

## **4 Diskussion**

### **4.1 Methodenkritik**

Um die Permeabilität und gastrointestinale Barrierefunktion in vivo, ex vivo und in vitro zu untersuchen, gibt es verschiedene methodische Ansätze:

Zum einen ist in vivo die Messung der intestinalen Permeabilität durch die orale Gabe von biologisch inerten Substanzen und nachfolgender Bestimmung der renalen Ausscheidung der Testsubstanz im Urin möglich (siehe auch 1.2). Dies ist eine häufig auch in der humanen Diagnostik bei gastrointestinalen Erkrankungen verwendete Methode.

Des Weiteren sind im Tiermodell methodische Ansätze zur Untersuchung der intestinalen Permeabilität beschrieben: 1) In vivo kann am narkotisierten Versuchstier eine hydrophile Testsubstanz intravenös verabreicht werden und anschließend die Ausscheidung aus dem Plasma in das Darmlumen in einem isolierten Darmabschnitt („isolated loop“) gemessen werden (Lundin et al. 1997, Henrikson et al. 1989), 2) Ex vivo wird am Versuchstier ein Darmabschnitt entfernt, an beiden Enden ligiert, der dabei entstandene Darmsack („everted sac“) wird in einer Nährlösung inkubiert. Anschließend kann die Permeabilität anhand des gemessenen Fluxes von mucosal nach serosal bestimmt werden (Fink 2003).

In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir die Ussing-Methode. Dabei wurde von uns ein humanes Präparat aus dem Colon entnommen, partiell gestriipt und in die Ussingkammer eingesetzt (siehe auch 2.3). Das eingesetzte Epithel teilt den Versuchsaufbau in eine mucosale und eine serosale Seite, es können einerseits elektrophysiologische Parameter wie Kurzschlussstrom, Potentialdifferenz und transepithelialer Widerstand gemessen werden, andererseits kann auch die Permeabilität anhand der Messung von Permeationsraten bestimmter Testsubstanzen untersucht werden (Fink 2003). Die Ussing-Methode ist häufig zur Untersuchung der gastrointestinalen Barrierefunktion verwendet worden und stellt eine geeignete Methode dar, physiologische Vorgänge im Experimentalmodell zu untersuchen und eine qualitative Aussage hinsichtlich der epithelialen Transportvorgänge zu machen (Söderholm et al. 1998). Einen hervorragenden Überblick über Untersuchungen zur epithelialen Transportphysiologie mittels der Ussing-Technik geben Holtug et al. in einer

Übersichtsarbeit von 1996.

Eine Weiterentwicklung der elektrophysiologischen Untersuchung an Epithelien stellt die von Fromm et al. entwickelte Impedanzanalyse (Fromm et al. 1985), durch die eine Unterscheidung zwischen epithelialer und subepithelialer Gewebeleitfähigkeit möglich wird (Gitter et al. 1997) sowie die Conductance-scanning-Methode dar. Bei der Conductance-scanning-Methode wird durch die Anwendung von Mikroelektrodenpaaren eine weitaus größere räumliche Auflösung erreicht, wodurch eine Unterscheidung der Gewebeleitfähigkeit („Conductance“) von verschiedenen Arealen des Epithels, z.B. von Krypten- und Oberflächenepithel (Köckerling et al. 1993), von epithelialen Lecks (Gitter et al. 2001) oder die Unterschiede zwischen trans- und parazellulären Leitfähigkeiten (Gitter et al. 1997) bestimmt werden können.

Zur experimentellen Untersuchung von intestinalen Epithelien mit der Ussing-Technik können verschiedene Epithelien eingesetzt werden: So sind in der Literatur mehrere tierexperimentelle Ansätze beschrieben worden, unter anderem mit Gewebe von Mäusen (Homaidan et al. 1999), Ratten (Scheppach et al. 1995) und Kaninchen (Riegler et al. 1996).

Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von künstlich hergestellten, epithelialen Zelllinien wie HT-29/B6, T84 oder CaCo-2. Bei diesen Zelllinien handelt es sich um primär aus Tumorgewebe gewonnenen Zellen aus dem humanen Colon, die isoliert und gezüchtet werden und anschließend monolayers, das heißt einschichtige Gewebelagen ausbilden. Dabei bilden sich zwischen den Zellen tight junctions aus (Fink 2003). Die Verwendung von monolayers bietet sich an als Modellepithel für die Untersuchung der epithelialen Barrierefunktion. Für die Zelllinie HT-29/B6 wurde z.B. die Ausbildung von tight junctions sowie die Fähigkeit zur Sekretion von Chloridionen und zur Produktion von Mucus beschrieben (Kreusel et al. 1991). Kunzelmann und Mall (2002) beschrieben jedoch Unterschiede gegenüber physiologischen Epithelzellen hinsichtlich der Zusammensetzung und Struktur der tight junctions sowie des Vorhandenseins von spezifischen Ionen transportern.

