

**Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

**Epitheliale Barrieredefekte als Pathomechanismus bei Colitis ulcerosa?
Messung von gastrointestinaler und Kolonpermeabilität im Rahmen einer Familienstudie**

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

Nora Geissler

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. C. Büning
2. Priv.-Doz. Dr. med. F. Obermeier
3. Priv.-Doz. Dr. med. N. Teich

Datum der Promotion: 04. Februar 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	2
1.1 Colitis ulcerosa	2
1.2 Hypothesen zur Pathogenese der Colitis ulcerosa.....	4
1.2.1 Genetische Prädisposition	4
1.2.2 Umweltfaktoren.....	4
1.2.3 Bakterien	5
1.2.4 Immunsystem	6
1.2.5 Barrieredefekt als zusätzlicher Pathomechanismus	6
1.3 Calprotectin	8
1.4 Herleitung der Aufgabenstellung	9
1.4.1 Permeabilität.....	9
1.4.2 Fäkales Calprotectin.....	10
1.4.3 Aufgabenstellungen.....	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Teilnehmer	12
2.1.1 Einschlusskriterien	12
2.1.2 Ausschlusskriterien	13
2.1.3 Medikamenteneinnahme	13
2.1.4 Kontraindikationen.....	13
2.2 Datenerhebung	14
2.2.1 Patienten	14
2.2.2 Verwandte und Lebensgefährten.....	15
2.3 Ethik-Kommission	15
2.4 Fäkales Calprotectin.....	15
2.4.1 Probenentnahme	15
2.4.2 Probenvorbereitung	16
2.4.3 Testdurchführung	16
2.5 Gastrointestinaler Permeabilitätstest.....	17

Inhaltsverzeichnis

2.5.1	Testutensilien	17
2.5.2	Durchführung des Testes.....	17
2.5.3	Probenrückgabe.....	18
2.5.4	Analyse der Urinproben	19
2.5.5	Auswertung und Interpretation des Analysevorganges.....	21
2.6	Statistik.....	22
2.6.1	Mann-Whitney-U-Test.....	22
2.6.2	Chi-Quadrat-Test.....	23
2.6.3	Exakter Test nach Fisher	23
2.6.4	Korrelationsanalyse.....	24
2.6.5	Boxplot.....	24
3	Ergebnisse	26
3.1	Permeabilität bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission	26
3.1.1	Phänotypisierung der Patienten.....	26
3.1.2	Ergebnisse des Permeabilitätstestes	26
3.1.3	Zusammenhang zwischen der Permeabilität und dem Befallsmuster	28
3.1.4	Zusammenhang zwischen der Permeabilität und der Medikation zum Zeitpunkt des Testes	29
3.1.5	Zusammenhang zwischen der Permeabilität und dem Alter	29
3.1.6	Zusammenhang zwischen der Permeabilität und dem Geschlecht	29
3.2	Permeabilität in den Familien der Colitis ulcerosa-Patienten	30
3.2.1	Untersuchung von genetisch Verwandten der Patienten.....	30
3.2.2	Untersuchung von nicht verwandten Lebensgefährten der Patienten	32
3.3	Fäkales Calprotectin.....	34
3.3.1	Korrelation des fäkalen Calprotectins zur Permeabilität.....	35
3.4	Eine Patientin mit ilioanalem Pouch	36
4	Diskussion	38
4.1	Permeabilität.....	39
4.1.1	Messung der Permeabilität	39
4.2	Permeabilität bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission	40
4.2.1	Permeabilität in Abhängigkeit vom Befallsmuster	43
4.2.2	Permeabilität in Abhängigkeit von der Medikation	44
4.2.3	Permeabilität in Abhängigkeit vom Alter und vom Geschlecht	45
4.3	Permeabilität in den Familien	46

Inhaltsverzeichnis

4.3.1	Permeabilität bei den Verwandten ersten Grades der Patienten	46
4.3.2	Permeabilität bei den nicht verwandten Lebensgefährten der Patienten.....	47
4.4	Fäkales Calprotectin.....	48
4.4.1	Fäkales Calprotectin in den einzelnen Gruppen.....	48
4.4.2	Korrelation des fäkalen Calprotectins zur Permeabilität.....	50
4.5	Eine Patientin mit ileoanalem Pouch	51
5	Zusammenfassung.....	54
6	Literaturverzeichnis.....	56
7	Anhang	61
7.1	Eidesstattliche Erklärung.....	61
7.2	Lebenslauf.....	62
7.3	Danksagung.....	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gastroduodenale Permeabilität	27
Abbildung 2: Intestinale Permeabilität.....	27
Abbildung 3: Kolonpermeabilität.....	27
Abbildung 4: Gastroduodenale Permeabilität	31
Abbildung 5: Intestinale Permeabilität.....	31
Abbildung 6: Kolonpermeabilität.....	31
Abbildung 7: Gastroduodenale Permeabilität	33
Abbildung 8: Intestinale Permeabilität.....	33
Abbildung 9: Kolonpermeabilität.....	33
Abbildung 10: relative Anzahl erhöhter Testergebnisse in den einzelnen Gruppen.....	34
Abbildung 11: Scatterplot Saccharose/ Calprotectin	36
Abbildung 12: Scatterplot L/M-Index/ Calprotectin	36

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der Teilnehmer an den einzelnen Untersuchungen.....	12
Tabelle 2: Zuckerkonzentrationen des internen Standards	21
Tabelle 3: Zuckerkonzentrationen der externen Standards	22
Tabelle 4: Merkmale der Patienten (absolute Patientenzahl).....	26
Tabelle 5: Permeabilität der einzelnen Darmabschnitte. Absolute (relative) Anzahl der Personen mit erhöhten Testwerten und Vergleich der Testergebnisse zwischen Patienten und Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test).....	27
Tabelle 6: Deskriptive Statistik Patienten	27
Tabelle 7: Permeabilität der einzelnen Darmabschnitte in Abhängigkeit vom Befallsmuster	28
Tabelle 8: L/ M-Index für zwei Untergruppen im Befallsmuster (exakter Fisher-Test).....	29
Tabelle 9: erhöhte intestinale Permeabilität und Azathioprin.....	29
Tabelle 10: Permeabilität der einzelnen Darmabschnitte. Absolute (relative) Anzahl der Personen mit erhöhten Testwerten und Vergleich der Testergebnisse zwischen Verwandten und Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test).....	30
Tabelle 11: Deskriptive Statistik Verwandte	31
Tabelle 12: Vergleich der Testergebnisse zwischen Patienten und Verwandten (Mann-Whitney-U-Test)	32
Tabelle 13: Vergleich der Testergebnisse der Lebensgefährten mit denen der anderen Testgruppen.....	33
Tabelle 14: Deskriptive Statistik Lebensgefährten	33
Tabelle 15: absolute (relative) Anzahl erhöhter Testergebnisse für fäkales Calprotectin	34
Tabelle 16: Vergleich der absoluten Testwerte für fäkales Calprotectin (Mann-Whitney-U-Test)	35
Tabelle 17: Korrelation Permeabilität/ Calprotectin nach Pearson.....	36
Tabelle 18: Testergebnisse für eine Patientin mit ilioanalem Pouch	37
Tabelle 19: Medikation der am Test teilnehmenden Patienten	44

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
BSG	-	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	-	beziehungsweise
ca.	-	circa
CD	-	Cluster of differentiation
CED	-	chronisch entzündliche Darmerkrankung(en)
cfu	-	colony forming unit
⁵¹ CrEDTA	-	(51) Cr-labelled ethylenediaminetetraacetic acid
CRP	-	c-reaktives Protein
MW	-	Mittelwert
NK-Zellen	-	natürliche Killerzellen
o. g.	-	oben genannte
ÖGD	-	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie
ppb	-	parts per billion
PEG 400	-	Polyethylenglykol 400
s. o.	-	siehe oben
sog.	-	so genannt
Stand.abw.	-	Standardabweichung
s. u.	-	siehe unten
Tab.	-	Tabelle
T. O. C.	-	Total Organic Carbon
u. a.	-	unter anderem
v. a.	-	vor allem
Z. n.	-	Zustand nach

1 Einleitung

1.1 Colitis ulcerosa

Die Colitis ulcerosa wird zusammen mit dem Morbus Crohn zu den wichtigsten chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gezählt. Dabei ist die Colitis ulcerosa die Erkrankung, bei der in erster Linie das Kolon betroffen ist. Die Erstmanifestation findet zunächst meist im Rektum statt und im späteren Krankheitsverlauf kann es zu einer Ausbreitung der Entzündung nach proximal kommen, wobei diese Ausbreitung typischerweise kontinuierlich verläuft und die entzündlichen Veränderungen auf die Mukosa beschränkt sind. Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch einen phasenhaften Verlauf, bei dem sich aktive Krankheitsphasen mit Phasen der Remission abwechseln. Auch chronisch aktive Verlaufsformen treten auf. Die Ätiologie der Erkrankung ist immer noch unklar.

Die Colitis ulcerosa wurde erstmalig 1859 von dem Engländer Samuel Wilks beschrieben. Die Prävalenz liegt derzeit bei etwa 80-120 Erkrankten pro 100.000 Einwohner (Siegmond et al. 2005). Wahrscheinlich liegt diese Zahl aber noch höher, da Erkrankungen mit mildem Verlauf bei ausschließlichem Befall des Rektums teilweise nicht diagnostiziert werden. Die Inzidenz wird mit 3-14 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr angegeben, wobei der Häufigkeitsgipfel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr liegt (Classen et al. 2004). Ein zweiter Höhepunkt der Inzidenz liegt laut älterer Studien im höheren Lebensalter (Siegmond et al. 2005, Dietel et al. 2009). Außerdem lässt sich eine ethnische und geografische Häufung von Erkrankungsfällen beobachten, wobei vor allem Nordeuropäer, Nordamerikaner sowie bestimmte jüdische Volksgruppen (Aschkenasim) häufiger betroffen sind. Weiterhin ist auffällig, dass sich für Verwandte ersten Grades eines an Colitis ulcerosa Erkrankten das Risiko, ebenfalls zu erkranken, um das vier- bis zehnfache erhöht im Vergleich zur Normalbevölkerung. Sind beide Eltern eines Kindes erkrankt, steigt die Erkrankungswahrscheinlichkeit für dieses Kind auf 50% (Classen et al. 2004). Beide Geschlechter sind in etwa gleich häufig betroffen.

Klinisch ist die Erkrankung durch blutig-schleimige Durchfälle mit schmerzhaften Stuhlentleerungen charakterisiert. Das Befallsmuster wird in drei große Gruppen unterteilt: ca. 50% der Patienten weisen einen alleinigen Befall des Rektosigmoids auf, bei ca. 25% kommt es zusätzlich zu einem Befall des linksseitigen Kolons und weitere 25% der Patienten leiden an einer Pankolitis. Bei einer kleinen Gruppe von Erkrankten kann es zur Ausbreitung der Entzündung in den letzten Teil des terminalen Ileums kommen, der so genannten „Backwashileitis“ (Classen et al. 2004, Herold 2006). Da bei der überwiegenden Mehrheit der

Patienten das distale Kolon von der Erkrankung betroffen ist, lokalisieren sich die Schmerzen meist im linken Unterbauch. Durch die aktive Flüssigkeitssekretion ins Darmlumen kommt es zu nächtlichen Stuhlentleerungen, Gewichtsverlust und in ausgeprägten Fällen auch zu Verschiebungen im Flüssigkeits- und Säure-Basen-Haushalt. Extraintestinale Manifestationen treten bei Patienten mit Colitis ulcerosa seltener auf als bei Patienten mit Morbus Crohn. So kommt es bei ca. 4% der Patienten zur Ausbildung eines Erythema nodosum oder eines Pyoderma gangraenosum. Das Erythema nodosum imponiert als eine schmerzhaft, überwärmte, rote, leicht erhabene Hautläsion, das Pyoderma gangraenosum ist durch die Entstehung einer eitrig-pustulösen Pustel, die zunächst in einen sterilen Abszess und später in ein schmerzhaftes Ulkus übergeht, gekennzeichnet. Die Pathogenese beider Hauterscheinungen ist unklar. Weiterhin leiden ca. 25% der Patienten an Arthropathien v. a. des Knie- und Sprunggelenks, die aber meist weder bei körperlichen Untersuchungen noch bei bildgebenden Verfahren pathologische Befunde zeigen. Ebenfalls mit einer Colitis ulcerosa assoziiert ist die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC): Zwischen ein und fünf Prozent der Colitis ulcerosa-Patienten leiden zusätzlich an einer PSC, aber bis zu 80% der PSC-Patienten sind ebenfalls an einer Colitis ulcerosa erkrankt (Dietel et al. 2009, Herold 2006).

Als wesentliche Komplikation der Colitis ulcerosa gilt die Ausbildung eines kolorektalen Karzinoms. Die Wahrscheinlichkeit ein solches zu entwickeln korreliert einerseits mit der Dauer der Erkrankung und andererseits mit dem Ausmaß des Befalls.

Das histologisch-pathologische Korrelat der aktiven Entzündung zeigt sich als ausgeprägte Hyperämie mit diffus verteilten, plasmazellreichen Entzündungsinfiltraten in der Mukosa. In den Kryptenlumina sammeln sich neutrophile Granulozyten an und treten als sog. Kryptenabszesse in Erscheinung. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu einer Veränderung der Kryptenarchitektur, welche auch in Remissionsphasen der Erkrankung als Ausdruck der Defektheilung bestehen bleibt (Riede et al. 2004).

Therapeutisch kommen Aminosalizylate, Kortikosteroide, Immunsuppressiva und Biologika zum Einsatz. Die ultima ratio bei therapierefraktärer Pankolitis stellt nach wie vor die totale Proktokolektomie dar.

Insgesamt ist die Colitis ulcerosa ebenso wie der Morbus Crohn eine Erkrankung mit vielen Komplikationen und Begleiterkrankungen. Dadurch reduziert sich die Lebensqualität der Patienten enorm, welches sich in einem hohen Leidensdruck äußert. Nicht zuletzt deswegen, sondern auch wegen der steigenden Inzidenz sollten die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Anlass für weitere Forschung bezüglich der Ursachen und Pathogenese geben.

1.2 Hypothesen zur Pathogenese der Colitis ulcerosa

Die Pathogenese der Colitis ulcerosa ist ebenso wie die des Morbus Crohn bis heute nur unzureichend geklärt. Während früher eine ausschließlich autoimmune Genese für die Krankheitsentstehung verantwortlich gemacht wurde, gibt es heute verschiedene Einflussfaktoren, welche immer wieder als bedeutend in der Entstehung des Krankheitsbildes diskutiert werden: eine genetische Prädisposition, der Einfluss von Umweltfaktoren, eine fehlregulierte Immunantwort, der Einfluss von Bakterien sowie eine veränderte epitheliale Barrierefunktion des Gastrointestinaltraktes.

1.2.1 Genetische Prädisposition

Mehrere epidemiologische Studien konnten zeigen, dass beide chronisch entzündlichen Darmerkrankungen familiär gehäuft auftreten (Orholm et al. 1991, Ahmad et al. 2001, Peña 1998). Orholm et al. zeigten, dass für Verwandte ersten Grades von Patienten mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn ein zehnfach höheres Risiko bestehe, ebenfalls diese Erkrankung zu entwickeln. Auch bestehe - im Vergleich zu einer Kontrollgruppe - für die Verwandten ersten Grades der Patienten ein etwas erhöhtes Risiko, die jeweils andere der beiden Erkrankungen zu bekommen. Eine Erblichkeit anhand von Zwillingsstudien konnten Tysk et al. (1988) eher für Morbus Crohn mit einer Konkordanz von 58,3% bei monozygoten Zwillingen zeigen als für Colitis ulcerosa, bei der die Konkordanz bei den monozygoten Zwillingen nur 6,3% betrug. In genetischen Kopplungsstudien konnten bestimmte Abschnitte der Chromosomen 1, 3, 5, 7, 10, 12, 16, 19 und dem X-Chromosom als Risikoregionen ausgemacht werden (Ahmad et al. 2004). Die einzelnen Regionen erhielten das Kürzel IBD und eine laufende Nummer, so z. B. IBD1 für die Region auf 16q12, IBD2 für die Region auf 12q13 etc.

1.2.2 Umweltfaktoren

Die ansteigende Erkrankungshäufigkeit, vor allem in den Industriestaaten, ist ein deutlicher Hinweis auf einen Einfluss der Umweltfaktoren in der Pathogenese beider chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl psychischer als auch physischer Stress mitverantwortlich für den Beginn einer Colitis ulcerosa sein kann (Herbert et al. 1993). Aber auch auf eine bereits bestehende Colitis ulcerosa kann länger andauernder Stress eine Schub auslösende Wirkung haben (Levenstein et al. 2000), wobei der genaue Mechanismus aber ungeklärt ist. Möglicherweise bewirkt der Einfluss von Stress eine Veränderung der epithelialen Barriere (Söderholm et al. 2001).

Umwelteinflüsse können ebenfalls als Triggerfaktoren für eine Entzündungsreaktion wirken (Peña 1998) und nicht zuletzt die Jahreszeiten wurden als Schub begünstigend beschrieben: Eine Studie aus Schweden beschreibt im Frühjahr und Herbst weitaus mehr Exazerbationen einer zuvor bestehenden Colitis ulcerosa als im Sommer (Tysk und Järnerot 1993). Außerdem wird der Wohnort mit zunehmend nördlicher Lage sowie ein hoher sozialer Status und ein hoher Bildungsgrad mit dem vermehrten Auftreten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert (Danese et al. 2004).

1.2.3 Bakterien

Es ist mehrfach die Vermutung geäußert worden, dass die bakterielle Besiedlung des Darmes einen Einfluss sowohl auf die Manifestation als auch auf den Krankheitsverlauf der Colitis ulcerosa hat. Schon unter physiologischen Bedingungen ist vor allem der Dickdarm dicht mit Bakterien besiedelt: 10^{11} bis 10^{12} Bakterien pro Gramm Faeces gelten als normal (Klinke und Silbernagl 2003). Die Besiedlung des Darmes findet erst nach der Geburt statt, wobei der Dünndarm eine geringere bakterielle Dichte aufweist (ca. 10^6 Bakterien pro ml Chymus). Erst distal der Valvula iliocaecalis ist ein massiver Anstieg der Bakterienzahl zu verzeichnen, welcher nochmals zunimmt, je weiter distal man ins Kolon vordringt. Damit ist vor allem die Kolonmukosa kontinuierlich einer hohen Anzahl an potentiellen Antigenen ausgesetzt. Bei der Untersuchung von Biopsaten aus Koloskopien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und von gesunden Kontrollpersonen zeigten Swidsinski et al. 2002, dass die CED-Patienten eine deutlich höhere Bakterienkonzentration aufwiesen im Vergleich zu Kontrollpersonen. Dies war unabhängig davon, ob das Biopsat aus einem entzündeten oder einem nicht entzündeten Darmabschnitt stammte. Außerdem war die Bakterienkonzentration umso höher, je schwerwiegender die Erkrankung ausgeprägt war. Die Zusammensetzung der gefundenen Bakterien entsprach auch bei den Patienten der physiologischen Bakterienzusammensetzung des Darmes. Bei Bakterienkonzentrationen $>10\ 000$ cfu pro μ l lagerte sich eine dichte Bakterenschicht an die intakte Mukosa an, wohingegen bei Bakterienkonzentrationen $>50\ 000$ cfu pro μ l charakteristische Einschlüsse von Bakterien in einzelnen Enterozyten, welche nahe der Lamina propria lagen, gefunden wurden. Daraus schlussfolgerte man, dass die Veränderungen in der Schleimhaut keine Folge der Entzündung darstellen, sondern als Ergebnis einer spezifischen Immunantwort zu werten seien. Die Hypothese lautet, dass eine gesunde Mukosa in der Lage wäre, diese Bakterien abzuwehren und dass diese Funktion aber bei den Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verloren gegangen sei. Duchmann et al. zeigten 1995, dass die physiologische Toleranz

gegenüber der eigenen bakteriellen Darmflora bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen offenbar gestört oder sogar aufgehoben ist, da es bei diesen Patienten zu einer gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus den Zellen des darmeigenen Immunsystems kommt.

