Versuchszeitraum von 180 Minuten stabil geblieben. In Abbildung 10 sind die totalen Widerstände ( $R^t$ ) nach 180 Minuten aufgezeigt. Die Widerstandsabnahme ( $\Delta R^t$ ) vom Versuchsbeginn bis 180 Minuten nach Versuchsbeginn betrug:  $\Delta R^t: 10,2 \pm 1,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Diese Messungen belegten elektrophysiologisch die Intaktheit des Epithels.



**Abbildung 8** Widerstände der Epithelien im Bacteroides-Versuch für das terminale Ileum nach 180 Minuten (n.s.).

### **3.1.1.3. Histologie**

Bei den Patienten der Kontrollgruppe wurden die Dünndarmepithelien aus dem Sicherheitsabstand um den zu resezierenden Tumor entnommen. Somit waren die Präparate entzündungsfrei ohne pathologische Veränderungen. Bei keinen der 12 Kontrollpatienten kam es zu einem Durchtritt von Bakterien über das Epithel.

### **3.1.1.4. Praeoperative Therapie**

#### **3.1.1.4.1. Cortison**

In der Kontrollgruppe (n=12) erhielt kein Patient Cortison.

#### **3.1.1.4.2. Antibiotika**

Alle Kontroll-Patienten erhielten als perioperative prophylaktische Antibiotika-Therapie 2 g Mezlocillin und 500 mg Metronidazol intravenös als Kurzinfusion, bei fehlender bakterieller Permeation.

#### **3.1.1.4.3. Totale parenterale Ernährung**

In der Kontrollgruppe erhielt bei fehlender bakterieller Permeation keiner der Patienten präoperativ eine parenterale Ernährung.

#### **3.1.1.4.4. Postoperative septische Komplikationen**

In der Kontrollgruppe hatte ein Patient postoperativ einen unklaren Temperaturanstieg und eine Leukozytose. Ein anderer entwickelte eine Harnwegsinfektion und eine akute Bronchitis. Ein Patient erlitt eine Anastomoseninsuffizienz mit nachfolgender Sepsis. In allen drei Fällen war keine bakterielle Permeation durch das Dünndarmepithel aufgetreten.

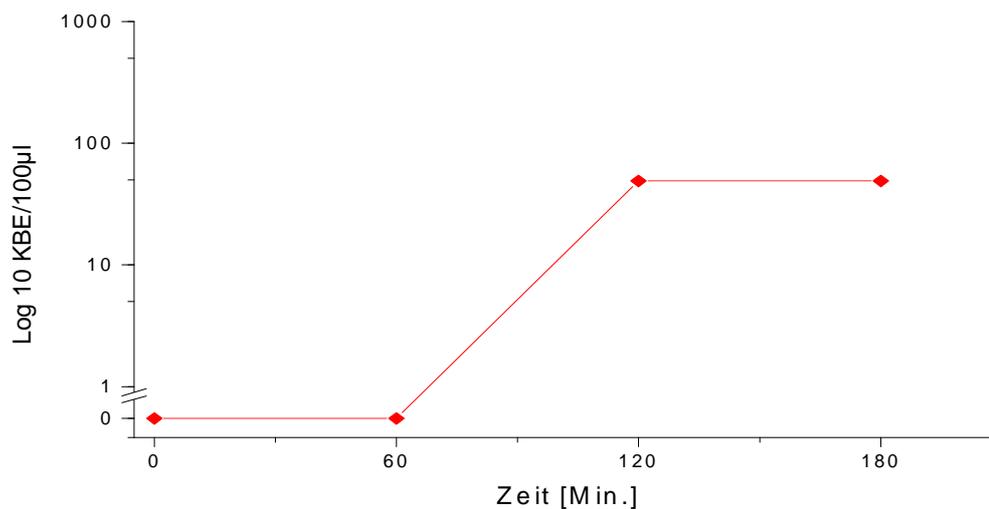
### 3.1.2 Colon

#### 3.1.2.1. Permeation – Bacteroides fragilis

Bei den Kontrollen kam es bei einem Colondarmepithel zu einer bakteriellen Permeation (Tabelle 14).

Colon	Zahl der Versuche (n)	Permeation	Permeation (%)
Kontrolle	16	1	6,2

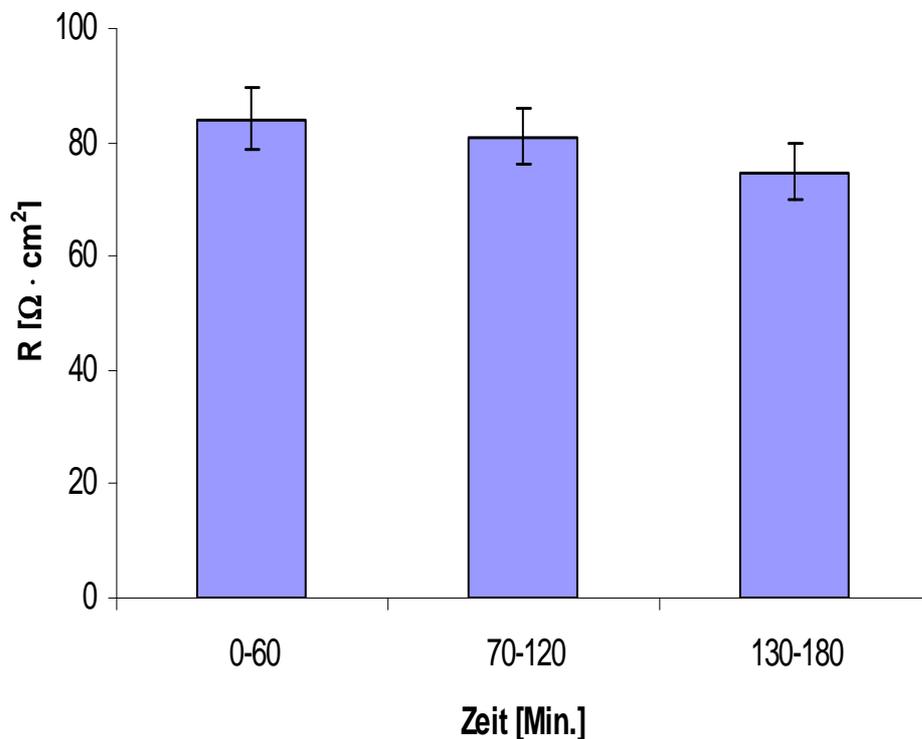
**Tabelle 14** Kontroll-Gruppe und die Häufigkeit der bakteriellen Permeation von Bacteroides fragilis



In **Abbildung 9** ist die Anzahl der koloniebildenden Einheiten im Zeitverlauf für das permeierte Epithel aufgetragen (Kolonie bildenden Einheiten, 10er logarithmisch).

### 3.1.2.2. Elektrischer Widerstand der Epithelien

Während des gesamten Versuchszeitraumes von 180 Minuten waren die totalen elektrischen Widerstände bei allen Versuchen stabil geblieben. **Abbildung 10** zeigt die totalen Widerstände ( $R^t$ ). Die Widerstandsabnahme ( $\Delta R^t$ ) der Kontrollen war:  $\Delta R^t: 9,2 \pm 1,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Die Intaktheit des Epithels über den Versuchszeitraum wird über die Stabilität des elektrischen Widerstands des Epithels elektrophysiologisch belegt.



**Abbildung 10** Verlauf des elektrischen Widerstand bei Kontrollen.

### 3.1.2.3. Histologie

Die Kolonepithel Präparate der Kontroll-Gruppen wiesen keine pathologischen Veränderungen auf.

### 3.1.2.4. Praoperative Therapie

#### 3.1.2.4.1. Cortison

Bei allen Kontrollpatienten der Kolongruppe bestand keine praeoperative Cortison-Medikation.

#### **3.1.2.4.2. Antibiotika**

Die untersuchten Dickdarmepithelien von den Patienten der Kontrollgruppe, erhielten als perioperative prophylaktische Antibiotika-Therapie 2g Mezlocillin und 500 mg Metronidazol. Es bestand keine Assoziation zur bakteriellen Permeation.

#### **3.1.2.4.3. Totale parenterale Ernährung**

Kein Patient der Kontrollgruppe erhielt eine praeoperative parenterale Ernährung. Es konnte keine Assoziation zur bakteriellen Permeation nachgewiesen werden.

#### **3.1.2.4.4. Postoperative septische Komplikationen**

In der Kontrollgruppe war bei fehlenden Nachweis einer bakteriellen Permeation, keine postoperativen Komplikationen zu beobachten.

### **3.2. Morbus Crohn**

#### **3.2.1. Terminales Ileum**

##### **3.2.1.1. Permeation – Bacteroides fragilis**

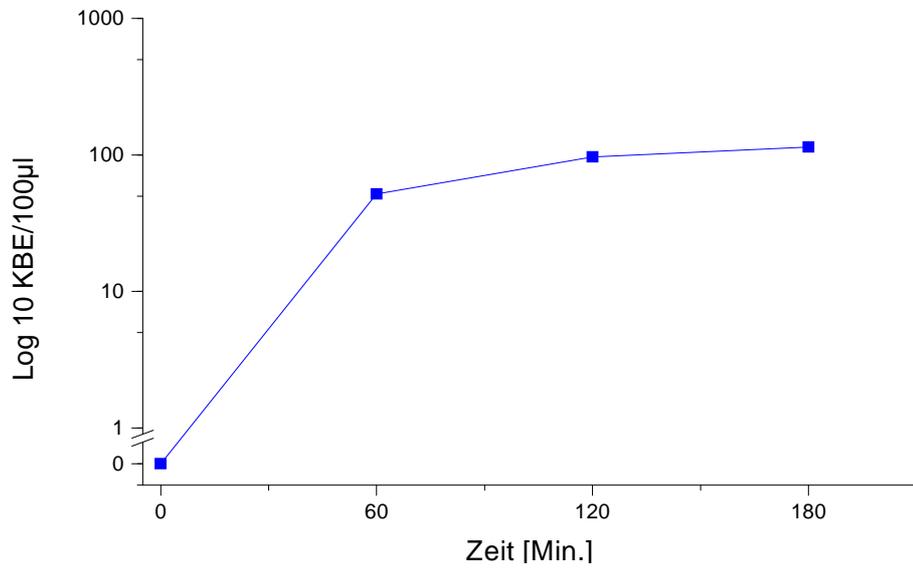
**Tabelle 15** zeigt die Ergebnisse der bakteriellen Permeation von den 26 untersuchten Ileum Darmepithelien der Kontroll- und Morbus Crohn Gruppe. Eine bakterielle Permeation von der mucosalen auf die serosale Hälfte der Ussingkammer wurde gefunden: Bei 0/12 Präparaten der Kontrollgruppe und 1/14 der Morbus Crohn Gruppe.

<b>Ileum</b>	<b>Zahl der Versuche (n)</b>	<b>Permeation</b>	<b>Permeation (%)</b>
Kontrolle	12	0	0
<b>M. Crohn</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>7,2</b>

**Tabelle 15**

Die Häufigkeit der bakteriellen Permeation von Bacteroides fragilis bei der Kontroll-, Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa Gruppe.

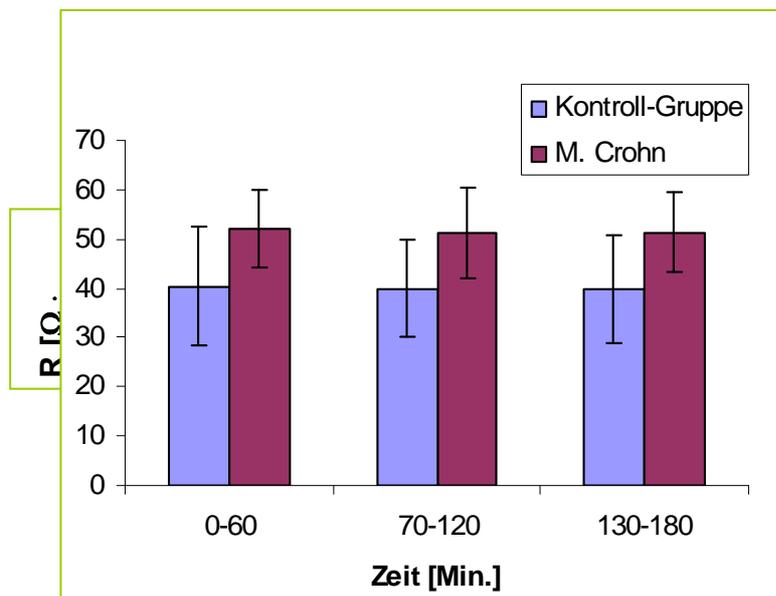
**Abbildung 11** zeigt, dass die bakterielle Permeation insgesamt ein von 26 Ileumepithelien aufweist. Die Dynamik der Permeation und die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten nach 0, 60, 120 und 180 Minuten ist in der nachfolgendenen Abbildung aufgezeigt.



**Abbildung 11** Verlauf des Bakterienzuwachses bei der *Bacteroides fragilis* Permeation (Kolonie bildenden Einheiten, 10er logarithmisch aufgetragen).

### 3.2.1.2. Elektrischer Widerstand der Epithelien

Während aller Versuche über den Versuchszeitraum von 180 Minuten waren die totalen elektrischen Widerstände stabil geblieben. In **Abbildung 12** sind die totalen Widerstände ( $R^t$ ) nach 180 Minuten aufgezeigt. Die Ileum-Widerstände zeigten keine Verminderung gegenüber den Kontrollen. Die Widerstandsabnahme ( $\Delta R^t$ ) der einzelnen Gruppen vom Versuchsbeginn bis 180 Minuten nach Versuchsbeginn betrug bei M. Crohn:  $\Delta R^t$ :  $15,3 \pm 3,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und bei den Kontrollen:  $\Delta R^t$ :  $10,2 \pm 1,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Die Intaktheit des Epithels wird elektrophysiologisch über diese Messungen belegt.

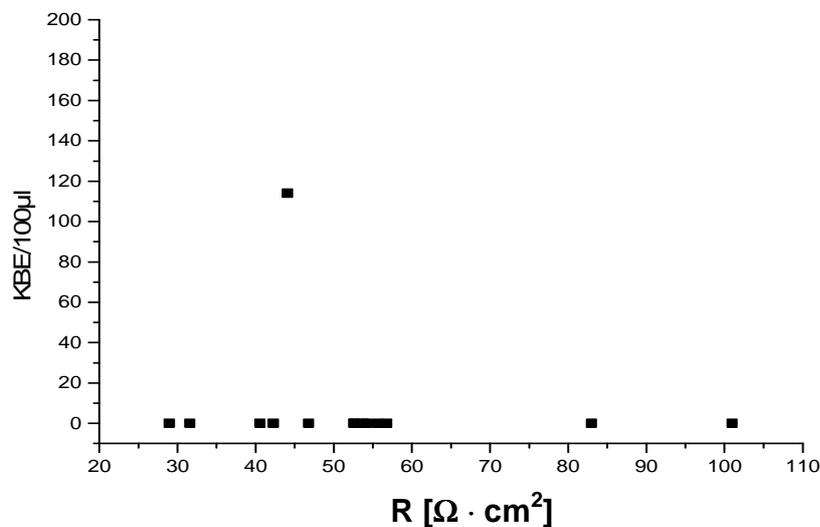


**Abbildung 12**

Widerstände der Epithelien im Bacteroides-Versuch für das terminale Ileum nach 180 Minuten. \*  $p < 0,05$  vs. Ileum Morbus Crohn.

### 3.2.1.3. Korrelation von Permeation und Widerstand

Zwischen bakterieller Permeation und Widerstand des Epithels ließ sich, wie in **Abbildung 13** zu sehen, kein Zusammenhang aufzeigen. In **Abbildung 13** sind die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE) nach 180 Minuten gegen den gemittelten Widerstand des Epithels der letzten 60 Minuten des Versuchs aufgetragen. Die Zahl der serosal nachgewiesenen Bakterien und die gemessenen elektrischen Widerstände korrelierten nicht miteinander ( $r = 0,138$  bei Morbus Crohn).



**Abbildung 13** Relation der serosalseitigen Kolonie bildenden Einheiten zum totalen Gewebewiderstand des terminalen Ileum bei Morbus Crohn ( $r = -0,138$ ,  $p = 0,639$ ).

### 3.2.1.4. Histologie

Die histologischen Befunde der Präparate der Morbus Crohn Gruppe wurden in Anlehnung an die Wiener Klassifikation in ein perforierendes und nicht-perforierendes Entzündungsmuster eingeteilt. Dabei entsprachen fünf der Patienten dem perforierendem und neun dem nicht-perforierendem Entzündungstyp. Ein fibrostenotischer nicht perforierender Typ lag bei dem Präparat vor, bei denen man eine bakterielle Permeation nachweisen konnte. Nach dem D'Haens-Score lag die Entzündungsschwere der Resektate bei  $12,2 \pm 0,9$  Punkten und entsprach damit einer schweren Ileitis Crohn (D'Haens et al. 1999<sup>24</sup>). Der CDAI (Crohn's disease activity index) der untersuchten Patienten lag bei  $277,3 \pm 44,3$  Punkten (Best et al. 1976<sup>12</sup>).

### **3.2.1.5. Praeoperative Therapie**

#### **3.2.1.5.1. Cortison**

Von 14 Morbus Crohn Patienten nahmen zehn systemisch Cortison (Prednisolon) ein. Bei dem einem Patienten mit stattgehabter Permeation wurde eine orale Medikation von 10 mg Prednisolon verabreicht. Eine Korrelation lässt sich hier nicht nachweisen.

#### **3.2.1.5.2. Antibiotika**

Alle untersuchten Ileumepithelien erhielten intravenös als Kurzinfusion als perioperative prophylaktische Antibiotika-Therapie 2 g Mezlocillin und 500 mg Metronidazol.

Ein Patient in der Morbus Crohn Gruppe erhielt bereits präoperativ über fünf Tage intravenös 3x2 g Mezlocillin und 2x500 mg Metronidazol. Bei dem einem Patienten mit einer bakteriellen Permeation wurde keine präoperative Antibiotika-Therapie durchgeführt.

#### **3.2.1.5.3. Totale parenterale Ernährung**

In der Morbus Crohn Gruppe erhielten insgesamt zwei von 14 Patienten präoperativ eine totale parenterale Ernährung. Ein Zusammenhang zwischen der einen Permeation wurde auch hier nicht nachgewiesen.

#### **3.2.1.5.4. Postoperative septische Komplikationen**

Einer von 14 Patienten in der Morbus Crohn Gruppe entwickelte postoperativ eine Anastomoseninsuffizienz mit Peritonitis und nachfolgenden Bauchdeckenabszess. Präoperativ war bei diesem Patienten eine enterovesicale Fistel bekannt. Auch hier bestand kein Zusammenhang zur bakteriellen Permeation. Der Patient mit bakterieller Permeation hatte keine postoperativen Komplikationen.

