

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

**Einfluss des Probiotikum Escherichia coli
Nissle 1917 auf die in-vitro Motilität humaner
Kolonmuskulatur**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von
Florian Bär
aus Lübeck

Lübeck 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thilo Wedel

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Klaus Fellermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2009

Zum Druck genehmigt,

Lübeck, den 22.09.2009

gezeichnet: Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT	1
1.1	Was sind Probiotika?	1
1.2	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	1
1.2.1	Biografische Anmerkungen zu Alfred August Julius Nissle	1
1.2.2	Charakteristika von <i>Escherichia coli</i>	4
1.2.3	Charakteristika von <i>E. coli</i> Nissle 1917	5
1.3	Klinische Einsatzmöglichkeiten von Probiotika	5
1.4	Einfluss von Probiotika auf gastrointestinale Motilität	8
1.5	Kurzkettige Fettsäuren und gastrointestinale Motilität	9
1.5.1	Einfluss von SCFAs auf gastrointestinale Motilität im Tiermodell	10
1.5.2	Einfluss von SCFA auf gastrointestinale Motilität beim Menschen	12
2	ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN	14
3	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	Untersuchungsmaterial	16
3.2	Präparation des Untersuchungsmaterials	16
3.2.1	Präparation der Operationsresektate	16
3.2.2	Feinpräparation der Muskelstreifen	17
3.3	Lösungen	18
3.3.1	Präparierlösung	18
3.3.2	Physiologische Puffer- und Nährlösung	18
3.4	Pharmaka und bakterielle Überstände	19
3.5	Versuchsanordnung zur Messung der mechanischen glattmuskulären Aktivität	20

3.5.1	Organbad	20
3.5.2	Kraftaufnahme und Signalverarbeitung	21
3.5.3	Software	22
3.5.4	Elektrische Feldstimulation	22
3.6	Versuchsablauf	24
3.6.1	Parasympathische Stimulation mit Acetylcholin	24
3.6.2	Elektrische Feldstimulation am nativen Darm	25
3.6.3	Zugabe von St.-I-Medium und EFS	25
3.6.4	Zugabe von bakteriellen Überständen und EFS	26
3.6.5	EFS unter NANC-Bedingungen	26
3.6.6	Zugabe von St.-I-Medium und EFS unter NANC-Bedingungen	26
3.6.7	Zugabe von bakteriellen Überständen und EFS unter NANC-Bedingungen	26
3.6.8	Zugabe von St.-I-Medium unter TTX-Bedingungen	27
3.6.9	Zugabe von bakteriellen Überständen unter TTX-Bedingungen	27
3.6.10	Vollständige Relaxation der Muskelstreifen	27
3.6.11	Zugabe von Essigsäure gespicktem St.-I-Medium	28
3.7	Datenauswertung und statistische Verfahren	29
3.7.1	Parasympathische Stimulation	30
3.7.2	Relaxation nach elektrischer Feldstimulation	30
3.7.2.1	Relative Relaxation	30
3.7.2.2	Änderung der relativen Relaxation	31
3.7.3	Änderung der maximalen Vielfachen des Grundtonus (xGT)	32
3.7.4	Änderung des mittleren Tonus (dmT)	33
4	ERGEBNISSE	35
4.1	Kontraktilität nach parasympathischer Stimulation	35
4.2	Kontraktilität nach Gabe von St.-I-Medium vs. Überstand unter nativen Bedingungen	36

4.3	Kontraktilität nach Gabe von St.-I-Medium vs. Überstand unter NANC-Bedingungen	38
4.4	Kontraktilität nach Gabe von St.-I-Medium vs. Überstand unter TTX-Bedingungen	40
4.5	Dosisabhängigkeit der Effekte	42
4.5.1	Dosisabhängigkeit für St.-I-Medium	42
4.5.2	Dosisabhängigkeit für bakteriellen Überstand	45
4.6	Effekte auf die EFS unter nativen Bedingungen	48
4.7	Effekte auf die EFS unter NANC-Bedingungen	49
4.8	Effekte von Essigsäure	50
5	DISKUSSION	55
5.1	Methodischer Vergleich mit anderen Untersuchungen	55
5.2	Interpretation der Untersuchungsergebnisse	57
5.2.1	Einfluss von bakteriellem Überstand auf die Kontraktilität des Darms unter nativen Bedingungen	57
5.2.2	Einfluss von bakteriellem Überstand auf die Kontraktilität unter NANC-Bedingungen	59
5.2.3	Einfluss von bakteriellem Überstand auf die Kontraktilität nach vollständiger nervaler Blockade	60
5.2.4	Einfluss von Essigsäure auf die Kontraktilität	61
5.3	Ausblick	62
6	ZUSAMMENFASSUNG	65
7	LITERATUR	67
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	76

9 DANKSAGUNG

77

10 LEBENSLAUF

78

1 EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT

1.1 Was sind Probiotika?

Probiotika sind apathogene definierte Mikroorganismen, die in ausreichender Menge und in aktiver Form lebend in den Darm gelangen und dort positive gesundheitliche Wirkungen erzielen. Das heißt, sie übertreffen die Eigenschaft eines Lebensmittels als bloßer Nährstoff, weil sie das gesundheitliche Befinden des Wirtsorganismus in positiver Weise beeinflussen. Diese Effekte können u. a. eine Förderung der Laktoseverdauung bei Lactasemangel, Immunmodulation, Vorbeugung gastrointestinaler Infekte durch Aufrechterhaltung einer physiologischen Darmflora sowie eine Induktion gesundheitsförderlicher Enzyme bei Repression schädlicher Enzyme umfassen.