1.2.4 Immunsystem

Die Colitis ulcerosa ist durch eine überschießende Immunreaktion gekennzeichnet, die sich gegen die bakterielle Darmflora richtet und innerhalb der Mukosa abläuft. An der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Immunreaktion sind hauptsächlich Th2-Lymphozyten und die von ihnen produzierten Zytokine beteiligt. Es kommt zu einem Ungleichgewicht in der Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Die Schwere dieses Ungleichgewichtes bestimmt das Ausmaß der mukosalen Schädigung und somit das klinische Erscheinungsbild (José León et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die T-Zellen aus der Lamina propria der Darmmukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa signifikant mehr Interleukin-13 (IL-13) und weniger IFN- γ bilden im Vergleich zu Kontrollpersonen. Die IL-13-Produktion geht von NK-Zellen aus und hat ein zytotoxisches Potential für die Epithelzellen der Darmmukosa (Fuss et al. 2004). Dies kommt durch einen Anstieg der epithelialen Apoptose und eine Dysfunktion der epithelialen Barriere zum Ausdruck: Als Folge der vermehrten IL-13-Produktion kommt es zu einer erhöhten Expression des Poren bildenden tight junction-Proteins Claudin-2 (Heller et al. 2005). Dadurch imponiert die Colitis ulcerosa mit epithelialen Lecks, welche schon frühzeitig im Krankheitsverlauf auftreten und als Folge der Mikroerosionen zu verstehen sind (Mankertz et al. 2007). Weiterhin weiß man, dass Th2-Zellen an ihrer Oberfläche CD30 tragen. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa konnte unabhängig von der Aktivität der Erkrankung ein erhöhter Spiegel an CD30 im Serum nachgewiesen werden (Giacomelli et al. 1998), wodurch die Hypothese einer Th2-überwiegenden Immunantwort zusätzlich gestützt wird.

1.2.5 Barrieredefekt als zusätzlicher Pathomechanismus

Die Oberfläche des Gastrointestinaltraktes ist durch ihren besonderen anatomischen Aufbau die größte Organoberfläche des menschlichen Körpers. Allein der Dünndarm besitzt durch die Strukturen der Zotten und Krypten, welche die makroskopische Dünndarmoberfläche um das 7- bis 14fache vergrößern, eine Austauschfläche von etwa 180 m². Der Gastrointestinaltrakt des Menschen verfügt über mehrere Mechanismen, um seine Abwehr- und Barrierefunktion aufrecht zu erhalten:

1. unspezifische Mechanismen im Darmlumen:

Durch Faktoren wie der proteindenaturierenden Wirkung der Salzsäure des Magens, der enzymatischen Spaltung durch Proteasen aus dem Pankreas, der Mukusekretion an die Darmoberfläche und der darmeigenen Peristaltik kommt es zu einer Limitierung der Antigenaufnahme.

2. GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue):

Das GALT besteht aus Solitärfollikeln, Peyer-Plaques, diffus verteilten lymphatischen Zellen und lymphozytenreichen Zotten. An Stellen, an denen die Darmschleimhaut durch die Follikel domartig aufgetrieben ist, liegen zwischen den Enterozyten vereinzelt M-Zellen, welche Bakterien, Viren und andere Antigene endozytieren. Diese werden über Transzytose an das lymphatische Gewebe der Follikel abgegeben und dadurch wird eine Immunantwort ausgelöst. Ein wesentliches Merkmal der darmspezifischen Immunabwehr sind die freigesetzten Zytokine, welche sowohl an der Entstehung der Entzündung als auch an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind.

3. intaktes Epithel der Mukosa:

Die intraepitheliale Permeabilitätsbarriere wird aus dem einreihigen Epithel der Mukosa und den Interzellularspalten gebildet, der Zusammenhalt des Epithels wird durch Desmosomen, gap junctions und tight junctions gewährleistet, wobei die tight junctions hauptsächlich für den parazellulären Stofftransport verantwortlich sind.

Im Dünndarm erfolgt der Stofftransport durch die intakte Darmwand auf zweierlei Wege: zum einen gibt es den transzellulären Transport, welcher meist durch aktive Transportmechanismen (Carrier, Kanäle) gewährleistet wird, und zum anderen den parazellulären Transport, welcher passiv mittels Diffusion funktioniert. Letzterer ist abhängig vom elektrochemischen Gradienten und der Durchlässigkeit der tight junctions (Argenzio 1984). Diesen intraepithelialen Anteil der Permeabilitätsbarriere bezeichnet man auch als intrinsischen Anteil. Der extrinsische Anteil besteht dagegen aus Schleim, Bikarbonat und Immunglobulinen. Er stellt eine der Darmmukosa aufgelagerte unbewegliche Schicht (sog. „unstirred water layer“) dar und wirkt als Diffusionsbarriere. Das enthaltene IgA dient als erste Immunbarriere und neutralisiert luminale Antigene.

Ist die gastrointestinale Permeabilität gesteigert, bedeutet dies eine vermehrte Exposition der Darmflora gegenüber luminalen Antigenen. Damit ist ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von lokalen oder systemischen Erkrankungen als Ausdruck der Abwehrreaktion verbunden.

Für den Morbus Crohn ist die veränderte Permeabilität als Pathomechanismus in der Entstehung der Erkrankung bereits etabliert: So zeigten Bühner et al. 2006, dass nicht nur Morbus Crohn-Patienten, sondern auch deren Angehörige ersten Grades eine erhöhte gastrointestinale Permeabilität aufweisen. Dabei wurde die erhöhte Permeabilität bei den verwandten Angehörigen als Hinweis auf eine Erblichkeit der Erkrankung angesehen. Außerdem wurden nicht verwandte Lebensgefährten der Patienten untersucht, um einen möglichen Einfluss von Umweltfaktoren auf die Permeabilität wider zu spiegeln. Hier zeigt sich aber, dass die Permeabilität der nichtverwandten Lebensgefährten - vergleichbar mit den gesunden Kontrollpersonen - niedrig war. Eine Erhöhung der Permeabilität bei Morbus Crohn-Patienten ist bereits vor dem Ausbruch der Erkrankung nachweisbar und wird heute ebenfalls als Marker für ein Rezidiv der Erkrankung verwendet (Irvine et al. 2000, Wyatt et al. 1993).

Welche Rolle spielt nun die Permeabilität in der Pathogenese der Colitis ulcerosa? Mehrere Studien haben bei Patienten mit Colitis ulcerosa die Darmpermeabilität untersucht (Munkholm et al. 1994, Gibson et al. 1988, Nejdors et al. 1998). Dabei sind die Ergebnisse nur eingeschränkt verwertbar, da es sich entweder um in vitro-Untersuchungen handelt oder die verwendete Markersubstanz nicht für die Untersuchung des Dickdarmes geeignet ist. Die Aussagen speziell zur Kolonpermeabilität bei Colitis ulcerosa sind relativ rar. Arslan et al. fanden 2001 eine signifikant höhere Permeabilität für $^{51}\text{CrEDTA}$ bei Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Außerdem korrelierte die Permeabilität bei den Patienten mit der Schwere der Erkrankung.

Zusammenfassend ist aber nach wie vor unklar, ob die Erhöhung der Permeabilität eine Rolle in der Pathogenese der Colitis ulcerosa spielt.

1.3 Calprotectin

Calprotectin ist ein Calcium und Zink bindendes Protein aus der S100-Gruppe mit antimikrobiellen Eigenschaften, welches sowohl im Serum als auch im Stuhl nachweisbar ist. Mehreren Studien zufolge ist Calprotectin im Stuhl sowohl bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als auch bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Das Calprotectin befindet sich zum überwiegenden Teil im Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Epithelzellen. Es stellt 60% der löslichen Bestandteile bzw. 5% des Gesamtproteins der neutrophilen Granulozyten dar. Daraus lässt sich ableiten, dass eine erhöhte Permeabilität der Darmschleimhaut für neutrophile Granulozyten vorliegen muss: Bei o. g. Erkrankungen kommt es zu einer deutlich vermehrten Invasion der Neutrophilen in die Schleimhaut und damit zu einer erhöhten Calprotectin-

Konzentration im Stuhl. Diese korreliert mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Darmlumen und somit mit der Entzündungsaktivität (Fagerberg et al. 2007). Folglich kann man die Bestimmung des Calprotectins im Stuhl sowohl als (Früh)marker in der Diagnostik als auch als Aktivitäts- bzw. Verlaufsmarker für das Therapiemonitoring bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einsetzen (Tibble et al. 2002, Wassell et al. 2004). Auch zeigt Calprotectin ein Rezidiv einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung mit höherer Sicherheit an als die bisher verwendeten Standardparameter CRP und Hb (Immundiagnostik AG 2007).

Von Roon et al. haben eine Metaanalyse von 30 Studien mit insgesamt knapp 6.000 Patienten durchgeführt, bei denen sie den Calprotectingehalt im Stuhl mit dem histologischen Untersuchungsergebnis verglichen haben. Dafür haben sie die Sensitivität, die Spezifität und die diagnostische Odds Ratio für jede Studie berechnet. Im Ergebnis zeigte sich, dass Calprotectin ein Parameter mit hohem negativen prädiktiven Aussagewert ist: bei niedrigen Messwerten im Stuhl liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit keine organische Erkrankung im Gastrointestinaltrakt vor (Immundiagnostik AG 2007).

1.4 Herleitung der Aufgabenstellung

Die Colitis ulcerosa ist genau wie der Morbus Crohn eine multifaktorielle Erkrankung, die auf der Grundlage einer genetischen Veranlagung unter dem Einfluss von exogenen Faktoren entsteht. Dabei ist unklar, ob eine Störung der epithelialen Barriere eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielt. In dieser Arbeit sollen nun wie in der bereits erwähnten Morbus Crohn-Studie von Bühner et al. (2006) nicht nur Patienten, sondern auch Verwandte und nicht verwandte Lebensgefährten der Patienten untersucht werden, um eine Differenzierung zwischen genetischer Disposition und dem Einfluss von Umweltfaktoren auf die Permeabilität zu ermöglichen. Dazu wird erstmals die Sucralose als spezifischer Marker für die Dickdarmpermeabilität verwendet. Zusätzlich wird das fäkale Calprotectin als Marker für eine - auch subklinische - Inflammation bestimmt. Anschließend soll aufgezeigt werden, ob eine Korrelation zwischen der gestörten Permeabilität und dem fäkalen Calprotectin besteht.

1.4.1 Permeabilität

Die genaue Pathogenese der Colitis ulcerosa ist nicht geklärt. Eine veränderte Permeabilität der Darmwand ist möglicherweise ein wichtiger Faktor entweder in der Entstehung der Erkrankung oder aber in der Unterhaltung der Entzündung. So könnten bei einer erhöhten Permeabilität der Darmwand Antigene aus dem Darmlumen die Mukosa vermehrt durchdringen und dadurch ihren Beitrag für die Unterhaltung der Entzündung leisten.

Für den Morbus Crohn ist bereits eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität sowohl bei Patienten in Remission als auch bei deren Verwandten ersten Grades festgestellt worden (Bühner et al. 2006). Eine gleichzeitige Untersuchung der nichtverwandten Lebensgefährten der Patienten als Hinweis für den Einfluss von Umweltfaktoren auf die Permeabilität konnte keine Erhöhung der intestinalen Permeabilität zeigen. Ob auch in der Remissionsphase der Colitis ulcerosa eine Erhöhung der Permeabilität der Darmwand - insbesondere im Kolon - vorliegt, ist bislang völlig unklar. Deshalb sollen in Anlehnung an die o. g. Morbus Crohn-Studie auch in dieser Arbeit Patienten in Remission und deren Verwandte ersten Grades sowie deren nichtverwandte Lebensgefährten und gesunde Kontrollpersonen untersucht werden.

1.4.2 Fäkales Calprotectin

Bei der Colitis ulcerosa kommt es im Rahmen der ablaufenden Entzündungsreaktion zu einer Invasion von neutrophilen Granulozyten in die Darmschleimhaut und damit zu einer Erhöhung des fäkalen Calprotectins. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob es auch in der Remissionsphase zu einer Erhöhung des fäkalen Calprotectins kommt und ob die Höhe des gemessenen Wertes mit einer Veränderung der Permeabilität in Zusammenhang steht.

1.4.3 Aufgabenstellungen

- I. Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission:
 - a) Findet sich bei diesen Patienten überhaupt eine Erhöhung der Permeabilität? Und wenn ja, wo ist diese lokalisiert:
 1. gastroduodenal?
 2. intestinal?
 3. im Kolon?
 - b) Wenn sich eine Erhöhung der Permeabilität ergibt, bei welchen Patienten findet man diese? Ergibt sich ein Zusammenhang
 1. zum Befallsmuster?
 2. zur Medikation?
 3. zum Alter?
 4. zum Geschlecht?
- II. Findet sich eine Erhöhung der Permeabilität in den Familien der Patienten?
 - a) Untersuchung von genetisch Verwandten ersten Grades. Gibt es einen Unterschied, ob diese im gleichen Haushalt mit den Patienten leben oder nicht?

- b) Untersuchung von nicht verwandten Lebensgefährten der Patienten.

Die Untersuchung von genetisch Verwandten ersten Grades und nicht verwandten Lebensgefährten der Patienten soll eine Unterscheidung in endogene und exogene Einflussfaktoren bei der Pathogenese ermöglichen.

III. Fäkales Calprotectin als Marker für eine intestinale Inflammation:

- a) Haben die Colitis ulcerosa-Patienten in Remission ein erhöhtes fäkales Calprotectin?
- b) Haben die Verwandten ersten Grades der Patienten ein erhöhtes fäkales Calprotectin?
- c) Haben die nicht verwandten Lebensgefährten der Patienten ein erhöhtes fäkales Calprotectin?

Wenn ja, ergibt sich eine Korrelation mit der Permeabilität?

2 Material und Methoden

2.1 Teilnehmer

Alle 89 Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, waren an Colitis ulcerosa erkrankt. Die Erkrankung wurde anhand von standardisierten klinischen, endoskopischen, histologischen oder radiologischen Kriterien diagnostiziert (Nikolaus und Schreiber 2007). Die Patienten wurden allesamt an der Universitätsmedizin Charité Berlin an den beiden Standorten Campus Charité Mitte und Campus Virchow Klinikum rekrutiert. Weitere Teilnehmer der Studie waren Verwandte ersten Grades und nicht verwandte Lebensgefährten der Patienten, die nach Kontaktvermittlung durch die Patienten Interesse an der Teilnahme zeigten. Dabei war bei den Lebensgefährten die Voraussetzung, dass sie mit den Patienten im gleichen Haushalt leben, bei den Verwandten war dies nicht erforderlich. Zur Referenz wurden 99 nicht mit den Patienten verwandte, gesunde Freiwillige als Kontrollgruppe rekrutiert. Alle teilnehmenden Personen waren Kaukasier und gaben ihre informierte Einwilligung.

Alle genannten Studienteilnehmer nahmen am gastrointestinalen Permeabilitätstest teil, einige von ihnen gaben zusätzlich eine Stuhlprobe zur Bestimmung des fäkalen Calprotectins ab (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Anzahl der Teilnehmer an den einzelnen Untersuchungen

	Permeabilitätstest	Calprotectin
CU-Patienten	89	60
CU-Verwandte ersten Grades	35	30
CU-Lebensgefährten	24	18
Kontrollen	99	0

2.1.1 Einschlusskriterien

Damit die Ergebnisse des gastrointestinalen Permeabilitätstestes vergleichbar sind, ist es notwendig, dass alle Teilnehmer die gleichen Bedingungen erfüllen:

- Patienten in klinischer Remission
- mindestens drei Wochen Abstand zum letzten akuten Schub
- eine Woche Abstand zur letzten Ösophago-Gastro-Duodenoskopie, zwei Wochen Abstand zur letzten Koloskopie
- drei Monate Abstand zur letzten Operation im Gastrointestinaltrakt
- acht Wochen Abstand zu einer parenteralen Ernährung

2.1.2 Ausschlusskriterien

Es gibt mehrere Faktoren, die die gastrointestinale Permeabilität beeinflussen (s. Kap. 4.1.1). Um den Einfluss von Störfaktoren auf die Untersuchungsergebnisse möglichst gering zu halten, wurden alle potentiellen Teilnehmer, sobald sie eines der nachfolgenden Kriterien erfüllten, von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen:

- insulinpflichtiger Diabetes mellitus Typ I oder II, Pankreasinsuffizienz
- Urtikaria
- Glutensensitive Enteropathie
- Short-Bowel-Syndrom, Ileostoma, vorausgegangene Bilroth I- oder –II-Operationen, Z.n. Gastrektomie
- Nierenerkrankungen, z. B. Nierensteine, Niereninsuffizienz
- bekannte maligne Erkrankungen
- Einnahme von hoch dosiertem Kortison (> 25 mg/ d) oder regelmäßige Aspirineinnahme (> 100 mg/ d)
- bei den Verwandten oder Lebensgefährten der Patienten: jede Operation im Gastrointestinaltrakt oder die Einnahme von Steroiden bzw. Immunsuppressiva

2.1.3 Medikamenteneinnahme

Da auch viele Medikamente die gastrointestinale Permeabilität beeinflussen können, sollten Patienten nach Möglichkeit auf alle Medikamente in den letzten 24 Stunden vor dem Test verzichten, vor allem aber auf Diuretika oder fiebersenkende Mittel. Weiterhin sollten sie die Abenddosis der aktuellen CED-Medikation wie 5-ASA, Steroide, Immunsuppressiva möglichst auslassen. Bei regelmäßiger Einnahme von NSAID, Antibiotika oder Abführmitteln musste diese von allen Teilnehmern mindestens zehn Tage vor dem Test pausiert werden. Für die Verwandten und Lebensgefährten war die Einnahme von Steroiden oder Immunsuppressiva ein Ausschlusskriterium.

2.1.4 Kontraindikationen

- gastrointestinale Stenosesymptomatik, Ileus
- Toxisches Megakolon
- Magen-/ Darmperforation
- unstillbares Erbrechen
- schwere Nierenfunktionsstörungen

2.2 Datenerhebung

2.2.1 Patienten

Die Erhebung der Daten erfolgte anhand der Krankenakten der Patienten. Mit Hilfe dieser wurden die Patienten nach phänotypischen Merkmalen in Untergruppen unterteilt:

I Befallsmuster:

- Befall nur des Rektums
- Linksseitenkolitis
- Pankolitis
- Backwashileitis

II Alter bei Testdurchführung:

- Alter < 40 Jahre bei der Testdurchführung
- Alter < 40 Jahre bei der Diagnosestellung
- Alter > 40 Jahre bei der Testdurchführung
- Alter > 40 Jahre bei der Diagnosestellung

III Medikamenteneinnahme zum Zeitpunkt des Testes:

- 5-ASA (oral/ rektal)
- Kortikosteroide (oral \leq oder $>$ 20 mg pro Tag/ rektal)
- Budesonid
- Azathioprin
- 6-Mercaptopurin

Außerdem erhielten alle Patienten Fragebögen, in denen folgende Daten aufgenommen wurden:

- Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht
- Zeitpunkt der Erstdiagnose
- aktuelle Medikamenteneinnahme
- Zeitpunkt des letzten Schubes
- Termin der letzten endoskopischen Untersuchung (ÖGD, Koloskopie)
- bisherige operative Eingriffe (Art, Zeitpunkt, Grund)
- weitere Erkrankungen
- Allergien/ Nahrungsmittelunverträglichkeiten
- Vorkommen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in der Familie
- Raucherstatus (Raucher/ Nichtraucher/ Ex-Raucher)

2.2.2 Verwandte und Lebensgefährten

Auch von den Verwandten und Angehörigen wurden anhand von Fragebögen folgende Daten aufgenommen:

- Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht
- Verhältnis zum Patienten und Wohnsituation zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt des Testes (gleicher Haushalt?)
- Beschwerden/ Erkrankungen im Magen-Darmbereich, Operationen im Magen-Darmbereich
- aktuelle Medikamenteneinnahme
- weitere Erkrankungen
- Allergien/ Nahrungsmittelunverträglichkeiten
- Raucherstatus (Raucher/ Nichtraucher/ Ex-Raucher)

2.3 Ethik-Kommission

Die Messung der gastrointestinalen und Kolonpermeabilität wurde 2001 und 2007 von der Ethikkommission der Charité genehmigt.

2.4 Fäkales Calprotectin

Zur Messung des fäkalen Calprotectins verwendeten wir folgende Geräte und Utensilien:

- Calprotectin ELISA Kit zur in vitro Bestimmung von Calprotectin (MRP 8/ 14) in Stuhl: Immundiagnostik AG (Bensheim, Deutschland)
- Multiplate-counter: VICTOR™ 3: Perkin Elmer (Waltham, USA)
- Microplate-washer: TECAN (Männedorf, Schweiz)
- DUO-Therm-Hybridisierungsöfen: BIOMETRA Biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen, Deutschland)

2.4.1 Probenentnahme

Alle Teilnehmer erhielten ein Stuhlröhrchen, mit dem sie selbständig zu Hause eine Stuhlprobe entnehmen sollten. Dabei war es wichtig, dass die Entnahme vor der Durchführung des Permeabilitätstestes erfolgte, damit die Stuhlprobe von den im Test zugeführten Zuckern unbeeinflusst blieb. Die Stuhlprobe wurde von den Teilnehmern bis zur Abgabe in unserem Stoffwechsellabor im Kühlschrank aufbewahrt und wurde bei uns im Labor bis zur weiteren Verarbeitung bei minus 20°C tief gefroren.