### 3.2.2. Colon

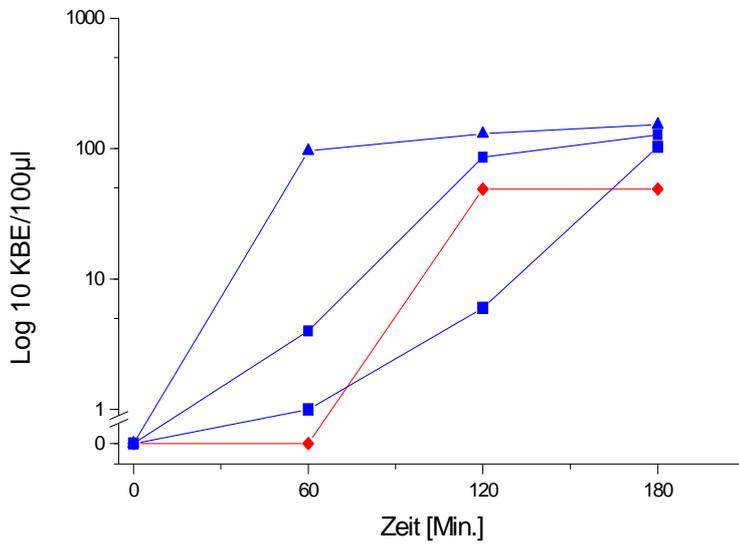
#### 3.2.2.1. Permeation – Bacteroides fragilis

29 Colon-Präparate entstammten der in **Tabelle 16** aufgeführten Kontroll- und Morbus Crohn Gruppe. Eine bakterielle Permeation von den 29 Colonresektaten fand sich bei der Morbus Crohn Gruppe 3/13 von der mucosalen auf die serosale Hälfte der Ussingkammer. In der Kontroll Gruppe wurde 1/16 Permeation nachgewiesen.

Colon	Zahl der Versuche (n)	Permeation	Permeation (%)
Kontrolle	16	1	6,2
<b>M. Crohn</b>	<b>13</b>	<b>3</b>	<b>23,1</b>

**Tabelle 16** Verteilung der Colon-Präparate auf die verschiedenen Gruppen und die Häufigkeit der bakteriellen Permeation von Bacteroides fragilis.

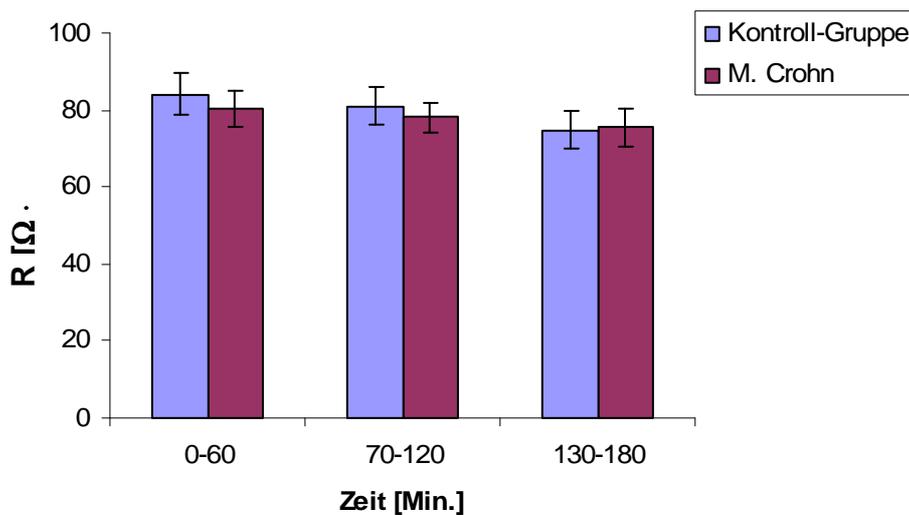
Die Dynamik der Permeation für die vier Epithelien, die eine bakterielle Permeation aufwiesen und die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten nach 0, 60, 120 und 180 Minuten, ist in **Abbildung 14** aufgezeigt. Nach 180 Minuten hatten alle Epithelien Kolonie bildende Einheiten zwischen 80 und 110 erreicht. Bei dem Epithel der Kontrollgruppe war der Durchtritt jedoch deutlich verzögert.



**Abbildung 14** Verlauf des Bakterienzuwachses im Zeitverlauf (Kolonie bildenden Einheiten, 10er logarithmisch aufgetragen, M.Crohn – blaue Linie, Kontrolle – rote Linie).

### 3.2.2.2. Elektrischer Widerstand der Epithelien

Während aller Versuche über den Versuchszeitraum von 180 Minuten waren die totalen elektrischen Widerstände stabil geblieben. In **Abbildung 15** sind die totalen Widerstände ( $R^t$ ) in Korrelation zur Anzahl der serosalseitigen Kolonie bildenden Einheiten nach 180 Minuten aufgezeigt. Keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden nachgewiesen. Folgende Widerstandsabnahme ( $\Delta R^t$ ) der einzelnen Gruppen vom Versuchsbeginn bis 180 Minuten nach Versuchsbeginn wurde nachgewiesen: M. Crohn:  $\Delta R^t$ :  $5,1 \pm 1,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , Kontrollen:  $\Delta R^t$ :  $9,2 \pm 1,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$  elektrophysiologisch. Die Intaktheit des Epithels über den Versuchszeitraum, wurde über die Stabilität des elektrischen Widerstands des Epithels belegt.

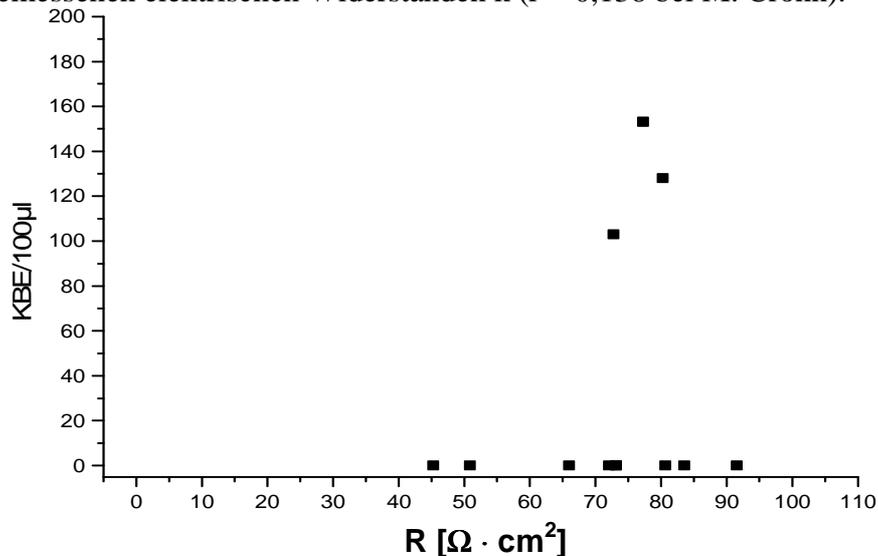


**Abbildung 15** Verlauf des elektrischen Widerstandes bei M. Crohn und bei den Kontrollen

### 3.2.2.3. Korrelation von Permeation und Widerstand

**Abbildung 16** zeigt, dass sich kein Zusammenhang zwischen bakterieller Permeation und Widerstand des Epithels darstellen lässt. Die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) sind nach 180 Minuten gegen den gemittelten Widerstand des Epithels der letzten 60 Minuten des Versuchs aufgetragen.

Es findet sich keine Korrelation zwischen der Zahl der serosal nachgewiesenen Bakterien und den gemessenen elektrischen Widerständen  $k$  ( $r = 0,138$  bei M. Crohn).



**Abbildung 16** Relation von serosalseitigen Kolonie bildenden Einheiten und totalen Gewebewiderstand des Colon ascendens bei M. Crohn. ( $r = -0,09$ ,  $p = 0,76$ ).

### 3.2.2.4. Histologie

Die histologische Einteilung der Morbus Crohn Präparate erfolgte nach der Wiener Klassifikation in ein perforierendes und nicht-perforierendes Entzündungsmuster. Von den insgesamt 13 Kolon Präparaten entsprachen acht Patienten aus dem Morbus Crohn-Kollektiv dem perforierendem und fünf dem nicht-perforierendem Entzündungstyp. Bei den drei Präparaten, die eine bakterielle Permeation aufwiesen, lag zweimal ein fibrostenotischer nicht perforierender Typ und einmal ein perforierender Typ vor. Der D'Haens-Score ergab eine Entzündungsschwere der Resektate von  $12,5 \pm 0,6$  Punkten. Somit entsprachen diese Ergebnisse einer schweren Colitis Crohn. Der CDAI der untersuchten Patienten lag bei  $300,3 \pm 54,2$  Punkten.

### **3.2.2.5. Praeoperative Therapie**

#### **3.2.2.5.1. Cortison**

Elf von 13 Morbus Crohn-Patienten nahmen systemisch präoperativ Prednisolon ein. Bei den drei Patienten mit Permeation bestand eine Medikation mit 10/15/20 mg Prednisolon. Eine Korrelation konnte nicht festgestellt werden.

#### **3.2.2.5.2. Antibiotika**

Von den untersuchten Dickdarmepithelien, erhielten alle Patienten als perioperative prophylaktische Antibiotika-Therapie 2g Mezlocillin und 500mg Metronidazol. Bereits präoperativ erhielten zwei Patienten in der Morbus Crohn-Gruppe 3x2 g Mezlocillin und 2x500 mg Metronidazol über fünf Tage. Bei den Patienten mit Permeation wurde keine präoperative antibiotische Therapie durchgeführt.

#### **3.2.2.5.3. Totale parenterale Ernährung**

Von den 13 untersuchten Kolon Darmepithelen, erhielten zwei Patienten der Morbus Crohn Gruppe präoperativ eine total parenterale Ernährung. Es ergab sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen parenteraler Ernährung und Dichtheit des Colonepithels gegenüber Bakterien. Keine Permeation konnte nachgewiesen werden.

#### **3.2.2.5.4. Postoperative septische Komplikationen**

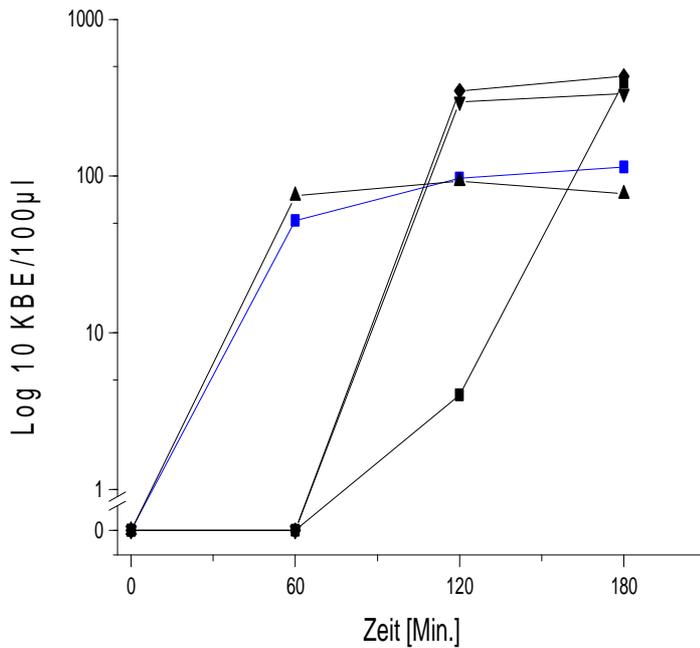
Ein Patient der Morbus Crohn Gruppe entwickelte eine Anastomoseninsuffizienz mit Peritonitis und im weiteren Verlauf einen Bauchdeckenabszess. Präoperativ hatte dieser Patient eine enterovesicale Fistel. Im Versuch zeigte sich kein bakterieller Übertritt. Der Patient mit bakterieller Permeation hatte keine Komplikationen. In der Kontrollgruppe, waren keine postoperativen Komplikationen zu beobachten.

**3.3. Colitis ulcerosa**  
**3.3.1. Terminales Ileum**  
**3.3.1.1. Permeation Bacteroides fragilis**

**Tabelle 17** zeigt die untersuchten Ileum-Präparate in der Kontroll-, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Gruppe. Es zeigten sich vier bakterielle Permeationen : Bei der Kontrollgruppe 0/12 und bei der Morbus Crohn Gruppe 1/14. Vier bakterielle Permeationen zeigt sich damit am häufigsten bei der Colitis ulcerosa ( $p < 0,05$  nach McNemars-Test).

<b>Ileum</b>	Zahl der Versuche (n)	Permeation	Permeation (%)
Kontrolle	12	0	0
M. Crohn	14	1	7,2
<b>Colitis ulcerosa</b>	<b>9</b>	<b>4</b>	<b>44,4</b>

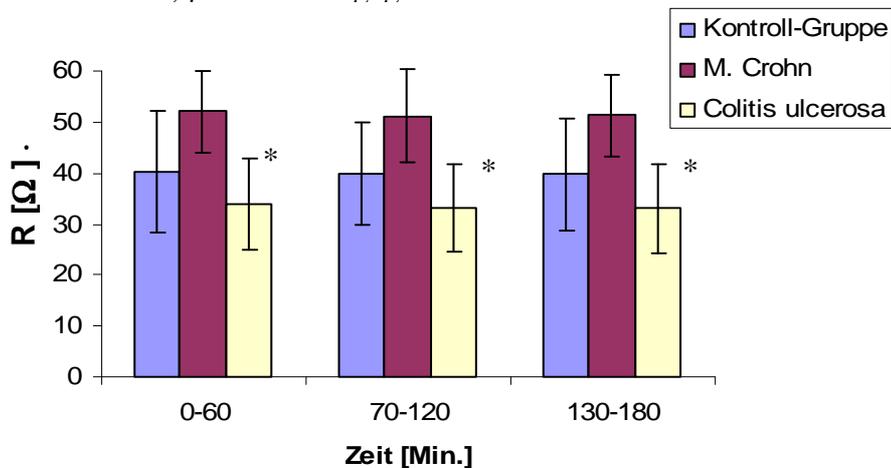
**Tabelle 17** Verteilung der Ileum-Präparate auf die verschiedenen Gruppen und die Häufigkeit der bakteriellen Permeation von Bacteroides fragilis.



**Abbildung 17** zeigt die Dynamik der Permeation und die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten nach 0, 60, 120 und 180 Minuten für die vier Epithelien der Colitis ulcerosa Ileum Gruppe, bei denen eine bakterielle Permeation nachgewiesen wurde. Alle Epithelien zeigen eine hohe Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten und eine Vermehrungstendenz auf der serosalen Seite der Ussingkammer.

### 3.3.1.2. Elektrischer Widerstand der Epithelien

Während aller Versuche über den Versuchszeitraum von 180 Minuten waren die totalen elektrischen Widerstände stabil geblieben. **Abbildung 18** zeigt die totalen Widerstände ( $R^I$ ) nach 180 Minuten. Bei der Colitis ulcerosa zeigt sich gegenüber M.Crohn eine Verminderung des Ileum-Widerstandes, jedoch nicht gegenüber Kontrollen.

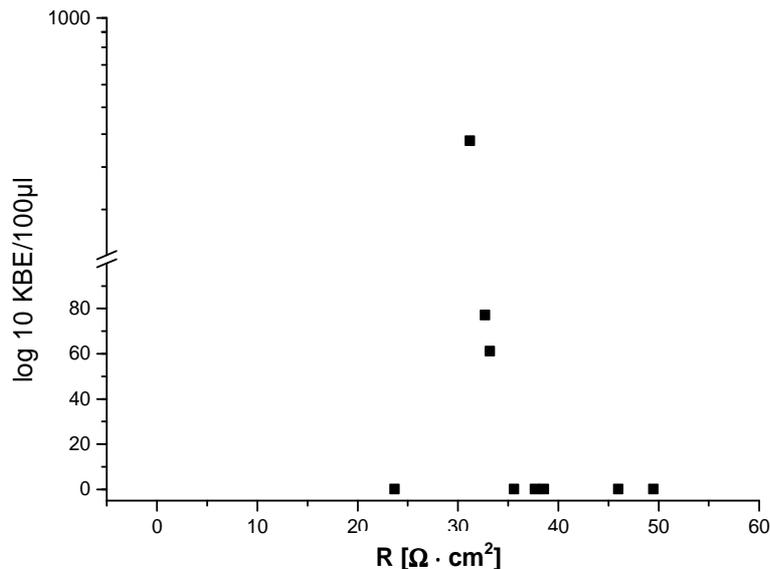


**Abbildung 18** Widerstände der Epithelien für das terminale Ileum (\*  $p < 0,05$  vs. Ileum M. Crohn).

### 3.3.1.3. Korrelation von Permeation und Widerstand

**Abbildung 19** zeigt keinen Zusammenhang zwischen bakterieller Permeation und Widerstand des Epithels. Die Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) sind nach 180 Minuten gegen den gemittelten Widerstand des Epithels der letzten 60 Minuten des Versuchs aufgetragen.

Es gibt keine Korrelation zwischen der Zahl der serosal nachgewiesenen Bakterien und den gemessenen elektrischen Widerständen ( $r = -0,314$  bei Colitis ulcerosa und  $r = 0,138$  bei M. Crohn)



**Abbildung 19** Relation von serosalseitigen Kolonie bildenden Einheiten und totalem Gewebewiderstand des terminalen Ileum bei Colitis ulcerosa ( $r = -0,314$ ,  $p = 0,411$ ).

### 3.3.1.4. Histologie

Die Colitis ulcerosa Präparate wurden histologisch nach der Truelove Klassifikation eingeteilt. Diese zeigten, dass von neun untersuchten Ileum Epithelien, in einem Fall eine mittelgradige und in den acht anderen Fällen eine schwere chronische Entzündung des Colons (Truelove et al. 1956<sup>140</sup>) besteht. In vier der schwer entzündeten Präparate fand eine Permeation von Bakterien statt. Der CAI „colitis activity index“ nach (Truelove et al. 1956<sup>140</sup>) lag bei den untersuchten Patienten bei  $2,9 \pm 0,8$  Punkten. In Fällen mit schwerer Entzündung kam es zur Permeation. Es bestand jedoch kein statistischer Zusammenhang zwischen Entzündungsgrad und Permeation ( $p=1,00$ ). Die Ileumpräparate wurden nach dem Histologie-Score des pouchitis-disease activity index eingeteilt. Eine Backwashileitis liegt bei einem Index ab vier vor. Vier der untersuchten Ileumpräparate hatten eine Backwashileitis. Ein Patient von den vier Präparaten mit einer

Bacteroides fragilis Permeation wies die Kriterien einer Backwashileitis auf. Eine Korrelation konnte nicht nachgewiesen werden.

