

Aus der Abteilung für Gastroenterologie des Zentrums für Innere Medizin

Direktor: Prof. Dr. med. Hans Georg Lamprecht

# **Der Einfluss Kolostrums und kolostraler Bestandteile auf die DSS-induzierte Kolitis im Mausmodell**



**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von:

Elisabeth Engberink

aus Rostock

Rostock, 2014

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter:

Prof. Dr. Claus Kerkhoff

Fachbereich Humanwissenschaften, Universität Osnabrück

2. Gutachter:

Prof. Dr. Robert Jaster

Klinik für Innere Medizin II, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. Karin Hengst

Medizinische Klinik B, Universitätsklinikum Münster

Datum der Einreichung: 18. November 2014

Datum der Verteidigung: 20. Oktober 2015



# INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG .....	4
1.1.	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen .....	4
1.1.1.	Epidemiologie.....	4
1.1.2.	Klinik und Diagnostik .....	4
1.1.3.	Pathogenese .....	6
1.1.4.	Therapie und Remissionserhalt der Colitis ulcerosa .....	7
1.2.	Der Darm .....	8
1.2.1.	Der Aufbau des Darms .....	8
1.2.2.	Das darmassoziierte Immunsystem .....	9
1.3.	Tierexperimentelle Modelle chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.....	13
1.3.1.	Chemisch-induzierte Modelle.....	14
1.3.2.	Genetische Modelle .....	15
1.3.3.	Immunologische Modelle .....	15
1.4.	Kolostrum und seine Einzelkomponenten.....	16
2.	MATERIALIEN.....	18
2.1.	Verwendete Chemikalien .....	18
2.2.	Puffer und Lösungen .....	18
2.3.	Antikörper.....	19
2.4.	Verbrauchsmaterialien.....	19
2.5.	Geräte.....	20
2.6.	Sonstiges.....	20
3.	METHODEN.....	21
3.1.	Versuchstiere .....	21
3.2.	Versuchsaufbau .....	21
3.2.1.	Therapeutischer Ansatz .....	21
3.2.2.	Prophylaktischer Ansatz .....	22
3.3.	Verwendete Methoden.....	22
3.3.1.	Gewichtsmessung .....	22
3.3.2.	Bestimmung des klinischen Disease Activity Index .....	23
3.3.3.	Ablauf der Organentnahme .....	24
3.3.4.	Leukozytenisolierung und Fluoreszenzmarkierung.....	25
3.3.5.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Kolons .....	26
3.3.6.	Immunhistochemische Färbung.....	27

3.3.7.	Durchflusszytometrie.....	28
3.3.8.	Statistik.....	29
4.	ERGEBNISSE.....	30
4.1.	Therapeutischer Ansatz.....	30
4.1.1.	Gewichtsverlust.....	31
4.1.2.	Klinischer Disease Activity Index.....	33
4.1.3.	Kolonlänge.....	35
4.1.4.	Histologie.....	36
4.1.5.	Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie.....	40
4.2.	Prophylaktischer Ansatz.....	43
4.2.1.	Gewichtsverlauf.....	44
4.2.2.	Klinischer Disease Activity Index.....	46
4.2.3.	Kolonlänge.....	48
4.2.4.	Histologie.....	48
4.2.5.	Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie.....	52
4.2.6.	Immunhistochemie.....	56
5.	DISKUSSION.....	58
5.1.	Tiermodelle zur Analyse der CED-Therapie und -Prophylaxe.....	58
5.2.	Effekte durch die Induktion der Kolitis.....	60
5.3.	Effekte von Kolostrum und seinen Komponenten im therapeutischen Ansatz.....	62
5.4.	Effekte von Kolostrum und seinen Komponenten im prophylaktischen Ansatz.....	64
5.5.	Vergleich des therapeutischen und prophylaktischen Ansatzes.....	67
5.6.	Einordnung der Ergebnisse in aktuelle Untersuchungen zu traditioneller und komplementärer Therapie.....	68
5.7.	Ausblick.....	69
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	71
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	73
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	81
9.	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	83
10.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	85
11.	DANKSAGUNG.....	86
12.	THESEN.....	87

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) stellen zwei Formen der schubweise verlaufenden chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) dar, die sich durch eine massive Infiltration von Leukozyten in die Mukosa und Submukosa auszeichnen.

### 1.1.1. Epidemiologie

Etwa 168.000 bzw. 320.000 Personen in Deutschland leiden an Colitis ulcerosa bzw. Morbus Crohn. Die Inzidenz liegt bei 3 bis 7 Fällen pro 100.000 Einwohnern für die CU und 7 bis 8 pro 100.000 Einwohnern für den MC in Deutschland [1]. Weltweit liegen die Inzidenzraten bei 0,5 bis 24,5 pro 100.000 Einwohner (CU) bzw. 0,1 bis 11 pro 100.000 Einwohner (MC) [2]. Dabei weisen Nord- und Westeuropa sowie Nordamerika die höchsten Zahlen auf. Die Colitis ulcerosa kann prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten, zeigt aber einen Erkrankungsgipfel im 25 bis 34 Lebensjahr, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen [3]. Der Morbus Crohn tritt im Schnitt 10 Jahre früher auf, wobei die Inzidenz in der Altersgruppe von 15 bis 34 Jahren für Frauen etwas höher ist als für Männer [3].

### 1.1.2. Klinik und Diagnostik

Die Colitis ulcerosa ist eine im Wesentlichen auf die Mukosa des Kolons beschränkte Entzündung der Darmschleimhaut. Dabei kommt es im Krankheitsverlauf zu einer kontinuierlichen Ausbreitung der Erkrankung im Darm, welche in der Regel im Rektum beginnt. Der Kolitispatient fällt typischerweise durch blutig-schleimige Durchfälle auf, welche auch in der Nacht persistieren. Dabei sind mehr als 20 Stuhlgänge pro Tag möglich. Krampfartige Schmerzen mit charakteristischer Lokalisation im linken Unterbauch begleiten die Durchfälle. Des Weiteren treten Anämie und Gewichtsabnahme als Folgen des anhaltenden Blut- und Nährstoffverlustes über den Darm auf. Begleitend zu dieser Symptomatik kann sich die Erkrankung auch extraintestinal z.B. in Form von Arthralgien, Pyodermien, Pankreatitiden oder Konjunktivitiden manifestieren. Zu den schwerwiegenden Komplikationen der Colitis ulcerosa gehören das toxische Megakolon, die primär sklerosierende Cholangitis und das Kolonkarzinom.

Der Morbus Crohn ist in seiner Ausbreitung nicht auf das Kolon beschränkt, sondern kann den gesamten Magen-Darm-Trakt befallen. Ein diskontinuierlicher Befall ist dabei typisch. Erste Symptome sind meist Bauchschmerzen mit gehäuft auftretenden Durchfällen, welche auch blutig sein können. Zu den charakteristischen Komplikationen zählen Strikturen, Fisteln und Abszesse des Magen-Darm-Traktes.

Ein erster Verdacht auf das Vorliegen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung durch die Präsentation der typischen Symptome sollte immer durch weitere diagnostische Maßnahmen gesichert werden. Die Abgrenzung zu infektionsbedingten Durchfällen ist wichtig, weil therapie relevant. Im Patientenstuhl können verschiedene Krankheitserreger nachgewiesen werden; dazu werden Kulturen angelegt oder Ausstriche angefertigt. Im schweren entzündlichen Krankheitsschub sollte möglichst auf eine endoskopische Diagnostik verzichtet werden; sie ist aber im weiteren Verlauf unerlässlich. Die Ileokoloskopie ermöglicht sowohl die makroskopische Beurteilung der Darmschleimhaut als auch die Entnahme von Biopsiepräparaten zur histopathologischen Begutachtung.

Bei CU-Patienten zeigt die betroffene Darmschleimhaut in der Endoskopie ödematöse und erythematöse Veränderungen, welche sich kontinuierlich vom Rektum her ausbreiten. Sie ist zudem von sandpapierartiger Granularität. Zunehmend konfluierende Ulzerationen zeigen ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium an. Die physiologische Gefäßzeichnung und Haustrierung der Kolonschleimhaut ist nicht mehr erkennbar und es kommt zu einer Darmverkürzung. Die Mukosa ist sehr empfindlich und blutet bereits spontan oder durch leichte Berührung. Durch die rezidivierenden Entzündungen kommt es zunehmend zu sichtbaren Verwachsungen und unpassierbaren Stenosen. Die sich immer wieder regenerierende Schleimhaut kann Ausgangspunkt für maligne Entartungen sein. Bei der Beurteilung der Biopsiepräparate wird v. a. auf die Kryptenarchitektur, entzündliche Infiltrate und regenerative Epithelveränderungen geachtet. Die Entzündung beschränkt sich typischerweise auf Mukosa und Submukosa.

Im Gegensatz dazu ist die Ausbreitung der Entzündung beim MC diskontinuierlich, durch sogenannte Skip Lesions gekennzeichnet. Makroskopisch zeigen sich in der Endoskopie schneckenspurartige Ulzerationen und ein pflastersteinartiges Schleimhautrelief. Mikroskopisch ist ein transmuraler Befall der Wandschichten der Darmschleimhaut mit Entzündungszellen auffällig. Gelegentlich sind Granulome zu finden. Als Folge der immer wiederkehrenden Entzündungszustände kommt es bei schwereren Krankheitsverläufen des Morbus Crohn häufig zur Bildung von Fistelgängen und Abszesshöhlen. [4] [5] [6] [7] [8]

### 1.1.3. Pathogenese

Die Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen konnte bislang noch nicht zufriedenstellend geklärt werden. Neben einer genetischen Prädisposition werden der Einfluss von Umweltfaktoren, eine fehlregulierte Immunantwort, der Einfluss von Bakterien sowie eine veränderte epitheliale Barrierefunktion des Gastrointestinaltrakts als Ursachen der CED diskutiert.

Halme et al. [9] untersuchten in mehreren Familien- und Zwillingsstudien die familiäre Häufung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Dabei zeigte sich, dass die Verwandtschaft mit einem CED-Erkrankten ein starker Risikofaktor für die Entwicklung einer eigenen CED ist. Die Wahrscheinlichkeit für Kinder zweier CED-Patienten selbst zu erkranken, liegt bei über 30 %. In Zwillingsstudien von Tysk et al. [10] wiesen eineiige Zwillinge ein bis zu 50%iges Risiko für die Entwicklung eines Morbus Crohn auf, wenn das Geschwisterkind von der Erkrankung bereits betroffen war. Insgesamt ist das genetische Risiko für eine Colitis ulcerosa-Erkrankung mit etwa 10 % für eineiige Zwillinge geringer als bei Morbus Crohn [10] [11].

Das erste Gen, welches mit einer Empfänglichkeit für CED in Zusammenhang gebracht wurde, war das sogenannte „Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2“ (NOD2) bzw. „Caspase Recruitment Domain-containing protein 15“ (CARD15) auf Chromosom 16 [12]. Etwa 30 % der Morbus Crohn- und 6 % der Colitis ulcerosa-Patienten weisen hier Mutationen auf. Mittlerweile wurde für eine Vielzahl von Genen auf fast allen Chromosomen des Menschen ein gehäuftes Auftreten von Mutationen bei CED postuliert. Zu nennen sind hier neben NOD2/CARD15 vor allem die Regionen IBD2 auf Chromosom 12 für Colitis ulcerosa [13] und IBD3 auf Chromosom 6 [14], welche den Bereich des „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) mit einschließt.

Für den Einfluss von Umweltfaktoren spricht zum einen die geografisch unterschiedliche Verteilung der CED-Inzidenz. Zum anderen beobachtet man eine steigende Zahl an Neuerkrankungen in den sich dem westlichen Lebensstandard annähernden Ländern. Für den Morbus Crohn zeigten Gent et al. einen Zusammenhang zwischen Erkrankung und frühkindlicher Hygiene [15]. Ihre Studie zeigte ein erhöhtes relatives Risiko an Morbus Crohn zu erkranken, wenn in der Kindheit heißes Wasser und eine separate Toilette verfügbar waren. Auch der Zusammenhang von Rauchen und CED wurde mehrfach untersucht. Seit längerem

ist bekannt, dass Raucher ein höheres Risiko für eine MC-Erkrankung aufweisen. Dagegen ist ihr Risiko für eine CU-Erkrankung geringer als bei Nicht-Rauchern [16].

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen werden auch als Ausdruck eines gestörten Gleichgewichts der pro- und antiinflammatorischen Mechanismen des Darmimmunsystems gesehen. Dabei zeigt sich beim Morbus Crohn eine verstärkte Ausschüttung entzündungsfördernder Mediatoren, wie  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$  und IL-12, durch Th1-Zellen [17]. Dagegen zeichnet sich die Colitis ulcerosa durch eine atypische Th2-Antwort aus [18].

#### 1.1.4. Therapie und Remissionserhalt der Colitis ulcerosa

Im Mittelpunkt der CU-Therapie stehen verschiedene Möglichkeiten der Immunsuppression. Je nach Befallsmuster kommt im akuten Schub der Erkrankung die orale und/oder rektale Applikation von Aminosalizylaten zum Einsatz. Alternativ wird bei Therapieversagen die orale Steroidtherapie erwogen. Für eine schmerzadaptierte Analgesie empfehlen sich Metamizol oder Opioidpräparate. Im Falle eines schweren Krankheitsschubes, definiert z.B. nach Truelove & Witts [19] (siehe Abbildung 1), kommt es zum Einsatz einer intravenösen Steroidtherapie. Ist dies nicht möglich, können alternativ Infliximab, Cyclosporin oder Tacrolimus eingesetzt werden. Ein schwerer Entzündungsschub sollte in jedem Fall stationär behandelt werden. Sind alle medikamentösen Therapieoptionen ausgeschöpft, sollte eine chirurgische Therapie erwogen werden. Sie besteht aus einer Proktokolektomie mit ileoanaler Pouchanlage und stellt zur Zeit die einzige Option für eine definitive Heilung der Erkrankung dar. [6]

- › schwere Diarrhöen mit  $\geq 6$  blutigen Stühlen pro Tag
- › Fieber (eine mittlere Abendtemperatur von  $> 37,5$  °C oder  $> 37,8$  °C an wenigstens 2 von 4 Tagen)
- › Tachykardie mit einem Puls  $> 90/\text{min}$
- › Anämie mit einem Hb-Wert  $< 75$  % der Norm
- › BSG  $> 30$  mm/h

**Abbildung 1:** Kriterien des schweren Schubes einer Colitis ulcerosa nach Truelove & Witts [19]

Kommt es zur Remission der Erkrankung, wird durch eine weiterführende Therapie der Remissionserhalt angestrebt. Die klinische Remission lässt sich als Abwesenheit von Durchfällen, blutigen Stühlen und weiterer intestinaler oder extraintestinaler Beschwerden

definieren. Zum Remissionserhalt eignen sich vorrangig Aminosalizylate [20] [21]. Nach zwei Jahren kann ein Auslassversuch unternommen werden. Als Therapiealternative können Infliximab oder eine Kombination aus Azathioprin und 6-Mercaptopurin eingesetzt werden. Bei Aminosalizylatunverträglichkeit wird auch die Gabe des E. coli Stamm Nissle [22] [23] oder bei Kindern des Milchsäure- und Bifidobakterienpräparates VSL#3 [24] zum Remissionserhalt empfohlen.

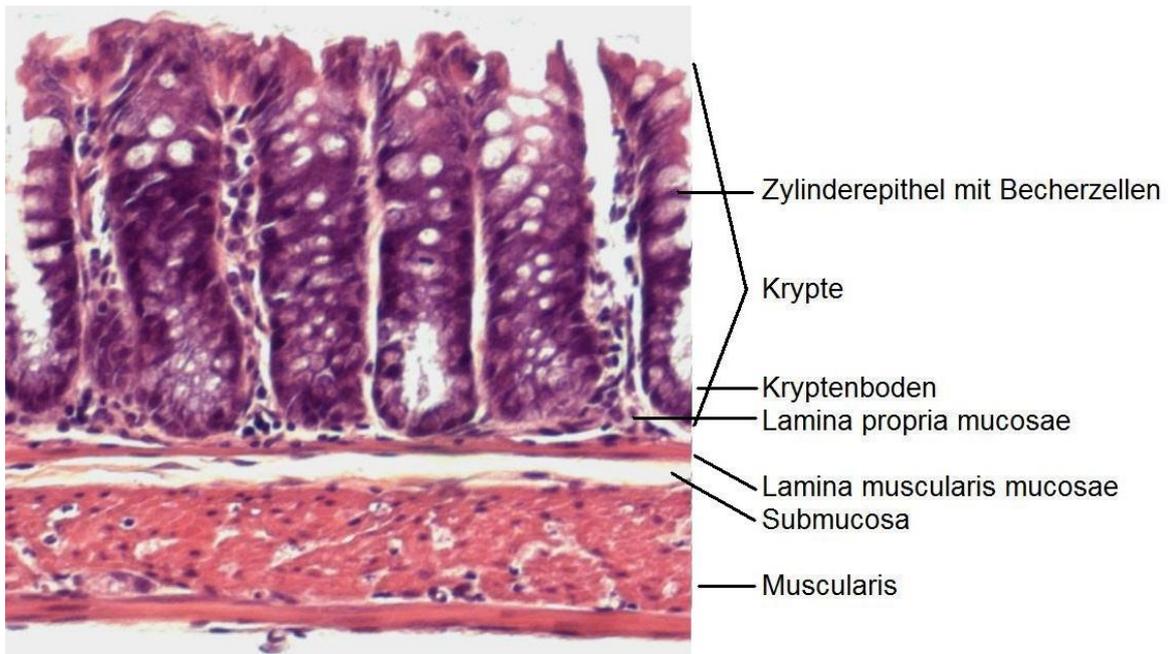
## **1.2. Der Darm**

### 1.2.1. Der Aufbau des Darms

Der menschliche Darm verfügt über eine Kontaktfläche mit unserer Umwelt von bis zu 500 m<sup>2</sup>. Er reicht mit einer Länge von 8 m vom Magenausgang bis zum Anus und ist in Dünndarm und Dickdarm unterteilt. Dabei lässt sich der Dünndarm wiederum in Duodenum, Jejunum und Ileum gliedern. Die Ileozökalklappe bildet die Grenze zum Dickdarm.

Der Dickdarm des Menschen erreicht eine Länge von etwa 150 cm. Er schließt sich im rechten Unterbauch dem terminalen Ileum an und reicht bis zum Anus. Von proximal nach distal lassen die Abschnitte Zäkum, aufsteigendes Kolon, Querkolon, absteigendes Kolon, Sigmoid und Rektum unterscheiden. Zu den Funktionen des Dickdarms gehören die Wasser- und Elektrolytresorption, Muzinproduktion und die immunologische Auseinandersetzung mit Nahrungsbestandteilen und Darmflora. Außerdem dient das Rektum als Stuhlreservoir.

Abbildung 2 zeigt den histologischen Aufbau der Darmwand. Der Dickdarm ist mit einem Zylinderepithel ausgekleidet, welches etwa 1 mm tiefe Krypten bildet. Am Kryptenboden befindet sich die Wachstumszone für die Epithelzellen. Das Zylinderepithel ist zusätzlich mit Mikrovilli besetzt, sodass der Dickdarm dadurch eine Oberfläche von etwa 120 m<sup>2</sup> erreicht. In der Epithelzellschicht befinden sich Muzin produzierende Becherzellen. Unterhalb des Zylinderepithels befindet sich eine zarte Bindegewebsschicht, die Lamina propria mucosae, welche auch zwischen die einzelnen Krypten reicht. Es folgt die Lamina muscularis mucosae, eine dünne Schicht glatter Muskulatur. Die bisher beschriebenen Gewebeschichten bilden zusammen die Mukosa, an die sich die Submukosa anschließt. In dieser sind solitäre Lymphfollikel zu finden. Darunter befindet sich wiederum die aus einer zirkulären und einer longitudinalen Schicht bestehende Muscularis, welche für den Weitertransport des Darminhalts verantwortlich ist.



**Abbildung 2:** Aufbau der Darmwand

Das Kolon und terminale Ileum müssen sich neben den mit der Nahrung aufgenommenen Antigenen auch mit einer Vielzahl von Bakterienantigenen auseinandersetzen, da die Konzentration der Mikroorganismen mit  $10^{13}$  bis  $10^{14}$  hier außerordentlich hoch ist. Trotz massiver Antigenexposition kommt es nicht zu einer symptomatischen Immunreaktionen. Die Aufrechterhaltung dieser Toleranz gegenüber physiologischen Antigenen setzt eine vom intestinalen Milieu gesteuerte komplexe Wechselwirkung zwischen luminalen Faktoren, intestinalen Epithelzellen und zellulären Komponenten des Mukosa-assoziierten Immunsystems voraus. Störungen dieses komplex regulierten Systems führen zu nicht physiologischen Immunantworten und damit zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. [25] [26] [27]

### 1.2.2. Das darmassoziierte Immunsystem

Die Barrierefunktion des Darms wird sowohl durch unspezifische, also nichtimmunologische, Abwehrmechanismen als auch durch ein hochspezialisiertes lokales Immunsystem, das darmassoziierte Immunsystem (GALT, "Gut Associated Lymphoid Tissue"), aufrechterhalten. Zum GALT gehören die Lymphfollikel und Peyer-Plaques des Dünndarms sowie die in der Lamina propria und als intraepitheliale Lymphozyten zwischen den Epithelzellen vorkommenden freien immunkompetenten Zellen. Das darmassoziierte Immunsystem enthält etwa die Hälfte aller im menschlichen Körper vorkommenden lymphatischen Zellen und ist damit unser größtes lymphatisches Organ.

Die unter anderem im Dünndarm und Wurmfortsatz des Zäkum vorkommenden **Peyer-Plaques** stellen eine wichtige histologische Struktur des darmassoziierten Immunsystems dar. Vom Darmlumen aus erscheinen sie als Vorwölbungen der Schleimhaut. Die typische Kryptenarchitektur ist an diesen Stellen aufgehoben. Die Peyer-Plaques sind Konglomerate aus mehreren Lymphfollikeln, welche von der Lamina propria mucosae bis in die Submukosa reichen. Der Aufbau der hier befindlichen Follikel entspricht denen der Lymphknoten. Die zum Lumen hin gerichtete kuppelförmige Vorwölbung wird als sogenanntes Dom-Areal bezeichnet. Sie wird durch eine Ansammlung von B- und T-Lymphozyten und Makrophagen in den Peyer-Plaques hervorgerufen.

Das Oberflächenepithel über den Peyer-Plaques wird als Follikel-assoziiertes Epithel (FAE) bezeichnet und besteht zum Teil aus sogenannten Mikrofalten-Zellen (**M-Zellen**). In den Einstülpungen ihrer basolateralen Membran beherbergen sie vor allem Lymphozyten und Makrophagen. Die M-Zellen dienen dem aktiven Antigentransport vom Darmlumen in die darunter gelegenen Lymphfollikel. Durch ihre Fähigkeit zur Endo- und Transzytose von Makromolekülen stellen sie auch eine Eintrittspforte für verschiedene Krankheitserreger dar. Aufgenommene Antigene werden unprozessiert durch die Zellen geschleust und von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie Makrophagen und dendritischen Zellen, den Lymphozyten der Peyer-Plaques präsentiert. Die B-Lymphozyten beginnen daraufhin mit der Antikörperproduktion und zwar hauptsächlich von Immunglobulin A (IgA), dessen Anteil an der Gesamtproduktion sich auf etwa 80 % beläuft.

Die Differenzierung der **B-Lymphozyten** erfolgt bereits im Knochenmark, d.h. noch vor dem ersten Kontakt mit einem Antigen. Durch die Transkription verschiedener Gensegmente in Kombination mit zufälligen Mutationen ist die B-Zelle in der Lage genau einen von ca.  $10^{10}$  möglichen Antikörpern zu produzieren. Dieses Immunglobulin kann als membranständiger B-Zell-Rezeptor in direkten Kontakt mit dem passenden Antigen treten, woraufhin sich der Lymphozyt rasch vermehrt und zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle entwickelt. Eine Prozessierung und Präsentation antigener Bestandteile durch andere Zellen auf deren Oberfläche ist zur Aktivierung nicht notwendig. Die klonale Expansion der B-Zellen kann durch das T-Zell-System gesteigert oder supprimiert werden. Zusätzlich kommt es zur Bildung sogenannter Gedächtniszellen. Bei erneutem Antigenkontakt können diese langlebigen B-Zellen eine rasche sekundäre Immunantwort einleiten.

Zwischen den Epithelzellen am Grund der Darmkrypten sind **Paneth-Zellen** zu finden. Sie gelten als wichtige Expressoren von NOD2 und sind verantwortlich für die Produktion von Defensinen, Lysozym und Phospholipase A2, welche antimikrobiell wirken.

Die Antigenpräsentation im Darm wird von **dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen** übernommen. Dies erfolgt über den bereits erwähnten MHC. Die dendritischen Zellen stehen durch ihre ausgezogenen Zellfortsätze in engem Kontakt zum Oberflächenepithel. Sie sind in der Lage, weitaus mehr MHC-Moleküle zu exprimieren als andere Antigenpräsentierende Zellen. Durch die Präsentation der Antigene und eine zusätzliche Freisetzung stimulierender Zytokine kommt es zu einer T-Zell-Aktivierung. Reife dendritische Zellen besitzen die Oberflächenmarker CD11b und CD83.

Die **T-Zell-Populationen** lassen sich wiederum nach ihrem Antigenexpressionsprofil weiter unterteilen. Es werden CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen unterschieden, welche unterschiedliche MHC-Moleküle mit Hilfe ihrer Oberflächenrezeptoren erkennen. Dabei interagiert der CD4-Rezeptor mit MHC-II- und der CD8-Rezeptor mit MHC-I-Molekülen. Die zytotoxischen T-Zellen werden dadurch direkt zur Ausschüttung zellschädigender Substanzen angeregt. Die T-Helferzellen reagieren durch die Ausschüttung von Botenstoffen. Durch die Art der freigesetzten Zytokine lassen sich wiederum Th1- und Th2-Zellen unterscheiden. Die Th1-Antwort ist durch die proinflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und IL-12 gekennzeichnet. Th2-Zellen sezernieren vorrangig IL-4 und IL-10, welche antiinflammatorisch wirken. Durch die sezernierten Interleukine kommt es zwischen den Th1- und Th2-Zellen zur reziproken Hemmung der Differenzierung zur jeweils anderen Zelllinie. Daneben existieren des Weiteren regulatorische T-Zellen, welche etwa 10 % der CD4<sup>+</sup> Zellen ausmachen und durch die Produktion von IL-10 und TGF $\beta$  regulierend auf das Gleichgewicht des Darmimmunsystems wirken. Sie haben die Fähigkeit, andere Immunzellreaktionen zu unterdrücken, wobei diese Mechanismen noch nicht ausreichend erforscht sind. Ihre verminderte Aktivierung oder Anzahl könnte zur Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen beitragen. Kennzeichnend für die regulatorischen T-Zellen sind die Oberflächenmarker CD25 und CD62L. Als vierte Subpopulation der CD4<sup>+</sup> Zellen sind die Th17-Zellen zu nennen, welche sich durch die Produktion des proinflammatorisch wirkenden IL-17 auszeichnen. Ihre Zahl ist im Serum und Darmgewebe von CED-Patienten erhöht.

Innerhalb der T-Zell-Population lassen sich nach Art des T-Zell-Rezeptors  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma/\delta$ -T-Zellen unterscheiden. Im gesamten Körper dominieren hierbei mit mehr als 90 % die Zellen mit  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptoren. Allerdings sind die  $\gamma/\delta$ -T-Zellen verstärkt im Darm zu finden und machen einen nicht unbedeutenden Teil der IEL aus. Die  $\gamma/\delta$ -T-Zellen zeichnen sich durch eine relativ geringe Rezeptorvielfalt aus. Ihre Aktivierung erfolgt MHC-unabhängig, weshalb ihre Abwehrreaktion gegen Mikroorganismen breiter gefächert ausfallen kann. Es wird vermutet, dass sie Teil des früh wirksamen nichtadaptiven Immunsystems sind. Zudem werden ihnen regulatorische Funktionen zugeschrieben.

Zum GALT gehören ebenfalls die **Lamina propria Lymphozyten** (LPL) und die **intraepithelialen Lymphozyten** (IEL). Die Fähigkeit zur klonalen Expansion nach TCR/CD3-Stimulation ist bei den LPL stark eingeschränkt [28]. Bedingt ist dies vermutlich durch ihre kontinuierliche Stimulierung in vivo unter physiologischen Bedingungen, welche sich anhand einer vermehrten Expression von CD69 und CD45R0 zeigt [29]. Auch ein verminderter Glutathiongehalt der Lymphozyten wird als Ursache für eine geringe Unterstützung der adaptiven Immunabwehr durch die LPL postuliert [30]. Die intraepithelialen Lymphozyten liegen zwischen den Epithelzellen der Darmschleimhaut, wobei auf 6-10 Epithelzellen ein IEL kommt. Sie haben dabei Kontakt mit der Basalmembran, welche das Epithel und die Lamina propria trennt. Genau wie bei den LPL ist die genaue Funktion der IEL noch nicht bekannt. Ihnen wird aber ein entscheidender Beitrag bei der Ausführung der Aufgaben des mukosalen Immunsystems zugesprochen. Beide Lymphozytenpopulationen bestehen überwiegend aus T-Zellen. Bei den IEL machen die überwiegend auftretenden  $CD8^+$   $\alpha\beta$ -T-Zellen einen Anteil von 70-85 % der T-Zellen aus. 15-30 % sind  $\gamma\delta$ -T-Zellen, welche aus  $CD4^-/CD8^-$  und  $CD4^-/CD8^+$  Subpopulationen bestehen. Ein großer Teil der  $\alpha\beta$ -IEL sind  $CD45R0^+$  Gedächtniszellen.