2.4.2 Probenvorbereitung

Zur Aufarbeitung des Stuhls wurde aus jedem Stuhlröhrchen eine Menge zwischen 80 und 120 mg entnommen. Zu jeder Probe wurde 5 ml Puffer dazu gegeben – unabhängig von der Einwaage. Die unterschiedliche Größe der Stuhlproben wurde später bei der Auswertung durch Verwendung eines jeweils angepassten Verdünnungsfaktors, welcher einer mitgelieferten Tabelle entnommen werden konnte, ausgeglichen. Anschließend wurden die Proben mit dem Puffer gut gemischt. Jeder Suspension wurde ca. 1 ml entnommen und bei 13000 G für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:50 mit Waschpuffer verdünnt und 100 µl dieser Verdünnung sind pro Vertiefung im Test verwendet worden. Falls die Testdurchführung nicht innerhalb von 48 Stunden stattfand, wurden die Proben, wie in den Empfehlungen des ELISA Kits angegeben, erneut bei minus 20 °C gelagert.

2.4.3 Testdurchführung

Für die Messung der Calprotectinwerte in den verdünnten Stuhlproben verwendeten wir die „Sandwich“-ELISA-Technik. Dabei wurden neben den zu untersuchenden Stuhlproben auch Teststandards und Kontrollen untersucht. Die verwendete Mikrotiterplatte war mit hochaffinen monoklonalen anti-humanen Calprotectin-Antikörpern beschichtet und jeweils zwei Proben, Teststandards und Kontrollen wurden als Doppelbestimmung in verschiedene Vertiefungen pipettiert. Danach wurde die gesamte Platte bei 37°C unter Schütteln für eine Stunde inkubiert. Dabei wurde das Calprotectin aus der Probe von dem an die Mikrotiterplatte gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Anschließend wurden alle Vertiefungen geleert und fünfmal mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Nun gab man in jede Vertiefung 100 µl des Detektionsantikörpers, welcher ebenfalls ein monoklonaler anti-humaner Calprotectin-Antikörper (biotinyliert) war. Anschließend wurde die gesamte Platte erneut für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert, wodurch nun der Detektionsantikörper an das Calprotectin der Proben binden konnte. Danach wurden wieder alle Vertiefungen geleert und fünfmal mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen. Jetzt gab man 100 µl Konjugat aus Extravidin (markiert mit Peroxidase) in alle Vertiefungen und im Anschluss wurde die Platte noch einmal bei 37°C für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Dabei bildete sich folgender Komplex an der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes Calprotectin – Detektionsantikörper (biotinyliert) – Peroxidasekonjugat. Nach erneutem Waschen, wie bereits beschrieben, gab man nun 100 µl Tetramethylbenzidin als Substrat der Peroxidase in alle Vertiefungen. Es folgte wieder eine schüttelnde Inkubation bei 37°C, diesmal aber nur für zehn bis 20 Minuten. Die ablaufende Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Säure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau

nach gelb erfolgte. Diese entstandene farbige Verbindung wurde sofort im Photometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm gemessen. Die Intensität der Farbe in den einzelnen Vertiefungen ist direkt proportional zum Calprotectingehalt in den Proben. Gleichzeitig wurde eine Standardkurve, bei der die optische Dichte gegen eine Standardkonzentration gemessen wurde, erstellt. Diese Messung erfolgte ebenfalls bei 450 nm gegen 620 nm.

Die ermittelte Calprotectinkonzentration wird nun erst mit dem der Tabelle entnommenen Verdünnungsfaktor (s. o.) und dann mit 50 (zweite Verdünnungsstufe) multipliziert. Als Normwerte gelten Calprotectinwerte unter 15 mg/l. Dabei entspricht ein g Stuhl einem ml.

2.5 Gastrointestinaler Permeabilitätstest

2.5.1 Testutensilien

- 500 ml-Sammelbehälter für Morgenurin
- Testlösung mit 20 g Saccharose, 10 g Lactulose, 5 g Mannitol, aufgefüllt auf 100 ml mit Aqua bidest.
- sechs Kapseln mit insgesamt 2 g Sucralose
- 2000 ml-Sammelbehälter für den gesamten Urin der ersten fünf Stunden des Testes
- 2 x 2000 ml-Sammelbehälter für den gesamten Urin der darauf folgenden 21 Stunden des Testes
- Testanleitung, Datenblatt, Fragebogen
- ggf. Versandbehälter mit vier Urin-Monovetten für den gekühlten Rücktransport der Testmaterialien mit der Post, wenn die Teilnehmer außerhalb Berlins wohnten

Die Zuckerlösung und die Sucralose-Kapseln wurden in der Apotheke des Universitätsklinikums Charité Berlin hergestellt und mit einem Haltbarkeitsdatum versehen.

Da der gesammelte Urin vor bakterieller Kontamination geschützt werden sollte, wurde allen vier Urinsammelgefäßen eine Spatelspitze Natriumazid zugesetzt (NaN_3 ; $M = 65,01 \text{ g/mol}$). Dieses gehört laut Gefahrstoffverordnung zur Klasse 2 bzw. Gruppe T+, so dass alle Behälter mit einem Warnhinweis versehen wurden und alle Teilnehmer auf dem Datenblatt darauf aufmerksam gemacht wurden. So konnte bei sachgemäßer Handhabung ein Kontakt mit der Chemikalie ausgeschlossen werden.

2.5.2 Durchführung des Testes

Die Teilnehmer des Permeabilitätstestes führten den Test zu Hause durch. Dabei war es wichtig, dass sie eine 48-stündige Alkoholkarenz einhielten, da bekannt ist, dass Alkohol die

Permeabilität der Darmmukosa beeinflussen kann (Bjarnason et al. 1984). Weiterhin mussten sie, wie bereits oben beschrieben, in den 24 Stunden vor dem Test auf alle Medikamente verzichten. Wenn dies bei den Patienten nicht möglich war, so ließen sie zumindest die abendliche Dosis vor dem Test weg. Die letzte Mahlzeit war um 18 Uhr am Vorabend des Testes erlaubt.

Am Testmorgen begann die Prozedur mit dem Auffangen eines nativen Morgenurins in den bereit gestellten 500 ml-Behälter (mit „A“ beschriftet), damit dieser später als Referenz und Nüchternkontrolle herangezogen werden konnte. Danach tranken die Teilnehmer die zubereitete Zuckerlösung innerhalb von zehn Minuten aus und schluckten damit auch gleichzeitig die Sucralose-Kapseln hinunter. Trinken von Wasser war zunächst nicht gestattet, ebenso wenig Zähneputzen, Kaugummi kauen, essen, rauchen und die morgendliche Medikamenteneinnahme. Der gesamte Urin, welcher nun in den folgenden fünf Stunden anfiel, wurde in einem der 2000 ml-Behälter (mit „B“ beschriftet) aufgefangen. Nach zwei Stunden sollten die Teilnehmer eine vorgeschriebene Menge Wasser trinken, welche mindestens 250 ml, höchstens jedoch 1000 ml betrug. Nach den ersten fünf Stunden des Testes wurde die letzte Urinportion in Gefäß „B“ aufgefangen und danach durften die Teilnehmer wieder essen, trinken und ihre Medikamente einnehmen. Alkohol trinken war weiterhin nicht gestattet und auch wurden die Patienten gebeten, möglichst bis zum Testende auf das Rauchen zu verzichten. War ihnen dies wegen starker Abhängigkeit nicht möglich, sollten sie aber die Menge an Zigaretten so stark wie möglich einschränken. In den verbleibenden 21 Stunden des Testes wurde der gesamte anfallende Urin in den beiden übrigen 2000 ml-Behältern (beschriftet mit „C“) gesammelt. Somit war der Permeabilitätstest nach 26 Stunden beendet und die Teilnehmer durften ihren normalen Lebensgewohnheiten nachgehen.

2.5.3 Probenrückgabe

Um den enzymatischen Abbau der nun im Urin enthaltenen Zucker so gering wie möglich zu halten, mussten die Testteilnehmer die Urinbehälter so schnell wie möglich zu uns in das Stoffwechsellabor der Charité bringen, spätestens aber nach 24 Stunden. Dort wurde dann aus allen Urinfraktionen (A, B und C) eine Probe von jeweils 10 ml entnommen. Außerdem wurden die Fraktionen B und C im Anschluss daran zusammen gegossen und daraus eine weitere Probe („D“ genannt) entnommen. Alle vier Probenröhrchen wurden dann bis zur weiteren Aufarbeitung in unserem Labor bei minus 20° C tief gefroren.

Die Teilnehmer, die nicht in Berlin wohnhaft waren, haben all diese Abfüllschritte zu Hause selbst durchgeführt. Dazu erhielten sie von uns vier Urinmonovetten sowie einen

Versandbehälter, mit dem sie die Proben in tief gefrorenem Zustand zusammen mit den Dokumentationsbögen an uns zurückschicken konnten.

2.5.4 Analyse der Urinproben

Zur Analyse der Urinproben mussten diese zunächst aufbereitet werden. Dazu wurden alle vier tief gefrorenen Proben aufgetaut und jeweils 500 µl entnommen. Zu diesen wurden jeweils 50 µl des internen Standards MET (Monosaccharid Meso-Erythrit und Disaccharid Turanose) als Kaliberlösung hinzu gegeben. Anschließend wurden jeder Probe 50 µl 20 %ige Sulfosalicylsäure zur Eiweißausfällung zugesetzt. Danach wurden die Proben durch Zugabe jeweils einer Spatelspitze des Ionenaustauscherharzes Amberlite MB-3 entsalzt und die in ihnen enthaltenen Farbstoffe gebunden. Nach einem Schütteln der Proben wurden sie bei 2000 G zehn Minuten lang zentrifugiert. Ein Überstand von 500 µl wurde abpipettiert und stellte die Grundlage für die Analyse mittels High Performace Liquid Chromatography (HPLC) dar. Für die eigentliche Analyse mussten die Proben nochmals stark verdünnt werden: Dazu wurden 10 µl einer Probe mit 990 µl Reinstwasser (s. u.) auf 1000 µl aufgefüllt. Somit ergab sich eine 1:100 fache Verdünnung, welche für die Analyse verwendet wurde.

Für die Analyse der aufbereiteten Proben wurden folgende Geräte und Reagenzien benutzt:

- HPLC-System: Dionex (Idstein, Deutschland)
- Gradientenpumpe GS 50
- Elektrochemischer Detektor ED 40
- Vorsäule: CarboPacTM PA1 (4 x 50 mm)
- Trennsäule: CarboPacTM PA1 (4 x 250 mm)
- Autosampler AS 100: TSP (San Jose, USA)
- Reinstwasseranlage: Millipore (Molsheim, Frankreich)
- Zentrifuge: Biofuge fresco; Hereaus Instruments (Berlin, Deutschland)
- Eppendorf-Mixer 5432: Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg, Deutschland)
- Zucker für die Standardmessungen (Lactulose, Mannitol, Saccharose, Meso-Erythrit und Turanose) und Natriumacetat zur Eluentenherstellung: Fluca (Buchs, Schweiz)
- Sucralose für die Standardmessungen: Tate & Lyle (Whiteknights, UK)
- Sulfosalicylsäure, Amberlite MB-3 und Natriumazid: Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Natriumhydroxid zur Eluentenherstellung: J. T. Baker (AA Derenter, Holland)

Zur Analyse der Proben nutzen wir eine spezielle Form der HPLC, die so genannte HPAE-PAD (High Performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection). Diese bot zum einen eine sehr sensitive Meßtechnik zur Analyse von Zuckermolekülen und konnte andererseits die Vorteile der HPLC, wie Schnelligkeit bei der Probenanalyse und eine gute Auflösung bei der Trennung von Stoffgemischen, sicherstellen. Durch die hohe Sensitivität konnten sogar Substanzmengen im subpicomolaren Bereich quantifiziert werden.

Als stationäre Phase diente die Trennsäule CarboPacTM PA1 (4 x 250 mm). Dabei handelt es sich um einen pelikulären Anionenaustauscher, welcher eine Trennung von Mono- und Disacchariden ermöglicht. Das enthaltene Trägermaterial (chemisch inertes, sulfoniertes Polystyrol-Divinylbenzolharz) hat einen Teilchendurchmesser von ca. 5 µm. Um die Sensitivität und die Genauigkeit des Messergebnisses nochmals zu erhöhen, wurde vor die eigentliche Trennsäule die Vorsäule CarboPacTM PA1 (4 x 50 mm) geschaltet. Erst damit konnte die bereits erwähnte Sensitivität im subpicomolaren Bereich erreicht werden.

Als mobile Phase wurden zwei verschiedene Eluenten verwendet. Beide wurden mit Reinstwasser aus unserem Labor hergestellt. Dieses hatte bei 25°C eine Leitfähigkeit von 18 MΩ/cm und einen sehr geringen Anteil an organischen Bestandteilen (T.O.C. < 3 ppb). Zur Herstellung des ersten Eluenten wurden 11,8 ml einer 50%igen NaOH-Lösung mit Reinstwasser auf 1,5 Liter aufgefüllt. Daraus ergab sich eine Molarität von 150 mmol/l. Für den zweiten Eluenten wurden 11,8 ml der 50%igen NaOH und 61,53 g Natriumacetat mit Reinstwasser auf 1,5 Liter aufgefüllt. Hieraus ergab sich für das NaOH wieder eine Molarität von 150 mmol/l und für das Natriumacetat von 500 mmol/l. Für beide Eluenten ergab sich ein pH-Wert im stark basischen Bereich. Abschließend wurden beide Eluenten für zehn Minuten mit Helium durchströmt. Dadurch wurden freie Gase wie CO₂ und O₂ aus der mobilen Phase verdrängt, welche sonst Reduktionsreaktionen eingehen oder eine Carbonatbildung verursachen könnten. Diese Heliumeinleitung erfolgte außerdem jeweils 20 Minuten vor und nach Zugabe der Eluenten in das HPLC-System.

Die Eluenten wurden in Form eines sog. Gradientenlaufes zum System gegeben, d. h. die Menge der Eluenten zueinander wechselt ständig in Abhängigkeit von der Zeit. Diese Methode ist notwendig, damit sich die Sucralose wieder vollständig aus der Trennsäule lösen kann.

Vor dem Start des Analysevorganges wurde die Trennsäule CarboPacTM PA1 mit NaOH-Lösung gespült. Anschließend führte der Autosampler AS 100 dem HPLC-System 25 µl der verdünnten Probe zu. Gleichzeitig wurden die Eluenten ins System eingeleitet. Alles zusammen gelangte zuerst zur Gradientenpumpe GS 50, welche die Trennsäule CarboPacTM PA1 enthält, und danach zum elektrochemischen Detektor ED 40. Dieser arbeitet mit drei verschiedenen Elektroden: An

der Goldelektrode, welche als Arbeitselektrode dient, laufen die Redoxreaktionen ab. Eine pH-Elektrode aus Ag/AgCl dient als Referenzelektrode und hält das Potential der Goldelektrode konstant. Der Strom wird mittels einer Hilfselektrode abgeleitet. Da die Zucker im basischen Milieu an der Goldelektrode oxidieren, konnte man sie durch Messung des Stromes an der Elektrodenoberfläche quantifizieren. Das Messpotential der Zucker lag bei -0,01 bis 0,05 Volt. Andere Inhaltsstoffe der Proben unterliegen bei dieser Spannung kaum Redoxreaktionen, somit ist sie für die zu messenden Kohlenhydrate hochspezifisch. Auch die hohe Verdünnung half, Wechselwirkungen bei der Trennung und der Detektion zu verhindern (Dionex 1989).

Die einzelnen Zuckerfraktionen werden einerseits durch Ionenaustausch der anionisch vorliegenden Zuckermoleküle und andererseits durch Adsorptionsvorgänge am Grundgerüst des polymeren Ionenaustauschers voneinander getrennt. Zwar unterscheiden sich die unterschiedlichen Zucker kaum in ihrer molekularen Zusammensetzung und in ihren pKa-Werten, trotzdem war es möglich, sie zu unterscheiden: Die Adsorptionsvorgänge der einzelnen Zucker an den Elektroden dauern unterschiedlich lange und somit verbleiben die verschiedenen Zuckerfraktionen unterschiedlich lange im System, d. h., sie besitzen unterschiedliche Retentionszeiten. In folgender Reihenfolge verlassen die Zuckerfraktionen die Trennsäule: Meso-Erythrit – Mannitol – Saccharose – Lactulose – Sucralose. Dadurch können die auf dem PC erscheinenden Peakflächen den einzelnen Fraktionen zugeordnet werden.

2.5.5 Auswertung und Interpretation des Analysevorganges

Die Berechnung der Zuckerkonzentrationen in den Urinproben erfolgte anhand von Standardkurven. Dazu wurde vor Zugabe der Proben zum System eine Kalibrierung mit externen Standards durchgeführt. Diese enthielten alle Komponenten, welche in den Proben bestimmt werden sollten, als reine Substanzen in bekannten Konzentrationen. Dabei entsprachen die Konzentrationen von Meso-Erythrit und Turanose dem internen Standard und waren in allen vier Eichlösungen gleich hoch (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Zuckerkonzentrationen des internen Standards

	Meso-Erythrit (mmol/l)	Turanose (mmol/l)
Interner Standard	25	1,5

Dagegen stiegen die Konzentrationen von Saccharose, Lactulose, Mannitol und Sucralose in den unterschiedlichen Eichlösungen an (siehe Tab. 3). Die Kalibrierung wurde jeweils nach sechs Probenanalysen wiederholt.

Tabelle 3: Zuckerkonzentrationen der externen Standards

Externer Standard	Mannitol (mmol/l)	Lactulose (mmol/l)	Saccharose (mmol/l)	Sucralose (mmol/l)
0	3	0,15	0,15	0,15
I	5	0,25	0,25	0,25
II	10	0,5	0,5	0,5
III	20	1	1	1

Der interne Standard wurde, wie bereits oben beschrieben, zu allen Proben dazugegeben. Somit war eine Kontrolle über die Verwertbarkeit des Messergebnisses möglich.

Da Mannitol vom menschlichen Organismus auch in kleinen Mengen endogen gebildet wird, wurde die Menge, welche im Morgenurin (Gefäß A) gemessen wurde, von der im Sammelurin gemessenen Menge abgezogen. Alle im Urin gemessenen Konzentrationen wurden als prozentualer Anteil der oral zugeführten Zuckermenge angegeben. Dabei stellte Sac% (prozentualer Anteil der Saccharose) ein Maß für die gastroduodenale, Lac%/ Man% (Lactulose/ Mannitolindex als prozentualer Anteil der aufgenommenen Menge) ein Maß für die intestinale und Suc% (prozentualer Anteil der Sucralose) ein Maß für die Kolonpermeabilität dar (s. Kap. 4.1.1).

Die Festlegung der Grenzwerte für die einzelnen Zucker erfolgte anhand der Untersuchung eines Kollektivs gesunder Kontrollpersonen. Eine Störung der Barrierefunktion wurde angenommen, sobald der Grenzwert (Mittelwert \pm zwei Standardabweichungen) über- bzw. unterschritten wurde.

2.6 Statistik

2.6.1 Mann-Whitney-U-Test

Dieser Test kann verwendet werden, um zwei voneinander unabhängige Stichproben miteinander zu vergleichen. Es erfolgt eine Prüfung auf Lageunterschiede zwischen den Populationen. Dazu wird jeder Wert der einen Stichprobe mit jedem Wert der anderen Stichprobe verglichen. Voraussetzung sind allgemein ordinal skalierte Merkmale.

Die zugrunde gelegte Nullhypothese H_0 besagt, dass es keinen Unterschied in der Verteilung zwischen den beiden Gruppen gibt. Eine stetige Verteilungsfunktion für beide Stichproben ist dabei die Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieses Testverfahrens. Da der Mann-Whitney-U-Test unempfindlicher bei Datenausreißern ist, kann er vor allem gut bei Verteilungen angewandt werden, die von der Normalverteilung abweichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Test verwendet, um die Permeabilität der Darmwand unserer Patienten, deren Verwandten, deren Lebensgefährten und der Kontrollpersonen jeweils miteinander zu vergleichen.