### **3.3.1.5. Praeoperative Therapie**

#### **3.3.1.5.1. Cortison**

Sieben von neun Patienten erhielten in der Colitis ulcerosa Gruppe systemisch Prednisolon. Bei allen Patienten mit Permeation bestand eine Cortisonmedikation. Aufgrund der Inhomogenität der Gruppe ergab sich jedoch kein Zusammenhang zwischen Permeation und Prednisolon-Medikation.

#### **3.3.1.5.2. Antibiotika**

Zwei von neun Patienten mit Colitis ulcerosa erhielten präoperativ 3x2 g Mezlocillin und 2x500 mg Metronidazol je über fünf Tage. Keine Permeation fand bei diesen Patienten statt.

#### **3.3.1.5.3. Totale parenterale Ernährung**

Ein Patient in der Colitis ulcerosa Gruppe wurde präoperativ parenteral ernährt. Kein Zusammenhang ergab sich zwischen parenteraler Ernährung und bakterieller Permeation.

#### **3.3.1.5.4. Postoperative septische Komplikationen**

Zwei von neun Patienten entwickelten postoperativ einen Bauchdeckenabszess. Eine bakterielle Permeation konnte nicht nachgewiesen werden.

**3.3.2.**  
**3.3.2.1.**

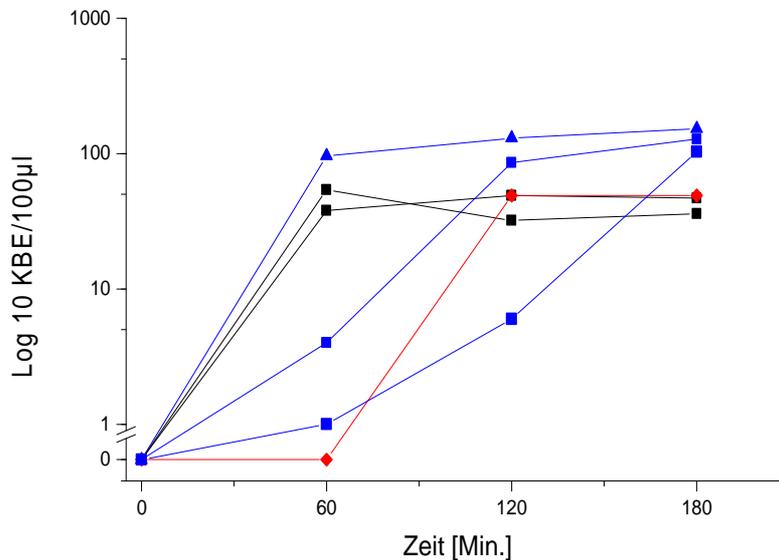
**Colon**  
**Permeation Bacteroides fragilis**

Zwei von elf Patienten bei der Colitis ucerosa-Gruppe zeigten eine bakterielle Permeation.  
**(Tabelle 18).**

<b>Colon</b>	Zahl der Versuche (n)	Permeation	Permeation (%)
Kontrolle	16	1	6,2
M. Crohn	13	3	23,1
<b>Colitis ulcerosa</b>	<b>11</b>	<b>2</b>	<b>18,2</b>

**Tabelle 18** Häufigkeit der bakteriellen Permeation von Bacteroides fragilis und die Verteilung der Colon-Präparate auf die verschiedenen Gruppen.

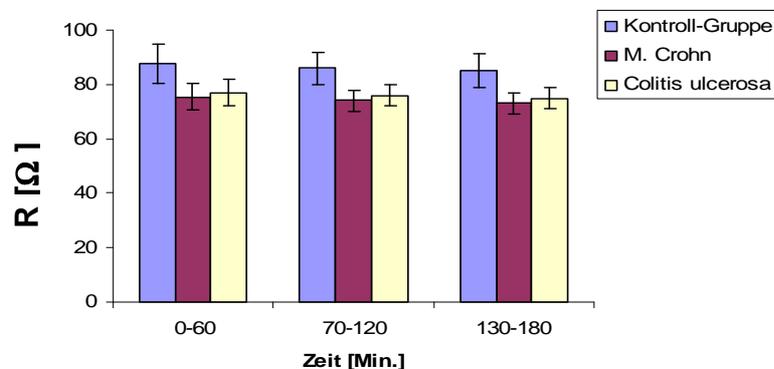
**Abbildung 20** zeigt die Dynamik der Permeation und die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten nach 0, 60, 120 und 180 Minuten im Vergleich zu M. Crohn und Kontrollen für die Colitis ulcerosa Epithelien, die eine bakterielle Permeation aufwiesen.



**Abbildung 20** Verlauf des Bakterienzuwachses im Zeitverlauf (Kolonie bildenden Einheiten, 10er logarithmisch aufgetragen: Colitis ulcerosa – schwarze Linie, M.Crohn – blaue Linie, Kontrolle – rote Linie).

### 3.3.2.2. Elektrischer Widerstand der Epithelien

**Abbildung 21** zeigt die Widerstände der Colon-Präparate im Rahmen der Bacteroides fragilis-Permeationsversuche. Keine Unterschiede wurden zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt. Vom Versuchsbeginn bis 180 Minuten nach Versuchsbeginn betrug die Widerstandsabnahme ( $\Delta R^t$ ) bei Colitis ulcerosa:  $\Delta R^t$ :  $4,3 \pm 2,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .



**Abbildung 21** Verlauf des elektrischen Widerstandes über die Zeit bei Kontrollen, Colitis ulcerosa und M. Crohn.

### 3.3.2.3. Korrelation von Permeation und Widerstand

Abbildung 22 zeigt die in Korrelation zur Anzahl der serosalseitigen Koloniebildenden Einheiten nach 180 Minuten die totalen Widerstände ( $R^t$ ). Keine Unterschiede bestanden zwischen den einzelnen Gruppen.

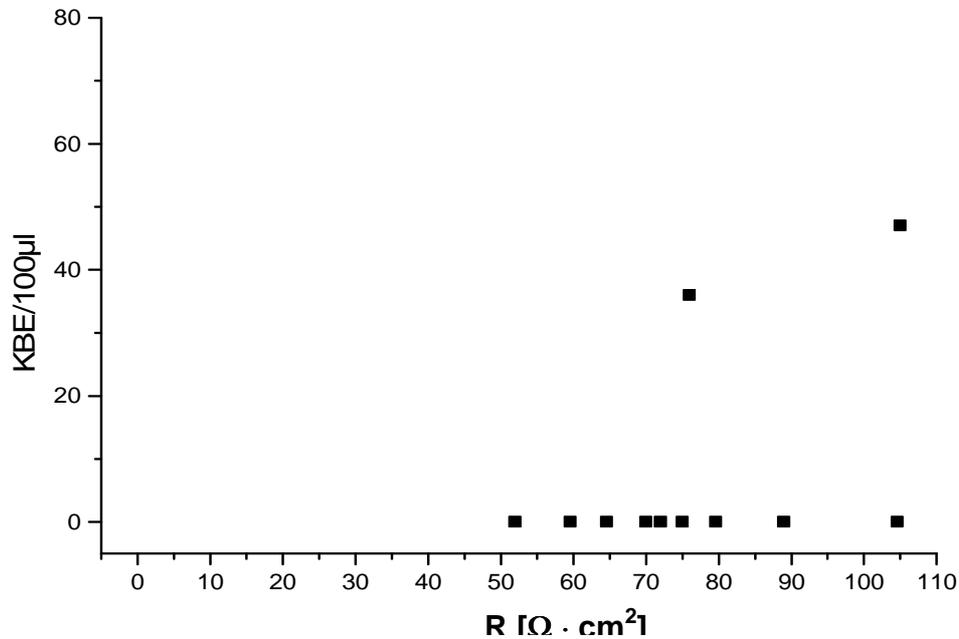


Abbildung 22 Relation von serosalseitigen Kolonie bildenden Einheiten und totalen Gewebewiderstand des Colon ascendens bei Colitis ulcerosa. ( $r=0,445$ ,  $p=0,17$ ).

### 3.3.2.4. Histologie

Angelehnt an die histologische Truelove Klassifikation zeigen die Colitis ulcerosa untersuchten Colon ascendens Epithelien der Patienten, 1/9 mittelgradige und in 8/9 Fällen eine schwere chronische Entzündung des Colons (Truelove et al. 1956<sup>140</sup>). Eine Permeation von Bakterien wurde in 2/8 schwer entzündeten Präparate beobachtet. Der CAI lag bei den untersuchten Patienten bei  $2,9 \pm 0,5$  Punkten. In allen vier Fällen mit schwerer Entzündung kam es zur Permeation. Dennoch bestand kein statistischer Zusammenhang zwischen Permeation und Entzündungsgrad ( $p=1,00$ ).

### **3.3.2.5. Praeoperative Therapie**

#### **3.3.2.5.1. Cortison**

Im Patiententeil bereits ausgeführt erhielten neun von elf Patienten in der Colitis ulcerosa-Gruppe eine intravenöse Prednisolon Gabe. Eine Cortisonmedikation bestand bei allen bakteriellen Permeationen. Es ergibt sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen Permeation und Prednisolon Gabe.

#### **3.3.2.5.2. Antibiotika**

Alle neun Patienten der Colon Epithel Gruppe, erhielten als perioperative prophylaktische Antibiotika-Therapie 2g Mezlocillin und 500mg Metronidazol.

Zwei der Patienten mit Colitis ulcerosa waren präoperativ mit 3x2 g Mezlocillin und 2x500 mg Metronidazol je über fünf Tage behandelt worden. Bei einem Patienten fand eine bakterielle Permeation statt. Auch hier liess sich keine Korrelation feststellen.

#### **3.3.2.5.3. Totale parenterale Ernährung**

Zwei Patienten wurden präoperativ parenteral ernährt. Keine bakterielle Permeation fand statt.

#### **3.3.2.5.4. Postoperative septische Komplikationen**

Zwei Patienten entwickelten im postoperativen Verlauf einen Bauchdeckenabszess. Bei einem dieser Fälle, war in vitro eine bakterielle Permeation zu beobachten. Es ließ sich keine Korrelation feststellen.

## **4**

### **Diskussion**

#### **4.1.1**

#### **Herleitung der Hypothese**

Es zeigte sich, dass *Bacteroides fragiles* eine wichtige Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spielt. Um die Rolle der Permeation entlang der Schlussleisten genauer zu untersuchen, führten wir die vorliegende Arbeit durch.

#### **4.1.2**

#### **Methode**

Zur Klärung der noch unklaren Pathogenese und Pathomechanismen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden eine Reihe von Kolitis-Tiermodellen etabliert, die durch toxische Schädigung des Darms und genetische oder immunologische Manipulationen die humane chronisch entzündliche Darmerkrankungen imitieren. Als Vorteil dieser Methode gilt, dass Tiermodelle besser reproduzierbar sind. Hiermit ist es möglich, selektiv bestimmte Aspekte der Erkrankung oder ihrer Pathogenese zu untersuchen. Ein Nachteil ist, dass keines dieser Modelle vollständig dem Bild einer der beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entspricht. Zudem ist die Übertragbarkeit der im Tierversuch nachgewiesenen physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhänge auf den Menschen aufgrund von unterschiedlichen Spezies-Eigenschaften umstritten.

Durch die Methode in der vorliegenden Arbeit, die die Untersuchung der bakteriellen Permeation durch menschliche Epithelien erlaubt, ist es möglich den bakteriellen Durchtritt bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen direkt am Darmepithel eines erkrankten Menschen nachzuweisen. Das Ziel war hierbei eine Methode zu etablieren, anhand derer sich die bakterielle Permeation durch menschliches Darmepithel ex vivo einfach und direkt nachweisen lässt. Unter der Vorstellung, dass das intakte Darmepithel eine wirksame Barriere gegenüber Bakterien darstellt, wurden die Versuche mit der Ussingkammer durchgeführt. Ausgangspunkt war die Annahme, dass das entzündete Darmepithel bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Barrieredefekte aufweist und durchlässig für Bakterien ist. Die hierbei verwendete Methode bietet die Grundlage weiterführender Untersuchungen über die Mechanismen und begünstigenden Faktoren der bakteriellen Permeation bei Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und anderen entzündlichen und nicht entzündlichen Darmerkrankungen, die mit einer Barriestörung einhergehen könnten. Ein solches Modell würde die Möglichkeit bieten, die These eines erhöhten bakteriellen Durchtritts bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu verifizieren. Darüber hinaus wäre es denkbar, es weiterführend dazu zu verwenden den Einfluss verschiedener Substanzen, wie z.B. Medikamente auf die Durchlässigkeit sowie den Metabolismus auf das entzündete Epithel für Bakterien zu untersuchen.

### 4.1.3

### Indirekter / Direkter Nachweis der bakteriellen Translokation

Bisher erbrachten alle bisherigen Arbeiten nur indirekt den Nachweis der bakteriellen Translokation, d.h. den Durchtritt von Bakterien aus dem Darmlumen in extraintestinale, physiologischerweise sterile Kompartimente beim Menschen. Der Translokationsprozess liess sich bisher durch den Nachweis lebender Bakterien in den verschiedenen Organen feststellen. Um die Prävalenz der bakteriellen Translokation zu untersuchen, wurde von 42 Patienten mit Morbus Crohn, die aus den unterschiedlichen Gründen laparotomiert wurden, Gewebeproben aus dem Blut- und mesenterialen Lymphknoten entnommen und mikrobiologisch untersucht. Eine bakterielle Translokation wurde bei 20 Patienten in mesenterialen Lymphknoten = 48 Prozent nachgewiesen. Die Blutkulturen waren in zwei von 20 Patienten positiv (Takesue et al. 2002<sup>137</sup>). In einer nachfolgenden Studie von Laffineur et al. 1992<sup>66</sup> wurden mesenteriale Lymphknoten, Pfortaderblut und Peritonealabstriche von 28 Patienten mit M. Crohn untersucht. Die Häufigkeit der bakteriellen Translokation betrug hier 29 % (Laffineur et al. 1992<sup>66</sup>). Ambrose et al 1984<sup>6</sup> verglichen Serosaproben und mesenteriale Lymphknoten von 46 Patienten mit M. Crohn und 43 anderen Patienten. Hier wurden Bakterien in den mesenterialen Lymphknoten von 33 % der Patienten mit M. Crohn und von 5 % der Kontrollpatienten nachgewiesen. Nach dem gleichen Prinzip wurden Tiere untersucht. In diesen Modellen wurden verschiedene physiologische und anatomische Veränderungen induziert, um Bedingungen zu schaffen, unter denen eine bakterielle Translokation stattfand. Bei Untersuchungen mit acht Ratten, die mittels rektaler Applikation von 2,4,6-Trinitrobenzenesulfon Säure (TNBS) eine induzierte akute Colitis aufwiesen, fand man in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad der Erkrankung eine potentielle Zunahme von gramnegativen aerob wachsenden Bakterien. Eine zusätzliche mikrobiologische Untersuchung von mesenterialen Lymphknoten, Milz und Leber ergab eine erhöhte bakterielle Translokation in den Colitisratten. Bei den Kontrolltieren wurden keine Bakterien in den untersuchten Geweben gefunden (Gardiner et al. 1993<sup>39</sup>). Potentiell pathogene Bakterien wurden in operativ entommener Serosa vom Ileum und in den mesenterialen Lymphknoten von Morbus Crohn nachgewiesen. Diesen Bakteriendurchtritt könnte man als Ursache für die Entstehung von Abszessen und Fisteln bei Morbus Crohn betrachten (Ambrose et al. 1984<sup>6</sup>). Die beschriebenen Arbeiten zum Nachweis der bakteriellen Translokation zeigten, dass darmständige Bakterien in umliegendes Gewebe eindringen konnten. Dieses Phänomen, das von der Entzündung der Darmschleimhaut abhing, konnte in seiner Häufigkeit variieren. Allerdings erbrachten die Autoren nur einen indirekten Permeationsnachweis. Die direkte Passage durch die Mucosa wurde nicht nachgewiesen. Die Inzidenz von Erkrankungen, die im Zusammenhang mit der

intestinalen Flora des menschlichen Organismus als Wirt stehen, ist steigend. Hierfür werden: die Zusammensetzung, intestinale Adhärenzfaktoren, bakterielle Translokationen und Immunmodulationen verantwortlich gemacht (Dunne et al. 2001<sup>30</sup>). Für den direkten Nachweis der bakteriellen Permeation über Darmepithelien ex vivo bietet das Ussingkammermodell eine ideale Methode. Es erlaubt im Gegensatz zu den in vivo-Modellen eine direkte Untersuchung der mukosalen Barrierefunktion in isolierten Darmsegmenten unabhängig von Einflüssen systemischer Immunfaktoren oder bakterieller Überwucherung. Durch kontinuierliche Messung der elektrophysiologischen Parameter kann die Viabilität des Epithels im Versuch beurteilt und Permeabilitätsveränderungen gemessen werden. Der Übertritt ausgewählter Substanzen kann untersucht werden, indem die Substanz auf der mucosalen Seite des Epithels in die Kammer gegeben und nachfolgend ihre Konzentration auf der serosalen Seite bestimmt wird. Der Übertritt von Bakterien durch das Epithel kann so qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Vorausgesetzt, dass die zugegebenen Bakterien sicher von der residenten Flora unterschieden werden können. Die Ussingkammer ist ein sinnvolles Modell um am Epithel die Mechanismen der bakteriellen Translokation zu untersuchen. 1998 etablierten Kurkchubasche, et al.<sup>64</sup> diese Methode im Tierversuch unter Verwendung eines apathogenen streptomycinresistenten Stammes *E. coli* C-25 zur Untersuchung der bakteriellen Permeation im Dünndarm neugeborener Ferkel. Mit dem gleichen Bakterienstamm erfolgten verschiedene Studien zum Durchtritt von Bakterien im Ileum von Ratten und Kaninchen. Die Identifizierung der auf die serosale Seite übergetretenen Bakterien gelang mittels Anzucht auf streptomycinhaltigen Agar und Auszählung der Kolonie bildenden Einheiten. In einem Versuch mit Clonidin zur Reduktion der die Mukosa bedeckenden Mucinschicht, mit dem Ziel die intestinale mukosale Barriere so zu verändern, dass es zu einer verstärkten bakteriellen Translokation kommt, verwendete Maxson et al. *E. coli* K-100 für Durchtrittsversuche im Rattendünndarm und differenzierte die in der serosalen Badlösung kultivierten Bakterienkolonien mit K100-Antigen im Latexagglutinationstest (Maxson et al. 1994<sup>73</sup>). In einer Studie über den Einfluß der Schädigung von Endotoxin an der gastrointestinalen Barriere durch Erhöhung von Stickstoffmonoxid, wird der Einfluß von einem Stickstoffmonoxidfänger (Dithiocarbamatederivate) mit fluoreszenzmarkierte *E. coli*, die sie mittels Durchflusszytometrie quantifizierten von Dickinson et al. 1999<sup>26</sup> durchgeführt. Der bakteriellen Durchtritt ex vivo im Colon wurde erstmalig von Scheppach et al. in einer Studie über den Effekt von L-Glutamin und n-Butyrat auf die Dickdarmschleimhaut an Ratten untersucht (Scheppach et al. 1996<sup>115</sup>). Sie verwendeten dazu einen Ampicillin resistenten enteropathogenen *E. coli* 11-1 Serotyp 0111:H- und identifizierten die Kolonien des serosalen Ausstrichs mittels Agglutinationstest mit *E. coli*

