

I

Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie,
Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

**EINFLUSS VON PROBIOTIKA UND ω -3-FETTSÄUREN AUF DIE
INTESTINALE SEMIALLOGENE TRANSPLANTAT GEGEN
WIRT REAKTION DER MAUS**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

ANNETTE GIRARDET

aus Essen

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stüber, Med. Klinik I
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kabelitz, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 23.02.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.02.2011

Gez.: Prof. Dr. S. Sebens
Vorsitzende d. Prüfungskommission

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Barrierefunktion des Darms	1
1.2	Mukosales Immunsystem im Darm	2
1.3	Immunologisch vermittelte Darmerkrankungen	2
1.4	Die semiallogene Graft-versus-Host Reaktion in der Maus	4
1.5	ω 3- Fettsäuren und das Immunsystem	4
1.6	Einfluss von Probiotika auf den Darm	6
1.7	Fragestellungen	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Reagenzien und Materialien	9
2.2	Mäusestämme	9
2.3	Standardlösungen	10
2.4	Induktion der akuten semiallogenen Graft-versus-Host Reaktion	10
2.5	Versuchsgruppen	11
2.6	Prüfung der Darmpermeabilität	13
2.7	Messung der Mannitol- und Lactulosekonzentrationen im Serum	13
2.8	Eluenten Herstellung	13
2.9	Probenaufbereitung (Serum)	13
2.10	Analyse von Kohlenhydraten mit der HPLC und gepulster amperometrischer Detektion	14

2.11	Histologie	14
2.11.1	Herstellung der Paraffinschnittpräparate	14
2.11.2	HE-Färbung	14
2.12	Bestimmung von Zottenlänge und Kryptentiefe	15
2.13	Berechnungen, Graphik und Statistik	15
3	Ergebnisse	16
3.1	Histologische Veränderungen im Jejunum nach Induktion der akuten Graft-versus-Host Reaktion	16
3.2	Effekt der Behandlung mit Probiotika und Omegaven® auf die intestinale Permeabilität während der akuten GvHD	19
4	Diskussion	23
5	Zusammenfassung	30
6	Literaturverzeichnis	32
7	Danksagung	43
8	Lebenslauf	44

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Stoffwechselschema der Linolsäure und α -Linolensäure	5
Abbildung 2:	Mikrophotographie einer gesunden murinen Dünndarmschleimhaut	16
Abbildung 3:	Mikrophotographie muriner Dünndarmschleimhaut mit Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie nach semiallogenem Lymphozytentransfer	17
Abbildung 4:	Histologische Untersuchung der Dünndarmpräparate	18
Abbildung 5:	Quotient von Zottenlänge und Kryptentiefe	19
Abbildung 6a:	Messung der Mannitolkonzentration im Blutserum	20
Abbildung 6b:	Werte der Lactulosekonzentration im Blutserum	21
Abbildung 7:	Lactulose/Mannitol-Quotient der Blutserumkonzentrationen	22

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonic acid (Arachidonsäure)
ACK	Ammonium Chlorid-Kaliumhydrogencarbonat Lysepuffer
CD	Cluster of Differentiation (Oberflächenmarker)
CED	Chronische entzündliche Darmerkrankungen
COX	Cyclooxygenase
d	day
DHA	Docosahexaenoic acid (Docosahexaensäure)
EPA	Eicosapentaenoic acid (Eicosapentaensäure)
GIT	Gastrointestinaltrakt
GvHD	Graft-versus-Host Disease (Transplantat-gegen-Wirt Krankheit)
Gy	Gray
H-2	Transplantationsantigen der Maus (vgl. MHC)
HBSS	Hank's-balanced salt solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HPLC	High pressure liquid chromatography
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPOX	Lipoxygenase
LT	Leukotriene
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	nuclear factor κ B
PAD	Pulsed amperometric detection (gepulster amperimetrischer Detektor)
PBS	phosphate-buffered saline
PG	Prostaglandine
PPAR	Peroxisom-Proliferator aktivierte Rezeptoren
sp.	Species
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TXA	Thromboxan A

1 Einleitung

1.1 Barrierefunktion des Darms

Der Darm besitzt bei der Auseinandersetzung des menschlichen Organismus mit seiner Umwelt eine herausragende Funktion. Noch vor Haut und Lunge setzt er sich mit den aufgenommenen, potentiell schädlichen Stoffen auseinander (Mowat und Viney, 1997; Turner, 2009). Er übernimmt neben der Rolle als Verdauungsorgan und der Nährstoffaufnahme die Aufgabe, verschiedene Toxine, Antigene und Mikroorganismen aus dem menschlichen Körper zu eliminieren und zu verhindern, dass diese die epitheliale Barriere aus dem Darmlumen in den Körper überwinden. Eine Störung der intestinalen Barriere, ob primär oder sekundär auf dem Boden einer entzündlichen Darmerkrankung entstanden, kann die Translokation von luminalen Antigenen und / oder Bakterien in den Körper zur Folge haben (Sturniolo et al., 2001). Neuere Befunde deuten in diesem Zusammenhang auch auf die besondere Rolle der Interaktion zwischen intestinaler Flora und Darmepithel hin (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist die Barrierefunktion des intestinalen Epithels strukturell und funktionell gestört. Diese Störung ist wahrscheinlich nicht nur sekundärer Ausdruck mukosaler Entzündungsaktivität. So weisen z.B. Verwandte von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine im Durchschnitt höhere intestinale Permeabilität gegenüber der Normalbevölkerung auf. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kann eine erhöhte Permeabilität häufig lange vor dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome nachgewiesen werden (Wyatt et al., 1993; Irvine et al., 2000).

Die Barriere wird durch eine strukturelle und eine immunologische Komponente gebildet. Struktureller Bestandteil sind unter anderem die Enterozyten, die durch einen Schlussleistenkomplex, den *tight junctions*, am apikalen Zellpol fest miteinander verbunden sind. Die *tight junctions*, die aus einem Multiproteinkomplex bestehen, regulieren die parazelluläre Permeabilität (Nusrat et al., 2000, Schulzke et al., 2009). Sie befinden sich im wesentlichen auf oberflächenbedeckenden Epithelien wie dem Darmepithel und bilden leistenförmige Verschlusslinien, in deren Bereich der Interzellularspalt komplett verschlossen ist. Durch die epitheliale Barriere werden die in der Lamina propria liegenden Immunzellen von den Antigenen im Darmlumen getrennt. Mit Hilfe der Epithelzellen und assoziierter Schutzfaktoren wird der Einstrom von Fremdstoffen in den Körper geregelt und begrenzt. Dies ist funktionell und quantitativ von Bedeutung, da allein die epitheliale Barriere im Darm

mit einer Oberfläche von 200 m² die größte des Menschen darstellt und intestinale Epithelzellen ständig der komplexen residenten Mikroflora des Darms ausgesetzt sind.

Die Durchlässigkeit des Darms kann mit Hilfe verschiedener Methoden bestimmt werden (Wyatt et al., 1997). Eine nicht-invasive Beurteilung erfolgt z.B. mit der Gabe von Zuckern und ist bei Erkrankungen, die sich auf die Morphologie des Darms auswirken, wie beispielsweise bei der einheimischen Sprue, abnormal verändert (Sanderson et al., 1987).

1.2 Mukosales Immunsystem im Darm

Das mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) des Gastrointestinaltraktes (GIT) stellt den grössten Teil des Immunsystems des menschlichen Körpers und ist ein wichtiges Glied in der Abwehr des Organismus gegen äußere Einflüsse (Isolauri et al., 2001). Unter physiologischen Bedingungen unterscheidet das Immunsystem des Darms mit hoher Selektivität zwischen apathogenen und pathogenen Substanzen. So können durch Bildung spezifischer Antikörper und durch zellulär vermittelte Entzündungsreaktionen pathogene Keime rasch eliminiert werden, wohingegen Immunreaktionen auf Nahrungsmittelantigene und Antigene der physiologischen Darmflora unterdrückt werden (Brandtzaeg, 2009; Tsuji und Kosaka, 2008). Dies erfordert die Anwesenheit immunregulatorischer Mechanismen, die kontinuierlich eine überschießende lokale und systemische Entzündungsreaktion verhindern. Für diese unterschiedlichen Aufgaben besitzt der GIT zum einen die angeborene antigenunspezifische Abwehr, zum anderen werden antigenspezifische Reaktionen durch das erworbene Abwehrsystem vermittelt.

Eine Störung dieser unterschiedlichen Wechselwirkungen kann zu schweren Organschädigungen und zu einem unphysiologischen Einstrom von Antigenen in die Darmwand führen, was eine Entzündung auslösen oder verstärken kann (Neutra et al., 2001; Blumberg, 2009).

1.3 Immunologisch vermittelte Darmerkrankungen

Eine Reihe von Merkmalen intestinaler Erkrankungen weist darauf hin, dass ihr Ursprung in einer Fehlregulation der immunkompetenten Zellen des Darmes liegt. So finden sich bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie z.B. Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, sowohl Schädigungen des Schleimhautepithels, als auch ein gesteigertes lymphozytäres, plasmazelluläres und granulozytäres Infiltrat, sowie Veränderungen in der Expression und

Synthese von Zytokinen in der Darmschleimhaut bzw. Darmwand als Ausdruck einer Beteiligung der zellvermittelten Immunität, die für eine immunologische Pathogenese sprechen (Rosenstiel et al., 2009). Nach heutigen Erkenntnissen liegt dem chronisch rezidivierenden Charakter der Entzündung vor allem eine Barrierestörung mit einer sekundären Fehlregulation von intestinalen T-Lymphozyten und Makrophagen zugrunde. Dies führt nachfolgend zu einer krankhaft gesteigerten Immunantwort und einem Ungleichgewicht von proinflammatorischen (Tumor Nekrose Faktor (TNF- α), Interleukin (IL-1 β)) (Schreiber et al., 1999; Nielsen et al., 1996) und kontrainflammatorischen Zytokinen (IL-10).

Zu einer anderen Gruppe intestinaler Erkrankungen mit immunologischer Pathogenese als Ursache wird die glutensensitive Enteropathie, auch einheimische Sprue oder Zöliakie genannt, gezählt. Sie zeichnet sich durch ihren histologischen Befund – Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie verbunden mit lymphozytären Infiltraten in der Lamina propria – sowie klinisch durch das Ansprechen auf eine glutenfreie Diät aus.

Der Erkrankung liegt eine T-Zell-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion gegen Gluten bei genetisch prädisponierten Individuen zugrunde. Mehr als 95% der Patienten mit einer Sprue exprimieren das Leukozytenantigen HLA DQ2, welches vom Gluten abstammende Gliadinpeptide auf seiner Oberfläche präsentiert und intestinale mukosale T-Lymphozyten stimuliert (Farrell et al., 2002). In einer kürzlich erschienenen genom-weiten Assoziationsstudie konnten weitere Nicht-HLA assoziierte Risikogene (*CCR3*, *IL12A*, *IL18RAP*, *RGS1*) identifiziert werden, die auf eine primär immunologisch vermittelte Kausalpathogenese hindeuten (Hunt et al., 2008). Gliadin ist die alkohollösliche Fraktion des Weizenklebeproteins Gluten. Auch verwandte Proteine aus Roggen und Gerste gelten als Auslöser der einheimischen Sprue (Stüber und Fölsch, 1999). Nach der Aufnahme gliadinhaltiger Getreideprodukte werden Gliadin-spezifische Lymphozyten (insbesondere T-Lymphozyten) aktiviert und induzieren die beobachteten histologischen Veränderungen der Darmschleimhaut (Stüber und Fölsch, 1999). Außerdem kommt es als Folge der intestinalen Malabsorption bei Patienten mit manifester Zöliakie zu typischen Symptomen, wie Diarrhoe, Steatorrhoe und Gewichtsverlust. Daraus können Sekundärerkrankungen resultieren, die sich vor allem an der Haut, im Blut-, Skelett- und Nervensystem manifestieren. Auch eine unklare Erhöhung der Serum-Transaminasen, die häufig mit dem histologischen Bild einer unspezifischen Hepatitis verbunden ist, wurde in einigen Fällen als Erstmanifestation einer Sprue beschrieben (Stüber und Fölsch, 1999). Die Therapie der Wahl bei der diagnostisch gesicherten Sprue ist das strikte Einhalten einer glutenfreien Diät. Darunter kommt es bei über

90% der Patienten zu einer klinischen Besserung. Selbst das im Vergleich zur Normalbevölkerung um das Doppelte erhöhte Risiko an einer malignen Erkrankung, wie dem intestinalen T-Zell-Lymphom, zu erkranken, lässt sich durch Einhaltung dieser Diät normalisieren (Stüber und Fölsch, 1999).

1.4 Die semiallogene Graft-versus-Host Reaktion in der Maus

Die murine semiallogene Transplantat-gegen-Wirt Krankheit (GvHD) ist ein etabliertes Modell für T-zellvermittelte atrophisch-hyperregenerative Darmerkrankungen (Stüber et al., 1998) und spiegelt mit Ausnahme der Antigenaktivierung in großen Teilen die Pathogenese der intestinalen Manifestation der Zöliakie wider (Marsh, 1992). Beide führen zu einer T-Zellinfiltration in der Mukosa (vorwiegend CD-4-Lymphozyten) und zu morphologischen Schleimhautveränderungen in Form von Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie.

Vorraussetzung für die Entstehung einer GvHD ist die Übertragung nichtautologer, immunkompetenter Zellen aus Knochenmark, Lymphozyten oder Milz. Diese Zellen vermitteln im Organismus des Empfängers zelluläre Immunreaktionen und bilden spezifische, gegen den Wirt gerichtete zytotoxische T-Zellen und Antikörper. Im gesunden Empfängerorganismus werden die Zellen rasch abgebaut. Ist die Immunabwehr jedoch geschwächt oder unterdrückt, wie z.B. durch Bestrahlung oder eine immunsuppressive Behandlung, proliferieren die Effektorzellen und schädigen das Gewebe des Empfängers. Der Darm ist das wichtigste Organ, das bei der akuten GvHD betroffen ist, und die Diarrhoe eines der frühesten Symptome (Guy-Grand und Vassalli, 1986).

