## 3. Therapie des langsamen Kolontransits

Für die chronische Obstipation werden Ballaststoffe allgemein als Basistherapie empfohlen[78]. In vielen Studien an gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Ballaststoffzufuhr zu einer Verkürzung der Transitzeiten und Erhöhung der Stuhlgewichte führt; dies trifft auch bei der Mehrzahl der Patienten mit chronischer Obstipation zu, wobei die Patienten mit chronischer Obstipation nicht die Werte gesunder Probanden erreichen[37, 79]. Der klinische Effekt auf die Beschwerden ist meist unbefriedigend, besonders bei Patienten mit chronischer Obstipation mit verlangsamtem Kolontransit, der sogenannten „slow- transit constipation“[56]. Das Ziel der in 3.1 zusammengefassten Untersuchung war es, das Ansprechen von obstipierten Patienten auf die Ballaststofftherapie zu testen und insbesondere Parameter zu definieren, die ein solches Ansprechen vorhersagen würde[15].

Sprechen Ballaststoffe nicht an, wird in der Praxis häufig auf die sog. stimulatorischen Laxantien übergegangen. Als Alternative dazu wäre nebenwirkungsfreies Präparat wünschenswert, das die bei der Obstipation gestörten physiologischen Vorgänge normalisiert.

Diese Voraussetzungen werden von E.- coli- Stamm Nissle 1917 (Serotyp 06:K5:H1, Mutaflor®) erfüllt, was u. a. in 2 klinischen Studien belegt werden konnte[80, 81]. Der Mechanismus dieser Wirkung ist unklar. Eine alleinige Wirkung über die Erhöhung des Stuhlgewichtes ist unwahrscheinlich, da sich die Ernährung der Patienten in der Placebo- von der in der Verumgruppe nicht signifikant unterschied. Eventuell tragen eine Zunahme der Bakterienmasse und eine leichte Durchgasung der Kotsäule über die Stimulation von Druckrezeptoren zur Normalisierung der Stuhlfrequenz bei. Sinnfällig erscheint die Hypothese, dass bei der Verstoffwechslung von Ballaststoffen durch die o.g. Kolibakterien im menschlichen Kolon

Substanzen entstehen, welche die Motilität anregen. Dies könnte einerseits über eine Steigerung der Flüssigkeitssekretion bzw. Hemmung der Resorption, andererseits aber auch über eine direkte muskuläre oder neuronale Stimulation bzw. Hemmung der Motilität erreicht werden. Möglicherweise spielen auch kurzkettige Karbonsäuren, in erster Linie Azetat, eine Rolle[82, 83].

Zur Prüfung der letztgenannten Hypothese eignen sich Grundlagenmodelle zur Motilitätsmessung am Rattenkolon. Die Verwendung der Ratte als Versuchstier empfiehlt sich wegen der vergleichbaren experimentellen Wirkung von Laxantien beim Kolon von Ratte und Mensch [84, 85]. Deshalb wurde an einem in- vitro- Modell der Einfluss von mit E. coli inkubierten zellfreien Kulturüberständen auf die Kontraktionsreaktivität isolierter Rattenkolonsegmente untersucht. Das Ziel der in Abschnitt 3.2 dargestellten Untersuchungen[86] ist die Beantwortung der Frage, ob von Stoffwechselprodukten des E.-coli-Stammes Nissle 1917 eine direkte Wirkung auf die Motilität der Kolonsegmente ausgeht.

## 3.1. Ballaststoffe

***Methode***

Patienten

Es wurden 149 konsekutive Patienten, die sich wegen Beschwerden einer chronischen Obstipation in der gastroenterologischen Ambulanz vorstellten, eingeschlossen (mittleres Alter 53 Jahre, Spannweite 18 bis 91, 84 % Frauen). Die Patienten wurden von Januar 1988 bis März 1993 in zwei großen Zentren rekrutiert: Medizinische Klinik, Klinikum Innenstadt der Universität München und Städtisches Krankenhaus München Bogenhausen. Die chronische Obstipation war definiert als eine Stuhlfrequenz von weniger als drei Defäkationen pro Woche oder die Notwendigkeit zum heftigen Pressen in mehr als 25 % der Defäkationen, kombiniert mit abdominellen Beschwerden[87]. Als chronisch wurden Beschwerden über ein Jahr angesehen.

Klinische Evaluation

Die Anamnese wurde jeweils von einem erfahrenen Gastroenterologen unter anderem mit der Hilfe eines standardisierten Fragebogens erhoben, der die Stuhlfrequenz, die Notwendigkeit zum Pressen bei der Defäkation, das Gefühl der Obstruktion und der inkompletten Entleerung, abdominelle Schmerzen oder Aufgetriebensein, Notwendigkeit der Fingermanipulation etc. abfragte. Die Schwere der Symptome wurde mit einer Nominalskala bewertet (0 Symptom liegt nicht vor, 1 gelegentlich, 2 fast ständig). Zur Obstipation prädisponierende Erkrankungen oder Medikamente und in Bezug auf die Darmfunktion relevante Operationen wurden ausgeschlossen. Eine körperliche Untersuchung und entsprechende

Labortests folgten. Mit Laborscreening wurden insbesondere ein Diabetes mellitus, eine Niereninsuffizienz, eine Schilddrüsenunter- oder -Überfunktion und ein Hyperparathyreoidismus ausgeschlossen. Bei den Nachuntersuchungen nach zwei und sechs Wochen Ballaststofftherapie wurde der Fragebogen erneut erhoben.

Ballaststofftherapie

Den Patienten wurde pro Tag 3x10g Plantago ovata Samenschalen verabreicht (3x2 Beutel zu 5g Mucofalk, Falk, Freiburg i.B.). Der Patient hatte die Möglichkeit, bei sehr unangenehmen Blähungen die Dosis selbstständig auf 3 x 5g pro Tag zu reduzieren und dies zu protokollieren. Als Ballaststoffe wurde das Plantago- Präparat gewählt, da es leichter einzunehmen und besser verträglich ist als einfache Weizenkleie [88, 89]. Die Compliance wurde durch Befragung und Abzählen der retournierten Beutel geprüft. Der subjektive Effekt der Ballaststofftherapie wurde wie folgt bewertet: 1 kein Effekt, 2 Besserung der Symptomatik, 3 komplettes Verschwinden der Symptomatik. Dieses einfache, nicht-placebo-kontrollierte Vorgehen wurde gewählt, da es nicht um den Nachweis einer prinzipiellen Wirksamkeit einer Therapie ging.

Kolontransitzeit

Die Kolontransitzeit wurde mit der Markermethode bestimmt (s. Kap. 1.4). Die Markergabe erfolgte über 13 Tage, so dass maximale Transitzeiten von knapp über 300 h quantifizierbar waren. Eine Kolontransitzeit von >67h wurde als pathologisch angesehen[74, 90].

Proktoskopie, Defäkographie, anorektale Manometrie

Die entsprechenden diagnostischen Methoden wurden wie in Kapitel 1.4 ausführlich dargestellt durchgeführt. Die funktionelle Proktoskopie wurde bei allen Patienten beim Indexbesuch durchgeführt. Bei 81 % der Patienten wurde eine Defäkographie und bei 67 % der Patienten eine anorektale Defäkographie durchgeführt. Eine rektale Hyposensitivität wurde angenommen, wenn ein Gefühl der Rektumfüllung bei einem rektalen Dehnungsvolumen von ≥60 ml und ein Stuhldrang erst bei einem Dehnungsvolumen von ≥140 ml auftrat[91].