1.2 *Escherichia coli* Nissle 1917

Im Folgenden wird das von uns für die Untersuchungen verwendete Probiotikum, *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), hinsichtlich seiner ungewöhnlichen Entdeckungsgeschichte, seiner morphologisch-funktionellen Charakteristika und seines bisher bekannten Wirkungsspektrums vorgestellt.

1.2.1 Biografische Anmerkungen zu Alfred August Julius Nissle

Nach: [1]

Vorangestellt werden soll ein biografischer Abschnitt über den Entdecker des von uns untersuchten probiotischen Bakteriums, der den klinischen Nutzen von EcN eindrucksvoll belegt und in einen historischen Zusammenhang stellt – auch wenn es für die eigentliche Kernthematik sicher von nachgeordneter Wichtigkeit ist.

Am 30.12.1874 wurde der Entdecker von EcN in Köpenick geboren. Dort besuchte er bis 1885 die Mittelschule, in Prenzlau dann bis 1892 das Gymnasium und legte die Abiturprüfung 1893 am Gymnasium in Görlitz ab. Noch im gleichen Jahr nahm er das Studium der Humanmedizin in Berlin auf. Zu seinen Lehrern zählte unter anderem der berühmte Anatom Wilhelm

Waldeyer. Nach dem zweiten klinischen Semester kehrte Nissle Berlin den Rücken und beendete sein Studium mit dem Staatsexamen 1898 in Freiburg. Nur ein Jahr später promovierte er mit dem Thema „Die Erkrankungen der Keilbeinhöhle“.

Nach dem Medizinstudium leistete er von 1899 bis 1900 den Militärdienst in Berlin ab. Seine weitere Karriere begründete er am physiologischen Institut in Berlin, merkte aber bereits 1902, dass ihn das rein theoretische Arbeiten dort nicht mehr befriedigte. Er wechselte an das Hygiene-Institut in Berlin, an dem er bis 1906 verblieb. Die darauf folgenden fünf Jahre arbeitete er am Münchener Institut für Hygiene. Von dort wechselte er an das Königsberger Institut der gleichen Fachrichtung, an dem er sich 1912 auch habilitierte. 1915 übernahm er die Leitung des „Badischen Medizinaluntersuchungsamts für ansteckende Krankheiten“ in Freiburg. In diese Zeit fällt auch die Ernennung zum außerordentlichen Professor (1917) und zum ordentlichen Honorarprofessor (1934). Er wirkte am Medizinaluntersuchungsamt bis 1937. In diesem Jahr wurde das Arbeitsverhältnis von den Ordinarien des Institutes für Hygiene, denen er direkt unterstand, aufgekündigt, weil Nissle bei der Besetzung frei werdender Assistentenstellen vermehrt eigene Entscheidungsrechte einforderte und verweigerte, seine Privateinnahmen im Zuge einer Kontrolle darzulegen.

Im Dezember des folgenden Jahres eröffnete er dann quasi gezwungenermaßen ein Privatinstitut in Freiburg. Unterstützt wurde er dabei vom Nationalsozialistischen Deutschen Ärztebund. Auch Hitlers Leibarzt Prof. Morell, ein überzeugter Mutaflor[®]-Verordner, gewährte ihm seine Unterstützung. Mit dem Ende des Nationalsozialismus 1945 wurde Prof. Nissle durch die Militärregierung aus dem Personalverzeichnis der Universität Freiburg gestrichen und seines Amtes als Forschungsleiter enthoben. Er leitete ein Revisionsverfahren ein, da er nicht Mitglied der NSDAP gewesen war. Erst 1952 wurde er jedoch erneut Honorarprofessor der Universität, da auch die Fakultät sein Bestreben zunächst nicht unterstützt hatte.