1.5 ω 3- Fettsäuren und das Immunsystem

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, auch Omegafettsäuren genannt, werden über die Anzahl der C-Atome, die Zahl der Doppelbindungen und die Position der ersten Doppelbindung, gerechnet vom Methylende des Moleküls (ω -3, ω -6 oder ω -9), charakterisiert. Die ω -6-Fettsäure Linolsäure und die ω -3-Fettsäure α -Linolensäure sind für den Menschen essentiell (Simopoulos, 1991). Sie können im menschlichen Organismus nicht synthetisiert werden und müssen daher mit der Nahrung zugeführt werden.

Linolsäure ist Vorläufersubstanz der Arachidonsäure (AA) und der γ -Linolensäure. Aus der α -Linolensäure leiten sich die langkettigen Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) ab. EPA und AA werden zu Eikosanoiden – Prostanoiden (Prostaglandine und Prostazykline) und Leukotriene – metabolisiert. Die gebildeten

Mediatoren weisen ein sehr differenziertes und teilweise gegensinniges Wirkungsspektrum auf. Die Metaboliten der AA, Prostanoiden der 2er Serie und Leukotriene der 4er Serie, besitzen starke proinflammatorische, chemotaktische, vasokonstriktorische und thrombozytenaggregationsfördernde Eigenschaften. Außerdem kann durch ihre Wirkung eine Permeabilitätszunahme für Entzündungszellen resultieren. Die Eikosanoide, deren Vorstufe EPA ist, werden als Prostanoiden der Serie 3 und als Leukotriene der Serie 5 bezeichnet. Sie besitzen antithrombotische, antichemotaktische, vasodilatative und antiinflammatorische Eigenschaften. Die Metaboliten von EPA und AA haben vorwiegend kompetitive Funktion. Sie konkurrieren beide um die Metabolisierung durch die gleichen Enzymsysteme (Lipoxygenase und Cyclooxygenase) und können sich durch ihr jeweiliges Angebot gegenseitig verdrängen. Durch Verabreichung von ω -3-Fettsäuren lässt sich die Leukotrienbildung modifizieren. Es werden weniger Typ-4-Leukotriene und dafür vermehrt die physiologisch weit geringer aktiven Typ-5-Leukotriene gebildet, wodurch die Häufigkeit und Stärke von Entzündungsreaktionen beeinflusst werden kann.

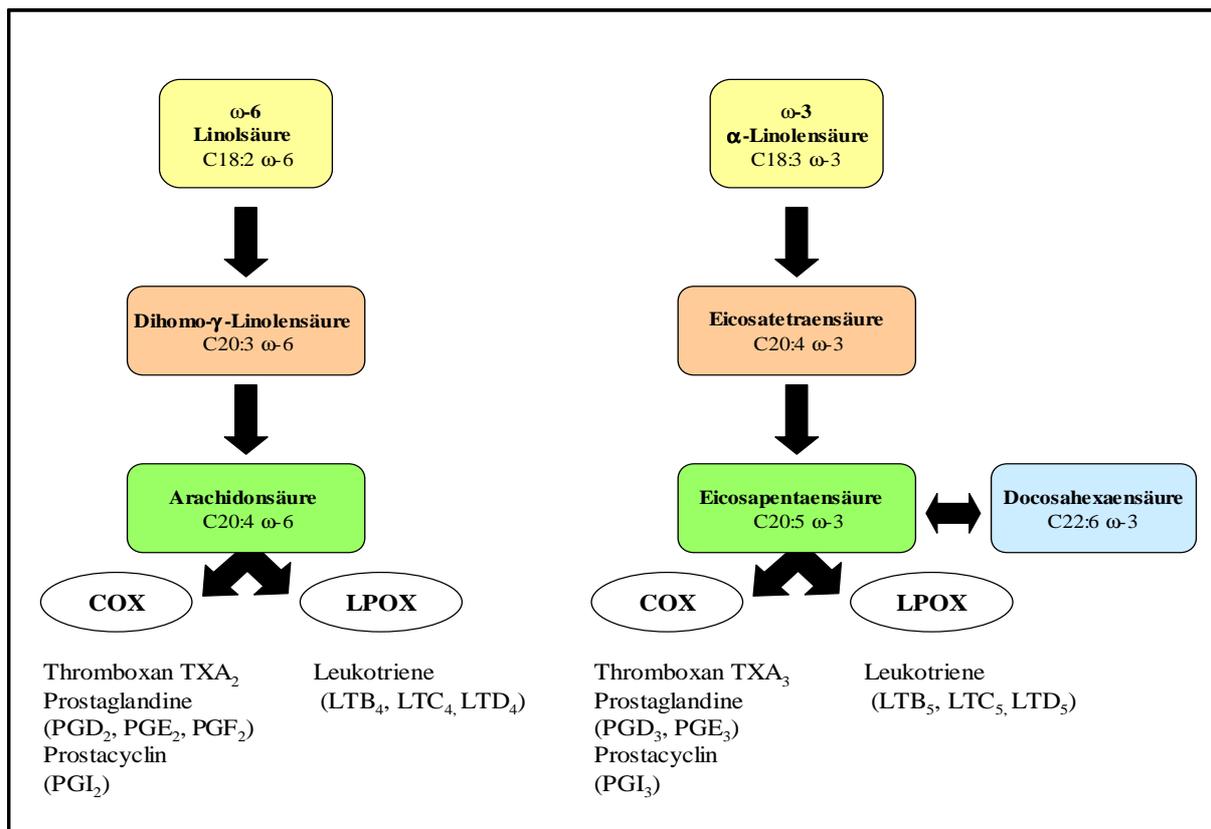


Abb.1: Stoffwechselschema der Linolsäure und α -Linolensäure

Für die menschliche Gesundheit sind vor allem die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einem hohen Anteil an ω -3-Fettsäuren von Bedeutung. Ein großer Anteil ungesättigter ω -3-Fettsäuren findet sich in Fischöl, das aus diesem Grund für therapeutische Zwecke, z.B. bei entzündlichen Darmerkrankungen angewendet wird. Die erhöhten Leukotrienspiegel bei entzündlichen Darmerkrankungen, wie z.B. der Colitis, waren mehrfach Anlass für Untersuchungen, die sich das Prinzip der Leukotrienmodifizierung durch ω -3-Fettsäuren zunutze machten (Cole et al., 1996). Die bei der Colitis ulcerosa erhöhte Synthese von Leukotrien B₄ in der rektalen Schleimhaut kann durch Fischöl gehemmt und damit deren entzündungsfördernde Wirkung unterdrückt werden (Aslan et al., 1992; Grimminger et al., 1993; Barbosa et al., 2003; Übersicht bei Ruggiero et al., 2009). Eine Verbesserung des klinischen Bildes wurde bei 70% der Patienten beobachtet. Auch beim Morbus Crohn sind durch Fischöl Erfolge erzielt worden. Die Zahl der Rückfälle bei Patienten, die sich in der Phase der Remission befanden, konnte durch die Fischöltherapie gesenkt werden. Außerdem nahmen unangenehme Begleiterscheinungen des Morbus Crohn, wie z.B. Blähungen, Diarrhoe und Aufstoßen, ab (Belluzzi et al., 1996). Weiterhin konnte bei Patienten mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn durch die Aufnahme von Fischöl die Histologie der Darmmukosa verbessert, sowie die Menge der benötigten entzündungshemmenden Medikamente reduziert werden.

Mit Omegaven® (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) wurde eine Fischölemulsion entwickelt, mit der EPA und DHA erstmals parenteral verabreichbar sind. Es ist hier im Vergleich zur oralen Zufuhr eine schnellere und effektivere Wirkung auf das Membranlipidmuster und die Eicosanoidsynthese gegeben (Grimminger et al., 1993).

1.6 Einfluss von Probiotika auf den Darm

Probiotika werden definiert als „ein lebender, mikrobakterieller Nahrungsbestandteil, der für die Gesundheit des Menschen förderlich ist“ (International Life Science Institute; www.ilsa.org).

Eine der vielversprechendsten Entwicklungen im Bereich der funktionalen Kost („functional food“) vollzieht sich auf dem Gebiet der Ernährung mit Probiotika und ihrem Effekt auf die menschliche Gesundheit (Erickson und Hubbard, 2000). In zahlreichen Arbeiten über Probiotika werden deren Wirkungen auf den Gastrointestinaltrakt und vor allem auf das dortige Immunsystem untersucht.

Die immunphysiologische Regulation des Gastrointestinaltraktes (GIT) hängt unter anderem von der Beschaffenheit der residenten Mikroflora ab (Isolauri et al., 2001; Bäckhed et al.,

2005; Turnbaugh et al., 2007). Die Anwesenheit normaler bakterieller Organismen im GIT kann eine Überwucherung mit möglichen pathogenen Keimen verhindern. Die Erkenntnis, dass die Mikroflora im Darm einen wichtigen Bestandteil der intestinalen mukosalen Barriere darstellt, und die Nissle bereits 1917 verfolgte, als er die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien beschrieb, hat zur Einführung des Konzepts der probiotischen Therapie geführt (Isolauri et al., 2001; Saavedra, 2001). Sie führt zu einer Verbesserung des Abwehrsystems bei älteren Menschen, das durch den natürlichen Alterungsprozess geschwächt ist (Gill et al., 2001). Atopische Erkrankungen wie die atopische Dermatitis, das Asthma und die allergische Rhinitis können gemildert werden (Kalliomäki et al., 2001). In der Prävention und Behandlung der akuten kindlichen Diarrhoe konnten mit Probiotika herausragende Erfolge erzielt werden (Saavedra, 2001).

Probiotika besitzen unterschiedliche Wirkungen auf das Immunsystem. Sie stabilisieren die gastrointestinale Mikroflora, steigern die immunologische Barrierefunktion und stimulieren außerdem die unspezifische Abwehr gegen bakterielle Pathogene, um deren Eliminierung zu fördern (Isolauri et al., 2001; Schlee et al., 2007). Anaerobe Lactobacillen und Bifidobakterien z.B. produzieren durch einen Gärungsprozess Säuren und wirken dadurch hemmend auf pathogene Stoffe (Kennedy et al., 2000; Duffy, 2000). Hinzu kommt, dass Laktobacillus sp. die Adhäsion pathogener Bakterien an die Darmwand hemmen können, selbst antibakterielle Substanzen (z.B. Bakteriocine) produzieren (Cotter et al, 2005) und außerdem in der Lage sind, Defekte der Darmpermeabilität zu reparieren (Madsen et al., 2001).

1.7 Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, anhand des tierexperimentellen Modells der akuten murinen semiallogenen Transplantat-gegen-Wirt Reaktion oder auch Graft-versus-Host Reaktion, die über eine T-Zellvermittelte Immunreaktion zu einer atrophisch-hyperregenerativen Darmerkrankung führt, den Einfluss von Probiotika und Omegaven® auf die Darmpermeabilität *in vivo* zu untersuchen.

Der Effekt von Probiotika und ω -3-Fettsäuren auf die intestinale Entzündungsreaktion ist weitgehend unbekannt. Ausgehend von den oben beschriebenen Befunden, dass beide Substanzen positive Effekte bei unterschiedlichen entzündlichen Erkrankungen des menschlichen Darmes zeigen, sollte am Modell der semiallogenen Graft-versus-Host

Reaktion bei der Maus untersucht werden, ob Probiotika und ω -3-Fettsäuren bei akuten autoimmunvermittelten Entzündungsprozessen einen protektiven Effekt ausüben können.

Im einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

Einfluß der Gabe von Probiotika und ω -3-Fettsäuren auf die Veränderungen der intestinalen Zytoarchitektur

Werden durch die Gabe von Probiotika und ω -3-Fettsäuren die Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie, die bei der semiallogenen Graft-versus-Host Reaktion beobachtet wird, vermindert ?

Einfluß von Probiotika und ω -3-Fettsäuren auf die Permeabilitätsveränderungen

Kann durch die Gabe von Probiotika und ω -3-Fettsäuren die Zunahme der intestinalen Permeabilität bei der semiallogenen Graft-versus- Host Reaktion verhindert werden ?

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Materialien

ACK lysing buffer	Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Deutschland
Eosin	Dako, Glostrup, Dänemark
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eukitt	Medac, Hamburg, Deutschland
Formaldehyd Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hank`s balanced salts solution	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
Lactulose	Calbiochem, San Diego, USA
Mannitol	Fluka, Seelze, Deutschland
Melbiose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Omegaven®	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Phosphat buffered salt solution	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland
Poly-L-Lysine	Sigma Diagnostics, St.-Louis, USA
Probiotika VSL#3	Yovis; Sigma-Tau, Pomezia, Italien
Trypan Blau Lösung 0,5%	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Zusammensetzung von Omegaven®:

Myristinsäure, Palmitinsäure, Palmitoleinsäure, Stearinsäure, Oelsäure, 9,12-Linolsäure, Linolensäure, Stearidonsäure, Icosensäure, Arachidonsäure, Icosapent, Erucasäure, Dokosapentaensäure, Doconexet, Alpha-Tocopherol, Glycerol, (3-sn-Phosphatidyl)cholin.

2.2 Mäusestämme

C57BL/6, DBA/2 und die F1 Generation dieser beiden Mäusestämme (B6D2F1) wurden unter offenen Bedingungen in den Räumen der Zentralen Tierhaltung (Leiter: PD Dr. Wottge) der Christian-Albrechts-Universität gezüchtet und in Makrolon-III-Käfigen auf Weichholzgranulat (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) gehalten. Die Tiere wurden mit Pressfutter (Altromin®, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Leitungswasser versorgt. C57BL/6 ist gegenüber DBA/2 MHC-allogen, während B6D2F1 als Hybridstamm gegenüber C57BL/6 nur semiallogen ist. Spender-und Empfängertiere waren 8-12 Wochen alt.

Die Tierversuchsvorhaben wurden von der Tierschutzkommission der CAU Kiel genehmigt (Antrags-Nr. 28-5/96).