Weiterhin kann in der Ussing-Kammer humanes Epithelgewebe untersucht werden. Die Gewinnung des Gewebes kann entweder durch endoskopisch entnommene Biopsien (Stockmann et al. 1999) erfolgen oder im Rahmen von chirurgischen Eingriffen, u.a.

Darmresektionen bei Karzinomen oder Colektomien bei Colitis ulcerosa (Schmitz et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Barriereeigenschaften von humanem Colonepithel. Das von uns verwendete Gewebe wurde von Patienten entnommen, die sich einem chirurgischen Eingriff zur Entfernung eines Darmtumors unterzogen. Wir verwendeten ausschließlich tumorfreies, makroskopisch intaktes Epithel. Um die Vitalität des Gewebes sicherzustellen, transportierten wir das Gewebe unmittelbar nach Entnahme des Resektates durch den Operateur in einer Kühlbox in unser Labor. Zwischen Entnahme im Operationssaal und Versuchsbeginn lagen maximal 45 Minuten.

Das Gewebe wurde vor Versuchsbeginn partiell gestrippt (Schulzke et al. 1986), mit Fibrinkleber auf einen Plastikring geklebt und in den Gewebecontainer eingesetzt (siehe auch 2.2). Technische Schwierigkeiten wie die Verletzung des Epithels bei der Präparation, Nekrotisierung im Randbereich des Epithels durch überschüssigen Fibrinkleber sowie Quetschung des Epithels beim Einbau in den Gewebecontainer wurden von uns beobachtet. Da diese Präparate unmittelbar nach Einbau in die Versuchsanordnung deutlich niedrigere Widerstandswerte und stark schwankende Kurzschlussstromwerte zeigten, wurden sie nicht in die Studie mit einbezogen. Weiterhin beobachteten wir eine Variabilität zwischen den Gewebeproben unterschiedlicher Patienten hinsichtlich der gemessenen Widerstandswerte. Um externe Einflussgrößen auszuschalten, achteten wir auf die enge Einhaltung von Ausschlusskriterien wie präoperative Chemo- oder Radiotherapie, medikamentöse Behandlung mit Corticoiden, Theophyllin, Antibiotika oder NSAR, Vor-Operationen am Gastrointestinaltrakt und gastrointestinale Erkrankungen (s. auch 2.1). Dennoch ergaben sich hinsichtlich der gemessenen transepithelialen Widerstände nach Erreichen des steady state Unterschiede zwischen den untersuchten Patientenproben. Diese erklären sich einerseits durch die interindividuelle Variabilität der Patienten sowie durch unterschiedliche OP-Techniken und Operateure, andererseits durch die Variabilität der Entnahmeorte im Colon (Colon descendens bzw. sigmoideum). Durch die Verwendung der relativen Darstellung zum Ausgangswert konnten die Unterschiede ohne Verlust an Aussagekraft ausgeglichen werden.

## 4.2 Experimentelles Schädigungsmodell

Um Störungen der gastrointestinalen Barrierefunktion untersuchen zu können, sind in der Literatur mehrere Methoden zur Induktion einer so genannten experimentellen Colitis in vitro beschrieben worden. Neben toxisch wirkenden Zytokinen (Mahraoui et al. 1997) wurden verschiedene chemische Agentien wie Ethanol (Loucks und Buell 1994, Lacy und Ito 1984), Formaldehyd (Cohen et al. 1986), Essigsäure (Argenzio und Meuten 1991), Desoxycholsäure (Argenzio et al. 1988, Henrikson et al 1989) und Salzsäure (Feil et al. 1989) zur experimentellen Schädigung des untersuchten Epithels verwendet.

Ziel unserer Versuche war, durch mucosal hinzugegebene Salzsäure einen initialen, im weiteren Verlauf jedoch reversiblen Barrierschaden herbeizuführen.

### 4.2.1 Experimentelle Schädigung durch mucosal gegebene Salzsäure

Die Wirkung von HCl auf die Mucosa in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes im Tierexperiment ist vielfach in der Literatur beschrieben worden (Orlando et al. 1984, Tobey et al. 1997, Nylander et al. 1989, Lundin et al. 1997). Im Hinblick auf das von uns untersuchte Colonepithel sind 3 Literaturstellen von besonderer Relevanz. Feil et al. (1989) untersuchten im Ussing-Experiment die Auswirkungen von HCl auf das Colonepithel von Kaninchen und Mensch nach mucosaler Exposition. Riegler et al. (1996) verwendeten das von Feil et al. beschriebene Schädigungsmodell zur Untersuchung der Wirkung von Epidermal Growth Factor (EGF) am Duodenum des Kaninchens. In einer weiteren Arbeit beschrieben Scheppach et al. (1986) den Effekt von L-Glutamin und n-Butyrat auf die Colonmucosa der Ratte nach experimenteller Schädigung mit HCl.