0111-Antiserum und PCR. Es konnte gezeigt werden, dass luminal und serosal zugegebenes Glutamin die Gewebe-Conductance, Mannitol- und Lactulose-Permeabilität und die Permeation von *Escherichia coli* reduziert. Durch Butyrat konnte dieser Effekt nicht erzielt werden. Unter der Annahme, dass Endotoxine die bakterielle Translokation triggern, untersuchte Mayer et al. 1998<sup>74</sup> die Permeation des Ampicillinresistenten *E. coli* HB101:K12 im Rattendickdarm in einer modifizierten Ussingkammer unter der selektiven extramuralen Zugabe von Endotoxinen. Isenmann et al. zeigte 2000<sup>53</sup>, dass unter der Zugabe einer Kombination von Gentamycin und Penicillin G eine ausreichende Dekontamination der Darmflora von Ratten erreichen konnten, um selektiv die Durchgängigkeit mit der Ussing Kammer von *Enterococcus faecalis* zu untersuchen. Es zeigte sich eine höhere in-vitro-Permeationsrate im Ratten-Colon von *Enterococcus faecalis* mit Aggregationssubstanzen als bei *Enterococcus faecalis* ohne Aggregationssubstanzen. Eine totale parenterale Ernährung führt im Vergleich zu einer elementaren Ernährung zu einer erhöhten bakteriellen Permeationsrate im Colon bei Ratten (Mosenthal et al. 2002<sup>80</sup>). Mishima et al. 1999<sup>77</sup> zeigte das Lipopolysaccharid als Zellwandbestandteil von *E. coli* eine verstärkte Aktivität der Nitrit Oxid Synthetase auslöst. Gemessen an der erhöhten Nitrit Oxid Synthetase Aktivität wurde eine verstärkte Permeation in der Mukosa vom Ileum in der Ussingkammer gemessen. Die bisher erwähnten Arbeiten zum Nachweis der bakteriellen Translokation zeigten, dass darmständige Bakterien in Abhängigkeit von bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel Entzündungsgrad, in das umliegende Gewebe eindringen können. Das Translokationsergebnis wurde jedoch nur indirekt nachgewiesen, d.h. die Bakterien wurden als Ergebnis der Translokation im entsprechenden Gewebe erfasst. Oder im Tierversuch mit der Ussingkammer als direkter Permeationsnachweis. Der einzige bisherige direkte Nachweis der bakteriellen Permeation beim Menschen ex - vivo wurde mit *E. coli* in der Arbeit von Becker et al. 2003<sup>9</sup> beschrieben. In dieser als auch in meiner Arbeit erfolgte der direkte Nachweis der bakteriellen Permeation durch Darmepithelien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ex vivo mit der Ussing Kammer. Es erlaubt im Gegensatz zu den in vivo- Modellen eine direkte Untersuchung der mukosalen Barrierefunktion an isolierten Darmsegmenten. Durch die kontinuierliche Messung der elektrophysiologischen Parameter konnte die Viabilität des Epithels im Versuch beurteilt werden und Permeabilitätsveränderungen gemessen werden. Der Durchtritt von Bakterien durch das Epithel wurde untersucht, indem eine bestimmte Anzahl von Bakterien mukosal in die Versuchslösung hinzugegeben wurde und nachfolgend die Konzentration auf der serosalen Seite bestimmt wurde. Der isolierte Durchtritt von *Bacteroides fragilis* konnte somit qualitativ und quantitativ untersucht werden. Die Schwierigkeit dieser Studie war *Bacteroides fragilis* isoliert nachzuweisen. Dafür wurde eine

Badlösung mit Kanamycin , Vancomycin , Ampicillin und Sulbactam resistenten *Bacteroides fragiles* gewählt. Die physiologische Besiedlung der untersuchten Darmschleimhaut wurde somit eradiziert. Die Identifizierung der auf der serosalen Seite durchgetretenen Bakterien erfolgte mittels Anzucht auf Kanamycin, Vancomycin, Ampicillin und Sulbactam haltigen Agar. Somit konnte die bakterielle Translokation von *Bacteroides fragiles* quantitativ und qualitativ beim Menschen ex vivo nachgewiesen werden.

#### **4.1.4. Bakterielle Translokation beim Menschen**

In allen bisher veröffentlichten Studien wurde der bakteriellen Durchtritt in der Ussingkammer bisher nur an Tiermodellen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals beim Menschen die bakterielle Permeation isoliert mit *Bacteroides fragiles* ex vivo nachgewiesen .

#### **4.1.5. Schädigung der Darmschleimhaut durch enterotoxinbildenden *Bacteroides fragilis* als obligater Anaerobier der intestinalen Mikroflora**

Die Schleimhautoberfläche des Menschen, inklusive des Magen –Darm-Traktes, der Atemwege und des Urogenitaltraktes beträgt etwa 400 m<sup>2</sup>. Ein grosser Teil der Schleimhautoberfläche ist mit einer normalen bakteriellen Flora besiedelt. Die Oberfläche des Magen-Darm-Traktes beträgt etwa 300 m<sup>2</sup>. Der Darm enthält mit über 400 Bakterienspezies und Subspezies, insgesamt etwa 10<sup>12</sup> - 10<sup>13</sup> Bakterien pro Gramm Darminhalt, die grösste Anzahl der bakteriellen Population im menschlichen Körper. Die Gesamtzahl von Bakterien pro Mensch beträgt etwa 10<sup>14</sup>, d. h es kommen 10 Bakterien auf eine menschliche Zelle (der Mensch besteht aus etwa 10<sup>13</sup> Zellen). Obligate Anaerobier, insbesondere *Bacteroides* Arten, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* oder *Clostridienspezies* machen mit 99 % einen wesentlichen Bestandteil der intestinalen Mikroflora des menschlichen Organismus aus. Die Zusammensetzung der Darmflora ist abhängig von verschiedenen Wirtsfaktoren, wie zum Beispiel dem Alter und dem Ernährungszustand. Eine faserreiche oder vegetarische Kost begünstigt die Kolonisierung mit Aerobiern, wie *E.coli* wohingegen eine fleischreiche Kost die Kolonisierung mit anaeroben Bakterien begünstigt (Sonneborn et al. 1991<sup>129</sup>). (Kryzanowski et al. 2003<sup>63</sup>). Darmorganismen sind vor allem an einer Vielzahl von metabolischen Prozessen beteiligt. Sie bilden vorwiegend Bernsteinsäure, neben geringen Mengen von Essig-, Propion-, Isobutter-, Butter- und Isovalerinsäure. Neben den metabolischen Aktivitäten haben *Bacteroides* und andere Anaerobier eine zusätzliche Rolle bei

der Abwehr von pathogenen Organismen (Van der Waaij et al.1971<sup>144</sup>). Ein wesentlicher Abwehrfaktor besteht darin, das Bacteroides auf der mit einer Mucinschicht bedeckten Oberfläche von Darmepithelzellen überzieht und adhärent wird, so dass weitere transiente mikrobielle Organismen an der Adhärenz der Darmepithelzellschicht behindert werden. Die Darmperistaltik befördert dann die transiente Darmflora weiter nach aboral, so dass der Kontakt zur jeweiligen Darmepithelzellschicht verloren geht (Croucher et al.1983<sup>23</sup>). 81 % der anaeroben klinischen Infektionen werden durch Bacteroides fragiles verursacht, wobei er nicht direkt invasiv ist sondern indirekt, wenn es zu einer Unterbrechung der Mukosawand kommt, wie u.a bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bei intraabdominellen Infektionen (Sheehan et al. 1989<sup>124</sup>). Wesentliche Virulenzfaktoren bei den anaeroben nichtsporenbildenden Bakterien sind Adhäsine, Kapselpolysaccharide, Endotoxine sowie Succinat und Superoxiddismutase, die vor der Wirkung von Phagozyten schützen. Als sezernierendes Enzym spielt bei der Gewebszerstörung das Exotoxin „Fragilysin“ eine Rolle. Die meisten Lipopolysaccharide in der Aussenmembran der Bakterien führen zu einer Stimulation der humoralen Zellabwehr „Antikörper Immunantwort“, wobei Bacteroides zu einer T-Zell vermittelten Immunantwort führt (Onderdonk et al.1982<sup>91</sup>). Eine Studie von Rokos et al. 1999 zeigte die adhäsiven Eigenschaften des Endotoxins, indem er nachweist das die Lipopolysaccharide vom Bacteroides fragiles die Expression von Adhäsionsmolekülen ICAM-1, VCAM-1 und E- Selectin stimulieren (Rokosz et al. 1999a<sup>99</sup>, Rokosz et al. 1999b<sup>100</sup>, Rokosz et al. 2002<sup>102</sup>). Dies führt wiederum zu einer Aktivierung und somit Unterstützung der Zytokinproduktion im Rahmen der Immunregulation von T Helferzellen. Zusätzlich werden die T-Zellen über das Exotoxin „Fragilysin“, das über die Zerspaltung des interzellulären Proteins zu einer Veränderung des Zytoskelettes führen kann. G und F Actin sind Eiweißkörper des Proteoplasmas =Actinfilament, die die Zelle durchspannen und bestimmend für die Zellform sind. G- Actin ist ein Monomer, aus dem durch Selbstaggregation fibrilläre Proteinmoleküle = F- Actin = Actinfilamente entstehen (Saidi et al.1997<sup>108</sup>). BFT ist das erste bakterielle Toxin, das in der Lage ist extrazellulär das Zytoskelett, F-Actinfilamente über eine Spaltung von Zelloberflächenmoleküle zu verändern (Lerm et al. 2000<sup>68</sup>). Enterotoxinbildender Bacteroides fragiles ist mehr an verschiedenen Infektionen beteiligt, als ein nicht enterotoxinbildene Bacteroides fragiles (Kato et al.1996<sup>57</sup>). Es ist möglich, dass das Fragilysin in der Lage ist, Organismen von einem Infektionsherd zu lösen und somit eine Dissemination im Körper zu unterhalten. Das Enterotoxin, das Fragilysin zeichnet sich u.a. dadurch aus, dass es in der Lage ist Epithelzellverbände aufzulösen. Bislang wurden drei Isotypen (BFT -1, BFT -2 und das Korea BFT) dieses Toxins identifiziert. Alle drei Stränge werden auf unterschiedlichen BFT Loci auf

Chromosom 6 kB, von enterotoxinbildenden *Bacteroides* Stämmen codiert (Sears et al. 2001<sup>119</sup>). 1999 wurde das dritte Toxin „Korea BFT“, von Chung et al. 1999<sup>20</sup> gefunden. Alle drei Toxine sind verschiedene Proteine mit gleicher biologischer Aktivität, aber unterschiedlicher Potenz (Shaoguang et al. 1998<sup>123</sup>). Weiterführende Studien zeigten bezüglich der Potenz folgende Unterschiede: BFT 2 > BFT 1 > BFT 3. BFT verändert die zelluläre Morphologie und Physiologie, wenn es vor allem auf der basolateralen Membran der Epithelzellen lokalisiert ist (Wu S et al. 1998<sup>148</sup>). Allen drei Enterotoxinen gemeinsam ist, dass sie ein Protein der extrazellulären Domäne der Zonula adherens, das „E – Cadherin“, zerspalten können (Wu S et al. 1998<sup>149</sup>). Sears zeigte, dass das zelluläre Ziel für BFT das E-Cadherin ist. Es bewirkt eine Veränderung der zellulären Morphologie in Epithelzellen (Sears et al. 2001<sup>119</sup>). Alle diese Veränderungen finden nach drei Stunden Versuchsdauer, nach der Zugabe von dem Enterotoxin „BFT“ statt (Donelli et al. 1996<sup>27</sup>). Enterotoxin bildender *Bacteroides fragilis* ist mit der akuten Diarrhö und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert. Prindiville et al. entdeckte, dass bei 13 % von 83 Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa das Enterotoxin in deren Fäzes, wobei in der aktiv entzündlichen Phase 19.3 % positiv waren und im nicht entzündlichen Schub kein Enterotoxin nachgewiesen worden ist (Prindiville et al. 2000<sup>94</sup>). Es kommt zu einer reversiblen Stimulation der Chlorid Sekretion und zu einer Veränderung der Tight junction Funktion in polarisierten intestinalen Epithelzellen. Riegler et al. 1999<sup>97</sup> zeigten, dass das BFT die Colon Darmepithelzellen schädigt und es somit zu einer Abnahme des totalen Widerstandes und zu einer erhöhten Permeabilität des Darmepithels kommt. Enterotoxin produzierender *Bacteroides fragilis* wurde erstmals in einer epidemiologischen Studie über Diarrhö bei einer Lammherde beschrieben (Obiso et al. 1995<sup>88</sup>, Sears et al. 1995<sup>120</sup>). Seit 1984 ist bekannt, dass das Enterotoxin von *Bacteroides fragilis* Stämmen mit Diarrhö bei Tieren und Menschen assoziiert wird (Shaoguang et al. 1998<sup>123</sup>). Dieser enterotoxinbildende *Bacteroides* Typ produziert als Virulenzfaktor, eine 20 kDa Zink Metalloprotease „Fragilysin“ (Abk. BFT) ein extrazelluläres Toxin, deren Hauptangriffspunkt das E-Cadherin der Zonula adherens zu sein scheint. E-Cadherin ist ein wichtiger Bestandteil der Zonula adherens, eine Verbindung zwischen Nachbarzellen. Sie bestehen aus einer intra- und extrazellulären Komponente. Über die extrazelluläre Komponente eines Cadherins wird zu der Nachbarzelle eine Verbindung zur extrazellulären Domäne des nächsten Cadherins hergestellt. Nach Toxinzugabe kommt es innerhalb von einer Minute zu einer Zerstörung der Tight junction (Shaoguang et al. 1998<sup>123</sup>). Zusätzlich hat die Metalloprotease die Fähigkeit, Actin, Tropomyosin, Gelatin und Fibrinogen zu hydrolysieren. Diese Metalloprotease (Abkürzung MMP- hier: M10 C) gehört zur Familie der Metzincin Superfamilie (Moncrief et al. 1995<sup>78</sup>). Diese Enzymgruppe wird von ca. 10 % von

*Bacteroides fragiles* produziert. Eine Gruppe von proteolytisch wirksamen Enzymen, die sich aus Methioninresiduen (Donelli et al.1996<sup>27</sup>) mit einer katalytischen Einheit, die sich aus drei Histidinresten als Liganden mit einem zentralen katalytischen wesentlichen Zinkion als aktive Bindungsstelle und Glutamat als Basis zusammensetzen und im extrazellulären Milieu mit neutralen pH arbeiten (Stocker et al.1995<sup>132</sup>). Optimale proteolytische Aktivität findet bei 37° und einem pH Wert von 6.5 statt. Für eine volle Funktionsfähigkeit benötigen sie extrinsische Kalzium Ionen. Sie befinden sich an der Zelloberfläche. Saidi et al. zeigte in einem Versuch mit HT29 veränderten intestinalen Epithelzellen, dass BFT durch die Hydrolysefähigkeit von G- und F Actin zu einer Veränderung des Zytoskelettes führen kann. G und F Actin sind Eiweißkörper des Proteoplasmas =Actinfilament, die die Zelle durchspannen und bestimmend für die Zellform sind. G- Actin ist ein Monomer, aus dem durch Selbstaggregation fibrilläre Proteinmoleküle = F-Actin = Actinfilamente entstehen (Saidi et al.1997<sup>108</sup>). BFT ist das erste bakterielle Toxin, das in der Lage ist extrazellulär das Zytoskelett, F-Actinfilamente über eine Spaltung von Zelloberflächenmoleküle zu verändern (Lerm et al. 2000<sup>68</sup>). Enterotoxinbildener *Bacteroides fragiles* ist mehr an verschiedenen Infektionen beteiligt, als ein nicht enterotoxinbildene *Bacteroides fragiles* (Kato et al.1996<sup>57</sup>). Es ist möglich, dass das Fragilysin in der Lage ist, Organismen von einem Infektionsherd zu lösen und somit eine Dissemination im Körper zu unterhalten. Das Enterotoxin, das Fragilysin zeichnet sich u.a. dadurch aus, dass es in der Lage ist Epithelzellverbände aufzulösen. Bislang wurden drei Isotypen (BFT -1, BFT -2 und das Korea BFT) dieses Toxins identifiziert. Alle drei Stränge werden auf unterschiedlichen BFT Loci auf Chromsomsom sechs kB, von enterotoxinbildenen *Bacteroides* Stämmen codiert (Sears et al.2001<sup>118</sup>). 1999 wurde das dritte Toxin „Korea BFT „, von Chung et al. 1999<sup>20</sup> gefunden. Alle drei Toxine sind verschiedene Proteine mit gleicher biologischer Aktivität, aber unterschiedlicher Potenz (Shaoguang et al. 1998<sup>122</sup>). Weiterführende Studien zeigten bezüglich der Potenz folgende Unterschiede: BFT 2 > BFT 1> BFT 3. BFT verändert die Epithelzellen lokalisiert ist (Wu S et al. 1998<sup>148</sup>). Allen drei Entertoxinen gemeinsam ist, das sie ein Protein der extrazellulären Domäne der Zonula adherens, das „E – Cadherin „zerspalten können (Wu S et al. 1998<sup>148</sup>). Sears zeigte, dass das zelluläre Ziel für BFT das E-Cadherin ist. Es bewirkt eine Veränderung der zellulären Morphologie in Epithelzellen (Sears et al. 2001<sup>119</sup>). Alle diese Veränderungen finden nach drei Stunden Versuchsdauer, nach der Zugabe von dem Enterotoxin „BFT“ statt (Donelli et al.1996<sup>27</sup>). Enterotoxin bildener *Bacteroides fragiles* ist mit der akuten Diarrhö und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert. Prindiville et al. entdeckte, das bei 13 % von 83 Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa das Enterotoxin in deren Fäzes, wobei in der aktiv entzündlichen Phase 19.3 % positiv waren und im nicht entzündlichen

Schub kein Enterotoxin nachgewiesen worden ist (Prindville et al.2000<sup>94</sup>). Es kommt zu einer reversiblen Stimulation der Chlorid Sekretion und zu einer Veränderung der Tight junction Funktion in polarisierten intestinalen Epithelzellen. Riegler et al. 1999<sup>97</sup> zeigten, dass das BFT die Colon Darmepithelzellen schädigt und es somit zu einer Abnahme des totalen Widerstandes und zu einer erhöhten Permeabilität des Darmepithels kommt.