Mäusestämme	MHC-Spezifität
C57BL/6	H-2 ^b
DBA/2	H-2 ^d
B6D2F1	H-2 ^{b+d}

Tab.1: MHC-Spezifitäten der verwendeten Mäusestämme

2.3 Standardlösungen

PBS (pH 7,4)	KCl	0,5 g
	KH ₂ PO ₄	0,5 g
	Na ₂ HPO ₄	5,4 g
	NaCl	20 g
	H ₂ O	ad 2500 ml
Tris-Puffer (pH 7,6)	Trisaminomethan(C ₄ H ₁₁ NO ₃)	30,3 g
	1N HCl	40 ml
	NaCl	18 g
	H ₂ O	ad 2500 ml

2.4 Induktion der akuten semiallogenen Graft-versus-Host Reaktion

Eine etablierte Methode zur Induktion einer atrophisch-hyperregenerativen Darmerkrankung am Mausmodell ist die Induktion einer semiallogenen Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (GvHD) (Marsh et al., 1992). Gegenüber einer allogenen GvHD hat die semiallogene GvHD den Vorteil, dass kein Wirt-gegen-Transplantat-Effekt im Sinne einer Abstoßung auftritt. Daher werden in den Versuchen die Mäuse des Hybridstamms B6D2F1 als Empfängertiere ausgewählt.

Für die semiallogene Versuchsgruppe werden Lymphozyten von C57BL/6-Mäusen präpariert, für die syngene Kontrollgruppe von B6D2F1-Mäusen (Williamson et al., 1996; Guy-Grand und Vasalli, 1986).

Die Mäuse werden durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend werden die Milzen und die mesenterialen Lymphknoten herauspräpariert und getrennt in 4° C kaltem HBSS auf Eis

gelagert. Die Gewebe werden mit einer Schere in einer 100 mm² großen Petrischale (Becton Dickenson, New Jersey, USA) zerkleinert und mit dem Stempel einer 2 ml Spritze homogenisiert. Das Homogenat wird in HBSS aufgenommen und durch einen Nylon-Zellfilter mit der Porengröße von 40 µm (Falcon, Becton-Dickenson, New Jersey, USA) in ein konisches 50 ml Röhrchen (Falcon, Becton-Dickenson, New Jersey, USA) pipettiert. Im Zellfilter verbleibende Zellen werden mit weiterem HBSS durchgespült und im Röhrchen aufgefangen. Die Röhrchen mit der Zellsuspension werden 10 Minuten bei 1400 U/min. zentrifugiert. Die Lymphozyten aus den mesenterialen Lymphknoten werden in 10 ml HBSS resuspendiert. Zur Lyse der Erythrozyten werden die Milzlymphozyten vorher in einem 4°C kaltem hypotonen Lysierungspuffer (ACK-Buffer, Boehringer Ingelheim, Deutschland) resuspendiert, 6 Minuten auf Eis inkubiert, mit HBSS gewaschen, erneut zentrifugiert und wiederum in 10 ml HBSS resuspendiert. 50µl dieser Zellsuspension werden 1:1 mit einer 0,05% Trypan-Blau Lösung versetzt, um bei der mikroskopischen Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) die lebenden Lymphozyten von den avitalen unterscheiden zu können. Nur Zellpräparationen mit einer Vitalität von über 90% werden in den Versuchen eingesetzt.

Um die semiallogene GvHD am Mausmodell etablieren zu können, müssen die Empfängertiere immunsupprimiert sein (Guy-Grand et Vasalli, 1986; Ferrara et Krenger, 1998). Die Empfängertiere (B6D2F1) werden hierfür mit einer Cäsium-137 Bestrahlungsquelle mit einer Dosis von 7,5 Gy ganzkörperbestrahlt (Gammacell 40, Atomic Energy of Canada Ltd. Commercial Products, Canada). 6 - 8 Stunden nach erfolgter Radiatio wurden ihnen je 80×10^6 Zellen aus einer Mischung von Milzlymphozyten und mesenterialen Lymphknoten-Lymphozyten in einem Volumen von 1 ml PBS intraperitoneal injiziert. Die semiallogene Versuchsgruppe erhält Lymphozyten gleichgeschlechtlicher C57BL/6-Mäuse und die syngene Kontrollgruppe von B6D2F1-Mäusen.

2.5 Versuchsgruppen

Es werden folgende Versuchsgruppen zur Untersuchung des Einflusses von Probiotika und ω-3-Fettsäuren auf die semiallogenen Graft-versus-Host Reaktion gebildet.

Versuchsgruppe	Art	Anzahl der Versuchstiere
I (negative Kontrolle)	Syngene Kontrollgruppe	$n=14$
II (positive Kontrolle)	Semiallogene Kontrollgruppe	$n=20$
III (Omegaven 1)	Semiallogene Gruppe, Behandlung mit ω -3-Fettsäuren (Beginn: 2 d vor der Radiatio in den Spendertieren, Empfängertiere über die gesamte Versuchsdauer)	$n=12$
IV (Omegaven 2)	Semiallogene Gruppe, Behandlung mit ω -3-Fettsäuren (Beginn: am Tag der Radiatio)	$n=17$
V (Probiotika)	Semiallogene Gruppe, Behandlung mit Probiotika (Beginn: Empfängertiere 2 d vor der Radiatio, fortgesetzt über die gesamte Versuchsdauer)	$n=15$

Tab.2: Aufteilung der VersuchsgruppenÜberlebenszeit der Tiere in den Gruppen I-V: 6 Tage

Omegaven® 1:

Zwei C57BL/6-Mäuse werden zwei Tage vor Versuchsbeginn (Tag 0) mit einer intraperitonealen Injektion von je 0,5 ml/die Omegaven (Omegaven® Fresenius, Deutschland) vorbehandelt. Ihre Lymphozyten werden am Tag der GvHD-Induktion zwei B6D2F1-Mäusen intraperitoneal verabreicht. Anschließend bekommen die Mäuse dieser Empfängergruppe sechs Tage lang je 0,5 ml/die Omegaven® injiziert.

Omegaven® 2:

Eine weitere Versuchsgruppe von zwei Empfängertieren (B6D2F1) bekommt nach der Radiatio und dem Lymphozytentransfer (Tag 0) täglich je 0,5 ml Omegaven intraperitoneal über sechs Tage appliziert.

Probiotika:

Zwei Tage vor Auslösung der akuten GvHD werden zwei B6D2F1-Mäuse täglich mit je 50 mg Probiotika, gelöst in je 1 ml H-Milch, über eine orogastrale Sonde gefüttert. Nach der Radiatio (Tag 0) erhalten sie Lymphozyten von C57BL/6-Mäusen. Das Füttern mit Probiotika wird über sechs Tage fortgesetzt.

2.6 Prüfung der Darmpermeabilität

Behandelte und unbehandelte Mäuse erhalten nach einer Nüchternperiode von 12 Stunden je 1 ml einer Mannitol-Lactulose-Lösung über eine orogastrale Sonde. Für die Lösung wurden 300 µg Lactulose (4-0-β-D-galactopyranosyl-D-fructofuranose; Calbiochem, San Diego, CA, USA) und 200 µg Mannitol (Fluka, Seelze, Deutschland) in 20 ml destilliertem Wasser gelöst. Eine Stunde nach der Fütterung erfolgt bei den mit Äther betäubten Mäusen mit Hilfe einer Pipette eine venöse Blutentnahme aus dem Sinus cavernosus. Das gewonnene Serum wird für die Bestimmung der Mannitol- und Lactulosekonzentration verwendet.

2.7 Messung der Mannitol- und Lactulosekonzentrationen im Serum

Melbiose als interner Standard wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) hergestellt. Die Mannitol und Lactulosebestimmung erfolgt mittels einer HPLC-Anlage (Merck, Darmstadt, Deutschland). Der gepulste Amperimetrische Detektor (PAD) mit einer Goldelektrode und einer Silber/Silberchlorid Referenzelektrode, einer CarboPac PA 100 Anionenaustauschersäule und einer gleich bestückten Vorsäule wird von der Firma Dionex (Idstein, Deutschland) bezogen. Ausgewertet werden die Messdaten mit dem Integrator D7500 der Firma Merck. Deionisiertes Wasser mit hohem Widerstand (18MX) zur Probenverdünnung und als Eluent wird ebenfalls von Merck bezogen.

2.8 Eluenten Herstellung

HPLC-Wasser wird durch eine 15-minütige Heliumbegasung von Sauerstoff befreit. 50% Natriumhydroxid-Lösung wird unter Sauerstoffabschluss dazugegeben und für 5 Minuten vorsichtig gemischt, um die erforderliche Konzentration von 90 mmol/l NaOH zu erreichen.

2.9 Probenaufbereitung (Serum)

Serum wird durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 3000 U/min aus Vollblut separiert und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Eine Menge von 0,5 ml Serum wird durch Präzipitation in 5% 5-Sulfosalizylsäure von Protein befreit und mit 200 µl des

internen Standards Melbiose (0,1 mg/l) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 4°C werden die Proben für 5 Minuten bei 9000U/l zentrifugiert. Der Überstand wird aufgenommen und mit 90 mmol/l NaOH verdünnt (1:100). 25 µl dieses Überstandes werden auf die Anionenaustauschersäule gegeben.

2.10 Analyse von Kohlenhydraten mit der HPLC und gepulster amperometrischer Detektion (PAD)

Die Proben werden mit dem 90 mmol NaOH Eluenten bei einer Flussrate von 1 ml/min bei 25°C verdünnt. Die Probenbestandteile werden anschließend auf der Carbopac 100 Anionenaustauschersäule getrennt und mit dem gepulsten amperometrischen Detektor an der Gold-Arbeits Elektrode und der Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode detektiert. Eine sich wiederholende Sequenz von drei unterschiedlichen Potentialen kommt dabei zur Anwendung: E1: 0,05V, T1: 0,4 sec; E2: 0,75V, T2: 0,2 sec; E3: -0,15V, T3: 0,4sec. Die Sensitivität an dem PAD Detektor wurde auf 100 nC gesetzt. Die Berechnung der Zuckerkonzentration von Mannitol und Lactulose erfolgte durch Integratoranalyse der Fläche des internen Standards (Melbiose Referenzfläche) im Vergleich zu den Testzuckern.

2.11 Histologie

2.11.1 Herstellung der Paraffinschnittpräparate

Die anästhesierten Versuchstiere werden nach der Blutentnahme durch zervikale Dislokation getötet. Der Darm wird präpariert und Teile aus dem mittleren Jejunum werden in 10%igem Formalin fixiert. Die formalinfixierten Präparate werden in Paraffin eingebettet. An einem Paraffin-Schlittenmikrotom (Fa. Reichert-Jung, Nussloch) werden 4 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern (Poly-L-Lysin Solution, Fa. Sigma Diagnostics, St.-Louis, USA) getrocknet.

2.11.2 HE-Färbung

Die Paraffinschnitte werden zunächst in Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 70%) rehydriert. Nach 5-minütiger Färbung mit Hämalaun werden die Präparate in Leitungswasser gespült und, sobald das Wasser klar ist, 10 Minuten darin zum Bläuen belassen. Eine Gegenfärbung erfolgt für 8 Sekunden in Eosin mit anschließendem Spülen in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70%, 80%, 96%, 100%) für je

5 Sekunden. Nach einer 10-minütigen Inkubation in Xylol folgt das Eindecken des Präparates mit Eukitt® (Medac, Hamburg) und Deckgläschen.

2.12 Bestimmung von Zottenlänge und Kryptentiefe

Die HE-gefärbten Präparate vom Jejunum werden lichtmikroskopisch auf den Grad der Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie untersucht. Mittels eines graduierten geeichten Okulars wird sowohl die Kryptentiefe als auch die Zottenlänge gemessen. Es werden nur die Krypten-Zotten-Einheiten ausgemessen, bei denen die Zotten in ganzer Länge und die Krypten ohne Gewebsbrücken zu beurteilen sind. Zur Messung wird ein 20-fach Objektiv verwendet. Durch Ausmessen der Felder in einer Neubauer-Zählkammer lässt sich ein Umrechnungsfaktor für die Angabe der Messwerte in μm ermitteln. Bei jedem Gewebsschnitt lassen sich je nach Schnittebene zwischen 10 und 20 Krypten-Zotten-Einheiten ausmessen.

2.13 Berechnungen, Graphik und Statistik

Alle Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden mit einem kommerziellen Tabellenkalkulationsprogramm durchgeführt (Excel, Microsoft, München).

Die Bearbeitung des mit Hilfe eines handelsüblichen Scanners eingescannten Bildmaterials erfolgte mit CorelDraw (Corel Cooperation, CA, USA) und die Ausarbeitung der Dissertation mit Word für Windows der Firma Microsoft.

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Veränderungen im Jejunum nach Induktion der akuten Graft-versus-Host Reaktion

Um die morphologischen Auswirkungen einer Behandlung mit Probiotika und Omegaven® während der akuten GvHD zu untersuchen, wird die Zottenlänge und Kryptentiefe im Jejunum am sechsten Tag nach semiallogenem Lymphozytentransfer bestimmt. Das Ausmaß der Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie weist zu diesem Zeitpunkt ein Maximum auf (Stüber et al., 1998). Die Tiere erscheinen gesund und weisen an diesem Tag noch keine unspezifische Mucosaatrophie auf, die durch die an Tag 14 - 21 zunehmende Kachexie und Malnutrition bedingt ist (Stüber et al., 1998). Als Kontrollgruppe dienen Tiere, die einen syngenen Lymphozytentransfer erhalten.

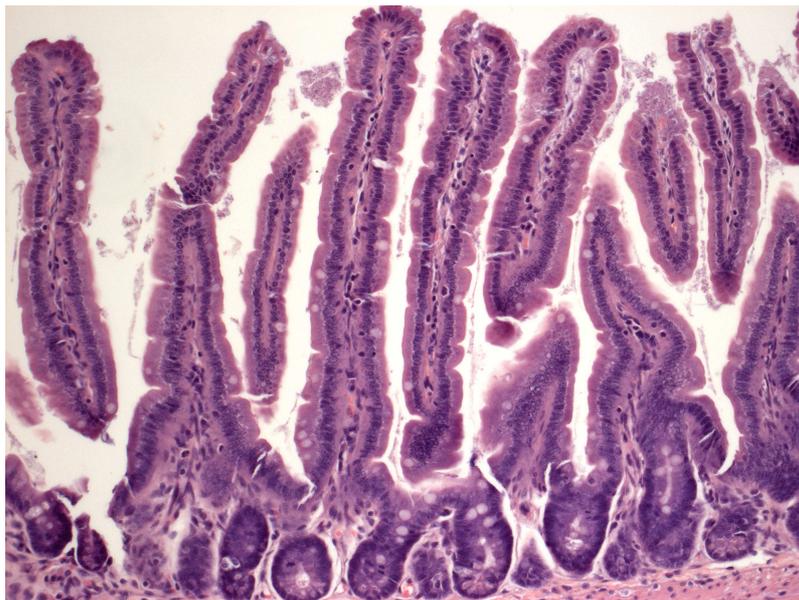


Abb. 2: Mikrophotographie einer gesunden murinen Dünndarm-Schleimhaut, 20-fache Vergrößerung



Abb. 3: Mikrophotographie muriner Dünndarmschleimhaut mit Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie nach semiallogenem Lymphozytentransfer, 20-fache Vergrößerung

Die semiallogen behandelten Tiere zeigen am sechsten Tag nach Induktion der GvHD eine deutliche Atrophie der Zotten mit einer Hypertrophie der Krypten (Abb. 3) im Vergleich zur syngenen Kontrollgruppe (Abb. 2). In der histologischen Untersuchung der Dünndarmpräparate zeigt sich die Länge der Zotten bei der syngenen Gruppe durchschnittlich mit $47,65 + 7,44 \mu\text{m}$ und $42,58 + 7,75 \mu\text{m}$ bei semiallogenem Transfer. Die Kryptentiefe wird mit $18,3 + 1,77 \mu\text{m}$ (syngen) und $27,13 + 5,35 \mu\text{m}$ (semiallogen) gemessen (Abb. 4).