In der zitierten Arbeit von Feil et al. wird eine Exposition der humanen Colonmucosa mit HCl in einer mucosalen Konzentration von 10 mmol/l über einen Zeitraum von 10 Minuten beschrieben. Anschließend erfolgte ein mehrfacher Wechsel der Inkubationslösung zur Auswaschung der Salzsäure. Feil et al. beschrieben einen signifikanten Abfall der Potentialdifferenz (PD) unmittelbar nach Säureexposition, im weiteren Zeitverlauf blieb die PD auf einem signifikant niedrigeren Niveau. Nach morphometrischer Messung von histologischen Schnittpräparaten konnte direkt nach

Exposition eine oberflächliche Schädigung des Epithels zu ca. 95% beschrieben werden. Nach 5 Stunden verblieb ein Schaden von ca. 16%. Die Autoren führten diese Wiederherstellung des Epithels auf die Migration von Zellen aus dem intakten Epithel der Krypten entlang der intakten Basalmembran zur epithelialen lumennahen Oberfläche zurück (Feil et al. 1989). Dieser Prozess der Migration und Differenzierung von Epithelzellen aus intakten Epithelbereichen wird auch als „epithelial restitution“ bezeichnet (Lacy und Ito 1984).

#### 4.2.2 Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach mucosaler Exposition mit HCl

In unseren Experimenten verwendeten wir zunächst, wie bei Feil et al. 1989 bzw. Scheppach et al. 1986 beschrieben, HCl in einer mucosalen Konzentration von 10 und 15 mmol/l (Ergebnisse nicht dargestellt). In beiden Konzentrationen zeigte sich kein Effekt auf die von uns gemessenen Parameter transepithelialer Widerstand ( $R_T$ ) und Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ). In weiteren Versuchen erhöhten wir die Konzentration um jeweils 5 mmol/l. Auch bei Konzentrationen von 20 (pH 6,18) und 25 (pH 3,36) mmol/l zeigte sich wie bei den niedrigeren Konzentrationen kein messbarer Effekt. Abgesehen von Artefakten, bedingt durch die Pipettierung und den der Expositionszeit folgenden Wechsel der Badlösung blieb sowohl der Widerstand als auch der Kurzschlussstrom auf dem vor Exposition gemessenen Niveau. Im weiteren Zeitverlauf über 180 Minuten konnten wir keine Unterschiede zur Kontrollgruppe feststellen.

Hinsichtlich der unterschiedlichen Ergebnisse zu der Arbeit von Scheppach et al. liegt ein möglicher Erklärungsansatz in der fehlenden Vergleichbarkeit zwischen der Colonmucosa der Ratte und der humanen Colonmucosa. Feil et al. untersuchten ebenso wie wir humane Colonmucosa und konnten deutliche Effekte von HCl in einer mucosalen Konzentration von 10 mmol/l zeigen. Um Einflüsse der Badlösung auf die effektive Konzentration von HCl zu zeigen, wäre der pH der Lösung von großem Interesse. In der zitierten Arbeit wurde lediglich ein pH vor Exposition (pH=7,4) sowie nach Auswaschung der HCl aus der Badlösung (ebenfalls pH 7,4), jedoch kein pH während der Exposition angegeben. Möglicherweise wurden bei einer vergleichbaren Konzentration von HCl aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen ein stärkerer Abfall des pH und damit eine stärkere säurebedingte Schädigung des Epithels bewirkt.

Nach Exposition mit 30 (pH 2,36) bzw. 35 (pH 2,02) mmol/l fiel der transepitheliale Widerstand 30 Minuten nach mucosaler Exposition signifikant auf einen Wert von 59% bzw. 39% des Ausgangswertes ab, am Ende des Untersuchungszeitraumes nach 180 Minuten zeigte der  $R_T$  mit 99 bzw. 75% keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Hinsichtlich des  $I_{sc}$  zeigte sich bei beiden Konzentrationen ein gegenüber den Kontrollen signifikanter Anstieg 30 Minuten nach Exposition. Im weiteren Zeitverlauf blieb der Kurzschlussstrom konstant auf einem signifikant höheren Niveau. Diese Beobachtung spricht dafür, dass bei mucosaler Exposition mit 30 bzw. 35 mmol/l initial eine deutliche Schädigung der Mucosa bewirkt wird. Im weiteren Verlauf erfolgt die nahezu vollständige Wiederherstellung des transepithelialen Widerstandes. Der Anstieg des Kurzschlussstromes ist einerseits durch Abfall des Widerstandes physikalisch zu erklären ( $I=U/R$ , Ohm'sches Gesetz) zu erklären, andererseits könnte die Irreversibilität des Anstieges für eine anhaltende Aktivierung der Ionenkanäle begründet sein. Der durch Exposition mit Salzsäure bedingte primäre Barrierschaden könnte zu einem unkontrollierten Austausch von Ionen durch einen Leckflux führen. Wäre der  $I_{sc}$  jedoch ausschließlich durch diesen Leckflux bedingt, würde man mit steigendem transepithelialen Widerstand auch eine Normalisierung des  $I_{sc}$  erwarten. Der in unseren Experimenten gemessene anhaltend hohe  $I_{sc}$  spricht möglicherweise für eine anhaltende Aktivierung von spezifischen Ionentransportern.