Diagnose

Die klinische Datenlage wurde wie im klinischen Alltag erhoben. Danach wurden die Befunde von vier Gastroenterologen ausführlich diskutiert, die danach eine Einteilung in fünf verschiedene diagnostische Kategorien vornahmen: Defäkationsstörung (Rektozele, innerer Prolaps, Anismus, rektale Hyposensitivität), langsamer Kolontransit, Defäkationsstörung und langsamer Kolontransit, Medikamentennebenwirkung und keine erhebbare Ursache der Beschwerden. Die Rektozele und der innere Prolaps wurden nur dann als relevant angesehen, wenn die Entleerung des Kontrastbreis bei der Defäkographie unvollständig war. Ein Anismus wurde nur angenommen, wenn die digitale Palpation, die rektoanale Manometrie und die Defäkographie übereinstimmend Befunde einer paradoxen Sphinkterkontraktion zeigten.

Statistik

Numerische Daten wurden mit dem Kruskal- Wallis-Test und dem Mann-Whitney- U- Test auf statistisch signifikante Unterschiede getestet, nominale Daten mit dem $\chi^2$-Test. Ein $p < 0,05$ im zweiseitigen Test wurde

als signifikant festgelegt. Die Auswertung erfolgte auf einem Computer mit dem Statistik-Programm SPSS/PC+ von SPSS Inc. Chikago, Illinois, USA.

***Ergebnisse***

Unter Ballaststoffgabe waren 32 Patienten (21 %, 24 Frauen, mittleres Alter 53 Jahre, Spannweite 18-91) symptomfrei. 84 Patienten (56 %, 72 Frauen, mittleres Alter 50 Jahre, Spannweite 20-81) bemerkten überhaupt keinen Einfluss der Ballaststoffe auf die Symptomatik. Die übrigen 33 Patienten (22 %, 29 Frauen, mittleres Alter 54 Jahre, Spannweite 24-86) erfuhren unter Ballaststoffgabe eine Besserung der Symptomatik. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen drei Gruppen in Bezug auf Alters- und Geschlechtsverteilung. Nur das Symptom des Gefühls der inkompletten Entleerung war bei den Patienten, die durch die Ballaststofftherapie asymptomatisch wurden, signifikant seltener anzutreffen (Tabelle 3.1.1). Zwischen den beiden Zentren traten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf demographische Daten und in der Symptomverteilung auf.

Tabelle 3.1.1: Symptomverteilung in den drei Gruppen mit unterschiedlichem Ansprechen auf die Ballaststofftherapie

| Symptom | Kein Ansprechen N=84 | Symptome besser N=33 | symptomfrei N=32 |
|---|---|---|---|
| Pressen | 93% | 91% | 100% |
| <3 Defäkationen pro Woche | 83% | 73% | 88% |
| aufgetriebenes Abdomen | 67% | 79% | 81% |
| inkomplette Entleerung | 60% | 76% | 41%* |
| Hindernis | 31% | 33% | 19% |
| Finger zur Hilfe | 30% | 30% | 22% |

* p=0,016

Bei einem Drittel der Patienten wurde keine definierte Störung als Ursache der Beschwerden gefunden, bei einem Drittel ein langsamer Kolontransit und bei einem Drittel eine Defäkationsstörung. Die verschiedenen Formen der Defäkationsstörungen sind in Tabelle 3.1.2 aufgeführt.

Tabelle 3.1.2: 61 Patienten mit Defäkationsstörung (incl.10 mit langsamem Transit)

| Diagnose | N (Frauen/Männer) |
|---|---|
| 1. Anismus | 5 (3/2) |
| 2. rektale Hyposensitivität | 9 (7/2) |
| 3. Rektozele | 17 (17/0) |
| 4. innerer Prolaps | 25 (22/3) |
| 2. und 3. | 2 (2/0) |
| 3. und 4. | 2 (2/0) |
| 1. und 2. | 1 (1/0) |

Die fünf verschiedenen diagnostischen Gruppen unterschieden sich signifikant im Ansprechen auf die Ballaststofftherapie (Abb. 3.1.1).

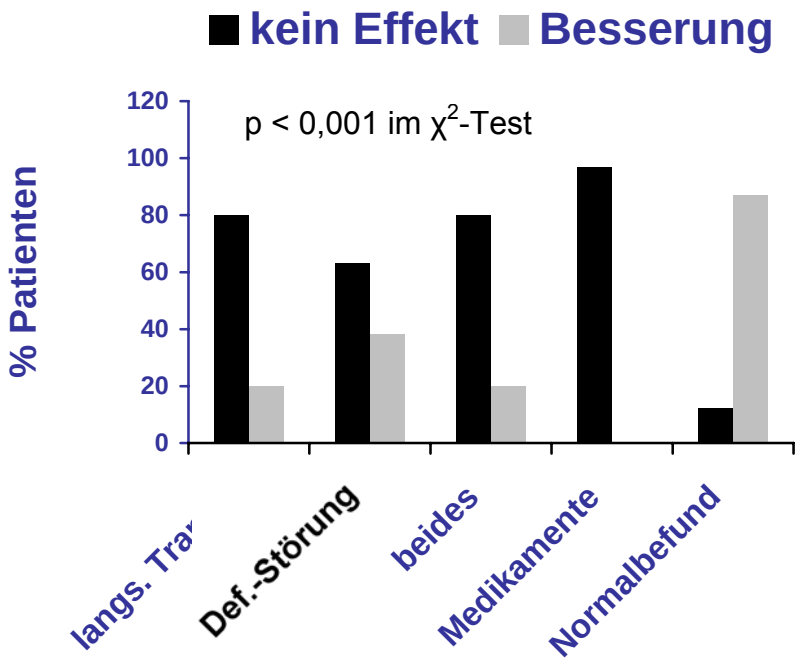



Abbildung 3.1.1: Ansprechen auf die Ballaststofftherapie, stratifiziert nach den 5 verschiedenen Behandlungssgruppen.

## 3.2 Einfluss von Darmbakterien E. coli Stamm Nissle 1917

***Methode***

Prinzip der Modelluntersuchungen

In einem sterilisierten und temperierten, mit modifizierter Krebs-Ringer-Lösung gefüllten Bad werden isolierte Kolonsegmente so fixiert, dass über eine Ableitung Kontraktilitätsänderungen gemessen und aufgezeichnet werden können (Abb. 3.2.1). Die Aufhängung der unmittelbar ex vivo entnommenen Darmsegmente erfolgt entweder vertikal oder horizontal zur Erfassung der longitudinalen oder zirkulären Muskelreaktivität.
Die sterile Krebs-Ringer-Pufferlösung wird dabei mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Kulturüberstände von E. coli Stamm Nissle 1917 versetzt. Die Auslösung von Kontraktionsreaktionen im Darmsegment erfolgt durch Zugabe von Carbachol oder das Setzen eines elektrischen Impulses.

Die im Eigenbau angefertigten doppelwandigen Organbäder (6 ml Fassungsvermögen) werden über eine Glasfritte (P3) mit Carbogen (95 % $O_2$, 5 % $CO_2$) kontinuierlich begast.
Als Puffer wird eine nach Krebs-Ringer modifizierte Lösung verwendet (NaCl [115,5 mMol/l], $NaHCO_3$ [22,14 m Mol/l] Glucose [11,11 mMol/l], KCl [4,48 mMol/l], $MgSO_4(7xH_2O)$ [1,16 mMol/l], $NaH_2PO_4(H_2O)$ [1,16 mMol/l], $CaCl_2$ (2x $H_2O$) [2,50 mMol/l]).