Als Ende des 19. Jahrhunderts das wissenschaftliche Interesse an

Darmbakterien wuchs, herrschten zunächst zwei gegensätzliche Auffassungen vor: Darmbakterien als harmlose Saprophyten oder als Verursacher von Krankheiten. Bei der Herstellung von Plattenkulturen aus einem Gemisch menschlicher Stuhlproben und Typhuskulturen stellte Nissle dann fest, dass einige Kolibakterien das Wachstum der Typhus-Kolonien hemmen konnten. Gegenüber Salmonellen, Shigellen und Proteus, aber auch unter verschiedenen Coli-Kulturen fand Nissle das gleiche Phänomen. Diejenigen Coli-Stämme, die das Wachstum anderer Bakterienkulturen besonders stark hemmten, bezeichnete er als „starke“ Stämme und begab sich in der Folgezeit systematisch auf die Suche nach besonders starken Kolibakterien. Besonders häufig an Durchfallerkrankungen erkrankten zu jener Zeit verletzte Frontsoldaten in den Feldlazaretten. Dort isolierte er 1917 aus dem Stuhl eines im Gegensatz zu seinen Kameraden nicht an Durchfall erkrankten Pionierunteroffiziers den *E. coli*-Stamm, der heute Bestandteil des Medikaments Mutaflor® ist. Dieses wurde bereits 1916 von Nissle als geschütztes Warenzeichen angemeldet und 1917 vom Reichspatentamt eingetragen. Nach einigen Selbstversuchen zur Verträglichkeit setzte er es zur Therapie bei Patienten mit Obstipation, Diarrhö, Parathyphus B, Flexner-Ruhr und Salmonellen-Dauerausscheidern ein und war trotz geringer Fallzahlen von der Wirksamkeit seines Medikaments überzeugt.

Am 25.11.1965 verstarb Prof. Dr. med. Alfred Nissle im Alter von 90 Jahren in Freiburg. Er war bis zu seinem Tod lebhaft in seinem Labor tätig und führte seine Vitalität auf den täglichen Konsum seines Medikaments zurück. Seine Ehefrau führte sein Institut bis zu ihrem Tod 1970 weiter, dann wurde es geschlossen und die Rechte an Mutaflor® an die Firma Ardeypharm GmbH in Herdecke verkauft.

Nachdem die therapeutische Potenz der körpereigenen Darmflora mit Einführung der Antibiotika zunächst aus dem Blickfeld der Forschung geriet, ist sie in den letzten Jahren aufgrund ihrer evidenzbasierten Effekte insbesondere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wieder in das wissenschaftliche Interesses gerückt. Mit dieser wissenschaftlichen

„Renaissance“ wurden die grundlegenden Forschungsergebnisse Nissles zum therapeutischen Einsatz mit lebensfähigen Kolibakterien verspätet gewürdigt (siehe auch 1.2.3).

1.2.2 Charakteristika von *Escherichia coli*

Nach: [2]

1885 von Theodor Escherich erstmals beschrieben, stellt *Escherichia coli* (Ec) das erste spezifisch charakterisierte Darmbakterium dar. Ec ist ein gramnegatives, sporenloses und aufgrund seiner peritrichen Begeißelung sehr bewegliches Stäbchen. Es ist fakultativ anaerob und vergärt unter Gasbildung Glukose, Laktose und Mannitol. Neben Ec gibt es drei weitere Spezies (*E. fergusonii*, *E. hermanii* und *E. vulneris*), die jedoch nur gelegentlich in menschlichen Stuhlproben nachgewiesen werden können und deshalb nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen sind. Ec kommt regelmäßig im Darm von Warmblütern vor und ist damit der klassische Indikator für Verunreinigungen mit Fäkalien. Durch serologische Typisierung können 171 Körper-(O) Antigene, 56 Geißel-(H) Antigene, 72 Kapsel-(K) Antigene sowie 12 Fimbrien-(F) Antigene nachgewiesen werden.

Extraintestinale Infektionen mit Ec betreffen vorwiegend den Urogenitaltrakt, der meist durch Schmierinfektion aus dem Analbereich kontaminiert wird. Mit Hilfe ihrer P-Fimbrien können sie sich spezifisch am Epithel der harnableitenden Wege anhaften und mit Bakterientoxinen (z. B. Hämolysinen) die Zellen schädigen. Diese Invasivität kann zu eitrigen Entzündungen bis hin zur Urosepsis führen.

Intestinale Infektionen mit Ec sind vorwiegend gekennzeichnet durch massive Diarrhöen. Als Verursacher hierfür sind vier Ec-Subtypen bekannt, die sich durch chromosomal kodierte, phagenkodierte und plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren unterscheiden: Enteropathogene Ec (EPEC, Adhärenz und Zerstörung von Mikrovilli), Enterotoxinbildende Ec (ETEC, Adhärenz mit Toxinproduktion), Enteroinvasive Ec (EIEC, mukosale Invasivität und Destruktion), Enterohämorrhagische Ec (EHEC, Adhärenz mit Verotoxin- und Hämolysinproduktion).

1.2.3 Charakteristika von *E. coli* Nissle 1917

Nach: [73]

Im Gegensatz zu den oben aufgeführten Ec-Stämmen ist der von uns untersuchte EcN-Stamm apathogen und erfüllt damit die wesentliche Bedingung, um als Probiotikum bezeichnet zu werden.