Bei der Suche nach Regulationsmechanismen der Immunantwort während akuter und chronischer Entzündungen fallen die sogenannten **Myeloid-derived suppressor cells** (MDSC) auf. Sie sind durch die Oberflächenmarker 11b und Gr1 gekennzeichnet und werden zur Vermeidung einer Überstimulation des Immunsystems vom Knochenmark freigesetzt. Haile et al. stellten in einem Kotransfer-Modell mit MDSC deren immunregulatorische Bedeutung im Rahmen intestinaler Entzündungen dar [31]. Bodammer et al. konnten einen Anstieg von  $11b^+/Gr1^+$  Splenozyten durch die prophylaktische Gabe von Kolostrum an Mäuse mit DSS-induzierter Kolitis nachweisen [32].

Das **sekretorische IgA** (sIgA) übernimmt eine wichtige Schutzfunktion an der gastrointestinalen Barriere. Es agglutiniert hochmolekulare Antigene, vermindert durch seine Bindung die Adhärenz von Bakterien und antigenen Nahrungsbestandteilen an die Epithelzellen und fördert den Abtransport von Fremdstoffen durch die Peristaltik. Diese lokale Immunantwort des GALT geht einher mit der Ausbildung einer systemischen Toleranz durch Förderung IgA-produzierender B-Lymphozyten bei gleichzeitiger Unterdrückung der Produktion von Immunglobulinen anderer Klassen. So kann verhindert werden, dass die Aufnahme von ungefährlichen hochmolekularen Nahrungsbestandteilen zu einer verfehlten systemischen Reaktion führt.

Im menschlichen Körper weist das sIgA die höchste Produktionsrate noch vor IgG auf. Es wird von den Immunzellen der Schleimhäute produziert und spielt, wie oben dargestellt, eine wichtige Rolle bei der Neutralisation von Antigenen. Insbesondere werden pathogene Mikroorganismen, welche sich auf Körperoberflächen befinden, eliminiert.

Seine Produktion wird durch die transzytotische Aufnahme von luminalen Antigenen über die M-Zellen der Peyer-Plaques initiiert. Ebenfalls in den Peyer-Plaques befindliche T- und B-Lymphozyten werden durch die Antigenpräsentation zur Interaktion angeregt und wandern über mesenteriale Lymphknotenstationen in das Blut und von dort durch Homing-Prozesse weiter in die Lamina propria des Darmepithels. Hier findet dann die Produktion von sekretorischem IgA durch Plasmazellen statt. Auf der basolateralen Seite des Kolonepithels bindet das Dimer an den polymeren Immunglobulinrezeptor (pIgR) und gelangt durch Transzytose auf die luminal Seite. Die extrazelluläre pIgR-Komponente wird hier abgespalten und ist als „secretory component“ (SC) Teil des sekretorischen IgA. sIgA steht nun im Darmlumen für die Antigenneutralisation zu Verfügung. Es ist mit Hilfe der SC vor der proteolytischen Spaltung durch die Darmenzyme geschützt.

### **1.3. Tierexperimentelle Modelle chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen**

Die Verwendung von Kolitis-Tiermodellen ist ein wichtiger Bestandteil der Erforschung von Pathogenese und Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Dabei spiegelt sich die multifaktorielle Genese der Erkrankungen in der Unterschiedlichkeit der Tiermodelle wider. Es werden chemische, genetische und immunologische Modelle zur Kolitisinduktion verwendet.

### 1.3.1. Chemisch-induzierte Modelle

Tiermodelle mit chemisch-induzierten Kolitiden zeichnen sich vor allem durch ihre gute Reproduzierbarkeit und einfache Handhabung aus. Meist kommt es in den verwendeten Modellen zu einer lokalen Schädigung des Darmepithels durch die Applikation toxischer Substanzen. An dieser Stelle sollen das in dieser Arbeit verwendete Modell der Kolitisinduktion mittels DSS (dextran sulfate sodium) sowie die Verwendung von TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid) näher erläutert werden.

1990 beschrieben Okayasu et al. erstmals die Verwendung von DSS zur Kolitisinduktion im Mausmodell [33]. Das Dextransulfat (MG: 36-50 kDa) wurde dazu in autoklaviertem Leitungswasser gelöst. Die Applikation einer 3-10%igen DSS-Lösung erfolgte für sieben Tage. Die so behandelten Tiere zeigten klinische Zeichen einer Kolitis wie Gewichtsverlust und blutige Durchfälle. Die Darmschädigung erfolgt hierbei weniger durch eine Modifikation der T-Zell-vermittelten Immunantwort, sondern vielmehr über die direkte Schädigung des Darmepithels. Daraus resultiert das Eindringen luminaler Antigene über die gestörte Darmbarriere. Bei der Aufarbeitung der Tiere fällt ein verkürztes, ödematös geschwollenes Kolon auf. Für die Quantifizierung klinischer und histologischer Veränderungen des Dickdarmgewebes existieren gut validierte Scores. Bei der Auswertung histologischer Darmpräparate sind Erosionen, entzündliche Infiltrate und Kryptenabszesse beschrieben worden. Das DSS-Kolitismodell eignet sich vor allem für die Testung neuer therapeutischer Substanzen. Die Induktion einer chronischen Kolitis ist durch die Applikation mehrerer DSS-Zyklen im Abstand von 1-3 Wochen möglich. Die wiederholten Entzündungen resultieren in der Entstehung epithelialer Dysplasien.

Erstmalig berichteten Neurath et al. 1995 von der Nutzung von TNBS zur Kolitisinduktion [34]. Die einmalige anale Applikation von 0,5 mg TNBS in 50%igem Ethanol führte zu deutlichen Diarrhöen und Gewichtsverlusten. Weiterhin kam es zu einer Hyperämie des Kolons und einer Splenomegalie. Dieses Modell einer Th1-vermittelten Immunantwort zeigt eine Infiltration des Kolons mit CD4<sup>+</sup> Zellen und eine vermehrte Produktion von INF $\gamma$ . Nicht jeder Mausstamm, darunter die verbreiteten C57Bl/6- und Balb/c-Stämme, eignet sich für dieses Kolitismodell. Die hohen TNBS-Dosen, welche zur Kolitisinduktion notwendig sind, führen zudem zu einer beträchtlichen Mortalitätsrate unter den Versuchstieren.

### 1.3.2. Genetische Modelle

Durch das Ausschalten (Knockout) einzelner Zytokingene kann deren Bedeutung bei der Pathogenese einer Erkrankung untersucht werden. Zu nennen sind hier das IL2- und IL10-Knockout-Modell. IL2<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln, wenn sie die zehnte Lebenswoche erreichen, zu 100 % Symptome einer CED-Erkrankung [35]. Dieses Modell eignet sich aufgrund hoher Mortalitätsraten weniger für pharmakologische Studien, lieferte aber bisher wichtige Erkenntnisse zum Verhalten verschiedener Lymphozytenpopulationen. IL10-defiziente Mäuse zeigen häufig eine chronische Enterokolitis, während unter keimfreien Bedingungen nur eine lokal begrenzte Entzündung des proximalen Kolons auftritt [36]. Die Entwicklung der Kolitis verläuft bei kommerziell erhältlichen Tieren eher langsam und ihre Ausprägung ist eher mild. Das Zusammenspiel von Genetik und Umweltfaktoren ist hier entscheidend für die Krankheitsentwicklung.

Neben dem Gen-Knockout konnte auch mit Hilfe des Gen-Transfers ein eigenes Kolitismodell entwickelt werden. HLA-B27- und  $\beta_2$ -Mikroglobulin-transgene Ratten entwickeln eine Entzündungsreaktion, welche auch den Darm betrifft [37].

1994 gelang Sundberg et al. zudem die Etablierung des C3H/HeJBir-Mausstammes [38]. Die Tiere dieses Inzuchtstammes entwickeln in der dritten bis sechsten Lebenswoche spontan eine Rechtsseitenkolitis. Das typische Krankheitsbild zeigt sich nur unter nicht keimfreien Bedingungen.

### 1.3.3. Immunologische Modelle

Die Übertragung von CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup> Zellen auf immundefiziente Mäuse (SCID, „severe combined immunodeficiency“) stellte das erste immunologische Tiermodell dar, bei dem es unter anderem zur Entwicklung einer Kolitis kam [39] [40]. Dieses Modell zeigt die Bedeutung regulatorischer T-Zellen, hat aber zum Nachteil, dass eine regelgerechte Lymphozytenzusammensetzung fehlt. Weiterhin ist die Krankheitsentstehung auch hier an das Vorhandensein einer nicht keimfreien Umgebung gebunden.

## 1.4. Kolostrum und seine Einzelkomponenten

Als Kolostrum wird die erste Muttermilch bezeichnet, welche innerhalb von 24 Stunden nach Geburt des Kindes gebildet wird. Sie unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung von der nachfolgenden Milch vor allem durch ihren hohen Gehalt an Immunglobulinen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen [41]. Das noch unreife Immunsystem des Neugeborenen kann in den ersten Lebenstagen noch keinen ausreichenden Schutz gegen enterale Pathogene gewährleisten. Die antimikrobiellen Substanzen der Erstmilch unterstützen die neonatale Immunabwehr. Durch die orale Aufnahme gelangen sie in den Gastrointestinaltrakt und bilden dort eine effektive Barriere gegen Antigene und Darmkeime.

Eine ausführliche Übersicht der Zusammensetzung von bovinem Kolostrum erstellten beispielsweise Abd El-Fattah et al. von der Milchviehrasse Holstein [42]. Sie konnten zeigen, dass der Gehalt an Fett und Proteinen, und damit auch Immunglobulinen und Lactoferrin, innerhalb von fünf Tagen stark abnimmt und den Wert herkömmlicher Kuhmilch erreicht, während der Laktosegehalt ansteigt. Dabei wird auf die vielfältigen Einflüsse auf die Zusammensetzung des Kolostrums hingewiesen wie z. B. Alter, Geburten, Ernährung und Gesundheit der Muttertiere. Weitere kolostrale Bestandteile sind Vitamine, Mineralien und Asche.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Rinderkolostrum stammt aus biozertifizierten Betrieben und wurde während des Verarbeitungsprozesses entfettet. Es wurde innerhalb von 12 bis 24 Stunden post partum gesammelt. Die genaue Zusammensetzung der Inhaltsstoffe wird durch den Hersteller, wie in Tabelle 1 dargestellt, angegeben.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung des verwendeten Kolostrums

<b>Inhaltsstoffe</b>	<b>Anteil</b>
Fett	< 2 %
Proteine, gesamt	60 – 70 %
sIgA	1,5 – 3,5 %
IgG	25 %
Lactoferrin	~ 0,1 %
Weitere Bestandteile: Laktose, Wachstumsfaktoren, Asche, Kreatin, Aminosäuren, Mineralien und Vitamine	

Khan et al. verglichen die kombinierte Gabe von 5-Aminosalicylsäure mit Kolostrum oder einem Placebo in einer klinischen Studie [43]. Es wurden 14 Patienten mit einer Linksseitenkolitis in die Studie eingeschlossen. Nach vier Wochen war eine signifikante Verbesserung des Symptomscores in der Kolostrumgruppe zu beobachten. Playford et al. zeigten positive Effekte der oralen Kolostrumgabe auf die Indomethacin-bedingte Darmschädigung im Tiermodell [44].

2011 untersuchten Bodammer et al. den Einfluss von prophylaktisch verabreichtem bovinem Kolostrum auf die DSS-induzierte Kolitis bei NMRI-Mäusen [32]. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen fanden sich bei den mit Kolostrum gefütterten Tieren ein signifikant geringerer Gewichtsverlust und eine verminderte Dickdarmverkürzung. Die histopathologische Untersuchung des Darms zeigte eine geringere Ausdehnung der Entzündung im Kolongewebe. Weiterhin wurde die  $\gamma/\delta$ -T-Zell-Population der Milz analysiert. Durch die Vorbehandlung mit Kolostrum kam es bei diesen Mäusen unter der Entzündung nicht zu einem Anstieg der  $\gamma/\delta$ -T-Zellen, wie es in den Kontrollgruppen der Fall war. Die Werte unterschieden sich außerdem nicht signifikant von denen un behandelter Tiere ohne Entzündung. Auch in den mesenterialen Lymphknoten sank die Zahl der  $\gamma/\delta$ -T-Zellen im Vergleich zu den Tieren, welche nur Wasser statt Kolostrum erhielten.

Lactoferrin ist ein eisenbindendes Protein, welches in Schleimhautsekreten und Neutrophilengranula nachweisbar ist. Durch seine Funktion als Protease ist es in der Lage, die Sekretion virulenter Proteine pathogener Darmbakterien zu stören. In bovinem Kolostrum ist es zu etwa 0,1 % enthalten. Seine antimikrobiellen und immunmodulierenden Eigenschaften konnten in tierexperimentellen Arbeiten von Haversen et al. [45] sowie Togawa et al. [46] [47] nachgewiesen werden. Die Anwendung erfolgte dabei therapeutisch im DSS-Kolitismodell der Maus bzw. prophylaktisch und therapeutisch im TNBS- und DSS-Kolitismodell der Ratte.

Herkunft und Bedeutung des sekretorischen IgA wurden in Kapitel 1.2.2 erläutert.

## 2. MATERIALIEN

### 2.1. Verwendete Chemikalien

Bovines Serumalbumin	Sigma
Dextran Sulfate Sodium, MG: 36–50 kDa	MP Biosciences
Ethanol 96,5 %, vergällt, steril filtriert	Appli Chem
Formafix 4 %	Grimm med. Logistik GmbH
IgA aus humanem Kolostrum	Sigma
IgG aus humanem Serum	Sigma
Ketamin 10 %	Medistar
Kolostrum, fest	Sanimalis
Kolostrum, flüssig	Sanimalis
Lactoferrin aus bovinem Kolostrum	Sigma
Leitungswasser, autoklaviert	
Methanol	J. T. Baker
NaCl 0,9 %	Braun
Narcoren	Merial
Rompun 2 % (Xylazin)	Bayer
Tissue-Tek	Sakura
Vectastain ABC-Kit	Biozol
Xylol	J. T. Baker

### 2.2. Puffer und Lösungen

BD FACSFlo <sub>w</sub> , FACS-Lysing Solution, 1:10 in A. dest.	BD Biosciences
Erylysepuffer, 0,16M NH <sub>4</sub> Cl + 0,17M Trisbase (1:10)	Merck
Hämalaun, 1:4 in A. dest.	Merck
PBS Waschpuffer 10x, 1:10 in A. dest., pH 7,4	Gibco
Trypanblau 0,4 %, 1:2 in PBS	Sigma

## 2.3. Antikörper

### *FACS-Antikörper*

CD3 hamster anti-mouse, FITC-konjugiert	Immunotools
CD4 rat anti-mouse, PE-konjugiert	Milteny Biotec
CD8 rat anti-mouse, PE-konjugiert	Milteny Biotec
CD11b rat anti-mouse, FITC-konjugiert	Milteny Biotec
CD11c hamster anti-mouse, FITC-konjugiert	Milteny Biotec
CD83 rat anti-mouse, PE-konjugiert	eBioscience
Gr1 rat anti-mouse, PE-konjugiert	Milteny Biotec
$\gamma/\delta$ TCR hamster anti-mouse, PE-konjugiert	Immunotools

### *Immunhistochemie-Antikörper*

CD4 rat anti-mouse	Immunotools
CD11c hamster anti-mouse	eBioscience
$\gamma/\delta$ TCR hamster anti-mouse	Immunotools

## 2.4. Verbrauchsmaterialien

Abdeckgläschen	Menzel-Gläser
BD Discardit II Einmalspritzen, steril 10 ml	BD Biosciences
BD Falcon Zellsieb 70 $\mu$ m, 100 $\mu$ m	BD Biosciences
Cellstar Einmalpipetten, steril 5 ml, 10 ml, 20 ml	Greiner Bio-One
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt
Feindosierungsspritze, 1 ml	Braun
Microvette, System zur Kapillarblutgewinnung	Sarstedt
Mullkompressen	Paul Hartmann AG
Objektträger, 76x26x1 mm	Marienfeld
Pipettenspitzen 10 $\mu$ l, 100 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l	Eppendorf
PP Tubes, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt

## 2.5. Geräte

BD FACSCalibur

Feinwaage

Kryostat CM 1850

Lineal

Mikroskop Axiophot

Neubauer Zählkammer

Präparierbesteck

Sterilwerkbank HERAsafe KS

Vortexer Unimag IR

Zentrifuge Avanti 30 Centrifuge

Zentrifuge Megafuge 1.0R

BD Biosciences

Sartorius

Leica

Zeiss

Brand

Kraut & Zimmermann

Thermo Scientific

UniEquip

Beckmann

Heraeus

## 2.6. Sonstiges

HemDetect Hämokkulttest

DIPROmed

## **3. METHODEN**

### **3.1. Versuchstiere**

Die Versuche wurden mit weiblichen NMRI-Mäusen (Harlan Winkelmann GmbH, Mellerslo NL) im Alter von acht bis zwölf Wochen durchgeführt. Die Tiere hatten bei Versuchsbeginn ein Durchschnittsgewicht von 30 g. Die Einteilung der Mäuse in die Versuchsgruppen erfolgte zufällig. Futter und Trinkwasser waren für die Tiere frei zugänglich. Die Genehmigung für die Tierversuche erteilte das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (Aktenzeichen: 2007/06/14; LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-059/08).

### **3.2. Versuchsaufbau**

Die Wirkung von bovinem Kolostrum auf die DSS-induzierte Kolitis wurde in zwei verschiedenen Versuchsansätzen getestet.

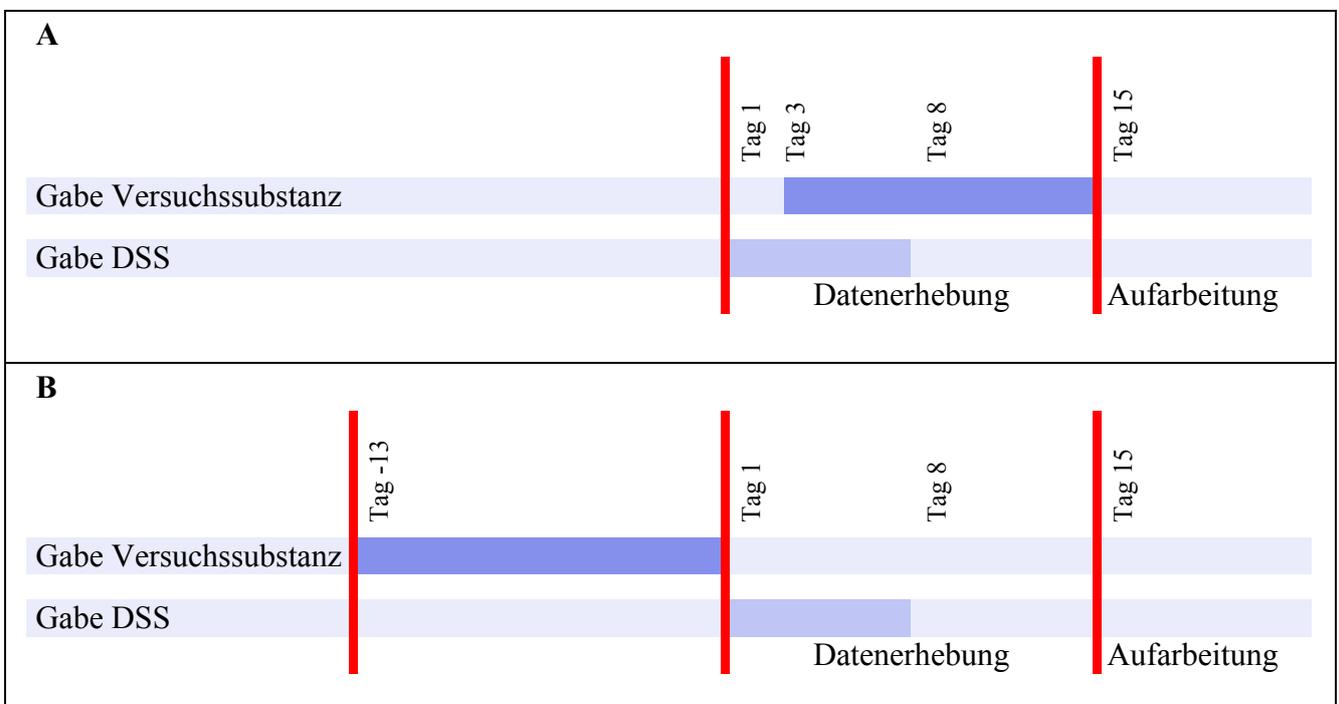
#### **3.2.1. Therapeutischer Ansatz**

Die Kolitisinduktion erfolgte nach Okayasu et al. 1990 [33]. Dazu wurden jeweils 5 g DSS in 100 ml autoklaviertem Leitungswasser gelöst. Ab Tag 1 wurde das Trinkwasser für sieben Tage durch eine 5%ige DSS-Lösung ersetzt. Das DSS-haltige Trinkwasser wurde alle zwei Tage erneuert. Von Tag 3 bis 14 wurde den Tieren mit einer Schlundsonde das jeweilige Therapeutikum in einem Volumen von 100 µl NaCl oral verabreicht. SIgA und IgG wurden täglich in einer Konzentration von 30 µg/100 µl/Tier appliziert. Die Kolostrumkonzentration betrug 600 µg/100 µl/Tier und Tag. Weiteren Gruppen wurden 400 µg Lactoferrin bzw. 400 µg bovines Serumalbumin (BSA)/100 µl/Tier verabreicht. Die Tiere der NaCl-Gruppe wurden mit 100 µl NaCl pro Tier und Tag geschlündelt, um den Schlündelstress der Therapiegruppen als Ursache für die Gewichtsabnahme zu berücksichtigen.

### 3.2.2. Prophylaktischer Ansatz

Die Gabe der Versuchssubstanzen erfolgte bei diesem Ansatz vor Induktion der DSS-Kolitis. Die Substanzen wurden den Tieren für zwei Wochen täglich oral über eine Schlundsonde verabreicht. Danach wurde das Trinkwasser zur Kolitisinduktion für sieben Tage durch eine 5%ige DSS-Lösung ersetzt. Die Immunglobuline wurden in einer Konzentration von 60 µg/100 µl/Tier/Tag verabreicht. Eine Versuchsgruppe erhielt täglich 100 µl einer Kolostrumlösung pro Tier. Lactoferrin und BSA wurden mit der gleichen Konzentration wie im therapeutischen Ansatz verabreicht. Es wurde keine erneute NaCl-Kontrolle durchgeführt.

Eine grafische Darstellung der Versuchsansätze zeigt Abbildung 3.



**Abbildung 3:** Darstellung des therapeutischen (A) und prophylaktischen (B) Versuchsaufbaus

## 3.3. Verwendete Methoden

### 3.3.1. Gewichtsmessung

Zur Bestimmung des Körpergewichtes wurden die Versuchstiere täglich einzeln gewogen und das Messergebnis protokolliert.

### 3.3.2. Bestimmung des klinischen Disease Activity Index

Zur Erfassung der klinischen Symptomatik wurde täglich der prozentuale Verlust des Körpergewichtes im Vergleich zum Ausgangsgewicht zu Versuchsbeginn bestimmt. Stuhlproben wurden im therapeutischen Ansatz täglich über den Zeitraum der DSS-Gabe genommen. Dazu wurden die Tiere einzeln in leere Käfige gesetzt. Im prophylaktischen Versuch wurde der Stuhl über einen Zeitraum von 14 Tagen ab Beginn der DSS-Gabe gesammelt. Es wurden die Konsistenz des Stuhls und die Stärke der Reaktion im Hämokkulttest, welcher okkultes Blut im Stuhl nachweist, beurteilt.

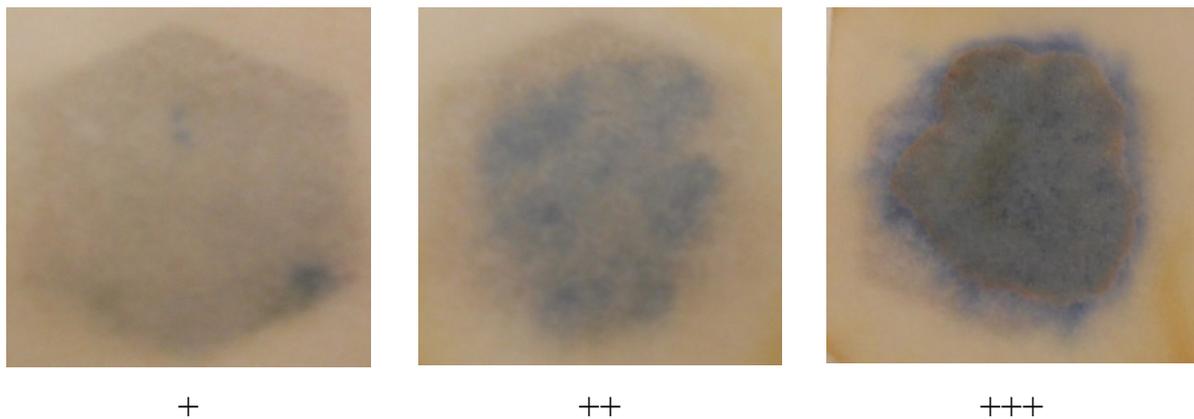
#### *Klinischer Disease Activity Index*

Der Disease Activity Index (DAI) dient der Beurteilung der klinisch messbaren Krankheitsaktivität der Kolitis. Cooper et al. [48] zeigten eine Assoziation zwischen der Höhe des DAI und den histologisch fassbaren entzündlichen Veränderungen im Kolon. Der Index wird mit Hilfe der Parameter Gewichtsabnahme, okkultes Blut und Stuhlkonsistenz bestimmt. Die für jeden Parameter vergebenen Punkte werden addiert. Wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, können 0 bis maximal 10 Punkte vergeben werden. Dabei wird ein klinisch unauffälliges Tier mit 0 Punkten bewertet, wohingegen 10 Punkte eine stärkste klinische Beeinträchtigung anzeigen.

**Tabelle 2:** Punkteverteilung für den DAI modifiziert nach Cooper et al. [48]

<b>Punkte</b>	<b>Gewichtsabnahme in % vom Ausgangsgewicht</b>	<b>Menge an okkultem Blut im Stuhltest</b>	<b>Stuhlkonsistenz</b>
<b>0</b>	keine Gewichtsabnahme	kein Blut im Stuhl	fest
<b>1</b>	bis 5 %	+	weich
<b>2</b>	bis 15 %	++	breiig/Durchfall
<b>3</b>	bis 20 %	+++	
<b>4</b>	bis 30 %		
<b>5</b>	> 30 %		

## Testung auf okkultes Blut



**Abbildung 4: Hämokultttest.** Dargestellt sind eine leicht (+), mittel (++) und stark (+++) positive Reaktion des Stuhltests auf okkultes Blut.

Das Prinzip des verwendeten Hämokultttests beruht auf der Oxidation der in Guajakharz enthaltenen farblosen Phenole zu farbigen Chinonen. Die Freisetzung des dazu benötigten Sauerstoffs erfolgt aus der aufzubringenden Entwicklerlösung, welche Wasserstoffperoxid enthält. Dabei dient das in Hämoglobin enthaltene Hämatin als Katalysator. Die Blaufärbung des Testpapiers zeigt somit die Anwesenheit von Hämoglobin an. Dies ist als Nachweis einer gastrointestinalen Blutung, wie sie z. B. im Rahmen einer Kolitis auftritt, zu werten.

### 3.3.3. Ablauf der Organentnahme

Die Organentnahmen erfolgten an Tag 15 nach Beginn der DSS-Gabe. Zunächst wurden die Tiere mit Ketamin (90-120 mg/kgKG)/Xylazin (6-8 mg/kgKG) betäubt. Anschließend wurde ihnen mit einer EDTA-beschichteten Kapillare retrobulbär ca. 1 ml Blut entnommen. Der Blutverlust führt zum Tod der Tiere. Der Bauchraum der Tiere wurde eröffnet und zunächst die mesenterialen Lymphknoten entnommen. Im Folgenden wurden die Milz und der Dickdarm entfernt. Die Länge des Kolons ohne Zäkum wurde gemessen und protokolliert. Das Kolon wurde longitudinal eröffnet und mit PBS gespült. Mit Hilfe eines Papierstreifens wurde es aufgerollt und der Länge nach halbiert. Je eine Hälfte wurde für immunhistologische Färbungen bzw. Hämatoxylin-Eosin-Färbungen verwendet. Lymphknoten und Milzen wurden bis zur weiteren Bearbeitung in PBS aufbewahrt.

### 3.3.4. Leukozytenisolierung und Fluoreszenzmarkierung

#### *Vollblut*

Das Vollblut wurde für die FACS-Analyse 4:5 mit PBS verdünnt und je 50 µl des verdünnten Blutes in ein FACS-Röhrchen gegeben. Die Antikörper wurden in entsprechender Konzentration zugefügt, das FACS-Röhrchen gevortext und anschließend für 20 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Danach wurde 1 ml Erylysepuffer pro FACS-Röhrchen dazugegeben, dieses gevortext und für weitere 10 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Die Lysereaktion wurde mit 500 µl PBS pro FACS-Röhrchen abgestoppt und die Proben bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Nach der Zugabe von 200 µl PBS wurden die Proben gevortext und am FACSCalibur durchflusszytometrisch gemessen (siehe Kapitel 3.3.7).

#### *Milz*

Die Arbeiten mit Milzen und Lymphknoten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Milzen wurden mit dem Stempel einer 10 ml-Spritze durch ein 100 µm-Sieb passiert, welches mit PBS nachgespült wurde. Die Proben wurden in 50 ml-Röhrchen aufgefangen und mit 1200 rpm für 8 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 5 ml Lysepuffer resuspendiert. Die Proben wurden dann für 5 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 ml PBS abgestoppt. Anschließend wurden die Proben erneut mit 1200 rpm für 8 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in etwa 10 ml PBS resuspendiert. Nachfolgend wurde die Lebendzellzahl nach Trypanblauausschluss bestimmt.  $1 \times 10^6$  Zellen/Ansatz wurden für 20 min im Dunkeln bei 4°C mit den Fluoreszenz-markierten Antikörpern entsprechender Konzentration inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 ml PBS abgestoppt und es folgte eine Zentrifugation mit 2000 rpm für 6 min bei 4°C. Nach dem anschließenden Dekantieren des Überstandes wurden je 200 µl PBS zu den Proben gegeben, diese dann gevortext und am FACSCalibur gemessen.