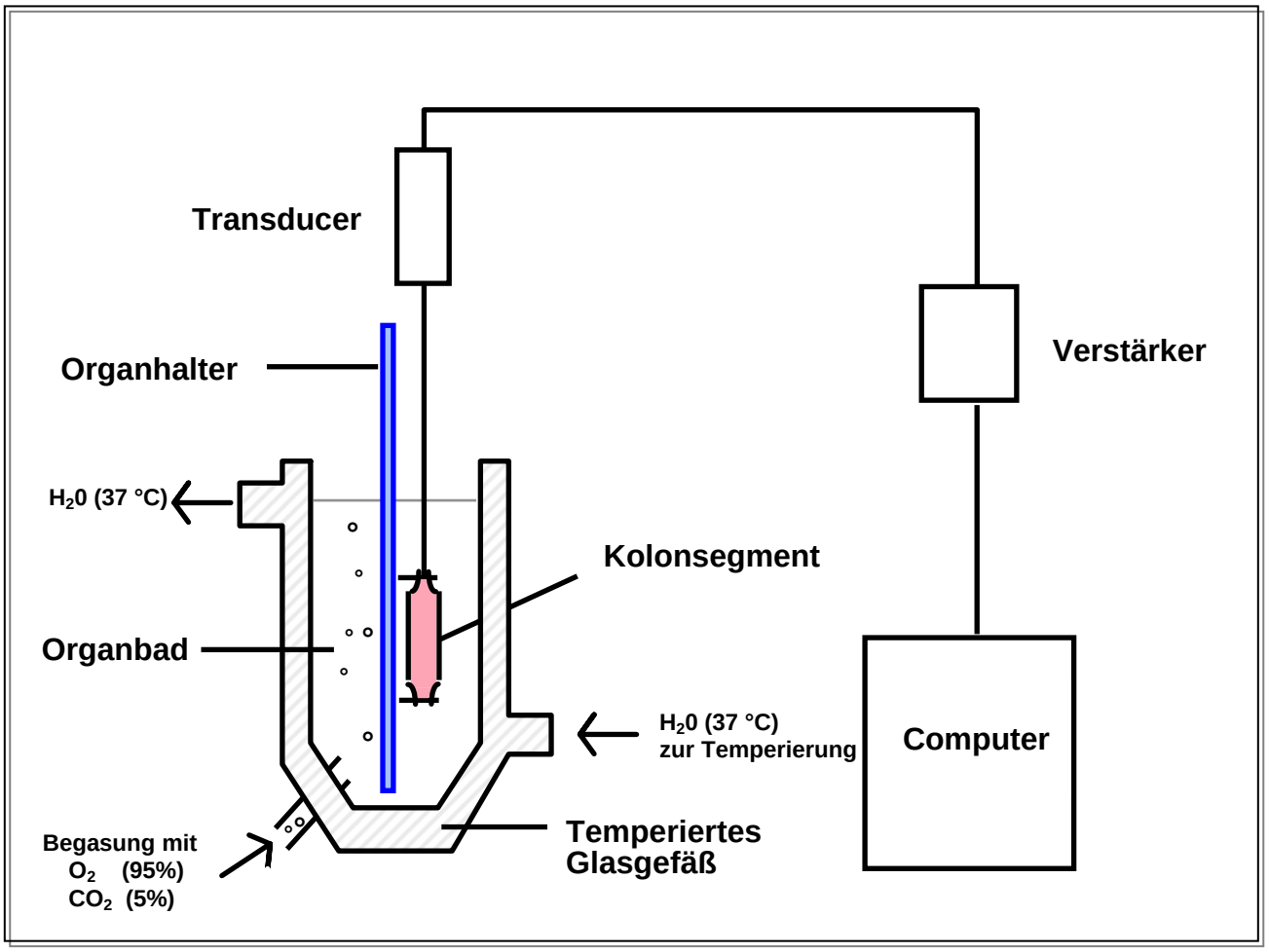



Abbildung 3.2.1: Vorrichtung zur Erfassung von Kontraktionsänderungen von Darmsegmenten im sterilisierten Organbad

Die Darmsegmente werden von 150 - 230 g schweren adulten, weiblichen Auszucht- Wistar- Ratten (Charles River) gewonnen. Die Tiere werden unter Ethernarkose getötet. Anschließend wird das Kolon entnommen und sofort in einem Gefäß mit durch Carbogengas oxygenierter Pufferlösung präpariert. Jeweils ein Darmsegment (1,0 - 1,3 cm) wird entweder vertikal (zur Erfassung der Reaktion longitudinal verlaufender Muskelfasern) oder horizontal (zur Erfassung der Reaktion zirkulär verlaufender Muskelfasern) befestigt (Abb. 3.2.1).

Präparation der Testflüssigkeit (zellfreier Nährbodenüberstand)

Im Kryosystem gehaltene mit E. coli Stamm Nissle 1917 beschichtete Perlen werden als Inokulum (1 Perle/10 ml) zur Erzeugung einer 16-stündigen Bakterienkultur im Standard-I-Bouillon verwendet. Eine Überimpfung von 100 µl dieser Vorkultur auf weitere 10 ml Medium dient der Herstellung der Subkultur I. Davon werden ebenfalls 100 µl in 10 ml Medium überimpft und bebrütet, um die Subkultur II, die zur Gewinnung des Überstandes herangezogen wird, zu erhalten. Durch das mehrmalige Überimpfen wird stets eine vergleichbare Stoffwechselbereitschaft der zu untersuchenden Bakterien erreicht. Das Bakterienwachstum erfolgt ausschließlich unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 37°C. Die Kultivierungsbedingungen differieren bezüglich der Zusammensetzung der Nährstoffmedien und der Inkubationsdauer (s.u.). Bei allen Inkubationsansätzen dient der Überstand einer nicht beimpften, aber inkubierten Probe als Kontrolle.

Anzucht von E. coli Stamm Nissle

Ein Teil der Untersuchungen wird mit Überständen von Bakterienkulturen durchgeführt. Als handelsübliches Nährmedium dient Standard-I-Bouillon (Merck). Es enthält je Liter Lösung 15,0 g Pepton, 3,0 g Hefeextrakt, 6,0 g NaCl und 1,0 g D(+)-Glucose.

Da bekannt ist, dass bestimmte Stoffwechselleistungen des E.- coli-Stammes Nissle 1917 erst unter Nährstoffmangelbedingungen ausgelöst werden, wird ein weiterer Teil der Untersuchungen mit Überständen von Bakterienkulturen durchgeführt, die in einem Nährstoffmangelmedium kultiviert worden sind. Als Mangelmedium dient PAG-Medium (**P**hosphatpuffer, $Na_2HPO_4$ [100,03 mMol/l] und 6,0 g $KH_2PO_4$ [44,09

mMol/l], **A**mmoniumchloridlösung, **G**lucoselösung). Alle Stamm-Lösungen werden nach der Herstellung autoklaviert (15 min., 121 °C) und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt.

Um eine eventuelle Abhängigkeit der Produktion motilitätsbeeinflussender Faktoren vom Entwicklungszustand der Bakterien zu erfassen, wird der Überstand nach einer Bebrütungsdauer von 4 Stunden (logarithmische Wachstumsphase) und 16 Stunden (stationäre Wachstumsphase) untersucht. Die Überstände werden durch Zentrifugation und Sterilfiltration gewonnen.