Das Genom von EcN ist seit einigen Jahren molekularbiologisch charakterisiert. Es umfasst 4,8 Megabasenpaare und ca. 600 open reading frames (ORF). Eine Punktmutation im Gen für die O-Antigen-Polymerase führt dazu, dass EcN nur eine einzige Basiseinheit in der O-spezifischen Kette des Lipopolysaccharids enthält. Diese Struktur scheint dafür verantwortlich zu sein, dass der Stamm apathogen ist, nicht in der Blutbahn überleben kann und auf Agarplatten als semi-raue Kolonie wächst, einem weiteren Kennzeichen apathogener Stämme. Das Chromosom enthält mindestens vier Genominseln für sog. Fitnessfaktoren wie Mikrozine, Adhäsine, Eisenaufnahmesysteme und drei Fimbrien-Typen, die ein Erreichen des Darms und das dortige Überleben gewährleisten. Gene für Pathogenitätsfaktoren fehlen dagegen vollständig. Der Stamm Nissle 1917 produziert weder Entero-, noch Zytotoxine und ist nicht enteroinvasiv, uropathogen oder serumresistent. Er ist genetisch stabil und damit ein schlechter Empfänger für Plasmide und Resistenzfaktoren. Gegen Antibiotika wurden bisher keinerlei Resistenzen nachgewiesen. Zwei Plasmide ermöglichen den spezifischen Nachweis mittels PCR. Die Nachweisgrenze aus Stuhlproben beträgt 10^3 Kolonie-bildende Einheiten pro Gramm Stuhlmasse (cfu/g).

1.3 Klinische Einsatzmöglichkeiten von Probiotika

In zahlreichen Studien haben mehrere Probiotikastämme ihre Wirksamkeit in der Therapie von Darmerkrankungen unter Beweis gestellt. Wesentliche Probleme in der wissenschaftlichen Bewertung des therapeutischen Nutzens von Probiotika sind allerdings die unzureichend Evidenz-basierten Untersuchungen sowie die unklaren Wirkmechanismen. Viele klinische Studien sind aufgrund geringer Fallzahlen, fehlender Placebokontrolle oder

Verblindung kritisch zu bewerten. Einige Berichte beziehen sich lediglich auf Kasuistiken, die zwar klinisch eindrucksvoll erscheinen, jedoch keine allgemein gültigen Schlussfolgerungen erlauben. Diesen Einschränkungen wurde in jüngeren Untersuchungen zur Wirksamkeit von Probiotika zunehmend Rechnung getragen, so dass mittlerweile die Studienlage wissenschaftlichen Maßstäben besser standhalten kann.

Seit bekannt ist, dass Probiotika immunmodulatorische Effekte haben, werden sie insbesondere zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt, bei denen eine gestörte Immuntoleranz eine wesentliche pathogenetische Rolle spielt. Mögliche Wirkmechanismen sind eine verbesserte mukosale Barriere gegen pathogene Darmbakterien, Produktion bakterizider Proteine, kompetitive Verdrängung von pathogenen Darmbakterien durch Nährstoffkonkurrenz und Belegung mukosaler Bindungsstellen [18], [19], [20], [21], [22], Hemmung proinflammatorischer Zytokine (TNF α) [23] sowie die Induktion protektiver Zytokine und Antikörper (IL10, IgA, IgM) [24], [25]. In mehreren Studien konnte die äquivalente Wirkung von Mesalazin und Mutaflor[®] in der Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa belegt werden [26], [27], [28], [29], [30]. Diese überraschenden Ergebnisse ließen sich im Tiermodell anhand histologischer Untersuchungen und Zytokinmessungen bestätigen [31], [32]. Ähnlich positive Ergebnisse wurden bei der Colitis ulcerosa-assoziierten Pouchitis erzielt. Sowohl bei der Prävention als auch für die Remissionserhaltung nach stattgehabter Pouchitis zeigte VSL#3, ein Gemisch aus vier Lactobacillus-Stämmen, drei Bifidobacterium-Stämmen und Streptococcus salivarius subsp. thermophilus, eine signifikant bessere Wirkung gegenüber Placebo [34], [35], [36]. Kasuistisch konnte dies auch für Mutaflor[®] belegt werden [37]. Generell scheint bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine zur Standardtherapie adjuvante Therapie mit bestimmten Probiotikastämmen in der gastroenterologischen Praxis legitimiert zu sein [8].

Für die Divertikulitis zeigte sich in einer kleinen Pilotstudie ebenfalls ein remissionsverlängernder Effekt durch die Zugabe von EcN zur antibiotischen Therapie. Zusätzlich gaben die Patienten in der Probiotika-Gruppe subjektiv

geringere abdominelle Beschwerden an. Diese Ergebnisse sind in größeren Studien noch zu bestätigen, bevor von einer generellen Wirksamkeit ausgegangen werden kann [14], [15]. Ähnlich ist die Datenlage zur Therapie der pseudomembranösen Kolitis. In einigen Fällen ist die erfolgreiche Behandlung durch intestinale Lavage und anschließende Instillation von in Lösung gebrachten Mutaflor®-Kapseln beschrieben, ohne dass dies bisher durch größere klinische Studien überprüft worden ist [16], [17].