2.6.2 Chi-Quadrat-Test

Den Chi-Quadrat-Test verwendet man zur Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen, also bei Variablen, die ein nominales Skalenniveau haben. Dazu muss die Stichprobe ausreichend groß sein, da sonst die Zuverlässigkeit der Aussage nicht gewährleistet werden kann.

In dieser Arbeit wurde der Chi-Quadrat-Test u. a. verwendet, um die Frage zu klären, ob eine Erhöhung der Permeabilität in einem bestimmten Darmabschnitt häufiger bei Einnahme eines bestimmten Medikamentes vorkommt. Jede Testperson hat zwei Merkmale: Erhöhung der Permeabilität (ja/ nein) und Einnahme des Medikamentes (ja/ nein), für welches der Test durchgeführt wird. Dabei überprüft man die zugrunde gelegte Hypothese, ob die Merkmale, die man untersuchen will, voneinander unabhängig sind. Es ergeben sich vier Teilgruppen, für die die beobachteten Häufigkeiten in eine Kreuztabelle eingetragen werden. Diese werden dann mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes mit den erwarteten Häufigkeiten verglichen. Dabei entspricht jedem Chi-Quadrat-Wert eine Signifikanz p . Der p -Wert trifft eine Aussage über das Signifikanzniveau der untersuchten Stichprobe, d. h., es wird ermittelt, wie hoch die Irrtumswahrscheinlichkeit für die zugrunde gelegte Hypothese ist. Normalerweise sollte diese Irrtumswahrscheinlichkeit nicht mehr als 5% betragen, d. h., der p -Wert liegt bei $\leq 0,05$. Liegt der p -Wert im Bereich zwischen 0,05 und 0,01 spricht man von „signifikant“, liegt er sogar unter 0,01, ist das Ergebnis „hoch signifikant“.

2.6.3 Exakter Test nach Fisher

Um auch für kleinere Stichproben zuverlässige Aussagen zu erhalten, kann man den exakten Test nach Fisher verwenden. Er ist ebenfalls ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit und das Einsatzgebiet entspricht dem des Chi-Quadrat-Testes. Die Grundlage für den exakten Test stellt eine Vierfeldertafel dar und es sind bereits Aussagen möglich, wenn pro Feld weniger als fünf Beobachtungen vorhanden sind. Es werden Kombinationen von Zellhäufigkeiten bei gleich bleibenden Zeilen- und Spaltensummen gebildet. Daraus werden im Test bedingte Wahrscheinlichkeiten für Zellhäufigkeiten bei gleich bleibenden Randsummen errechnet. Dies geschieht nicht nur für den vorgegebenen Fall, sondern auch für extremere Fälle und die Ergebnisse der Wahrscheinlichkeiten werden addiert. Unter Annahme einer Nullhypothese H_0 kann so die Wahrscheinlichkeit für die Zufälligkeit der beobachteten Verteilung berechnet

werden. Lag die Wahrscheinlichkeit p unter 0,05, konnte die Nullhypothese H_0 abgelehnt werden, da dies als statistisch signifikant gilt.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Test z. B. verwendet, um die Abhängigkeit der Permeabilität vom Befallsmuster zu untersuchen.

2.6.4 Korrelationsanalyse

Eine Korrelationsanalyse kann durchgeführt werden, um den Zusammenhang zwischen zwei oder mehr Merkmalen zu beschreiben. Dabei ist es wichtig, dass beide Merkmale gleichberechtigt sind, da nur so die Stärke des Zusammenhanges richtig quantifiziert werden kann. Die Darstellung des Zusammenhanges der beiden Merkmale erfolgt graphisch mit Hilfe eines Scatterplots („Punktwolke“). Dazu wird ein Merkmal auf der x-Achse und das andere auf der y-Achse abgetragen. Je stärker die Korrelation ist, desto schmaler erstreckt sich die Punktwolke entlang einer gedachten Gerade.

Man unterscheidet bei der Korrelationsanalyse die nach Pearson von der nach Spearman. In der vorliegenden Arbeit wurde die Korrelationsanalyse nach Pearson verwendet, da hier die Voraussetzung ist, dass es sich um einen linearen Zusammenhang zweier quantitativer Merkmale handelt. Der Korrelationskoeffizient liegt im Wertebereich von -1 bis +1. Er liegt im positiven Bereich, wenn hohen Werten des einen Merkmals hohe Werte des anderen Merkmals entsprechen, also die (gedachte) Gerade durch die Punktwolke eine positive Steigung hat. Andersherum ergibt ein negativer Korrelationskoeffizient eine fallende Gerade. Der Korrelationskoeffizient liegt näher an 1 bzw. -1, je stärker der Zusammenhang zwischen den untersuchten Merkmalen ist und liegt nahe an null, wenn kein linearer Zusammenhang besteht.

2.6.5 Boxplot

Boxplots werden verwendet, um die Verteilung numerischer Daten grafisch darzustellen. Als Box wird dabei das Rechteck bezeichnet, in dem sich 50% der Daten befinden. Sie wird durch das obere und untere Quartil begrenzt, wobei sich oberhalb des oberen Quartils noch 25% der Messdaten befinden und oberhalb des unteren Quartils 75% der Daten liegen. Der Interquartilsabstand (IQR = interquartile range) ist durch die Länge der Box abzulesen und ist ein Maß für die Streuung der Messwerte. Weiterhin ist der Median in die Box eingezeichnet, wodurch ebenfalls ein Eindruck über die Verteilung der Messwerte gewonnen werden kann.

Ober- und unterhalb der Box befinden sich die sog. Whisker (Antennen). Sie stellen alle Daten dar, die noch innerhalb des 1,5-fachen IQR liegen. Dabei wird ihre Länge durch die Daten bestimmt, welche gerade noch innerhalb dieses Abstandes liegen.

Als Ausreißer bezeichnet man Messwerte, die außerhalb des 1,5-fachen IQR liegen und damit nicht mehr von den Antennen erfasst werden. Man unterscheidet milde Ausreißer, welche zwischen dem 1,5-fachen und 3-fachen IQR liegen von extremen Ausreißern, welche sich außerhalb des 3-fachen IQR befinden. In der vorliegenden Arbeit werden die milden Ausreißer mit einem Kreis (°) und die extremen Ausreißer mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Permeabilität bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission

3.1.1 Phänotypisierung der Patienten

Um eine Untersuchung einzelner Patientenuntergruppen zu ermöglichen, wurden durch eine intensive Aktenrecherche und die Auswertung der Fragebögen die im Folgenden aufgeführten Patientendaten erhoben.

Tabelle 4: Merkmale der Patienten (absolute Patientenzahl)

Patientenzahl	89
Verhältnis männlich / weiblich	35 / 54
Alter (Mittelwert + Standardabweichung)	
bei Erstdiagnose (66 Patienten)	36,1 + 13,42
bei Testdurchführung (89 Patienten)	45,5 + 13,94
Krankheitsdauer in Jahren (MW + Stand.abw. von 66 Patienten)	10,0 + 7,98
Familiäre Colitis ulcerosa	1
Sporadische Colitis ulcerosa	88
Rauchgewohnheiten	
Nichtraucher	45 (50,6%)
Raucher	10 (11,2%)
Ex-Raucher	34 (38,2%)
Befallsmuster (77 Patienten)	
Rektum	19 (24,7%)
Linksseitenkolitis	30 (38,9%)
Rektum + Linksseitenkolitis	49 (63,6%)
Pankolitis	28 (36,4%)

3.1.2 Ergebnisse des Permeabilitätstestes

Die Messung der gastroduodenalen, intestinalen und Kolonpermeabilität erfolgte bei insgesamt 89 Patienten und wurde mit den Daten von 99 gesunden Kontrollpersonen verglichen. Es gab für jeden der gemessenen Darmabschnitte Patienten, die erhöhte Testwerte aufwiesen. Beim Vergleich der absoluten Messwerte der Patienten mit denen der Kontrollpersonen ergab sich sowohl für den intestinalen Darmabschnitt als auch für das Kolon eine signifikante Erhöhung der Permeabilität ($p = 0,001$ bzw. $0,035$). Beim Vergleich der Häufigkeit erhöhter Testwerte ergab sich nur für den intestinalen Darmabschnitt ($p < 0,001$) eine Signifikanz (s. Tab. 5).

Ergebnisse

Tabelle 5: Permeabilität der einzelnen Darmabschnitte. Absolute (relative) Anzahl der Personen mit erhöhten Testwerten und Vergleich der Testergebnisse zwischen Patienten und Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test)

	Gastroduodenale Permeabilität erhöht	Intestinale Permeabilität erhöht	Kolonpermeabilität erhöht
89 Patienten	15 (16,9%)	25 (28,1%)	5 (4,45%)
99 Kontrollen	16 (16,2%)	6 (6,1%)	9 (9,1%)
	p-Wert gastroduodenal	p-Wert intestinal	p-Wert Kolon
Vergleich absoluter Testwerte	0,601	0,001	0,035
Vergleich erhöhter Testwerte	0,899	<0,001	0,366

Zur anschaulicheren Darstellung der Messergebnisse sind im Folgenden die absoluten Messwerte für die Permeabilität der einzelnen Darmabschnitte in Form von Boxplots abgebildet. Dabei sind jeweils die Messergebnisse der Patienten denen der Kontrollpersonen gegenübergestellt.

Abbildung 1: Gastroduodenale Permeabilität

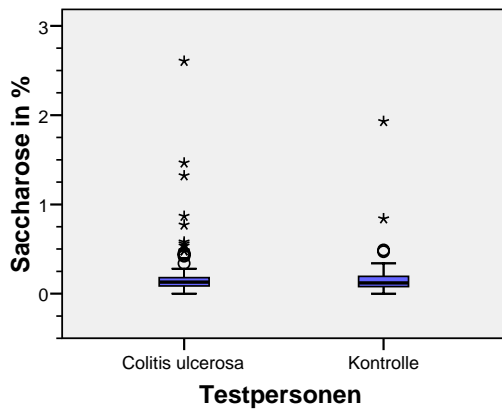


Abbildung 2: Intestinale Permeabilität

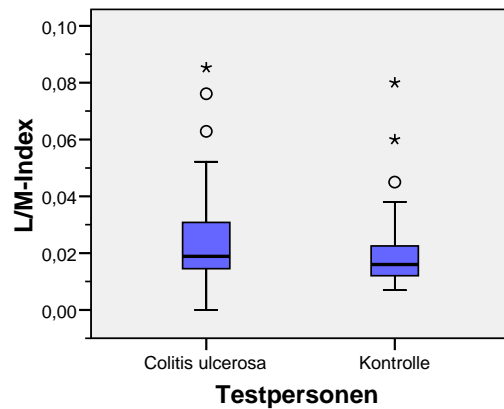


Abbildung 3: Kolonpermeabilität

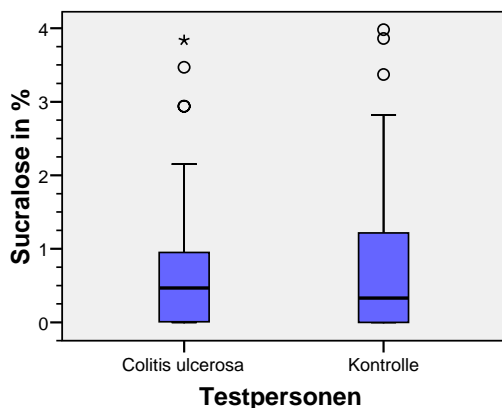


Tabelle 6: Deskriptive Statistik Patienten

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Std. abw.
Sac P	89	0	2,6049	0,2257	0,3510
Sac K	99	0	1,9300	0,1656	0,2118
L/M P	89	0	0,0853	0,0246	0,0153
L/M K	99	0,01	0,0800	0,0183	0,0104
Suc P	89	0	3,8365	0,6645	0,7938
Suc K	99	0	3,9800	0,6719	0,9173

Sac = gastroduodenale Permeabilität

L/M = intestinale Permeabilität

Suc = Kolonpermeabilität

P = Patientengruppe

K = Kontrollgruppe

° milde Ausreißer * extreme Ausreißer

Man kann erkennen, dass sich die Messwerte der Patienten für die gastroduodenale Permeabilität auf gleichem Niveau befinden wie die der Kontrollpersonen. Lediglich einige extreme Ausreißer gibt es in der Patientengruppe mehr als in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 1).

Für die intestinale Permeabilität zeigt sich, dass die Streubreite der Messwerte größer ist als in der Kontrollgruppe, die Messwerte der Patienten insgesamt aber auf höherem Niveau liegen als bei den Kontrollpersonen (siehe Abb. 2).

Für die Kolonpermeabilität liegt in der Kontrollgruppe sogar eine größere Streuung der Messwerte vor als bei den Patienten, wobei der Median in der Patientengruppe über dem der Kontrollgruppe liegt (siehe Abb. 3). Es zeigt sich hier zwar eine signifikante Erhöhung der absoluten Testwerte der Patienten im Vergleich mit den Kontrollpersonen ($p = 0,035$), insgesamt betrachtet findet dieser Signifikanzunterschied aber im Normwertbereich statt.

Anschließend wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der erhöhten intestinalen Permeabilität und dem Befallsmuster, der Medikation oder dem Alter bzw. Geschlecht der Patienten bei Durchführung des Testes gab. Dazu wurden die Messwerte der einzelnen Darmabschnitte mit den verschiedenen Parametern verglichen.

3.1.3 Zusammenhang zwischen der Permeabilität und dem Befallsmuster

In diese spezielle Betrachtung wurden 77 Patienten mit bekanntem Befallsmuster eingeschlossen. Es erfolgte zuerst eine Einteilung des Befallsmusters in Proktitis, Linksseitenkolitis und Pankolitis. Dabei ergab sich folgendes Bild:

Tabelle 7: Permeabilität der einzelnen Darmabschnitte in Abhängigkeit vom Befallsmuster

	Rektumbefall	Linksseitenkolitis	Pankolitis	p-Wert*
Saccharose erhöht	4	6	2	0,302
Saccharose normal	15	24	26	
L/ M-Index erhöht	2	7	12	0,042
L/ M-Index normal	17	23	16	
Sucralose erhöht	3	7	2	0,236
Sucralose normal	16	23	26	

*im Chi-Quadrat-Test nach Pearson

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Erhöhung der intestinalen Permeabilität und dem Ausprägungsgrad der Colitis ulcerosa: Für das Befallsmuster Pankolitis zeigte sich eine signifikante Assoziation zur Erhöhung der intestinalen Permeabilität ($p = 0,042$). Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass mit steigendem Ausprägungsgrad der Colitis ulcerosa eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität wahrscheinlicher wird. Um dies genauer

zu untersuchen, wurden die drei Untergruppen für das Befallsmuster zu zwei Gruppen zusammengefasst. Dies ermöglichte die Anwendung des exakten Fisher-Testes, welcher bei der Untersuchung von zwei Variablen genauere Ergebnisse liefert als der Chi-Quadrat-Test. Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchung wurden auch in diesem Testverfahren bestätigt. Es zeigte sich sogar noch deutlicher, dass die Permeabilität signifikant häufiger erhöht ist, wenn das gesamte Kolon von der Erkrankung betroffen ist (siehe Tab. 8).

Tabelle 8: L/ M-Index für zwei Untergruppen im Befallsmuster (exakter Fisher-Test)

	Rektum + linkes Kolon	Pankolitis	p-Wert*
L/ M-Index erhöht	9	12	0,032
L/ M-Index normal	40	16	

* im exakten Fisher-Test

3.1.4 Zusammenhang zwischen der Permeabilität und der Medikation zum Zeitpunkt des Testes

Im Folgenden wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der erhöhten intestinalen Permeabilität und der Medikation, welche die Patienten zum Zeitpunkt des Testes einnahmen, besteht. Hierbei zeigte sich für das Azathioprin, dass es unter seiner Einnahme signifikant häufiger zu keiner Erhöhung der Permeabilität kommt (siehe Tab. 9).

Für kein anderes Medikament ergab sich ein Zusammenhang zur Permeabilität.

Tabelle 9: erhöhte intestinale Permeabilität und Azathioprin

	Patienten mit Azathioprineinnahme	Patienten ohne Azathioprineinnahme	p-Wert*
L/ M-Index erhöht	1	24	0,018
L/ M-Index normal	17	46	

* im exakten Fisher-Test

3.1.5 Zusammenhang zwischen der Permeabilität und dem Alter

Da sich lediglich für die intestinale Permeabilität erhöhte Messwerte in der Patientengruppe ergaben, wurde nur diese auf einen Zusammenhang zum Alter der Patienten untersucht. Dabei konnte weder ein Zusammenhang zum Alter der Patienten bei der Testdurchführung noch zum Alter bei der Erstdiagnose der Erkrankung festgestellt werden.

3.1.6 Zusammenhang zwischen der Permeabilität und dem Geschlecht

Auch zwischen dem Geschlecht der Patienten und der erhöhten intestinalen Permeabilität konnte kein Zusammenhang hergestellt werden.

3.2 Permeabilität in den Familien der Colitis ulcerosa-Patienten

3.2.1 Untersuchung von genetisch Verwandten der Patienten

Es erfolgte die Messung der Permeabilität der einzelnen Darmabschnitte bei 35 Verwandten ersten Grades der Patienten. Dabei zeigten sich für die in Tabelle 10 dargestellte Anzahl an Personen erhöhte Messwerte der Permeabilität in den verschiedenen Abschnitten des Darmes.

Anschließend wurden die Messwerte der Verwandten wieder mit den Werten der 99 gesunden Kontrollpersonen verglichen. Dazu wurden zunächst die absoluten Messwerte des Permeabilitätstestes herangezogen. Hier ergab sich für das Kolon, dass die Verwandten signifikant höhere Testwerte aufwiesen als die Kontrollpersonen ($p = 0,003$). Für die gastroduodenalen und intestinalen Darmabschnitte ergab sich diese Signifikanz nicht. Vergleicht man hingegen die Anzahl erhöhter Testergebnisse bei den Verwandten mit der der Kontrollpersonen, ergibt sich für den intestinalen Darmabschnitt eine signifikant häufigere Erhöhung der Permeabilität ($p = 0,017$) bei den Verwandten. Für den gastroduodenalen Abschnitt und das Kolon zeigte sich keine signifikante Häufung erhöhter Permeabilitätswerte.

Tabelle 10: Permeabilität der einzelnen Darmabschnitte. Absolute (relative) Anzahl der Personen mit erhöhten Testwerten und Vergleich der Testergebnisse zwischen Verwandten und Kontrollen (Mann-Whitney-U-Test)

	Gastroduodenale Permeabilität erhöht	Intestinale Permeabilität erhöht	Kolonpermeabilität erhöht
35 Verwandte	11 (31,4%)	7 (20,0%)	2 (5,7%)
99 Kontrollen	16 (16,2%)	6 (6,1%)	9 (9,1%)
	p-Wert gastroduodenal	p-Wert intestinal	p-Wert Kolon
Vergleich absoluter Testwerte	0,186	0,059	0,003
Vergleich erhöhter Testwerte	0,054	0,017	0,533

Zur bildlicheren Darstellung der absoluten Messwerte für die Permeabilität in den einzelnen Darmabschnitten sollen auch hier wieder Boxplots dienen, in denen die Messwerte der Verwandtengruppe denen der Kontrollgruppe gegenübergestellt werden.