Stimulation der Kolonkontraktilität

Die überwiegend muskuläre Stimulation der Kolonsegmentkontraktion erfolgt mit Carbamylcholinchlorid (= Carbachol; = CCH; $C_6H_{15}ClN_2O_2$; MG = 182,65; SIGMA), gelöst in physiologischer Kochsalzlösung. Es wurde ausschließlich die kumulative Carbacholstimulation verwendet, d.h. den Organbädern werden sukzessive nach jeweils 2 Minuten ohne auszuwaschen, CCH- Konzentrationen in den Abstufungen $10^{-7}$, 3 x $10^{-7}$, $10^{-6}$, 3 x $10^{-6}$, $10^{-5}$, 3 x $10^{-5}$ Mol/l erzeugt.
Zur Elektrostimulation wird über 2 Platinelektroden, die an den Enden der Darmsegmente angelegt sind, ein elektrisches Feld aufgebaut. Jedes Darmsegment wird mehrmals (5 bis 7 mal) für je 10 Sekunden stimuliert (40 V, 1 ms Impulsdauer, 3 pps/ 10 pps). Gemessen werden die Ausschläge nach Beendigung der jeweiligen Stimulationen („off-contractions“).
Der Versuchsablauf pro Versuchstag ist in Abb. 3.2.2 dargestellt.

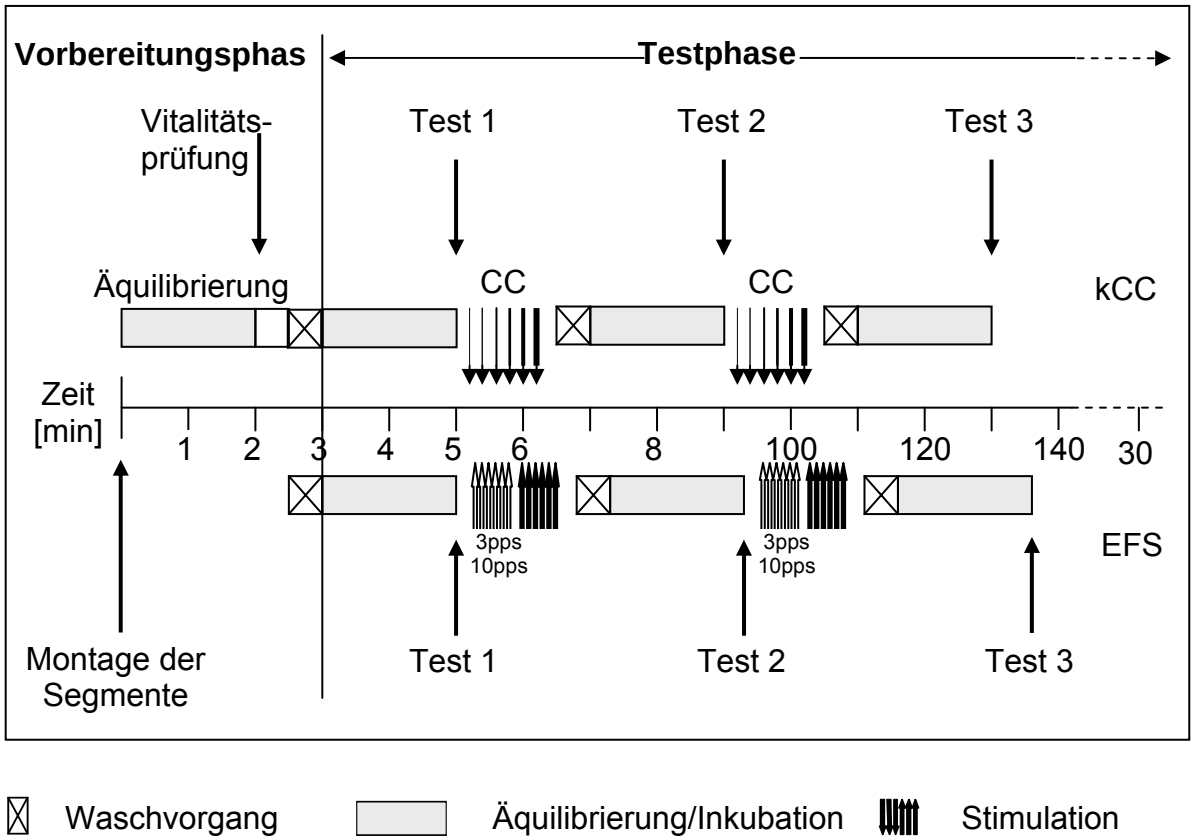



Abbildung 3.2.2: Schema eines Versuchstages für kumulative Carbachol-Stimulation (kCCH) oder elektrische Feldstimulation (EFS). Für jedes Darmsegment erfolgt zu Beginn einer Messreihe eine Vitalitätsprüfung mit einer $10^{-5}$ M CCH-Stimulation. Die kCCH- Stimulation ist immer identisch ($10^{-7}$ M bis 3 x $10^{-5}$ M), die EFS erfolgt alternierend in Stärken 3 pps und 10 pps bzw. 10 pps und 3 pps. Test: verschiedene Testflüssigkeitsvarianten als Zugabe zur Organbadflüssigkeit.

Statistische Methoden

In unserem Versuchsaufbau werden die Kontraktionsamplituden bei beiden Stimulationsarten von je fünf unabhängigen dichotomen Variablen beeinflusst. Es ergeben sich somit $2^5$ = 32 Kombinationsmöglichkeiten, die an jeweils mindestens sechs Rattenkolonsegmenten ausgetestet werden. Von statistischer Seite ergibt sich aus unserer Versuchsanordnung einerseits das Problem der geringen Fallzahl pro Kombinationsmöglichkeit

(n=6) und andererseits das Problem des multiplen Testens. Auf diesem Hintergrund ist ein Verfahren sinnvoll, welches die Anzahl der Tests minimiert und zugleich irrelevante Variable herausfiltert und somit die Zusammenfassung verschiedener Kombinationsmöglichkeiten erlaubt.

Tabelle 3.2.1: Unabhängige Variable und ihre Ausprägungsformen

| Variable | Ausprägungsformen der Variablen | | |
|---|---|---|---|
| Herkunft des Segmentes | Colon ascendens | - | Colon descendens |
| Art der Aufhängung | longitudinal | - | zirkulär |
| Kulturmedium | Standard-I-Bouillon | - | PAG-Medium |
| Wachstumsphase | logarithmisch | - | stationär |
| Bebrütungsart | Verum | - | Kontrolle |

Insgesamt ergeben sich die in Abb. 3.2.3 dargestellten Kombinationsmöglichkeiten.