Aufgrund der guten Verträglichkeit und des geringen Nebenwirkungsspektrums erscheint es nicht verwunderlich, dass Probiotika auch bei Kindern und Frühgeborenen eingesetzt werden. So konnte durch eine postnatale Besiedlung des Säuglingsdarms mit EcN das Auftreten und das Spektrum pathogener Keime geschmälert und so das Auftreten von späteren gastrointestinalen Infektionen verringert werden [38], [39]. Bei Frühgeborenen führte die Besiedlung mit EcN zu einem signifikant höheren Plasma-Level von IgA und IgM, so dass auf eine Stimulierung der humoralen und zellulären Immunität durch die orale Gabe des Probiotikums geschlossen werden kann [40]. Weitere Indikationen stellen atopische Erkrankungen dar. Hier wurde Lactobacillus zur Primärprävention atopischer Erkrankungen an Mütter, die mindestens einen erstgradigen Verwandten mit atopischer Erkrankung (atopisches Ekzem, allergische Rhinitis, Asthma) hatten, in der Schwangerschaft und für sechs Monate an deren Neugeborene verabreicht. Dadurch ließ sich die Häufigkeit atopischer Erkrankungen im Vergleich zum Placebo um die Hälfte reduzieren [41].

Nicht zuletzt wird Probiotika vor allem eine Wirksamkeit bei sog. funktionellen Darmerkrankungen wie Obstipation und Diarrhö [3] durch eine positive Beeinflussung der darmeigenen Mikroflora zugesprochen [4], [5]. Die postulierten Wirkmechanismen, die einer Beeinflussung der gastrointestinalen Motilität durch Probiotika zugrunde liegen, werden gesondert im folgenden Abschnitt besprochen.

Trotz klinisch überzeugender Studien zum Einsatz von Probiotika verbleiben kritische Stimmen, die einem routinemäßigem Einsatz zurückhaltend gegenüberstehen, da nicht genau untersucht ist, welche Probiotika-

Zusammensetzung für welche Indikation zu verwenden ist, wie hoch die optimale Dosis ist und wie lange eine Therapie durchzuführen ist [33].

1.4 Einfluss von Probiotika auf gastrointestinale Motilität

Wie im vorhergehenden Abschnitt aufgezeigt wurde, sind die Wirkungsmechanismen probiotischer Kulturen vor allem in der Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen intensiv beforscht. Erkenntnisse bezüglich der Wirkprinzipien, durch die die gastrointestinale Motilität beeinflusst wird, sind hingegen spärlich. Es werden zwar Effekte auf die gastrointestinale Motilität, deren Normalisierung eine große klinische Herausforderung darstellt, beobachtet, aber die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht befriedigend aufgeklärt. Eine standardisierte Untersuchung der Motilitätsbeeinflussung durch Probiotika an humanem Kolongewebe findet sich derzeit in der wissenschaftlichen Literatur gar nicht. Während die vorliegende Untersuchung einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle von EcN in der Modulation der intestinalen Motilität leisten soll, stützen sich bisherige Erkenntnisse vornehmlich auf die Beschreibung klinischer Erkenntnisse oder die Auswertung von Daten aus Tierversuchen.

Die Besserung obstipativer Symptomatik wird im Wesentlichen zurückgeführt auf eine Beeinflussung der Darmmotilität durch drei Mechanismen. Zunächst führt die Wiederherstellung einer ausgewogenen physiologischen Mikroflora auch zur Wiederherstellung einer geregelten intestinalen Motilität. Belegt wird diese Annahme durch Beobachtungen an Patientenkollektiven mit Antibiotika-assoziiertes Diarrhö, denen durch die Gabe von Probiotika geholfen werden konnte (siehe 1.3). Wesentliche Wirkprinzipien dürften hierbei die Verdrängung entero-invasiver Keime durch die Abgabe bakterizider Peptide und die verschärfte Nahrungs- und Lebensraumkonkurrenz sein [9].

Des Weiteren kommt es unter der Therapie mit Probiotika zu einem Absinken des luminalen pH-Wertes- vermutlich durch den vermehrten Anfall von kurzkettigen Fettsäuren (short chain fatty acids, SCFA) aus der bakteriellen Fermentation. Diese pH-Wertänderung in den azidotischen Bereich soll eine direkte Stimulation der glatten Muskelzellen bewirken [10].

Ob dabei der vermehrte Anfall von kurzkettigen Fettsäuren (short-chain fatty acids, SCFAs) direkt oder das reine Absinken des pH-Wertes für die gefundenen Effekte verantwortlich ist, bleibt dabei spekulativ.

Als letzter Mechanismus wird die vermehrte Dehnung der Darmwand und damit reflektorische Tonuszunahme der enteralen Muskelzellen diskutiert. Diese verstärkte Dehnung der Darmwand wiederum basiert auf einer vermehrten Gasbildung und erhöhten Bakterienzellmasse sowie einem vermehrten Wassergehalt des Stuhls durch osmotische Effekte bakterieller Stoffwechselprodukte und in der Folge einem höheren Stuhlgewicht bei weicherer Konsistenz [10], [11], [12].

Im Tierversuch bewirkte die Gabe von Probiotika bei Schweinen eine gesteigerte Motilität, die tageszeitabhängig morgens auch zu einer vermehrten Defäkation führte [43]. An Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Zufuhr von Probiotika eine infektionsbedingte muskuläre Hyperkontraktibilität des Darms lösen konnte. Dabei spielte vor allem die Herunterregulierung bestimmter proinflammatorischer Zytokine eine Rolle (TGF- β , PGE₂) [44].