#### *Mesenteriale Lymphknoten*

Die entnommenen Lymphknoten wurden durch ein 70 µm-Sieb, welches mit PBS nachgespült wurde, in ein 50 ml-Röhrchen passiert. Die Proben wurden mit 1200 rpm für 8 min bei 4 °C

zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml PBS und einer erneuten Zentrifugation mit 1200 rpm für 8 min bei 4 °C. Nach dem Dekantieren wurde das Zellpellet in 3 ml PBS resuspendiert und eine Zellzählung vorgenommen. Pro FACS-Ansatz wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/Röhrchen verwendet. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte für 20 min im Dunkeln bei 4 °C. Mit 1 ml PBS wurde die Reaktion abgestoppt und die Proben mit 2000 rpm für 6 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren wurden 200 µl PBS zu jeder Probe gegeben, welche dann gevortext und durchflusszytometrisch gemessen wurden.

### 3.3.5. Hämatoxylin-Eosin-Färbung des Kolons

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine gebräuchliche Übersichtsfärbung für Gewebeschnitte. Basophile Zellbestandteile wie die Zellkerne färben sich durch Hämalaun blau. Eosin bindet an azidophile Zellkomponenten und sorgt so unter anderem für eine Rotfärbung des Zytoplasmas. Die Färbung der Kolonschnitte erfolgte im Institut für Pathologie der Universität Rostock.

#### *Histologischer Score*

Die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Gewebeschnitte wurden nach einem histologischen Score modifiziert nach Dieleman et al. beurteilt [49]. Für die Bewertung wurden die Proben anonymisiert und durch zwei Gutachter unabhängig voneinander benotet. Beurteilt wurden die Stärke der Inflammation, ihre Eindringtiefe in die Schichten der Darmwand sowie der Kryptenschaden. Ebenso flossen in die Bewertung mit ein, in wie weit das Gewebe Anzeichen von Regeneration zeigte und wie groß der Anteil des entzündeten Gewebes war. Die zur Punktevergabe genutzte Tabelle ist im Folgenden dargestellt.

**Tabelle 3:** Histologischer Score modifiziert nach Dieleman et al. [49]

Entzündung	0	keine
	1	wenig
	2	moderat
	3	schwer
Ausdehnung	0	keine
	1	Mukosa
	2	Mukosa und Submukosa
	3	transmural
Kryptenschaden	0	kein
	1	basales 1/3 geschädigt
	2	basale 2/3 geschädigt
	3	Verlust der gesamten Krypten und des Epithels
Regeneration	1	fast vollständige Regeneration
	2	Regeneration mit Kryptenverlust
	3	Oberflächenepithel nicht intakt
	4	keine
Betroffener Anteil	1	0-25 %
	2	26-50 %
	3	51-75 %
	4	76-100 %

Die histologischen Scores errechnen sich daraus wie folgt:

$$\begin{aligned}
 & \text{Histoscore Entzündung} &= & \text{Entzündung} & \times & \text{Betroffener Anteil} \\
 + & \text{Histoscore Ausdehnung} &= & \text{Ausdehnung} & \times & \text{Betroffener Anteil} \\
 + & \text{Histoscore Kryptenschaden} &= & \text{Kryptenschaden} & \times & \text{Regeneration}
 \end{aligned}$$

---

= Gesamtscore

Für jeden Einzelscore werden 0 bis 12 Punkte vergeben. Der Gesamtscore beträgt maximal 36 Punkte.

### 3.3.6. Immunhistochemische Färbung

Das Kolongewebe für die immunhistochemischen Färbungen wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ °C}$  kryokonserviert. Für die Färbungen wurden am Kryostat bei  $-20\text{ °C}$  mehrere Gewebeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden zunächst für 30 min getrocknet und für weitere 8 min in eiskaltem Methanol fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Blockierung endogener Avidin- und Biotinbindungsstellen zunächst für 15 min mit einer

Avidin D-Lösung und nach erneutem Waschen für 15 min mit einer Biotin-Lösung. Die Gewebeschnitte wurden wieder dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde in „Goat Blocking Serum“ (GBS) inkubiert, um unspezifischen Antikörperbindungen vorzubeugen. Danach wurden die Präparate mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Konzentrationen der Primärantikörper sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

**Tabelle 4:** Konzentrationen und Spezieszugehörigkeit der Primärantikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration in GBS</b>	<b>Spezies</b>
Anti-CD4	1:200	Ratte
Anti-CD11c	1:200	Hamster
Anti-CD83	1:200	Ratte
Anti- $\gamma/\delta$ -TCR	1:50	Hamster

Nach 1 ½ Stunden wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und dann für 30 min mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden dazu 1:200 (Hamster) bzw. 1:2000 (Ratte) mit PBS verdünnt. Nach Abwaschen der Antikörper erfolgte die Inkubation mit dem Vectastain ABC-Reagenz für 30 min. Die Peroxidase ist Avidin-modifiziert und bindet darüber an den biotinylierten Sekundärantikörper. Sie verstoffwechselt das nachfolgend für 5 bis 10 Minuten zugesetzte chromogene Peroxidase-Substrat. Nach einer Gegenfärbung mit Hämalaun wurden die Objektträger mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend eingebettet.

### 3.3.7. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) lassen sich morphologische und Fluoreszenzeigenschaften von Zellen bestimmen. Dafür werden die Zellen in Suspension einzeln durch einen Laserstrahl gesogen. Die Analyse des Laserstreulichts ermöglicht die Bestimmung von Zellgröße (Vorwärtsstreulicht) und Zellgranularität (Seitwärtsstreulicht). Diese Parameter sind Zelltyp-spezifisch, wodurch die Selektion einer bestimmten Zellpopulation durch das Setzen eines Gates ermöglicht wird. Gleichzeitig wurden die untersuchten Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt.

Durch die Auswahl von Zelltyp-spezifischen Oberflächenproteinen können die Zellpopulationen charakterisiert werden. Zur Anregung der Fluoreszenz werden Laser unterschiedlicher Wellenlänge genutzt, sodass Mehrfachfärbungen möglich sind.

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit dem FACSCalibur durchgeführt. Der verwendete Argonlaser sendet einen monochromatischen Lichtstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm aus, durch welchen die zu untersuchenden Zellen gesogen werden. Als Vorwärtsstreulicht wird der Anteil des Laserlichts bezeichnet, welcher an der Zelloberfläche abgelenkt wird. Er wird aus einem Winkel, welcher in Relation zum einfallenden Licht klein ist, gemessen. Der gemessene Wert bestimmt den Parameter Zellgröße. Das in einem Winkel von 90° gestreute Licht hängt von der intrazellulären Granularität ab. Mit Hilfe dieser beiden Messgrößen lassen sich schon verschiedene Zellpopulationen unterscheiden.

Als Fluoreszenzmarker wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC, gelb-grün) und Phycoerythrin (PE, rot-orange) verwendet. Fluoreszenzfarbstoffe senden nach Anregung durch den Argonlaser ein Licht definierter Wellenlänge aus. Die Emissionsmaxima liegen bei 515 nm für FITC und bei 580 nm für PE und sind damit gut voneinander zu unterscheiden.

Die ermittelten Werte für Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzintensität wurden digitalisiert. Zellgröße und Granularität wurden gegeneinander aufgetragen. Zelltrümmer und tote Zellen wurden durch die Verwendung eines Schwellenwertes für die Zellgröße von der Messung ausgeschlossen. Auch die FITC- und PE-Intensitäten wurden gegeneinander aufgetragen und der prozentuale Anteil für Einfach- und Doppelfärbungen errechnet. Für jede Messung wurden 10.000 Zellen untersucht.

### 3.3.8. Statistik

Für die Gewichts- und DAI-Verläufe wurde die statistische Signifikanz mit nonparametrischer Varianzanalyse nach dem ANOVA-Modell ermittelt. Für alle weiteren Werte wurde der Mann-Whitney-U-Test zur Berechnung der Signifikanz genutzt. In den Grafiken sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, soweit nicht anders in der Legende beschrieben, dargestellt.

## **4. ERGEBNISSE**

In dieser Arbeit wurde die Wirkung bovinen Kolostrums und seiner Bestandteile sekretorisches Immunglobulin A und Lactoferrin auf die DSS-induzierte Kolitis in einem Mausmodell mittels eines therapeutischen und eines prophylaktischen Versuchsansatzes untersucht. Als Immunglobulin- bzw. Proteinkontrollen dienten IgG bzw. bovines Serumalbumin.

### **4.1. Therapeutischer Ansatz**

Im therapeutischen Versuchsansatz wurde die Wirkung der Versuchssubstanzen während eines aktiven Entzündungsschubes untersucht.

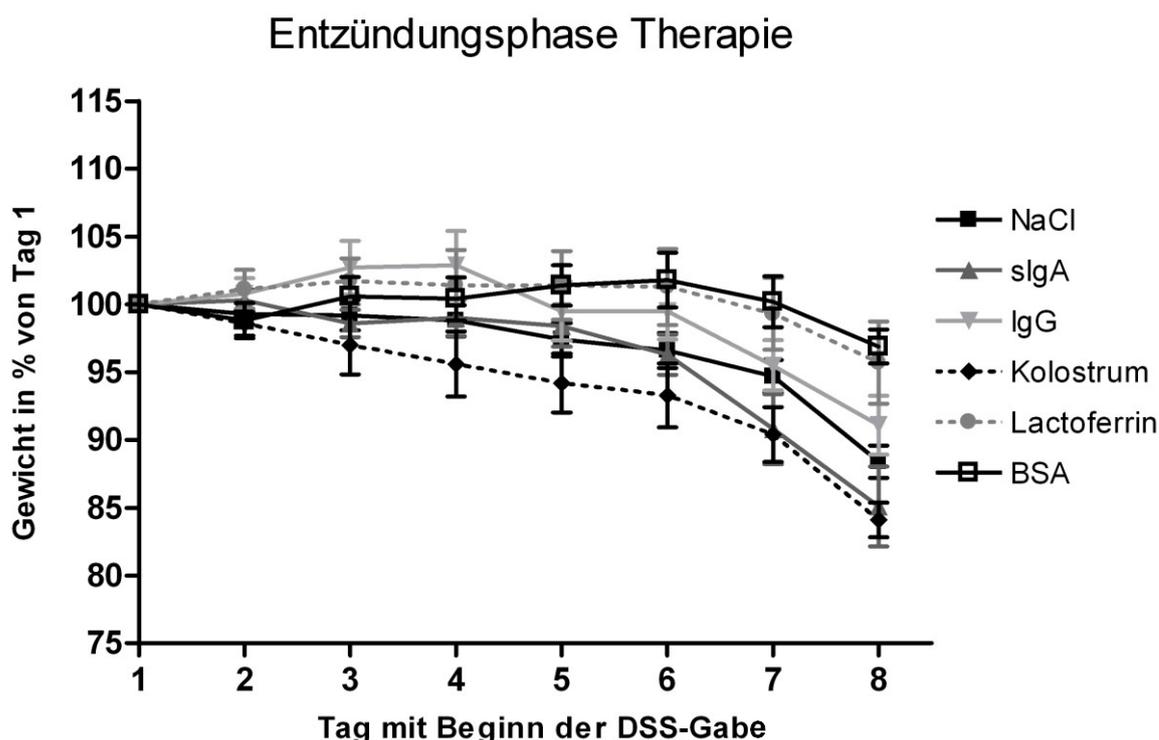
Es wurden ausschließlich weibliche NMRI-Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 30 g zum Experiment zugelassen. Die Tiere wurden im Alter von acht bis zwölf Wochen nach dem Zufallsprinzip in sechs Versuchsgruppen (n = 5-8) aufgeteilt.

Zur Kolitisinduktion wurde den Tieren nach dem von Okayasu et al. [33] entwickelten experimentellen Modell der Colitis ulcerosa für sieben Tage eine 5%ige Natrium-Dextransulfat-Lösung anstelle des Trinkwassers verabreicht. Das Natriumsalz bedingt eine Störung der intestinalen Barrierefunktion. Dieser Integritätsverlust der mukosalen Epithelzellbarriere mit unkontrollierter Antigenstimulation des GALT induziert im akuten Stadium des DSS-Kolitismodells eine charakteristische, T-Zell-vermittelte, granulozytäre Darmentzündung [50] [51]. An Tag 3 der DSS-Gabe wurde mit dem Schlündeln der Versuchssubstanzen begonnen. Von Tag 8 bis Tag 14 wurde die DSS-Lösung durch Trinkwasser ersetzt und das tägliche Schlündeln fortgeführt. Der Verlauf der akuten Entzündung und der darauf folgenden Regeneration wurde durch Bestimmung des Körpergewichts und Analyse des Stuhls protokolliert. An Tag 15 wurde den Mäusen durch Punktion des retrobulbären Venenplexus Blut entnommen. Die Tiere wurden dazu mit Ketamin/Xylazin narkotisiert. Der Blutverlust führte zum Tod der Tiere. Anschließend erfolgte die Organentnahme.

#### 4.1.1. Gewichtsverlust

Diarrhö und damit einhergehende Dehydratation führen zu einem Gewichtsverlust während der akuten Kolitis. Die Auswertung des Gewichtsverlaufes durch tägliches Wiegen der Versuchstiere ist somit ein indirekter Parameter der Entzündungsintensität.

Abbildung 5 zeigt die prozentuale Entwicklung des Körpergewichtes in den Versuchsgruppen.

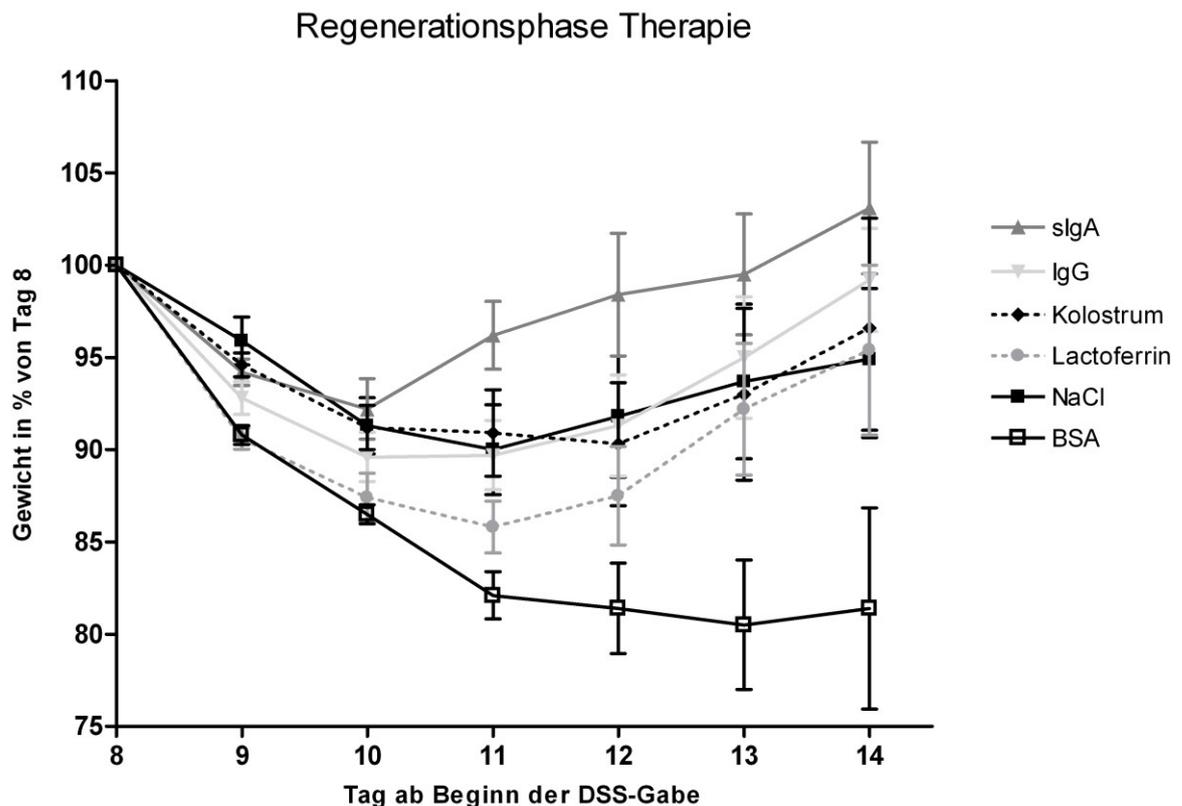


**Abbildung 5: Gewichtsverlauf während akuter DSS-induzierter Kolitis.** Ohne Therapie (NaCl) sowie unter oraler Therapie mit 30 µg sIgA/Tier, 30 µg IgG/Tier, 0,6 mg Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8).

Die Gewichtsänderung ist prozentual gegenüber den Ausgangswerten für Tag 1 angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit nonparametrischer Varianzanalyse nach dem ANOVA-Modell ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) im Verlauf  $\pm$  Standardfehler (SEM).

Das mittlere Ausgangsgewicht der Versuchsgruppen wurde am Tag 1 (Beginn der Entzündungsphase) gleich 100 % gesetzt. Innerhalb von sieben Tagen verlor die NaCl-Gruppe etwa  $11,6 \pm 1,2$  % ihres Ausgangsgewichts. In den weiteren Versuchsgruppen zeigten sich ebenfalls deutliche Reduktionen des Körpergewichts um durchschnittlich  $9,9 \pm 1,4$  %. Die statistische Auswertung nach dem ANOVA-Modell mit nonparametrischer Varianzanalyse zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der NaCl-Kontrolle und den anderen Versuchsgruppen.

Mit dem Ersatz der DSS-Lösung durch Trinkwasser an Tag 8 beginnt die Regenerationsphase der Kolitis. Das mittlere Ausgangsgewicht der Versuchsgruppen wurde an Tag 8 erneut gleich 100 % gesetzt. Abbildung 6 zeigt, dass die sIgA-Behandlung im Vergleich zu den anderen Gruppen zu einer schnelleren Gewichtszunahme führte.

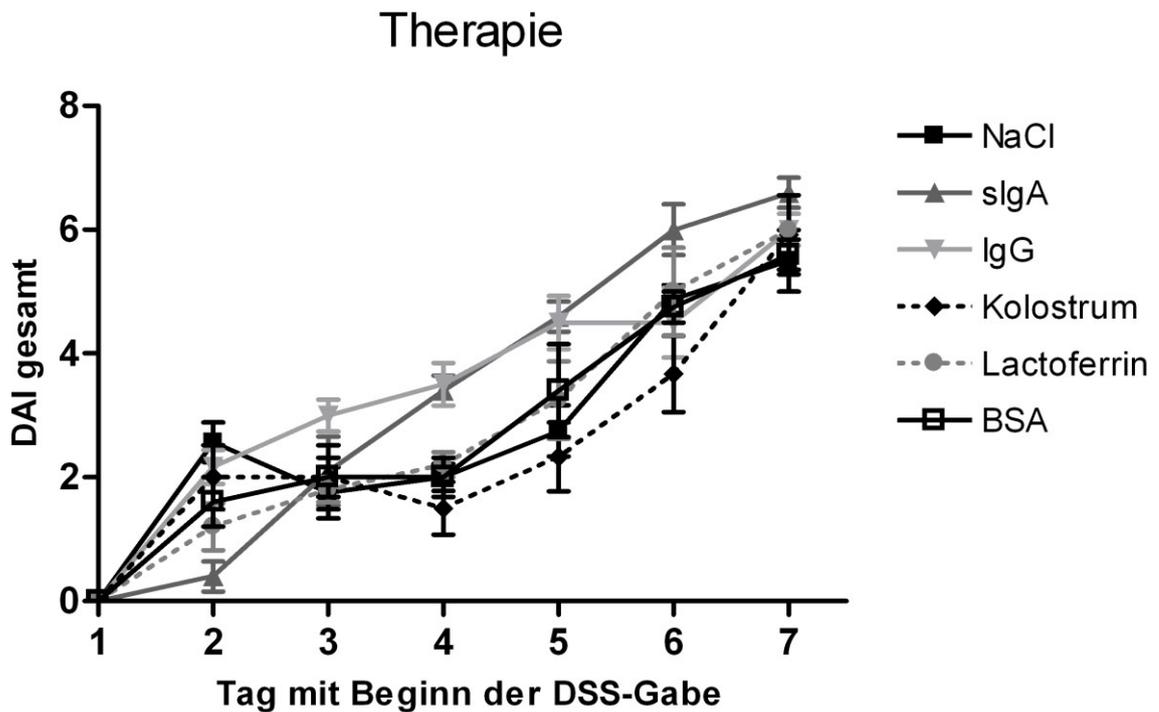


**Abbildung 6: Gewichtsverlauf während der Regenerationsphase nach akuter DSS-induzierter Kolitis.** Ohne Therapie (NaCl) sowie unter oraler Therapie mit 30 µg sIgA/Tier, 30 µg IgG/Tier, 0,6 mg Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8). Die Gewichtsänderung ist prozentual gegenüber den Ausgangswerten für Tag 8 angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit nonparametrischer Varianzanalyse nach dem ANOVA-Modell ermittelt. Dargestellt sind die MW im Verlauf ± SEM.

Die sIgA-behandelten Tiere zeigten ab Tag 11 die höchste Zunahme des Körpergewichts auf  $103,1 \pm 3,6$  %. Die Behandlung mit BSA führt nicht zu einer Gewichtszunahme in der Regenerationsphase, stattdessen wurde eine weitere Gewichtsabnahme von  $18,6 \pm 5,4$  % nachgewiesen. Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied im Gewichtsverlauf von sIgA vs. BSA ( $p < 0,01$ ) während der Regenerationsphase. Weiterhin zeigte sich bei sIgA-Gabe eine Tendenz zur Verbesserung des Gewichtsverlaufs im Vergleich zur NaCl-Gabe ( $p = 0,077$ ). Dagegen konnten weder Kolostrum noch Lactoferrin die Gewichtszunahme im Vergleich zu den Kontrollsubstanzen verbessern.

#### 4.1.2. Klinischer Disease Activity Index

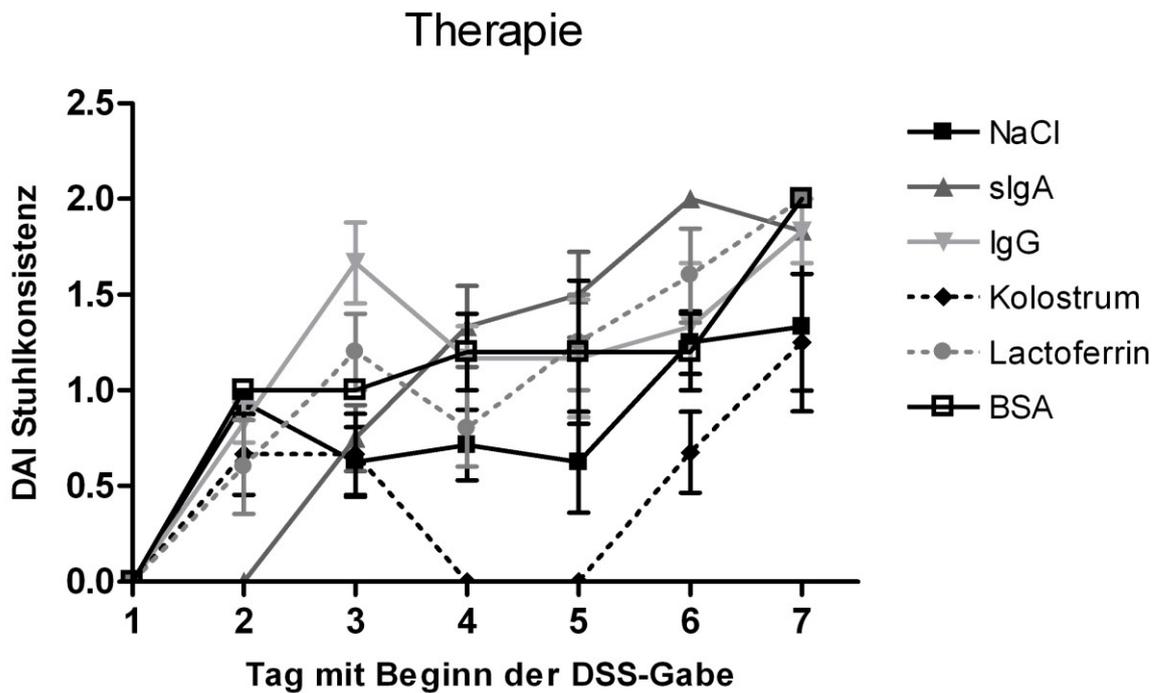
Mit DSS zur Kolitisinduktion behandelte Tiere zeigten bereits nach 1 bis 2 Tagen erste klinische Symptome, die in der Regel aus einem weichen Stuhl bestanden. Später traten massive Diarrhö, Gewichtsverlust und Blut im Stuhl auf. Diese Symptome wurden durch den DAI quantifiziert. Höhere Indexwerte zeigen eine erhöhte Krankheitsaktivität an. Der Index wurde täglich bis einschließlich Tag 7 bestimmt.



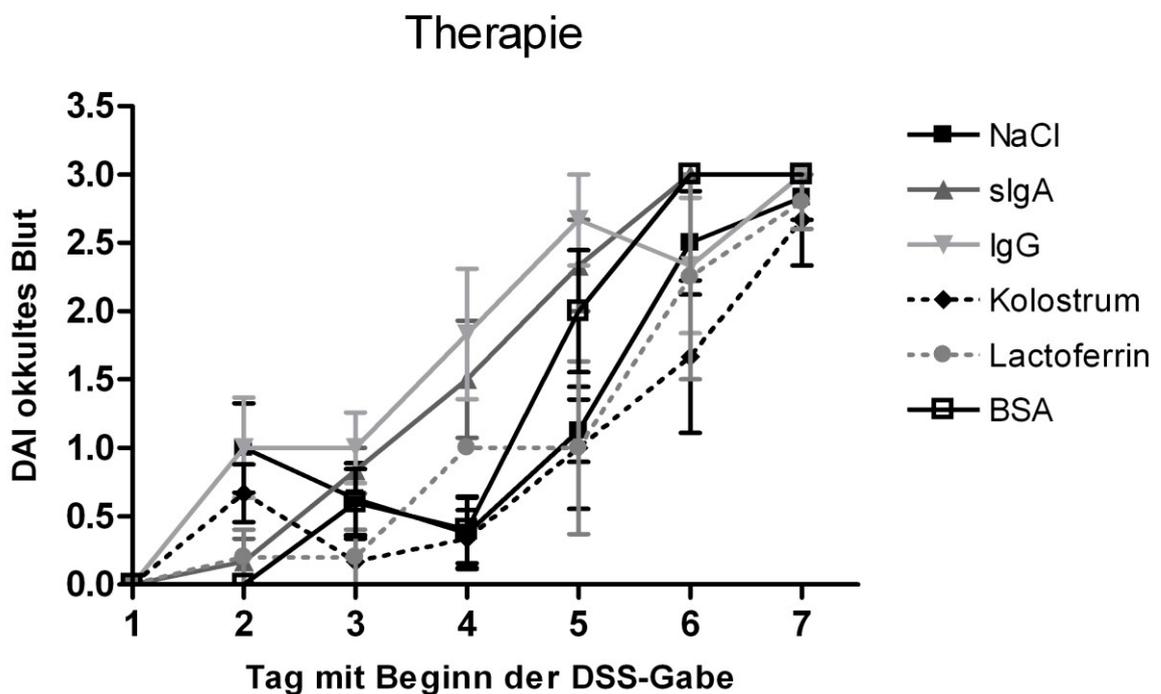
**Abbildung 7: Disease Activity Index während akuter DSS-induzierter Kolitis.** Ohne Therapie (NaCl) sowie unter oraler Therapie mit 30 µg sIgA/Tier, 30 µg IgG/Tier, 0,6 mg Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8).

Der DAI wurde täglich ermittelt. Statistische Signifikanz wurde mit nonparametrischer Varianzanalyse nach dem ANOVA-Modell ermittelt. Dargestellt sind die MW im Verlauf ± SEM.

Kolostrum zeigte eine Verbesserung des klinischen Index gegenüber den Kontrollsubstanzen NaCl und BSA. Dies war vor allem auf eine Verbesserung der Stuhlkonsistenz ( $p < 0,05$  vs. BSA) und geringere okkulte Blutungen ( $p < 0,01$  vs. BSA) zurückzuführen (siehe Abbildung 8). Von Tag 4 bis 6 erreichten die mit Kolostrum behandelten Tiere die niedrigsten Indexwerte aller Gruppen. Die therapeutische Gabe von sIgA oder Lactoferrin zeigte keine Verbesserung des klinischen Index im Vergleich mit den Kontrollen IgG und BSA.



A

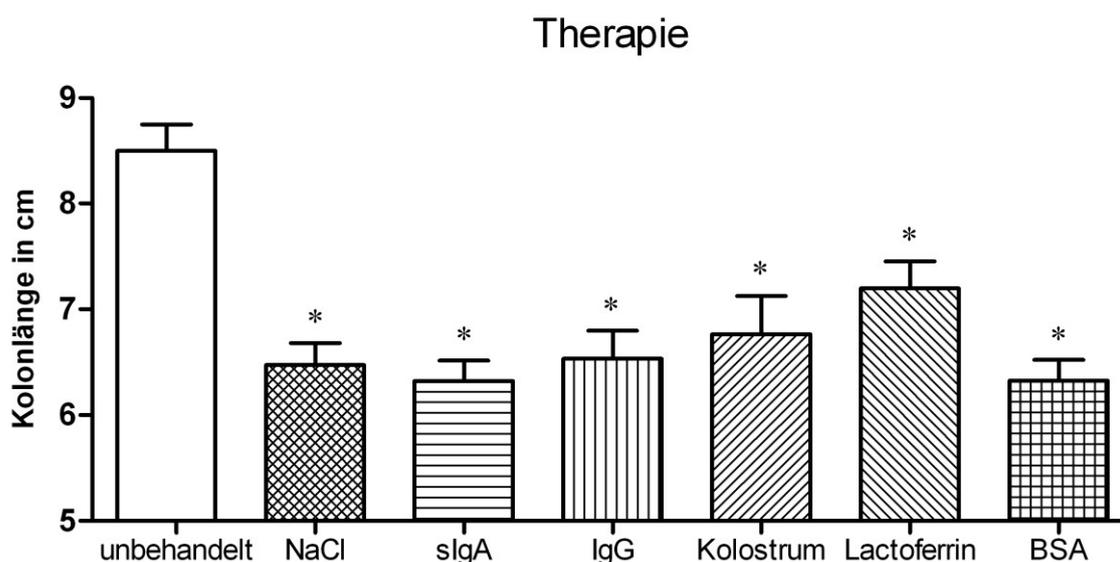


B

**Abbildung 8: Veränderung von Stuhlkonsistenz (A) und okkulten Blut (B) während akuter DSS-induzierter Kolitis.** Ohne Therapie (NaCl) sowie unter oraler Therapie mit 30 µg sIgA/Tier, 30 µg IgG/Tier, 0,6 mg Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8). Der DAI wurde täglich ermittelt. Statistische Signifikanz wurde mit nonparametrischer Varianzanalyse nach dem ANOVA-Modell ermittelt. Dargestellt sind die MW im Verlauf ± SEM.