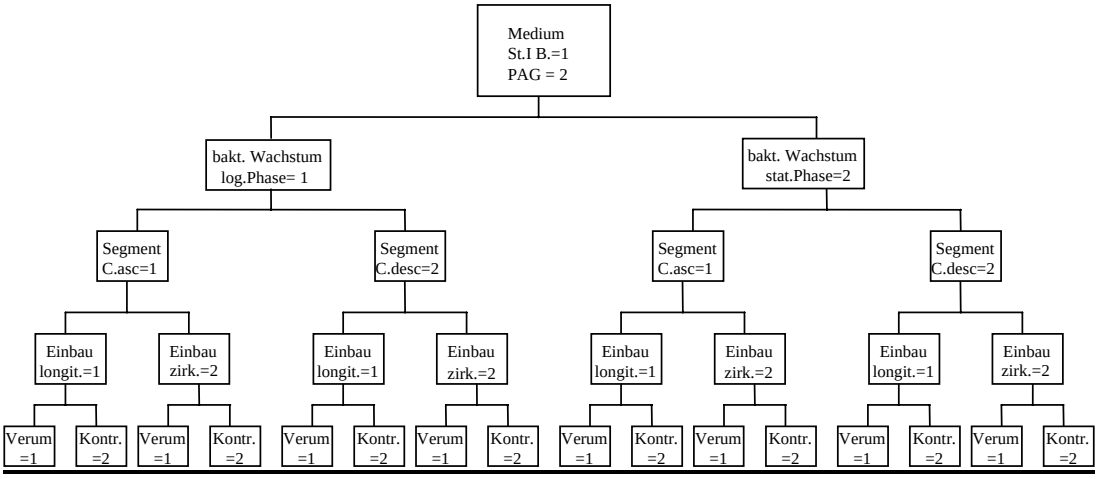



Abbildung 3.2.3: Kombinationsmöglichkeiten von Versuchsansätzen einer Stimulationsart: *Medium*: Standard-I-Bouillon (St.I B.) vs. PAG-Medium (PAG). *Bakterielle Wachstumsphase*: logarithmische (log.) vs. stationäre (stat.)Phase. *Segment*: Colon ascendens (C.asc) vs. Colon descendens (C.desc). *Einbau der Segmente*: longitudinal (longit.) vs. zirkulär (zirk.). *Inkubierter Überstand*: Verum vs. Kontrolle (Kontr.).

Ein solches Verfahren ist die schrittweise multiple Regression. Hierbei werden zunächst über eine Varianzanalyse Regressionskoeffizienten für

jede unabhängige Variable berechnet. Davon ausgehend wird diejenige unabhängige Variable ermittelt, die den größten (signifikanten) Einfluss auf die abhängige Variable ausübt. In einem zweiten Schritt werden dann die Variablen ermittelt, die darüber hinaus die Regression signifikant beeinflussen. Anschließend wird eine Regressionsgleichung erstellt, die nur die signifikanten unabhängigen Variablen enthält.
Ergibt die Regressionsanalyse einen signifikanten Einfluss einer Variablen, werden die entsprechenden paarweisen Vergleiche mit dem Mann-Whitney- U- Test durchgeführt.

***Ergebnisse***

Elektrische Feldstimulation (EFS)

Multiple Regression

Wie aus den Tabellen 3.2.2 und 3.2.3 ersichtlich ist, haben weder das Bebrütungsmedium noch das Stadium des bakteriellen Wachstums sondern die Art der Aufhängung bzw. die Herkunft des Darmsegments einen Einfluss auf die Kontraktionskraft. Die Art der Bebrütung (mit oder ohne Bakterien) beeinträchtigt das Ergebnis nur im Falle der höchsten Testflüssigkeitskonzentration. Die Ergebnisse werden im folgenden deshalb jeweils nach diesen beiden Variablen getrennt dargestellt.

Tabelle 3.2.2: Multiple schrittweise Regression der Variablen (s. Tab. 3.2.1) für die Elektrostimulation mit 3 pps. Die Zahlen geben die p-Werte für die Signifikanz der Regressionskoeffizien-ten an, n.s. = nicht signifikant.

| Variable | Konzentration der Testflüssigkeit im Organbad | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | $3x10^{-3}$ | $3x10^{-2}$ | $1,7x10^{-1}$ |
| Segment | n.s. | 0,038 | 0,044 | n.s. |
| Aufhängung | 0,0 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Medium | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| Phase | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| Bebrütung | n.s. | n.s. | n.s. | 0,017 |

Tabelle 3.2.3: Multiple schrittweise Regression der Variablen (s. Tab. 3.2.1) für die Elektrostimulation mit 10 pps.
Die Zahlen geben die p-Werte für die Signifikanz der Regressionskoeffizienten an, n.s. = nicht signifikant.

| Variable | Konzentration der Testflüssigkeit im Organbad | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | $3x10^{-3}$ | $3x10^{-2}$ | $1,7x10^{-1}$ |
| Segment | 0,005 | n.s. | n.s. | 0,001 |
| Aufhängung | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| Medium | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| Phase | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| Bebrütung | n.s. | n.s. | n.s. | 0,001 |

Kontraktionsamplituden

Die Ergebnisse zum Einfluss des zellfreien Überstandes unterschiedlicher Vorbehandlung (Bebrütung mit und ohne Bakterien) und Konzentration auf die Spontanaktivität der Darmsegmente (gemessen als „off- contraction“) sind in den Tabellen 3.2.4 - 3.2.5 zusammengestellt. Um während der Experimente systematische Fehler auszuschließen, ist die Reihenfolge der zuzugebenden Testflüssigkeiten (inklusive der NaCl- Zugabe für den Nullwert) randomisiert worden und nicht in auf- oder absteigender Konzentrationsreihe erfolgt. Trotzdem ist eine nachhaltige Beeinflussung des funktionsbereiten Darmsegmentes durch den vorangegangenen Inkubationsversuch nicht sicher auszuschließen (physiologische Adaptation). Das hat zur Folge, dass der gemittelte Nullwert der Verumreihe, (die generell höhere Kontraktionsamplituden erzeugt) durchschnittlich ein höheres Niveau annimmt als der gemittelte Nullwert der Kontrollreihe. Dieser Effekt ist bei der graphischen Darstellung der Ergebnisse für die Elektrofeldstimulation mit 10 pps berücksichtigt worden. Die in den Abbildungen 3.2.4 und 3.2.5 dargestellten Säulen sind auf einen Basiswert ohne Überstandzugabe umgerechnet und als relative Änderungen der Kontraktilität angegeben.

Fast in allen Versuchseinstellungen zeigt sich übereinstimmend ein hemmender Einfluss des ohne Bakterien bebrüteten Überstandes auf die Kontraktionsamplituden. Die Hemmung ist konzentrationsabhängig und verstärkt sich mit steigenden Zugabemengen. Der Effekt ist deutlicher unter der hohen

Stimulationsfrequenz (10 pps). Sind in den Nährmedien E.- coli- Bakterien (Stamm Nissle 1917) gezüchtet worden und werden davon zellfreie Überstände eingesetzt, so zeigt sich trotz unterschiedlicher Versuchsansätze insgesamt ein Trend zur Kompensation der beschriebenen Hemmung. Aus der Vielzahl der getesteten Kombinationsmöglichkeiten haben sich Konstellationen herauskristallisiert, bei denen die Zugabe bebrüteter zellfreier Überstände sogar zu einer zusätzlichen Stimulation, gemessen an der Höhe der Kontraktionsamplituden, führt. Dabei sprechen die gewählten unterschiedlichen Frequenzen jeweils verschiedene Darmkompartimente an. So zeigt sich der steigernde Effekt nach 3- pps-Stimulation auf die zirkuläre Muskulatur im Colon ascendens und nach 10- pps-Stimulation auf die longitudinale Muskulatur im Colon descendens statistisch signifikant (T-Test für unverbundene Stichproben).