Die Behandlungen mit Probiotika oder Omegaven® haben keinen signifikanten Effekt auf die durch die GvHD induzierten Veränderungen der Zotten- und Kryptenarchitektur. Die Zottenlänge beträgt unter der Behandlung mit Probiotika $42,73 + 5,64 \mu\text{m}$ bei einer Kryptentiefe von $25,55 + 4,08 \mu\text{m}$. Die Gruppe der Tiere, die vor und nach Lymphozytentransfer Omegaven® erhalten (Omegaven 1), weisen eine leichte Zunahme der Veränderungen im Vergleich zu den semiallogen behandelten Tieren auf (Zottenlänge $35,95 + 3,78 \mu\text{m}$ und Kryptentiefe $23,47 + 4,36 \mu\text{m}$). Gleiches gilt für die Mäuse, die nur nach dem Lymphozytentransfer Omegaven®-Injektionen erhalten (Omegaven 2; Zottenlänge $36,18 + 6,97 \mu\text{m}$ und Kryptentiefe $26,21 + 5,75 \mu\text{m}$).

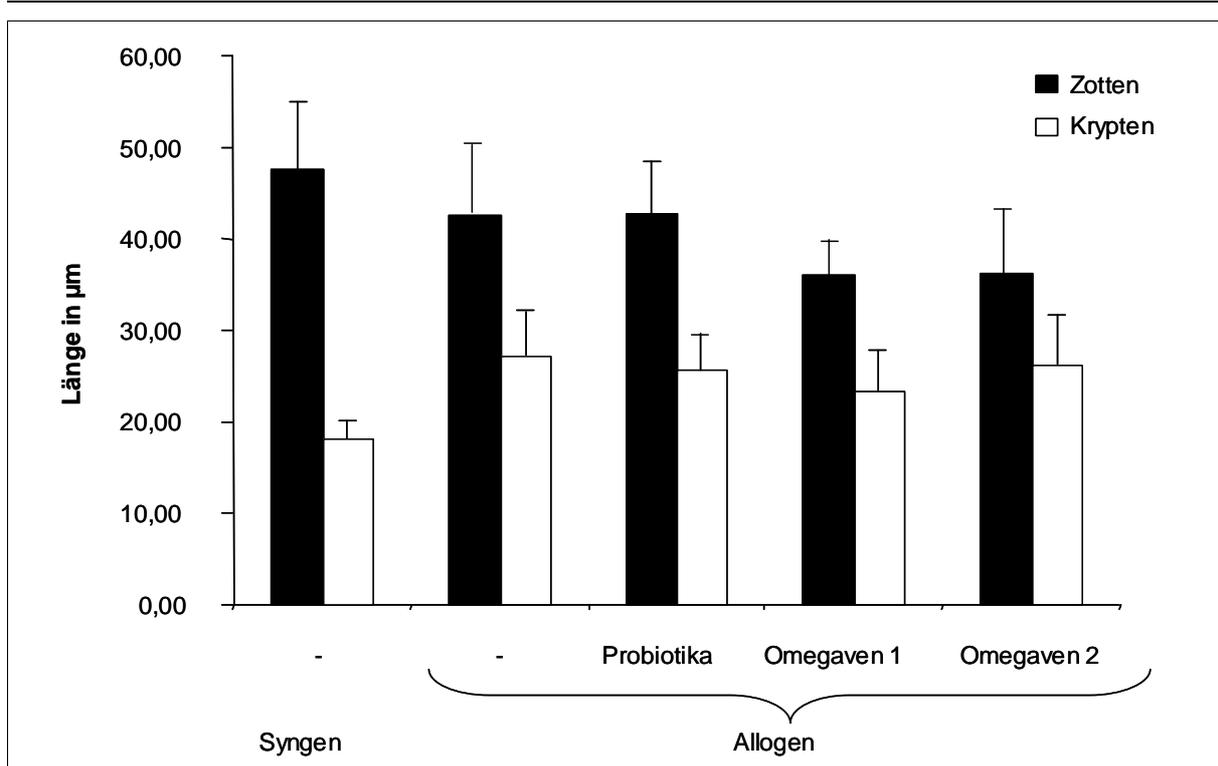


Abb. 4: Histologische Untersuchung der Dünndarmpräparate. Bestrahlte B6D2F1 Mäuse erhielten 80×10^6 Lymphozyten von C57BL/6- (semiallogene Versuchsgruppe) oder B6D2F1-Mäusen (syngene Kontrollgruppe). Am sechsten Tag nach Leukozytentransfer wurden die Tiere getötet und das Jejunum entnommen. Aus der Dünndarmschleimhaut wurden nach Fixierung in Formalin Paraffinschnitte mit einer Schichtdicke von $4 \mu\text{m}$ angefertigt. Zottenlänge und Kryptentiefe wurden mit einem graduierten Okular an longitudinal angeschnittenen Krypten-Zotten-Einheiten ausgemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Messungen mit Standardabweichung von 20 Präparaten von semiallogenen - und 14 von syngen Tieren, von 15 Präparaten von Probiotikatieren, von 12 Präparaten von Tieren der Gruppe Omegaven® 1 und von 17 Präparaten der Gruppe Omegaven® 2.

Das Verhältnis von Zottenlänge zu Kryptentiefe sinkt von durchschnittlich 2,63 (syngen) auf 1,60 (semiallogen). Der Quotient beträgt für die Probiotika-Gruppe im Durchschnitt 1,71, für Omegaven®1 1,59 und für Omegaven®2 1,42 (Abb. 5). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme des Quotienten der semiallogenen Versuchsgruppe zu der syngen Kontrolle ($p < 1,2 \times 10^{-5}$). Bei der semiallogenen Gruppe im Vergleich zu den mit Probiotika oder Omegaven® behandelten Tieren ist keine Signifikanz zu beobachten (z.B. Allogen gegen Probiotika: 0,19 im Student T-Test).

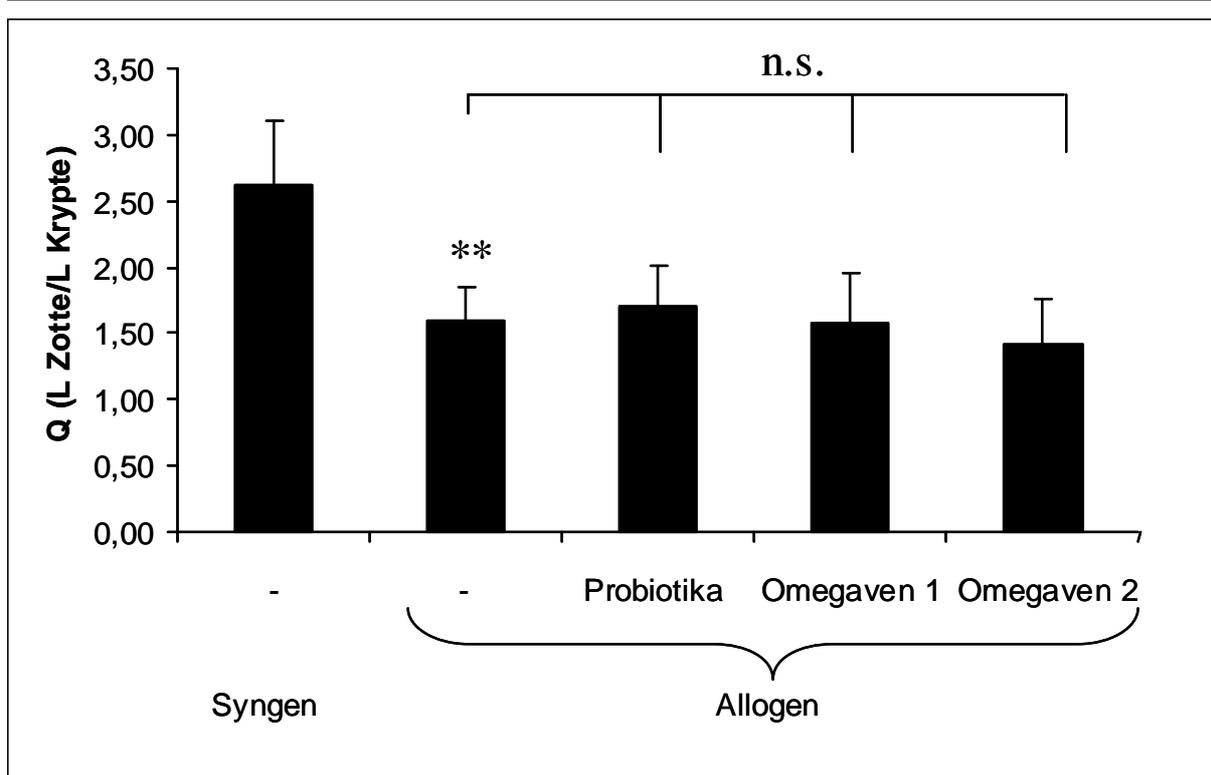


Abb.5: Quotient von Zottenlänge und Kryptentiefe. Veränderung des Verhältnisses von Zottenlänge zu Kryptentiefe 6 Tage nach Induktion der GvHD. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der semiallogenen Versuchsgruppe zur syngenen Kontrollgruppe (** $p < 1,2 \times 10^{-5}$). Die Behandlung der Tiere der weiteren Versuchsgruppen (Probiotika, Omegaven 1 und 2) erbrachte keine signifikante Veränderung gegenüber der unbehandelten semiallogenen Versuchsgruppe.

3.2 Effekt der Behandlung mit Probiotika und Omegaven® auf die intestinale Permeabilität während der akuten GvHD

Es ist bekannt, dass bei entzündlichen Darmerkrankungen die Permeabilität des Darmes gestört ist (Dawson et al., 1988; Wyatt et al., 1997; Sturniolo et al., 2000; Usami et al., 2001). Die erhöhte Durchlässigkeit der Darmwand kann mit Hilfe verschiedener Marker bestimmt werden.

In dem vorliegenden Modell wird den Tieren zur Messung der Darmpermeabilität am sechsten Tag nach Induktion der GvHD eine Mannitol-Lactulose-Lösung oral über eine Sonde zugeführt. Die Serumkonzentrationen von Mannitol und Lactulose werden 60 Minuten nach der Gabe gemessen und sowohl als Einzelwerte, als auch als Lactulose-Mannitol-Quotient dargestellt.

Mannitol ist ein Marker für die resorptive Kapazität (bzw. Oberfläche) des Darms, da es leicht transzellulär aufgenommen wird. Lactulose bleibt bei der intakten Schleimhaut nahezu unresorbiert, es kann allerdings bei der Öffnung der Schlussleistenkomplexe oder zellulären

Defekten im Darmepithel leicht parazellulär eindringen. Die Berechnung des Lactulose/Mannitol-Quotienten dient der Korrelation der Lactulosekonzentration zur vorhandenen Darmresorptionskapazität. D.h. ein großer Quotient spricht für eine hohe Permeabilität und umgekehrt.

Die Tiere, die einen semiallogenen Lymphozytentransfer erhalten, weisen eine deutliche Zunahme der Serumspiegel von Mannitol (Abbildung 6a) und Lactulose (Abbildung 6b) auf.

Im Vergleich zur syngen Kontrollgruppe ist bei den Tieren mit semiallogem Transfer ein deutlicher Anstieg der durchschnittlichen Serumkonzentration von Mannitol von $135 + 60,30$ mg/dl (syngen) auf $441,20 + 245,85$ mg/dl (semiallogen) zu erkennen. Dagegen liegen die Werte der Serummannitolkonzentrationen der anderen Gruppen zwischen denen der syngen Kontrollgruppe und der semiallogenen Gruppe. Für die Probiotika beträgt die Serumkonzentration $303,53 + 148,05$ mg/dl und liegt damit signifikant niedriger im Vergleich zur semiallogenen Versuchsgruppe ($p < 0,03$). Die Werte für Omegaven®1 mit $335,58 + 212,19$ mg/dl und für Omegaven®2 mit $391,83 + 230,14$ mg/dl sind gegenüber der semillogenen Gruppe nicht signifikant erniedrigt.