### 4.1.3. Kolonlänge

Inflammatorische Prozesse führen im Krankheitsverlauf der Kolitis zu stenosierenden Vernarbungen und ödematösen Verquellungen des Kolons. Diese Vorgänge bedingen eine messbare Reduktion der Darmlänge. Daher ist der Vergleich der Kolonlängen ein geeigneter und einfach ermittelbarer Parameter zur Beurteilung der vorangegangenen Krankheitsaktivität. Die Entnahme und Längenmessung des Kolons wurde an Tag 15 durchgeführt. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse.



**Abbildung 9: Kolonlängen** von unbehandelten Tieren (n=12) und Mäusen nach DSS-induzierter Kolitis an Tag 15 ohne Therapie (NaCl) sowie nach oraler Therapie mit 30 µg sIgA/Tier, 30 µg IgG/Tier, 0,6 mg Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 4-8). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SEM; \*p < 0,01 vs. unbehandelt.

Die durchschnittliche Kolonlänge von unbehandelten Mäusen lag bei  $8,5 \pm 0,25$  cm. Die DSS-Kolitis führte bei den NaCl-Tieren zu einer Verkürzung der Darmlänge auf  $6,5 \pm 0,21$  cm. Wurden die Tiere von Tag 3 bis 14 mit der oralen Gabe von sIgA, IgG oder Kolostrum behandelt, kam es ebenfalls zu einer Abnahme der Kolonlängen ( $p < 0,01$  vs. unbehandelt). Die Versuchsgruppen zeigten dabei Mittelwerte von  $6,3 \pm 0,19$  cm (sIgA),  $6,5 \pm 0,26$  cm (IgG) bzw.  $6,8 \pm 0,36$  cm (Kolostrum). Die geringste Verkürzung der Darmlänge im Vergleich zu unbehandelten Mäusen war mit einer Länge von  $7,2 \pm 0,26$  cm in der mit Lactoferrin behandelten Gruppe zu sehen.

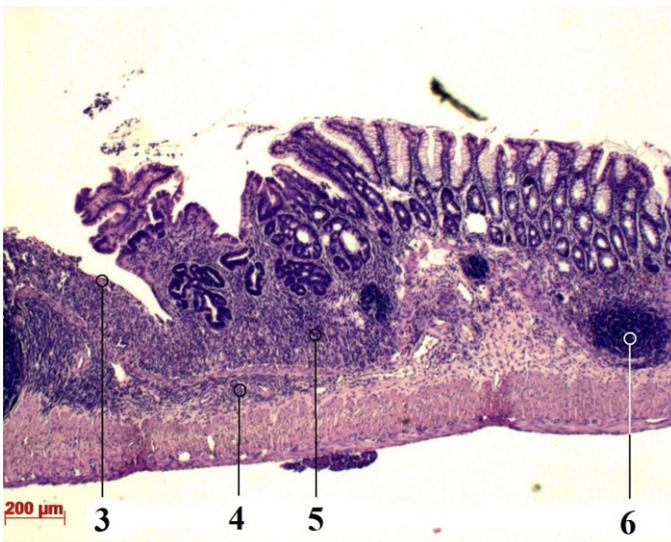
#### 4.1.4. Histologie

Zur genaueren Beurteilung der Entzündungsreaktion im Darmgewebe wurden histologische Präparate des Kolons angefertigt. Durch die Begutachtung der H.E.-gefärbten Gewebeschnitte lassen sich Aussagen zu Schweregrad und Tiefe der lymphozytären Infiltration sowie zur Schädigung der Kryptenarchitektur treffen. Die Abbildungen 10 und 11 zeigen typische Veränderungen des Darms bei DSS-induzierter Kolitis: Die Krypten sind unregelmäßig strukturiert und verlieren den Kontakt zur Basalmembran. Die massiven lympho- und granulozytären Infiltrate können bis in die Muscularis hineinreichen. Sie stören die natürliche Gewebestruktur, wodurch sich ein ungeordnetes histologisches Bild ergibt. Die DSS-bedingte Darmschädigung führt stellenweise zum Verlust des Oberflächenepithels.



**Abbildung 10: Histologische Merkmale der murinen DSS-Kolitis**

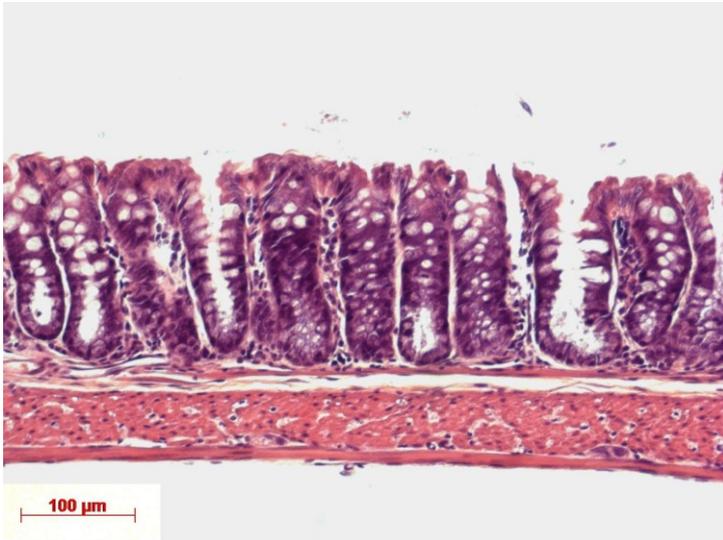
- 1 - Kryptenverlust
- 2 - leichte Entzündungsreaktion



**Abbildung 11: Histologische Merkmale der murinen DSS-Kolitis**

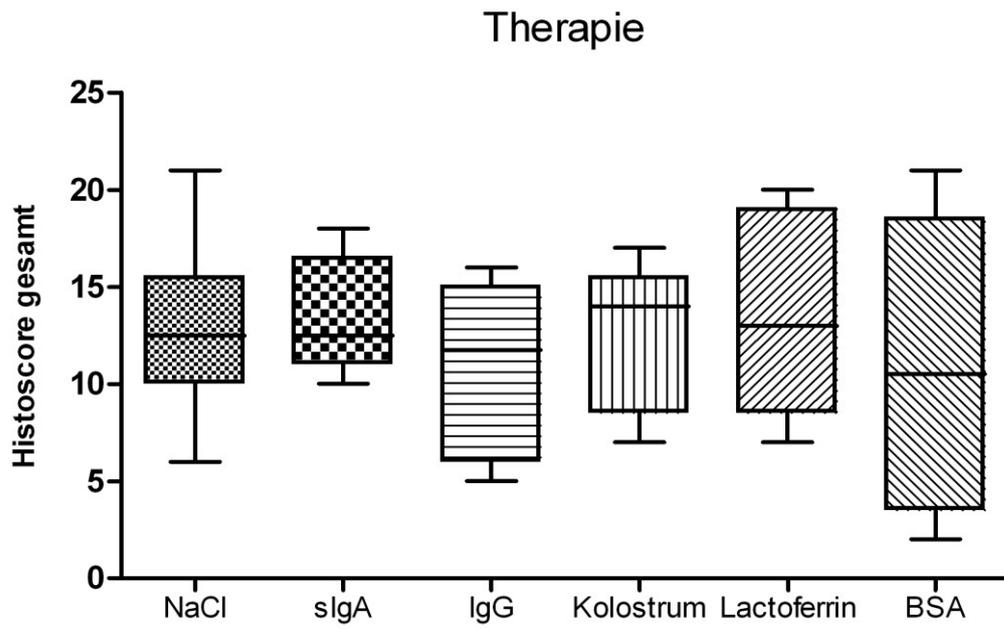
- 3 - Epithelverlust
- 4 - entzündliche Infiltrate in der Submukosa
- 5 - schwere Entzündungsreaktion
- 6 - Lymphknotenhyperplasie

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 12 das Darmgewebe einer Maus ohne DSS-Kolitis zu sehen: Die Krypten sitzen der Basalmembran auf und zeigen eine regelmäßige Anordnung. Entzündliche Infiltrate fehlen. Die Submukosa ist nur als schmaler Saum zu erkennen.

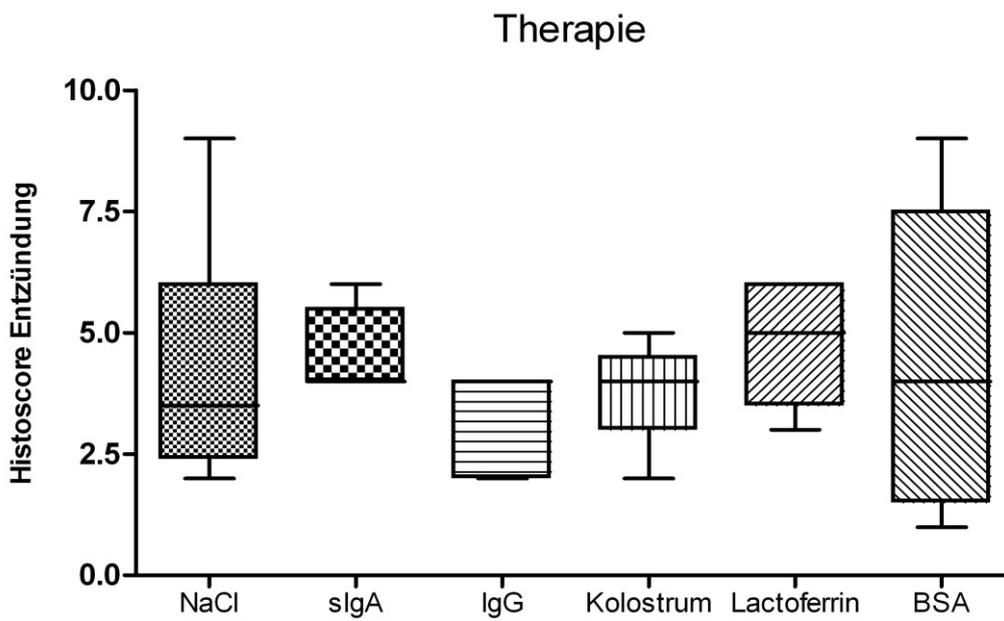


**Abbildung 12: Histologisches Bild des murinen Kolons ohne DSS-induzierte Kolitis**

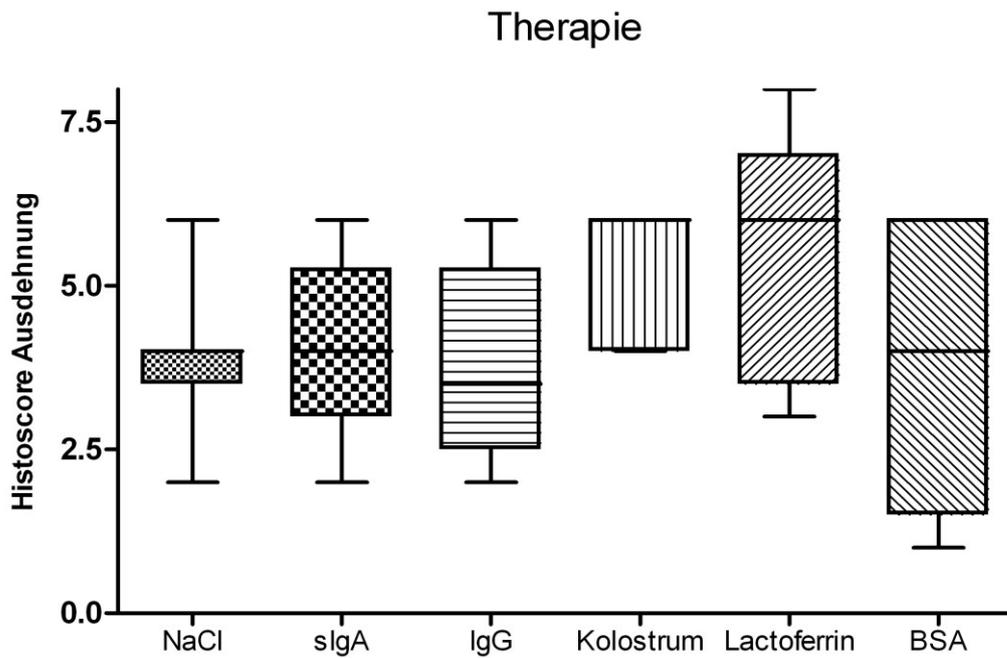
Der histologische Score, modifiziert nach Dieleman et al. [49], erfasst die mikroskopisch beobachteten Gewebepathologien in statistisch verwertbarer Form. Die Beurteilung der Histologie erfolgte in Hinblick auf Schwere und Ausdehnung entzündlicher Veränderungen sowie Ausmaß des Kryptenschadens. Der durchschnittliche Scorewert von Tieren mit und ohne Behandlung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollsubstanzen. Dieses galt sowohl für den Gesamtscore als auch für die Teilscores (siehe Abbildung 13).



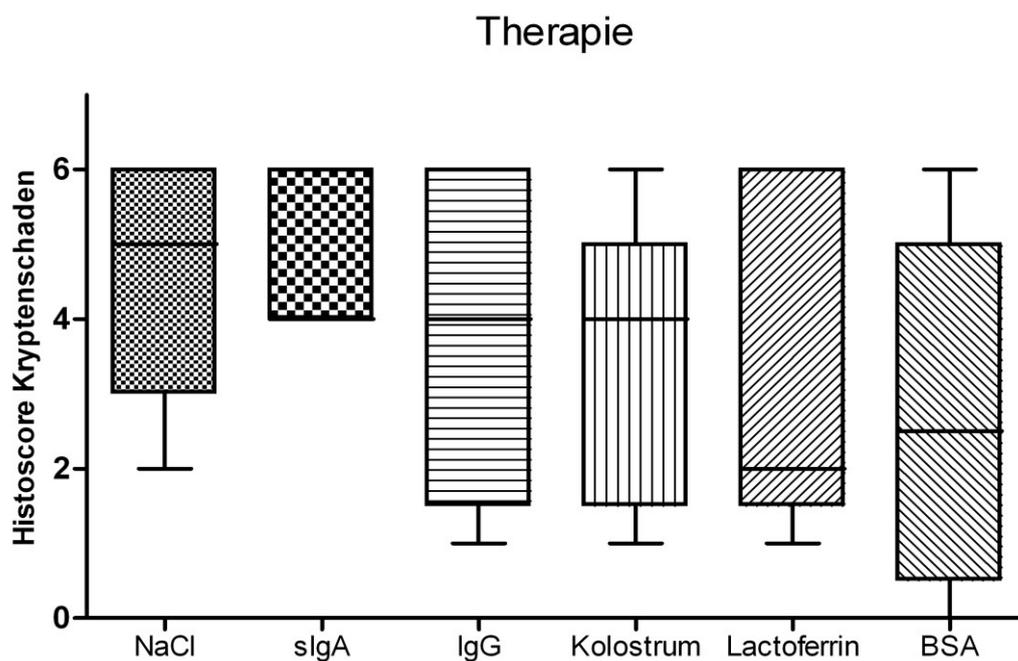
A



B



C



D

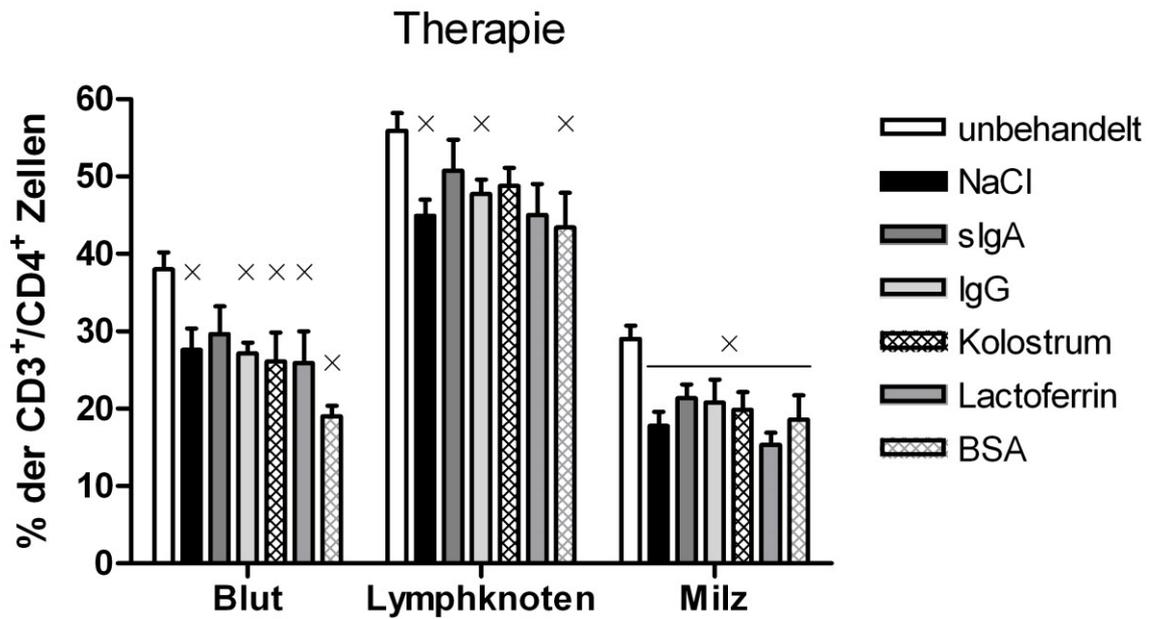
**Abbildung 13: Histologischer Score dargestellt als Gesamtscore (A), Entzündung (B), Ausdehnung (C) und Kryptenschaden (D) nach akuter DSS-induzierter Kolitis. Ohne Therapie (NaCl) sowie nach oraler Therapie mit 30 µg sIgA/Tier, 30 µg IgG/Tier, 0,6 mg Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 4-8).**

Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind der Median und die Streuung der Ergebnisse.

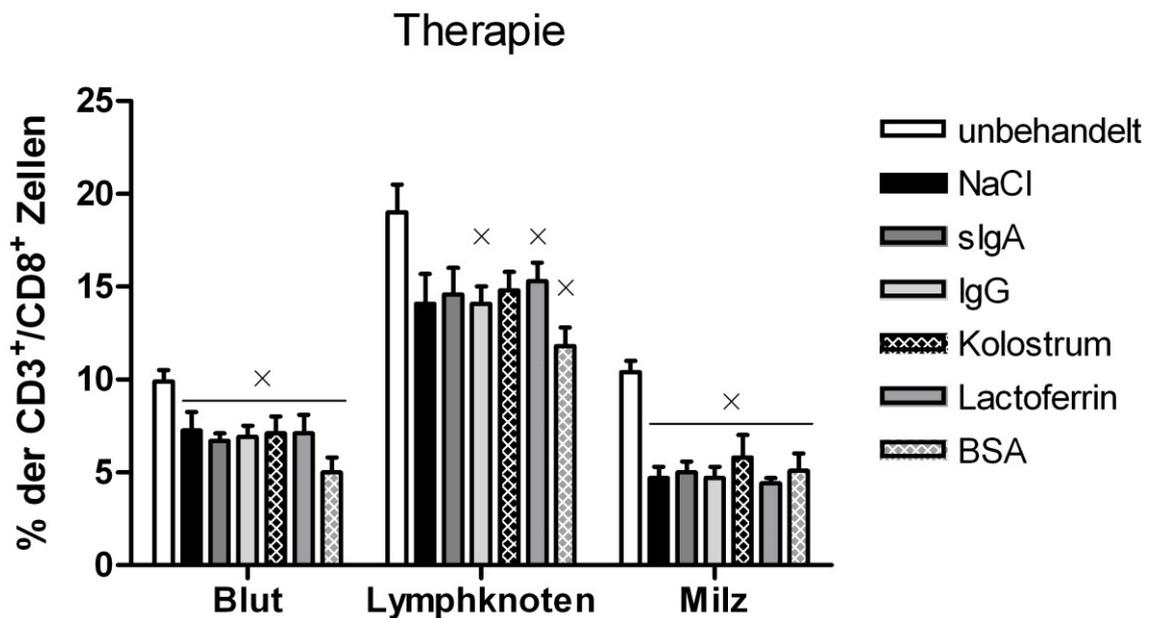
#### 4.1.5. Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Sowohl für Kolostrum als auch für seine Einzelkomponenten sIgA und Lactoferrin sind immunmodulierende Eigenschaften beschrieben worden [45] [52] [53]. Zur genaueren Charakterisierung dieser Effekte durch die therapeutische Applikation der Versuchssubstanzen wurden ausgewählte Leukozytenpopulationen mit Hilfe der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Leukozyten wurden an Tag 15 aus der Milz, den intestinalen Lymphknoten und dem Blut extrahiert.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen sind dabei weder für T-Helferzellen noch für die zytotoxischen T-Zellen signifikant. Im Zuge der Kolitis verringert sich der Anteil beider Leukozytenpopulationen in allen drei Kompartimenten (siehe Abbildung 14).



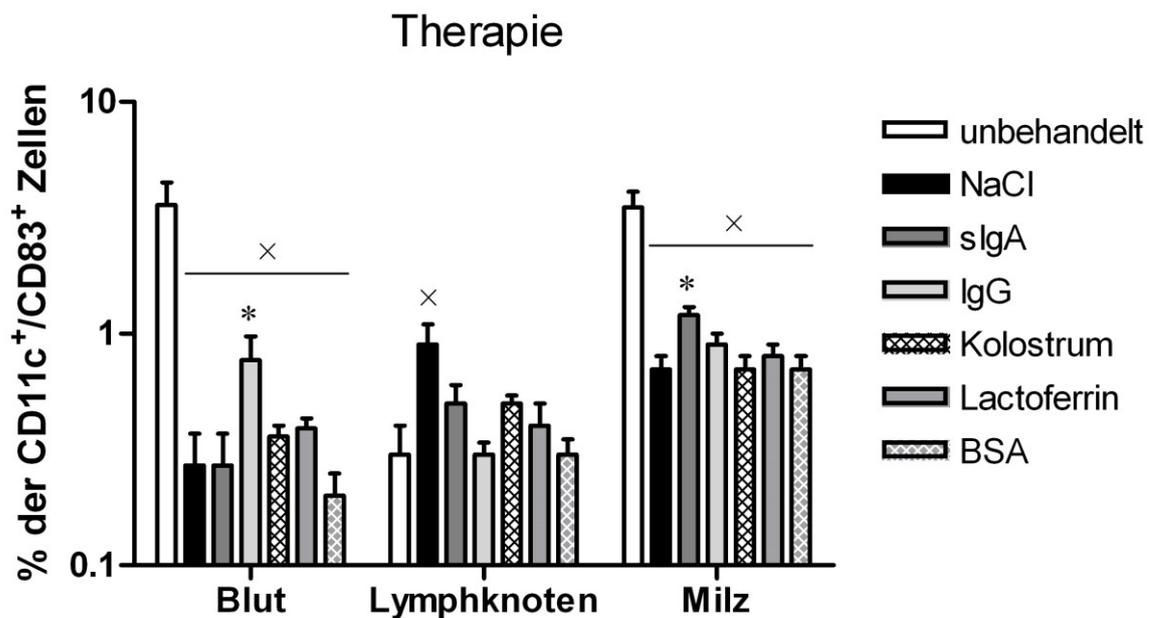
A



B

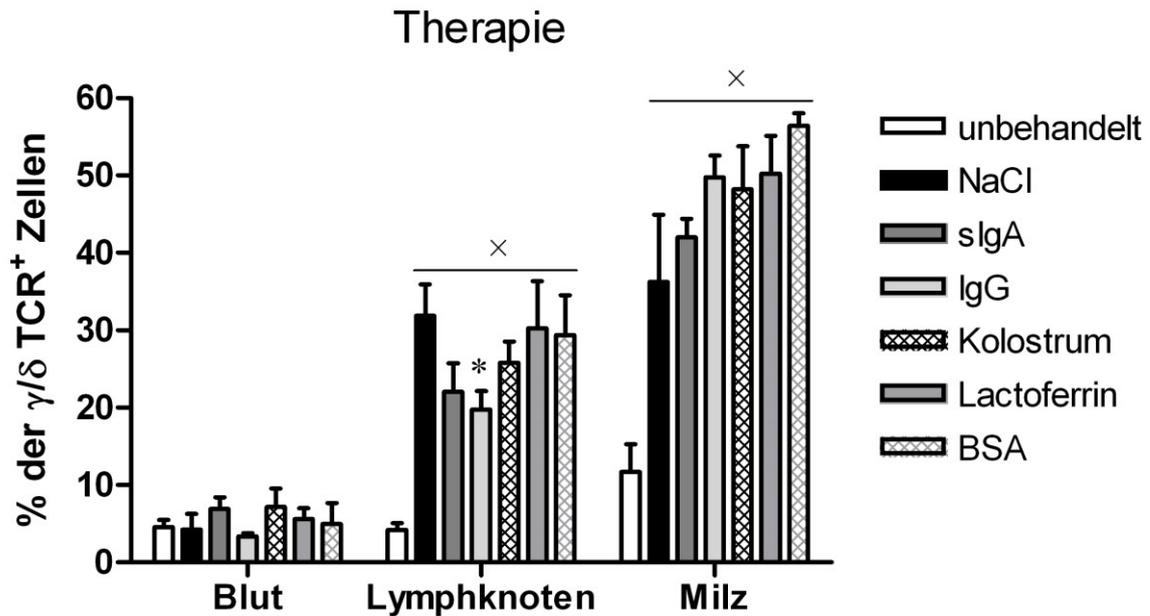
**Abbildung 14: Anteil der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen (A) und CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Zellen (B) an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz von unbehandelten Tieren (n = 12) und Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis an Tag 15 ohne Therapie (NaCl) sowie nach oraler Therapie mit 30 µg sIgA/Tier, 30 µg IgG/Tier, 0,6 mg Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 4-8). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SEM; × p < 0,05 vs. unbehandelt.**

Reife dendritische Zellen, welche als Antigen-präsentierende Zellen mit den T-Lymphozyten interagieren, lassen sich CD11c/CD83 markieren. Ihr Anteil nahm durch die Kolitisinduktion in Blut und Milz signifikant ab ( $p < 0,05$  vs. unbehandelt) (siehe Abbildung 15). Unterschiede zwischen den Testsubstanzen zeigten sich im Blut bei den IgG-behandelten Tieren ( $p < 0,05$  vs. NaCl) und in der Milz bei den sIgA-behandelten Tieren ( $p < 0,05$  vs. NaCl). Im Gewebe der mesenterialen Lymphknoten war ein signifikanter Anstieg der CD11c<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> Population der NaCl-Gruppe zu erkennen ( $p < 0,05$  vs. unbehandelt).



**Abbildung 15:** Anteil der CD11c<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz von unbehandelten Tieren (n = 12) und Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis an Tag 15 ohne Therapie (NaCl) sowie nach oraler Therapie mit 30 µg sIgA/Tier, 30 µg IgG/Tier, 0,6 mg Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 4-8). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SEM; ×  $p < 0,05$  vs. unbehandelt; \*  $p < 0,05$  vs. NaCl.

Eine weitere immunregulatorisch interessante Zellpopulation stellen die  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen dar. Sie finden sich vor allem in der Darmmukosa. Ihr Anteil an der Gesamtpopulation der Leukozyten erhöhte sich unter Entzündung in intestinalen Lymphknoten und im Milzgewebe gegenüber unbehandelten Tieren, welche keine DSS-Lösung erhielten ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 16). IgG-behandelte Tiere zeigten signifikant geringere Mengen an  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen in den Lymphknoten des Darms ( $p < 0,05$  vs. NaCl).



**Abbildung 16: Anteil der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen** an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz von unbehandelten Tieren ( $n = 12$ ) und Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis an Tag 15 ohne Therapie (NaCl) sowie nach oraler Therapie mit  $30 \mu\text{g}$  sIgA/Tier,  $30 \mu\text{g}$  IgG/Tier,  $0,6 \text{ mg}$  Kolostrum/Tier,  $0,4 \text{ mg}$  Lactoferrin/Tier bzw.  $0,4 \text{ mg}$  BSA/Tier ( $n = 4-8$ ). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM;  $\times$   $p < 0,05$  vs. unbehandelt; \*  $p < 0,05$  vs. NaCl.