Tabelle 3.2.4: Einfluss von zellfreien Nährbodenüberständen auf die Amplituden der „off- Kontraktionen“ im Colon ascendens und descendens nach Elektrofeldstimulation mit **3 pps** (n=24)

| Art der Aufhängung | Konzentration der Testflüssigkeit | Off-Kontraktionsamplituden [mN] | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | C. ascendens | | C. descendens | |
| | | Kontrolle [ξ( $s_x$)] | Verum [ξ( $s_x$)] | Kontrolle [ξ( $s_x$)] | Verum [ξ( $s_x$)] |
| Longitudinal | 0 | 14,9 (0,9) | 15,0 (1,6) | 11,0±(1,2) | 12,5(0,9) |
| | $3x10^{-3}$ | 15,6 (1,2) | 14,2 (1,4) | 9,2±(1,2) | 12,1(1,0) |
| | $3x10^{-2}$ | 13,2 (1,2) | 14,2 (1,5) | 10,3±(1,1) | 10,7(1,0) |
| | $1,7x10^{-1}$ | 11,4 (1,0) | 12,7 (1,0) | 9,5±(0,8) | 10,6(0,8) |
| Zirkulär | 0 | 7,6 (0,9) | 7,8 (0,8) | 8,2(0,9) | 9,8(1,0) |
| | $3x10^{-3}$ | 8,4 (1,3) | 7,9 (0,9) | 8,3(1,1) | 9,6(1,1) |
| | $3x10^{-2}$ | 7,6 (0,8) | 8,3 (0,9) | 7,6(0,9) | 8,6(0,8) |
| | $1,7x10^{-1}$ | 6,2 (0,7) | 9,0 (1,1)* | 7,0(0,8) | 7,8(0,9) |

- p = 0,031
-

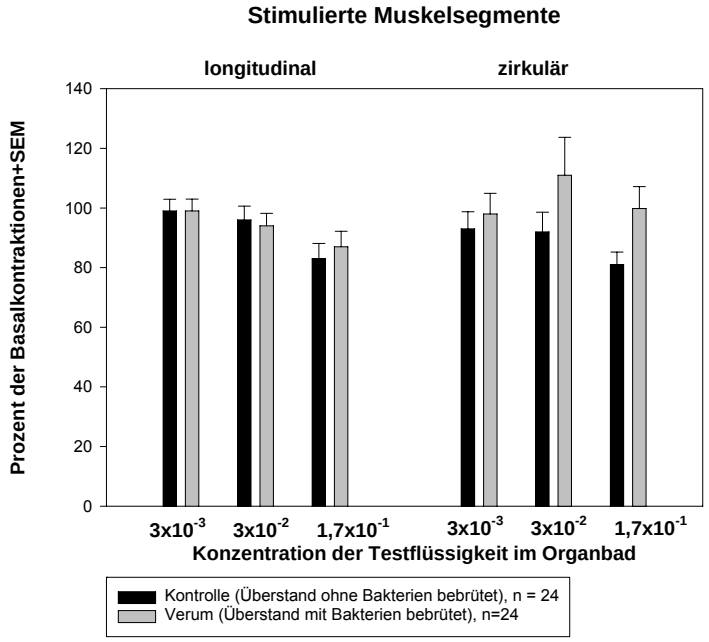
Kontrolle: Überstand ohne Bakterien bebrütet, Verum: Überstand mit Bakterien bebrütet

Tabelle 3.2.5: Einfluss von zellfreien Nährbodenüberständen auf die Amplituden der „off-Kontraktionen“ im Colon ascendens und descendens nach Elektrofeldstimulation mit **10 pps** (n=24)

| Art der Aufhängung | Konzentration der Testflüssigkeit | Off-Kontraktionsamplituden [mN] | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | C. ascendens | | C. descendens | |
| | | Kontrolle [ξ( $s_x$)] | Verum [ξ( $s_x$)] | Kontrolle [ξ( $s_x$)] | Verum [ξ( $s_x$)] |
| longitudinal | 0 | 25,4(1,3) | 27,6(2,4) | 25,7(1,9) | 27,0(2,0) |
| | $3x10^{-3}$ | 24,8(1,4) | 26,9(2,4) | 22,9(1,7) | 26,4(1,9) |
| | $3x10^{-2}$ | 23,8(1,3) | 25,2(2,1) | 21,7(1,8) | 25,7(2,0) |
| | $1,7x10^{-1}$ | 20,2(1,2) | 22,7(1,7) | 19,6(1,4) | 25,7(1,7)** |
| zirkulär | 0 | 9,8(1,0) | 9,8(0,8) | 15,3(1,6) | 17,6(1,6) |
| | $3x10^{-3}$ | 9,4(1,1) | 9,9(1,2) | 14,5(1,6) | 16,3(1,5) |
| | $3x10^{-2}$ | 9,7(1,2) | 9,5(0,9) | 13,3(1,6) | 15,9(1,5) |
| | $1,7x10^{-1}$ | 8,0(0,8) | 9,5(0,9) | 12,6(1,3) | 15,5(1,8) |

** p = 0,006

Kontrolle: Überstand ohne Bakterien bebrütet, Verum: Überstand mit Bakterien bebrütet



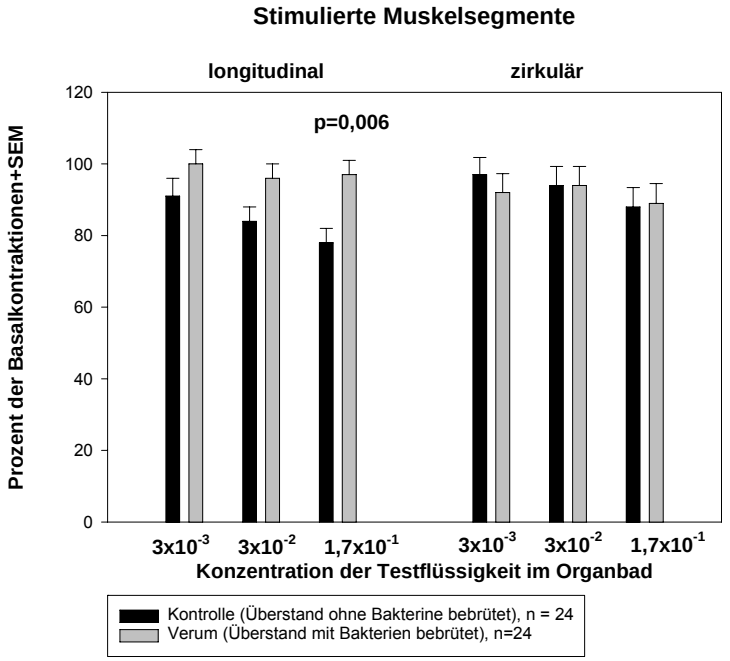




Abbildung 3.2.4: Einfluss von zellfreien Nährbodenüberständen auf die relative Änderung der Kontraktionsamplituden („off-Kontraktion“) longitudinaler und zirkulärer Muskulatur im Colon ascendens (oben) und Colon descendens (unten) nach Elektrofeldstimulation mit 10 pps (Ergebnisse ohne Zugabe von Nährbodenüberstand werden 100 % gesetzt und entsprechen der Basalkontraktion), Mittelwert ± SEM

Carbachol (CCH)-Stimulation

Nach Stimulation mit dem Acetylcholin- Analogon Carbachol in aufsteigender Konzentration ergeben sich typischerweise dose- response- Kurven, wie sie beispielhaft in Abb. 3.2.5 wiedergegeben sind. Die Kurven in Abb. 3.2.5 resultieren aus der Zusammenfassung aller Ergebnisse (Mittelwert ± SEM) von Darmsegmenten (Colon ascendens plus Colon descendens, n = 102), die mit Puffer oder unterschiedlicher Konzentration von nicht mit Bakterien bebrüteten Nährbodenüberständen erhalten wurden. Analog zur Stimulation im elektrischen Feld wird auch hier der inhibitorische Effekt bei Einsatz einer hohen Überstand-Konzentration selbst ohne Stimulation mit Carbachol (Spontanaktivität) sichtbar.