Abbildung 4: Gastroduodenale Permeabilität

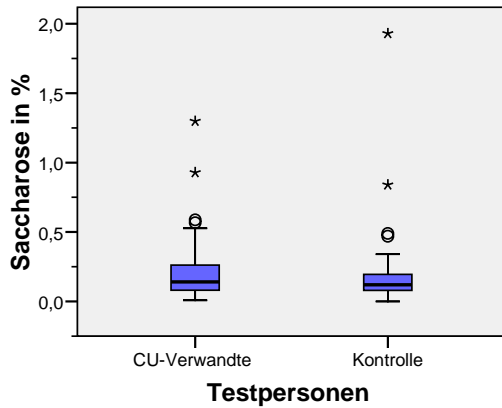


Abbildung 5: Intestinale Permeabilität

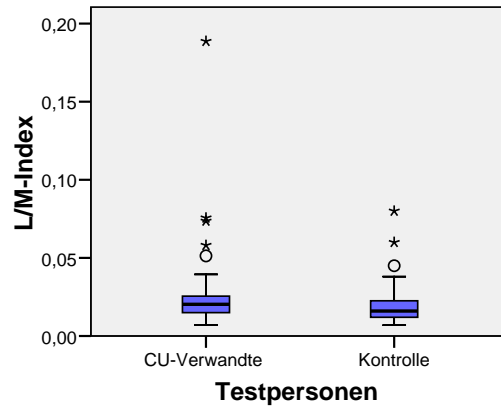


Abbildung 6: Kolonpermeabilität

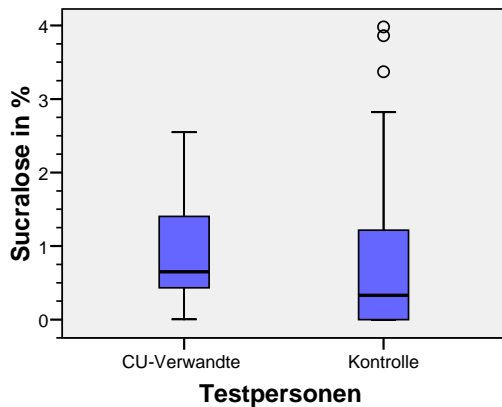


Tabelle 11: Deskriptive Statistik Verwandte

	N	Min.	Max.	Mittelwert	Std. abw.
Sac V	35	0,01	1,2982	0,235117	0,264227
Sac K	99	0	1,9300	0,1656	0,2118
L/M V	35	0,01	0,1887	0,028661	0,032547
L/M K	99	0,01	0,0800	0,0183	0,0104
Suc V	35	0	2,5485	0,882274	0,671302
Suc K	99	0	3,9800	0,6719	0,9173

Sac = gastroduodenale Permeabilität
 L/M = intestinale Permeabilität
 Suc = Kolonpermeabilität
 V = Gruppe der Verwandten
 K = Kontrollgruppe

° milde Ausreißer * extreme Ausreißer

Für die gastroduodenale Permeabilität zeigt sich erneut, dass die Messwerte in beiden Gruppen auf ähnlich hohem Niveau liegen und dass es etwa gleich häufig sowohl milde als auch extreme Ausreißer gibt (siehe Abb. 4).

Bei der intestinalen Permeabilität liegen die Messwerte in der Verwandtengruppe auf etwas höherem Niveau als in der Kontrollgruppe, wobei es in der Verwandtengruppe, vor allem relativ betrachtet, häufiger Ausreißer gibt (siehe Abb.5).

Für die Kolonpermeabilität liegen die Messwerte der Box in der Verwandtengruppe auf höherem Niveau als die der Kontrollgruppe, allerdings zeigt sich in der Kontrollgruppe insgesamt eine größere Streuung der Messwerte, so dass der Unterschied nicht signifikant ist.

Beim Vergleich der 89 Patienten mit den 35 Verwandten ergab sich beim Vergleich der absoluten Testwerte eine signifikante Erhöhung der Kolonpermeabilität bei den Patienten. Für die gastroduodenalen und intestinalen Darmabschnitte war der Unterschied nicht signifikant. Für die Häufigkeit erhöhter Testwerte ergab sich für keinen der untersuchten Darmabschnitte ein signifikanter Unterschied. Außerdem zeigt die folgende Darstellung, dass die in der Patientengruppe gemessene erhöhte intestinale Permeabilität im Vergleich mit der Gruppe der Verwandten nicht mehr signifikant ist (siehe Tab. 12).

Tabelle 12: Vergleich der Testergebnisse zwischen Patienten und Verwandten (Mann-Whitney-U-Test)

	p-Wert gastroduodenal	p-Wert intestinal	p-Wert Kolon
Vergleich absoluter Testwerte	0,418	0,743	0,021
Vergleich erhöhter Testwerte	0,074	0,356	0,983

Da nicht nur der Einfluss genetischer Faktoren auf die Permeabilität, sondern auch der Einfluss von Umweltfaktoren betrachtet werden sollte, wurde zudem untersucht, ob es eine häufigere Permeabilitätserhöhung bei den Verwandten gibt, wenn sie im gleichen Haushalt mit den Patienten leben. Dies ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit einer erhöhten Permeabilität zwischen Verwandten, die zum Zeitpunkt des Testes im selben Haushalt wie die Patienten lebten, und Verwandten, die den Haushalt nicht mit ihren erkrankten Familienangehörigen teilten.

3.2.2 Untersuchung von nicht verwandten Lebensgefährten der Patienten

Hier wurden die Permeabilitäten der einzelnen Darmabschnitte von 24 nichtverwandten Lebensgefährten der Patienten gemessen. Es ergaben sich für 20,8% der Lebensgefährten erhöhte Testwerte im gastroduodenalen Darmabschnitt, für 12,5% im intestinalen Bereich und für 4,2% im Bereich des Kolons. Es wurden sowohl die absoluten Testwerte der einzelnen Gruppen und Darmabschnitte als auch die Häufigkeit erhöhter Testwerte miteinander verglichen. Dabei ergab sich für keinen Vergleich ein signifikanter Unterschied (siehe Tab. 13).

Ergebnisse

Tabelle 13: Vergleich der Testergebnisse der Lebensgefährten mit denen der anderen Testgruppen

	p-Wert gastroduodenal	p-Wert intestinal	p-Wert Kolon
P/ L absolute Testwerte	0,787	0,067	0,424
P/ L erhöhte Testwerte	0,652	0,118	0,779
V/ L absolute Testwerte	0,517	0,198	0,123
V/ L erhöhte Testwerte	0,373	0,455	0,792
L/ K absolute Testwerte	0,995	0,818	0,124
L/ K erhöhte Testwerte	0,587	0,279	0,430

P/ L = Vergleich Patienten/ Lebensgefährten
 V/ L = Vergleich Verwandte/ Lebensgefährten
 L/ K = Vergleich Lebensgefährten/ Kontrollen

Einmal mehr sollen zur bildlicheren Darstellung Boxplots dienen. Es wird ersichtlich, dass in allen drei untersuchten Darmabschnitten die Messwerte in beiden Gruppen auf ähnlichem Niveau liegen und die Streubreite in etwa gleich ist bzw. in der Kontrollgruppe sogar größer ist (siehe Abb. 7 bis 9).

Abbildung 7: Gastroduodenale Permeabilität

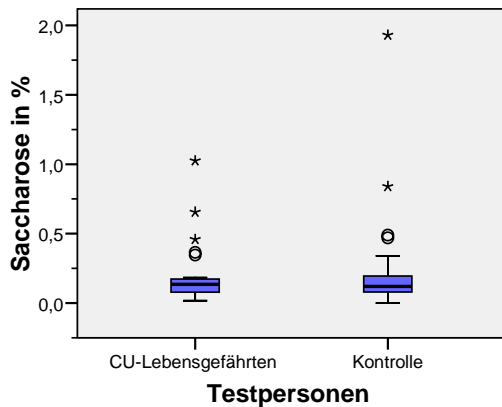


Abbildung 8: Intestinale Permeabilität

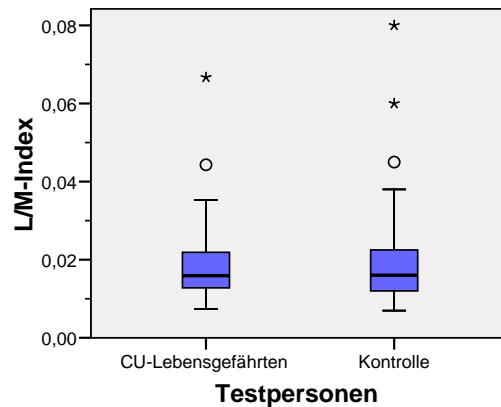


Abbildung 9: Kolonpermeabilität

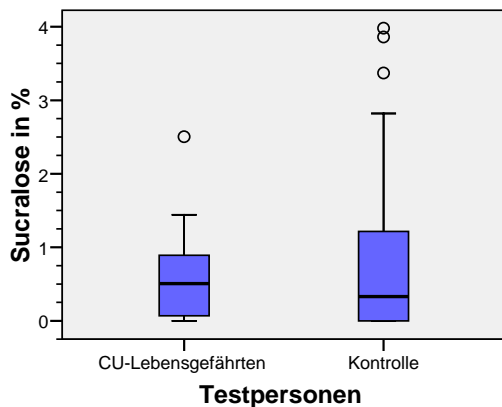


Tabelle 14: Deskriptive Statistik Lebensgefährten

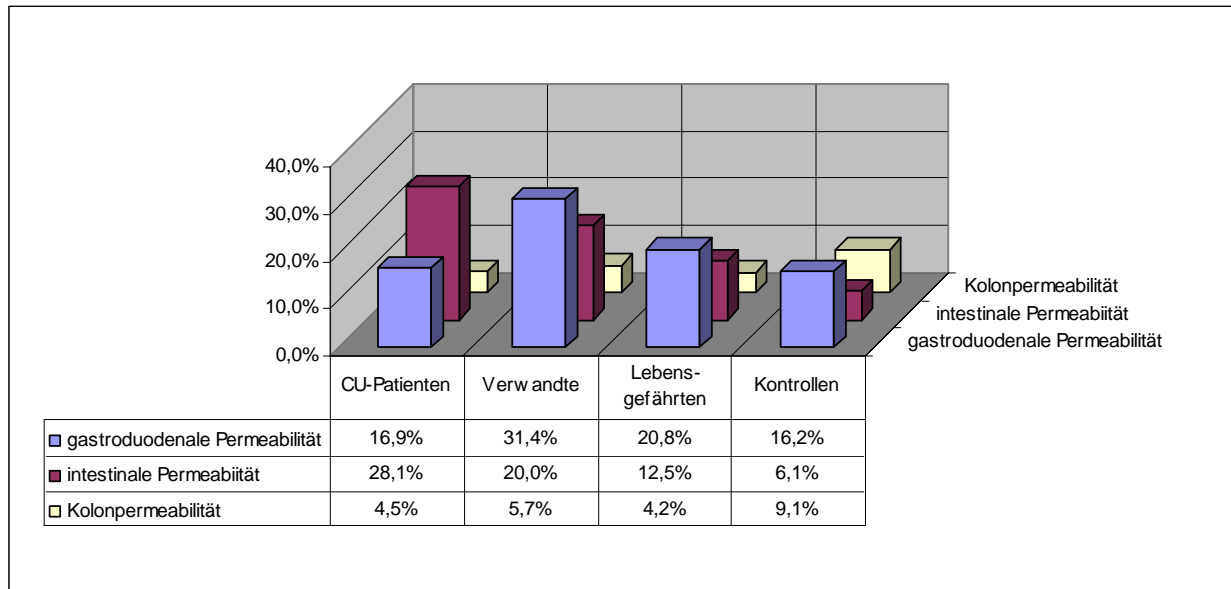
	N	Min.	Max.	Mittelwert	Std. abw.
Sac LG	24	0,0171	1,0249	0,200488	0,231221
Sac K	99	0,0000	1,9300	0,1656	0,2118
L/M LG	24	0,0074	0,0667	0,0198	0,0129
L/M K	99	0,0070	0,0800	0,0183	0,0104
Suc LG	24	0,0000	2,5036	0,6060	0,6027
Suc K	99	0,0000	3,9800	0,6719	0,9173

Sac = gastroduodenale Permeabilität
 L/M = intestinale Permeabilität
 Suc = Kolonpermeabilität
 LG = Gruppe der Lebensgefährten
 K = Kontrollgruppe

° milde Ausreißer * extreme Ausreißer

Die folgende Abbildung 10 soll eine bildliche Übersicht der Testergebnisse aller Testgruppen in den drei untersuchten Darmabschnitten liefern:

Abbildung 10: relative Anzahl erhöhter Testergebnisse in den einzelnen Gruppen



3.3 Fäkales Calprotectin

Das fäkale Calprotectin wurde als Marker für eine intestinale Inflammation bei 60 Patienten, 30 Verwandten und 18 Lebensgefährten bestimmt. Dabei wurde zuerst untersucht, ob es in den einzelnen Testgruppen überhaupt eine Erhöhung des fäkalen Calprotectins gibt. Dies war besonders für die Gruppe der Patienten interessant, da sich diese zum Zeitpunkt der Bestimmung in einer Remissionsphase befanden. Von einer Erhöhung der fäkalen Calprotectinkonzentration wurde bei Werten > 15 mg/l ausgegangen. Die Untersuchung ergab für folgende Personen erhöhte Testwerte:

Tabelle 15: absolute (relative) Anzahl erhöhter Testergebnisse für fäkales Calprotectin

	60 Patienten	30 Verwandte	18 Lebensgefährten
Anzahl erhöhter Testwerte	41 (68,3%)	8 (26,7%)	9 (50%)

Es zeigte sich, dass in der Patientengruppe ein signifikant höherer Anteil der Testpersonen erhöhte Werte für Calprotectin aufwies als normale Testwerte auftraten ($p = 0,005$), in der Gruppe der Verwandten der Patienten traten signifikant häufiger normale Testwerte auf ($p = 0,011$). In der Gruppe der Lebensgefährten war die Verteilung gleich (siehe Tab.15).

Im Anschluss wurden die absoluten Calprotectinwerte der Patienten, Verwandten und Lebensgefährten miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Patienten signifikant höhere Testwerte aufwiesen als ihre Verwandten ($p < 0,0001$) und ihre Lebensgefährten ($p = 0,015$). Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Verwandten im gleichen Haushalt wie die Patienten lebten oder nicht ($p = 0,444$). Außerdem wiesen die Verwandten mit erhöhter intestinaler Permeabilität keine signifikant höheren Messwerte für das fäkale Calprotectin auf als die mit normaler Permeabilität ($p = 0,346$). Beim Vergleich zwischen den Verwandten und den Lebensgefährten konnte kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Testwerte festgestellt werden (siehe Tab. 16).

Tabelle 16: Vergleich der absoluten Testwerte für fäkales Calprotectin (Mann-Whitney-U-Test)

	p-Wert fäkales Calprotectin
Vergleich Patienten/ Verwandte	< 0,0001
Vergleich Patienten/ Lebensgefährten	0,015
Vergleich Verwandte/ Lebensgefährten	0,459

3.3.1 Korrelation des fäkalen Calprotectins zur Permeabilität

Da das fäkale Calprotectin als ein Marker für eine intestinale Inflammation gilt, wurde im Folgenden untersucht, ob eine Zunahme der Permeabilität mit ansteigenden Testwerten für fäkales Calprotectin korreliert. Hierzu wurden die absoluten Calprotectinwerte mit den absoluten Messwerten des Permeabilitätstestes aus den einzelnen Darmabschnitten verglichen. Dieser Vergleich wurde sowohl für die Patienten als auch für deren Verwandte und Lebensgefährten durchgeführt. Unter besonderem Interesse standen hierbei die Untersuchungsergebnisse für die intestinale Permeabilität in der Patienten- sowie der Verwandtengruppe, da sich hier, wie in den Abschnitten 3.1.2 und 3.2.1 dargestellt, eine signifikante Häufung erhöhter Messwerte zeigte.

Die Untersuchung ergab die in Tabelle 17 dargestellten Ergebnisse. Es zeigte sich, dass in der Patientengruppe die Korrelation sowohl für den gastroduodenalen als auch für den intestinalen Darmabschnitt auf dem Niveau von 0,05 signifikant war. Für die Sucralose ergab sich keine Korrelation.

Tabelle 17: Korrelation Permeabilität/ Calprotectin nach Pearson

	N	Korr.koeff.Sac	p-Wert Sac	Korr.koeff.L/M	p-Wert L/M	Korr.koeff.Suc	p-Wert Suc
Patienten	59	0,3	0,019	0,31	0,017	-0,058	0,665
Verwandte	29	0,1	0,487	0,184	0,338	-0,037	0,849
Lebensgefährten	18	-0,1	0,721	-0,173	0,493	0,232	0,355

N=Anzahl

Korr.koeff.=Korrelationskoeffizient

Sac=gastroduodenaler Darmabschnitt

L/M=intestinaler Darmabschnitt

Suc=Kolon

In den Abbildungen 11 und 12 werden die Scatterplots für die Korrelation der gastroduodenalen (Saccharose) bzw. intestinalen Permeabilität (L/M-Index) zum Calprotectin im Stuhl in der Patientengruppe dargestellt, da sich die Korrelation nur für diese Abschnitte als signifikant erwies. Die Steigung der Gerade verdeutlicht dabei die Ausprägung der Korrelation der beiden Parameter.

Abbildung 11: Scatterplot Saccharose/ Calprotectin

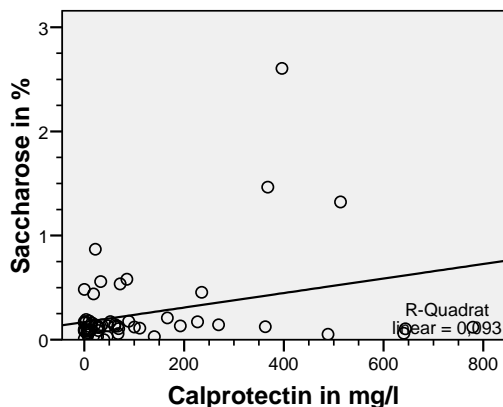
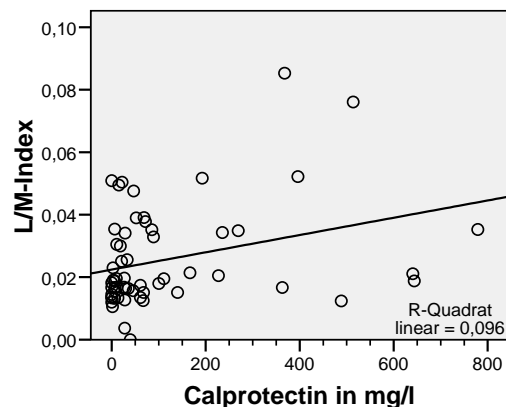


Abbildung 12: Scatterplot L/M-Index/ Calprotectin



Für die anderen untersuchten Personengruppen ergab sich keine Signifikanz.

3.4 Eine Patientin mit ilioanalem Pouch

Zusätzlich zu den Colitis ulcerosa-Patienten in Remission untersuchten wir eine Patientin mit ilioanalem Pouch. Diese war für uns insofern interessant, als dass sie kein Kolon mehr besitzt, für welches wir ursprünglich eine erhöhte Permeabilität vermuteten. Im Abschnitt 3.1.2 zeigte sich, dass die Kolonpermeabilität der Patienten nicht erhöht ist, wohl aber die intestinale Permeabilität. Somit war nun interessant, ob auch bei dieser Patientin die intestinale Permeabilität als eine mögliche Ursache der Inflammation erhöht ist. Träfe die alternative Vermutung zu, dass es zu einer erhöhten Permeabilität als Folge der Inflammation kommt,

Ergebnisse

müsste sie bei dieser Patientin im Normalbereich liegen, da bei ihr das Kolon als zentraler Ort des Inflammationsgeschehens entfernt wurde. Es zeigten sich folgende Testergebnisse:

Tabelle 18: Testergebnisse für eine Patientin mit ileoanalem Pouch

	gastroduodenale Permeabilität in %	intestinale Permeabilität (L/M)	Kolonpermeabilität in %
Testwert	0,2497	0,0169	0,2990
Testwert erhöht?	ja	nein	nein

Die Normalwerte liegen für die Saccharoseausscheidung (gastroduodenale Permeabilität) bei unter 0,23%, der Lactulose/ Mannitol-Index (intestinale Permeabilität) gilt bei Werten unter 0,03 als normal und für die Sucraloseausscheidung (Kolonpermeabilität) liegt der Normbereich unter 2,11%.

Die erhöhte gastroduodenale Permeabilität bei der Patientin mit ileoanalem Pouch gilt es zu diskutieren.

4 Diskussion

Die Kenntnisse über die genaue Ätiologie und Pathogenese der Colitis ulcerosa sind nach wie vor nur unzureichend. Da das Darmepithel im menschlichen Organismus die Funktion einer äußeren Oberfläche übernimmt, ist es ständig einer Vielzahl potenziell schädlicher Substanzen und Mikroorganismen ausgesetzt. Dazu gehören z. B. Antigene aus der Nahrung, Bakterien und deren synthetisierte Produkte sowie aufgenommene Chemikalien und Toxine aus der Umwelt. Um sich vor diesen möglicherweise schädigenden Substanzen zu schützen, ist es wichtig, dass der menschliche Organismus eine intakte Barriere gegenüber diesen Stoffen aufbaut bzw. aufrechterhält.