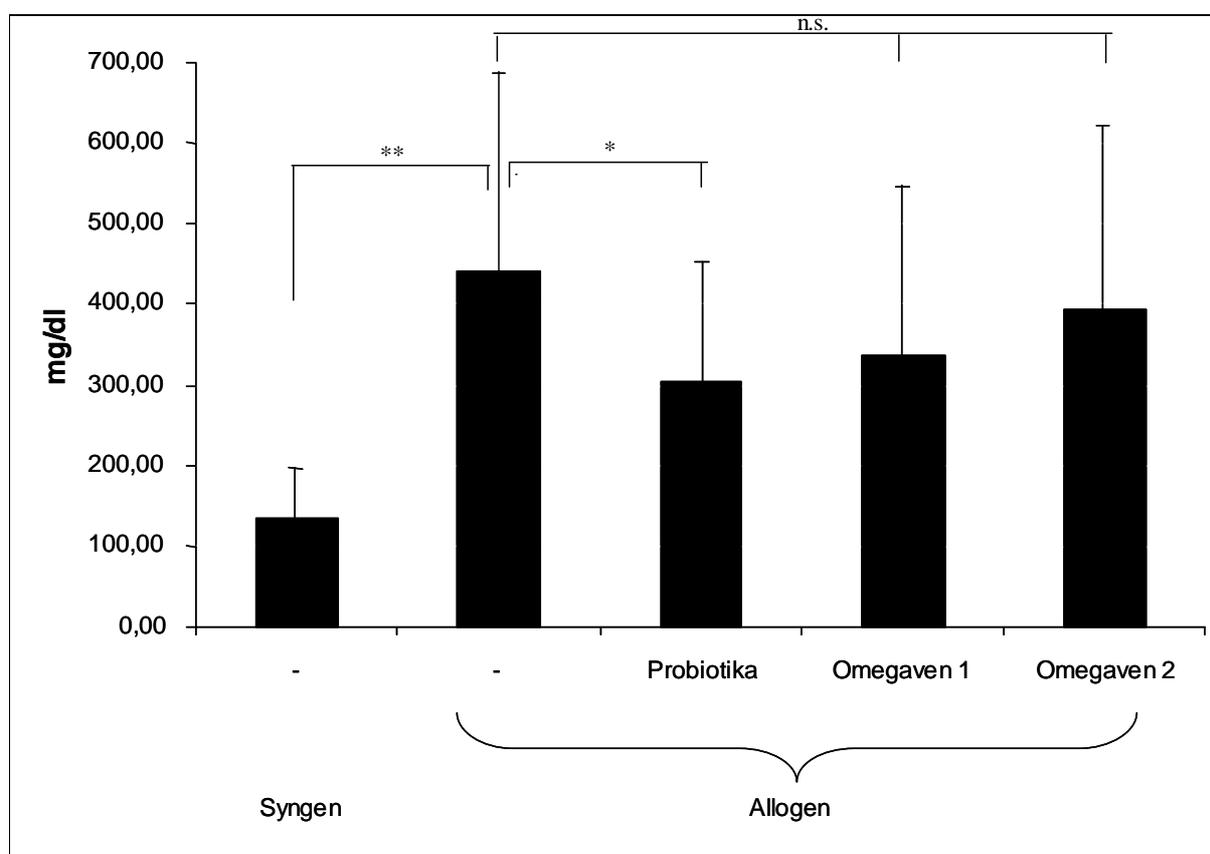


Abb. 6a: Messung der Mannitolkonzentration im Blutserum. Sechzig Minuten nach der oralen Applikation einer Mannitol-Lactulose-Lösung wurde den Tieren Blut aus dem Sinus cavernosus

entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Serumkonzentrationen für Mannitol (6a) und für Lactulose (6b) von 14 syngen-, 20 semiallogenen-, 15 Probiotika-, 12 Omegaven® 1- und 17 Omegaven® 2- Tieren. Für die syngene Kontrollgruppe und die Probiotika-Versuchsgruppe zeigten sich signifikante Unterschiede im Vergleich mit der semiallogenen Versuchsgruppe (** $p < 0,0001$; * $p < 0,03$).

Die Serumkonzentration für Lactulose steigt von einem Mittelwert von $62,33 + 38,53$ mg/dl in der syngenen Gruppe auf einen Mittelwert von $223,40 + 116,61$ mg/dl bei den semiallogenen Versuchstieren signifikant an ($p < 2,22 \times 10^{-7}$; Abbildung 6b). Die mit Probiotika behandelten Tiere zeigen keine signifikanten Unterschiede der Darmpermeabilität für Lactulose im Vergleich zu der semiallogenen Gruppe. Die Serumkonzentration von Lactulose beträgt unter einer Behandlung mit Probiotika $263,67 + 198,60$ mg/dl. Die Gruppe Omegaven® 1 hingegen liegt mit Werten von $326,33 + 196,16$ mg/dl signifikant höher im Vergleich zur semiallogenen Versuchsgruppe ($p < 0,002$). Die Gruppe Omegaven® 2 weist mit $273,67 + 197,16$ mg/dl wiederum eine in Bezug zur semiallogenen Gruppe vergleichbar erhöhte Darmpermeabilität für Lactulose auf.

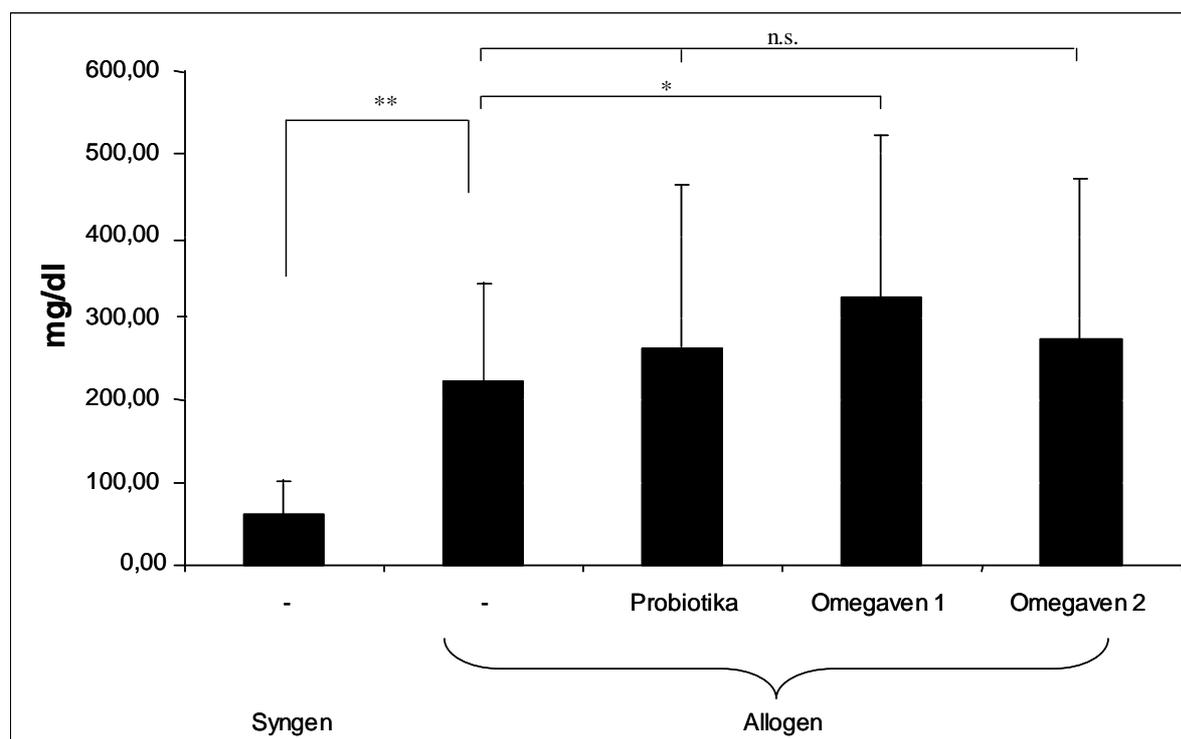


Abb. 6b: Werte der Lactulosekonzentration im Blutserum. Sechzig Minuten nach der oralen Applikation einer Mannitol-Lactulose-Lösung wurde den Tieren Blut aus dem Sinus cavernosus entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Serumkonzentrationen für Mannitol (6a) und für Lactulose (6b) von 14 syngen-, 20 semiallogenen-, 15 Probiotika-, 12 Omegaven® 1- und 17 „Omegaven® 2- Tieren. Es ergaben sich signifikante Unterschiede für die syngene Kontrollgruppe gegen die semiallogene Versuchsgruppe (** $p < 2,22 \times 10^{-7}$), sowie für die Omegaven 1 -Versuchsgruppe im Vergleich zur semiallogenen Gruppe (* $p < 0,002$).

Der Laktulose/Mannitol-Quotient dient als Marker für die resorptive Kapazität des Darmes. Er liegt in der semiallogenen Gruppe mit 0,57 nur wenig über dem Wert der syngen Kontrollgruppe, wo er 0,54 beträgt (Abbildung 7). Ein signifikanter Anstieg zeigt sich bei den mit Probiotika behandelten Tieren im Vergleich zu der semiallogenen Versuchsgruppe ($p < 0,02$). Dieser Quotient beträgt 0,79. Die Gruppe Omegaven® 1 weist mit 1,04 den größten und ebenfalls im Vergleich zur semiallogenen Gruppe signifikant erhöhten Quotienten auf ($p < 0,001$). Der Wert der Gruppe Omegaven® 2 liegt mit 0,74 unter dem der Probiotika-Gruppe und weist keine Signifikanz auf.

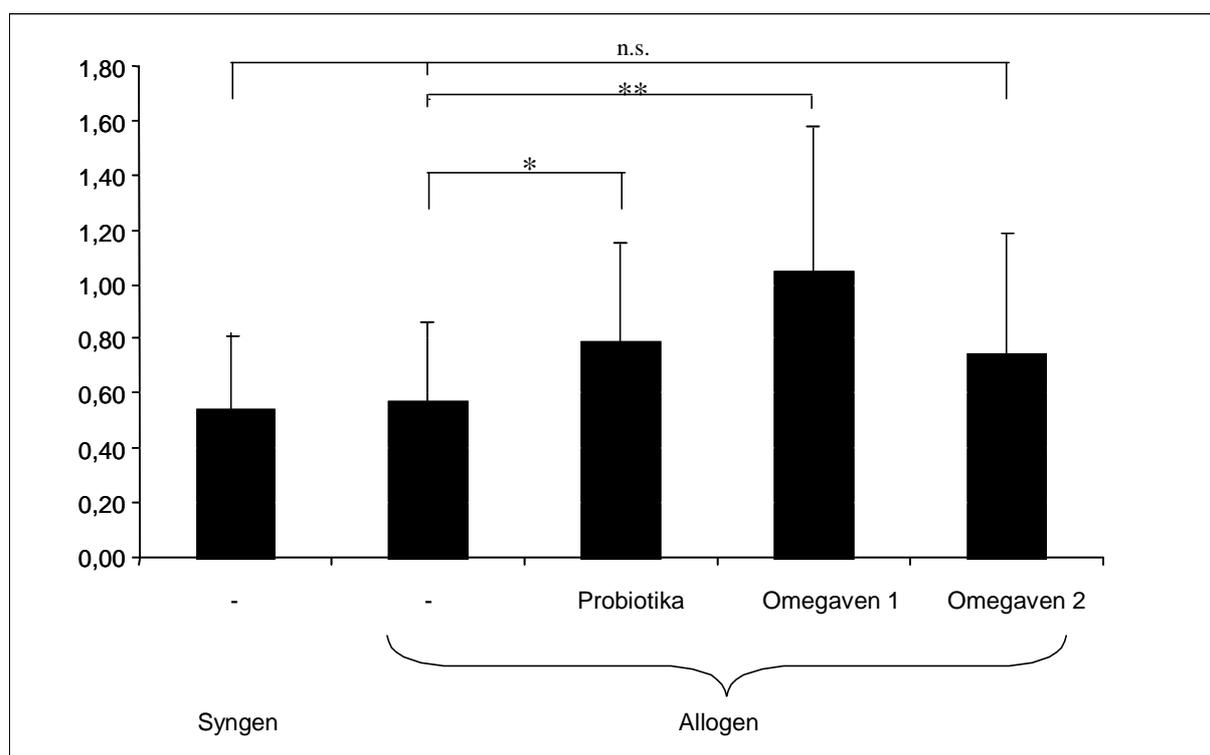


Abb. 7: Lactulose/Mannitol-Quotient der Blutserumkonzentrationen. Sechzig Minuten nach oraler Gabe der Mannitol-Lactulose-Lösung wurde den Mäusen Blut aus dem Sinus cavernosus entnommen und die Serumkonzentration von Mannitol und Lactulose bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung des Quotienten Lactulose/Mannitol. Es zeigten sich signifikante Unterschiede für die semiallogene Versuchsgruppe gegen die Probiotika-Gruppe (* $p < 0,02$) und die Versuchsgruppe Omegaven 1 (** $p < 0,001$).

4 Diskussion

Die murine semiallogene akute GvHD ist ein anerkanntes Modell für die T-zellvermittelte Enteropathie. Sie spiegelt in großen Teilen die Pathogenese der intestinalen Manifestation der Zöliakie wider (Marsh, 1992). Wie in anderen Studien zuvor (Guy-Grand et Vassalli 1986; Mowat und Widmer 1995) konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die akute GvHD bei bestrahlten Empfängertieren typische Schleimhautveränderungen am Dünndarm hervorruft, die sich durch eine Zottenatrophie, eine Kryptenhyperplasie und durch Lymphozyteninfiltrate in der Lamina propria auszeichnen. Die intestinalen Manifestationen der murinen GvH-Reaktion sind T-zellvermittelt und werden durch CD4⁺ (Guy-Grand und Vassalli 1986) und CD8⁺-T-Lymphozyten des Spenders verursacht. Die CD8⁺-Spenderlymphozyten besitzen eine wichtige Funktion bei der Entstehung der akuten GvHD, der alleinige Transfer CD4⁺-Spenderlymphozyten ruft statt einer akuten eine chronische GvHD hervor (Rus et al., 1995).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Gabe von Probiotika und ω -3-Fettsäuren auf die Veränderungen der intestinalen Zytoarchitektur und der intestinalen Permeabilität nach Auslösung einer akuten GvHD im murinen semiallogenen Transfermodell untersucht.

Einfluss durch Gabe von ω -3-Fettsäuren

Früh wurde beobachtet, dass Nahrungsmittel, die Fischöl enthielten, den Verlauf entzündlicher Erkrankungen positiv beeinflussten. Bereits in den 80er Jahren wurden erste Studien durchgeführt, die die Wirksamkeit von oral verabreichten ω -3-Fettsäuren bei Patienten mit M. Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatoider Arthritis, Psoriasis und Asthma untersuchten (Kremer et al., 1985 und 1987; Bittiner et al., 1988; Arm et al., 1988; Lorenz et al., 1989; Bloch et al., 1989). Stenson et al. konnten 1992 eine signifikante Verbesserung des histologischen Entzündungsindex und eine Gewichtszunahme bei mit Fischöl behandelten Colitis ulcerosa - Patienten aufzeigen. Des Weiteren nahm der Bedarf an Steroiden in der Therapie bei gleichbleibendem Ergebnis bei diesen Patienten ab (Hawthorne et al., 1992) und beschwerdefreie Intervalle konnten verlängert werden (Loeschke et al., 1996).