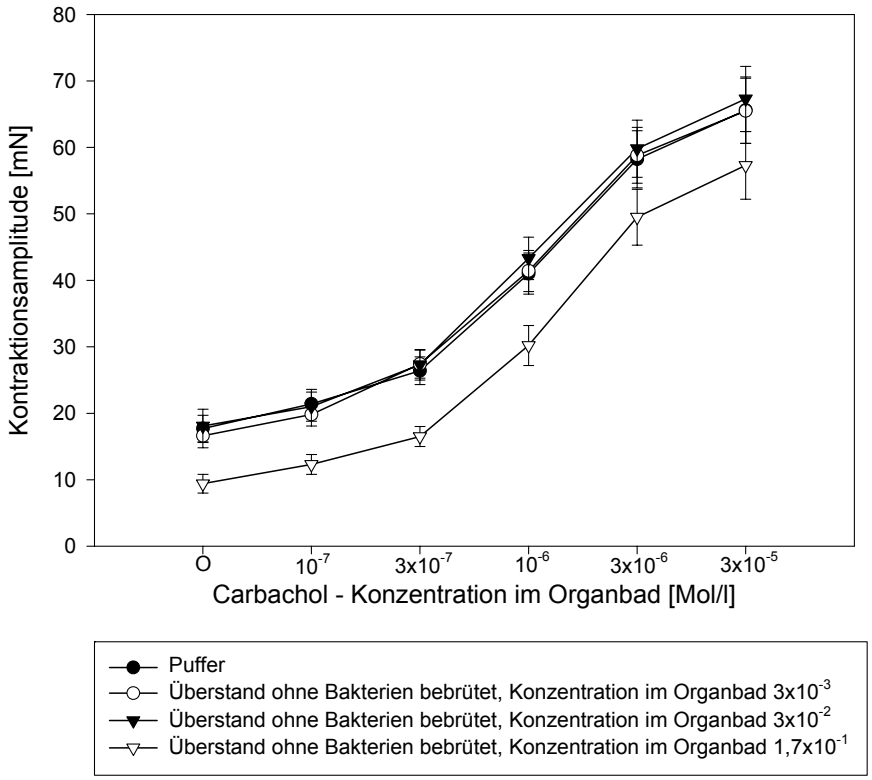



Abbildung 3.2.5 Gepoolte dose- response- Kurven nach kumulativer Carbachol- Stimulation. Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert±SEM aus den Einzelergebnissen beider Darmabschnitte (n=102).

Multiple Regression

Analog zur Elektrofeld-Stimulation erfolgte auch für die Carbachol- Stimulation eine Berechnung der multiplen Regression. Um eine übersichtliche Darstellung zu ermöglichen und das Problem des multiplen Testens zu vermeiden, erfolgte die Berechnung nur für 2 CCH- Konzentrationen (maximalen Kontraktionskraft ($3 \times 10^{-5}$ Mol/l) und maximale Steigung der dose- response- Kurve, entsprechend $EC_{50}$, (mit $10^{-6}$ Mol/l)).

Tab. 3.2.6: Multiple schrittweise Regression der Variablen (s. Tab. 3.2.1) für die Stimulation mit einer CCH- Konzentration von $10^{-6}$ Mol/l.
Die Zahlen geben die p- Werte für die Signifikanz der Regressionskoeffizienten an, n.s. = nicht signifikant

| Variable | Konzentration der Testflüssigkeit im Organbad | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | $1x10^{-3}$ | $3x10^{-3}$ | $3x10^{-2}$ | $1,7x10^{-1}$ |
| Segment | 0,0 | 0,0 | 0,038 | 0,0 | 0,0 |
| Aufhängung | 0,0 | 0,0 | 0,000 | 0,0 | 0,0 |
| Medium | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | 0,002 |
| Phase | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| Bebrütung | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |

Tab. 3.2.7: Multiple schrittweise Regression der Variablen (s. Tab. 3.2.1) für die Stimulation mit einer CCH- Konzentration von $3 \times 10^{-5}$ Mol/l.
Die Zahlen geben die p-Werte für die Signifikanz der Regressionskoeffizienten an, n.s. = nicht signifikant.

| Variable | Konzentration der Testflüssigkeit im Organbad | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | $1x10^{-3}$ | $3x10^{-3}$ | $3x10^{-2}$ | $1,7x10^{-1}$ |
| Segment | 0,0 | 0,006 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Aufhängung | 0,0 | 0,000 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Medium | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| Phase | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. |
| Bebrütung | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | 0,01 |

Analog zu den Ergebnissen der Elektrischen Feldstimulation zeigt sich bei beiden CCH- Konzentrationen, dass die Herkunft und die Art der Aufhängung des verwendeten Darmsegmentes entscheidend für das Ergebnis ist. Nur in einem Falle gibt es einen Hinweis darauf, dass die Zusammensetzung des Mediums einen Einfluss haben könnte. Die Art der Bebrütung (mit oder ohne Bakterien) führt wiederum bei der hohen Testflüssigkeits- Konzentration unter maximaler CCH- Stimulation zu einem signifikanten Unterschied.

Kontraktionsamplituden

Die Tabellen 3.2.8 und 3.2.9 enthalten die für die entsprechenden Darmabschnitte und Muskelkompartimente gemessenen Kontraktionsamplituden in Abhängigkeit von der eingesetzten Überstandspräparation und –Konzentration. Die Abbildungen 3.2.6. und 3.2.7 demonstrieren dagegen die vom Ausgangswert abweichenden Änderungen der Kontraktionsamplituden. Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, werden die beiden charakteristischen CCH- Konzentrationen $10^{-6}$ bzw. $3 \times 10^{-5}$ Mol/l zur Stimulation eingesetzt.

Im Colon ascendens wie im Colon descendens zeigt sich nach Zusatz von unbebrüteten Nährbodenüberständen eine Hemmung der Muskelaktivität, die Konzentrationsabhängig ist. Der inhibierende Effekt wirkt sich deutlicher auf die Längs- als auf die Ringmuskulatur aus. Allerdings wird bei der zirkulären Aufhängung (Ringmuskulatur) im Colon ascendens die Hemmung durch Zugabe von mit Bakterien bebrüteten Überständen (Verum) in höheren Konzentrationen aufgehoben ($p=0,03$). Im Colon descendens führt der Einsatz des Verums bereits in niedrigeren Konzentrationen zu einer Verminderung bzw. Aufhebung des inhibierenden Effektes. Im zirkulären Kompartiment wird sogar eine Stimulation der Ringmuskelkontraktion gemessen.

Tabelle 3.2.8: Einfluss von zellfreien Nährbodenüberständen auf die Muskelkontraktilität im Colon ascendens nach Carbachol- Stimulation ($10^{-6}$ Mol/l und 3 x $10^{-5}$ Mol/l).