Als Grundlage für unsere Untersuchungen sollten die viel versprechenden Studienergebnisse von Bühner et al. dienen, die 2006 veröffentlicht wurden. Sie untersuchten 128 Patienten mit Morbus Crohn in Remission, 129 Verwandte ersten Grades der Patienten, 66 nichtverwandte Lebensgefährten der Patienten und 96 gesunde Kontrollpersonen auf Veränderungen der gastroduodenalen und intestinalen Permeabilität. Dabei fanden sie eine signifikante Erhöhung der Permeabilität in beiden Darmabschnitten sowohl bei den Patienten als auch bei den Verwandten der Patienten. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Verwandten im gleichen Haushalt mit den Patienten lebten oder nicht. Keine signifikante Erhöhung der Permeabilität hingegen fand sich bei den nichtverwandten Lebensgefährten, die den Haushalt mit den Patienten teilten. Somit schlussfolgerte man, dass Veränderungen der Permeabilität am ehesten genetisch determiniert sind und dass Umwelteinflüsse die Permeabilität, wenn überhaupt, nur unwesentlich beeinflussen.

Da es viele Parallelen zwischen den beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gibt, wurde als Grundlage dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass es auch bei der Colitis ulcerosa zu einer Veränderung der Barrierefunktion des Darmes kommt. Da sich die Erkrankung im Dickdarm manifestiert, wurde neben der gastroduodenalen und intestinalen auch die Kolonpermeabilität untersucht.

Um zu differenzieren, ob es sich bei der veränderten Permeabilität um die Ursache oder eine Folge der Erkrankung handelt, wurden auch in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchung nicht nur Patienten getestet: Zusätzlich wurden einerseits genetische Verwandte ersten Grades der Patienten untersucht, um eine eventuelle genetisch determinierte Veränderung der Permeabilität zu erkennen und sie somit als ätiologischen Faktor aufdecken zu können. Andererseits wurden auch nicht verwandte Lebensgefährten der Patienten untersucht, damit mögliche Umwelteinflüsse auf die Permeabilität, z. B. die Ernährung, entdeckt werden konnten.

Zusammenfassend konnten wir mit unseren Untersuchungen zeigen, dass es auch bei der Colitis ulcerosa zu einer signifikanten Erhöhung der intestinalen Permeabilität sowohl bei den Patienten als auch bei den Verwandten ersten Grades der Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen kam. Dabei spielte es auch im vorliegenden Fall keine Rolle, ob die Verwandten den Haushalt mit den Patienten teilten oder nicht. Bei den nicht verwandten Lebensgefährten der Patienten hingegen kam es – wie auch schon bei den Morbus Crohn-Untersuchungen – zu keiner signifikanten Permeabilitätserhöhung.

4.1 Permeabilität

4.1.1 Messung der Permeabilität

Eine erhöhte intestinale Permeabilität als Ausdruck einer Störung der epithelialen Barrierefunktion kann mit verschiedenen Markersubstanzen gemessen werden: Man verwendet inerte Substanzen, wie beispielsweise Polyethylenglykol, Mannitol, Rhamnose, Lactulose, Cellobiose und radioaktives ^{51}Cr -EDTA, welche vom menschlichen Organismus nicht bzw. kaum verstoffwechselt werden (Munkholm et al. 1994, Elia et al. 1987). Sie werden in unterschiedlichem Maße trans- und parazellulär transportiert (Tomita et al. 2000). Die Menge an diesen Substanzen, welche nach oraler Applikation im Urin der Patienten nachweisbar ist, ist proportional zur Transportrate aus dem Darmlumen ins Blutplasma und damit ein Maß für die Permeabilität. Die im Urin gemessene Menge eines oral verabreichten Markers ist von vielen prä-mukosalen, mukosalen und postmukosalen Faktoren abhängig, so z. B. vom Füllungszustand des Magens, vom bakteriellen Abbau der verabreichten Substanz, von der Funktion der intestinalen Barriere, von der Durchblutung der Schleimhaut, von der Nierenfunktion, von der Compliance des Patienten (gesamten Urin gesammelt?) etc. Die am häufigsten verwendeten Testlösungen enthalten ein Mono- und ein Disaccharid. Lactulose beispielsweise hat die Eigenschaft, dass es hauptsächlich parazellulär aufgenommen wird und nicht durch darmeigene Disaccharidasen abgebaut wird. Sie wird sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nur zu 0,5% über den Urin ausgeschieden. Erhöht man aber die Konzentration auf 1500 mmol/l, erhöht sich die Ausscheidung bei den Gesunden nur marginal, bei den Erkrankten hingegen bedeutend (Bjarnason 1994). Weiterhin verwendet werden Mannitol oder L-Rhamnose. Beides sind Monosaccharide, die sowohl para- als auch transzellulär aufgenommen werden und als inerte Substanzen vom Körper nicht verstoffwechselt werden (Munkholm et al. 1994). Um den Einfluss der oben beschriebenen prä-, intra- und postmukosalen Faktoren so gering wie möglich zu halten, bildet man die sog. Lactulose/

Mannitol- bzw. Lactulose/ L-Rhamnose-Ratio, da ein Störfaktor die Aufnahme und Ausscheidung beider Substanzen in gleichem Maße beeinflussen würde, das Verhältnis aber weitgehend unabhängig vom jeweiligen Einflussfaktor ist (Bjarnason 1994).

Ein weiterer Marker für die Permeabilität ist die Sucralose. Dabei handelt es sich um ein Disaccharid, welches sich beständig im Kolon aufhält und somit einen idealen Marker zur Messung erhöhter Kolonpermeabilität darstellt (Anderson et al. 2004 und 2005).

Zahlreiche Parameter wurden als die Permeabilität beeinflussende Faktoren identifiziert, so z. B. die Einnahme von NSAIDs (Zamora et al. 1999) und Steroiden (Kiziltaş et al. 1998), Rauchen (McGilligan et al. 2007), chronische Urtikaria (Bühner et al. 2004), Alkoholkonsum (Bjarnason et al. 1984) etc. Deshalb war es wichtig, diese Kriterien bei der Formulierung von Ein- und Ausschlusskriterien zu berücksichtigen.

Die Testsubstanz, die wir in unseren Untersuchungen verwendet haben, enthielt 20 g Saccharose, 10 g Lactulose, 5 g Mannitol und 2 g Sucralose. Bei der Saccharose handelt es sich um ein Disaccharid aus Fruktose und Glukose, welches im gastroduodenalen Bereich des Gastrointestinaltraktes aufgenommen wird (Meddings et al. 1993). Lactulose und Mannitol werden in den weiter distal gelegenen Dünndarmabschnitten aufgenommen und Sucralose dient wie oben beschrieben als Markersubstanz für die Kolonpermeabilität. Durch die Verwendung einer Kombination aus diesen vier Markersubstanzen lässt sich die Lokalisation von Abschnitten mit veränderter epithelialer Barrierefunktion eingrenzen.

4.2 Permeabilität bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission

Untersuchungen über das Vorliegen einer veränderten Kolonpermeabilität bei Patienten mit Colitis ulcerosa gibt es kaum.

Teahon K et al. fanden bei Patienten mit Colitis ulcerosa 1996 eine erhöhte Permeabilität für ⁵¹CrEDTA, welches sie zusammen mit Sulfasalazin verabreichten. Letzteres wird im Zökum und Kolon von bakterieller Azoreduktase metabolisiert und anschließend von der Mukosa resorbiert. Damit dient es als Marker für den Passagezeitpunkt von ⁵¹CrEDTA im Zökum und Kolon. Ausgehend von einer Resorption von ⁵¹CrEDTA im gesamten Darmtrakt maßen sie dessen Konzentration im Urin zum Zeitpunkt des Auftretens von Sulfasalazin im Urin. Dabei fanden sie bei den Patienten eine signifikant erhöhte Konzentration an ⁵¹CrEDTA im Urin im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und schlussfolgerten daraus, dass eine Erhöhung der Kolonpermeabilität vorliegen muss. Leider führten sie diese Untersuchung nur an fünf Patienten mit Colitis ulcerosa durch, so dass die Ergebnisse damit nur vorsichtig zu bewerten sind.

Arslan et al. fanden 2001 eine signifikant höhere Permeabilität der Darmschleimhaut für $^{51}\text{CrEDTA}$ bei 43 Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zu 19 gesunden Kontrollpersonen. Das $^{51}\text{CrEDTA}$ wurde nach einer nächtlichen Nahrungskarenz morgens oral verabreicht und dessen Konzentration im Urin nach fünf und nach 24 Stunden bestimmt. Da die Patienten auch nach 24 Stunden eine signifikant höhere Konzentration an $^{51}\text{CrEDTA}$ im Urin aufwiesen als die Kontrollpersonen, schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass dies an einer erhöhten Permeabilität der Kolonschleimhaut liegen muss. Allerdings ist in der Literatur für $^{51}\text{CrEDTA}$ keine explizite Resorption im Kolon beschrieben worden, so dass die erhöhte Konzentration im Urin der Patienten ebenso gut aus einer erhöhten Permeabilität in proximaleren Darmabschnitten resultieren könnte. So wären z. B. eine eingeschränkte Peristaltik oder eine ausgedehnte Passagezeit durch das Blut und die Nieren nach intestinaler Resorption für die auch noch nach 24 Stunden hohen Konzentrationen im Urin denkbar. Somit kann man nicht davon ausgehen, dass $^{51}\text{CrEDTA}$ als Standard zur Messung der Kolonpermeabilität verwendet werden kann.

Weiterhin fand die Arbeitsgruppe um Arslan, dass die Permeabilität in aktiven Krankheitsphasen höher war und dass sie wieder sank, nachdem die klinische Symptomatik nach Ansprechen auf die medikamentöse Therapie wieder rückläufig war. Dies könnte suggerieren, dass die medikamentöse Therapie nicht nur die Inflammation im Darm bekämpft, sondern ebenfalls die Barrierefunktion des Darmes positiv beeinflusst.

Nejdfors et al. konnten 1998 in einer in vitro-Untersuchung eine erhöhte Kolonpermeabilität bei Patienten mit Colitis ulcerosa zeigen. Dazu maßen sie die Mukosa-Serosa-Passage von ^{14}C -Mannitol und Ovalbumin an Kolektomiepräparaten. Die Ergebnisse der Colitis ulcerosa-Patienten wurden mit denen von Patienten mit Kolonkarzinom verglichen und es zeigte sich eine signifikant höhere Permeabilität bei den Patienten mit Colitis ulcerosa.

All diese Ergebnisse einer erhöhten Permeabilität der Kolonschleimhaut bei Patienten mit Colitis ulcerosa konnten wir in unseren Untersuchungen nicht bestätigen. Wir fanden bei 9,1% der Patienten eine erhöhte Kolonpermeabilität im Vergleich zu 4,45% in der Kontrollgruppe. Daraus ergab sich aber keine Signifikanz beim Vergleich der Anzahl erhöhter Testwerte. Lediglich beim Vergleich der absoluten Testwerte der Patienten mit denen der Kontrollpersonen ergab sich ein signifikanter Unterschied. Da der überwiegende Teil der Testwerte aber trotz alledem im festgesetzten Normbereich lag, wurde diesem Ergebnis keine grundlegende Bedeutung beigemessen. Wir sind der Auffassung, dass die Messung der Permeabilität in einer Remissionsphase der Erkrankung erfolgen sollte, um sicher zu gehen, dass eine Erhöhung der Permeabilität nicht die Folge, sondern möglicherweise Ursache der Entzündung ist. Somit war in unserer Studie die Remission der Patienten ein wesentliches Einschlusskriterium, dies war aber

in keiner der o. g. Untersuchungen der Fall. In vielen bisher beschriebenen Untersuchungen vor allem zur intestinalen Permeabilität (s. u.), aber auch zur Kolonpermeabilität (Arslan et al. 2001) wurde postuliert, dass sich die Permeabilität in Abhängigkeit von der Aktivität der Erkrankung ändere. Auch unsere Daten, welche in der Remissionsphase erhoben wurden, sprechen gegen eine primäre Erhöhung der Kolonschleimhaut.

Allerdings konnten wir bei unseren Patienten eine signifikante Erhöhung der intestinalen Permeabilität feststellen. Diese betraf 28,1% der Patienten im Vergleich zu 6,1% der Kontrollpersonen ($p = 0,015$). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem bisheriger Studien (Welcker et al. 2004; Loranskaia et al. 1999), wobei aber auch bei diesen die Permeabilität in Abhängigkeit von der Aktivität der Erkrankung betrachtet wurde und somit ein direkter Vergleich mit unseren Patienten in klinischer Remission nicht möglich ist.

In einer dänischen Studie von Munkholm et al. wurden 1994 ebenfalls 52 Patienten mit Colitis ulcerosa auf eine veränderte intestinale Permeabilität hin untersucht, wobei sie keine signifikant erhöhten Werte feststellen konnten. Anzumerken ist, dass sie als Markersubstanz PEG 400 verwendeten, welche aus unterschiedlichen Gründen kritisch zu beurteilen ist: Einerseits ist sie einem starken bakteriellen Abbau unterlegen, andererseits kann sie zu einem nicht unerheblichen Prozentsatz bereits im Magen aufgenommen werden. Die Ausscheidung über den Urin ist sehr variabel und teilweise nur gering. Dadurch ist die Gültigkeit der Ergebnisse als nur sehr unsicher einzustufen. Weiterhin hat PEG 400 die Eigenschaft, dass es nur transzellulär aufgenommen wird. Somit kann es keine Aussage über Veränderungen auf der Ebene der Mukosazellverbindungen liefern und seine Aussagekraft bezüglich einer gestörten Barrierefunktion wird weiter eingeschränkt. Zusätzlich zu PEG 400 verwendeten sie die drei inerten Zucker Lactulose, L-Rhamnose und Mannitol. Bei den Ergebnissen verwundert allerdings, dass, obwohl auch Patienten mit schwerer Krankheitsaktivität gemessen wurden, diese keine signifikante Veränderung der Permeabilität aufwiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen.

Als Ursache für die in unserer Untersuchung gefundene Erhöhung der intestinalen Permeabilität trotz Manifestation der Erkrankung im Kolon lassen sich folgende Hypothesen annehmen:

1. Es besteht die genetische Prädisposition zur Ausbildung einer gestörten Barrierefunktion. Dabei ist allerdings unklar, ob es sich um eine rein genetische Ursache handelt oder ob Umwelteinflüsse, wie z. B. eine bestimmte Form der Ernährung, ebenfalls die Permeabilität beeinflussen. Kommt es nun aber durch die Störung der Barrierefunktion zu einer erhöhten Permeabilität, ist der potentielle Patient vermehrt den sich im Darmlumen befindlichen Antigenen ausgesetzt. Er versucht, diese in einer Immunreaktion

abzuwehren, kann dies aber aus unbekannten Gründen nicht am Ort des Geschehens praktizieren, sondern tut dies an der genetisch festgelegten Stelle, im Falle der Colitis ulcerosa also im Kolon, im Falle des Morbus Crohn im gesamten Gastrointestinaltrakt. Diese Theorie würde auch erklären, wieso es im Falle der Schwächung des menschlichen Organismus, wie z. B. durch Stress oder durch andere Erkrankungen, zu einem vermehrten Auftreten von Schüben der Erkrankung kommt. In solch einem Falle ist ebenfalls der gesamte Organismus vermehrt mit Antigenen belastet bzw. muss sich vermehrt mit diesen auseinandersetzen, die Entzündungsreaktion aber tritt - im Falle der Colitis ulcerosa - im Kolon zu Tage.

2. Die Möglichkeit der primären Entzündung erscheint eher unwahrscheinlich. Hierbei ginge man davon aus, dass durch die Auseinandersetzung mit den im Darmlumen befindlichen Antigenen dauerhaft eine subklinische Entzündung vorliegt, welche im Laufe der Zeit Veränderungen der Barrierefunktion und damit eine Erhöhung der Permeabilität hervorruft. Diese Theorie liefert allerdings keine Erklärung dafür, warum es trotz der Krankheitsmanifestation im Kolon zu erhöhten Permeabilitätstestwerten im intestinalen Darmabschnitt kommt.
3. Als Ursache für die nicht signifikant häufiger erhöhten Kolonpermeabilitätstestwerte ist aber auch ein methodisches Problem denkbar: Möglicherweise ist die Oberfläche im Dickdarm mit $0,5-1\text{m}^2$ im Vergleich zur Dünndarmoberfläche von $100-200\text{m}^2$ zu klein, um eine ausreichende Resorption der Sucralose zu gewährleisten bzw. zu ermöglichen. Eine andere Möglichkeit ist, dass der cut-off, also die Schwelle vom Normalwert zu erhöhten Testwerten, unter Umständen noch korrekturbedürftig ist: Die Patienten weisen zwar signifikant höhere Absolutwerte auf als die Kontrollpersonen, die Anzahl erhöhter Testwerte ist aber nicht signifikant höher.

4.2.1 Permeabilität in Abhängigkeit vom Befallsmuster

Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob es eine Abhängigkeit der Permeabilität vom Befallsmuster gibt. Da sich bei den Untersuchungen zur Permeabilität zeigte, dass bei den Patienten zwar die intestinale, nicht aber die Kolonpermeabilität erhöht ist, wurde hier auch nur die Beziehung zwischen der intestinalen Permeabilität und dem Befallsmuster untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei einem ausgedehnten Befall des Kolons durch die Erkrankung signifikant häufiger eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität auftritt. Damit stehen unsere Ergebnisse in Widerspruch zu denen von Loranskaia et al., die 1999 bei der Untersuchung von 44 Patienten mit Colitis ulcerosa zwar eine gesteigerte intestinale Permeabilität für Ovalbumin fanden, jedoch

keinen Zusammenhang zum Befallsmuster herstellen konnten. Ovalbumin wird allerdings transzellulär aus dem Darmlumen aufgenommen (Schürmann et al. 1999) und somit liefern diese Ergebnisse keine Aussage zum Funktionszustand der interzellulären Verbindungen wie beispielsweise den tight junctions. Hingegen können die von uns verwendeten Zucker Lactulose und Mannitol sowohl zum parazellulären Transport (Lactulose) als auch zum transzellulären Transport (Mannitol) Aussagekraft bieten.

Je nachdem, ob man die gesteigerte Permeabilität als Ursache oder Folge der Erkrankung betrachtet, lassen sich dafür folgende Hypothesen ableiten:

1. Wenn die intestinale Permeabilität erhöht ist, ist es wahrscheinlicher, einen ausgedehnten Befall der Kolonschleimhaut durch die Erkrankung zu entwickeln. Dies bedeutet, dass eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität als Risikofaktor für die Entwicklung einer Pankolitis zu betrachten ist.
2. Je ausgeprägter der Befall der Kolonschleimhaut durch die Erkrankung ist, desto häufiger kommt es auch zum Auftreten einer erhöhten intestinalen Permeabilität.

Die erste Hypothese bestärkt die Vermutung, dass die Permeabilität einen wichtigen Faktor in der Pathogenese der Colitis ulcerosa darstellt. Die zweite Hypothese hingegen scheint unwahrscheinlicher, da sich die Colitis ulcerosa im Kolon manifestiert und eine direkte Beeinflussung der intestinalen Barriere durch die Entzündung somit nicht stattfinden kann. Unsere Vermutung besteht weiterhin darin, dass die veränderte Barrierefunktion des Darmes einen wichtigen Beitrag zum Entstehungsmechanismus der Colitis ulcerosa liefert.

4.2.2 Permeabilität in Abhängigkeit von der Medikation

Eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung des Testes war die Remission der Patienten. Somit war auch die Einnahme hoher Dosen Kortison (>20mg) ein Ausschlusskriterium. Die 89 Patienten, die am Test teilnahmen, nahmen folgende Medikamente ein:

Tabelle 19: Medikation der am Test teilnehmenden Patienten

Medikament	Anzahl Patienten
5-ASA oral	57
5-ASA rektal	13
Budesonid	5
Azathioprin	19
Kortison oral < 10mg	5
Kortison oral > 10mg < 25mg	3
Kortison rektal	1
Mercaptopurin	3
Tacrolimus	1

Es wurde untersucht, ob es unter der Einnahme eines dieser Medikamente signifikant häufiger zu einer Erhöhung der intestinalen Permeabilität kam. Die Ergebnisse für Kortison oral > 10 mg, Kortison rektal, Mercaptopurin und Tacrolimus sind aber aufgrund der geringen Fallzahlen nicht verwertbar. Unter den anderen von den Patienten eingenommenen Medikamenten zeigte sich für die Einnahme von keinem eine signifikante Häufung einer erhöhten intestinalen Permeabilität. Allerdings ergab diese Untersuchung, dass es unter der Einnahme von Azathioprin signifikant seltener zu einer Erhöhung der intestinalen Permeabilität kommt ($p = 0,012$ im exakten Test nach Fisher). Auch für die Ursache dieses Faktes lassen sich wieder mehrere Vermutungen aufstellen:

1. Durch die Einnahme von Azathioprin kommt es nicht nur zu einer Besserung der klinischen Symptomatik, sondern es kann außerdem eine Reparatur der gestörten intestinalen Barriere bewirken. Möglicherweise könnte auch die Reparatur der Barriere in der Folge die klinische Symptomatik verbessern. Dies wiederum würde den protrahierten Wirkungseintritt von Azathioprin erklären.
2. Unter der Annahme, dass die Störung der intestinalen Barriere eine Folge der chronischen Entzündung wäre, könnte Azathioprin einen Schutz vor dieser Störung darstellen.