## 4.2. Prophylaktischer Ansatz

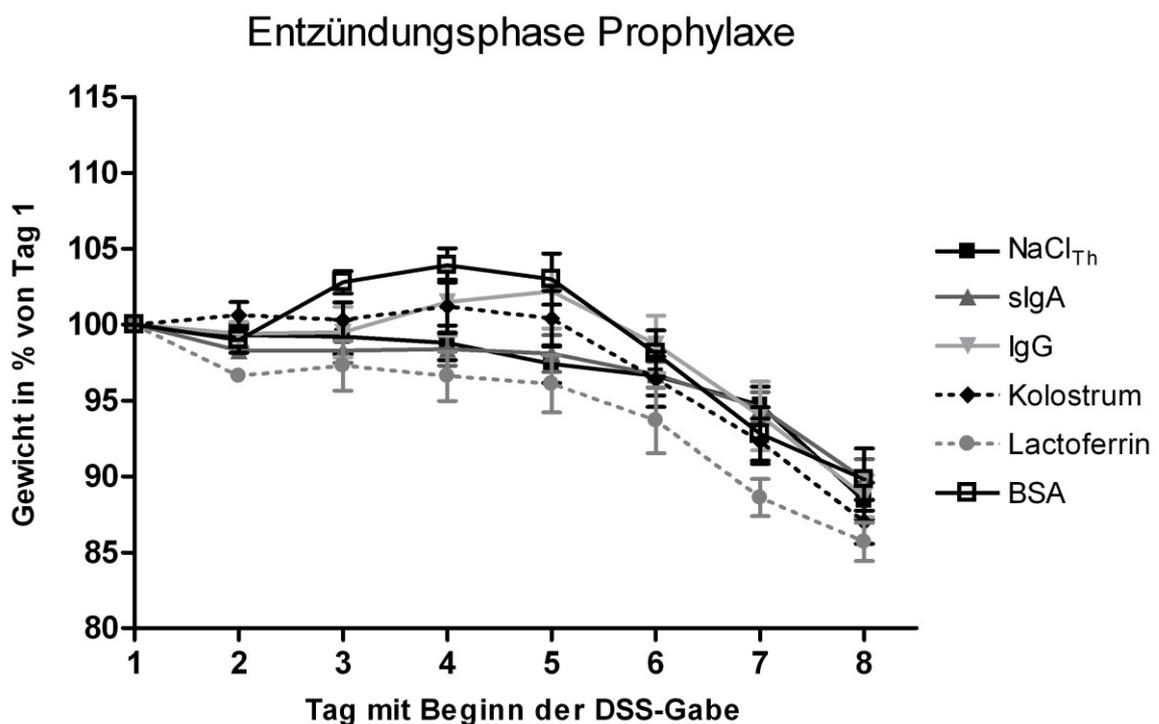
Mit diesem Ansatz wurden vorbeugende Effekte der Versuchssubstanzen untersucht. Für Kolostrum konnten bereits positive Effekte auf den Verlauf der DSS-induzierten Kolitis im Mausmodell nachgewiesen werden [32]. Deshalb wurden nun die Effekte für sIgA und Lactoferrin betrachtet. Auch für diesen Versuchsansatz wurden Tiere mit einem Durchschnittsgewicht von  $30 \text{ g}$  im Alter von acht bis zwölf Wochen in die Versuchsgruppen eingeteilt. Es wurde keine weitere NaCl-Gruppe gebildet, sondern die Werte aus dem therapeutischen Versuchsansatz als Referenz verwendet.

Der Versuchsaufbau sah vor, dass den Tieren 14 Tage vor Beginn der Kolitisinduktion die Versuchssubstanzen einmal täglich verabreicht wurden. Mit Beginn der dann folgenden 7-tägigen DSS-Gabe wurden Gewichts- und Stuhlprotokolle erstellt. An Tag 8 wurde die 5%ige DSS-Lösung wieder durch Trinkwasser ersetzt. Weitere Daten wurden bei der Aufarbeitung der Tiere an Tag 15 gewonnen.

#### 4.2.1. Gewichtsverlauf

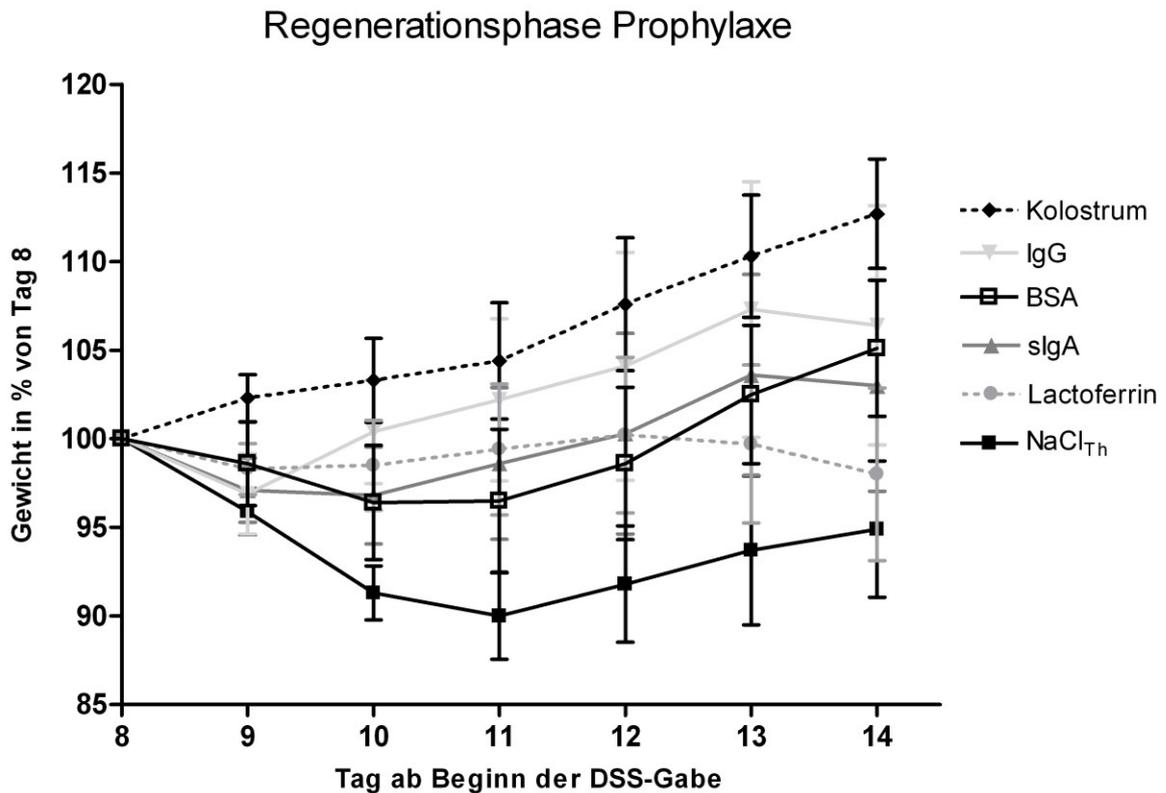
Der Gewichtsverlauf wurde analog zu dem des therapeutischen Versuchsansatzes protokolliert und abgebildet.

Während der DSS-Gabe verloren die Tiere bis zum Tag 8 durchschnittlich  $11,8 \pm 0,7$  % ihres Ausgangsgewichts. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die Gewichtsverläufe sind in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Gewichtsverlauf während akuter DSS-induzierter Kolitis.** Ohne Prophylaxe (NaCl<sub>Th</sub>) sowie nach prophylaktischer Gabe von 60 µg sIgA/Tier, 60 µg IgG/Tier, 100 µl Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8). Die Gewichtsänderung ist prozentual gegenüber den Ausgangswerten für Tag 1 angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit nonparametrischer Varianzanalyse nach dem ANOVA-Modell ermittelt. Dargestellt sind die MW im Verlauf ± SEM.

Danach wurden die Gewichte zur Darstellung der Regenerationsphase für Tag 8 wieder gleich 100 % gesetzt (siehe Abbildung 18). Es zeigte sich, dass die prophylaktische Gabe von Kolostrum ab Tag 8 zu einer kontinuierlichen Gewichtszunahme führt.

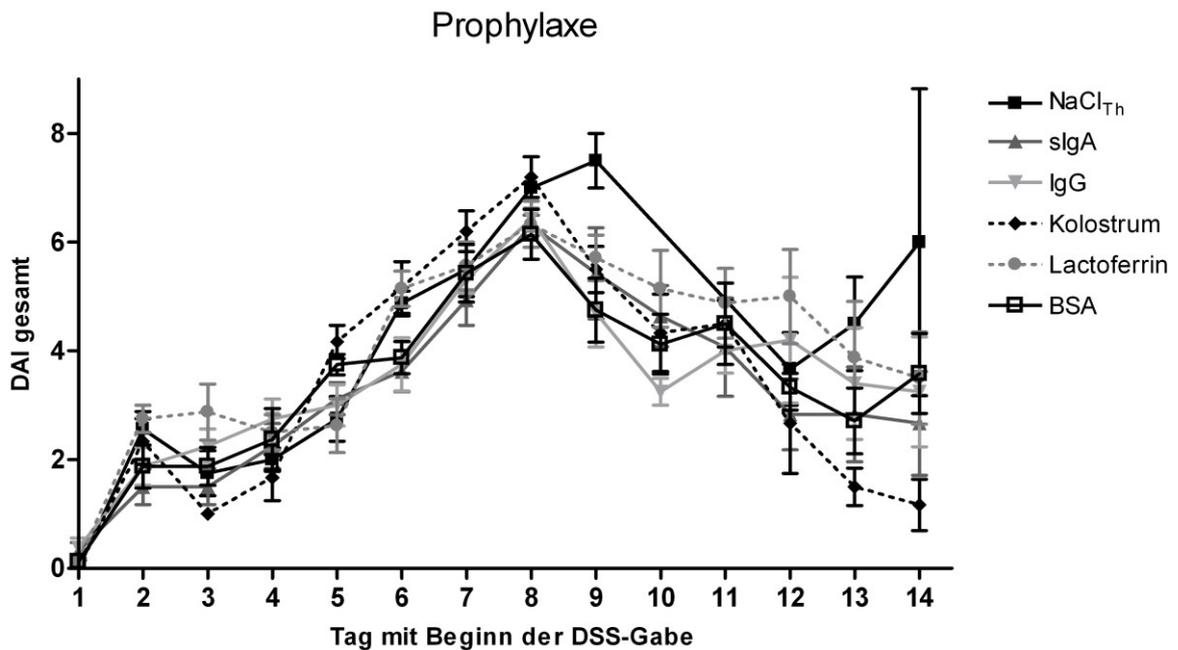


**Abbildung 18: Gewichtsverlauf während der Regenerationsphase nach akuter DSS-induzierter Kolitis.** Ohne Prophylaxe (NaCl<sub>Th</sub>) sowie nach prophylaktischer Gabe von 60 µg sIgA/Tier, 60 µg IgG/Tier, 100 µl Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8). Die Gewichtsänderung ist prozentual gegenüber den Ausgangswerten für Tag 8 angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit nonparametrischer Varianzanalyse nach dem ANOVA-Modell ermittelt. Dargestellt sind die MW im Verlauf ± SEM.

Die so behandelte Versuchsgruppe konnte ihr Gewicht auf  $112,7 \pm 3,1$  % an Tag 14 steigern. Damit ergab sich für Kolostrum ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,001$  gegenüber der NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe. sIgA und Lactoferrin konnten die Gewichtszunahme gegenüber den Kontrollsubstanzen nicht signifikant erhöhen. Dagegen zeigte die IgG-Gruppe in ihrem Verlauf einen signifikanten Unterschied gegenüber NaCl<sub>Th</sub> ( $p < 0,05$ ). Insgesamt setzte die Gewichtszunahme im prophylaktischen Versuchsansatz etwa 1 bis 2 Tage früher ein als im therapeutischen Ansatz.

#### 4.2.2. Klinischer Disease Activity Index

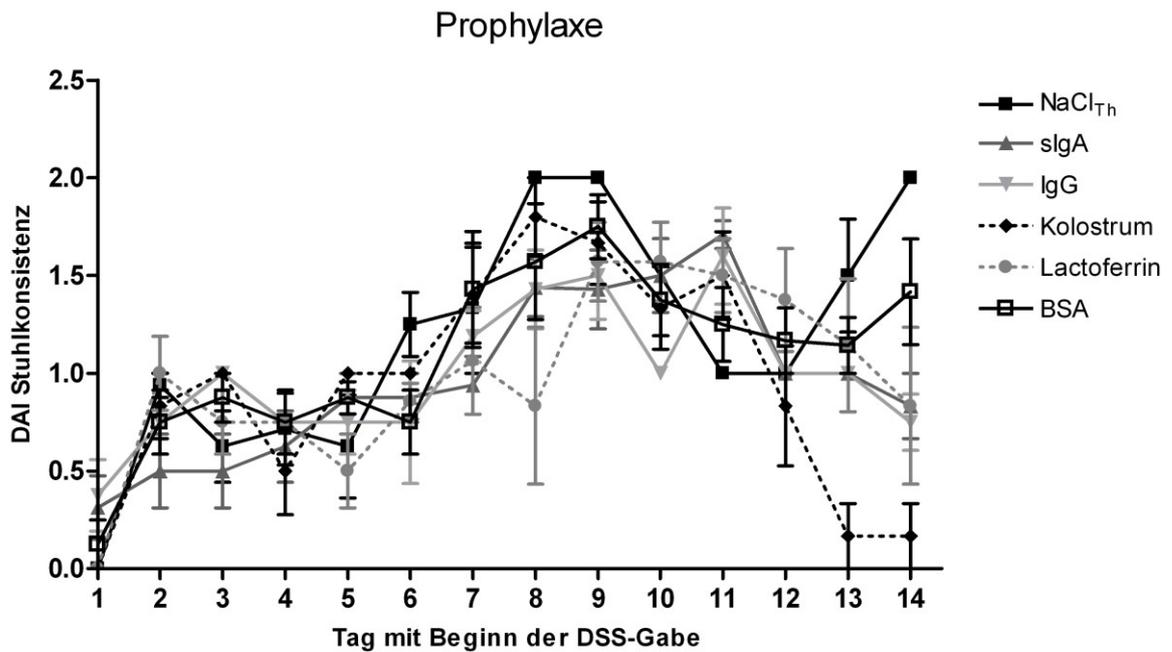
Der DAI wurde im prophylaktischen Versuchsansatz von Tag 1 bis 14 erhoben. Täglich wurden auch hier Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz und die Ausscheidung von okkultem Blut protokolliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.



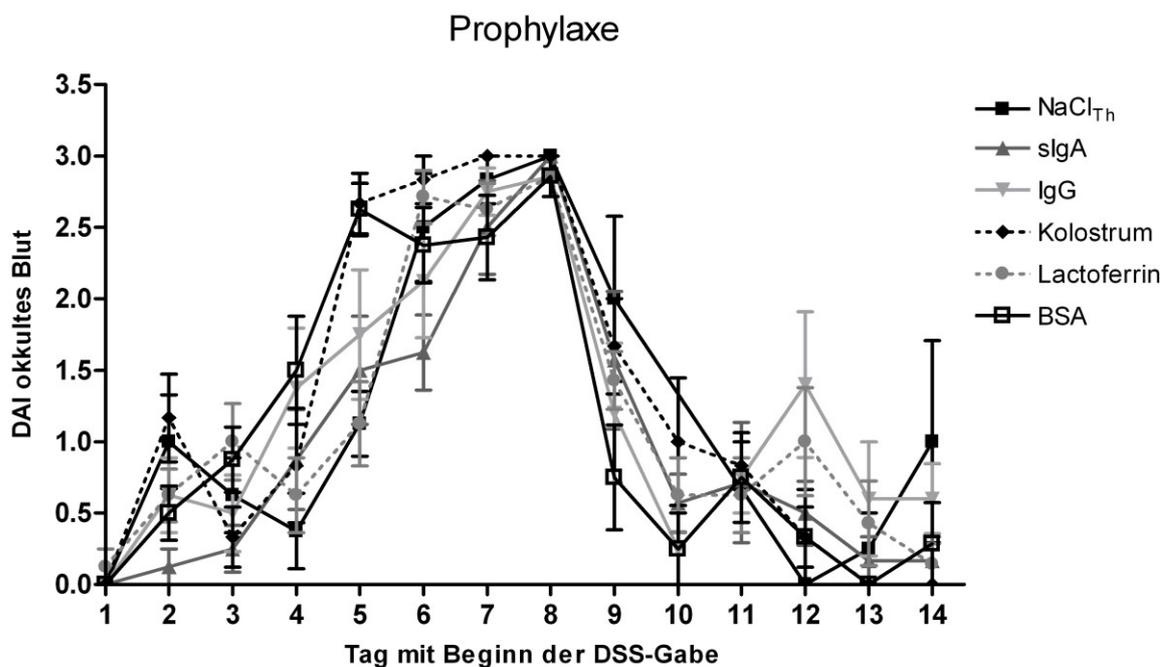
**Abbildung 19: Disease Activity Index während DSS-induzierter Kolitis.** Ohne Prophylaxe (NaCl<sub>Th</sub>) sowie nach prophylaktischer Gabe von 60 µg sIgA/Tier, 60 µg IgG/Tier, 100 µl Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8).

Der DAI wurde täglich ermittelt. Statistische Signifikanz wurde mit nonparametrischer Varianzanalyse nach dem ANOVA-Modell ermittelt. Dargestellt sind die MW im Verlauf ± SEM.

Die Kolostrum-Gruppe erreichte zum Ende der Regenerationsphase mit 1,5 (Tag 13) und 1,2 Punkten (Tag 14) die niedrigsten Werte des Gesamt-DAI. Es zeigte sich im Verlauf des Gesamt-DAI ein signifikanter Unterschied von  $p < 0,05$  zwischen dieser und den BSA-, Lactoferrin- und IgG-Gruppen. Auch gegenüber der NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe kann Kolostrum die Stuhlkonsistenz verbessern ( $p < 0,001$ ) sowie okkulte Blutungen verringern ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 20). Weiterhin fanden sich geringere Mengen an okkultem Blut bei den Tieren der sIgA-Gruppe ( $p < 0,01$  vs. IgG). Der Gesamt-DAI unterscheidet sich zwischen sIgA- bzw. Lactoferrin-behandelten Mäusen und ihren Kontrollgruppen nicht signifikant im Verlauf.



A

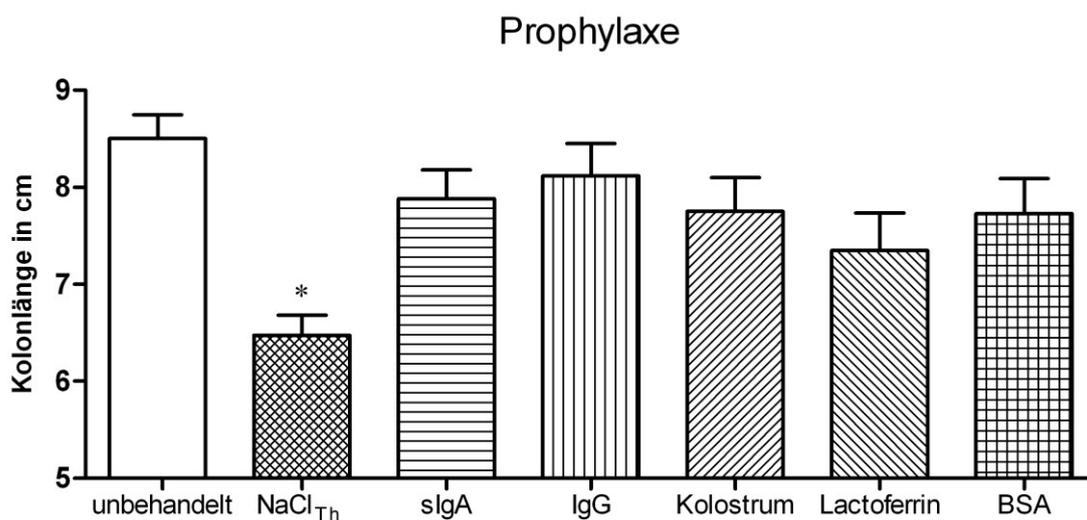


B

**Abbildung 20: Veränderung von Stuhlkonsistenz (A) und okkultes Blutung (B) während DSS-induzierter Kolitis.** Ohne Prophylaxe ( $\text{NaCl}_{\text{Th}}$ ) sowie nach prophylaktischer Gabe von  $60 \mu\text{g}$  slgA/Tier,  $60 \mu\text{g}$  IgG/Tier,  $100 \mu\text{l}$  Kolostrum/Tier,  $0,4 \text{ mg}$  Lactoferrin/Tier bzw.  $0,4 \text{ mg}$  BSA/Tier ( $n = 5-8$ ). Der DAI wurde täglich ermittelt. Statistische Signifikanz wurde mit nonparametrischer Varianzanalyse nach dem ANOVA-Modell ermittelt. Dargestellt sind die MW im Verlauf  $\pm$  SEM.

### 4.2.3. Kolonlänge

Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte auch im prophylaktischen Versuchsansatz an Tag 15. Zunächst wurde wieder das Kolon als Ganzes entnommen und vermessen. Abbildung 21 zeigt die Mittelwerte der Darmlängen  $\pm$  Standardfehler.

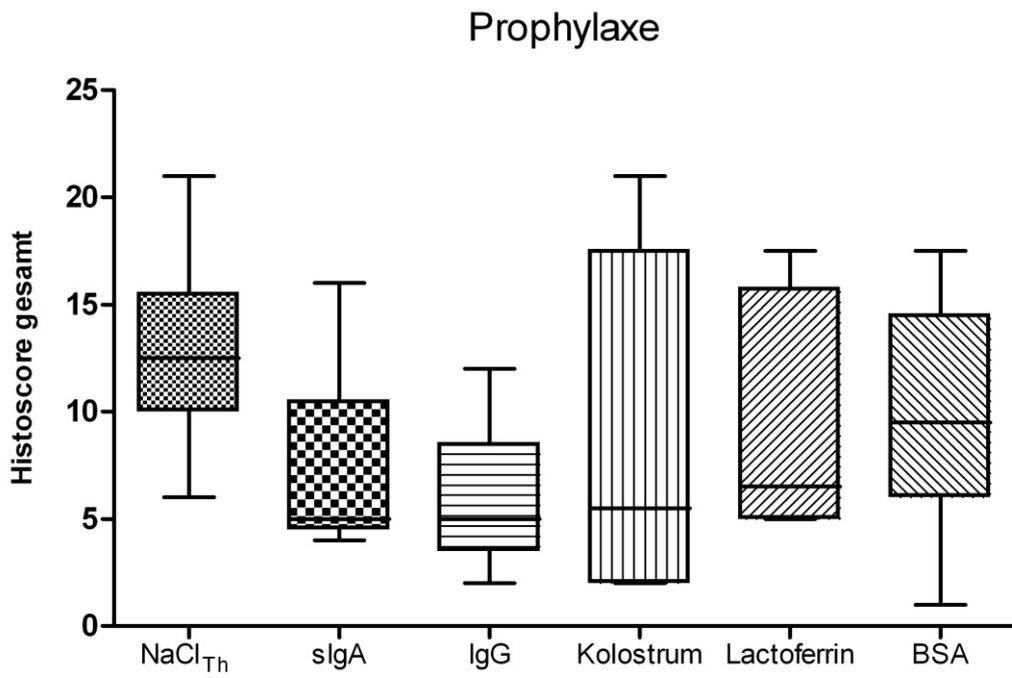


**Abbildung 21: Kolonlängen** von unbehandelten Tieren (n = 12) und Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis an Tag 15 ohne Prophylaxe (NaCl<sub>Th</sub>) sowie nach prophylaktischer Gabe von 60  $\mu$ g sIgA/Tier, 60  $\mu$ g IgG/Tier, 100  $\mu$ l Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM; \* p < 0,01 vs. unbehandelt.

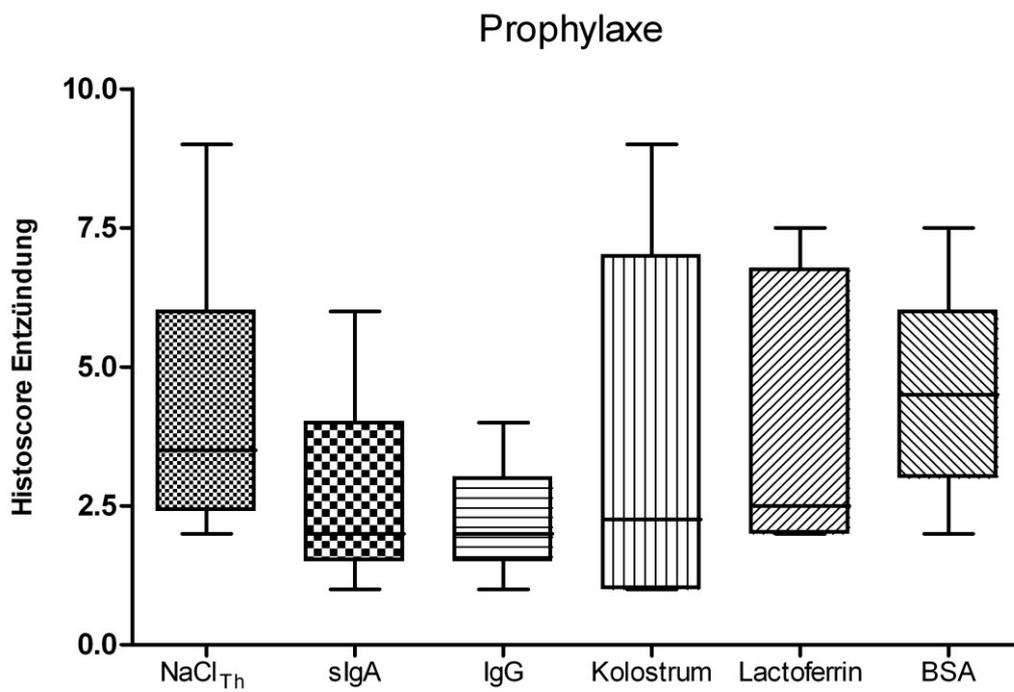
Die Verkürzung der Kolonlängen fiel bei allen Gruppen im Vergleich zur NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe geringer aus. Zwischen den prophylaktisch verabreichten Versuchssubstanzen zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede. Die geringste Darmverkürzung wiesen dabei die Gruppen sIgA (7,9  $\pm$  0,3 cm) und IgG (8,1  $\pm$  0,3 cm) auf.

### 4.2.4. Histologie

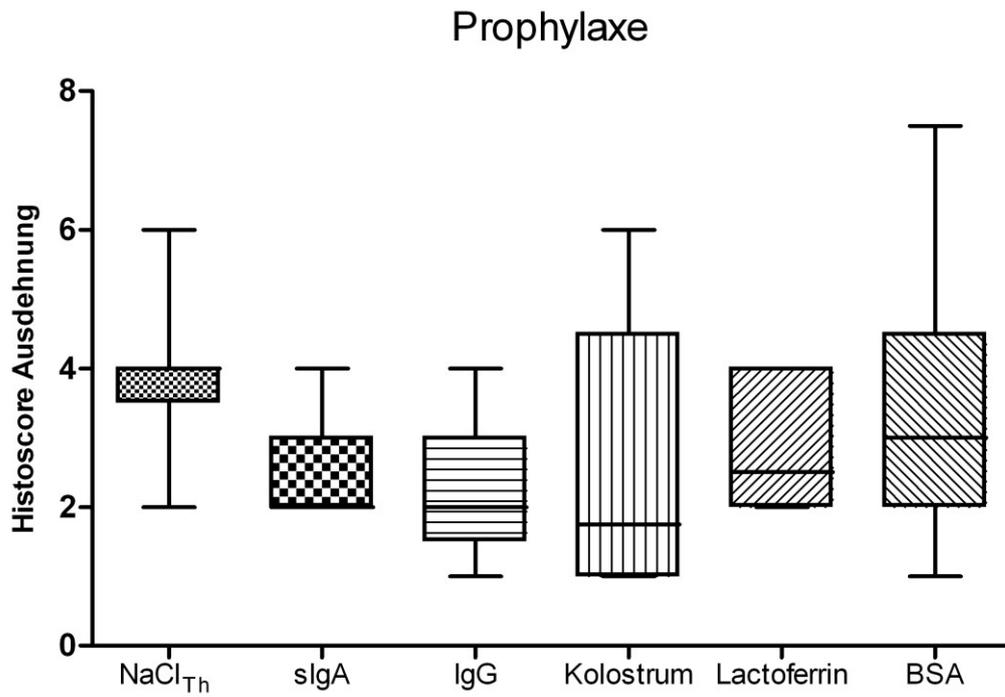
Auch im prophylaktischen Versuchsansatz erfolgte nach der Entnahme des Kolons an Tag 15 eine histologische Beurteilung anhand von H.E.-gefärbten Schnitten.



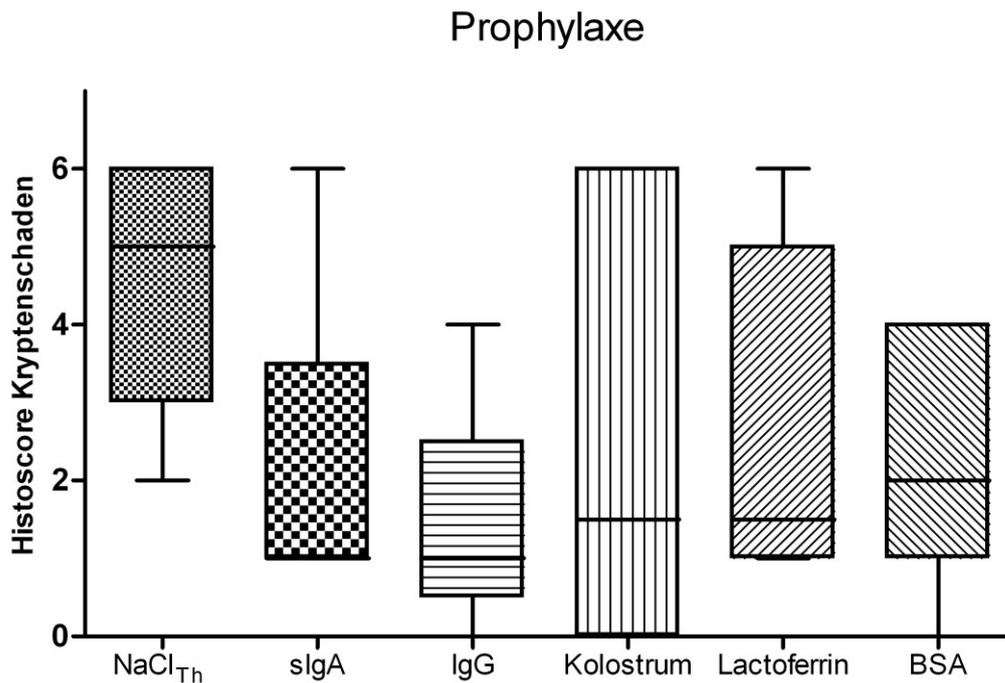
A



B



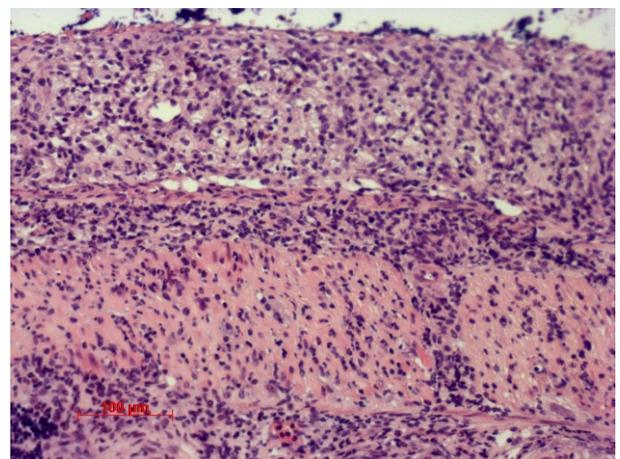
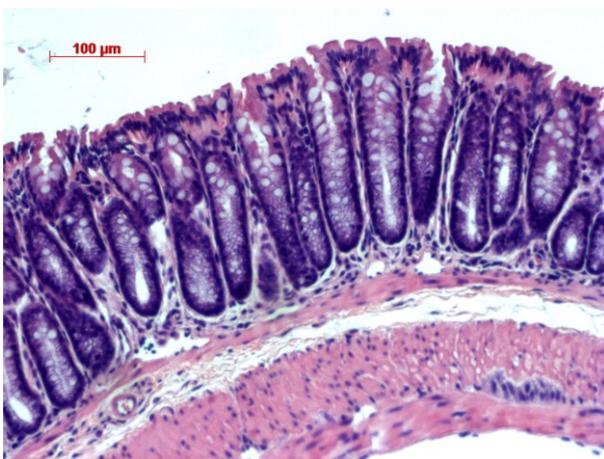
C



D

**Abbildung 22: Histologischer Score dargestellt als Gesamtscore (A), Entzündung (B), Ausdehnung (C) und Kryptenschaden (D) nach akuter DSS-induzierter Kolitis.** Ohne Prophylaxe (NaCl<sub>Th</sub>) sowie nach prophylaktischer Gabe von 60 µg sIgA/Tier, 60 µg IgG/Tier, 100 µl Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind der Median und die Streuung der Ergebnisse.