Auch Mutaflor[®] hat seine Wirksamkeit sowohl gegen Placebo als auch gegen Lactulose zeigen können und bietet somit eine praktisch nebenwirkungsfreie Therapiealternative, die zusätzlich zu ernährungsumstellenden Allgemeinmaßnahmen in der Therapie von Erkrankungen, die auf einer gestörten Motilität beruhen, sicher empfohlen werden kann [12], [13].

1.5 Kurzkettige Fettsäuren und gastrointestinale Motilität

Die durch probiotische Bakterienkulturen vermittelten Effekte auf die gastrointestinale Motilität scheinen überwiegend von den in das Lumen abgegebenen Stoffwechselprodukten abhängig zu sein. Funktionell bedeutsam sind hier insbesondere die SCFAs, die als Nährstoffe für die Darmschleimhaut dienen und mit mukosalen Ionenkanälen interagieren. SCFAs entstehen im Kolon durch anaerobe bakterielle Fermentation von Oligosacchariden, nichtabsorbierter Stärke, Glucose und abgeschilferten

Enterozyten. Die wesentlichen Vertreter sind Essigsäure, Butyrat und Propionat mit einem molaren Konzentrationsverhältnis von circa 60:25:15. SCFAs werden überwiegend passiv absorbiert, zu etwa 60% in undissoziierter Form, zu 40% als Ionen. SCFAs stellen den Großteil an Anionen im Kolonlumen, da sie schwache Säuren sind und bei neutralem Lumen-pH mit einem pK_a von 4,8 als Anionen vorliegen. Dementsprechend liegen in gleicher Menge freie H^+ -Ionen vor. Im Folgenden sollen die bisherigen Daten vorgestellt werden, die eine Modulation der gastrointestinalen Motilität durch SCFAs belegen konnten.

1.5.1 Einfluss von SCFAs auf gastrointestinale Motilität im Tiermodell

Aus Untersuchungen am Hundedarm ist bekannt, dass ein Gemisch aus kurzkettigen Fettsäuren die Motilität im Ileum stärker steigern kann, als die Infusion von NaCl allein dazu in der Lage ist [45]. Die potenteste der SCFAs dieser Studie war Essigsäure. Physiologische Bedeutung könnte diese Motilitätsinduktion im Sinne einer sog. Reinigungsfunktion des Ileum haben, um bei koloilealem Reflux den Koloninhalt aus dem Ileum in das Kolon zurückzutransportieren. Dieser prokinetische Effekt war durch Blockade von $5HT_2$ -Rezeptoren, muskarinergen Rezeptoren, adrenergen Rezeptoren, durch Inhibition der Prostaglandin-Synthese oder Vollnarkose nicht, wohl aber durch die Blockade von Ca^{++} -Kanälen durch Verapamil oder den Einsatz des Lokalanästhetikums Lidocain aufhebbar [46], was auf einen lokalen Ca^{++} -abhängigen Reflex hindeutet.

Weitere Studien weisen darauf hin, dass ein Ca^{++} -abhängiger Mechanismus auch für die verstärkte Kontraktilität im Kolon verantwortlich sein könnte. In ex-vivo Untersuchungen wurde die longitudinale Kolonmuskulatur im Organbad mit SCFAs (Propionat, Butyrat und Essigsäure jeweils gegen ACh) stimuliert [47]. Während Tetrodotoxin (TTX), Atropin (AT) oder Ryanodin zu keiner Einschränkung der kontraktionssteigernden Effekte führte, kam es unter dem Kalziumantagonisten Nifedipin oder Anwendung Ca^{++} -freier Lösung zum Erliegen der induzierten Motilitätssteigerung. Diese Befunde sprechen dafür, dass die Effekte direkt muskulär vermittelt werden und dabei ein Ca^{++} -Influx von essentieller Bedeutung ist.

Auch am Rattenkolon führt die Applikation von SCFAs zu einer Motilitätsinduktion. Hier zeigte sich im Organbad, dass die gefundenen Effekte wohl nicht direkt muskulär, sondern vermittelt über eine non-cholinerge Neurotransmission auftreten [48]. Andere Studien deckten einen weiteren möglichen, eher hormonellen Mechanismus auf. SCFAs verkürzten die Kolontransitzeit, reduzierten dabei aber zugleich die myoelektrische Aktivität. Dieser Effekt könnte durch Polypeptid YY (PYY) erklärbar sein, dessen Konzentration im Blut nach SCFA-Applikation anstieg und dessen Inaktivierung durch ein Antiserum die beschriebenen Effekte komplett aufhob [53].

Außerdem scheinen SCFAs in der Lage zu sein, die Magen-Caecum-Transitzeit zu verkürzen und beeinflussen damit neben der Motilität im Kolon auch die des Rattendünndarms [50], was durch in-vitro Untersuchungen des terminalen Ileum belegt werden konnte. SCFAs induzierten hier eine verstärkte Kontraktionsaktivität nach propulsivem Muster, die nicht auf nervalen Mechanismen basierte, sondern rein muskulär über Ca^{++} -Ionen-Verschiebung vermittelt wurde [52].