Daten in der Literatur zum Einfluss von Azathioprin auf die intestinale Barriere sind kaum vorhanden. Es wurde aber die Vermutung aufgestellt, dass es durch die Einnahme von Medikamenten auch zu einer Verringerung einer vormals erhöhten Permeabilität kommt (Arslan et al. 2001). Diese Vermutung begründet sich auf der Tatsache, dass sich die erhöhten Permeabilitätswerte von Patienten in aktiven Krankheitsphasen nach erfolgreicher medikamentöser Therapie wieder normalisierten. Ob dies auch für das Azathioprin zutreffen könnte, lässt sich aus den Daten unserer Untersuchung nicht sagen, da von unseren Patienten keine Messdaten aus der Zeit vorliegen, in der sie noch kein Azathioprin eingenommen haben.

4.2.3 Permeabilität in Abhängigkeit vom Alter und vom Geschlecht

Bei den Untersuchungen, ob es eine Korrelation zwischen den erhöhten intestinalen Permeabilitätswerten und dem Alter der Patienten bei der Durchführung des Testes und bei Erstdiagnose bzw. ihrem Geschlecht gab, ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse. Diese Erkenntnisse gleichen sich mit denen bisheriger Studien zur Permeabilität bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und sollten daher nicht überraschen (Munkholm et al. 1994; Bühner et al. 2006; Loranskaia et al. 1999).

4.3 Permeabilität in den Familien

4.3.1 Permeabilität bei den Verwandten ersten Grades der Patienten

Es ist nach wie vor ungeklärt, ob Störungen der Barrierefunktion des Darmes einem Krankheitsausbruch bereits vorausgehen oder ob sich diese Veränderungen erst als Folge der chronischen Entzündungsreaktion manifestieren. Daher führten wir den Permeabilitätstest auch mit Verwandten ersten Grades der Patienten durch, um zu untersuchen, ob eine Erhöhung der Permeabilität als ätiologischer Faktor zu betrachten ist, für den es einen genetischen Hintergrund geben könnte. Unter diesen Verwandten fanden sich keine, die ebenfalls an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung erkrankt sind.

Dazu wurden 35 Verwandte unserer Patienten auf Veränderungen der Permeabilität in den einzelnen Darmabschnitten untersucht. Diese wurden dann einerseits mit den Messwerten der Patienten und andererseits mit denen der gesunden Kontrollpersonen verglichen.

Die Messung der intestinalen Permeabilität der Verwandten ergab eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollpersonen ($p = 0,049$). Im Vergleich zu den Messdaten der Patienten waren die Testergebnisse nicht signifikant. Auch ergab sich bezüglich der Häufigkeit erhöhter Permeabilitätswerte kein Unterschied, ob die Verwandten im gleichen Haushalt lebten wie die Patienten oder nicht.

Eine erhöhte Kolonpermeabilität ergab sich für 5,7% der Verwandten im Vergleich zu 4,45% bei den Patienten und 9,1% bei den Kontrollpersonen. Dieses Ergebnis war weder im Vergleich mit den Patienten noch im Vergleich mit den gesunden Kontrollpersonen signifikant ($p = 0,983$ bzw. $0,533$).

Folglich spricht das Ergebnis gegen eine vorrangig durch Umweltfaktoren verursachte Störung der Barrierefunktion des Darmes.

Damit kann die vorliegende Untersuchung die Ergebnisse der Studie zum Morbus Crohn von Bühner et al. (2006) für die Colitis ulcerosa teilweise bestätigen: Auch bei dieser Erkrankung zeigen die Verwandten eine signifikant höhere Permeabilität der Darmschleimhaut im Vergleich mit den Kontrollpersonen. Allerdings ist im Gegensatz zur Morbus Crohn-Studie der Unterschied zwischen den Patienten und den Verwandten nicht signifikant. Somit liegt offenbar auch der Colitis ulcerosa eine genetische Veranlagung zur Entwicklung einer gestörten Barriere zugrunde.

Auch die dänische Forschergruppe um Munkholm et al. (1994) hat zusätzlich zu den Patienten mit Colitis ulcerosa Verwandte ersten Grades und gesunde Kontrollpersonen auf Veränderungen der Permeabilität hin untersucht. Dazu verwendeten sie neben PEG 400 die drei inerten Zucker

Lactulose, L-Rhamnose und Mannitol, fanden aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Dabei ist die bereits erwähnte Problematik in der Wahl von PEG 400 zu bedenken (s. Kap. 4.2). Nach zusätzlicher Verwendung der drei anderen Zucker konnten sie auch keine Erhöhung der intestinalen Permeabilität bei den Verwandten finden. Damit stellen sich deren Ergebnisse erneut gegensätzlich zu unseren dar. Weitere Studien, in denen explizit die Permeabilität von Colitis ulcerosa-Patienten mit der ihrer Verwandten verglichen wurde, existieren nicht.

In der Literatur wird vielfach ein erhöhtes Risiko beschrieben, an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu erkranken, wenn auch ein Familienmitglied bereits an einer solchen erkrankt ist. So soll es bei etwa 10% der Patienten mindestens ein Familienmitglied geben, welches ebenfalls erkrankt ist. Andersherum erhöht sich bei Erkrankung eines Familienmitgliedes das Risiko zu erkranken für die anderen Familienmitglieder um etwa das zehnfache im Vergleich zur Normalbevölkerung (Binder und Orholm 1996). Von unseren 89 Patienten gab es lediglich eine Patientin, bei der ebenfalls beide Eltern an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung litten.

4.3.2 Permeabilität bei den nicht verwandten Lebensgefährten der Patienten

Um den zweiten Teil der Frage zu erörtern, ob Barrierestörungen im Darm als Ursache oder als Folge der Erkrankung aufzufassen sind, wurden im Folgenden gesunde nicht verwandte Lebensgefährten der Patienten auf Veränderungen der Permeabilität untersucht. Dabei ergaben sich bei den 24 untersuchten Lebensgefährten für keinen Darmabschnitt signifikant erhöhte Testwerte im Vergleich zu den drei anderen Gruppen.

Dieses Ergebnis ist mit dem der Morbus Crohn-Studie (Bühner et al. 2006) vergleichbar, welche als Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen diente. Dort fanden sich bei 20% der Lebensgefährten erhöhte Testwerte für die gastroduodenale Permeabilität (vs. 20,8% bei uns) und bei 8% im intestinalen Darmabschnitt (vs. 12,5% bei uns). Die erhöhten Testwerte für das Kolon lagen in unserer Untersuchung mit 4,2% sogar noch unter denen der Kontrollgruppe (9,1%).

In unserer Studie wurden erstmalig nicht verwandte Lebensgefährten von Colitis ulcerosa-Patienten untersucht. Somit gibt es in der Literatur auch keine Daten, die diskutiert werden können. Es lässt sich aber die Vermutung aufstellen, dass bei der Colitis ulcerosa, wie auch schon mehrfach für den Morbus Crohn gezeigt, eine Beeinflussung der Barrierefunktion des Darmes durch Umwelteinflüsse nicht sehr wahrscheinlich ist bzw. nicht als zugrunde liegender Pathomechanismus zu verstehen ist.

4.4 Fäkales Calprotectin

Calprotectin ist ein Protein, welches hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Monozyten freigesetzt wird und als Marker für eine intestinale Inflammation eingesetzt werden kann. Es gibt mehrere Marker, die zur Aufdeckung einer im Körper ablaufenden Entzündung verwendet werden. Dazu gehören u. a. CRP, BSG, die Thrombozytenzahl im Blut und saures α -1-Glykoprotein. Allen gemeinsam ist, dass sie sehr unspezifisch sind und keine Entzündung speziell im Verdauungstrakt anzeigen können. Dem hingegen zeigen Untersuchungen zum fäkalen Calprotectin, dass es eine Korrelation zwischen der Calprotectinkonzentration im Stuhl und der Schwere der intestinalen Inflammation gibt (Fagerberg et al. 2007; Xiang et al. 2008).

4.4.1 Fäkales Calprotectin in den einzelnen Gruppen

In den von uns durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass 68,3% der getesteten Colitis ulcerosa-Patienten, von denen sich alle in Remission befanden, erhöhte Testwerte für fäkales Calprotectin aufwiesen. Unter den Verwandten ersten Grades der Patienten waren nur 26,7% mit erhöhten Werten und in der Gruppe der nicht verwandten Lebensgefährten hatten 50% erhöhte Calprotectinkonzentrationen. Der Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander ergab einen signifikanten Unterschied in der Höhe der Testwerte zwischen den Patienten und ihren Verwandten einerseits und zwischen den Patienten und ihren Lebensgefährten andererseits. Der Unterschied zwischen den Verwandten und Lebensgefährten war nicht signifikant.

Diverse Studien zur Bedeutung des fäkalen Calprotectins haben postuliert, dass dieses gut zur Differenzierung zwischen organischen und funktionellen Erkrankungen des Darmes einsetzbar ist (Tibble et al. 2001; Angriman et al. 2007; D'Inca et al. 2007). So bestimmte die englische Forschergruppe um Tibble JA bei 600 Patienten, die neu auf einer gastroenterologischen Station aufgenommen wurden, die Sensitivität, Spezifität und die Odds Ratio einiger nicht invasiver Untersuchungen, um eine Methode zu finden, die zwischen organischen Erkrankungen des Verdauungstraktes und nicht organischen (Reizdarmsyndrom) unterscheidet. Zu den durchgeführten Untersuchungen gehörten die Bestimmung des fäkalen Calprotectins, die Messung der intestinalen Permeabilität, die Bestimmung diverser Blutwerte (u. a. CRP, BSG, Thrombozytentahl) und die Einstufung der Patienten anhand der Rom-I-Kriterien (Dauer der abdominellen Beschwerden, Merkmale der Defäkation und Symptomatik dabei etc.). Die Ergebnisse wurden dann mit denen objektiver Untersuchungen wie Endoskopie und Bariumbreischluck verglichen. Dabei lagen die Sensitivitäten der nicht invasiven Untersuchungsmethoden zwischen 63 und 89%, die Spezifitäten zwischen 71 und 87 %. Daraus

schlossen die Forscher, dass die Bestimmung des fäkalen Calprotectins, die Messung der intestinalen Permeabilität und das Vorhandensein positiver Rom-I-Kriterien eine nicht invasive Methode zur Differenzierung zwischen organischer und nicht organischer Erkrankung des Verdauungstraktes darstellt.

Obwohl sich alle Patienten, die an unseren Untersuchungen teilnahmen, in klinischer Remission befanden, zeigten zwei Drittel von ihnen Testwerte oberhalb der Normgrenze. Eine schwedische Forschergruppe (Fagerberg et al. 2007) fand in einer ähnlichen Untersuchung heraus, dass ein koloskopisch unauffälliges Bild mit normalen Werten für fäkales Calprotectin einhergeht. Dazu untersuchten sie 39 Kinder mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung auf den Gehalt an fäkalem Calprotectin und verglichen die Werte mit den makroskopischen und mikroskopischen Befunden einer zeitgleich durchgeführten Koloskopie. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation zur Ausdehnung und zum Schweregrad der Entzündung sowohl für das makroskopische als auch für das mikroskopische Bild. Normale Werte für fäkales Calprotectin gingen mit dem koloskopischen Bild der kompletten mukosalen Heilung einher. Unsere Patienten allerdings befanden sich in klinischer Remission, d. h., sie wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Symptome auf, die auf einen akuten Schub hingewiesen hätten. Eine Koloskopie zum Zeitpunkt des Testes führten wir nicht durch. Somit ist unser Ergebnis nicht als Widerspruch zu o. g. Studie zu werten, sondern es zeigt, dass es trotz des Fehlens von Krankheitsanzeichen zum Auftreten erhöhter Konzentrationen an fäkalem Calprotectin kommen kann. Zusätzlich unterstreicht unser Ergebnis die Aussagen von Xiang et al., die ebenfalls signifikant höhere Calprotectinkonzentrationen bei Patienten in Remission im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen maßen. Da bei deren Untersuchungen aber auch der Unterschied zwischen den Patienten in Remission und denen mit akuter Symptomatik signifikant war (s. o.), kommt es offenbar mit steigender Aktivität der Entzündung zu ansteigend erhöhten Konzentrationen des fäkalen Calprotectins und nur unter vollständiger Ausheilung der Entzündung möglicherweise zur Normalisierung erhöhter Testwerte. Somit könnte Calprotectin gut als Marker für das Aufdecken einer subklinischen Inflammation verwendet werden.

Bei der Betrachtung der Verwandten und Lebensgefährten der Patienten zeigen einige ebenfalls erhöhte Konzentrationen an fäkalem Calprotectin, obwohl sie keinerlei Symptome aufweisen, die an das Vorliegen einer entzündlichen Darmerkrankung denken lassen. Die Häufigkeit erhöhter Testwerte war aber keineswegs signifikant.

In einer italienischen Studie (Montalto et al. 2007) wurden ebenfalls Patienten mit Colitis ulcerosa, deren Verwandte ersten Grades, deren Ehepartner sowie gesunde Kontrollpersonen auf die Konzentration an fäkalem Calprotectin untersucht. Dabei zeigten sich auch dort erhöhte

Testwerte: die Werte der Patienten waren signifikant höher als die der anderen drei Gruppen, die Werte der Verwandten waren signifikant höher als die der Ehepartner und Kontrollpersonen und selbst die Testwerte der Ehepartner waren immer noch signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen. Damit stellt sich die Frage, ob es auch für die Erhöhung der Konzentration des fäkalen Calprotectins eine genetische Disposition gibt oder ob sie durch Umweltfaktoren beeinflusst wird. Das Ergebnis der Italiener spricht für eine Kombination beider Faktoren, da sowohl die Verwandten als auch die Ehepartner erhöhte Werte aufweisen, die Messwerte bei den Verwandten aber insgesamt höher sind. Unklar bleibt jedoch, ob die Erhöhung des fäkalen Calprotectins bei den Verwandten als frühes Anzeichen einer sich später manifestierenden Colitis ulcerosa zu werten ist oder ob sie lediglich einen weiteren Risikofaktor in der Pathogenese darstellt.

Bei der hier vorliegenden Untersuchung dagegen lässt sich die Erhöhung der Calprotectinkonzentration nicht als genetische Disposition werten, da zwar in der Gruppe der Patienten signifikant höhere Konzentrationen an fäkalem Calprotectin gemessen wurden im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen, sich die Gruppe der Verwandten aber nicht von der der Lebensgefährten abhebt. Allerdings wiesen 50% der Lebensgefährten und nur 26,7% der Verwandten erhöhte Calprotectinkonzentrationen auf. Damit könnte möglicherweise doch eine Beeinflussung durch Umweltfaktoren bestehen. Die Fallzahl der untersuchten Lebensgefährten ist aber mit 18 sehr gering, so dass dieses Ergebnis mit Vorsicht zu werten ist.

4.4.2 Korrelation des fäkalen Calprotectins zur Permeabilität

In diesem Teil der Untersuchung wurde geprüft, ob die Messwerte für das fäkale Calprotectin mit den Testergebnissen des Permeabilitätstestes korrelieren. Dazu wurden die absoluten Messergebnisse beider Untersuchungen verglichen. Es zeigte sich in der Patientengruppe eine positive Korrelation zur gastroduodenalen sowie zur intestinalen Permeabilität. Für die Gruppe der Verwandten und Lebensgefährten ergab sich keine Korrelation.

Diese Ergebnisse kann man folgendermaßen interpretieren: In der Patientengruppe waren die Messwerte für die intestinale Permeabilität signifikant erhöht und für diesen Darmabschnitt korrelieren die Messwerte auch mit den Werten der fäkalen Calprotectinkonzentration. Somit scheint es wahrscheinlich zu sein, dass es einen Zusammenhang zwischen der erhöhten intestinalen Permeabilität und der Konzentration des fäkalen Calprotectins gibt. Die Korrelation zur gastroduodenalen Permeabilität beruht möglicherweise darauf, dass die Messwerte im Permeabilitätstest an der oberen Normgrenze liegen, damit noch nicht als erhöht gelten und sich somit keine Signifikanz ergibt. Vergleicht man aber die absoluten Werte mit den absoluten

Calprotectinkonzentrationen im Stuhl, zeigt sich die Korrelation auf dem Niveau 0,05 als signifikant.

In der Gruppe der untersuchten Verwandten waren die Messwerte für die intestinale Permeabilität signifikant erhöht, aber nur 26,7% der Verwandten wiesen erhöhte Werte für fäkales Calprotectin auf. Eine Korrelation ergab sich somit nicht.

Es kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die Erhöhung der fäkalen Calprotectinkonzentration zumindest bei den Patienten im Zusammenhang mit der Erhöhung der Permeabilität steht. Dabei könnten beide Faktoren sowohl als Ursache als auch als Folge des jeweils anderen interpretiert werden. Da aber sowohl die Permeabilität als auch die Calprotectinkonzentration bei unseren Patienten in Remission erhöht sind, ist es auch denkbar, dass hier zwei Faktoren vorliegen, die möglicherweise unabhängig voneinander eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen könnten und Zeichen einer subklinischen Entzündung sind. Der klinische Nutzen könnte darin liegen, dass Calprotectin als Rezidivmarker Verwendung findet.

4.5 Eine Patientin mit ileoanalem Pouch

Die ultima ratio in der Therapie der Colitis ulcerosa stellt die totale Proktokolektomie dar. Dazu wird das Kolon komplett entfernt und entweder ein Ileostoma angelegt oder nach zusätzlicher Entfernung der Rektumschleimhaut ein neues Reservoir (Pouch) aus dem terminalen Ileum geformt. Dieses wird dann mit der anokutanen Grenze verbunden, der Sphinkterapparat kann erhalten werden. Obwohl durch diese Operation das gesamte Gewebe, welches durch die Erkrankung befallen sein kann, entfernt wurde, kommt es in dem neuen Pouch oftmals wieder zu Entzündungen. Diese äußern sich klinisch durch eine erhöhte Stuhlfrequenz mit gelegentlichen Blut- und Schleimauflagerungen sowie durch generelles Unwohlsein. Als Ursache der Pouchitis wird eine Metaplasie der Ileumschleimhaut zu Kolonschleimhaut angenommen, aber auch eine bakterielle Überbesiedlung der empfindlicheren Ileumschleimhaut wird vermutet (Merret et al. 1996). Im Rahmen der Metaplasie kommt es zu einer Atrophie der Villi mit kompensatorischer Hyperplasie der Krypten (Shepherd et al. 1987; de Silva et al. 1990). Diese Veränderungen treten schon bald, nachdem die Schleimhaut des Pouches der normalen Stuhlpassage ausgesetzt ist, auf (de Silva et al. 1990) und sind vermutlich als Anpassungsreaktion an die neue luminale Umwelt mit Verbesserung der Barrierefunktion zu verstehen.

Eine englische Forschergruppe hat die Permeabilität von Patienten vor und nach Anlage eines ileoanalen Pouches sowie bei Patienten mit Pouchitis gemessen (Merret et al. 1996). Sie verglichen die Testwerte mit denen von nicht operierten Colitis ulcerosa-Patienten. Als Marker

diente dabei rektal verabreichtes $^{51}\text{CrEDTA}$. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Permeabilität, sobald das Ileostoma verschlossen war und der Pouch seine Funktion aufnahm ($p < 0,002$). Dies galt aber nur, so lange sich keine Pouchitis einstellte. Dann wiederum waren die Testwerte für die Permeabilität signifikant höher als bei Patienten mit nicht entzündetem Pouch ($p < 0,006$).