Für Kolostrum und die Immunglobuline wurden die niedrigsten Scores ermittelt. Aufgrund der breiten Streuung der Ergebnisse ließen sich zwischen den einzelnen Gruppen aber keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Bei der Beurteilung von Schwere und Ausdehnung der Entzündung und Kryptenschäden im Einzelnen, zeigt sich ein ähnliches Bild. Wie schon bei den Kolonlängen zu sehen, sind die Schäden durch den Entzündungsprozess am Darmgewebe insgesamt geringer als bei der therapeutischen Gabe der Testsubstanzen. Insbesondere fiel hierbei der Kryptenschaden schwächer aus. Abbildung 23 zeigt beispielhaft einen leichten Kryptenschaden mit geringem Kriptenverlust (A) und ein stark geschädigtes Darmepithel mit komplettem Kriptenverlust und Oberflächendefekt sowie einer Durchsetzung mit entzündlichen Infiltraten, welche bis in die Muscularis reichen (B).

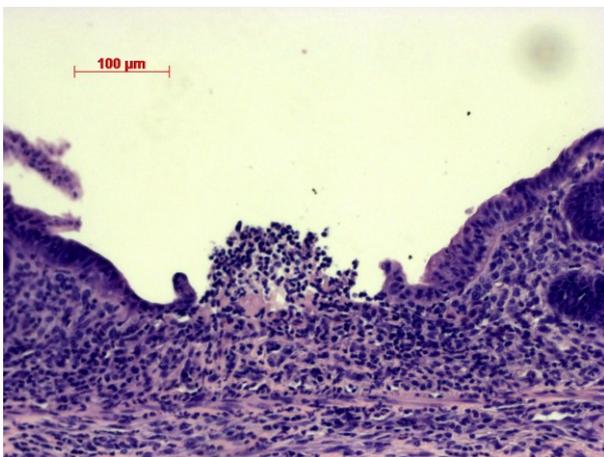


**A**

**B**

**Abbildung 23:** Leicht (A) und stark (B) geschädigtes Darmepithel. Beschreibung siehe Text.

Die Regeneration des Darmepithels ist im prophylaktischen Versuchsansatz weiter vorangeschritten. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 24 eine beginnende Reepithelialisierung (A) sowie eine fast vollständige Kriptenregeneration (B) mit erkennbarer Becherzellhyperplasie und Kryptenelongation dargestellt.



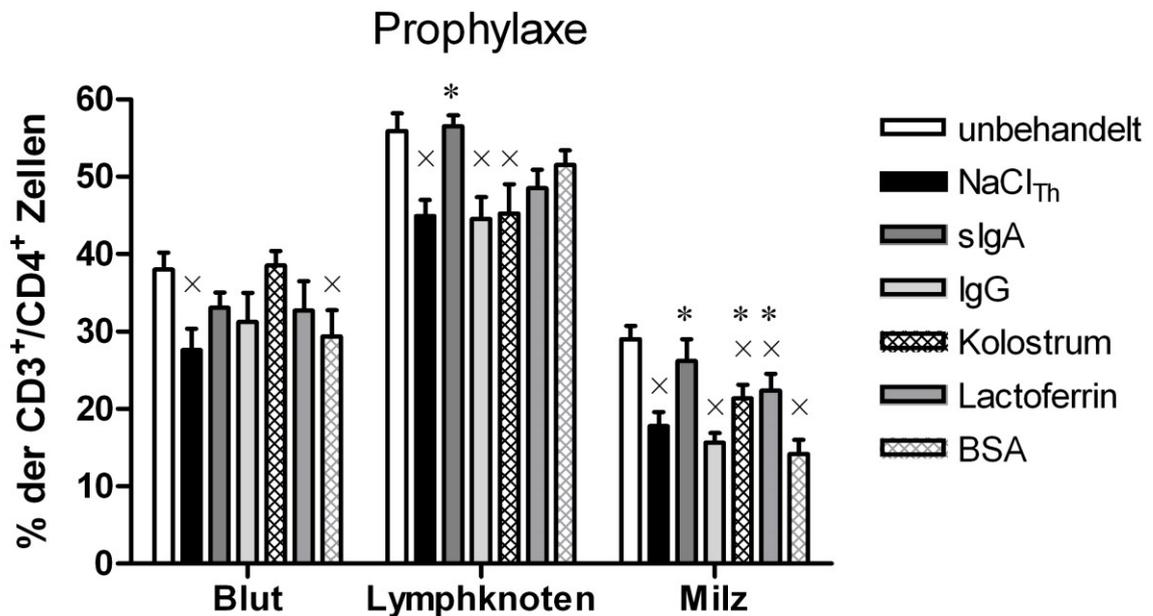
**A**

**B**

**Abbildung 24:** Beginnende Reepithelialisierung (A) und fast vollständige Kriptenregeneration (B)

#### 4.2.5. Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

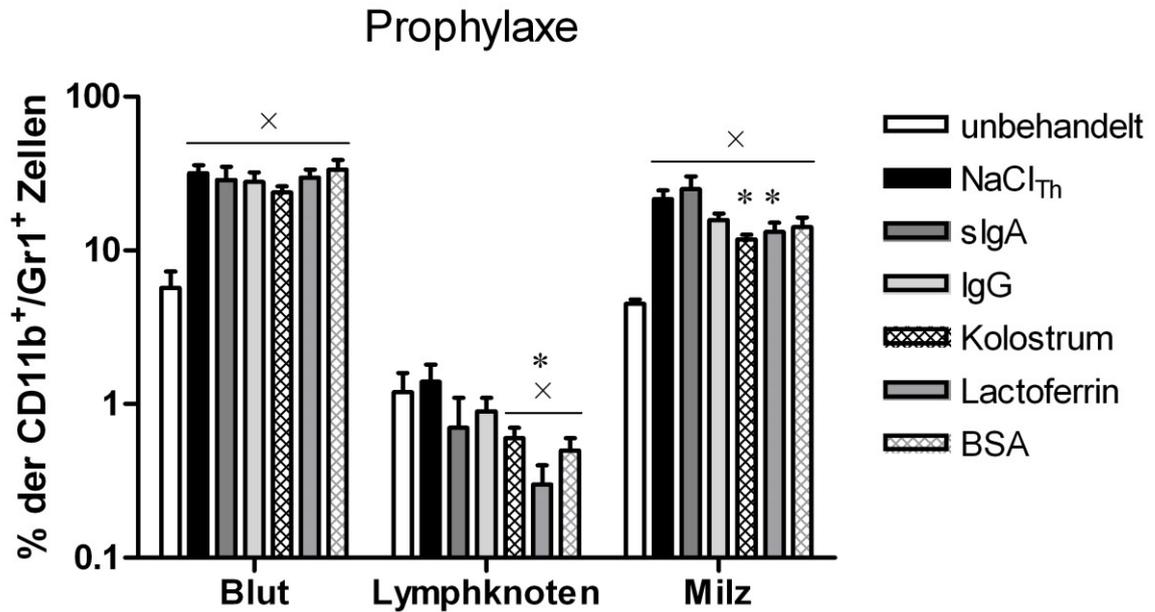
Es wurden Leukozyten aus Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz isoliert und durchflusszytometrisch analysiert.



**Abbildung 25:** Anteil der CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz von unbehandelten Tieren (n=12) und Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis an Tag 15 ohne Prophylaxe (NaCl<sub>Th</sub>) sowie nach prophylaktischer Gabe von 60 µg sIgA/Tier, 60 µg IgG/Tier, 100 µl Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SEM; × p < 0,05 vs. unbehandelt; \* p < 0,05 vs. NaCl<sub>Th</sub>.

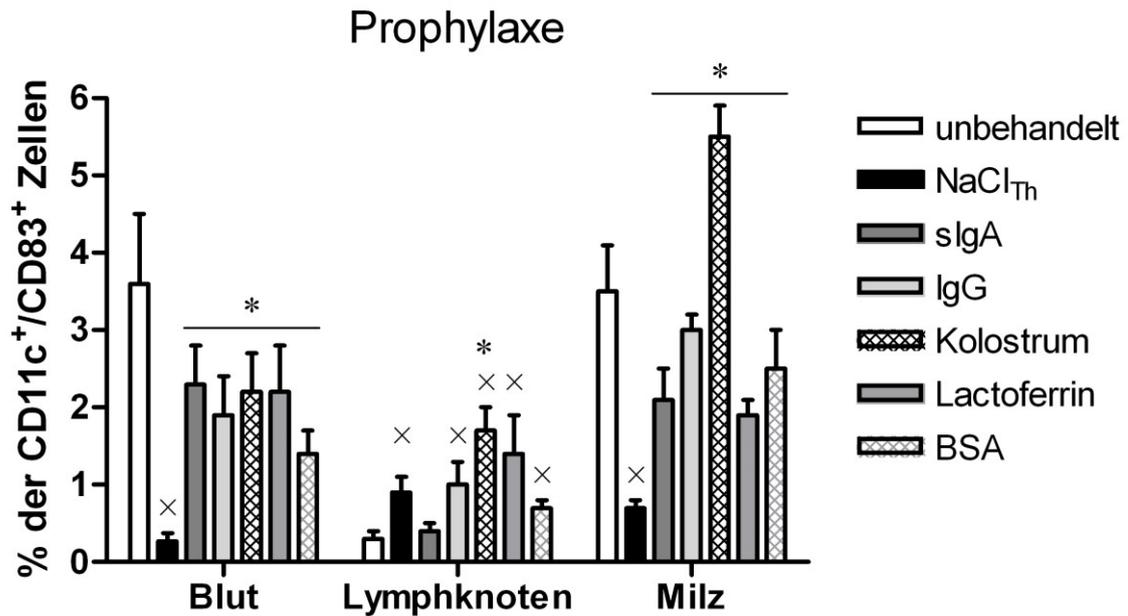
Der Anteil an T-Helferzellen nahm unter der DSS-Kolitis im Lymphknoten- und Milzgewebe gegenüber gesunden Kontrolltieren signifikant ab ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 25). Des Weiteren führte auch die prophylaktische Gabe von IgG oder Kolostrum zu einer Verringerung der Zellpopulation im Lymphknotengewebe ( $p < 0,05$ ). Dagegen stieg der Anteil dieser Population bei vorbeugender sIgA-Gabe sowohl in Lymphknoten- als auch in Milzgewebe signifikant gegenüber der NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe an ( $p < 0,01$ ). Auch Kolostrum und Lactoferrin hatten diesen Effekt auf die T-Lymphozyten des Milzgewebes.

Die Zahl der CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup> Blut- und Milzleukozyten stieg unter Entzündung im Vergleich zu unbehandelten Tieren an ( $p < 0,05$ ). Dabei bedingte die prophylaktische Gabe von Kolostrum den geringsten Anstieg der MDSC-Population in Blut und Milzgewebe (siehe Abbildung 26).



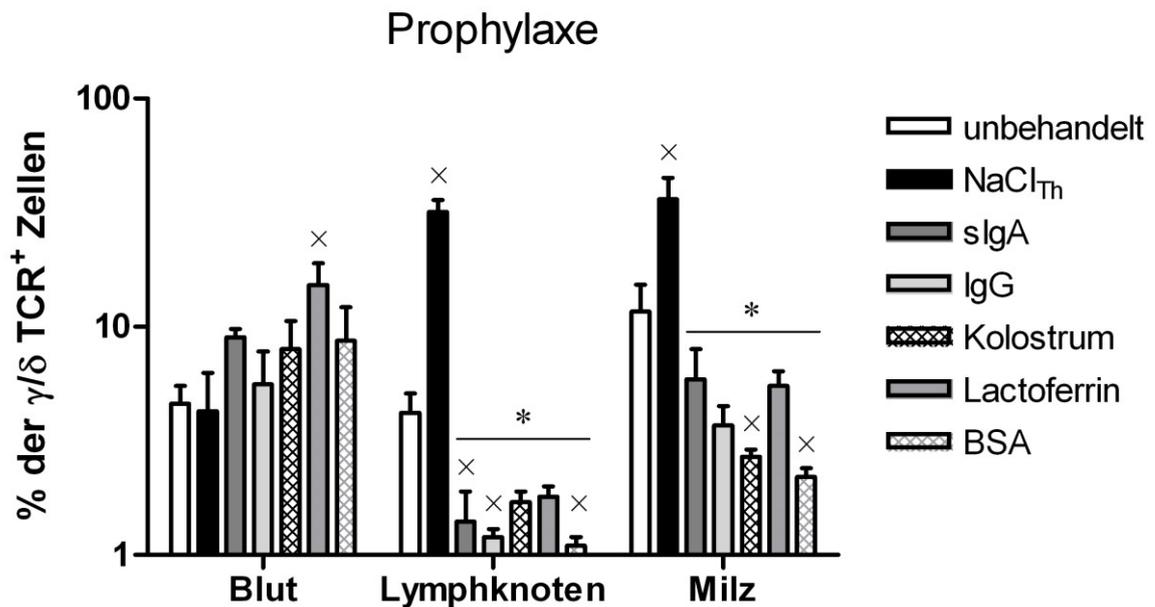
**Abbildung 26:** Anteil der CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz von unbehandelten Tieren ( $n = 12$ ) und Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis an Tag 15 ohne Prophylaxe (NaCl<sub>Th</sub>) sowie nach prophylaktischer Gabe von 60 µg sIgA/Tier, 60 µg IgG/Tier, 100 µl Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier ( $n = 5-8$ ). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SEM; ×  $p < 0,05$  vs. unbehandelt; \*  $p < 0,05$  vs. NaCl<sub>Th</sub>.

In Abbildung 27 ist die Verteilung der CD11c<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> Zellen, der reifen dendritischen Zellen, dargestellt. Die prophylaktische Gabe der Versuchssubstanzen ergab keine signifikanten Unterschiede zu den Blut- und Milzgewebeprobe gesunder Kontrolltiere. Bei der Untersuchung der intestinalen Lymphknoten zeigte sich, dass mit Ausnahme von sIgA alle Versuchssubstanzen den Anteil CD11c<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> Zellen signifikant ansteigen lassen (p < 0,05 vs. unbehandelt).



**Abbildung 27: Anteil der CD11c<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> Zellen** an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz von unbehandelten Tieren (n = 12) und Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis an Tag 15 ohne Prophylaxe (NaCl<sub>Th</sub>) sowie nach prophylaktischer Gabe von 60 µg sIgA/Tier, 60 µg IgG/Tier, 100 µl Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SEM; × p < 0,05 vs. unbehandelt; \* p < 0,05 vs. NaCl<sub>Th</sub>.

Abbildung 28 zeigt den Anteil  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen in den verschiedenen Geweben.

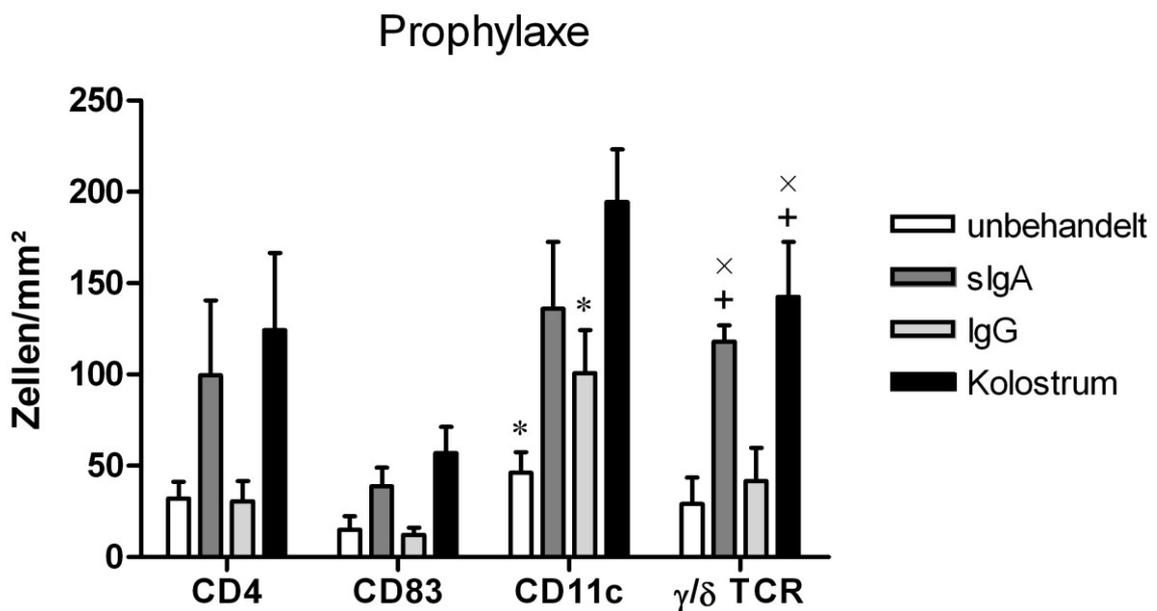


**Abbildung 28:** Anteil der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz von unbehandelten Tieren (n = 12) und Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis an Tag 15 ohne Prophylaxe (NaCl<sub>Th</sub>) sowie nach prophylaktischer Gabe von 60  $\mu$ g sIgA/Tier, 60  $\mu$ g IgG/Tier, 100  $\mu$ l Kolostrum/Tier, 0,4 mg Lactoferrin/Tier bzw. 0,4 mg BSA/Tier (n = 5-8). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM;  $\times$  p < 0,05 vs. unbehandelt; \* p < 0,05 vs. NaCl<sub>Th</sub>.

Im prophylaktischen Versuchsansatz wurden für den Anteil  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen in den intestinalen Lymphknoten signifikant geringere Werte unter Einfluss von sIgA, IgG und BSA erreicht (p < 0,05 vs. unbehandelt). Im Milzgewebe galt dies ebenfalls für BSA sowie für Kolostrum (p < 0,05 vs. unbehandelt). Im Blut wurden signifikant höhere Werte bei prophylaktischer Behandlung mit Lactoferrin gemessen (p < 0,05 vs. unbehandelt).

#### 4.2.6. Immunhistochemie

Zur genaueren Charakterisierung der entzündlichen Infiltrate im Darmgewebe wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. Dabei wurden die unbehandelten Tiere ohne Kolitis mit den prophylaktisch behandelten Gruppen sIgA, IgG und Kolostrum verglichen (siehe Abbildung 29). Untersucht wurde die Anzahl CD4-, CD83-, CD11c- und  $\gamma/\delta$ -TCR-positiver Zellen/mm<sup>2</sup>.



**Abbildung 29: CD4-, CD83-, CD11c- und  $\gamma/\delta$ -TCR-positiver Zellen/mm<sup>2</sup> nach immunhistochemischer Färbung** von unbehandelten Tieren und Mäusen nach prophylaktischer Gabe von 60  $\mu$ g sIgA/Tier, 60  $\mu$ g IgG/Tier bzw. 100  $\mu$ l Kolostrum/Tier (n = 5-6). Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SEM; \* p < 0,05 vs. Kolostrum; × p < 0,05 vs. unbehandelt; + p < 0,05 vs. IgG.

Tendenziell zeigt sich ein ähnliches Immigrationsverhalten der Entzündungszellen in den Gruppen sIgA und Kolostrum. Beide Gruppen erreichen eine signifikant höhere Anzahl  $\gamma/\delta$ -TCR-positiver Zellen/mm<sup>2</sup> als die unbehandelten und IgG-Tiere. Des Weiteren sind in der Kolostrum-Gruppe signifikant mehr CD11c<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> zu finden als in der IgG-Gruppe oder bei den unbehandelten Tieren.

Im ersten Teil der Versuche konnte mit der therapeutischen Gabe von sIgA die schnellste und höchste Gewichtszunahme erreicht werden. Dies spiegelte sich nicht in den Untersuchungen von DAI, Kolonlänge und histologischem Score wider. In den FACS-Analysen zeigten sich nur wenige signifikante Unterschiede zu den anderen Versuchsgruppen, darunter ein Anstieg in der Anzahl reifer dendritischer Zellen im Milzgewebe.

Prophylaktisch verabreicht konnte Kolostrum sowohl den Gewichtsverlauf als auch den klinischen DAI positiv beeinflussen. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten ein ähnliches Verhalten der Immunzellen bei sIgA- oder Kolostrum-Gabe an die Versuchstiere.

## 5. DISKUSSION

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sind nicht nur von sozioökonomischer und gesundheitspolitischer Bedeutung, sondern stellen für hunderttausende Betroffene alleine in Deutschland auch eine schwerwiegende Einschränkung ihrer Lebensqualität dar. Da es bislang noch keine kurative medikamentöse Therapie für CED gibt, müssen die meist noch jungen Patienten über Jahrzehnte mit zum Teil schwerwiegenden Komplikationen ihrer Erkrankung leben. Die bisher verfügbaren Medikamente müssen in der Regel über Jahre hinweg eingenommen werden und sind aufgrund ihrer Nebenwirkungen für die Betroffenen eine große Belastung. Deshalb wird seit Längerem intensiv nach verträglicheren medikamentösen Alternativen auch im Bereich der Komplementärmedizin gesucht.

In einer Studie von Bodammer et al. konnten positive Effekte von prophylaktisch verabreichtem bovinem Kolostrum auf eine DSS-induzierte Kolitis im Tiermodell gezeigt werden [32]. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit zum einen untersucht werden, welche wirksamen Einzelkomponenten für die positiven Effekte des Kolostrums verantwortlich sind, und zum anderen die therapeutische Anwendung von Kolostrum und seinen Einzelkomponenten analysiert werden. Mit Hilfe eines therapeutischen und eines prophylaktischen Versuchsansatzes sollte der Sachverhalt eines akuten Entzündungsschubes sowie eine Remissionssituation vor einem erneuten Krankheitsschub nachgebildet werden. Als Einzelkomponenten des bovines Kolostrums wurden das sekretorische Immunglobulin A und das antibakteriell wirksame Lactoferrin im Vergleich zu Kolostrum selbst untersucht. Als Kontrollen dienten eine physiologische Kochsalzlösung, Immunglobulin G und bovines Serumalbumin. Die Krankheitsverläufe wurden durch Verfahren der Biometrie, Histologie, Immunhistochemie und Durchflusszytometrie analysiert.

### 5.1. Tiermodelle zur Analyse der CED-Therapie und -Prophylaxe

Die Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen resultiert aus dem pathologischen Zusammenspiel von genetischen, immunologischen, Umwelt- und Barrierefaktoren im Darm. Vor dem Hintergrund dieser komplexen Pathogenese entstand in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl tierexperimenteller Modelle [54]. Die Modelle von Okayasu [33] und Neurath [34] setzen dabei zur Kolitisinduktion die direkte Darmschädigung durch die Substanzen DSS beziehungsweise TNBS ein. Die Untersuchungen an Knockout-Modellen, wie z.B. dem IL2<sup>-/-</sup>

oder IL10<sup>-/-</sup>-Modell, liefern wichtige Erkenntnisse zur Relevanz einzelner Gene für die Pathogenese der CED. Auch immunologische Tiermodelle, wie der Transfer CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup>-Zellen auf immundefiziente Mäuse, kommen zur Anwendung.

Das in dieser Arbeit verwendete DSS-Kolitismodell basiert auf einer Schädigung der Darmbarriere durch die orale Applikation der Chemikalie Dextransulfat. Es zeichnet sich durch seine einfache Handhabung und eine gute Reproduzierbarkeit aus [54]. Das DSS-Modell wird daher häufig zur Untersuchung potentieller Therapeutika bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen verwendet. In mehreren Arbeiten konnte das Modell auch für NMRI-Mäuse etabliert werden [32] [55] [56]. Dabei wurden zur Kolitisinduktion DSS-Lösungen in einer Konzentration von 3-5 % verwendet. In der vorliegenden Arbeit kam eine 5%ige DSS-Lösung zur Anwendung, welche den Tieren für sieben Tage anstelle des Trinkwassers dargeboten wurde.

Durch das Eindringen luminaler Antigene über das geschädigte Darmepithel kommt es zu einer CED-ähnlichen Entzündung des Darms. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten die durch DSS geschädigten Tiere die bereits 1990 durch Okayasu et al. beschriebenen klinischen Symptome. Dazu zählen blutige Durchfälle und ein damit einhergehender Gewichtsverlust. Die ersten Tiere zeigten bereits zwei Tage nach Beginn der DSS-Applikation eine Veränderung ihrer Stuhlkonsistenz sowie okkultes Blut im Stuhl. Innerhalb einer Woche sank das Gewicht der Tiere der NaCl-Kontrollgruppe deutlich um etwa  $11,6 \pm 1,2$  %. Es konnten ebenfalls typische histologische Veränderungen, wie lymphozytäre Infiltrate und Kryptenschäden, an den mit DSS behandelten Tieren nachgewiesen werden. Für die Beschreibung klinischer und histologischer Veränderungen der behandelten Tiere im Krankheitsverlauf standen für die DSS-Kolitis gut validierte Scores zu Verfügung [48] [49].

Das DSS-Modell basiert auf einer primär chemischen Schädigung der Darmbarriere. Dies führt erst sekundär zu einer spezifischen lymphozytenvermittelten Immunreaktion. Potentielle Therapeutika müssen ihren Nutzen dann auch in den meist aufwendigeren T-Zell-abhängigen Tiermodellen unter Beweis stellen, wie z.B. dem IL10<sup>-/-</sup>-Modell, welches durch eine gesteigerte Aktivität der Th1- und Th2-Lymphozyten charakterisiert ist. Zur Beurteilung von mukosaler Regeneration, Beeinflussung der Darmbarriere und Auswirkung auf die Entzündungsaktivität durch die verwendeten Präparate ist das DSS-Tiermodell aber durchaus geeignet [54].

## 5.2. Effekte durch die Induktion der Kolitis

Mit der Nutzung des DSS-Kolitismodells lassen sich verschiedene Teilaspekte chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen betrachten. Zunächst wurde der Einfluss der DSS-Gabe auf die einzelnen Parameter untersucht. Die Reduktion des Körpergewichts um  $11,6 \pm 1,2$  % in der NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe innerhalb von sieben Tagen bestätigt die Wirksamkeit der DSS-Lösung zur Kolitisinduktion. Der zunehmende Gewichtsverlust ist auch ein typisches Symptom betroffener CED-Patienten.

Zur Bestimmung der Krankheitsaktivität wurden für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen verschiedene Aktivitätsindices, wie z.B. der Crohn's Disease Activity Index oder der Mayo-Score entwickelt [57] [58]. In Anlehnung daran berücksichtigt der klinische DAI, beschrieben durch Cooper et al., den prozentualen Gewichtsverlust der Versuchstiere, das Auftreten von okkultem Blut im Stuhl und die Stuhlkonsistenz [48]. Ein höherer DAI ist nach Cooper et al. verbunden mit dem Auftreten entzündlicher Veränderungen des Kolons. Bereits ab Tag 2 zeigten die Tiere in allen Gruppen erste Spuren von Blutbeimengungen im Stuhl sowie Stuhlerweichungen. Die NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe erreichte nach sieben Tagen einen DAI von  $5,5 \pm 1,2$  bei einer maximal möglichen Punktzahl von 10.

Des Weiteren kommt es durch rezidivierende Entzündungs- und Vernarbungsprozesse unter der DSS-Kolitis, wie schon durch Okayasu et al. beschrieben, zu einer Verkürzung des Dickdarms [33]. Erwartungsgemäß führte die Kolitisinduktion innerhalb von 15 Tagen zu einer signifikanten Reduktion der Darmlänge der Versuchstiere von durchschnittlich  $8,5 \pm 0,25$  cm auf  $6,5 \pm 0,21$  cm ( $p < 0,01$  für unbehandelt vs. NaCl<sub>Th</sub>).

Für die Beurteilung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ist ebenfalls die mikroskopische Bewertung des Darmgewebes der Patienten von Bedeutung. Dementsprechend wurden auch die Därme der Versuchstiere in der beschriebenen Art und Weise aufgearbeitet und unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Zur Einschätzung des Schweregrades der Entzündung wurde der histologische Score nach Dieleman et al. [49] in modifizierter Form verwendet. Er erfasst die Schwere und Ausdehnung der Entzündung sowie den Umfang des Kryptenschadens. In Folge der Kolitisinduktion zeigten die Därme der Versuchstiere die durch Dieleman et al. beschriebenen typischen Veränderungen: Es trat ein Verlust der Krypten bis hin zum kompletten Epithelverlust auf. Entzündliche Infiltrate von unterschiedlichem Schweregrad drangen zum Teil bis in die Schicht der Muscularis vor. Zudem ließen sich Lymphknotenhyperplasien und eine gestörte Kriptenarchitektur nach Epithelregeneration nachweisen.