#### **4.1.6. Selektion eines Ampicillinresistenten resistenten Bacteroides fragiles**

Ein Problem war, dass humane Darmresektate durch die physiologische Darmflora immer bakteriell kontaminiert sind. Daher ist die Differenzierung des experimentell hinzugefügten Bacteroides fragiles von der residenten Flora schwierig. Hierzu wurde eine enterotoxinbildender Bacteroides fragiles Wildstamm verwendet, dessen entscheidender Vorteil in seiner Ampicillin-Resistenz besteht. Die Besonderheit von Ampicillin in Kombination mit Sulbactam gegenüber den anderen Antibiotika liegt hier in seinem breiten Wirkungsspektrum gegen gramnegative und grampositive Bakterien. Die Antibiotikaresistenz von Bacteroides fragiles bietet ein nahezu sicheres Unterscheidungsmerkmal zwischen Versuchsbakterien und „kontaminierenden“ Darmbakterien. Dadurch wird eine einfache Bestimmung der Bakterienzahl mit geringem technischem Aufwand ermöglicht. Von den insgesamt 60 ausgewerteten Versuchen mussten vier Versuche, die vor Versuchsbeginn Bakterienwachstum auf den Platten nachwiesen, ausgeschlossen werden. Durch Zugabe von Ampicillin in Kombination mit Sulbactam in der Badlösung und Agar konnte erreicht werden kann, dass auf den Agarplatten ausschliesslich der im Versuch zugegebene Enterotoxin produzierende Bacteroides fragiles wachsen und mittels Auszählung einfach und sicher quantifiziert werden kann. Dadurch wird sichergestellt, dass alle im weiteren Verlauf gewachsenen Keime dem zugegebenen resistenten Bacteroides fragiles entsprechen. Die Notwendigkeit einer weiteren Differenzierung, der aus dem Ausstrich gewachsenen Bakterienkolonien entfällt.

#### **4.1.7. Messung des elektrischen Widerstands als Parameter für die Intaktheit des Darmepithels**

Die Intaktheit der menschlichen Epithelien ex vivo in der Ussingkammer wird durch den elektrische Widerstand beschrieben. Er dient als Kontrollparameter bei den nicht entzündeten Epithelien der Kontrollgruppe als auch bei den hochgradig entzündeten Epithelien. Der elektrische Widerstand bleibt im Verlauf der Versuche konstant, d.h. die Überlebenszeit des

Gewebes nach Entnahme kann für die Dauer des Versuchs gewährleistet werden. Es werden ausschliesslich Epithelien untersucht, deren Widerstand zu Versuchsbeginn ausreichend hoch bzw. so stabil ist, so dass ein grösserer Schleimhautdefekt aufgrund der schweren Entzündung ausgeschlossen werden kann. In der Literatur wurde bereits beschrieben, das mit der hier verwendeten Methode das menschliche Darmepithel ex vivo über acht Stunden überlebensfähig ist und darüber hinaus seine aktive Transportfunktion aufrechterhalten bleibt (Epple et al. 1997<sup>33</sup>).

## **4.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1. Permeation von Bacteroides fragiles Permeation im terminales Ileum und Colon bei Morbus Crohn**

Die Ergebnisse meiner Versuchsreihe für das terminale Ileum, zeigten dass eine Permeation von Bacteroides fragilis, durch die Ileum-Mukosa nur in einem von 14 Epithelien zu beobachten ist. Bei der M. Crohn Colon Gruppe kommt es von insgesamt 13 Epithelien dreimal zur Permeation von Bacteroides fragiles. Dabei erreichen weder die Permeationsrate vom Morbus Crohn-Ileum- oder Colonpräparaten, noch im Vergleich zu den Kontrollen das Signifikanz-Niveau. Hinsichtlich der niedrigen Permeationsrate kann man verschiedene Gründe betrachten:

#### **I. Adhärenz von Fragilylin an Adhäsionsproteinen führt zur Veränderung der Epithelbarrierefunktion**

Bei beiden Erkrankungen in den entzündeten Darmabschnitten besteht ein dichtes Infiltrat von Entzündungszellen und aktivierten Immunzellen in der Lamina propria. Das Zellinfiltrat ist nur zu einem geringen Teil durch Zellvermehrung innerhalb der Darmwand entstanden. Die meisten Zellen kommen aus der Blutbahn und binden sich an Adhäsionszellen. Das Endotoxin von Bacteroides fragiles hat sogenannte adhäsive Eigenschaften, es stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin (Rokosz et al.1999a<sup>99</sup>, Rokosz, et al.1999b<sup>100</sup>, Rokosz et al.2002<sup>102</sup>). Diese sogenannte Adhäsionsmoleküle, wie E-Cadherin , ICAM-1 und E-Selectin werden von zirkulierenden Bacteroideszellen benutzt, um sich an die Gefäßinnenwand, das Endothel anzuheften und in das Darmgewebe einzuwandern. Eine Studie von Sears et al. 2001<sup>119</sup> zeigt, dass das zelluläre Target für Fragilylin von Bacteroides fragiles das E- Cadherin, ein Protein von der Zonula adherens ist. Er postuliert, dass die Verbindung zwischen dem Toxin und E-Cadherin eine Veränderung in der Zellmorphologie verursacht,

indem es die Fähigkeit der Polarization und die Formation eines Tight junction Komplex verändert (Sears et al. 2001<sup>119</sup>). Zelladhäsionsmoleküle sitzen einerseits auf den zirkulierenden Zellen selbst, andererseits sind sie als Rezeptoren oder Liganden auf ortsständigen Endothelzellen zu finden. Bis zu sechs Millionen eines einzelnen Adhäsionsmolekültyps können auf einer einzigen Zelle sitzen. Ihr Auftreten auf der Zelloberfläche wird unter anderem durch ortsständige Aktivatorstoffe wie Interleukine und Interferon reguliert. Bei der aktiven Colitis ulcerosa und Morbus Crohn wurden erhöhte freie Konzentrationen von ICAM-1 und E-Selectin nachgewiesen (Patel et al.1995<sup>92</sup>). Die Anheftung zirkulierender Bacteroideszellen an die Innenwand von Darmgefäßen verläuft in mehreren Schritten: Zuerst drängen sich zirkulierende Zellen von der Mitte des Blutstroms in den gefäßwandnahen Randbereich (margination). Dann verlangsamen sie ihre Strömungsgeschwindigkeit (rolling). Einem ersten lockeren Kontakt mit dem Gefäßendothel (tethering) folgt die feste Anbindung (adhesion). Schließlich drängt sich die vormals zirkulierende Zelle zwischen den Endothelzellen in das darunterliegende Gewebe (transendothelial migration). Hier kann sie im Falle von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, an der Entzündungsreaktion und der Antigen-Zerstörung in der Darmwand mitarbeiten. Folglich ist durch die Adhärenz an den Adhäsionsproteinen E-Cadherin und ICAM-1 an den Epithelzellen der Mucosa, Bacteroides fragiles fest mit dem Epithel verbunden (Wu et al.2003<sup>148</sup>). Es kommt zu einer Auflösung der Epithelzellverbände. Die Epithelbarrierefunktion wird vermutlich durch eine Verminderung eines Tight junction proteins, ZO – 1 verändert (Obiso et al.1997<sup>89</sup>) Fragilysin erhöht über die Interaktion mit E-Cadherin die Permeabilität von der parazellulären Barriere von Epithelzellen für Ionen (durch eine Verminderung des elektrischen Widerstandes) und für größere Moleküle (Zunahme des Mannitol Flux). Der in in vivo Vergleich von Darm-, Nieren und Lungenepithel erbrachte für das Darmepithel die höchste Sensitivität. Die Abdichtungen zwischen den Epithelzellen (Tight junction) werden durchlässiger. Es kommt zu einer verstärkten passiven Abgabe von Flüssigkeit ins Lumen, die nicht wieder vollständig resorbiert werden kann. Die dabei auftretende Diarrhoe bezeichnet man als eine Leckfluss Diarrhoe (Schmitz et al.1999<sup>116</sup>). Durch diese ausgeprägte Adhäsionsfähigkeit könnte man die geringe Permeation des verwendeten Bacteroides fragilis erklären.

## **II. Hydrolysefähigkeit des Fragilysin führt zur Veränderung der mukosalen Mucinschicht**

Das Fragilysin von dem Enterotoxin bildenden *Bacteroides fragiles*, hydrolysiert das Gelatin. Durch die Gelatinveränderung als Bestandteil der Mucinschicht auf der Mukosa könnte es zu einer Veränderung der mukosalen Barriere kommen. Ein vermehrter Eintritt von enteropathogenen Bakterien könnte durch die veränderte mukosale Epithelbarriere entstehen. Somit wäre dies ein weiterer Faktor, der die mukosale Barriere verändert und somit die Permeation anderer Organismen und eine Hyperaktivität des darmassoziierten Immunsystems ermöglichen könnte (Franco et al.1997<sup>35</sup>).

## **III. Veränderung des Zytoskelettes durch die Hydrolysefähigkeit von Fragilysin**

Fragilysin hat einen zytotoxischen Effekt auf das Zytoskelett und –Morphologie bei HT 29 induzierten intestinalen Epithelzellen. Durch die Hydrolysefähigkeit von BFT werden die am Zytoskelett beteiligten G und F-Actin Eiweißkörper verändert, so dass es zu einer neuen Anordnung des Zytoskelettes kommt (Saidi et al. 1997<sup>108</sup>). Die Epithelzellen könnten ihre Aufgabe einer wirkungsvollen mukosalen Epithelbarriere, als Schutzfunktion verändern. Somit könnte das Fragilysin den Durchtritt für weitere Bakterien bahnen.

## **IV. Regulation der Expression von Matrixmetalloproteasen**

Die Expression von Fragilysin (Matrixmetalloprotease) wird modifiziert durch physiologische und pharmakologische Signale, wie Cytokine, Wachstumsfaktoren, bakterielle Endotoxine, phagozytiertes Material und Hormone. Diese Faktoren können über eine positive oder negative Regulation über die Promoterregion der MMP's Gene reguliert werden. Alle MMP's werden vor allem als inaktive Proenzyme katalysiert. Die Aktivierung in die aktive Form kann unter anderem durch Autoaktivierung oder durch weitere Proteasen, wie z.B. Neutrophile Elastase, Cathepsin reguliert werden. Es gibt ebenso natürliche Protease Inhibitoren, wie das akute Phase Protein „Alpha-2-Makroglobulin“, die die Funktion hemmen. Jede Form der Gewebsverletzung oder -störung beschleunigt eine inflammatorische Antwort und löst eine akute Phase Reaktion aus. Eine Gruppe von pro – inflammatorisch immunmodulatorischen Proteinen, die Cytokine

regulieren und somit die Inflammation entweder direkt oder indirekt über eine Aktivierung weiterer Zelltypen (Whicher et al.1990<sup>147</sup>) auslösen. Hierbei könnte es zur Aktivierung einer inaktiven Vorstufe eines Proenzymes der Metalloprotease Fragilysin kommen und somit über eine E.Cadherinzerspaltung zu einer Schädigung der parazellulären Barriere führen und wiederum die Permeation für andere Bakterien bahnen.

#### **V. Ungleichgewicht zwischen Freisetzung und Inhibition von Metalloproteasen**

BFT gehört zur Superfamilie der Metalloproteasen. Unter physiologischen Bedingungen sind Metalloproteasen an der extrazellulären Degradierung und Abbau von Matrixproteinen (amorphe Grundsubstanz, in die eine Struktur im Rahmen eines physiologischen Gewebsumbauprozess bei der Wundheilung eingelagert ist), Angiogenese und Schwangerschaft, beteiligt. Durch diesen Prozess wird die Zellmigration erleichtert. Ein Ungleichgewicht zwischen der Freisetzung dieser Enzyme und deren Proteaseinhibitoren, wird für die Pathogenese von verschiedenen entzündlichen Erkrankungen, die mit einer Gewebszerstörung einhergehen beschrieben(Borkakoti et al.1998<sup>14</sup>), (Giambenardi et al. 1998<sup>43</sup>). Die Erleichterung der Zellmigration könnte somit die Permeation von anderen Bakterien bahnen. Unter der Annahme, dass das hyperaktivierte Immunsystem als Ungleichgewicht zwischen pro- und anti inflammatorischen Zytokinen unterhalten wird, galt als Teil eines Therapiekonzeptes zur Immunneutralisation die Anwendung von Anti Tumor Nekrose Faktor alpha. Potentiell vielversprechend könnte eine Änderung des Therapiekonzeptes zugunsten Matrix Metalloproteasen Inhibitoren sein (Madsen et al. 2000<sup>72</sup>).

#### **VI. Fehlende Aktivierung des inaktivierten Fragilysins als Ursache der fehlenden Permeation**

Ein weiterer erklärender Ansatz könnte sein, dass das Enterotoxin in inaktiver Form synthetisiert wird. Somit könnte demzufolge ein fehlender Faktor, wie z.B. Interleukin 8 eine Ursache für die fehlende Permeation sein.

## VII. Veränderung der epithelialen Polarität durch die Zerspaltung des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin

Die größte Aktivität von BFT ist die dosisabhängige Abnahme des transepithelialen Widerstandes in polarisierten Monolayers in Epithelzellen (Saidi et al.1996<sup>107</sup>), (Obsio et al.1997<sup>89</sup>). Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit T84 behandelten Zellen zeigen eine Abnahme der Mikrovilli und eine Wirkung auf die Tight junction und Zonula adherens. BFT übt seine Wirkung auf der Zelloberfläche, den Tight junction aus, wobei nur E-Cadherin zerspalten wurde. Diese E.Cadherin Zerspaltung verläuft in zwei Schritten: die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin wird, ATP unabhängig degradiert. Anschließend folgt der vor allem durch intrazelluläre Proteasen ATP abhängige intrazelluläre Abbau. Man vermutet, das enterotoxinbildene Bacteroides Stämme sich an die apikale Membran von intestinalen Epithelzellen anhaften und es zu einer Sekretion von Fragilysin kommt. Dieses Fragilysin verbreitet sich durch die Zonula occludens, um die extrazelluläre Domäne von E-Cadherin zu erreichen und zu zerspalten. Dabei kommt es zu einer Zerstörung der intrazellulären Domäne von E-Cadherin. Weil die intrazelluläre Domäne von E-Cadherin an das apikale Netzwerk von F-Actin angebunden ist, kann ein Verlust dieser Protein-Protein Wechselwirkung zu einer morphologischen Veränderung des apikalen Zytoskeletts führen. Das wiederum zu einem Verlust der Mikrovilli und zu einer Abnahme des Zellkontaktes untereinander (Shaoguang et al.1998<sup>123</sup>). Somit kommt es zu einer Verminderung der Barrierefunktion. Das ermöglicht den Empfang für BFT zu der apikalen Membran von intestinalen Epithelzellen. Eine weitere Zunahme der Zerspaltung von E-Cadherin verursacht eine zunehmende apikale Morphologieveränderung der Epithelzellen. Somit könnte das BFT die Funktion von einen oder mehreren Ionentransportern verändern, die zu einer intestinalen Sekretion führen können. E-Cadherin ist hier das zelluläre Substrat für die proteolytische Zell Oberflächen Aktivität des Fragilysin, die zur intestinalen Sekretion und Veränderung des Zytoskelettes führen (Shaoguang et al.1998<sup>123</sup>). E-Cadherin ist ein Protein, das für die epitheliale Polarität essentiell ist. Somit sollten fortführende Studien die Ereignisse der Siganltransduktion und der Veränderungen der Morphologie des Zytoskelettes durch die Einflüsse von enterotoxinproduzierenden Bacteroides Stämme in der Annäherung von therapeutischen Mitteln gegen chronisch entzündliche Darmerkrankungen folgen. Geht man davon aus, das Bacteroides selber nicht permeiert, sondern möglicherweise durch die proteolytische Veränderung der parazellulären Barriere (Wu et al.1998<sup>149</sup>) durch das BFT, die mukosale Permeation anderer Bakterien begünstigt, könnte das

eine entscheidene Rolle bei der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen haben. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen verdeutlichten das auch für das Ileum von der Morbus Crohn Gruppe, bei dem nur bei einem von 14 Epithelien eine Translokation von *Bacteroides fragilis* festgestellt werden konnte, *Bacteroides fragilis* trotzdem eine entscheidende Rolle bei Morbus Crohn spielen könnte. Bahnt des Frailysin von *Bacteroides fragiles* erst den Durchtritt für weitere Bakterien ? Bisher konnte noch keine isolierte Permeation in einem vergleichbaren experimentellen Modell in der Literatur beschrieben werden. Die Versuchsergebnisse für die bakterielle Permeation bei Morbus Crohn Patienten erbrachten keine Determinanten, die im Zusammenhang mit einer Permeation stehen könnten. Wie weiter unten gezeigt, kann neben den adhäsiven, hydrolisierenden und immunregulatorische Eigenschaften des *Bacteroides fragilis* keine Erklärung für die geringe Permeation gegeben werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Eigenschaften der Adhärenz an die Adhäsionsproteine der intestinalen Epithelzellen eine wesentliche Bedeutung bei der Pathogenese der Virulenzfaktoren des Frailysins von *Bacteroides fragiles* sein könnten. Hinsichtlich der Viabilität der Methode lässt sich keine weitere Erklärung finden.