Weiterhin untersuchten wir die Wirkung von HCl in mucosalen Konzentrationen von 40 (pH 1,97) und 45 (pH 1,66) mmol/l. Bei beiden Konzentrationen zeigte sich ein Abfall des  $R_T$  auf einen Wert von 15 bzw. 14% des Ausgangswertes. Im weiteren Verlauf konnte kein Anstieg des Widerstandes beobachtet werden. Bezüglich des  $I_{sc}$  zeigte sich nach Exposition mit 40mmol/l HCl kein Unterschied zu den Kontrollen. Bei 45 mmol/l HCl fiel der  $I_{sc}$  deutlich ab, eine Signifikanz konnte aufgrund der Fallzahl  $n=3$  nicht errechnet werden. Bei beiden Konzentrationen ist davon auszugehen, dass das Epithel irreversibel geschädigt ist. Dieser Eindruck wurde auch durch die Ergebnisse der histologischen Untersuchung bestätigt.

Am Abschluss unserer Versuche wurde Theophyllin serosal und mucosal hinzugegeben. Theophyllin bewirkt eine über den intrazellulären Transmitter cAMP vermittelte Sekretion von Chloridionen. Diese Sekretion bewirkt im Ussing-Experiment einen unmittelbar nach Zugabe messbaren Anstieg des  $I_{sc}$ . Bei unseren Experimenten

mit HCl in Konzentrationen von 20 bis 35 mmol/l mucosal zeigte sich hinsichtlich der Sekretionsantwort nach Zugabe von Theophyllin kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe. Dies spricht für das Vorliegen eines sekretionsfähigen Epithels zum Ende des untersuchten Zeitraumes. Nach Exposition mit 40 bzw. 45 mmol/l HCl fiel der Anstieg des  $I_{sc}$  nach Theophyllin sehr gering aus und war in der Gruppe 40 mmol/l deutlich signifikant verringert gegenüber den Kontrollen. Dies spricht für einen kompletten irreversiblen Schaden des Epithels, das untersuchte Gewebe ist nicht mehr fähig zum aktiven Transport von Cl-Ionen.

Am Ende unserer Versuche, das heißt nach Überprüfung der Sekretionsfähigkeit des Epithels und somit 180 Minuten nach Schädigung durch HCl, wurden die Gewebestücke aus den Ussing-Containern herausgenommen und in Formalin konserviert. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Herstellung der histologischen Schnitte im Histochemischen Labor des Institutes für Pathologie (s. auch Abschnitt 2.71). Zur Beantwortung unserer Fragestellung waren nur Schnitte geeignet, bei denen die Krypten sehr exakt längsgeschnitten dargestellt waren. Bei der Auswertung der histologischen Schnittbilder ergab sich eine sehr große Anzahl von nicht exakt getroffenen Schnitten, so dass auf die ursprünglich vorgesehene semiquantitative Auswertung verzichtet werden musste. Daher konnten wir in der vorliegenden Arbeit lediglich exemplarisch histologische Schnittbilder darstellen.

Die dargestellten histologischen Schnittbilder geben jedoch einen Eindruck der oben beschriebenen Veränderungen nach Exposition mit unterschiedlichen mucosalen Konzentrationen von HCl.

Bei Konzentrationen von 20, 25 und 30 mmol/l zeigten sich keine morphologischen Veränderungen gegenüber den Kontrollen. Nach Exposition mit 35 mmol/l zeigt das histologische Schnittbild ein intaktes Oberflächenepithel, lediglich im mittleren Abschnitt und in der Tiefe der Krypten zeigten sich geringe strukturelle Veränderungen. Es ist zu vermuten, dass unmittelbar nach Exposition mit Salzsäure das oberflächennahe Epithel geschädigt wurde. Möglicherweise erfolgte innerhalb des untersuchten Zeitraumes von 180 Minuten die Wiederherstellung der Oberfläche durch Migration von intakten Epithelzellen aus der Tiefe der Krypten. Nach Exposition mit 40 bzw. 45 mmol/l ist das Epithel nahezu komplett zerstört, die epitheliale Oberfläche erscheint aufgetrieben und zerfranst, im Bereich der gesamten Krypten ist die Basalmembran verbreitert und

teilweise unterbrochen. Hinsichtlich der Epithelzellen sind vermehrt apoptotische Zellfiguren und Reste von Zellkernen nach Kariolysis zu erkennen.