Zur Beurteilung des Einflusses der Therapiesubstanzen auf das Immunsystem der Versuchstiere wurden ausgewählte Leukozytenpopulationen mit Hilfe der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie quantifiziert. Zunächst wurde die Anzahl der T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen in den Kompartimenten Blut, Milz und mesenteriale Lymphknoten untersucht. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ohne Kolitis sanken die Zellzahlen in allen Kompartimenten nach Kolitisinduktion. Es ist bekannt, dass im Zuge einer Aktivierung des Darmimmunsystems die Zahl der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der Darmschleimhaut ansteigt [59] [60]. Auch konnte eine erhöhte Anzahl aktivierter CD8<sup>+</sup> Zellen bei aktiver Kolitis durch Kappeler & Müller nachgewiesen werden [61]. Somit ist bei gleichzeitig anhand der histologischen Präparate beobachteter lymphozytärer Infiltration ein Auswandern der T-Lymphozyten in das Darmgewebe zu vermuten.

Es wurde des Weiteren das Verhalten der CD11c<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> reifen dendritischen Zellen in Blut, Milz und mesenterialen Lymphknoten untersucht. Ihre Bedeutung als Antigen-präsentierende Zellen für die adaptive Immunantwort ist bekannt [62]. Baumgart et al. fanden eine Korrelation zwischen der Kolitisaktivität und der Anzahl peripherer dendritischer Zellen [63]. Demnach nahmen diese zu Beginn der Entzündung signifikant ab. Diese Beobachtung konnte in dieser Studie im Mausmodell bestätigt werden: Durch die Kolitisinduktion nimmt der Anteil CD11c<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup>-markierter Zellen im Blut signifikant ab. Auch bei den Leukozyten der Milz ist diese Abnahme durch die Kolitisinduktion in allen Versuchsgruppen zu beobachten. Dagegen stieg ihr Anteil im Gewebe der mesenterialen Lymphknoten in der NaCl-Gruppe signifikant an. Andere Arbeitsgruppen postulieren eine erhöhte Anzahl aktivierter reifer dendritischer Zellen sowohl im peripheren Blut als auch in der Darmmukosa [64] [65].

$\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen nehmen im Darmgewebe einen proportional größeren Teil der T-Zell-Population ein als im übrigen Körper. Ihre Bedeutung als regulatorisch wirksame Zellpopulation ist seit längerem bekannt [66] [67] [68]. Die genauere Charakterisierung ihrer Funktionen ist noch Gegenstand der Forschung. Der Einfluss von  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen auf den Verlauf der DSS-induzierten Kolitis konnte von Tsuchiya et al. [69] gezeigt werden:  $\gamma/\delta$ -TCR-negative Mäuse entwickelten im Durchschnitt einen gravierenderen Verlauf der Darmentzündung. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass der Anteil der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen im Milz- und mesenterialen Lymphknotengewebe nach Kolitisinduktion gegenüber unbehandelten Tieren signifikant ansteigt. Dies entspricht den Beobachtungen von Bodammer et al. [32].

Die Kolitisinduktion an NMRI-Mäusen mittels DSS konnte in der vorliegenden Arbeit erfolgreich realisiert werden. Zusammenfassend verlief die Entwicklung der einzelnen Parameter analog zu den Beschreibungen der Fachliteratur.

### **5.3. Effekte von Kolostrum und seinen Komponenten im therapeutischen Ansatz**

Eine Verringerung des Gewichtsverlustes nach Kolitisinduktion bzw. das schnellere Wiedererreichen des Ausgangsgewichtes gilt als ein wichtiges Merkmal für die Wirksamkeit eines potentiellen Therapeutikums [48]. Ein positiver Effekt auf den Gewichtsverlauf konnte im therapeutischen Versuchsansatz für bovines Kolostrum nicht nachgewiesen werden. Die Gewichtskurve unterschied sich nicht signifikant von der der NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe. Die Untersuchungen zeigten den stärksten Anstieg des Körpergewichts in der sIgA-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich im Vergleich zur BSA-Gruppe ( $p < 0,01$ ) während der Regenerationsphase. Gegenüber der NaCl<sub>Th</sub>- konnte die sIgA-Gruppe den Gewichtsverlauf zumindest tendenziell verbessern ( $p = 0,077$ ). Einen ähnlichen, wenn auch nicht ganz so deutlichen, Effekt auf die Gewichtszunahme in der Regenerationsphase hatte die therapeutische Gabe von IgG ( $p < 0,05$  vs. BSA). Die Verabreichung von Lactoferrin hatte hingegen keinen günstigen Einfluss auf die Gewichtszunahme. Im Gegensatz zu Kolostrum wirken die therapeutisch verabreichten Immunglobuline durchaus positiv auf die Gewichtsentwicklung, wobei die Wirksamkeit bei der Anwendung von sekretorischem IgA deutlicher ist.

Für den Disease Activity Index ließen sich folgende Veränderungen beobachten: Die Kolostrum-Gruppe zeigte insgesamt niedrigere Indexwerte. Dabei wurden sowohl die Stuhlkonsistenz ( $p < 0,05$ ) als auch das Auftreten okkultur Blutungen ( $p < 0,01$ ) gegenüber der BSA-Gruppe signifikant gebessert. Die mit sIgA behandelten Tiere zeigten trotz erhöhter Gewichtszunahme unerwarteterweise keine Verbesserung des DAI im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Das Auftreten blutiger Diarrhöen konnte durch die Gabe von sIgA nicht gemindert werden. Die insgesamt hohe Kolitisaktivität führte bei vielen Versuchstieren nach etwa einer Woche dazu, dass sie innerhalb einer Wartezeit von mindestens einer Stunde keinen Stuhl absetzten. Die Ermittlung des DAI konnte daher im therapeutischen Versuchsansatz nur bis Tag 7 nach Beginn der DSS-Gabe erfolgen.

Bei der Ermittlung der Kolonlängen fiel auch bei den therapeutisch mit Kolostrum oder seinen Komponenten behandelten Versuchsgruppen eine deutliche Verkürzung auf. Dabei konnte die geringste Reduktion der Darmlänge in der Lactoferrin-Gruppe ermittelt werden. Eine Korrelation der Kolonlänge mit der günstigen Gewichtsentwicklung der sIgA-Gruppe war nicht zu beobachten. Auch die Behandlung mit Kolostrum hatte auf die Darmlänge der Versuchstiere nicht den gleichen positiven Effekt wie auf den klinischen Index.

Die Veränderungen am Darmgewebe wurden durch zwei Gutachter unabhängig voneinander evaluiert. Die Proben waren zuvor anonymisiert worden. Der histologische Gesamtscore berechnet sich aus den Teilscores für Entzündung, Ausdehnung und Kryptenschaden. Die Zusammenschau der Daten ergab sowohl für den Gesamt- als auch für die Teilscores keine Verbesserungen durch die Therapiesubstanzen in Hinblick auf die Schwere der Entzündungsreaktion oder den Kripten- und Epithelverlust im Vergleich mit der NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe. Auch die Ausdehnung der Entzündung in das Darmgewebe hinein konnte nicht signifikant beeinflusst werden.

Auf Grundlage der Arbeiten von Bodammer et al. [32] wurde für die Untersuchungen eine Zeitspanne von zwei Wochen von Beginn der DSS-Gabe bis zum Tag der Aufarbeitung gewählt. Dabei traten histologische Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bereits nach diesem Zeitraum auf. In der Studie von Dieleman et al. erfolgte die Aufarbeitung der Versuchstiere dagegen nach drei beziehungsweise sechs Wochen [49]. Möglicherweise könnte in zukünftigen Studien der Beobachtungszeitraum weiter ausgedehnt werden, um signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen zu erheben.

Die Ursache für das verbesserte klinische Erscheinungsbild der mit Kolostrum behandelten Tiere und die positive Gewichtsentwicklung unter sIgA-Gabe könnte in einer Änderung der Zusammensetzung einzelner Immunzellpopulationen begründet sein. Deshalb wurden FACS-Analysen durchgeführt, um den Einfluss der einzelnen Versuchssubstanzen auf die Verteilung der T-Zell-Populationen innerhalb der drei Kompartimente Blut, Milz und mesenteriale Lymphknoten zu analysieren. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen ergaben sich im therapeutischen Versuchsansatz jedoch weder für die T-Helferzellen noch für die zytotoxischen T-Zellen. Für die Population der CD11c<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> Zellen wiesen alle Versuchsgruppen in Blut und Milzgewebe eine geringere Zahl im Vergleich mit gesunden Kontrolltieren auf. Von den Werten der NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe wichen die dendritischen Zellen der Milz unter sIgA und die des Blutes unter IgG erkennbar ab. Sie waren signifikant erhöht. Auch die  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen verhielten sich unter dem Einfluss der Versuchssubstanzen nicht auffällig anders als unter NaCl-Gabe. Einzig die IgG-behandelten Tiere zeigten einen signifikant geringeren Anteil  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation der mesenterialen Lymphknoten. Die gleiche Tendenz war in den Kolostrum- und sIgA-Gruppen erkennbar. Relevante Abweichungen in der Größe der T-Zell-Populationen unter den Versuchsgruppen waren insgesamt kaum festzustellen. Allein die Gabe von Immunglobulinen konnte signifikante Änderungen in einzelnen Subpopulationen hervorrufen. Diese Abweichungen erfolgten stets hin zu den Werten gesunder Kontrolltiere.

## **5.4. Effekte von Kolostrum und seinen Komponenten im prophylaktischen Ansatz**

An Medikamente zur Rezidivprophylaxe werden höhere Anforderungen hinsichtlich der Verträglichkeit gestellt, als dies bei Akutmedikamenten der Fall ist. Der symptomfreie Patient ist seltener dazu bereit, Nebenwirkungen in Kauf zu nehmen. Eine gute Verträglichkeit der Langzeitmedikation sollte daher auch über Jahre hinweg gegeben sein. Die bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen vielfach eingesetzten Aminosalizylate führen häufig zu gastrointestinalen Nebenwirkungen und Kopfschmerzen und schädigen mitunter auch die blutbildenden Organe. Die Suche nach verträglicheren Alternativen ist somit von großer Relevanz. Im prophylaktischen Versuchsansatz wurden die vorbeugenden Effekte der Versuchssubstanzen untersucht. Die Suche nach neuen Substanzen zum erstrebten Remissionserhalt stand dabei im Vordergrund. Der CED-Patient in Remission leidet weder unter blutigen Durchfällen noch anderen intestinalen oder extraintestinalen Beschwerden. Um diesen Sachverhalt nachzubilden, wurden die Versuchssubstanzen deshalb zunächst gesunden Tieren verabreicht. Anschließend wurde die Kolitis induziert. Der Gewichtsverlauf während der Regenerationsphase unterschied sich im prophylaktischen vom therapeutischen Versuchsansatz. Die Tiere nahmen in allen Gruppen etwa 1 bis 2 Tage früher an Gewicht zu. Hingegen zeigt der Gewichtsverlauf während der Entzündungsphase keine wesentlichen Unterschiede. Wie in der Arbeit von Bodammer et al. [32] beschrieben, zeigten die prophylaktisch mit Kolostrum behandelten Tiere eine schnellere Gewichtszunahme in der Regenerationsphase. Schon ab Tag 8 konnten die so behandelten Tiere kontinuierlich ihr Gewicht steigern. Die Gewichtszunahme ist im Vergleich zur NaCl<sub>Th</sub>-Kontrollgruppe signifikant ( $p < 0,001$ ). Weder sIgA noch Lactoferrin erzielten als Einzelkomponenten des Kolostrums eine ähnliche Wirkung. Des Weiteren zeigten nur die IgG-geschlündelten Tiere einen wesentlichen Unterschied des Gewichtsverlaufes im Vergleich zur NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe, wobei die Differenz zur sIgA- oder BSA-Gruppe gering war.

Zur Bestätigung der besseren Gewichtszunahme der prophylaktisch mit Kolostrum behandelten Tiere wurde ebenfalls ein günstigerer Verlauf ihres klinischen Indexes erwartet. Tatsächlich konnte ein signifikant besserer Verlauf des DAI der Kolostrumgruppe gegenüber den BSA-, Lactoferrin- und IgG-geschlündelten Versuchsgruppen ermittelt werden. Dies wurde besonders zum Ende der Regenerationsphase hin deutlich. Im Vergleich mit der NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe konnte die Behandlung mit Kolostrum ihre Wirksamkeit ebenfalls bestätigen. So erwies sich die Gabe von Kolostrum gegenüber der von Kochsalzlösung als signifikant günstiger in Bezug auf Stuhlkonsistenz und dem Auftreten okkultur Blutungen. Des Weiteren

sorgte die Gabe von sIgA im Vergleich mit IgG für eine signifikante Verringerung der okkulten Blutungen bei den Versuchstieren. Signifikante Differenzen des Gesamt-DAI der sIgA- und Lactoferrin-Gruppen zu ihren Kontrollgruppen konnten nicht ermittelt werden. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Untersuchung der Gewichtsverläufe dieser Versuchsgruppen.

Bezüglich der Kolonlängen zeigte sich in allen Versuchsgruppen eine geringere Verkürzung gegenüber den Gruppen des therapeutischen Versuchsansatzes. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen waren im prophylaktischen Versuchsansatz keine signifikanten Unterschiede der Kolonlängen nachzuweisen. Die sIgA- und IgG-behandelten Tiere zeigten durchschnittlich die geringste Darmverkürzung. Ein Einfluss der Kolostrum-Gabe auf den darmverkürzenden Effekt der Kolitis konnte nicht nachgewiesen werden. Der Vergleich der histologischen Gesamtscores der Versuchsgruppen zeigte eine recht breite Streuung der Scorewerte und lieferte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Die niedrigsten Werte sowohl im Gesamt- als auch bei den Teilscores konnten für die Kolostrum- und die Immunglobulin-Gruppen ermittelt werden. Dies entspricht den Ergebnissen des Vergleichs der Kolonlängen.

Die histologische Analyse der therapeutischen und prophylaktischen Versuchsansätze zeigte, dass die Regeneration der Darmschleimhaut bei letzterem bereits fortgeschritten war. Besonders der Kryptenverlust war vermindert. Auch dieses Ergebnis korreliert mit den Darmlängen und den Gewichtsverläufen in der Regenerationsphase.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der T-Helferzell-Population nach Kolitisinduktion zeigten, dass der Anteil  $CD3^+/CD4^+$  Zellen in Milz- und Lymphknotengewebe erniedrigt war, während die prophylaktische Gabe von sekretorischem IgA zu höheren Werten führte. Diese befanden sich im Bereich gesunder unbehandelter Tiere. Gegenüber der  $NaCl_{Th}$ -Gruppe war hier ein signifikanter Anstieg nachweisbar. Etwas weniger deutlich stieg der Anteil  $CD3^+/CD4^+$  Zellen im Milzgewebe durch die Gabe von Kolostrum und Lactoferrin im Vergleich mit der  $NaCl_{Th}$ -Gabe an. Durch die Modifikation des Versuchsansatzes minderte sich der Anteil der  $CD3^+/CD4^+$  Zellen innerhalb der betrachteten Gewebe weniger deutlich. In Übereinstimmung damit konnte eine Verminderung der entzündlichen Infiltrate der Darmschleimhaut in allen Versuchsgruppen beobachtet werden.

$CD11b^+/Gr1^+$  Zellen spielen eine bedeutende Rolle im Verlauf von Tumor- und Infektionserkrankungen sowie autoimmun-entzündlichen Prozessen. Sie supprimieren T-Zell-Funktionen und besitzen somit eine regulatorische Funktion in der Immunantwort [70]. Während der DSS-induzierten Kolitis steigt ihre Zahl im Laufe der Regenerationsphase an [71]. In Übereinstimmung damit nahm der Anteil  $CD11b^+/Gr1^+$  Splenozyten nach

Kolitisinduktion bei allen Versuchsgruppen im Vergleich zu gesunden unbehandelten Tieren signifikant zu. Für CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup> Blutleukozyten konnte ebenfalls eine Zunahme ermittelt werden. Dieses korreliert mit den Ergebnissen von Haile et al. [31], die einen Anstieg der MDSC-Population im peripheren Blut von CED-Patienten beschreiben. Durch die prophylaktische Gabe von Kolostrum kam es sowohl im Milzgewebe als auch im Blut zu einem geringeren Anstieg von CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup> Zellen. Ihr Anteil wurde im Vergleich mit der NaCl<sub>Th</sub>-Gruppe um mehr als die Hälfte reduziert. Die Beeinflussung der MDSC-Population ist damit ein möglicher Ansatzpunkt, um die positive Wirkung der prophylaktischen Verabreichung von Kolostrum auf den Kolitisverlauf zu erklären.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der reifen dendritischen Zellen in Blut und Milzgewebe zeigten im Gegensatz zum therapeutischen Versuchsansatz keine signifikanten Differenzen zwischen den behandelten Versuchsgruppen und den unbehandelten Tieren ohne Kolitis. Dagegen stieg der Anteil CD11c<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> Zellen in den mesenterialen Lymphknoten durch die Darmentzündung signifikant an. Davon ausgenommen blieben allein die sIgA-behandelten Tiere. Die Quote der CD11c<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> Zellen in den Lymphknoten ist mit maximal 2 % der Leukozyten allerdings äußerst gering, sodass die Aussagekraft dieses Ergebnisses fraglich ist.

Bei der Untersuchung der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen zeigte sich bei prophylaktischer Gabe der Versuchssubstanzen ein wesentlich geringerer Anteil im Milz- und Lymphknotengewebe. Die ermittelten Werte lagen dabei noch unter denen gesunder unbehandelter Kontrolltiere. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von Tsuchiya et al. und Bodammer et al., welche einen Anstieg der Zellpopulation zeigten [32] [69]. Ein erhöhter Anteil der  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen korreliert mit einer aktiveren inflammatorischen Reaktion. Dementsprechend könnte ein Abfall als Hinweis auf eine geringere Entzündungsaktivität gewertet werden. Diese Interpretation stimmt mit der histologischen Analyse überein.

Die Relevanz der als signifikant ermittelten Differenzen einzelner Versuchsgruppen zu den unbehandelten Tieren ist in diesem Zusammenhang nur eingeschränkt beurteilbar. Zur besseren Bewertung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden ausgewählte Zellpopulationen, denen regulatorische Funktionen im Entzündungsprozess zugeschrieben werden, im Kolongewebe immunhistochemisch quantifiziert. Dazu wurden Präparate der Kolostrum- und Immunglobulin-behandelten Gruppen mit denen gesunder Tiere ohne Kolitis verglichen.

Die Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate zeigte ein analoges Verhalten der Kolostrum- und der sIgA-Gruppe. Im Vergleich mit IgG- und unbehandelten Tieren wurden hier signifikant mehr  $\gamma/\delta$ -TCR<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> gezählt. Die prophylaktische Gabe von Kolostrum

fürte außerdem zu einer signifikant größeren Anzahl CD11c<sup>+</sup> Zellen gegenüber unbehandelten und IgG-Tieren. Gleichzeitig stieg die Anzahl CD83<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup>, was für eine verstärkte Infiltration durch reife dendritische Zellen spricht. Der Anstieg der entsprechenden Zellpopulation war durch die Vorbehandlung mit Kolostrum jeweils etwas stärker ausgeprägt als durch die sIgA-Gabe. Sekretorisches IgA als Bestandteil von Kolostrum könnte damit für einen Teil der positiven Wirkung auf den Verlauf der DSS-induzierten Entzündung verantwortlich sein.

### **5.5. Vergleich des therapeutischen und prophylaktischen Ansatzes**

Die Wahl des Versuchsansatzes führte zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Wirksamkeit der einzelnen Versuchssubstanzen. In der therapeutischen Versuchsanordnung hatte sIgA einen positiven Effekt auf den Heilungsverlauf, während im prophylaktischen Ansatz Kolostrum einen größeren Effekt zeigte. Die weiteren Untersuchungen zum therapeutischen Versuchsansatz zeigten zwar insgesamt einen eher positiven Einfluss von Kolostrum und sIgA, jedoch hatte sIgA keinen signifikant positiven Einfluss auf den Gewichtsverlauf. Die Veränderungen in den verschiedenen Leukozytenpopulationen stimmen mit Befunden der aktuellen Literatur überein. Der mögliche Nutzen von Kolostrum oder seiner Komponenten als Therapeutikum bei akuter Kolitis konnte durch die vorliegenden Messungen nicht nachgewiesen werden. Insbesondere das fehlende Ansprechen des klinischen Krankheitsindex auf die Behandlung verdeutlicht dies. Dagegen ist die prophylaktische Anwendung von Kolostrum zum Remissionserhalt ein vielversprechender Forschungsansatz. Die Kolostrumgabe hat positive Effekte auf die Gewichts- und DAI-Entwicklung. Vermutlich sind diese begründet durch die Wirkung von Kolostrum auf regulatorisch wirksame Leukozytenpopulationen.

Zum Teil zeigte sIgA ähnlich positive Effekte im prophylaktischen Ansatz. Dieser Befund weist darauf hin, dass sekretorisches IgA eine der wirksamen Komponenten des Kolostrums sein könnte. Es ist jedoch zu vermuten, dass sich die Wirksamkeit von Kolostrum erst in dem Zusammenspiel mehrerer Einzelkomponenten und der Nutzung unterschiedlichster Aktivierungswege begründet.

## **5.6. Einordnung der Ergebnisse in aktuelle Untersuchungen zu traditioneller und komplementärer Therapie**

Für die leitliniengerechte Behandlung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen steht glücklicherweise bereits eine Reihe von Medikamenten zur Verfügung. Die Nebenwirkungen können allerdings gravierend sein. Remissionserfolge sind zum Teil nur durch die jahrelange Einnahme entsprechender Präparate zu erzielen. Neue Therapieerfolge beispielsweise durch Therapeutika aus dem Bereich der immunmodulierenden Biologicals sind erfreulich und lassen auf eine zukünftig effektivere Behandlung hoffen. Viele Betroffene suchen dennoch nach möglichen Ergänzungen zur sogenannten Schulmedizin. Die dazu geeigneten Verfahren werden unter dem Begriff der Komplementärmedizin zusammengefasst. Sie sollen die etablierten Therapien nicht ersetzen, sondern werden begleitend angewandt. Durch die gleichzeitige Anwendung wird versucht, die Dosen nebenwirkungsträchtiger konventioneller Therapeutika zu reduzieren, ohne dass es zu Einbußen bei der Wirksamkeit kommt. Die Trennung von komplementär- und alternativmedizinischen Verfahren ist dadurch erschwert, dass im Englischen oft der Überbegriff der CAM („Complementary and Alternative Medicine“) Verwendung findet. Im Gegensatz zur Komplementärmedizin hat die Alternativmedizin das Ziel, die Schulmedizin zu ersetzen. Die Verfahren der Komplementärmedizin gelten im Allgemeinen als nebenwirkungsarm und damit gut verträglich. Wissenschaftlich belegt ist diese Annahme allerdings für die wenigsten der angewendeten Verfahren.

Das Interesse chronisch erkrankter Patienten an komplementären Heilmethoden ist groß. Hilsden et al. veröffentlichten zu diesem Thema im Jahr 2010 eine umfangreiche Übersichtsarbeit [72]. Demnach hatten 21 – 60 % der befragten CED-Patienten bereits Erfahrungen mit Verfahren der Komplementär- oder Alternativmedizin. Für Deutschland liegt diese Zahl bei 51 % [73]. In Internetforen und Selbsthilfegruppen erfolgt zu den verschiedenen Therapiemöglichkeiten ein intensiver Erfahrungsaustausch [74] [75]. Die Deutsche Morbus Crohn/ Colitis ulcerosa Vereinigung hat bereits einen eigenen Arbeitskreis Komplementärmedizin ins Leben gerufen. Sie möchte den Betroffenen durch die Bewertung und Förderung komplementärmedizinischer Verfahren fachkundige Unterstützung bieten [76].

Es ist vor allem eine vorangegangene intensive Steroidtherapie, welche bei CED-Patienten zu einer Suche nach komplementären Heilmethoden führt. Darüber hinaus sind besonders Akademiker mit einer gesundheitsbewussten Lebensweise und einer aktiven Krankheitsbewältigung geneigt, Methoden der Komplementärmedizin anzuwenden [73].

Einige Verfahren der Komplementärmedizin wurden in die konventionelle Therapie übernommen und sind Teil der Empfehlungen der aktuellen Leitlinie zur Therapie der Colitis ulcerosa [6]. Dies betrifft die Anwendung der Probiotika *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 [22] sowie VSL#3 [24]. Ihre Anwendung wird zum Remissionserhalt empfohlen. Aus dem Bereich der Komplementärmedizin werden weiterhin die Verwendung von Curcumin [77] oder *Plantago ovata*-Samen [78] zum Remissionserhalt, die Nutzung einer Lebensstilmodifikation [79] zur Verbesserung der Lebensqualität und die Anwendung von Akupunktur mit Moxibustion [80] im leichten bis moderaten Schub empfohlen. Positive Effekte mit guter Evidenz konnten ebenfalls für die Anwendung von *Saccharomyces boulardii* [81] und Fischölkapseln [82] in klinischen Studien erhoben werden. Weitere Mittel wie z.B. Lecithin oder Wurmeier sind noch in der Erprobung. Ihre Anwendung wird derzeit noch nicht empfohlen.

Die meisten der aussichtsreicheren Therapien setzen bei der Immunmodulation oder Barrierestärkung des Darms an. Sie gehen damit auf die aktuellen Erkenntnisse zur Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ein. Dagegen wirkt ein Großteil der konventionellen Therapieverfahren ausschließlich immunsuppressiv. Die Nutzung von Kolostrum stellt deshalb einen vielversprechenden Ansatz für die Immunmodulation dar. Die vorliegende Arbeit und weitere Untersuchungen konnten seine modulierenden Effekte auf verschiedene Immunzellpopulationen nachweisen.

## **5.7. Ausblick**

Für das DSS-Kolitismodell sind verschiedene Abwandlungen des Studiendesigns beispielsweise hinsichtlich Dauer und Konzentration der DSS-Gabe oder Länge des Beobachtungszeitraumes möglich. Durch eine Erweiterung des Beobachtungszeitraumes und zusätzliche Messpunkte für histologische und durchflusszytometrische Untersuchungen könnten weitere Effekte des Kolostrums und seiner wirksamen Einzelkomponenten hinsichtlich des Kolitisverlaufs auf histologischer und immunregulatorischer Ebene untersucht werden.

Studien zum klinischen Einsatz von Kolostrum als komplementärmedizinisches Therapeutikum sind rar, die Zahl der eingeschlossenen Patienten eher gering. Positive Ergebnisse tierexperimenteller Arbeiten können das Vertrauen in seine Wirksamkeit stärken und Anlass für eine Erweiterung klinischer Untersuchungen sein.

Die bisherigen konventionellen Arzneimittel zeichnen sich durch ihre immunsuppressiven oder immunmodulierenden Eigenschaften aus. Bei der Auswahl möglicher neuer Therapiesubstanzen sollte ihr Einfluss auf das Verhalten des Immunsystems besondere Beachtung finden. Für Kolostrum konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit positive, immunmodulierende Wirkungen gezeigt werden. Zukünftige Untersuchungen sollten die aktuelle Studienlage zur immunpathologischen Genese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ebenfalls berücksichtigen.

Die vorliegende Studie liefert Evidenzen für eine prophylaktische Gabe des Kolostrums zum Remissionserhalt und zeigt, dass sIgA eine der wirksamen Komponenten darstellen könnte. Neben sIgA enthält Kolostrum weitere Komponenten, wie IGF-1, IL-1 und TNF- $\alpha$ , die ebenfalls zu seinen immunmodulierenden Eigenschaften beitragen könnten. Weitere Studien sind erforderlich, um die wirksamen Komponenten des Kolostrums zu identifizieren und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu analysieren.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Fast 500.000 Menschen in Deutschland sind von Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn betroffen. Die Erkrankungen verlaufen über Jahrzehnte rezidivierend, da es bisher keine kurativen medikamentösen Therapieoptionen gibt. Dabei kommt es zu einer zunehmenden Zerstörung der Darmschleimhaut und einem damit einhergehenden Funktionsverlust der betroffenen Areale. Damit verbunden sind weitere Komplikationen, welche die Lebensqualität der Betroffenen stark einschränken können.

Für die multifaktorielle Genese der CED ist auch eine Fehlregulation der Immunantwort bei gestörter Darmbarriere von Bedeutung. Die derzeit eingesetzten Therapeutika wirken vor allem immunsuppressiv und sind reich an Nebenwirkungen. Immunmodulierende Substanzen aus dem Bereich der Komplementärmedizin rücken deshalb zunehmend in den Fokus der Forschung. So verbessert die prophylaktische Gabe von bovinem Kolostrum nachweislich den Verlauf der DSS-induzierten Kolitis. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Einzelkomponenten des bovinen Kolostrums, das sekretorische Immunglobulin A und das antibakteriell wirksame Lactoferrin im Vergleich zu Kolostrum mit Hilfe eines therapeutischen und eines prophylaktischen Versuchsansatzes untersucht. Die positiven Effekte von prophylaktisch angewendetem Kolostrum auf den experimentellen Kolitisverlauf konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die prophylaktische Gabe von Kolostrum führte zu einem geringeren Anstieg der immunregulatorisch wirksamen CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>+</sup> Zellen im Blut und in der Milz. Des Weiteren kam es durch die Kolostrumgabe zu einer Veränderung der Zusammensetzung der entzündlichen Infiltrate der Darmschleimhaut. Dieser Effekt konnte ebenfalls für sIgA, aber nicht für IgG gezeigt werden. Ähnliche Auswirkungen auf die einzelnen Subpopulationen der Lymphozyten waren für Lactoferrin nicht nachweisbar.