#### **4.2.1.2. Elektrischer Widerstand der Epithelien**

Nach Zugabe des enterotoxinbildenden *Bacteroides fragiles* konnte weder bei den Kontrollen, noch bei den Morbus Crohn Patienten ein Abfall des totalen Gewebewiderstandes verzeichnet werden. Vorherige Studien ergaben folgendes:

Riegler et al. vergleicht in seiner Studie die elektrophysiologischen und morphologischen Effekte von isolierten BFT-2 serosal und luminal an menschlicher Mukosa in der Ussingkammer. Serosal zugegebenes BFT-2 senkt im Vergleich zu luminal mehr den Widerstand und führt zu einem verstärkten Mannitol Flux (Riegler et al. 1999<sup>97</sup>). Zusätzlich gingen diese Veränderungen mit einer Zerstörung der Krypten und der Oberfläche der Kolonozyten einher. In der Studie von Obsio et al. wurde dieser Effekt bestätigt. Der Effekt auf die mukosale Barriere von kultivierten Epithelzellen vom isolierten Frailysin wurde untersucht. Isoliertes Frailysin führt zu einer Zerstörung der parazellulären Strukturen mit Abnahme des Widerstandes und zu einer Zunahme des Mannitol Fluxes für Ionen (Obsio et al. 1997<sup>89</sup>).

Eine Erklärung für die von mir untersuchten Ergebnisse mit den o.g. Versuchsergebnissen wäre, dass in den o.g. Arbeiten mit Nachweis eines Widerstandabfalls das isolierte Toxin und nicht ein toxinbildender *Bacteroides* Stamm zugegeben wurde.

#### **4.2.1.3. Korrelation von Permeation und Widerstand**

In meiner Arbeit für das Ileum- und Colon-Gewebe von Morbus Crohn konnte keine Korrelation von Permeation und totalem Gewebewiderstand nachgewiesen werden. Betrachtet man die geringe Permeationsrate ist dies sicherlich schwierig. Um den Effekt des Fragilysins zu untersuchen, könnte man durch eine selektive Toxin Zugabe eine Steigerung der *Bacteroides fragiles*-Permeation möglicherweise erreichen. Dies könnte ein neuer Ansatz für fortführende Versuche zur Untersuchungen der Virulenz von enterotoxinproduzierende *Bacteroides Fragiles* Stämme sein.

#### **4.2.1.4. Histologie**

In Anlehnung an die Wiener Klassifikation erfolgte die Einteilung der 14 Morbus Crohn Ileum und 13 Colon Epithelien. Daraus ergaben sich bei den insgesamt 14 Ileumpräparaten: fünf perforierende Typen und neun nicht perforierende Typen. Es kam bei einem Morbus Crohn Patienten mit einem nicht perforierenden, fibrostenotischen Typ zu einer Permeation. Bei den 13 Morbus Crohn Colon Epithelien ergaben sich: ein perforierender Typ und zwölf nicht perforierende Typen. Bei drei Patienten mit einem nicht perforierenden, fibrostenotischen Entzündungstyp kam es zur Permeation. Obwohl von der pathophysiologischen Überlegung her eine Permeation bei einem perforierendem Typ wahrscheinlicher erscheint, tritt in meinen Versuchen die Permeation bei einem nicht perforierendem Typ auf. Bisher ist in der Literatur kein Zusammenhang zwischen Histologie und Permeation beschrieben worden. Eine Studie von Rokos et al. 1999 bestätigt die eher adhäsiven Eigenschaften des Endotoxins, indem er nachweist das die Lipopolysaccharide vom *Bacteroides fragiles* die Expression von Adhäsionsmolekülen ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin stimulieren (Rokosz et al. 1999a<sup>99</sup>, Rokosz et al. 1999b<sup>100</sup>, Rokosz et al. 2002<sup>102</sup>). Dies wiederum zu einer Aktivierung und somit Unterstützung der Zytokinproduktion im Rahmen der Immunregulation von T Helferzellen kommt. BFT und LPS führen beide zu einer gleich verstärkten Zunahme der Adhäsion von Granulozyten an Endothelzellen (Rokosz et al. 2001<sup>101</sup>). Wu et al. zeigte die morphologischen Zellveränderungen, bezüglich der proteolytischen Aktivität zwischen E-Cadherin (ein primär interzelluläres Adhäsionsprotein von der Zonula adherens) und *Bacteroides fragilis* (Wu et al.1998<sup>149</sup>).

#### **4.2.1.5. Praeoperative Therapie**

##### **4.2.1.5.1. Cortison**

Tierexperimentelle Studienergebnisse von Meddings et al. zeigten, dass erhöhte Cortisonkonzentrationen zu einer Zunahme der gastrointestinalen Permeabilität führen. Somit wählte ich die Cortisoneinnahme präoperativ als Determinante (Meddings et al. 2000<sup>75</sup>). Zur Erhaltungsdosis mittlerer Konzentration (10 mg) erhielten die Morbus Crohn Patienten Prednisolon. Zehn von 14 Patienten standen zum Operationszeitpunkt unter einer Prednisolon-Medikation. Der Patient mit Permeation durch die Ileum-Mucosa wurde mit 10 mg Prednisolon therapiert. Elf von 13 Colon – Mukosa Patienten erhielten ebenfalls eine mittlere Prednisolon Medikation. Die drei Patienten mit Bacteroides-Permeation weisen alle eine Prednisolon-Medikation mittlerer Intensität auf. Es lässt sich kein Zusammenhang zwischen Permeationsfähigkeit von Bacteroides fragilis und Prednisoloneinnahme herstellen. Als Begründung kann man hier erneut die vornehmlichen Exo- und Endotoxineigenschaften des Bacteroides fragilis anführen. Bisher ist noch kein Einfluss von Cortison auf die Permeationsfähigkeit von Bacteroides fragilis in der Literatur beschrieben worden.

##### **4.2.1.5.2. Antibiotika**

Alle Patienten erhielten präoperativ 0.5 g Metronidazol intravenös als Kurzinfusion. Dies sollte kritisch gesehen werden. Die Zugabe des entertoxinbildenden Bacteroides erfolgte im Median 100 Minuten nach i.v. Gabe des Metronidazols. Die Gewebkonzentration des Metronidazols lag nach dieser Zeit bereits wieder unterhalb der MHK (minimale Hemmkonzentration) für Bacteroides fragilis (Schwab et al. 2001<sup>118</sup>). Die intravenöse Single-Shot-Gabe von Metronidazol als Kurzinfusion präoperativ, war bei allen untersuchten Patienten gleich. Ein Patient innerhalb der Ileum-Gruppe wurde bereits sieben Tage präoperativ antibiotisch therapiert. Auch hierbei ließ sich kein Zusammenhang zwischen sieben tägiger Antibiotikagabe und Permeation zeigen. In der Colon-Gruppe ergibt sich ebenfalls keine antibiotische Determinante. Es lässt sich hieraus kein Zusammenhang auf die Bacteroides-Permeation ableiten. Die zugegebenen Bacteroides weisen eine gute Vermehrungstendenz auf der mucosalen Ussing-Kammer-Seite auf. Somit ist ein Effekt des Metronidazols auf die Permeationsfähigkeit des Bacteroides fragilis eher unwahrscheinlich.

#### **4.2.1.5.3. Totale parenterale Ernährung**

Kobayashi et al. zeigte, dass die intestinale Aktivität der Entzündung bei Morbus Crohn durch eine totale parenterale Ernährung über einen Zeitraum von zwei Wochen stärker vermindert wird als mit einer elementaren Diät (Kobayashi et al. 1998<sup>62</sup>). Dagegen fand man, dass bei Deitch et al. in einem Tierversuch mit der Ussingkammer eine parenterale Diät im Vergleich zur oralen elementaren Diät zu einer verstärkten bakteriellen Translokation in der Mukosa vom Ileum führt (Deitch et al. 1995<sup>25</sup>). Unter Beachtung der Studienergebnisse wurde die totale parenterale Ernährung als Determinante miteinbezogen. Dabei ergab sich in der Ileum als auch Colon Epithelgruppe, dass zwei Patienten präoperativ parenteral ernährt wurden. Bei beiden Patienten wurde keine bakterielle Permeation nachgewiesen. Bisher wurde kein Zusammenhang zwischen *Bacteroides fragilis* und dem Einfluss einer parenteralen Ernährung wissenschaftlich nachgewiesen. Es lassen sich hier keine Rückschlüsse ziehen.

#### **4.2.1.5.4. Postoperative septische Komplikationen**

Ein Morbus Crohn Patient entwickelte eine Anastomoseninsuffizienz mit Peritonitis und im weiteren Verlauf einen Bauchdeckenabszess. In dieser Studie konnte eine *Bacteroides*-Permeation bei diesen Patienten festgestellt werden. Hier wäre ein Einfluss des *Bacteroides fragilis* sehr wohl denkbar. In der bereits zitierten Studie von u.a Laffineur et al. konnte *Bacteroides* in mesenterialen Lymphknoten von operierten M. Crohn Patienten nachgewiesen werden (Laffineur et al. 1992<sup>66</sup>). Studienergebnisse von Keighley et al. konnte in Abszessen bei Morbus Crohn Patienten, die eine Darmresektion erhielten, gehäuft *Bacteroides fragilis* nachweisen (Keighley et al. 1982<sup>58</sup>, Keighley et al. 1984<sup>59</sup>).

Bezüglich der Fragestellungen (Seite 24):

1. Kommt es zu einer verstärkten Permeation bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen Permeation und Entzündungsmuster des Darmepithels bei CED Patienten ?
3. Gibt es klinisch relevante Faktoren, die eine Permeation von *Bacteroides fragiles* beeinflussen können ?

Ob es bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu einer verstärkten Permeation von enterotoxinbildenden *Bacteroides fragilis* Stämmen kommt, lässt sich folgend festhalten:

*Bacteroides fragilis* weist in der Morbus Crohn Gruppe, nur an einem von 14 Operationspräparaten des Ileums eine Permeation auf, beim Colon kommt es insgesamt von 13 Präparaten nur dreimal zur Permeation. Es lassen sich keine Determinanten in Korrelation mit zahlreichen klinischen Parametern (praeoperatives Cortison, perioperative Antibiotika Therapie, praeoperative parenteraler Ernährung, Histologie, Gewebewiderstand) und der Permeation herausarbeiten. Eine mögliche Erklärung für die geringe Permeationsrate des *Bacteroides fragilis* könnte durch die erhöhte Adhärenz dieses Bakteriums an die Mucosa über die E-Cadherine und ICAM-1 sein.

#### **4.2.2.1. Permeation von *Bacteroides fragilis* im terminales Ileum und Colon bei Colitis ulcerosa**

Von den insgesamt neun untersuchten Epithelien des terminalen Ileums, konnten bei 44.4 %, entsprechend vier intestinalen Epithelien eine Permeation nachgewiesen werden. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Bei der unten aufgeführten Analyse der Determinanten konnte hierfür leider kein Zusammenhang gefunden werden. Man könnte annehmen, dass eine erhöhte Permeation durch die natürliche Leckigkeit des terminalen Ileums zusammen mit den leichteren entzündlichen Veränderungen der Backwashileitis ohne Ausbildung von abdichtenden Fibrinbelägen ermöglicht wird. Allerdings spricht gegen diese Hypothese, die bisher aufgeführten adhäsiven Eigenschaften des *Bacteroides fragilis*. Von den insgesamt elf untersuchten Colon Epithelien konnten bei 18.2%, entsprechend zwei Colitis ulcerosa Patienten eine Permeation nachgewiesen werden. Bei den 16 Kontroll Colon Epithelien, konnte bei 6.2 % entsprechend einem Patienten eine Permeation nachgewiesen werden. Folglich gab es keinen Unterschied zwischen den Permeationsraten bei den Kontrollen und bei der Colitis ulcerosa. Damit könnte die Permeationsrate, vor allem unter dem Aspekt, dass sich auch bei Kontroll Patienten eine Permeation finden lässt, Teil einer natürlichen bakteriellen Translokation sein. Die Studienergebnisse von Mosenthal et al., Berg et al. und Spath et al. belegten meine Ergebnisse. Sie zeigten, dass auch bei Kontrollen eine gewisse bakterielle Translokation stattfindet (Mosenthal et al. 2002a<sup>80</sup>) (Spath et al. 1998<sup>130</sup>) (Berg et al.1995<sup>11</sup>). Somit machen diese Ergebnisse vielmehr eine bakterielle Permeation als physiologische Auseinandersetzung des Immunsystems mit Bakterien wahrscheinlich.

#### **4.2.2.2. Elektrischer Widerstand der Epithelien**

Bei den *Bacteroides fragilis* Versuchen ist der totale elektrische Epithelwiderstand des terminalen Ileums bei Colitis ulcerosa signifikant geringer als im terminalen Ileum bei M.Crohn. Eine Erklärung für den erhöhten subepithelialen Widerstand im terminalen Ileum bei Morbus Crohn, ist in dem stärkeren fibrotischen Umbau des Subepithels durch die meist langjährige Entzündung zu sehen. Die Viabilität der Epithelien wird über die Messung des Widerstandes über die Zeit dokumentiert, so dass eine Störung auf dieser Ebene als Ursache für die erhöhte Permeationsrate nicht angenommen werden kann. Der totale epitheliale Widerstand des Colons in dieser Colitis ulcerosa Gruppe unterscheidet sich weder von der Kontroll Gruppe, noch vom Morbus Crohn. Der Widerstand bleibt über den Versuchsverlauf stabil. Damit ist die Viabilität des Epithels für den Versuchszeitraum dokumentiert.

#### **4.2.2.3. Korrelation von Permeation und Widerstand**

Der Widerstand des Ileums in diesem Kollektiv ist im Vergleich zum M. Crohn signifikant niedriger, jedoch kann man auch in dieser Gruppe, wie auch im Kolon keine Korrelation zwischen bakterieller Permeabilität und epithelialen Widerstand feststellen. Die hierfür erörterbaren Faktoren entsprechen denselben, wie bereits für die *Bacteroides fragilis* Permeation des terminalen Ileums und Kolons der Morbus Crohn Gruppe (4.2.1.3).

#### **4.2.2.4. Histologie**

Die histologische Einteilung der insgesamt 20 Colitis ulcerosa Patienten, von denen neun Ileum- und elf Colon Epithelien entnommen wurden, erfolgte nach Truelove und Richardson. Acht von neun Ileum Präparaten haben eine schwere Entzündung. Eine Backwashileitis liegt nur bei einem Epithel mit *Bacteroides fragilis* Peremation vor. Von den insgesamt elf Colon Epithelien haben (nach Truelove und Richardson) zehn Colon Präparate eine schwere Entzündung. Die beiden Permeationen ereigneten sich bei Patienten mit schwerer Entzündung. Somit konnte man weder zwischen Entzündungsschwere des terminalen Ileums noch zwischen dem Entzündungsgrad des resezierten Colons einen Einfluß auf die Permeation des *Bacteroides fragilis* feststellen. Als wesentliche Begründung kann man wiederum die Adhäsionsfähigkeit des *Bacteroides* angeführen.

**4.2.2.5. Praeoperative Therapie**  
**4.2.2.5.1. Cortison**

Die vier von neun Ileum Präparaten und die zwei von elf Colon Präparaten mit Bacteroides Permeation haben alle eine orale Prednisolon Medikation mittlerer Dosis erhalten. Betrachtet man die geringe Fallzahl für eine solche Fragestellung, lassen sich hieraus jedoch keine Schlüsse ziehen. Die prinzipiellen Überlegungen zur Cortison - Wirkung auf die Permeation entsprechen denen aus Kapitel 4.2.1.5.1.

**4.2.2.5.2. Antibiotika**

Auch hier kann man keinen Zusammenhang zwischen Antibiotika-Therapie und bakterieller Permeation dar. Es folgt die Interpretation der Diskussion aus Kapitel 4.2.1.5.2.

**4.2.2.5.3. Totale parenterale Ernährung**

Ergebnisse einer tierexperimentellen Studie zeigten, dass eine totale parenterale Ernährung zu einer Veränderung der intestinalen Barriere führt (Mosenthal et al. 2002<sup>80</sup>). Unter Beachtung verschiedener dies bezüglich Studieneergebnisse wurde die totale parenterale Ernährung als Determinante mitbetrachtet. Dabei ergab sich, dass ein Patient in der Ileum Gruppe und zwei Patienten der Colon Gruppe praoperativ parenteral ernährt wurden. Bei keinen der drei Patienten konnte eine Bacteroides Permeation nachgewiesen werden. Somit kann man von keinen Zusammenhang zwischen parenteraler Ernährung und bakterieller Permeation ausgehen.

**4.2.2.5.4. Postoperative septische Komplikationen**

Zwei Patienten hatten postoperativ in der Bauchdecke eine Wundinfektion. Dabei hatte weder in dem Ileum- noch in den Colon Epithelien eine Permeation stattgefunden. Folglich lässt sich kein Zusammenhang zwischen septischen Komplikationen und bakterieller Permeation feststellen.

Bezüglich der Fragestellungen (Seite 24):

1. Kommt es zu einer verstärkten Permeation bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen Permeation und

Entzündungsmuster des Darmepithels bei CED Patienten ?

3. Gibt es klinisch relevante Faktoren, die eine Permeation von *Bacteroides fragilis* beeinflussen können ?

lässt sich wiederum festhalten:

*Bacteroides fragilis* weist bei der Colitis ulcerosa im Vergleich zu Kontrollen eine erhöhte bakterielle Permeation, jedoch ohne statistische Signifikanz - Niveau auf. Auch hier lassen sich keine Determinanten der Permeation herausarbeiten. Die geringe Permeationsrate des *Bacteroides fragilis* wird anhand der bereits in der Literatur umfangreich durchgeführten Studien auf die erhöhte Adhärenz dieses Bakteriums an die Mucosa über die E-Cadherine und ICAM-1 begründet.

#### **4.2.3. Vergleich Morbus Crohn und Colitis ulcerosa**

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa als die beiden wichtigsten Verlaufsformen gehören zu den Erkrankungen, dessen Ursachen noch weitgehend unklar sind. Es ist nicht verwunderlich, dass es bisher noch schwierig ist klare Therapiekonzepte zu entwickeln. Die beiden Erkrankungen unterscheiden sich hinsichtlich: Vererbung, immunologischer Antwort, Histologie, Befallsmuster, Epidemiologie, der Risikofaktoren, des Karzinomrisikos und Therapieansätze. Ein chirurgisch bedeutender Unterschied ist, dass Colitis ulcerosa nur durch Kolektomie heilbar ist. Dagegen ist Morbus Crohn (auch operativ) nicht heilbar. Mit Hilfe geeigneter therapeutischer Maßnahmen sind aber 60-70 % der Patienten symptomfrei.

## 5.

### Zusammenfassung

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden im Vergleich mit gesunden Darm von Patienten einer Kontrollgruppe hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit für einen enterotoxinbildenden *Bacteroides fragilis* im menschlichen Darm im in-vitro-ex-vivo Versuch mit der Ussingkammer untersucht. Anschließend erfolgte eine quantitative Erfassung der Permeation. Eine Korrelation zwischen Permeation und Entzündungsmuster sowie klinisch relevante Faktoren, die eine Permeation begünstigen könnten, wurde erörtert.