#### 4.2.3 Einordnung der eigenen Ergebnisse

Mucosale Konzentrationen von 20 und 25 mmol/l HCl hatten in unseren Experimenten keinen Effekt auf die Barriereigenschaften des untersuchten Epithels. Bei hohen Konzentrationen (40 und 45 mmol/l HCl) zeigte sich eine deutliche und irreversible Schädigung des untersuchten Epithels. Nach Exposition mit 30 und 35 mmol/l HCl konnten wir eine initiale Schädigung des Gewebes mit nachfolgender nahezu kompletter Wiederherstellung der Barrierefunktion feststellen. Die mucosale Konzentration von 35 mmol/l HCl wurde von uns in den weiteren Experimenten als Schädigungskonzentration gewählt.

### 4.3 Wirkung von LPS

#### 4.3.1 Effekt an der intakten Mucosa

In unseren Experimenten bewirkte die beidseitige Gabe von LPS in einer Konzentration von 10 µg/ml einen deutlichen Anstieg des Kurzschlussstromes  $I_{sc}$  innerhalb von 90 Minuten. Die serosale Gabe von LPS zeigte eine nahezu identische Sekretionsantwort der untersuchten Mucosa. Bei den Experimenten mit mucosaler Zugabe von LPS konnten wir hingegen keinen Effekt auf die Mucosa beobachten. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der Wirkort von LPS alleine auf der serosalen Seite des Epithels, d.h. an den subepithelialen Zellen der Lamina propria mucosae und der Submucosa zu vermuten ist. Diese Annahme wird gestützt durch weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Bühner et al. 2006, zur Publikation eingereicht). So zeigte die Zugabe von LPS im Ussing-Modell an epithelialen HT-29/B6-Monolayers keinen Effekt auf den  $I_{sc}$  oder den transepithelialen Widerstand. Dies spricht dafür, dass LPS keine direkte Wirkung auf die Enterozyten hat.

Die Ergebnisse von Robert und Rao (1996) bestärken unsere Vermutung, dass LPS auf der mucosalen Seite keinen Effekt auf die intakte epitheliale Barriere hat. Die Autoren konnten in einem In-vivo-Modell zeigen, dass die untersuchten Mäuse nach



intravenöser Injektion von LPS eine Diarrhöe entwickelten, bei oraler oder enteraler Verabreichung von LPS jedoch keine Symptome einer Barrierestörung zeigten (Robert und Rao 1996). Osman et al. (1998) untersuchten die Wirkung von LPS in vitro im Ussing-Modell. Sie konnten zeigen, dass die serosale Exposition des untersuchten Dünndarmes von Ratten mit LPS in Konzentrationen von 0,05 und 0,25 mg/ml innerhalb von 120 Minuten einen deutlichen Anstieg der Permeabilität für Cr-EDTA und BSA bewirkte. Konzentrationen von 0,01 mg/ml (entspricht der von uns untersuchten Konzentration von 10 µg/ml) zeigten keinen signifikanten Effekt gegenüber den Kontrollen hinsichtlich der Permeabilität der beiden Markersubstanzen. Die mucosale Zugabe von LPS zeigte keinen signifikanten Effekt. Elektrophysiologische Parameter wurden von den Autoren nicht gemessen.

Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass LPS auf der luminalen Seite der intakten epithelialen Barriere wahrscheinlich keinen Effekt hat.

In unseren Versuchen zeigte sich kein Effekt von LPS auf den transepithelialen Widerstand sowie auf die Sekretionsantwort nach Gabe von Theophyllin. Dies spricht dafür, dass während des Untersuchungszeitraumes von 180 Minuten keine Schädigung der Barriere eintrat und das Epithel in seiner Sekretionsfähigkeit nicht beeinträchtigt wurde. Unsere Ergebnisse stehen zunächst im Widerspruch zu den oben genannten Studien. Die im In-vivo-Modell von Robert und Rao beschriebene Diarrhöe sowie die erhöhte Permeabilität für Cr-EDTA und BSA nach Exposition mit LPS sprechen für eine epitheliale Barrierschädigung. Go et al. untersuchten die Wirkung von Endotoxin im In-vitro-Modell auf den Dünndarm von Ratten. Dabei konnten sie in der mit LPS behandelten Gruppe von Ratten im Ussing-Modell eine signifikant höhere Translokation von E.coli von mucosal nach serosal sowie eine signifikant niedrigere Potentialdifferenz nachweisen. Die Exposition erfolgte mit LPS durch eine intravenöse Injektion 24 h vor dem Einsatz des untersuchten Gewebes in die Ussingkammer (Go et al. 1995).