Eine andere Forschergruppe aus Deutschland führte *in vitro* Untersuchungen an Biopsaten durch, die vor der Kolektomie entnommen wurden, sowie an Präparaten, die vor und nach Verschluss des temporären Ileostomas entnommen wurden (Kroesen et al. 2002). Auch Biopsate mit akuter Pouchitis wurden untersucht. Sie maßen die epitheliale Widerstandskraft sowie den Mukosa-Serosa-Durchfluss von Mannitol als Maß für die epitheliale Barrierefunktion. Die Messung des Na^+ - Glukose - Cotransportes und der aktiven Cl^- - Sekretion sollte zur Abschätzung der absorptiven und sekretorischen Transportfunktion des Epithels dienen. Die Ergebnisse der Messungen verglichen sie mit Präparaten von Kolonkarzinompatienten, welche als gesunde Kontrollpersonen dienen sollten. Die Untersuchungen ergaben keine signifikante Störung der Barrierefunktion bei Patienten mit Pouchitis im Vergleich zu Patienten mit nicht entzündetem Pouch sowie zu Ileumbiopsaten von Patienten vor Kolektomie. Allerdings zeigte sich eine Verminderung der absorptiven und resorptiven Funktionen. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse von denen von Merrett et al., die eine Zunahme der Permeabilität bei Pouchitis und eine Abnahme im nicht entzündeten Pouch feststellten.

Bei der einen von uns untersuchten Patientin mit nicht entzündetem Pouch ergab sich eine erhöhte gastroduodenale Permeabilität sowie normale Testwerte für die intestinale Permeabilität und die Permeabilität für Sucralose. Natürlich ist es schwierig, mit den Werten von nur einer Patientin überhaupt eine Vermutung über die Ursachen bzw. die Zusammenhänge anzustellen: Geht man von der oben beschriebenen Metaplasie im Bereich des Pouches aus, müsste im Bereich des Pouches auch die Aufnahme der Sucralose stattfinden. Das normal ausgefallene Messergebnis steht einerseits im Einklang mit unseren Ergebnissen für die Patienten in Remission, welche ebenfalls signifikant häufiger normale Testwerte für die Kolonpermeabilität aufwiesen. Andererseits zeigt es sich gegensätzlich zu den Ergebnissen von Merrett et al., die eine Abnahme der Permeabilität im Bereich des Pouches feststellten.

Die intestinale Permeabilität unserer Patientin fiel ebenfalls normal aus. Damit würde dieses Ergebnis eher die nachrangig aufgestellte Vermutung für die Rolle der Permeabilität in der Pathogenese der Erkrankung stützen: Als Folge der chronischen Entzündungsreaktion kommt es zum Anstieg der Permeabilität. Da bei dieser Patientin der zentrale Ort des Entzündungsgeschehens - das Kolon - entfernt wurde, kommt es auch zur Normalisierung der

Permeabilitätswerte. Leider liegen uns keine Messwerte vom Zeitpunkt vor der Pouchanlage vor, so dass unklar bleibt, ob die Patientin jemals pathologische Testwerte aufgewiesen hat. Eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität als Ursache der Erkrankung müsste aber auch nach einer Kolektomie bestehen bleiben.

Die Messung der gastroduodenalen Permeabilität unserer Patientin ergab ein pathologisches Messergebnis. Möglicherweise ist ein gewisser Abstand des Barrierelecks zum potenziellen Entzündungsherd, welcher im Zustand nach totaler Kolektomie der neu angelegte Pouch ist, notwendig. Somit wandert nach Entfernung des Kolons das Barriereleck weiter nach proximal und manifestiert sich im Bereich des oberen Dünndarms. Wahrscheinlich tritt dieser Befund aber eher zufällig auf. Für die genauere Ergründung der Verhältnisse bei Patienten mit Pouch ist eine Untersuchung mit größerer Fallzahl natürlich unerlässlich.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine möglicherweise auftretende Veränderung der Permeabilität der Darmwand bei Patienten mit Colitis ulcerosa aufzudecken und deren Ursachen zu detektieren. Als vermutete Ursachen galten einerseits eine genetische Disposition und andererseits der Einfluss von Umweltfaktoren. Dazu wurde die Permeabilität der einzelnen Darmabschnitte nicht nur bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission, sondern auch bei deren Verwandten ersten Grades und bei deren nicht verwandten Lebensgefährten gemessen und mit den Testergebnissen gesunder Kontrollpersonen verglichen. Als Grundlage für die vorliegende Untersuchung galten die Ergebnisse von Bühner et al. (2006), die bei Patienten mit Morbus Crohn in Remission und deren Familien eine offenbar genetisch bedingte Veränderung der Permeabilität feststellen konnten.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Permeabilität bei den Patienten. Diese fand sich allerdings nicht im Kolon, wo sich die Erkrankung selbst manifestiert, sondern im intestinalen Abschnitt des Darmes. Außerdem war die intestinale Permeabilität umso häufiger erhöht, desto ausgeprägter der Befall des Dickdarmes durch die Erkrankung war. Somit kann eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität als Risikofaktor für die Entwicklung einer Pankolitis interpretiert werden. Weniger häufig hingegen war die intestinale Permeabilität unter der Einnahme von Azathioprin erhöht. Dies lässt die Vermutungen zu, dass Azathioprin entweder als protektiver Faktor vor der Ausbildung einer erhöhten Permeabilität schützt oder aber kurativ auf eine bereits bestehende erhöhte Permeabilität wirken könnte. Zum Alter und Geschlecht der Patienten konnte ebenso wie zur Erkrankungsdauer keine Korrelation hergestellt werden.

Auch bei den untersuchten Verwandten ersten Grades fand sich eine signifikante Erhöhung der intestinalen Permeabilität im Vergleich mit den gesunden Kontrollpersonen. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Verwandten mit den Patienten im gleichen Haushalt lebten oder nicht. Somit scheint auch bei der Colitis ulcerosa eine genetisch determinierte Veränderung der Permeabilität vorzuliegen und die Vermutung des Einflusses von Umweltfaktoren auf die Integrität der intestinalen Barriere kann in den Hintergrund gerückt werden.

Unterstützt wird dieses Ergebnis durch die Testergebnisse der nicht verwandten Lebensgefährten der Patienten, welche beim Vergleich mit den gesunden Kontrollpersonen keine signifikante Erhöhung für die Permeabilität aufwiesen.

Als zweites großes Kernstück der vorliegenden Untersuchung wurde bei den Teilnehmern des Permeabilitätstestes ebenfalls das fäkale Calprotectin bestimmt. Die Untersuchungen ergaben,

dass die Testwerte bei den Patienten signifikant höher sind als bei den Verwandten ersten Grades der Patienten und ihren nicht verwandten Lebensgefährten. Damit ist offenbar nicht nur eine aktive Colitis ulcerosa mit dem Auftreten erhöhter Calprotectinwerte assoziiert, sondern ebenso die Erkrankung in der Ruhephase, wobei die Remission in unserer Untersuchung durch das Fehlen klinischer Symptome bei den Patienten charakterisiert wurde und nicht durch den koloskopisch und histologisch durchgeführten Beweis der Ausheilung auf Zellebene. Betrachtet man die absolute Konzentration des fäkalen Calprotectins und die absoluten Testwerte des Permeabilitätstestes, erkennt man eine Korrelation des fäkalen Calprotectins mit der gastroduodenalen und der intestinalen Permeabilität in der Patientengruppe. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es aufgrund der erhöhten Permeabilität zur Erhöhung des fäkalen Calprotectins im Darmlumen kommt. Dabei kann die Erhöhung der Permeabilität Ausdruck einer subklinischen Inflammation sein und somit zum Ansteigen des fäkalen Calprotectins führen. Da bei den Verwandten der Patienten keine Korrelation zwischen der Erhöhung der Permeabilität und der Höhe des fäkalen Calprotectins vorliegt, unterstützt dies das Ergebnis, dass es sich bei der erhöhten Permeabilität um einen primär genetischen Barrieredefekt handelt, in dessen Folge es zum Anstieg des fäkalen Calprotectins kommt. Eine Erhöhung der Permeabilität als Folge der Inflammation erscheint damit sehr unwahrscheinlich.

Abschließend lässt sich sagen, dass es sich bei der Colitis ulcerosa ebenfalls um eine Erkrankung handelt, bei der es zu einer genetisch bedingten Erhöhung der Permeabilität kommt und bei der Umwelteinflüsse keinen - oder wenn, dann nur einen geringen - Einfluss auf die Permeabilität haben. Dafür sprechen auch neueste Studienergebnisse, bei denen verschiedene Gene identifiziert wurden, die mit der Permeabilität der Darmwand bei Colitis ulcerosa assoziiert sind und die somit einen Zusammenhang zwischen der veränderten Integrität der mukosalen Barriere und der Pathogenese der Erkrankung nahe legen (UK IBD Genetics Consortium et al. 2009; Fisher et al. 2008).

In weiteren Untersuchungen gilt es zu klären, warum es zu einer Erhöhung der intestinalen Permeabilität kommt und sich die Permeabilitäts-erhöhung nicht an gleicher Stelle manifestiert, an der auch die Entzündung stattfindet.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease; *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 Jun;15(6):731-748
- 2) Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology.* 2004 May;126(6):1533-1549
- 3) Anderson AD, Jain PK, Fleming S, Poon P, Mitchell CJ, MacFie J. Evaluation of a triple sugar test of colonic permeability in humans. *Acta Physiol Scand.* 2004 Oct;182(2):171-177
- 4) Anderson AD, Poon P, Greenway GM, MacFie J. A simple method for the analysis of urinary sucralose for use in tests of intestinal permeability. *Ann Clin Biochem.* 2005 May;42(Pt 3):224-226
- 5) Argenzio RA. Intestinal transport of electrolytes and water. In: Swenson MJ (Hrsg.): *Duke`s physiology of domestic animals*; 1984; Cornell University Press, London
- 6) Angriman I, Scarpa M, D'Inca R, et al. Enzymes in feces: useful markers of chronic inflammatory bowel disease. *Clin Chim Acta.* 2007 May;381(1):63-68
- 7) Arslan G, Atasever T, Cindoruk M, Yildirim IS. ⁵¹CrEDTA colonic permeability and therapy response in patients with ulcerative colitis. *Nucl Med Commun.* 2001 Sep;22(9):997-1001
- 8) Berstad A, Arslan G, Folvik G. Relationship between intestinal permeability and calprotectin concentration in gut lavage fluid. *Scand J Gastroenterol.* 2000 Jan;35(1):64-69
- 9) Binder V, Orholm M. Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Neth J Med.* 1996 Feb;48(2):53-56
- 10) Bjarnason I, Peters TJ, Wise RJ. The leaky gut of alcoholism: possible route of entry for toxic compounds. *Lancet.* 1984 Jan 28;1(8370):179-182
- 11) Bjarnason I. Intestinal permeability. *Gut.* 1994 Jan;35(1 Suppl):S18-22
- 12) Bühner S, Reese I, Kuehl F, Lochs H, Zuberbier T. Pseudoallergic reactions in chronic urticaria are associated with altered gastroduodenal permeability. *Allergy.* 2004 Oct;59(10):1118-1123
- 13) Bühner S, Büning C, Genschel J, et al. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut.* 2006 Mar;55(3):342-347

- 14) Classen M, Diehl V, Kochsiek K: Innere Medizin. Urban & Fischer Verlag, München/Jena 2004; S. 1214-1218
- 15) Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev.* 2004 Jul;3(5):394-400
- 16) Dietel M, Suttorp N, Zeitz M: Harrisons Innere Medizin. ABW Wissenschaftsverlag, Berlin 2009; S. 2327
- 17) Dionex Technical Note 20: Analysis of Carbohydrates by Anion Exchange Chromatography with pulsed Amperometric Detection. Dionex 1989; S. 1-5
- 18) Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Büschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol.* 1995 Dec;102(3):448-455
- 19) Elia M, Behrens R, Northrop C, Wraight P, Neale G. Evaluation of mannitol, lactulose and ⁵¹Cr-labelled ethylenediaminetetra-acetate as markers of intestinal permeability in man. *Clin Sci (Lond).* 1987 Aug;73(2):197-204
- 20) Fagerberg UL, Lööf L, Lindholm J, Hansson LO, Finkel Y. Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007 Oct;45(4): 414-420
- 21) Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, et al. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008 Jun;40(6):710-712
- 22) Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest.* 2004 May;113(10):1490-1497
- 23) Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis.* 2000 Feb;6(1):8-15
- 24) Giacomelli R, Passacantando A, Parzanese I, et al. Serum levels of soluble CD30 are increased in ulcerative colitis (UC) but not in Crohn's disease (CD). *Clin Exp Immunol.* 1998 Mar;111(3):532-535
- 25) Gibson PR, van de Pool E, Barrat PJ, Doe WF. Ulcerative colitis--a disease characterized by abnormal epithelial cell? *Gut.* 1988 Apr;29(4):516-521
- 26) Heller F, Florian P, Bojarski C, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology.* 2005 Aug;129(2):550-564

- 27) Herbert TB, Cohen S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom Med.* 1993 Jul-Aug;55(4):364-379
- 28) Herold G: *Innere Medizin.* Verlag Arzt + Information, Köln 2006, S. 415-422
- 29) Immundiagnostik AG: Arbeitsanleitung Calprotectin ELISA Kit: Zur in vitro Bestimmung von Calprotectin (MRP 8/ 14) in Stuhl. Dez. 2007, S. 3
- 30) D'Inca R, Dal Pont E, Di Leo V, et al. Calprotectin and lactoferrin in the assessment of intestinal inflammation and organic disease. *Int J Colorectal Dis.* 2007 Apr;22(4):429-437
- 31) Irvine EJ, Marshall JK. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 2000 Dec;119(6):1740–1744
- 32) José León A, Garrote JA, Arranz E. Cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Med Clin (Barc).* 2006 Jun 24;127(4):145-152
- 33) Kiziltaş S, Imeryüz N, Gürcan T, et al. Corticosteroid therapy augments gastroduodenal permeability to sucrose. *Am J Gastroenterol.* 1998 Dec;93(12):2420-2425
- 34) Klinker R, Silbernagl S: *Lehrbuch der Physiologie.* Thieme Verlag, Stuttgart 2003, S. 439
- 35) Kompetenznetz CED: Die Identifizierung von Krankheitsgenen – Ursachen von CED verstehen lernen. (Zugriff am 05. 02. 2008 auf <http://www.kompetenznetz-ced.de/index.php?genetik>)
- 36) Kroesen AJ, Stockmann M, Ransco C, Schulzke JD, Fromm M, Buhr HJ. Impairment of epithelial transport but not of barrier function in idiopathic pouchitis after ulcerative colitis. *Gut.* 2002 Jun;50(6):821-826
- 37) Levenstein S, Prantera C, Varvo V, et al. Stress and exacerbation in ulcerative colitis: a prospective study of patients enrolled in remission. *Am J Gastroenterol.* 2000 May;95(5):1213-1320
- 38) Loranskaia ID, Zorin SN, Gmoshinskiĭ IV, et al. Permeability of intestinal barrier for macromolecules in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Klin Med (Mosk).* 1999;77(11):31-33
- 39) Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007 Jul;23(4):379-383
- 40) McGilligan VE, Wallace JMW, Heavey PM, Ridley DL, Rowland IR. Hypothesis about mechanisms through which nicotine might exert its effect on the interdependence of inflammation and gut barrier function in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007 Jan;1(13):108-115

- 41) Meddings JB, Sutherland LR, Byles NI, Wallace JL. Sucrose: a novel permeability marker for gastroduodenal disease. *Gastroenterology*. 1993 Jun;104(6):1619-1626
- 42) Merrett MN, Soper N, Mortensen N, Jewell DP. Intestinal permeability in the ileal pouch. *Gut*. 1996 Aug;39(2):226-230
- 43) Montalto M, Curigliano V, Santoro L, et al. Fecal calprotectin in first-degree relatives of patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 2007 Jan;102(1):132-136
- 44) Munkholm P, Langholz E, Hollander D, et al. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis and their first degree relatives. *Gut*. 1994 Jan;35(1):68-72
- 45) Nejdfor P, Wang Q, Ekelund M, et al. Increased colonic permeability in patients with ulcerative colitis: an in vitro study. *Scand J Gastroenterol*. 1998 Jul;33(7):749-753
- 46) Nikolaus S, Schreiber S. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007 Nov;133(5):1670-1689
- 47) Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 1991 Jan 10;324(2):84-88
- 48) Peña AS. Genetics of inflammatory bowel disease. The candidate gene approach: susceptibility versus disease heterogeneity. *Dig Dis*. 1998 Nov-Dec;16(6):356-363
- 49) Riede UN, Werner M, Schaefer HE: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme Verlag, Stuttgart 2004; S. 716-717
- 50) Von Roon AC, Karamountzos L, Purkayastha S, et al. Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am J Gastroenterol*. 2007 Apr;102(4):803-813
- 51) Schürmann G, Brüwer M, Klotz A, Schmid KW, Senninger N, Zimmer KP. Transepithelial transport processes at the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*. 1999 Feb;14(1):41-46
- 52) Shepherd NA, Jass JR, Duval I, Moskowitz RL, Nicholls RJ, Morson BC. Restorative proctocolectomy with ileal reservoir: pathological and histochemical study of mucosal biopsy specimens. *J Clin Pathol*. 1987 Jun;40(6):601-607
- 53) Siegmund B, Zeitz M: *PRAXIS*. Verlag Hans Huber, Bern 2005, Band 94, Heft 41, S. 1599-1604
- 54) de Silva HJ, Gatter KC, Millard PR, Kettlewell M, Mortensen NJ, Jewell DP. Crypt cell proliferation and HLA-DR expression in pelvic ileal pouches. *J Clin Pathol*. 1990 Oct;43(10):824-828

- 55) Söderholm JD, Perdue MH. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001 Jan;280(1):G7-G13
- 56) Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):44-54
- 57) Teahon K, Somasundaram S, Smith T, Menzies I, Bjarnason I. Assessing the site of increased intestinal permeability in coeliac and inflammatory bowel disease. *Gut*. 1996 Jun;38(6):864-869
- 58) Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Forgacs I, Bjarnason I. Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease. *Gastroenterology* 2002 Aug;123(2): 450-460
- 59) Tomita M, Menconi MJ, Delude RL, Fink MP. Polarized transport of hydrophilic compounds across rat colonic mucosa from serosa to mucosa is temperature dependent. *Gastroenterology*. 2000 Mar;118(3):535-543
- 60) Tysk C, Järnerot G. Seasonal variation in exacerbations of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 1993 Jan;28(1):95-96
- 61) Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*. 1988 Jul;29(7):990-996
- 62) UK IBD Genetics Consortium, Barrett JC, Lee JC, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1330-1334
- 63) Wassell J, Dolwani S, Metzner M, Losty H, Hawthorne A. Faecal calprotectin: a new marker for Crohn's disease? *Ann Clin Biochem*. 2004 May;41(Pt3): 230-232
- 64) Welcker K, Martin A, Kölle P, Siebeck M, Gross M. Increased intestinal permeability in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Med Res*. 2004 Oct 29;9(10):456-460
- 65) Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Waldhöer T, Lochs H. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 1993 Jun 5;341(8858):1437-1439
- 66) Xiang JY, Ouyang Q, Li GD, Xiao NP. Clinical value of fecal calprotectin in determining disease activity of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2008 Jan 7;14(1):53-57
- 67) Zamora SA, Hilsden RJ, Meddings JB, Butzner JD, Scott RB, Sutherland LR. Intestinal permeability before and after ibuprofen in families of children with Crohn's disease. *Can J Gastroenterol*. 1999 Jan-Feb;13(1):31-36

7 Anhang

7.1 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Nora Geissler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Epitheliale Barriere-defekte als Pathomechanismus bei Colitis ulcerosa? Messung von gastrointestinaler und Kolonpermeabilität im Rahmen einer Familienstudie“ 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.“

Datum

Unterschrift

7.2 Lebenslauf

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

7.3 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater, PD Dr. Carsten Büning, für die Vergabe des Themas, für die Einführung in die Statistik der Medizin, für die angeregten fachlichen Diskussionen sowie für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Martina Werich für die liebevollen und aufmunternden Worte, vor allem während der Durststrecken bei der Patientenakquise, aber auch für die fachlich-technische Einführung in die Analysemethoden.

Ich danke den Krankenschwestern der CED-Sprechstunden an den Campi CCM und CVK für die Geduld während meiner Anwesenheit und die Bereitstellung von Räumlichkeiten, wenn dies möglich war.

Danke, Alex, für Deine geduldige Unterstützung und Hilfe bei der Bildverarbeitung und beim Layout sowie für die Motivation während des Fertigstellens der Arbeit.

Ich danke meiner Mama, Frau Vera Rosenberg, für die Korrekturen und den Zuspruch.

Und natürlich Enno für die kleinen Tritte während der Niederschrift dieser Arbeit, die mir jedes Mal ein kleines Glücksgefühl verschafften.