Im therapeutischen Ansatz zeigte die Behandlung mit Kolostrum positive Wirkungen auf die Stuhlkonsistenz und das Auftreten okkultur Blutungen. Die Gabe von Immunglobulinen verbesserte den Gewichtsverlauf in der Regenerationsphase; allerdings konnten keine Effekte auf andere klinische Parameter, wie Stuhlkonsistenz, Auftreten okkultur Blutungen, Darmlänge u.a. nachgewiesen werden. Die für Kolostrum nachgewiesenen Wirkungen auf einzelne, für den Krankheitsverlauf zentrale T-Zell-Subpopulationen, konnten dagegen für die Immunglobuline nur in geringerer Form festgestellt werden. Das Lactoferrin hatte keinen günstigen Einfluss auf die klinischen DAI-Parameter.

Diese Ergebnisse belegen, dass sIgA eine der wirksamen Komponenten des Kolostrums darstellt. Durch ihre immunmodulatorischen Effekte können Kolostrum und sIgA zu einem verbesserten Outcome in der Regenerationsphase der DSS-induzierten Kolitis beitragen. Der vielversprechendste Einsatzbereich ist dabei die unterstützende prophylaktische Anwendung der Substanzen in der Remissionsphase der Kolitis.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. J. C. Hoffmann, Chronisch entzündliche Darmerkrankungen: Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis; 66 Tabellen. Georg Thieme Verlag, 2004.
2. L. Lakatos und P. L. Lakatos, „Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel diseases increasing in Eastern Europe?“, *Postgrad Med J*, Bd. 82, Nr. 967, S. 332–337, Mai 2006.
3. S. Shivananda, J. Lennard-Jones, R. Logan, N. Fear, A. Price, L. Carpenter, und M. van Blankenstein, „Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD).“, *Gut*, Bd. 39, Nr. 5, S. 690–697, Nov. 1996.
4. I. Koop, Gastroenterologie compact: alles für Klinik und Praxis ; 27 Tabellen. Georg Thieme Verlag, 2010.
5. W. Gerok, Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt ; mit 712 Tabellen. Schattauer Verlag, 2007.
6. A. Dignass, J. Preiß, D. Aust, F. Autschbach, A. Ballauff, G. Barretton, B. Bokemeyer, S. Fichtner-Feigl, S. Hagel, K. Herrlinger, G. Jantschek, A. Kroesen, W. Kruis, T. Kucharzik, J. Langhorst, M. Reinshagen, G. Rogler, D. Schleiermacher, C. Schmidt, S. Schreiber, H. Schulze, E. Stange, M. Zeitz, J. Hoffmann, und A. Stallmach, „Aktualisierte Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa 2011 – Ergebnisse einer Evidenzbasierten Konsensuskonferenz“, *Zeitschrift für Gastroenterologie*, Bd. 49, Nr. 09, S. 1276–1341, Aug. 2011.
7. J. Hoffmann, J. Preiß, F. Autschbach, H. Buhr, W. Häuser, K. Herrlinger, W. Höhne, S. Koletzko, C. Krieglstein, W. Kruis, H. Matthes, G. Moser, M. Reinshagen, G. Rogler, S. Schreiber, A. Schreyer, B. Sido, B. Siegmund, A. Stallmach, B. Bokemeyer, E. Stange, und M. Zeitz, „S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn““, *Zeitschrift für Gastroenterologie*, Bd. 46, Nr. 09, S. 1094–1146, Sep. 2008.
8. G. L. Gitnick, Hrsg., *Inflammatory bowel disease: diagnosis and treatment*. New York: Igaku-Shoin, 1991.
9. L. Halme, P. Paavola-Sakki, U. Turunen, M. Lappalainen, M. Farkkila, und K. Kontula, „Family and twin studies in inflammatory bowel disease“, *World J. Gastroenterol.*, Bd. 12, Nr. 23, S. 3668–3672, Juni 2006.
10. C. Tysk, E. Lindberg, G. Järnerot, und B. Flodérus-Myrhed, „Ulcerative colitis and Crohn’s disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking.“, *Gut*, Bd. 29, Nr. 7, S. 990–996, Juli 1988.
11. M. Orholm, V. Binder, T. I. Sørensen, L. P. Rasmussen, und K. O. Kyvik, „Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study“, *Scand. J. Gastroenterol.*, Bd. 35, Nr. 10, S. 1075–1081, Okt. 2000.

12. D. K. Bonen und J. H. Cho, „The genetics of inflammatory bowel disease“, *Gastroenterology*, Bd. 124, Nr. 2, S. 521–536, Feb. 2003.
13. M. Parkes, M. M. Barnada, J. Satsangi, D. E. Weeks, D. P. Jewell, und R. H. Duerr, „The IBD2 Locus Shows Linkage Heterogeneity between Ulcerative Colitis and Crohn Disease“, *Am J Hum Genet*, Bd. 67, Nr. 6, S. 1605–1610, Dez. 2000.
14. D. A. van Heel, S. A. Fisher, A. Kirby, M. J. Daly, J. D. Rioux, und C. M. Lewis, „Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs“, *Hum. Mol. Genet.*, Bd. 13, Nr. 7, S. 763–770, Jan. 2004.
15. A. E. Gent, M. D. Hellier, R. H. Grace, E. T. Swarbrick, und D. Coggon, „Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy“, *Lancet*, Bd. 343, Nr. 8900, S. 766–767, März 1994.
16. M. Vessey, D. Jewell, A. Smith, D. Yeates, und K. McPherson, „Chronic inflammatory bowel disease, cigarette smoking, and use of oral contraceptives: findings in a large cohort study of women of childbearing age.“, *Br Med J (Clin Res Ed)*, Bd. 292, Nr. 6528, S. 1101–1103, Apr. 1986.
17. P. Parronchi, P. Romagnani, F. Annunziato, S. Sampognaro, A. Bechio, L. Giannarini, E. Maggi, C. Pupilli, F. Tonelli, und S. Romagnani, „Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn’s disease.“, *Am J Pathol*, Bd. 150, Nr. 3, S. 823–832, März 1997.
18. I. J. Fuss und W. Strober, „The role of IL-13 and NK T cells in experimental and human ulcerative colitis“, *Mucosal Immunol*, Bd. 1, Nr. 0 1, S. S31–S33, Nov. 2008.
19. S. C. Truelove und L. J. Witts, „Cortisone in Ulcerative Colitis“, *Br Med J*, Bd. 2, Nr. 4947, S. 1041–1048, Okt. 1955.
20. L. Sutherland und J. K. Macdonald, „Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis.“, *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, S. CD000543–, 2006.
21. S. Nikfar, R. Rahimi, und A. Rezaie, „A meta-analysis of the efficacy of sulfasalazine in comparison with 5-aminosalicylates in the induction of improvement and maintenance of remission in patients with ulcerative colitis.“, *Dig Dis Sci*, Bd. 54, S. 1157–1170, 2009.
22. W. Kruis, P. Fric, J. Pokrotnieks, M. Lukas, B. Fixa, M. Kascak, M. A. Kamm, J. Weismueller, C. Beglinger, M. Stolte, C. Wolff, und J. Schulze, „Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine“, *Gut*, Bd. 53, Nr. 11, S. 1617–1623, Nov. 2004.
23. B. J. Rembacken, A. M. Snelling, P. M. Hawkey, D. M. Chalmers, und A. T. Axon, „Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial“, *Lancet*, Bd. 354, Nr. 9179, S. 635–639, Aug. 1999.

24. E. Miele, F. Pascarella, E. Giannetti, L. Quaglietta, R. N. Baldassano, und A. Staiano, „Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis“, *Am. J. Gastroenterol.*, Bd. 104, Nr. 2, S. 437–443, Feb. 2009.
25. W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz, G. Höfler, H. H. Kreipe, und H. Moch, Hrsg., *Pathologie: mit rund 150 Tabellen* ;, 5., vollst. überarb. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer, 2012.
26. C. Thomas und E. Alexandrakis, *Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzialdiagnostik*, 14., neu bearb. und aktualisierte Aufl. Stuttgart [u.a.]: Schattauer, 2006.
27. J.-O. Gebbers, *Colitis ulcerosa: Immun- und Ultrastrukturpathologie*. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 1981.
28. L. Qiao, M. Golling, F. Autschbach, G. Schurmann, und S. C. Meuer, „T cell receptor repertoire and mitotic responses of lamina propria T lymphocytes in inflammatory bowel disease.“, *Clin Exp Immunol*, Bd. 97, Nr. 2, S. 303–308, Aug. 1994.
29. R. De Maria, S. Fais, M. Silvestri, L. Frati, F. Pallone, A. Santoni, und R. Testi, „Continuous in vivo activation and transient hyporesponsiveness to TcR/CD3 triggering of human gut lamina propria lymphocytes“, *Eur. J. Immunol.*, Bd. 23, Nr. 12, S. 3104–3108, Dez. 1993.
30. B. Sido, J. Braunstein, R. Breitkreutz, C. Herfarth, und S. C. Meuer, „Thiol-mediated redox regulation of intestinal lamina propria T lymphocytes“, *J. Exp. Med.*, Bd. 192, Nr. 6, S. 907–912, Sep. 2000.
31. L. A. Haile, R. von Wasielewski, J. Gamrekelashvili, C. Krüger, O. Bachmann, A. M. Westendorf, J. Buer, R. Liblau, M. P. Manns, F. Korangy, und T. F. Greten, „Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway“, *Gastroenterology*, Bd. 135, Nr. 3, S. 871–881, 881.e1–5, Sep. 2008.
32. P. Bodammer, C. Maletzki, G. Waitz, und J. Emmrich, „Prophylactic application of bovine colostrum ameliorates murine colitis via induction of immunoregulatory cells“, *J. Nutr.*, Bd. 141, Nr. 6, S. 1056–1061, Juni 2011.
33. I. Okayasu, S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki, und R. Nakaya, „A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice“, *Gastroenterology*, Bd. 98, Nr. 3, S. 694–702, März 1990.
34. M. F. Neurath, I. Fuss, B. L. Kelsall, E. Stüber, und W. Strober, „Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice“, *J. Exp. Med.*, Bd. 182, Nr. 5, S. 1281–1290, Nov. 1995.
35. B. Sadlack, H. Merz, H. Schorle, A. Schimpl, A. C. Feller, und I. Horak, „Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene“, *Cell*, Bd. 75, Nr. 2, S. 253–261, Okt. 1993.

36. R. Kühn, J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky, und W. Müller, „Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis“, *Cell*, Bd. 75, Nr. 2, S. 263–274, Okt. 1993.
37. R. E. Hammer, S. D. Maika, J. A. Richardson, J. P. Tang, und J. D. Taurog, „Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders“, *Cell*, Bd. 63, Nr. 5, S. 1099–1112, Nov. 1990.
38. J. P. Sundberg, C. O. Elson, H. Bedigian, und E. H. Birkenmeier, „Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice“, *Gastroenterology*, Bd. 107, Nr. 6, S. 1726–1735, Dez. 1994.
39. P. Morrissey, K. Charrier, S. Braddy, D. Liggitt, und J. Watson, „CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells“, *J Exp Med*, Bd. 178, Nr. 1, S. 237–244, Juli 1993.
40. F. Powrie, M. W. Leach, S. Mauze, S. Menon, L. B. Caddle, und R. L. Coffman, „Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells“, *Immunity*, Bd. 1, Nr. 7, S. 553–562, Okt. 1994.
41. G. S. Kelly, „Bovine colostrums: a review of clinical uses“, *Altern Med Rev*, Bd. 8, Nr. 4, S. 378–394, Nov. 2003.
42. A. M. Abd El -Fattah, F. H. Abd Rabo, S. M. EL-Dieb, und H. A. El-Kashef, „Changes in composition of colostrum of Egyptian buffaloes and Holstein cows“, *BMC Vet Res*, Bd. 8, S. 19, März 2012.
43. Z. Khan, C. Macdonald, A. C. Wicks, M. P. Holt, D. Floyd, S. Ghosh, N. A. Wright, und R. J. Playford, „Use of the ‘nutriceutical’, bovine colostrum, for the treatment of distal colitis: results from an initial study“, *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, Bd. 16, Nr. 11, S. 1917–1922, 2002.
44. R. J. Playford, D. N. Floyd, C. E. Macdonald, D. P. Calnan, R. O. Adenekan, W. Johnson, R. A. Goodlad, und T. Marchbank, „Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage“, *Gut*, Bd. 44, Nr. 5, S. 653–658, Mai 1999.
45. L. A. Håversen, L. Baltzer, G. Dolphin, L. A. Hanson, und I. Mattsby-Baltzer, „Anti-inflammatory activities of human lactoferrin in acute dextran sulphate-induced colitis in mice“, *Scand. J. Immunol.*, Bd. 57, Nr. 1, S. 2–10, Jan. 2003.
46. J.-I. Togawa, H. Nagase, K. Tanaka, M. Inamori, T. Umezawa, A. Nakajima, M. Naito, S. Sato, T. Saito, und H. Sekihara, „Lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance“, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, Bd. 283, Nr. 1, S. G187–195, Juli 2002.

47. J.-I. Togawa, H. Nagase, K. Tanaka, M. Inamori, A. Nakajima, N. Ueno, T. Saito, und H. Sekihara, „Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance“, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Bd. 17, Nr. 12, S. 1291–1298, Dez. 2002.
48. H. S. Cooper, S. N. Murthy, R. S. Shah, und D. J. Sedergran, „Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis“, *Lab. Invest.*, Bd. 69, Nr. 2, S. 238–249, Aug. 1993.
49. L. A. Dieleman, M. J. H. J. Palmen, H. Akol, E. Bloemena, A. S. Pena, S. G. M. Meuwissen, und E. P. van Rees, „Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines“, *Clin Exp Immunol*, Bd. 114, Nr. 3, S. 385–391, Dez. 1998.
50. S. Kitajima, S. Takuma, und M. Morimoto, „Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium“, *Exp. Anim.*, Bd. 48, Nr. 3, S. 137–143, Juli 1999.
51. W. Strober, I. J. Fuss, und R. S. Blumberg, „The immunology of mucosal models of inflammation“, *Annu. Rev. Immunol.*, Bd. 20, S. 495–549, 2002.
52. N. W. Solomons, „Modulation of the immune system and the response against pathogens with bovine colostrum concentrates“, *Eur J Clin Nutr*, Bd. 56 Suppl 3, S. S24–28, Aug. 2002.
53. A. K. Murthy, C. N. Dubose, J. A. Banas, J. J. Coalson, und B. P. Arulanandam, „Contribution of polymeric immunoglobulin receptor to regulation of intestinal inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis“, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Bd. 21, Nr. 9, S. 1372–1380, Sep. 2006.
54. R. B. Sartor, „Animal models of intestinal inflammation“, *Kirsner’s Inflammatory Bowel Diseases*, S. 120–137, 2004.
55. Z. Selmeczy, B. Csóka, P. Pacher, E. S. Vizi, und G. Haskó, „The adenosine A2A receptor agonist CGS 21680 fails to ameliorate the course of dextran sulphate-induced colitis in mice“, *Inflamm. Res.*, Bd. 56, Nr. 5, S. 204–209, Mai 2007.
56. N. Amini-Shirazi, A. Hoseini, A. Ranjbar, A. Mohammadirad, P. Khoshakhlagh, N. Yasa, und M. Abdollahi, „Inhibition of tumor necrosis factor and nitrosative/oxidative stresses by *Ziziphora clinopoides* (Kahlioti); a molecular mechanism of protection against dextran sodium sulfate-induced colitis in mice“, *Toxicol. Mech. Methods*, Bd. 19, Nr. 2, S. 183–189, Feb. 2009.
57. D. H. Winship, R. W. Summers, J. W. Singleton, W. R. Best, J. M. Becketl, L. F. Lenk, und F. Kern Jr, „National Cooperative Crohn’s Disease Study: study design and conduct of the study“, *Gastroenterology*, Bd. 77, Nr. 4 Pt 2, S. 829–842, Okt. 1979.
58. K. W. Schroeder, W. J. Tremaine, und D. M. Ilstrup, „Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study“, *N. Engl. J. Med.*, Bd. 317, Nr. 26, S. 1625–1629, Dez. 1987.

59. I. Monteleone, P. Vavassori, L. Biancone, G. Monteleone, and F. Pallone, „Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease“, *Gut*, Bd. 50, Nr. Suppl 3, S. iii60–iii64, Mai 2002.
60. K. Yamagata, M. Tanaka, and H. Kudo, „A quantitative immunohistochemical evaluation of inflammatory cells at the affected and unaffected sites of inflammatory bowel disease“, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, Bd. 13, Nr. 8, S. 801–808, Aug. 1998.
61. A. Kappeler und C. Mueller, „The role of activated cytotoxic T cells in inflammatory bowel disease“, *Histol. Histopathol.*, Bd. 15, Nr. 1, S. 167–172, Jan. 2000.
62. J. Banchereau, F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, und K. Palucka, „Immunobiology of dendritic cells“, *Annu. Rev. Immunol.*, Bd. 18, S. 767–811, 2000.
63. D. C. Baumgart, D. Metzke, J. Schmitz, A. Scheffold, A. Sturm, B. Wiedenmann, und A. U. Dignass, „Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells“, *Gut*, Bd. 54, Nr. 2, S. 228–236, Feb. 2005.
64. H. Murakami, S. M. F. Akbar, H. Matsui, N. Horiike, und M. Onji, „Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis“, *Clin Exp Immunol*, Bd. 128, Nr. 3, S. 504–510, Juni 2002.
65. Y. Ikeda, F. Akbar, H. Matsui, und M. Onji, „Characterization of antigen-presenting dendritic cells in the peripheral blood and colonic mucosa of patients with ulcerative colitis“, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, Bd. 13, Nr. 7, S. 841–850, Juli 2001.
66. K. Fujihashi, T. Dohi, M.-N. Kweon, J. R. Mcghee, T. Koga, M. D. Cooper, S. Tonegawa, und H. Kiyono, „ $\gamma\delta$  T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion“, *Int. Immunol.*, Bd. 11, Nr. 12, S. 1907–1916, Jan. 1999.
67. P. Mombaerts, J. Arnoldi, F. Russ, S. Tonegawa, und S. H. Kaufmann, „Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen“, *Nature*, Bd. 365, Nr. 6441, S. 53–56, Sep. 1993.
68. K. Fujihashi, T. Taguchi, W. K. Aicher, J. R. McGhee, J. A. Bluestone, J. H. Eldridge, und H. Kiyono, „Immunoregulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes: gamma/delta T cell receptor-positive (TCR+) T cells abrogate oral tolerance, while alpha/beta TCR+ T cells provide B cell help.“, *J Exp Med*, Bd. 175, Nr. 3, S. 695–707, Jan. 1992.
69. T. Tsuchiya, S. Fukuda, H. Hamada, A. Nakamura, Y. Kohama, H. Ishikawa, K. Tsujikawa, und H. Yamamoto, „Role of  $\gamma\delta$ T Cells in the Inflammatory Response of Experimental Colitis Mice“, *J Immunol*, Bd. 171, Nr. 10, S. 5507–5513, Nov. 2003.
70. D. I. Gabrilovich und S. Nagaraj, „Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system“, *Nat Rev Immunol*, Bd. 9, Nr. 3, S. 162–174, März 2009.

71. R. Zhang, S. Ito, N. Nishio, Z. Cheng, H. Suzuki, und K.-I. Isobe, „Dextran sulphate sodium increases splenic Gr1+CD11b+ cells which accelerate recovery from colitis following intravenous transplantation“, *Clin Exp Immunol*, Bd. 164, Nr. 3, S. 417–427, Juni 2011.
72. R. J. Hilsden, M. J. Verhoef, H. Rasmussen, A. Porcino, und J. C. C. DeBruyn, „Use of complementary and alternative medicine by patients with inflammatory bowel disease“, *Inflammatory Bowel Diseases*, Bd. 17, Nr. 2, S. 655–662, 2011.
73. J. Langhorst, I. B. Anthonisen, U. Steder-Neukamm, R. Lütke, G. Spahn, A. Michalsen, und G. J. Dobos, „Amount of systemic steroid medication is a strong predictor for the use of complementary and alternative medicine in patients with inflammatory bowel disease. Results From a German National Survey“, *Inflammatory Bowel Diseases*, Bd. 11, Nr. 3, S. 287–295, 2005.
74. „Alternative Medizin - Cröhnchen-Klub Forum“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.croehnchen-klub.de/crohn-forum/index.php?page=Board&boardID=61>. [Zugegriffen: 24-Mai-2014].
75. „Deutsche Morbus Crohn / Colitis ulcerosa Vereinigung e.V.: Forumsarchiv“. [Online]. Verfügbar unter: [http://www.dccv.de/nicht-allein-mit-ced/dccv-forum/forumsarchiv/?view=single\\_conf&cat\\_uid=1&conf\\_uid=4](http://www.dccv.de/nicht-allein-mit-ced/dccv-forum/forumsarchiv/?view=single_conf&cat_uid=1&conf_uid=4). [Zugegriffen: 24-Mai-2014].
76. „Deutsche Morbus Crohn / Colitis ulcerosa Vereinigung e.V.: AK Komplementärmedizin“. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.dccv.de/die-dccv/arbeitskreise/ak-komplementaermedizin/ak-komplementaermedizin/>. [Zugegriffen: 05-Juni-2014].
77. H. Hanai, T. Iida, K. Takeuchi, F. Watanabe, Y. Maruyama, A. Andoh, T. Tsujikawa, Y. Fujiyama, K. Mitsuyama, M. Sata, M. Yamada, Y. Iwaoka, K. Kanke, H. Hiraishi, K. Hirayama, H. Arai, S. Yoshii, M. Uchijima, T. Nagata, und Y. Koide, „Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial“, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, Bd. 4, Nr. 12, S. 1502–1506, Dez. 2006.
78. F. Fernández-Bañares, J. Hinojosa, J. L. Sánchez-Lombraña, E. Navarro, J. F. Martínez-Salmerón, A. García-Pugés, F. González-Huix, J. Riera, V. González-Lara, F. Domínguez-Abascal, J. J. Giné, J. Moles, F. Gomollón, und M. A. Gassull, „Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU)“, *Am. J. Gastroenterol.*, Bd. 94, Nr. 2, S. 427–433, Feb. 1999.
79. S. Elsenbruch, J. Langhorst, K. Popkirowa, T. Müller, R. Luedtke, U. Franken, A. Paul, G. Spahn, A. Michalsen, O. E. Janssen, M. Schedlowski, und G. J. Dobos, „Effects of mind-body therapy on quality of life and neuroendocrine and cellular immune functions in patients with ulcerative colitis“, *Psychother Psychosom*, Bd. 74, Nr. 5, S. 277–287, 2005.

80. S. Joos, N. Wildau, R. Kohnen, J. Szecsenyi, D. Schuppan, S. N. Willich, E. G. Hahn, und B. Brinkhaus, „Acupuncture and moxibustion in the treatment of ulcerative colitis: a randomized controlled study“, *Scand. J. Gastroenterol.*, Bd. 41, Nr. 9, S. 1056–1063, Sep. 2006.
81. M. Guslandi, G. Mezzi, M. Sorghi, und P. A. Testoni, „*Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn’s disease“, *Dig. Dis. Sci.*, Bd. 45, Nr. 7, S. 1462–1464, Juli 2000.
82. A. Belluzzi, C. Brignola, M. Campieri, A. Pera, S. Boschi, und M. Miglioli, „Effect of an Enteric-Coated Fish-Oil Preparation on Relapses in Crohn’s Disease“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 334, Nr. 24, S. 1557–1560, 1996.

## 8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A. dest.	destilliertes Wasser
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APC	<i>antigen presenting cell</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CAM	<i>complementary and alternative medicine</i>
CARD15	<i>caspase recruitment domain-containing protein 15</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
cm	Zentimeter
CU	Colitis ulcerosa
DAI	<i>disease activity index</i>
DSS	<i>dextran sulfate sodium</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
GBS	<i>goat blocking serum</i>
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPL	Lamina propria Lymphozyten
m	Meter

MC	Morbus Crohn
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaCl <sub>Th</sub>	Natriumchlorid (Therapiegruppe)
nm	Nanometer
NMRI	<i>naval medical research institute</i>
NOD2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
p	Signifikanzwert
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pIgR	polymerer Immunglobulinrezeptor
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SC	<i>secretory component</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
TBNS	<i>2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid</i>
TCR	<i>t-cell receptor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	T-Helferzelle
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>

## 9. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammensetzung des verwendeten Kolostrums.....	16
Tabelle 2: Punkteverteilung für den DAI modifiziert nach Cooper et al. [47].....	23
Tabelle 3: Histologischer Score modifiziert nach Dieleman et al. [48] .....	27
Tabelle 4: Konzentrationen und Spezieszugehörigkeit der Primärantikörper.....	28
Abbildung 1: Kriterien des schweren Schubes einer Colitis ulcerosa nach Truelove & Witts [18] .....	7
Abbildung 2: Aufbau der Darmwand .....	9
Abbildung 3: Darstellung des therapeutischen und prophylaktischen Versuchsaufbaus .....	22
Abbildung 4: Hämokultttest. Reaktion des Stuhltests auf okkultes Blut. ....	24
Abbildung 5: Gewichtsverlauf während akuter DSS-induzierter Kolitis, Therapieversuch. ...	31
Abbildung 6: Gewichtsverlauf während der Regenerationsphase nach akuter DSS-induzierter Kolitis, Therapieversuch.....	32
Abbildung 7: Disease Activity Index, Therapieversuch.....	33
Abbildung 8: Entwicklung von Stuhlkonsistenz und okkulten Blutungen, Therapieversuch. ....	34
Abbildung 9: Kolonlängen, Therapieversuch.....	35
Abbildung 10: Histologische Merkmale der murinen DSS-Kolitis.....	36
Abbildung 11: Histologische Merkmale der murinen DSS-Kolitis.....	36
Abbildung 12: Histologisches Bild des murinen Kolons ohne DSS-induzierte Kolitis.....	37
Abbildung 13: Histologischer Score dargestellt als Gesamtscore, Entzündung, Ausdehnung und Kryptenschaden nach akuter DSS-induzierter Kolitis, Therapieversuch. .	39
Abbildung 14: Anteil der CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> Zellen und CD3 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz, Therapieversuch.....	41
Abbildung 15: Anteil der CD11c <sup>+</sup> /CD83 <sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz, Therapieversuch. ....	42
Abbildung 16: Anteil der $\gamma/\delta$ -TCR <sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz, Therapieversuch.....	43
Abbildung 17: Gewichtsverlauf während akuter DSS-induzierter Kolitis, Prophylaxeversuch. .....	44
Abbildung 18: Gewichtsverlauf während der Regenerationsphase nach akuter DSS-induzierter Kolitis, Prophylaxeversuch.....	45
Abbildung 19: Disease Activity Index, Prophylaxeversuch.....	46

Abbildung 20: Entwicklung von Stuhlkonsistenz und okkulten Blutungen, Prophylaxeversuch.	47
Abbildung 21: Kolonlängen, Prophylaxeversuch.	48
Abbildung 22: Histologischer Score dargestellt als Gesamtscore, Entzündung, Ausdehnung und Kryptenschaden nach akuter DSS-induzierter Kolitis, Prophylaxeversuch	50
Abbildung 23: Leicht und stark geschädigtes Darmepithel.	51
Abbildung 24: Beginnende Reepithelialisierung und fast vollständige Kryptenregeneration.	51
Abbildung 25: Anteil der CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz, Prophylaxeversuch.	52
Abbildung 26: Anteil der CD11b <sup>+</sup> /Gr1 <sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz, Prophylaxeversuch.	53
Abbildung 27: Anteil der CD11c <sup>+</sup> /CD83 <sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz, Prophylaxeversuch.	54
Abbildung 28: Anteil der $\gamma/\delta$ -TCR <sup>+</sup> Zellen an der Leukozytenpopulation in Blut, intestinalen Lymphknoten und Milz, Prophylaxeversuch.	55
Abbildung 29: CD4 <sup>-</sup> , CD83 <sup>-</sup> , CD11c <sup>-</sup> und $\gamma/\delta$ -TCR-positive Zellen/mm <sup>2</sup> nach immunohistochemischer Färbung, Prophylaxeversuch.	56

## **10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich aus den genutzten Veröffentlichungen entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keinem anderen Prüfungsamt in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Rostock, Oktober 2014

Elisabeth Engberink

## **11.DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt meinen Doktorvätern Prof. Dr. Jörg Emmrich, der mich durch seinen Enthusiasmus für die Thematik begeistern konnte, und Prof. Dr. Claus Kerkhoff, der mir jederzeit mit konstruktiven Gesprächen beratend zur Seite stand, sowie Prof. Dr. Robert Jaster für seine Unterstützung in organisatorischen Angelegenheiten.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Peggy Bodammer für ihre fortwährende Hilfe und Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit.

Mein herzlichster Dank gilt nicht zuletzt allen Motivatoren, Diskussionspartnern und fleißigen Korrekturlesern, ohne deren Hilfe die Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## 12. THESEN

1. Die Wirksamkeit der Versuchssubstanzen ist abhängig von der Wahl des Versuchsansatzes.
2. Prophylaktisch verabreichtes Kolostrum führt zu einer schnelleren Gewichtszunahme in der Regenerationsphase der DSS-Kolitis.
3. Prophylaktisch verabreichtes Kolostrum reduziert den Anteil der MDSC-Population der Milz- und Blutlymphozyten während der DSS-Kolitis.
4. Die prophylaktische Gabe von Kolostrum und sIgA führt zu einer Immigration von reifen dendritischen Zellen und  $\gamma/\delta$ -TCR-positiven Zellen in das Kolongewebe.
5. Kolostrum beeinflusst die klinisch erfassbare Krankheitsaktivität auch in der therapeutischen Anwendung.
6. Die therapeutische Gabe von Immunglobulinen verbessert die Gewichtszunahme in der Regenerationsphase der DSS-Kolitis.
7. Die vorteilhaften Effekte von Kolostrum sind stärker als die von sIgA.
8. Lactoferrin hat weder im prophylaktischen noch im therapeutischen Ansatz positive Effekte auf den Verlauf der DSS-Kolitis.
9. Sekretorisches IgA stellt eine der wirksamen Komponenten des Kolostrums dar.
10. Kolostrum und sIgA können durch ihre immunmodulatorischen Effekte zu einem verbesserten Outcome in der Regenerationsphase der DSS-induzierten Kolitis beitragen.
11. Den vielversprechendsten Einsatzbereich stellt die unterstützende prophylaktische Anwendung von Kolostrum und sIgA in der Remissionsphase der Kolitis dar.