Im Gegensatz dazu wurde von uns LPS unmittelbar bei Versuchsbeginn in die Badlösung der Ussingkammer pipettiert und Messungen über einen Zeitraum von 3 Stunden durchgeführt. Es erscheint denkbar, dass 2 Faktoren die in unseren Versuchen ausbleibende Barrierestörung erklären: 1. Durch die intravenöse Gabe von LPS wird möglicherweise der Effekt von LPS durch die Interaktion mit im Serum vorhandenen Proteinfaktoren wie u.a. LBP und CD14 verstärkt und 2. ist der untersuchte Zeitraum

von 3 Stunden möglicherweise zu kurz, um mit elektrophysiologischen Untersuchungen eine Barriestörung messen zu können.

In unseren Experimenten bewirkte LPS (beidseits und serosal) einen Anstieg des Kurzschlussstromes mit einem Maximum bei etwa 90 Minuten. Diese starke Sekretionsantwort des Epithels auf LPS könnte begründet sein durch eine zytokinvermittelte Aktivierung von Ionen transportern mit nachfolgender Veränderung der Sekretions- und Transportvorgänge am Epithel. Es ist bekannt, dass die Produktion und Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ), IL-6, IL-8 durch epitheliale und subepitheliale Zellen des Darmes durch LPS stimuliert wird (Meyer et al. 1994, Ogle et al. 1997). Bisher nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten eine Erhöhung der Konzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 in der serosalen Badlösung nach vorheriger Inkubation des Epithels mit LPS (Bühner et al. 2006, zur Publikation eingereicht). Von besonderer Bedeutung unter den pro-inflammatorischen Zytokinen ist TNF- $\alpha$ : es ist gut untersucht, dass TNF- $\alpha$  über eine Induktion von Prostaglandinen zu einer Chloridsekretion des Epithels führt und damit möglicherweise zum Symptom der Diarrhöe bei CED beiträgt (Schmitz et al. 1999). In früheren Untersuchungen konnten Schmitz et al. zeigen, dass TNF- $\alpha$  innerhalb von 60 Minuten einen Anstieg des  $I_{sc}$  im Ussing-Experiment bewirkte (Schmitz et al. 1996). In der genannten Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde der Zusammenhang zwischen LPS und TNF- $\alpha$  näher untersucht: Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg des  $I_{sc}$  nach LPS durch vorherige Inkubation mit TNF- $\alpha$  - Antikörpern nicht beeinflusst wurde. Ebenso zeigten Untersuchungen mit IL-10 und IL-4 keinen Effekt auf die Sekretionsantwort nach LPS (Bühner et al. 2006, zur Publikation eingereicht). In der genannten Studie wurde weiterhin der Zusammenhang der sekretorischen Wirkung von LPS mit dem Vorhandensein von Prostaglandinen untersucht: Einerseits konnte gezeigt werden, dass LPS eine Erhöhung der Konzentration von PGE<sub>2</sub> in der Badlösung bewirkte, andererseits konnte der Effekt von LPS durch den Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin komplett blockiert werden.

Dies spricht für die Annahme, dass LPS möglicherweise über einen zytokin-unabhängigen Weg einen sekretorischen Effekt auf die humane Colonmucosa hat, der in Zusammenhang mit dem Auftreten von Diarrhöen stehen könnte.

#### 4.3.2 Effekt von LPS nach Schädigung mit HCl

Wie in 4.2.2 beschrieben, bewirkte eine mucosale Exposition mit 35 mmol/l HCl eine reversible Schädigung der epithelialen Barriere sowie einen Anstieg des  $I_{sc}$ . Bei nachfolgender mucosaler Zugabe von LPS zeigte sich der zeitliche Verlauf des transepithelialen Widerstandes unverändert gegenüber den Kontrollen. Hinsichtlich der Sekretionsantwort auf Theophyllin zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollen. Diese Ergebnisse zeigen, dass LPS bei einem vorgeschädigten Epithel in einem Zeitraum von 180 Minuten nicht zu einem weiteren Barrierschaden führt.