Auch konnte für den M. Crohn ein positiver Effekt von ω -3-Fettsäuren bei der Remissionserhaltung beschrieben werden. (Beluzzi et al., 1996; Lorenz-Meyer et al., 1996). Weiterhin zeigte sich eine Verminderung unangenehmer Begleiterkrankungen wie Blähungen, Aufstoßen und Diarrhoen.

In psoriatisch veränderter Haut sind erhöhte Spiegel von Arachidonsäure, der proinflammatorischen Mediatoren LTB₄ und LTC₄, sowie eine gesteigerte Lipooxygenaseaktivität nachgewiesen worden (Grabbe et al., 1984), denen die antiinflammatorisch wirksamen Mediatoren LTB₅ und LTC₅ der Vorläufersubstanz EPA entgegenwirken konnten. Dieser positive Effekt wurde durch eine Reihe von Untersuchungen belegt. So haben Grimmiger et al. 1993 bei Patienten mit Psoriasis guttata nach 10 Tagen Behandlung mit 100ml Fischöl/d eine signifikante Verbesserung des Hautbildes gegenüber der Kontrollgruppe, deren Patienten mit Sojabohnenöl behandelt wurden, beobachtet. Mayer et al. konnten 2002 diese Ergebnisse mit ebenfalls signifikanter Besserung im PASI-Score (Psoriasis Area and Severity Index) nach 14-tägiger Behandlung mit 200 ml/d untermauern.

Beim Asthma bronchiale beeinflussen Leukotriene und Prostaglandine die Entzündungskaskade mit grosser Relevanz und induzieren Bronchospasmen, Schleimhautödeme, eine vermehrte Schleimproduktion sowie die Einwanderung von Entzündungszellen. Mit der Nahrung zugeführte ω -3-Fettsäuren führten nach einer Studie von Broughton et al., 1997, zu einer klinischen Verbesserung der respiratorischen Symptome beim Asthma bronchiale.

Auch für die humane GvHD gibt es erste Hinweise, dass die Gabe von ω -3-Fettsäuren die Sekretion pro-entzündlicher Zytokine in der intestinalen Mucosa signifikant vermindern kann (Takatsuka et al., 2002). In einer kleineren Studie bei Patienten, die Knochenmark von nicht-verwandten Spendern erhalten hatten, wurde ein signifikant vermindertes Auftreten von GvHD durch Behandlung mit ω -3-Fettsäuren beobachtet. Insgesamt konnte bei dieser Patientengruppe eine höhere Überlebensrate nachgewiesen werden (Takatsuka et al, 2001).

Die therapeutische Wirksamkeit von ω -3-Fettsäuren ist für verschiedene chronisch-entzündliche Erkrankungen belegt. Als molekularer Wirkmechanismus ist der inhibierende Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf die Leukotrien- und Prostaglandinsynthese beschrieben worden (Tomobe et al., 2000; Takatsuka et al., 2002). Hierbei konnte ein besonderer Einfluss auf Leukotrien B₄ mit einer Verminderung im Blutserum nachgewiesen werden. Weiterhin waren bei den knochenmarkstransplantierten Patienten, die ω -3-Fettsäuren erhielten, die Serumspiegel der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und Interferon- γ gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass der durch Oxidation von Eicosapentaensäure entstehende Lipidmediator Resolvin E1 über einen spezifischen Rezeptor auch direkt den pro-entzündlichen Signalweg von NF- κ B inhibieren

kann (Arita et al., 2005). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die therapeutische Applikation von Resolvin in einem chemisch-induzierten Colitismodell bei der Maus eine anti-inflammatorische Wirkung besitzt (Ishida et al., 2010). Die Wirksamkeit einer NF- κ B Inhibition durch die Gabe eines Proteasominhibitors (Bortezomib) bei der GvHD ist bereits gezeigt worden (Sun et al. 2004). Auch die Aktivierung von Peroxisom-Proliferator aktivierten Rezeptoren (PPAR γ) wird in diesem Zusammenhang diskutiert (Li et al., 2005; Arita et al., 2005; Ponferrada et al., 2007).

Eine duale Rolle ist für ω -3-Fettsäuren bei der Regulation von Zellproliferation und -überleben berichtet worden. Auf der einen Seite können ω -3-Fettsäuren das Wachstum verschiedener Tumorzelllinien hemmen und in höheren Konzentrationen über den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen, jedoch kann die Gabe von ω -3-Fettsäuren in bestimmten Zelltypen auch anti-apoptische Effekte hervorrufen. So konnte in dünnarmtransplantierten Ratten durch die Gabe von ω -3-Fettsäuren eine signifikante Steigerung der Proliferation und eine Abnahme der Apoptoserate intestinaler Epithelzellen gezeigt werden (Wu et al., 2003).

Nur wenige Daten existieren zu dem Einfluss von ω -3-Fettsäuren auf die Regulationsmechanismen intestinaler Permeabilität. Unter *in vitro* Bedingungen scheint die Gabe von ω -3-Fettsäuren die parazelluläre Permeabilität von konfluenten intestinalen Epithelzellen (Monolayer) über die Redistribution von tight junction Proteinen zu erhöhen (Usami et al., 2001 und 2003). Andererseits wurde gezeigt, dass der transzelluläre Transport von großen Molekülen (z.B. Proteinen) durch ω -3-Fettsäuren inhibiert werden kann (Rosella et al., 2000).

Da diese Ergebnisse nur bedingt auf die komplexe *in vivo* Situation übertragbar sind, sollte in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss die Gabe von ω -3-Fettsäuren auf die erhöhte intestinale Permeabilität bei mukosaler Entzündung am *in vivo* Modell der murinen semiallogenen GvHD ausübt.

Es wurden zwei Behandlungsgruppen gebildet, wobei die eine Gruppe zwei Tage vor der Transplantation mit Omegaven® vorbehandelt wurde. Die andere Versuchsgruppe erhielt Omegaven® ab dem Tag der Transplantation. Hierbei sollte herausgearbeitet werden, ob die Behandlung mit ω -3-Fettsäuren **vor** dem entzündlichen Stimulus einen anderen Effekt ausübt als eine Behandlung, die **während** einer entzündlichen Reaktion beginnt. So könnte beispielsweise die Präkonditionierung der Mäuse mit ω -3-Fettsäuren die Expression und Verteilungsmuster von Tight junction Proteinen beeinflussen, z.B. konnten Oh und

Mitarbeiter (2005) die Heraufregulation von Occludin durch ω -3-Fettsäuren zeigen. Interessanterweise ist bekannt, dass eine verminderte Occludinexpression bei CED die Transmigration von Neutrophilen durch das intestinale Epithel begünstigt und so die Entzündungsreaktion verstärken kann (Kucharzik et al., 2001).

Unter dem verwendeten Behandlungsschema war jedoch in keiner der beiden mit Omegaven® behandelten Gruppen eine signifikante Veränderung der Epithelschäden und/oder der intestinalen Permeabilität im Sinne einer Verbesserung zu beobachten. In der mit Omegaven®-vorbehandelten Gruppe (Omegaven 1) war bzgl. der Lactulosekonzentration sogar ein statistisch signifikanter Trend zu einer erhöhten Permeabilität zu erheben.

Die intestinale Permeabilität wird mit Hilfe der nicht metabolisierbaren Zucker Mannitol und Lactulose beurteilt. Mannitol wird leicht von der Darmschleimhaut absorbiert und dient als Marker für die transzelluläre Aufnahme, wohingegen Lactulose nur schwer absorbiert wird und als Marker für den interzellulären Zusammenhalt steht. Um zwischen diesen Störungen unterscheiden zu können, wird stets eine Kombination aus beiden Zuckern oral verabreicht und nach einem zeitlichen Abstand die Konzentration des jeweiligen Zuckers im Blut gemessen.

Ein Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit erstellten Ergebnisse wären ein zu kurzer Behandlungszeitraum oder eine zu niedrig gewählte Dosis. Zudem stellt Omegaven ein komplexes Gemisch aus verschiedenen ungesättigten Fettsäuren dar. Um eine Dosis-Wirkungskurve zu erstellen, muss auch die Interaktion und mögliche unterschiedliche Resorption der einzelnen Wirkstoffe in Betracht gezogen werden.

Bei der hier vorgelegten Arbeit wurde der intraperitoneale Applikationsweg für die Omegaven®-Injektion gewählt. Dieser Weg wurde bereits in anderen Studien erfolgreich verwendet (Kikuchi et al., 1998). Es ist jedoch zu diskutieren, ob die unzureichende Wirkung von Omegaven® bei dem hier verwendeten Versuchsaufbau z.B. aufgrund entzündlicher Vorgänge im Bereich des Peritoneums zu einer Resorptionsstörung des Medikamentes führen kann und so die therapeutische Wirkung negativ beeinflusst bzw. vermindert. Insbesondere könnte der fehlende Einfluss auf die Permeabilität auch auf eine zu geringe Dosis an den intestinalen Epithelzellen zurückzuführen sein, da diese im wesentlichen luminal ernährt werden.

Einfluss durch Gabe von Probiotika

Der menschliche Darm ist von einer residenten Mikroflora besiedelt (Turnbaugh et al., 2007). Das komplexe Gleichgewicht dieser Flora und das symbiotische Wechselspiel mit den Darmepithelzellen spielt eine wichtige Rolle für die immunologische Integrität der intestinalen Barriere. Schon früh wurde erkannt, dass die therapeutische Gabe von Bakteriengemischen eine positive Wirkung auf den Verlauf von Darmerkrankungen haben kann (Nissle A Medizinische Klinik 1918; 2:29-33). Änderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora können die Immunität des Wirtes und somit den Verlauf einer entzündlichen Darmerkrankung stark beeinflussen (Hooper et al., 2001; Madsen et al., 1999). Experimentelle Daten und klinische Beobachtungen zeigen das bedeutsame Zusammenspiel zwischen der komplexen intestinalen Mikroflora und der Entwicklung einer mukosalen Entzündung. Insbesondere bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen gerät das physiologische Gleichgewicht durcheinander, was vor allem auf einem Verlust anaerober Bakterien, wie *Bacteroides* spezie, *Eubacterium* spezie und *Lactobacillus* spezie, basiert (Ott et al., 2004 und 2008). Durch die Gabe von Probiotika konnte eine Restitution der bakteriellen Diversität mit Wiederherstellung einer „protektiven“ intestinalen Flora erzielt und eine Remission derselben aufrecht erhalten werden (Kühbacher et al., 2006).

Auch in anderen bereits durchgeführten Studien zeigte sich durch die Verabreichung von Probiotika ein positiver Einfluss bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, bei antibiotika-assoziierten Diarrhoen (Vanderhoof et al., 1999; Armuzzi et al., 2001) und viral verursachten gastrointestinalen Infekten (Salazar-Lindo et al., 2004).

Kruis et al. wies in einer Studie 2004 einen vergleichbaren remissionserhaltenden Effekt von *E.coli* Nissle 1917 und dem Goldstandard Mesalazin bei Patienten mit colitis ulcerosa nach.

Prophylaktisch verabreichte Probiotika konnten die Inzidenz bei Kindern mit erhöhtem Risiko für eine atopische Erkrankung senken. Weiterhin konnte durch Holler und Mitarbeiter (Gerbitz et al., 2004) gezeigt werden, dass die Probiotikagabe die Überlebensrate bei der GvHD im Modell der murinen semiallogenen Knochenmarkstransplantation signifikant verbessert.

Die molekularen Mechanismen, die zu den oben beschriebenen Wirkungen von Probiotika führen sind bis heute wenig verstanden. Zahlreiche Arbeiten weisen jedoch daraufhin, dass weniger die Stabilisierung der intestinalen Mikroflora, als vielmehr eine spezifische Wechselwirkung von probiotischen Bakterien mit dem angeborenen Immunsystem den Effekten zugrunde liegen. Probiotika beeinflussen das mukosale Immunsystem u.a. durch eine

Modulation der Immunglobulin A-Synthese, der Schleimzusammensetzung und durch eine Änderung des pro- versus anti-entzündlichen Gleichgewichts der lokalen Zytokine (Isolauri, 2001). Das intestinale Schleimhautepithel als physiologische Barriere bildet antimikrobielle Peptide, die die Ansiedlung von Bakterien und anderen Mikroorganismen limitieren. Eine bedeutende Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Klasse der Defensine. Die menschlichen β -Defensine-1 (hBD-1), -2, -3 und -4 werden in verschiedenen Epithelzellen exprimiert. Sie besitzen eine antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien, Pilze und einige Viren (Ganz, 2003). Zusätzlich zu den direkten antimikrobiellen Eigenschaften der kationischen Peptide, wird angenommen, dass einige der β -Defensine auch als Chemokine agieren können (Yang et al., 1999). Wehkamp und Mitarbeiter (2004 und 2007) konnten zeigen, dass die Induktion von hBD-2 in den intestinalen Epithelzellen insbesondere durch *E.coli* NISSLE 1917 und einige andere probiotische Bakterien stimuliert und so die antimikrobielle und antiinflammatorische Aktivität unterstützt werden kann.

In der Abwehr mikrobieller Infektionen spielen auch Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine wichtige Rolle. Sie werden in Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet, beeinflussen die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und besitzen damit eine wichtige protektive Funktion in Hinblick auf die Regulation der bakteriellen Besiedelung des Darms und dadurch verursachte Entzündungsreaktionen (Rakoff-Nahoum et al., 2004).

Lactobacilli und Bifidobakterien sind als natürliche Bestandteile der darmeigenen Mikroflora bekannt. Als probiotische Bakterien waren sie wiederholt Gegenstand von Untersuchungen. Bei Patienten mit Morbus Crohn wurde durch *Lactobacillus casei* eine Erniedrigung der TNF- α -Sekretion im Ileum beobachtet (Borrueel et al., 2002; Borrueel et al., 2003). Auch für andere Probiotika, u.a. VSL#3, wurde, wie bereits beschrieben, eine antientzündliche Wirkung durch Heraufregulation der Bildung des anti-inflammatorisch wirksamen IL-10 in dendritischen Zellen nachgewiesen (Drakes et al., 2004; Christensen et al., 2002). Einen anderen Angriffspunkt bietet die Inhibition des pro-entzündlich wirkenden NF- κ B, die in einer Studie von Tien und Mitarbeiter gelang (2006). Sie zeigten eine durch *L. casei* begünstigte Stabilisierung von I κ B- α , einem spezifischen Inhibitor von NF- κ B, und erschlossen damit eine bedeutende Stufe in der Unterbrechung der pro-inflammatorischen Kaskade.