Widersprüchliche Erkenntnisse liefert eine ex-vivo Untersuchung an Ratten, die zeigte, dass die Motilität hinsichtlich Frequenz und Kontraktionsaktivität durch die verschiedenen SCFAs abgesenkt wurde [51]. Durchweg zu einer Reduktion gastrointestinaler Motilität kam es bei Untersuchungen an Schweinen. Allerdings wurde in den folgenden Studien primär die Motilität des Magens untersucht. Eine unterschiedliche Wirkung von SCFAs in unterschiedlichen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes (GIT) kann aber nicht ausgeschlossen werden, sodass diese Daten nur bedingt vergleichbar sind. SCFAs im Ileum von Schweinen reduzierten die gastrointestinale Motilität, indem die Frequenz der Kontraktionen zwar zunahm, dafür die Amplitude der Kontraktionen stark verringert wurde [54]. Auch an Schweinen kann diese Inhibition der gastralen Motilität bei Applikation von SCFAs ins Ileum, eventuell wie bei Ratten, auf PYY zurückgeführt werden, da die SCFA-Infusion zu einem Anstieg von PYY im Serum führte [55]. Ein weiterer Mechanismus, der zur Abnahme der Motilität führt, könnte die

Desensitivierung vagaler Rezeptoren durch die applizierten Fettsäuren sein [56].

1.5.2 Einfluss von SCFA auf gastrointestinale Motilität beim Menschen

Essigsäure, Propionat und Butyrat sind im Dickdarm aller bisher untersuchten Säugetiere einschließlich des Menschen gefunden worden. Das molare Verhältnis dieser drei wichtigsten SCFAs beträgt beim Menschen etwa 60: 24: 16.

Bei Fermentationsprozessen durch bakterielle Anaerobier entstehen etwa 200 mmol bis 700 mmol SCFA pro Tag [57]. Wesentliche Substrate sind hierbei Zellwand-Polysaccharide wie z.B. Zellulose, Pektin und Hemizellulose. Die physiologischen Funktionen sind vielfältig und umfassen die Energieversorgung der Darmmucosa (bis zu 10%), die Interaktion im Elektrolyttransport sowie die Vermittlung antibakterieller Effekte [58].

Nach Absorption durch die Enterozyten wird vor allem Butyrat in der Mukosa verstoffwechselt. Der Großteil der Fettsäuren, die über die Vena portae zur Leber gelangen, wird dort metabolisiert und nur ein kleiner Rest gelangt zu den peripheren Geweben [59].

Die Untersuchungen der Fettsäuren hinsichtlich ihres möglichen Einflusses auf die intestinale Motilität sind sehr spärlich und zudem nicht komplett vergleichbar. Einerseits wurde nach Applikation von SCFAs (Mischung aus Essigsäure, Propionat und Butyrat) in die ileozoekale Region eine Zunahme der Motilität im terminalen Ileum gefunden und, wie bei der Studie am Hundedarm bereits postuliert, als ileale Reinigungsfunktion bei bestehendem koloilealen Reflux gedeutet [60]. Andererseits ließen sich diese Beobachtungen in einer weiteren Studie am Kolon nicht bestätigen [61] und physiologische SCFA-Konzentrationen konnten nach Applikation in das Kolonlumen weder die phasische noch die tonische Darmwandkontraktilität steigern [62].

Ein weiterer Wirkmechanismus von SCFAs, über den die gastrointestinale Motilität beeinflusst werden kann, ergibt sich aus der Tatsache, dass SCFAs in-vitro bei Hund und Mensch [63] zu einem signifikant gesteigerten Blutfluss

in der Kolonwand führen. Vermittelt wird dieser Effekt durch eine Widerstandseniedrigung in den zuführenden Arterien, der vor allem durch Essigsäure getriggert zu sein scheint [64].

2 ZIEL DER UNTERSUCHUNGEN

Nach den ersten Beschreibungen positiver Effekte von Probiotika auf die gastrointestinale Integrität, gerieten Probiotika mit Einführung der antibiotischen Therapie zunächst in den Hintergrund des wissenschaftlichen Interesses.

Mit dem Nachweis des therapeutischen Potenzials von Probiotika bei entzündlichen und funktionellen Erkrankungen des GIT rückten diese im Vergleich zu Antibiotika oder Immunsuppressiva fast nebenwirkungsfreien Therapiekonzepte wieder in den klinischen Fokus.

Obwohl die Zahl klinischer Studien zur Wirksamkeit von Probiotika deutlich ansteigt, ist die Datenlage zu standardisierten Grundlagenuntersuchungen der Wirkprinzipien relativ schwach. Dies trifft insbesondere auf den Einsatz von Probiotika zur Modulation der gastrointestinalen Motilität und deren Effekte auf die Kontraktilität der menschlichen Darmwand zu.