Weiterhin beobachteten wir in unseren Experimenten einen signifikanten Anstieg des  $I_{sc}$  nach mucosaler Exposition nach vorhergehender Schädigung mit HCl in einer Konzentration von 35 mmol/l. Aufgrund der vorher beschriebenen Beobachtung, dass mucosal hinzugegebenes LPS an der intakten Mucosa keinen Effekt zeigt, ist der nach Schädigung beobachtete Anstieg des  $I_{sc}$  nur durch eine Durchwanderung von LPS durch die epitheliale Barriere zu erklären. Dies würde bedeuten, dass im Darmlumen vorhandene Lipopolysaccharide bei einem entsprechenden initialen Ereignis, d.h. einer durch eine toxische Substanz, eine akute Entzündung oder eine systemischen Störung bedingten Schädigung der gastrointestinalen Barriere, die Epithelbarriere durchwandern könnten und auf der basolateralen Seite zu einer Reaktion führen könnten. Diese lokale Reaktion könnte u.a. durch eine vermehrte Freisetzung und Induktion von Zytokinen und Mediatoren oder aber direkt durch LPS vermittelt sein. Zu den lokalen Reaktionen ist sicherlich die von uns gemessene Steigerung der Ionensekretion zu zählen. Somit könnte intraluminales LPS, das die vorgeschädigte gastrointestinale Schleimhaut durchwandert, an der bei CED klinisch beobachteten Diarrhöe beteiligt sein.

In zahlreichen Arbeiten ist die im Rahmen einer Sepsis auftretende Endotoxinämie experimentell untersucht worden. Deitch et al. (1989) beschrieben eine gesteigerte bakterielle Translokation aus dem Darm als Resultat von erhöhten serosalen Konzentrationen von LPS. Nach Deitch sind folgende Faktoren von wichtiger Bedeutung für die bakterielle Translokation: a) Veränderungen der körpereigenen Darmflora mit nachfolgender Überbesiedlung des Darmes mit virulenten Keimen, b) eine eingeschränkte Immunabwehr und c) ein physischer Schaden („disruption“) der intestinalen mucosale Barriere (Deitch et al. 1989).

Unsere Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass im Darmlumen vorhandene Lipopolysaccharide unter den Bedingungen einer Schädigung der epithelialen Barriere in geringer Menge die Colonmucosa durchwandern können und zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion beitragen könnten. Damit könnte LPS bei der Entstehung einer Sepsis als Kofaktor beteiligt sein.

#### **4.4 Barriereprotektive Substanzen**

##### 4.4.1 Effekt von TGF- $\beta$ 1

Als wichtiger funktioneller Effekt von Wachstumsfaktoren (wie u.a. epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor (IGF), fibroblast growth factor (FGF), colony stimulating factors (CSF's), trefoil factors, transforming growth factors (TGF $\alpha$  und TGF $\beta$ 1) im Gastrointestinaltrakt gilt die Stimulation der Proliferation von Epithelzellen sowie die Beschleunigung der Zellmigration innerhalb eines Epithelkompartimentes (Dignass 1996). Von daher besteht ein besonderes Interesse daran, die Wirkung von Wachstumsfaktoren im experimentellen Schädigungsmodell zu untersuchen.

Zwei methodische Ansätze stehen dabei im Vordergrund:

Kann eine vorherige Inkubation mit einem Wachstumsfaktor eine nachfolgende Schädigung durch ein toxisches Agens verhindern bzw. abmildern?

Kann die Regeneration nach experimentell induzierter Schädigung des Epithels durch Zugabe eines Wachstumsfaktors positiv beeinflusst werden?

Der erste Ansatz wurde von Chen et al. (2002) näher untersucht. Anhand eines experimentellen Modells mit kultivierten gastrischen Epithelzellen von Kaninchen (monolayers) und Schädigung des Epithels mit HCl konnten die Autoren nachweisen, dass Epithelial Growth Factor (EGF) einen barriereprotektiven Effekt hat. EGF wurde 30 Minuten vor mucosaler Exposition mit HCl serosal bzw. mucosal hinzugegeben. Anschließend wurde HCl titriert bis zu einem pH von 2,5. Sowohl in der EGF-Gruppe wie auch in der Kontrollgruppe zeigte sich ein Abfall des transepithelialen Widerstandes im Ussing-Experiment, die vorherige mucosale Inkubation mit EGF bewirkte jedoch einen deutlich langsameren Abfall des Widerstandes. Mucosale Gabe von EGF ohne nachfolgende Schädigung mit HCl bewirkte einen Anstieg des Widerstandes sowie eine

Verringerung der Permeabilität für Mannitol (Chen et al. 2002). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die mucosale Inkubation mit EGF mittels einer Regulation des parazellulären Transportweges zu einer gesteigerten epithelialen Barrierefunktion führt.

Ein ähnlicher barriereprotektiver Effekt konnte neben Trefoil Peptides (Babyatski et al. 1996) auch für TGF- $\beta$ 1 an menschlichen T84 und HT-29 Zellkulturen gezeigt werden. Serosale Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 bewirkte einen Anstieg des Widerstandes sowie eine reduzierte Sekretionsantwort auf Sekretagoga wie Forskolin und Cholera toxin (Howe et al. 2002).