Der Nachweis der Toxinbildung für den verwendeten Keim erfolgte über einen Zytotoxizitätstest. Der totale Widerstand wurde nach Inkubation bei 3 HT 29/B7-Monolayer-Gruppen gemessen. Es wurden der Versuchskeim, ein nicht Toxin bildender Laborstamm und ein bakterienfreier Ansatz miteinander verglichen. Es zeigte sich eine Abnahme des totalen Widerstands von 20,2 auf 9,3 cm<sup>2</sup> für den verwendeten Ampicillin/Sulbactam resistenten Wildstamm. Somit wurde der Nachweis von Riegler et al. 1999<sup>97</sup> bestätigt, dass die Zugabe des *Bacteroides*-Toxins zu einer Abnahme des totalen Widerstands in der Zellkultur und am humanen Colon führt. Der Zytotoxizitätstest war der Beweis für das Vorhandensein des *Bacteroides fragilis* Toxin.

Eine definierte Menge von Ampicillin und Sulbactam resistenten *Bacteroides fragilis* im Mittel 250 KBE/100µl, wurde der mucosaseitigen Hälfte der Badlösung in der Ussingkammer zugegeben. Um eine Permeation nachzuweisen wurden serosaseitige Proben der Badlösung entnommen, auf eine Agarplatte gebracht und 48 Stunden inkubiert. Durch Auszählen der gewachsenen koloniebildenden Einheiten erfolgte der Nachweis der permeierten enterotoxinbildenden *Bacteroidaceae fragilis*. Zur selektiven Anzucht von *Bacteroides fragilis* wurde zur Wachstumshemmung weiterer Enterobakterien der Darmflora, der Badlösung und der Agarplatten zusätzlich Kanamycin, Vancomycin, Ampicillin und Sulbactam hinzugefügt.

In der Morbus Crohn- und in der Colitis ulcerosa Gruppe bestand im Vergleich zu der Kontrollgruppe insgesamt eine gering erhöhte Permeabilität für *Bacteroides fragilis*. Im Ileum des Morbus Crohn ergab sich in 1 von 14 Präparaten = 7,2%, bei der Colitis ulcerosa in 4 von 9 Präparaten = 44,4% und in der Kontroll-Gruppe keine Permeation des *Bacteroides fragilis*. Im Colon von Patienten mit Morbus Crohns zeigte sich in 3 von 13 Präparaten = 23.1%, bei der Colitis ulcerosa in 2 von 11 Präparaten = 18.2% und in der Kontrollgruppe in 1 von 16 Präparaten = 6.2% eine Permeation. Dabei erreichen weder die Permeationsrate der Ileum- und der Colonepithelien bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, im Vergleich zu den Kontrollen das Signifikanz-Niveau.

Während des gesamten Versuchszeitraumes von 180 Minuten waren alle totalen elektrischen Widerstände der Epithelien bei allen Versuchen der jeweiligen drei Gruppen stabil geblieben. Die Widerstandsabnahme ( $\Delta R^t$ ) der Kontrollen im Ileum war:  $\Delta R^t(9,2 \pm 1,2 \Omega \cdot \text{cm}^2)$  und im Colon  $\Delta R^t(10,2 \pm 1,2 \Omega \cdot \text{cm}^2)$ . Die Intaktheit des Epithels wurde über den Versuchszeitraum über die Stabilität des elektrischen Widerstands des Epithels elektrophysiologisch belegt.

Die Ileum-  $\Delta R^t(15,3 \pm 3,4 \Omega \cdot \text{cm}^2)$  und Colon-  $\Delta R^t(5,1 \pm 1,4 \Omega \cdot \text{cm}^2)$  Widerstände der Morbus Crohn Gruppe zeigten keine Verminderung gegenüber den Kontrollen. Zwischen bakterieller Permeation und Widerstand des Epithels ließ sich kein Zusammenhang aufzeigen. Die Zahl der serosal nachgewiesenen Bakterien und die gemessenen elektrischen Widerstände korrelierten nicht miteinander ( $r = 0,138$ ). Bei der Colitis ulcerosa zeigte sich gegenüber Morbus Crohn eine Verminderung des Ileum – Widerstandes. Es gab keinen Zusammenhang zwischen bakterieller Permeation und Widerstand des Epithels. Eine Korrelation zwischen der Zahl der serosal nachgewiesenen Bakterien und den gemessenen elektrischen Widerständen ( $r = 0,314$ ,  $p = 0,411$ ) bestand nicht.

Weder für den Morbus Crohn, noch für die Colitis ulcerosa konnte eine Korrelation zwischen klinischen Parametern und bakterieller Permeation gefunden werden. Die geringe Permeationsrate, vor allem unter dem Aspekt, dass sich auch bei den Kontroll Patienten eine Permeation finden lässt, könnte Teil einer natürlichen bakteriellen Translokation sein. Diese Ergebnisse machen vielmehr eine bakterielle Permeation als physiologische Auseinandersetzung des Immunsystems mit Bakterien wahrscheinlich. Es besteht also bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu darmgesunden Patienten keine erhöhte Permeabilität für *Bacteroides fragilis*.

Hierfür kommen verschiedene mögliche Erklärungen in Betracht: Entweder reicht die Toxin-Produktion des verwendeten Stammes nicht aus, oder die Toxinwirkung wirkt sich nicht auf die Barrierefunktion des Colons aus. Ebenso könnte man eine in-vitro-Erkennung der Toxinwirkung nur durch eine isolierte Toxinzugabe, wie in den Versuchen von Obiso et al. 1997<sup>89</sup> beschrieben, in Erwägung ziehen. Die niedrige Permeationsrate könnte auf die erhöhte Adhärenz des Bakteriums an die Mucosa über die Adhärenz von Fragilysin an Adhäsionsproteinen zurückzuführen sein. Dies könnte zu einer Veränderung der Epithelbarrierefunktion führen. Zusätzlich wird die Hydrolysefähigkeit des Fragilysin diskutiert, die zur Veränderung der mukosalen Mucinschicht und zur Veränderung des Zytoskelettes führt. Zudem kann man die Stimulierung der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie ein Ungleichgewicht

von pro und anti inflammatorischen Zytokinen als Auslöser des hyperaktivierten darmassoziierten Immunsystems betrachten. Eine Veränderung der epithelialen Polarität durch die Zerspaltung von Adhäsionsmolekülen führt über die verstärkte Adhärenz zu einer verminderten bakteriellen Permeation. Die geringe Permeationsrate des *Bacteroides fragilis* könnte sich somit durch die erhöhte Adhärenz und die einzelne Wirkung der Virulenzfaktoren von Fragilysin an der Mucosa begründen.

Es erübrigt sich eine weitere spekulative Diskussion zur Erklärung der geringeren Permeationsrate. *Bacteroides fragilis* eignet sich nicht in diesem in-vitro-ex-vivo-Modell. Die normale Darmflora ist ein komplexes Ökosystem, das bis heute unzureichend verstanden ist. Gleichwohl weiss man heute, dass die normale Darmflora sowohl nützliche als auch negative krankheitsauslösende Effekte für den Wirt haben kann. Es ist zu erwarten, dass in den nächsten Jahren durch molekulare Analysen der Bakterien-Bakterien- sowie Bakterien-Wirt – Interaktionen die einzelnen Komponenten der Darmflora besser verstanden und somit die Grundlagen für neue therapeutische Ansätze geschaffen werden könnten.

1. A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H (2002), Mucosal flora in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 122: 44-54
2. Acea NB, Freire RD, Sanchez GF, Fraguela MJ, Taboada FL, Gomez FC (1997), [Psoas abscess in Crohn's disease. Preoperative evaluation and surgical attitude], *Gastroenterol.Hepatol.* 20: 412-414
3. Adler M, Van Gossum A, De Reuck M (1996) Epidemiology of inflammatory bowel disease in Brussels' area (1992-1993). *Acta Gastroenterol Belg (Belgium)*, 59(1) p7-9
4. Albanese CT, Cardona M, Smith SD, Watkins S, Kurkchubasche AG, Ulman I, Simmons RL, Rowe MI (1994a), Role of intestinal mucus in transepithelial passage of bacteria across the intact ileum in vitro, *Surgery* 116: 76-82
5. Albanese CT, Smith SD, Watkins S, Kurkchubasche A, Simmons RL, Rowe MI (1994b), Effect of secretory IgA on transepithelial passage of bacteria across the intact ileum in vitro, *J Am.Coll.Surg* 179: 679-688
6. Ambrose NS, Johnson M, Burdon DW, Keighley MR (1984), Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery, *Br.J Surg.* 71: 623-625
7. Batt RM, Rutgers HC, Sancak AA (1996), Enteric bacteria: friend or foe?, *J.Small Anim Pract.* 37: 261-267
8. Baughn AD, Malamy MH (2004), The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature* 427 : 441-4
9. Beckmann G, Ruffer A. (1998) *Mikroökologie des Darmes*, Schlütersche GmbH
10. Benoit R, Rowe S, Watkins SC, Boyle P, Garrett M, Alber S, Wiener J, Rowe MI, Ford HR (1998), Pure endotoxin does not pass across the intestinal epithelium in vitro, *Shock* 10: 43-48
11. Berg RD. Bacteria translocation from the gastrointestinal tract.(1995)*Trends Microbiol ;* 3: 149-54
12. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F, Jr. (1976), Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study, *Gastroenterology* 70: 439-444
13. Borody TJ, Leis S, Warren EF, Surace R (2002), Treatment of severe Crohn's disease using antimycobacterial triple therapy-approaching a cure?, *Dig.Liver Dis.* 34: 29-38
14. Borkakoti N (1998) Matrix metalloproteases: variation on a theme.*Progress in Biophysics and Molecular ,*70: 73-94
15. Brandes JW, Lorenz-Meyer H (1981), [Sugar free diet: a new perspective in the treatment of Crohn disease? Randomized, control study], *Z.Gastroenterol.* 19: 1-12
16. Braun J (2002), Unsettling facts of life: bacterial commensalism, epithelial adherence, and inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 122: 228-230
17. Caradonna L ; Amati L ; Magrone T ;Pellegrino NM;Jirillo E; Caccavo D (2000) Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease:biological and clinical significance, *J Endotoxin Res* 6:205-14.
18. Castiglione F ; Rispo A ;Di Girolamo E;Cozzilino A; Manguso F; Grassia R; Mazzacca G (2003 ), *Aliment Pharmacol Ther.*18:1107-12
19. Chandra RH, Wang S, Au B. (1992). Enriched feeding formula and immune response in outcome after *Listeria monocytogenes* challenge in mice. *Nutrition.* 8: 426-9

20. Chung GT; Franco AA; Wu S; Rhie GE; Cheng R; Oh HB; Sears CL (1999) Identification of a third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun* ;67:4945-9
21. Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, Di Paolo M, Riegler G, Rigo GP, Ferrau O, Mansi C, Ingrosso M, Valpiani D (1998), Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC), *Int.J.Epidemiol.* 27: 397-404
22. Crohn, B.B., Ginzburg, L., Oppenheimer G.B. (1932) Regional ileitis, a pathological and clinical entity. *J. Amer. med. Ass.* 93:1223 - 1329
23. Croucher, S.C., A.P. Houston, C. E. Bayliss, and R.J Turner (1983) Bacterial population associated with different region of the colon wall. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1025-1033
24. D'Haens G, Rutgeerts P (1999), Postoperative recurrence of Crohn's disease: pathophysiology and prevention, *Inflamm. Bowel. Dis* 5: 295-303
25. Deitch EA, Xu D, Naruhn MB, Deitch DC, Lu Q, Marino AA (1995), Elemental diet and IV-TPN-induced bacterial translocation is associated with loss of intestinal mucosal barrier function against bacteria, *Ann Surg* 221: 299-307
26. Dickinson E; Tuncer R; Nadler E; Boyle P; Alber S; Watkins S; Ford H (1999) NOX, a novel nitric oxide scavenger, reduces bacterial translocation in rats after endotoxin challenge, *Am J Physiol*; 277:G 1281-7
27. Donelli G, Fabbri, Fiorenti C. (1996) *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces cytoskeletal changes and surface blebbing in HT 29 cells, *Infect Immun* 64:113-9
28. Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath M (1996), Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12, *Eur. J Immunol.* 26: 934-938
29. Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, Collins JK (1999), Probiotics: from Myth to reality, *Antonien Leeuwenhoek* 76:279-92
30. Dunne C, (2001), Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflamm Bowel Dis* . 7:136-45
31. Eckermann L, Kagnoff M, Fierer J. (1995). Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends Microbiol.* 3:118-29
32. Einerhand AW, Renes IB; Makkink MK; van der Sluis M; Buller HA; Dekker J (2002), Role of mucin in inflammatory bowel disease: important lessons from experimental models, *Eur J Gastroenterol Hepatol*; 14(7):757-65
33. Epple HJ, Kreusel KM, Hanski C, Schulzke JD, Riecken EO, Fromm M (1997), Differential stimulation of intestinal mucin secretion by cholera toxin and carbachol, *Pflugers Arch.* 433: 638-647
34. Foulon I, Pierard D, Muyldermans G (2003) Prevalence of fragilysin gene in *Bacteroides fragilis* isolates from blood and other extraintestinal samples. *J Clin Microbiol (United States)*, 41(9):4428-30
35. Franco AA, Mundy LM, Trucksis M, Wu S, Kaper JB, Sears CL (1997), Cloning and characterization of the *Bacteroides* metalloprotease toxin gene. *Infect Immun*, 65:1007-13
36. Fromm M, Hegel U, Wiederholt M. (1994). Epithelien: in *Pathophysiologie des Menschen*, hrsg. Von K. Hierholzer und R.F. Schmidt, Chapman & Hall, Seite 5.1
37. Fromm M, Schulzke JD, Hegel U (1985), Epithelial and subepithelial contributions to transmural electrical resistance of intact rat jejunum in vitro, *Pflugers Arch.* 405: 400-402
38. Fujita H, Eishi Y, Ishige I, (2002). Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgatus*, and *Escherichia coli* in tissue samples from

- patients with inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol (Japan)*, , 37(7) p509-16
39. Gardiner KR, Erwin PJ, Anderson NH, Barr JG, Halliday MI, Rowlands BJ (1993), Colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis, *Br.J Surg.* 80: 512-516
  40. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR (2000), A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998, *Inflamm.Bowel.Dis* 6: 8-15
  41. Gewirtz AT, Madara JL (2001), Periscope, up! Monitoring microbes in the intestine, *Nat.Immunol.* 2: 288-290
  42. Giaffer MH, Holdsworth CD, Duerden BI (1991), The assessment of faecal flora in patients with inflammatory bowel disease by a simplified bacteriological technique, *J.Med.Microbiol.* 35: 238-243
  43. Giambernardi TA (1998) , Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biology.* 16 : 483-496
  44. Gitter AH, Schulzke JD, Sorgenfrei D, Fromm M (1997), Ussing chamber for high-frequency transmural impedance analysis of epithelial tissues, *J.Biochem.Biophys.Methods* 35: 81-88
  45. Go LL, Ford HR, Watkins SC, Healey PJ, Albanese CT, Donhalek A, Simmons RL, Rowe MI (1994), Quantitative and morphologic analysis of bacterial translocation in neonates, *Arch Surg* 129: 1184-1190
  46. Goddard AF, Spiller RC (1997), In vitro assessment of gastric mucosal transfer of anti-Helicobacter therapeutic agents, *Antimicrob.Agents Chemother.* 41: 1246-1249
  47. Guindi M, RH Riddel, Inderteminata colitis, *J. Clinical Pathol.* 2004;57;1233 - 1244
  48. Hahn,Falke,Klein (1994) *Medizinische Mikrobiologie, Springer- Lehrbuch*, Seite 420
  49. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG (2001), Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations, *Lancet* 357: 1925-1928
  50. Heller F, Duchmann R (2003), Intestinale flora and mukosal immune response, *Int J Med Microbiol* 293: 77-86
  51. Hernandez GA, Appleyard CB (2003) Bacterial load in animal models of acute and chronic 'reactivated' colitis. *Digestion (Switzerland)*, , 67(3) p161-9
  52. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G (2001), Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* 411: 599-603
  53. Isenmann R, Schwarz M, Rozdzinski E, Marre R, Beger HG (2000), Aggregation substance promotes colonic mucosal invasion of *Enterococcus faecalis* in an ex vivo model, *J Surg Res.* 89: 132-138
  54. Ishikawa T, Okamura S, Oshimoto H, Kobayashi R, Mori M (2003), Metronidazole plus ciprofloxacin therapy for active Crohn's disease. *Intern Med.* 42 :318-21
  55. Karlinger K; Gyorke T; Mako E; Mester A; Tarjan Z (2000) The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Eur J Radiol* 35:154-67
  56. Kasper,H. (2000) *Ernährungsmedizin und Diätetik.* Urban & Fischer Verlag, 3 145- 171
  57. Kato, N., H. Kato, K. Wantanabe, and K.Ueno.(1996) Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with bacteremia. *Clinical Infectious Disease.* 23 :s83-86