In Zusammenschau dieser Erkenntnisse lag es nahe, die Auswirkung einer Probiotikatherapie auf die entzündete Darmschleimhaut im Hinblick auf Permeabilität und Zytoarchitektur intensiver zu untersuchen.

Obwohl für Probiotika in anderen Studien bereits positive Ergebnisse beschrieben wurden, konnte anhand dieses Modells kein weiterer Erfolg vermessen werden. Auch im Hinblick auf die Darmpermeabilität konnte mit der Probiotikabehandlung keine Verbesserung erzielt werden. Eher wurde eine Zunahme der Darmwanddurchlässigkeit beobachtet.

Denkbar wäre, dass der mögliche Effekt von Probiotika auf die sekundäre Epithelschädigung und bakterielle Translokation im Vergleich zum primären Effekt des Lymphozytentransfers zu gering ist, um den Veränderungen der Darmmorphologie entgegen zu wirken und diesen Umbau aufzuhalten.

Ob sich bei einer Verlängerung der Versuchsdauer oder einer höheren Dosis der Probiotika ein Therapieerfolg einstellt, könnte Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Da sich in anderen Studien für die beiden hier untersuchten Substanzen bereits positive Wirkungen beim Menschen bezüglich der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt haben, besitzt diese Arbeit, da es sich um ein Tiermodell handelt, nur eine begrenzte Aussagefähigkeit. Wünschenswert wären weitere Untersuchungen am Menschen hinsichtlich der in dieser Arbeit untersuchten Schwerpunkte in Bezug auf die Darmpermeabilität und den Einfluss auf die Zytoarchitektur des Darms.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde am Beispiel der murinen semiallogenen Transplantat-gegen-Wirt Reaktion als Modell für T-zellvermittelte atrophisch-hyperregenerative Darmerkrankungen untersucht, welchen therapeutischen Einfluss die Gabe von Probiotika oder Omega-3-Fettsäuren ausübt. Hierbei wurden die Veränderungen der Zytoarchitektur des Darmes und die intestinale Permeabilität als Endpunkte der Studie gewählt.

Der Zöliakie liegt eine T-zellvermittelte Überempfindlichkeitsreaktion gegen Gluten bei genetisch prädisponierten Individuen zugrunde. Die murine GvHD spiegelt in großen Teilen die Pathogenese der intestinalen Manifestation der Zöliakie wider. Beide führen zu einer T-Zellinfiltration in der Mukosa und zu morphologischen Schleimhautveränderungen in Form von Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie. Durch die epithelialen Veränderungen wird die Barrierefunktion des Darms strukturell und funktionell gestört, was zu einem unphysiologischen Einstrom von Antigenen in die Darmwand, zu einer krankhaft gesteigerten Immunantwort und einem Ungleichgewicht von pro- und kontrainflammatorischen Zytokinen führen kann.

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, auch Omegafettsäuren genannt, sind als ω -6-Fettsäure Linol- und ω -3-Fettsäure α -Linolensäure für den Menschen essentiell. Sie dienen als Vorläufersubstanzen für Arachidon- und Eicosapentaensäure, die zu Eikosanoiden – Prostanoiden und Leukotriene – metabolisiert werden. Durch Verabreichung von ω -3-Fettsäuren lässt sich die Bildung von anti-entzündlichen Eikosanoiden verstärken, wodurch die Häufigkeit und Stärke von Entzündungsreaktionen beeinflusst werden kann. Ein hoher Anteil an ω -3-Fettsäuren findet sich vor allem in Fischöl.

Die immunphysiologische Regulation des GIT hängt unter anderem auch von der Beschaffenheit der residenten Mikroflora ab. Sie stellt einen wichtigen Bestandteil der intestinalen mukosalen Barriere dar. Diese Erkenntnis hat zur Einführung des Konzepts der probiotischen Therapie geführt. Probiotika besitzen unterschiedliche Wirkungen auf das Immunsystem. Sie stabilisieren die gastrointestinale Barrierefunktion und stimulieren außerdem die unspezifische Abwehr gegen bakterielle Pathogene.

Ausgehend von den oben beschriebenen Befunden, dass beide Substanzen positive Effekte bei unterschiedlichen entzündlichen Erkrankungen des menschlichen Darmes zeigten, sollte am Modell der semiallogenen Graft-versus-Host Reaktion bei der Maus untersucht werden, ob Probiotika und ω -3-Fettsäuren bei akuten autoimmunen Entzündungsprozessen einen

protektiven Effekt ausüben und ob sie die erhöhte intestinale Permeabilität bei einer mukosalen Entzündung beeinflussen können.

Die intestinale Permeabilität wird mit Hilfe der nicht metabolisierbaren Zucker Mannitol und Lactulose beurteilt. Der Lactulose/Mannitol-Quotient dient zur Berechnung der Darmresorptionskapazität und zeigt das Ausmaß der Permeabilitätsstörung an.

Entgegen der vielen beschriebenen positiven Wirkungen von Fettsäuren und Probiotika bei entzündlichen Prozessen beim Menschen, zeigte die Auswertung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nicht den erhofften Erfolg. Sowohl die Zytoarchitektur als auch die Darmpermeabilität betreffend wurde eine Verschlechterung der Ausgangssituation beobachtet. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass es sich in dieser Arbeit um ein Tiermodell handelt, und die Aussagefähigkeit der untersuchten Schwerpunkte für mögliche positive Effekte auf den Menschen begrenzt bleibt.

6 Literaturverzeichnis

1. Arita, M., M. Yoshida, S. Hong, E. Tjonahen, J.N. Glickman, N.A. Petasis, R.S. Blumberg, and C.N. Serhan. 2005. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7671-7676.
2. Arm, J.P., C.E. Horton, J.M. Mencia-Huerta, F. House, N.M. Eiser, T.J. Clark, B.W. Spur, and T.H. Lee. 1988. Effect of dietary supplementation with fish oil lipids on mild asthma. *Thorax* 43:84-92.
3. Armuzzi, A., F. Cremonini, F. Bartolozzi, F. Canducci, M. Candelli, V. Ojetti, G. Cammarota, M. Anti, A. De Lorenzo, P. Pola, G. Gasbarrini, and A. Gasbarrini. 2001. The effect of oral administration of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 15:163-169.
4. Aslan, A., and G. Triadafilopoulos. 1992. Fish oil fatty acid supplementation in active ulcerative colitis: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Am J Gastroenterol* 87:432-437.
5. Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307:1915-20.
6. Barbosa, D.S., R. Cecchini, M.Z. El Kadri, M.A. Rodriguez, R.C. Burini, and I. Dichi. 2003. Decreased oxidative stress in patients with ulcerative colitis supplemented with fish oil omega-3 fatty acids. *Nutrition* 19:837-842.
7. Belluzzi, A., C. Brignola, M. Campieri, A. Pera, S. Boschi, and M. Miglioli. 1996. Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 334:1557-1560.
8. Bittiner, S.B., W.F. Tucker, I. Cartwright, and S.S. Bleehen. 1988. A double-blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. *Lancet* 1:378-380.
9. Blumberg, R.S, 2009. Inflammation in the intestinal tract: pathogenesis and treatment. *Dig Dis*. 27:455-64.

-
10. Borrueal, N., M. Carol, F. Casellas, M. Antolin, F. de Lara, E. Espin, J. Naval, F. Guarner, and J.R. Malagelada. 2002. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut*. 51:659-64.
 11. Borrueal, N., F. Casellas, M. Antolin, M. Llopis, M. Carol, E. Espiin, J. Naval, F. Guarner, and J.R. Malagelada. 2003. Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa. *Am J Gastroenterol*. 98:865-70.
 12. Brandtzaeg P. 2009. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol*. 70:505-15.
 13. Broughton, K.S., C.S. Johnson, B.K. Pace, M. Liebman, and K.M. Kleppinger. 1997. Reduced asthma symptoms with n-3 fatty acid ingestion are related to 5-series leukotriene production. *Am J Clin Nutr*. 65:1011-7.
 14. Christensen, H.R., H. Frokiaer, and J.J. Pestka. 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol*. 168:171-8.
 15. Cole, A.T., B.J. Pilkington, J. McLaughlan, C. Smith, M. Balsitis, and C.J. Hawkey. 1996. Mucosal factors inducing neutrophil movement in ulcerative colitis: the role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Gut* 39:248-254.
 16. Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*. 10:777-88.
 17. Dawson, D.J., R.W. Lobley, P.C. Burrows, J.A. Notman, M. Mahon, and R. Holmes. 1988. Changes in jejunal permeability and passive permeation of sugars in intestinal biopsies in coeliac disease and Crohn's disease. *Clin Sci (Lond)* 74:427-431.
 18. Drakes, M., T. Blanchard, and S. Czinn. 2004. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun*. 72:3299-309.
 19. Duchmann, R., H. Lochs, and W. Kruis. 1999. [Crohn disease, ulcerative colitis. When bacteria attack the intestinal wall....]. *MMW Fortschr Med* 141:48-51.

-
20. Duffy, L.C. 2000. Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine. *J Nutr* 130:432S-436S.
 21. Erickson, K.L., and N.E. Hubbard. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr* 130:403S-409S.
 22. Farrell, R.J., and C.P. Kelly. 2002. Celiac sprue. *N Engl J Med* 346:180-188.
 23. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 3:710-20.
 24. Gerbitz, A., M. Schultz, A. Wilke, H.J. Linde, J. Scholmerich, R. Andreesen, and E. Holler. 2004. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood* 103:4365-4367.
 25. Gill, H.S., K.J. Rutherford, M.L. Cross, and P.K. Gopal. 2001. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 74:833-839.
 26. Grabbe, J., B.M. Czarnetzki, T. Rosenbach, and M. Mardin. 1984. Identification of chemotactic lipooxygenase products of arachidonate metabolism in psoriatic skin. *J Invest Dermatol.* 82:477-9.
 27. Grimminger, F., D. Fuhrer, C. Papavassilis, E. Schlotzer, K. Mayer, K.U. Heuer, L. Kiss, D. Walmrath, S. Piberhofer, F. Lubbecke, and et al. 1993. Influence of intravenous n-3 lipid supplementation on fatty acid profiles and lipid mediator generation in a patient with severe ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 23:706-715.
 28. Grimminger, F., P. Mayser, C. Papavassilis, M. Thomas, E. Schlotzer, K.U. Heuer, D. Fuhrer, K.D. Hinsch, D. Walmrath, W.B. Schill, and et al. 1993. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of n-3 fatty acid based lipid infusion in acute, extended guttate psoriasis. Rapid improvement of clinical manifestations and changes in neutrophil leukotriene profile. *Clin Investig* 71:634-643.
 29. Guy-Grand, D., and P. Vassalli. 1986. Gut injury in mouse graft-versus-host reaction. Study of its occurrence and mechanisms. *J Clin Invest* 77:1584-1595.

-
30. Hawthorne, A.B., T.K. Daneshmend, C.J. Hawkey, A. Belluzzi, S.J. Everitt, G.K. Holmes, C. Malkinson, M.Z. Shaheen, and J.E. Willars. 1992. Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial. *Gut* 33:922-928.
 31. Hooper, L.V., M.H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P.G. Falk, and J.I. Gordon. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 291:881-4.
 32. Hunt, K.A., Zhernakova, A., Turner, G., Heap, G.A., Franke, L., Bruinenberg, M., Romanos, J., Dinesen, L.C., Ryan, A.W., Panesar, D., Gwilliam, R., Takeuchi, F., McLaren, W.M., Holmes, G.K., Howdle, P.D., Walters, J.R., Sanders, D.S., Playford, R.J., Trynka, G., Mulder, C.J., Mearin, M.L., Verbeek, W.H., Trimble, V., Stevens, F.M., O'Morain, C., Kennedy, N.P., Kelleher, D., Pennington, D.J., Strachan, D.P., McArdle, W.L., Mein, C.A., Wapenaar, M.C., Deloukas, P., McGinnis, R., McManus, R., Wijmenga, C., van Heel, D.A. 2008. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet*. 40:395-402.
 33. Irvine, E.J., and J.K. Marshall. 2000. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. *Gastroenterology* 119:1740-1744.
 34. Isolauri, E., Y. Sutas, P. Kankaanpaa, H. Arvilommi, and S. Salminen. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 73:444S-450S.
 35. Isolauri, E. 2001. Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr*. 73:1142S-1146S.
 36. Ispida, T., Yoshida, M., Arita, M., Nishitani, Y., Nishiumi, S., Masuda, A., Mizuno, S., Takagawa, T., Morita, Y., Kutsumi, H., Inokuchi, H., Serhan, C.N., Blumberg, R.S., Azuma, T. 2010. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 16:87-95.
 37. Kalliomaki, M., S. Salminen, H. Arvilommi, P. Kero, P. Koskinen, and E. Isolauri. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357:1076-1079.