Der zweite genannte Ansatz wurde von Planchon et al. genauer untersucht. Die Autoren setzten T84 monolayer simultan dem barrierschädigenden Zytokin IFN- $\gamma$  sowie TGF- $\beta$ 1 aus. Der Effekt von IFN- $\gamma$  zeigte sich an Hand eines Abfalls des transepithelialen Widerstandes. Bei gleichzeitiger Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 zeigte sich ein signifikant höherer Wiederanstieg des Widerstandes (Planchon et al. 1994).

Diese Arbeiten zeigen eine erhöhte Evidenz für einen barriereprotektiven Effekt verschiedener Wachstumsfaktoren auf.

In unseren Versuchen verwendeten wir TGF- $\beta$ 1 in Konzentrationen von 10 und 20 ng/ml beidseits (simultan mucosal und serosal). Ohne vorherige Exposition mit HCl zeigte TGF- $\beta$ 1 in beiden Konzentrationen keinen Effekt auf die untersuchte Schleimhaut. Nach vorheriger Schädigung des Epithels mit HCl in einer Konzentration von 35 mmol/l mucosal konnte von uns ein positiver Effekt von TGF- $\beta$ 1 in den oben genannten Konzentrationen nicht gezeigt werden. Wir führten lediglich Pilotversuche zu den beiden genannten Konzentrationen durch, eine komplette Versuchsreihe mit statistischer Auswertung wurde nicht erstellt. Die von uns durchgeführten Versuche stellen einen Ansatz dar, eine mögliche positive Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die Wiederherstellung der epithelialen Barrierefunktion nach experimenteller Schädigung zu untersuchen. Dieser Effekt konnte von uns weder bestätigt noch widerlegt werden, ist aber weiterhin von großem wissenschaftlichem Interesse und bedarf weiterer Forschung.

#### 4.4.2 Effekt von Diosmectit

In der in Abschnitt 1.4.2 zitierten Arbeit von Mahraoui et al. (1997) wird ein barriereprotektiver Effekt von Diosmectit beschrieben. Mahraoui inkubierte epitheliale Monolayer für 1 Stunde mit Diosmectit in mucosalen Konzentrationen von 1, 10 und 100 mg/ml nach experimenteller Schädigung durch TNF- $\alpha$ . Durch die Gabe von TNF- $\alpha$  erfolgte ein Anstieg der Gewebeleitfähigkeit (mathematischer Kehrwert des transepithelialen Widerstandes) sowie der Permeabilität von Mannit und Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“, HRP). Das nach initialer Schädigung hinzugegebene Diosmectit bewirkte einen signifikanten Abfall der Gewebeleitfähigkeit sowie der Permeabilität von Mannit und HRP auf das Niveau der Kontrollgruppe ohne Schädigung durch TNF- $\alpha$  (Mahraoui et al. 1997). Diosmectit alleine ohne vorherige Zugabe von TNF- $\alpha$  hatte keinen Einfluss auf die Gewebeleitfähigkeit sowie auf die Permeabilitätsmarker.

In unseren Experimenten verwendeten wir Diosmectit in mucosalen Konzentrationen von 1 und 10 mg/ml. Diosmectit alleine ohne vorherige Barrierschädigung bewirkte in beiden Konzentrationen geringfügige Veränderungen des transepithelialen Widerstandes, nach vorheriger Schädigung mit HCl in einer mucosalen Konzentration von 35 mmol/l zeigte sich bei 1 mg/ml kein positiver Effekt auf den Widerstand im Sinne eines schnelleren oder höheren Anstiegs gegenüber der Kontrolle ohne Diosmectit. In einer mucosalen Konzentration von 10 mg/ml zeigt der in den Ergebnissen (vgl. 3.4.2) dargestellte Einzelversuch einen Wiederanstieg des Widerstandes auf ein gegenüber der Kontrolle höheres Niveau.

In unseren Versuchen löste sich das verwendete Diosmectit nicht in der sich im Wärmetauscher befindlichen Pufferlösung, so dass es zu Verwirbelungen in der Messkammer und zum Ausfallen der Substanz aus der Lösung kam. Diese beiden Erscheinungen bewirkten starke Artefakte und demzufolge eine große Streuung der gemessenen Werte. Wir verzichteten daher auf eine statistische Auswertung, die dargestellten Einzelversuche haben den Charakter von Pilotversuchen und sind daher nur bedingt aussagekräftig.

Ein positiver Effekt von Diosmectit in einer mucosalen Konzentration von 10 mg/ml auf die epitheliale Barriere lässt sich mit unseren Ergebnissen vermuten, bedarf aber einer weiteren Überprüfung.