| Art der Aufhängung | Konzentration der Testflüssigkeit | Kontraktionsamplituden [mN] | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | $10^{-6}$ Mol/l | | 3 x $10^{-5}$ Mol/l | |
| | | Kontrolle [ξ( $s_x$)] | Verum [ξ( $s_x$)] | Kontrolle [ξ( $s_x$)] | Verum [ξ( $s_x$)] |
| longitudinal | 0 | 18,0 ± (1,9) | 15,0 ± (1,5) | 26,9 ± (2,7) | 25,7 ± (3,1) |
| | $10^{-3}$ | 17,4 ± (2,4) | 16,7 ± (2,2) | 26,7 ± (2,5) | 30,1 ± (5,6) |
| | 3x$10^{-3}$ | 19,2 ± (2,2) | 16,3 ± (1,5) | 28,7 ± (3,1) | 28,2 ± (3,4) |
| | 3x$10^{-2}$ | 19,0 ± (2,1) | 16,3 ± (1,7) | 25,8 ± (2,8) | 26,1 ± (3,4) |
| | 1,7x$10^{-1}$ | 16,1 ± (2,2) | 13,3 ± (1,4) | 24,2 ± (3,3) | 21,7 ± (2,9) |
| zirkulär | 0 | 47,6 ± (7,6) | 50,3 ± (8,4) | 74,9 ± (8,6) | 80,8 ± (7,2) |
| | $10^{-3}$ | 47,6 ± (5,1) | 42,8 ± (8,0) | 96,8 ± (10,7) | 81,7 ± (9,2) |
| | 3x$10^{-3}$ | 42,3 ± (5,3) | 44,9 ± (6,7) | 77,7 ± (9,3) | 79,3 ± (8,4) |
| | 3x$10^{-2}$ | 54,0 ± (7,5) | 53,2 ± (6,7) | 90,9 ± (11,4) | 88,0 ± (8,3) |
| | 1,7x$10^{-1}$ | 29,5 ± (5,5) | 31,4 ± (4,5) | 53,2 ± (5,5) | 78,2 ± (11,1) |

Tabelle 3.2.9: Einfluss von zellfreien Nährbodenüberständen auf die Muskelkontraktilität im Colon descendens nach Carbachol- Stimulation ($10^{-6}$ Mol/l und 3 x $10^{-5}$ Mol/l).

| Art der Aufhängung | Konzentration der Testflüssigkeit | Kontraktionsamplituden [mN] | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | $10^{-6}$ Mol/l | | 3 x $10^{-5}$ Mol/l | |
| | | Kontrolle [ξ( $s_x$)] | Verum [ξ( $s_x$)] | Kontrolle [ξ( $s_x$)] | Verum [ξ( $s_x$)] |
| longitudinal | 0 | 41,2(3,0) | 38,2(3,1) | 69,1 ± (4,3) | 93,8 ± (15,2) |
| | $10^{-3}$ | 43,3(6,1) | 39,8(6,4) | 72,7 ± (7,1) | 101,6 ± (20,3) |
| | 3x$10^{-3}$ | 45,3(3,5) | 44,2(3,6) | 71,6 ± (3,0) | 86,1 ± (14,8) |
| | 3x$10^{-2}$ | 38,4(2,7) | 35,0(2,9) | 68,2 ± (3,6) | 88,2 ± (12,7) |
| | 1,7x$10^{-1}$ | 28,7(3,6) | 31,8(3,9) | 54,5 ± (3,0) | 102,3 ± (16,6) |
| zirkulär | 0 | 59,4(8,1) | 76,6(12,4) | 93,8 ± (15,2) | 90,8 ± (11,4) |
| | $10^{-3}$ | 65,4(11,7) | 75,1(17,9) | 101,6 ± (20,3) | 73,0 ± (12,2) |
| | 3x$10^{-3}$ | 59,6(8,8) | 82,7(11,7) | 86,1 ± (14,8) | 108,1 ± (16,5) |
| | 3x$10^{-2}$ | 64,7(8,1) | 86,9(12,2) | 88,2 ± (12,7) | 102,8 ± (13,0) |
| | 1,7x$10^{-1}$ | 48,6(9,6) | 61,5(12,3)* | 102,3 ± (16,6) | 144,1 ± (15,0) |

* p = 0,03

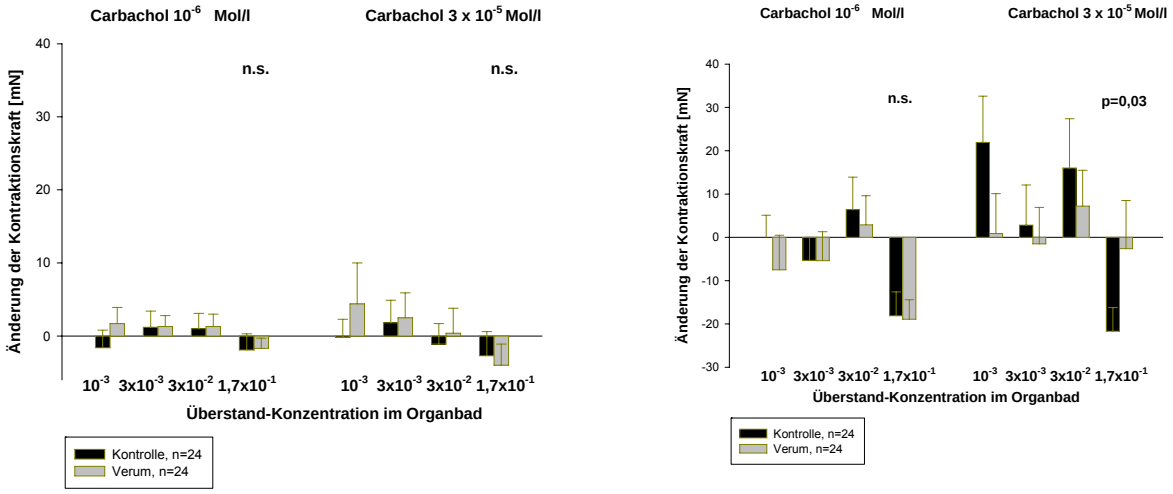



Abb. 3.2.6: Carbachol- Stimulation. Änderungen der Kontraktionsamplituden (Mittelwert±SEM) im Colon ascendens für longitudinale (links) und zirkuläre (rechts) Aufhängung im Organbad.

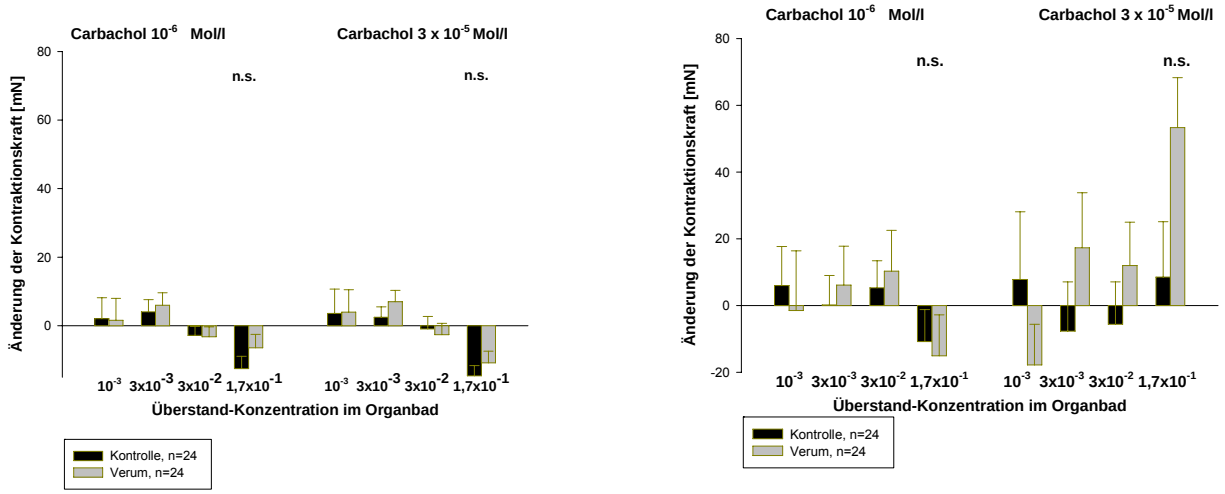



Abb. 3.2.7: Carbachol- Stimulation. Änderungen der Kontraktionsamplituden (Mittelwert±SEM) im Colon descendens für longitudinale (links) und zirkuläre (rechts) Aufhängung im Organbad.