58. Keighley MR, Eastwood D, Ambrose NS, Allan RN, Burdon DW (1982), Incidence and microbiology of abdominal and pelvic abscess in Crohn's disease, *Gastroenterology* 83: 1271-1275
59. Keighley MR (1984), Infection and the use of antibiotics in Crohn's disease, *Can.J.Surg.* 27: 438-441
60. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M (2002), Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls, *Scand.J Gastroenterol.* 37: 1034-1041
61. Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duerig N, Eppelen JT, A polymorphism in the CD 14 gene is associated with Crohn disease, *Gastroenter.* 2002 Feb;37(2):189-91
62. Kobayashi K; Katsumata T; Yokoyama K; Takahashi H; Igarashi M; Saigenji K (1998). A randomized controlled study of total parenteral nutrition and enteral nutrition by elemental and polymeric diet as primary therapy in active phase of Crohn's disease. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 95:1212-21
63. Kryzanowski F., M.J. Avila-Campos (2003), Detection of non enterotoxigenic and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in stool samples from children in Sap Paulo, Brazil. *Rev.Inst.Med. trop.S.Paulo*,45 :225-227
64. Kucharzik T, Lugerling N, Rautenberg K, Lugerling A, Schmidt MA, Stoll R, Domschke W (2000), Role of M cells in intestinal barrier function, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 915: 171-183
65. Kurkchubasche AG; Cardona M; Watkins SC; Smith SD; Albanese CT; Simmons RL; Rowe MI; Ford HR (1998) Transmucosal passage of bacteria across rat intestinal epithelium in the Ussing chamber: effect of nutritional factors and bacterial virulence, *Shock*,9:121-7
66. Laffineur G, Lescut D, Vincent P, Quandalle P, Wurtz A, Colombel JF (1992), Bacterial translocation in Crohn disease, *Gastroenterol.Clin.Biol.* 16: 777-781
67. Lehmann FS, (2003) Pathophysiology of inflammatory bowel disease, *Ther Umsch* 60:127-32
68. Lerm, M., Schmidt, G. and Aktories K. (2000) Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol. Lett.* 188:1-6
69. Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG (2001), The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics, *Scand.J Gastroenterol.Suppl* 29-40
70. Guindi M, RH Riddel, Inderteminata colitis *J. Clin. Pathol.* 2004;57:1233-1244
71. MacPherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I (1996), Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria, *Gut* 38: 365-375
72. Madsen JR (2000), Chronic inflammatory bowel disease—pathogenic concepts and therapeutic perspective, *Ugeskr Laeger.* 163:1361-6
73. Maxson RT, Dunlap JP, Tryka F, Jackson RJ, Smith SD (1994), The role of the mucus gel layer in intestinal bacterial translocation, *J Surg Res.* 57: 682-686
74. Mayer JM, Dolch M, Rozdzinski E, Schoenberg MH, Beger HG (1998), Early effect of low-dose endotoxin on rat cecal mucosa ex vivo, *J Surg Res.* 80: 259-265
75. Meddings JB, Swain MG (2000), Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat, *Gastroenterology* 119: 1019-1028
76. Merger M; Croutoru K. (1998), Infections in the immunopathogenesis of chronic inflammatory bowel disease, *Semin Immunol.* 10 : 69 - 78

77. Mishima S; Xu D; Deitch EA (1999), Increase in endotoxin-induced mucosal permeability is related to increased nitric oxide synthase activity using the ussing chamber, *Crit Care Med*; 27:880-6
78. Moncrief JS, Obiso R., Barroso LA., Kling JJ, Wright RL., Vantassell RL., Lyerly DM, Wilkins TD, (1995) The Enterotoxin of *Bacteroides fragiles* is a Metalloprotease
79. Montgomery SM, Lambe M, Wakefield AJ, Pounder RE, Ekbohm A (2002), Siblings and the risk of inflammatory bowel disease, *Scand.J.Gastroenterol.* 37: 1301-1308
80. Mosenthal AC, Xu D, Deitch EA (2002a), Elemental and intravenous total parenteral nutrition diet-induced gut barrier failure is intestinal site specific and can be prevented by feeding nonfermentable fiber, *Crit Care Med* 30: 396-402
81. Mosenthal AC, Xu D, Deitch EA (2002b), Elemental and intravenous total parenteral nutrition diet-induced gut barrier failure is intestinal site specific and can be prevented by feeding nonfermentable fiber, *Crit Care Med.* 30: 396-402
82. Myers,L.L.;Shoop,D.S.,Stackhouse,L.L.,Newman,F.S.;Flaherty,R.J.,Letson,G.W.and Sack,R.B.(1987) Isolation of enterotoxigenic *Bacteroides fragiles* from humans with diarrhea.*J.Clin.Micrbiol.* 25: 2330-3
83. Matsutani M; Barry M ( 2003) Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease, *Clin Chim Acta* . 335: 9-20
84. Nakamura RM; Matsutani M; Barry M ( 2003) Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease, *Clin Chim Acta* . 335: 9-20
85. Nejdfors P, Wang Q, Ekelund M, Westrom BR, Jansson O, Lindstrom CL, Karlsson B, Jeppsson B (1998), Increased colonic permeability in patients with ulcerative colitis: an in vitro study, *Scand.J Gastroenterol.* 33: 749-753
86. O'Boyle CJ, Macfie J, Dave K, Sagar PS, Poon P, Mitchell CJ (1998b), Alterations in intestinal barrier function do not predispose to translocation of enteric bacteria in gastroenterologic patients, *Nutrition* 14: 358-362
87. O'Boyle CJ, Macfie J, Mitchell CJ, Johnstone D, Sagar PM, Sedman PC (1998a), Microbiology of bacterial translocation in humans, *Gut* 42: 29-35
88. Obiso, R.J.Jr.,Lyerly,D.M.,Van Tassell,R.L. and Wilkins, T.D. (1995)Proteolytic activity of *Bacteroides fragiles* enterotoxin causes fluid secretion and intestinal damage in vivo.*Infect.Immun.*63:3820-6
89. Obiso RJ, Jr., Azghani AO, Wilkins TD (1997), The *Bacteroides fragilis* toxin fragilysin disrupts the paracellular barrier of epithelial cells, *Infect.Immun.* 65: 1431-1439
90. Offerman S. (2003) Bakterien und Darmzellen lösen zusammen Entzündungsreaktionen aus, *Journal of clinical investigation.* 66: 1531 - 1536
91. Onderdonk A.B.,R.B.Markham,D.F. Zaleznik,R.L. Cisernos, and D.L. Kasper. (1982) Evidence for T cell dependent immunity to *Bacteroidess fragiles* in an intraabdominal abscess model. *J. Clin. Invest.* 69:9-16
92. Patel RT, Pall AA, Adu D, Keighley MR (1995), Circulating soluble adhesion molecules in inflammatory bowel disease, *Eur.J Gastroenterol Hepatol.* 7: 1037-1041
93. Peitz U; Bruck U; Malfertheiner P ( 1999 ), Conservative therapy of fistulas of the anorectal area in Crohn disease, *Zentralbl Chir* 124: 42 -4
94. Prindville TP, Sheikh RA, Cohen SH, Tang YJ, Cantrell MC, Silva Jn( 2000), *Bacteroides fragiles* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel diseaes, *Emerg Infect Dis* 6: 171-4
95. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE, Jr., Balish E, Taurog JD, Hammer RE, Wilson KH, Sartor RB (1996), Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats, *J Clin Invest* 98: 945-953

96. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P (2001), Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria, *Nat.Immunol.* 2: 361-367
97. Riegler M, Lotz M, Sears C, Pothoulakis C, Castagliuolo I, Wang CC, Sedivy R, Sogukoglu T, Cosentini E, Bischof G, Feil W, Teleky B, Hamilton G, LaMont JT, Wenzl E (1999), *Bacteroides fragilis* toxin 2 damages human colonic mucosa in vitro, *Gut* 44: 504-510
98. Rocha,E.R.,T.Selby,J.P.Coleman, and C.J.Smith.(1996) Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragiles*:a role for catalase protection against hydrogen peroxide. *J.Bacteriol.* 178:6895-6903
99. Rokosz A, Meisel-Mikolajczyk F, Kot K, Zawidzka E, Malchar C, Nowaczyk M, Gorski A (1999a), Toxins of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* rods as stimulators of adhesion molecule expression on the surface of vascular endothelial cells, *Med.Dosw.Mikrobiol.* 51: 133-142
100. Rokosz A, Meisel-Mikolajczyk F, Malchar C, Nowaczyk M, Gorski A (1999b), Adhesion molecule expression stimulated by *Bacteroides thetaiotaomicron* cell-surface antigens, *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* 47: 169-178
101. Rokosz A, Meisel-Mikolajczyk F, Kot K, Malchar C, Zawidzka E, Nowaczyk M, Gorski A (2001) Adhesion of humen granulocytes and T lymphocytes to vascular endothelial cells after stimulation with *Bacteroides fragiles* endotoxin and enterotoxin. *Med Dosw Mikrobiol.* 53:259-6
102. Rokosz A, Meisel-Mikolajczyk F, Kot K, Malchar C, Zawidzka E, Nowaczyk M, Gorski A (2002), Stimulation of adhesion molecule expression in human vascular endothelium by *Bacteroides fragilis* toxins--influence of polymyxin B, *Med.Dosw.Mikrobiol.* 54: 243-251
103. Rotimi VO,Duerden B ( 1981).The development of the bacterial flora in normal neonates.L *Med Microbiol.*14:51-62
104. Ruseler-van Embden JG, Both-Patoir HC (1983), Anaerobic gram-negative faecal flora in patients with Crohn's disease and healthy subjects, *Antonie Van Leeuwenhoek* 49: 125-132
105. Russel MG, Stockbrugger RW ( 2001), Epidemiological insights in chronic inflammatory bowel diseases.*Ned Tijdschr Geneesk*; 145:1448-52
106. Rutgeerts P (2003), Strategies in the prevention of post-operative recurrence in Crohn's disease 344, *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol* 17: 63-73
107. Saidi,R.F. and Sears, C.L.(1996) *Bacteroides fragiles* toxin rapidly intoxicates humen intestinal epithelial cells (HT 29 cells) in vitro. *Infec. Immun.* 64:5029-34
108. Saidi,R.F, Jaeger K, Montrose MH, Wu S, Sears CL ( 1997), *Bacteroides fragiles* toxin rearranges the actin cytoskelett of HT 29/C1 cells without direct proteolysis of actin or decrease in F-Actin content. *Cell Motil Cytoskeleton* 37:159-65
109. Sandborn WJ, Landers CJ, Tremaine WJ, Targan SR (1995c), Antineutrophil cytoplasmic antibody correlates with chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis, *Am.J Gastroenterol* 90: 740-747
110. Sandborn WJ, Tremaine WJ, Offord KP(1997) Transdermal nicotine for mildly to moderately active ulcerative colitis. *Ann Intern Med* . 126:364-71
111. Sandler RS, Eisen GM (2000), Epidemiology of Inflammatory Bowel disease, in *Inflammatory Bowel Disease*, ed. Kirsner JB, J.B. Saunders, Philadelphia p 89-112
112. Sanfilippo L, Li CK, Seth R, Balwin TJ, Menozzi MG, Mahida YR( 2000),*Bacteroides fragiles* enterotoxin induces the expression of IL-8 and transforming growth factor-beta(TGF-beta) by humen colonic epithelial cells, *Clin Exp Immunol.*, 119:456-63

113. Santos J; Yang PC; Soderholm JD; Benjamin M; Perdure MH 2001, Role of mast cells in chronic induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat, *Gut*. 48(5):630-6
114. Sawai T; Drongowski RA; Lampman RW; Coran AG; Harmon CM (2001) The effect of Phospholipids and fatty acids on tight junction permeability and bacterial translocation, *Pediatr Surg Int* 2001, 17:269-74
115. Scheppach W, Dusel G, Kuhn T, Loges C, Karch H, Bartram HP, Richter F, Christl SU, Kasper H (1996), Effect of L-glutamine and n-butyrate on the restitution of rat colonic mucosa after acid induced injury, *Gut* 38: 878-885
116. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD (1999), Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis, *Gastroenterology* 116: 301-309
117. Schultz M; Sartor RB (2000), Probiotics and inflammatory bowel disease, *AM J Gastroenterology* 95:S19-21
118. Schwab M, Klotz U (2001), Pharmacokinetic considerations in the treatment of inflammatory bowel disease, *Clin.Pharmacokinet.* 40: 723-751
119. Sears CL (2001), The toxins of *Bacteroides fragilis*, *Toxicon*, 39:1737-46
120. Sears, C., Myers, L.L., Lazenby, A. and Van Tassell, R.L. (1995) Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Clin. Infec.Dis.* 20: 142-8
121. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB (1998), Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice, *Infect.Immun.* 66: 5224-5231
122. Sharek, (2000) *Bifidobacterium adolescentis* modulates the specific immune response to another human gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron*, in gnotobiotic rats. *Immunobiology* 202, 429-441
123. Shagouang Wu, Kuei-Cheng LIM, Huang J., Roxan F., Sears C. (1998), *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-Cadherin, *Microbiology* 95: 14979-14984
124. Sheehan, G., and G. Harding (1989). *Intraperitoneal infections*. Academic Press, San Diego, p. 349-384
125. Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, Mine T, Koga Y. (2003) The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacterioides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol*; 47:371-8
126. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M (1996), Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD), *Gut* 39: 690-697
127. Shokouh-Amiri MH, Palnaes HC, Moesgaard F, Bulow S (1989), Psoas abscess complicating Crohn's disease, *Acta Chir Scand.* 155: 409-412
128. Soderholm JD, Olaison G, Lindberg E, Hannestad U, Vindels A, Tysk C, Järnerot G, Sjødahl R (1999b), Different intestinal permeability patterns in relatives and spouses of patients with Crohn's disease: an inherited defect in mucosal defence?, *Gut* 44: 96-100
129. Sonnenborn U, Greinwald R (1991), *Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora*, Schattauer Verlag,
130. Spath G, Hirner A (1998), Microbial translocation and impairment of mucosal immunity induced by an elemental diet in rats is prevented by selective decontamination of the digestive tract, *Eur.J.Surg.* 164: 223-228

131. Spitz J, Hecht G, Taveras M, Aoyo E, Alverdy J (1994), The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability: the role of bacterial adherence, *Gastroenterology* 106: 35-41
132. Stocker W, Bode W (1995), Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins, *Curr Opin Struct Biol.* 5:383-90
133. Stockmann M, Fromm M, Schmitz H, Schmidt W, Riecken EO, Schulzke JD (1998), Duodenal biopsies of HIV-infected patients with diarrhoea exhibit epithelial barrier defects but no active secretion, *AIDS* 12: 43-51
134. Stockmann M, Gitter AH, Sorgenfrei D, Fromm M, Schulzke JD (1999), Low edge damage container insert that adjusts intestinal forceps biopsies into Ussing chamber systems, *Pflugers Arch.* 438: 107-112
135. Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki SS, Honma T, Inoko H, Asakura H (2001), A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis, *Tissue Antigens* 57: 9-14
136. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke, Lochs (2002), Mucosal flora in inflammatory bowel diseases, *Gastroenterology* 122:44-45
137. Takesue Y; Ohge H; Uemura K; Imamura Y; Murakami Y; Jokoyama T; Kakehshi M; Sueda T (2002) Bacterial translocation in patients with Crohn's disease undergoing surgery, *Dis Colon Rectum*, 45:1665-71
138. Tally, F.P., P.R. Stewart, V.L. Sutter, and J.E. Rosenblatt. (1975). Oxygen tolerance of fresh clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1: 161-164
139. Trier JS (2002), Mucosal flora in inflammatory bowel disease: Intraepithelial bacteria or endocrine epithelial cell secretory granules?, *Gastroenterology* 123: 955
140. Truelove SC, Richards WCD (1956), Biopsy studies in ulcerative colitis., *BMJ* 3: 1315-1318
141. Tsujikawa T, Andoh A, Fujiyama Y (2003), Enteral and parenteral nutrition therapy for Crohn's disease, *Curr. Pharm. Des* 9: 323-332
142. Tvede M, Bondesen S, Nielsen OH, Rasmussen SN (1983), Serum antibodies to *Bacteroides* species in chronic inflammatory bowel disease, *Scand. J. Gastroenterol.* 18: 783-789
143. Ussing HH, Zerahn K. (1999). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. Reprinted from *Acta. Physiol. Scand.* 23: 110-127, 1951. *J Am Soc Nephrol.* 10:2056-65
144. Van der Waaij, D., J.M. Berhuis de Vries, and J.E.C. Lekkerkerk vander Wees (1971) Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated – treated mice. *J. Hyg.* 69:405-411
145. Veillon, M.H., and Zuber. (1898) Recherches sur quelques microbes strictement anaerobes et leur role en pathologie, *Arch. Exp. Med. Path. Anat.* 10:517-545
146. Weikel CS, Grieco FD, Reuben J, Meyers LL, Sack LB (1992) Human colonic epithelial cells, HT 29/C1, treated with crude *Bacteroides fragilis* enterotoxin dramatically alters their morphology. *Infect Immun.* 60:321-7
147. Whicher JT, Evans SW (1990), Cytokines in disease, *Clinical Chemistry*, 367: 1269-81
148. Wu S, Morin PJ, Maouyo D, Sears CL (2003), *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation, *Gastroenterology* 124: 392-400
149. Wu S; Lim KC; Huang J; Saidi RF (1998) *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin, *Sears CL Proc Natl Acad USA* 95:14979-84
150. Zhou J, Huang XY, Ren LC, Tang Y (2003), The influence of the LPS from *Bacteroides fragilis* on the secretion of IL-2 and IL-4 from the peripheral blood mononuclear cells of normal volunteers. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 19:82-5

## 7.

### **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei meinem geduldigen Betreuer PD Dr Anton Kroesen für die langjährige Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Es ist wirklich unglaublich, was Du für eine Geduld mit mir hattest. Privat möchte ich mich für die besondere Unterstützung von meinem Ehemann Jan bedanken, der mich sehr geduldig und mit seiner ganz „besonderen Art „ zum Endspurt meiner Arbeit unterstützt hat. Meinen Eltern möchte ich einen besonderen Dank widmen, sie haben mir immer das Gefühl gegeben , dass ich mit meinem Willen Berge versetzen kann. Es ist nicht ganz einfach über einen längeren Zeitraum, neben den üblichen Verpflichtungen im Leben, stets diese mir entgegen gebrachte Geduld und dieses unglaubliche Verständnis zu haben. Ihr habt in meinen Leben alle einen ganz besonderen Platz. Danke Mum, das ich mich zu 100 % immer auf Dich verlassen kann. Danke Daddy, daß Du mir seitdem ich denken kann, immer das Gefühl gegeben hast, das ich alles erreichen kann, wenn ich es wirklich will. Ich muss nur ganz fest daran glauben. Nicht zu vergessen ist meine beste Freundin Anne Katrin und Albert (unsere Freundin Albert), Ihr habt mir lückenlos immer das Gefühl gegeben, das Ihr an mich glaubt. Nicht zu vergessen meine Busenfreundin Julia. Es ist einfach herrlich mit Dir an meiner Seite, so viele Abschnitte gemeinsam zu erleben und zu genießen. An Dich Carola geht ein ganz besonderer Dank, durch Deine Colitis ulcerosa Erkrankung, wurde ich inspiriert mich ausführlicher, bis schließlich zur Dissertation über chronisch entzündliche Darmerkrankungen, zu beschäftigen. In guten, wie in schlechten Zeiten standen sie mir alle immer zur Seite.

Ich schätze es sehr, dass ich in meinen Leben solche Menschen an meiner Seite haben darf.

DANKE

**8. Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre, dass gegen meine Person keine gerichtlichen Vorstrafen vorliegen und kein staatsanwaltschaftliches Ermittlungsverfahren oder ein Disziplinarverfahren anhängig ist.

Lehrte, den 28.09.2008

---

Nicole Steenfatt, geb. Krüger

## **Erklärung**

„ Ich, Nicole Steenfatt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Bakterielle Permeation und epitheliale Barriereveränderungen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die ( unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

09.09.2008

Nicole Steenfatt