-
38. Kennedy, R.J., M. Hoper, K. Deodhar, S.J. Kirk, and K.R. Gardiner. 2000. Probiotic therapy fails to improve gut permeability in a hapten model of colitis. *Scand J Gastroenterol* 35:1266-1271.
 39. Kikuchi, S., T. Sakamoto, C. Ishikawa, K. Yazawa, and S. Torii. 1998. Modulation of eosinophil chemotactic activities to leukotriene B₄ by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 58:243-8.
 40. Kremer, J.M., J. Bigauoette, A.V. Michalek, M.A. Timchalk, L. Lininger, R.I. Rynes, C. Huyck, J. Zieminski, and L.E. Bartholomew. 1985. Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Lancet* 1:184-187.
 41. Kremer, J.M., W. Jubiz, A. Michalek, R.I. Rynes, L.E. Bartholomew, J. Bigauoette, M. Timchalk, D. Beeler, and L. Lininger. 1987. Fish-oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A double-blinded, controlled, crossover study. *Ann Intern Med* 106:497-503.
 42. Kruis, W., P. Fric, J. Pokrotnieks, M. Lukas, B. Fixa, M. Kascak, M.A. Kamm, J. Weismueller, C. Beglinger, M. Stolte, C. Wolff, and J. Schulze. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53:1617-1623.
 43. Kruis, W., E. Schutz, P. Fric, B. Fixa, G. Judmaier, and M. Stolte. 1997. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 11:853-858.
 44. Kucharzik, T., S.V. Walsh, J. Chen, C.A. Parkos, and A. Nusrat. 2001. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol* 159:2001-2009.
 45. Kuehbacher, T., S.J. Ott, U. Helwig, T. Mimura, F. Rizzello, B. Kleessen, P. Gionchetti, M. Blaut, M. Campieri, U.R. Folsch, M.A. Kamm, and S. Schreiber. 2006. Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut*. 55:833-41.
 46. Li, H., X.Z. Ruan, S.H. Powis, R. Fernando, W.Y. Mon, D.C. Wheeler, J.F. Moorhead, and Z. Varghese. 2005. EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation

-
- responses in HK-2 cells: evidence for a PPAR-gamma-dependent mechanism. *Kidney Int* 67:867-874.
47. Loeschke, K., B. Ueberschaer, A. Pietsch, E. Gruber, K. Ewe, B. Wiebecke, W. Heldwein, and R. Lorenz. 1996. n-3 fatty acids only delay early relapse of ulcerative colitis in remission. *Dig Dis Sci* 41:2087-2094.
48. Lorenz, R., P.C. Weber, P. Szimnau, W. Heldwein, T. Strasser, and K. Loeschke. 1989. Supplementation with n-3 fatty acids from fish oil in chronic inflammatory bowel disease--a randomized, placebo-controlled, double-blind cross-over trial. *J Intern Med Suppl* 731:225-232.
49. Lorenz-Meyer, H., P. Bauer, C. Nicolay, B. Schulz, J. Purmann, W.E. Fleig, C. Scheurlen, I. Koop, V. Pudel, and L. Carr. 1996. Omega-3 fatty acids and low carbohydrate diet for maintenance of remission in Crohn's disease. A randomized controlled multicenter trial. Study Group Members (German Crohn's Disease Study Group). *Scand J Gastroenterol* 31:778-785.
50. Madsen, K.L., J.S. Doyle, L.D. Jewell, M.M. Tavernini, and R.N. Fedorak. 1999. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology*. 116:1107-14.
51. Madsen, K., A. Cornish, P. Soper, C. McKaigney, H. Jijon, C. Yachimec, J. Doyle, L. Jewell, and C. De Simone. 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121:580-591.
52. Marsh, M.N. 1992. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 102:330-354.
53. Mayser, P., H. Grimm, and F. Grimminger. 2002. n-3 fatty acids in psoriasis. *Br J Nutr* 87 Suppl 1:S77-82.
54. Morikawa, M., R.A. Shorthouse, M.J. Suto, M.E. Goldman, and R.E. Morris. 1997. A novel inhibitor of nuclear factor-kappa B and activator protein-1 transcription factors in T cells suppresses host-versus-graft alloreactivity in vivo. *Transplant Proc.* 29:1269-70.

-
55. Mowat, A.M., and J.L. Viney. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156:145-166.
 56. Mowat, A.M., and M.B. Widmer. 1995. A role for IL-4 in immunologically mediated enteropathy. *Clin Exp Immunol* 99:65-69.
 57. Neutra, M.R., N.J. Mantis, and J.P. Kraehenbuhl. 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2:1004-1009.
 58. Nielsen, O.H., T. Koppen, N. Rudiger, T. Horn, J. Eriksen, and I. Kirman. 1996. Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 41:1786-1793.
 59. Nissle, A. 1918. Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Colibakterien. *Medizinische Klinik* 2:29-33.
 60. Nusrat, A., J.R. Turner, and J.L. Madara. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G851-857.
 61. Oh, I.S., H. Shimizu, T. Sato, Y. Uehara, S. Okada, and M. Mori. 2005. Molecular mechanisms associated with leptin resistance: n-3 polyunsaturated fatty acids induce alterations in the tight junction of the brain. *Cell Metab* 1:331-341.
 62. Ott, S.J., M. Musfeldt, D.F. Wenderoth, J. Hampe, O. Brant, U.R. Folsch, K.N. Timmis, and S. Schreiber. 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53:685-693.
 63. Ott, S.J., Plamondon, S., Hart, A., Begun, A., Rehman, A., Kamm, M.A., Schreiber, S. 2008. Dynamics of the mucosa-associated flora in ulcerative colitis patients during remission and clinical relapse. *J Clin Microbiol.* 46:3510-3.
 64. Ponferrada, A., Caso, J.R., Alou, L., Colón, A., Sevillano, D., Moro, M.A., Lizasoain, I., Menchén, P., Gómez-Lus, M.L., Lorenzo, P., Cos, E., Leza, J.C., Menchén, L. 2007. The role of PPARgamma on restoration of colonic homeostasis after

-
- experimental stress-induced inflammation and dysfunction. *Gastroenterology*. 132:1791-803.
65. Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, and R. Medzhitov. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229-241.
66. Roberts, W.G., T.J. Simon, R.G. Berlin, R.C. Haggitt, E.S. Snyder, W.F. Stenson, S.B. Hanauer, J.E. Reagan, A. Cagliola, W.K. Tanaka, S. Simon, and M.L. Berger. 1997. Leukotrienes in ulcerative colitis: results of a multicenter trial of a leukotriene biosynthesis inhibitor, MK-591. *Gastroenterology* 112:725-732.
67. Rosella, O., A. Sinclair, and P.R. Gibson. 2000. Polyunsaturated fatty acids reduce non-receptor-mediated transcellular permeation of protein across a model of intestinal epithelium in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* 15:626-631.
68. Rosenstiel, P., Sina, C., Franke, A., Schreiber, S. 2009. Towards a molecular risk map-recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease. *Semin Immunol*. 21:334-45.
69. Ruggiero, C., Lattanzio, F., Lauretani, F., Gasperin, B., Andres-Lacueva, C., Cherubini, A., Omega-3 polyunsaturated fatty acids and immune-mediated diseases: inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*. 2009; 15:4135-48.
70. Rus, V., A. Svetic, P. Nguyen, W.C. Gause, and C.S. Via. 1995. Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. *J Immunol* 155:2396-2406.
71. Saavedra, J.M. 2001. Clinical applications of probiotic agents. *Am J Clin Nutr* 73:1147S-1151S.
72. Salazar-Lindo, E., P. Miranda-Langschwager, M. Campos-Sanchez, E. Chea-Woo, and R.B. Sack. 2004. Lactobacillus casei strain GG in the treatment of infants with acute watery diarrhea: a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trial [ISRCTN67363048]. *BMC Pediatr* 4:18.

-
73. Sanderson, I.R., P. Boulton, I. Menzies, and J.A. Walker-Smith. 1987. Improvement of abnormal lactulose/rhamnose permeability in active Crohn's disease of the small bowel by an elemental diet. *Gut* 28:1073-1076.
74. Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T.A., Stange, E.F., Fellermann, K. 2007. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun.* 75:2399-407.
75. Schreiber, S., S. Nikolaus, J. Hampe, J. Hamling, I. Koop, B. Groessner, H. Lochs, and A. Raedler. 1999. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 353:459-461.
76. Schulzke, J.D., Ploeger, S., Amasheh, M., Fromm, A., Zeissig, S., Troeger, H., Richter, J., Bojarski, C., Schumann, M., Fromm, M. 2009. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 1165:294-300.
77. Simopoulos, A.P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 54:438-463.
78. Stenson, W.F., D. Cort, J. Rodgers, R. Burakoff, K. DeSchryver-Keckskemeti, T.L. Gramlich, and W. Beeken. 1992. Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Ann Intern Med* 116:609-614.
79. Stuber, E., and U.R. Folsch. 1999. [Gluten-sensitive enteropathy (sprue, celiac disease). Current aspects of epidemiology, diagnosis and therapy]. *Dtsch Med Wochenschr* 124:1462-1467.
80. Stuber, E., A. Von Freier, D. Marinescu, and U.R. Folsch. 1998. Involvement of OX40-OX40L interactions in the intestinal manifestations of the murine acute graft-versus-host disease. *Gastroenterology* 115:1205-1215.
81. Sturniolo, G.C., V. Di Leo, A. Ferronato, A. D'Odorico, and R. D'Inca. 2001. Zinc supplementation tightens "leaky gut" in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 7:94-98.
82. Sun, K., L.A. Welniak, A. Panoskaltis-Mortari, M.J. O'Shaughnessy, H. Liu, I. Barao, W. Riordan, R. Sitcheran, C. Wysocki, J.S. Serody, B.R. Blazar, T.J. Sayers, and W.J. Murphy. 2004. Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-

-
- versus-tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:8120-5.
83. Takatsuka, H., Y. Takemoto, N. Iwata, A. Suehiro, T. Hamano, T. Okamoto, A. Kanamaru, and E. Kakishita. 2001. Oral eicosapentaenoic acid for complications of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28:769-774.
84. Takatsuka, H., Y. Takemoto, S. Yamada, T. Wakae, A. Mori, M. Okada, N. Iwata, T. Okamoto, A. Kanamaru, and E. Kakishita. 2002. Oral eicosapentaenoic acid for acute colonic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Drugs Exp Clin Res* 28:121-125.
85. Tien, M.T., S.E. Girardin, B. Regnault, L. Le Bourhis, M.A. Dillies, J.Y. Coppee, R. Bourdet-Sicard, P.J. Sansonetti, and T. Pedron. 2006. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 176:1228-1237.
86. Tomobe, Y.I., K. Morizawa, M. Tsuchida, H. Hibino, Y. Nakano, and Y. Tanaka. 2000. Dietary docosahexaenoic acid suppresses inflammation and immunoresponses in contact hypersensitivity reaction in mice. *Lipids* 35:61-69.
87. Tsuji, N.M., Kosaka, A. 2008. Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. *Trends Immunol.* 29:532-40.
88. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I. 2007. The human microbiome project. *Nature*. 449(7164):804-10.
89. Turner J.R. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 11:799-809.
90. Usami, M., T. Komurasaki, A. Hanada, K. Kinoshita, and A. Ohata. 2003. Effect of gamma-linolenic acid or docosahexaenoic acid on tight junction permeability in intestinal monolayer cells and their mechanism by protein kinase C activation and/or eicosanoid formation. *Nutrition* 19:150-156.

-
91. Usami, M., K. Muraki, M. Iwamoto, A. Ohata, E. Matsushita, and A. Miki. 2001. Effect of eicosapentaenoic acid (EPA) on tight junction permeability in intestinal monolayer cells. *Clin Nutr* 20:351-359.
 92. Vanderhoof, J.A., D.B. Whitney, D.L. Antonson, T.L. Hanner, J.V. Lupo, and R.J. Young. 1999. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 135:564-568.
 93. Wehkamp, J., Harder, J., Wehkamp, K., Wehkamp-von Meissner, B., Schlee, M., Enders, C., Sonnenborn, U., Nuding, S., Bengmark, S., Fellermann, K., Schröder, J.M., Stange, E.F. 2004. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect Immun.* 72:5750-8.
 94. Williamson, E., P. Garside, J.A. Bradley, and A.M. Mowat. 1996. IL-12 is a central mediator of acute graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 157:689-699.
 95. Wu, X.T., J.S. Li, X.F. Zhao, N. Li, Y.K. Ma, W. Zhuang, Y. Zhou, and G. Yang. 2003. Effects of n-3 fatty acid, fructose-1,6-diphosphate and glutamine on mucosal cell proliferation and apoptosis of small bowel graft after transplantation in rats. *World J Gastroenterol* 9:1323-1326.
 96. Wyatt, J., G. Oberhuber, S. Pongratz, A. Puspok, G. Moser, G. Novacek, H. Lochs, and H. Vogelsang. 1997. Increased gastric and intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 92:1891-1896.
 97. Wyatt, J., H. Vogelsang, W. Hubl, T. Waldhoer, and H. Lochs. 1993. Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 341:1437-1439.
 98. Yang, D., O. Chertov, S.N. Bykovskaia, Q. Chen, M.J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J.M. Schroder, J.M. Wang, O.M. Howard, and J.J. Oppenheim. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 286:525-8.

7 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt zuerst meinem Doktorvater und Betreuer dieser Arbeit PD Dr. med. Eckhard Stüber, wissenschaftlicher Leiter des Labors für *Gastroenterologische Immunologie*, der mir das Thema dieser Dissertation nahe brachte und mich bei der Durchführung der Experimente hervorragend betreute. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und war durch sein großes Engagement maßgeblich am Fortgang dieser Arbeit beteiligt.

Auch sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Maren Dirks für die Einführung in die Methoden der Gefrierschnittpräparateherstellung und für die Unterstützung bei der Laborarbeit, insbesondere im Umgang mit den Mäusen.

Weiterhin danke ich Herrn Edward Woda für die Verarbeitung der Blutseren für die Blutzuckermessungen.

Allen Mitarbeitern des Labors danke ich für die freundliche Aufnahme, Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der Durchführung meiner Experimente.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie für ihre unermüdliche Unterstützung und Ermunterung bedanken, die als antreibende Kraft zum Vollenden dieser Arbeit sehr förderlich war.

8 Lebenslauf

Am 9. August 1975 wurde ich, Annette Renate Gertrud Girardet, als viertes von sechs Kindern des Verlegers Dr. Paul Girardet und seiner Ehefrau Eva-Maria Girardet, geb. Hackl, in Essen geboren.

Von 1982 bis 1995 besuchte ich die Freie Waldorfschule in Essen, die ich 1995 mit dem Abitur abschloss. Nach Beendigung der Schulausbildung absolvierte ich ein freiwilliges soziales Jahr in Kapstadt, Süd-Afrika, wo ich mit geistig behinderten Erwachsenen arbeitete. Anschließend machte ich eine einjährige Ausbildung zur Krankenpflegehelferin an den Kliniken Essen-Süd in Essen. Während der halbjährigen Überbrückungszeit bis zum Beginn des Studiums arbeitete ich ehrenamtlich in einem Hospiz in Essen.

Im April 1998 begann ich mein Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Im Jahr 2000 bestand ich das Physikum und wechselte an die Christian Albrecht-Universität zu Kiel, wo ich 2001 das erste Staatsexamen, 2003 das zweite Staatsexamen und 2004 das dritte Staatsexamen ablegte.

Während des Studiums begann ich mit der Arbeit für die vorliegende Dissertation. Die Experimente im Labor habe ich von August 2001 bis Oktober 2002 durchgeführt.

Im Februar 2005 trat ich meine erste Stelle als Assistenzärztin in der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel, an.