Vor diesem Hintergrund hat die vorliegende Untersuchung zum Ziel, die Effekte des Probiotikum EcN auf die Kontraktilität humaner Kolonmuskulatur zu beschreiben und die dafür verantwortlichen Mechanismen aufzuklären. Um standardisierte Bedingungen herzustellen, wurde auf Organbadexperimente zurückgegriffen, bei denen isolierte Muskelstreifen definierten Konzentrationen von EcN-Überständen exponiert wurden.

Das experimentelle Studiendesign berücksichtigte folgende Fragestellungen:

- § Einfluss von bakteriellen Überständen auf das isometrische Kontraktilitätsmuster der nativen Darmwandmuskulatur
- § Einfluss von bakteriellen Überständen auf das enterische Nervensystem (ENS) durch selektive nervale Reizung mittels elektrischer Feldstimulation (EFS)
- § Einfluss von bakteriellen Überständen auf das non-adrenerge, non-cholinerge (NANC) Transmittersystem nach Blockierung adrenerger und cholinerges Transmitter
- § Einfluss von bakteriellen Überständen auf die intestinale Muskulatur

nach vollständiger Blockierung des ENS

- § Einfluss von Essigsäure (Bestandteil des bakteriellen Überstandes) auf die Kontraktilität der Darmwandmuskulatur.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchungsmaterial

Zur Messung der glattmuskulären Aktivität von Muskelstreifenpräparaten der gesunden Darmwand dienten Präparate von insgesamt 17 Patienten (9 Frauen, 8 Männer, Alter: 41-86 Jahre, Durchschnittsalter: 65,1 Jahre), die sich aufgrund eines linksseitigen nicht-stenosierenden Kolonkarzinoms einer Kolonteilresektion unterziehen mussten. Die Anamnese und der Obstipations-Score ergaben keinen Hinweis auf eine obstipative Symptomatik, ebenso wenig lag eine die Motilität beeinflussende Dauermedikation oder eine anderweitige Darmerkrankung vor.

3.2 Präparation des Untersuchungsmaterials

3.2.1 Präparation der Operationsresektate

Unmittelbar nach Bergung des OP-Resektates wurden noch im Operationssaal die Appendices epiploicae mitsamt der Serosa im Entnahmeareal abpräpariert und ein ca. 5 cm langer zirkulärer Darmabschnitt aus dem distalen Colon sigmoideum gewonnen.

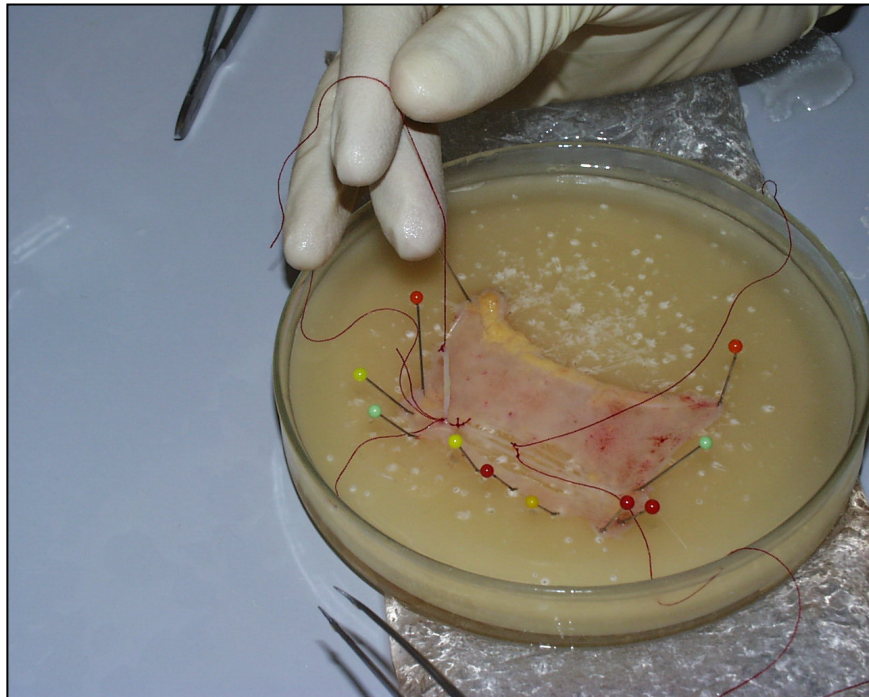
Bei der Darmwandentnahme wurde immer ein Mindestabstand von 5 cm zum Tumor eingehalten. Darmabschnitte, deren Vitalität durch intraoperative Massnahmen (ischämische, thermische oder mechanische Schädigungen) beeinträchtigt war oder die narbige, entzündliche oder stenosierende Veränderungen aufwiesen, wurden grundsätzlich von den Untersuchungen ausgeschlossen. Das herausgetrennte Präparat wurde ausgiebig in auf 4°C gekühlter Präparierlösung (siehe 3.3.1) gespült und umgehend in das Organbadlabor transportiert, wo die Feinpräparation der Muskelstreifen erfolgte.

Alle Untersuchungen erfolgten im Einverständnis mit den Patienten, der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, und dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck und wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Universität zu Lübeck genehmigt (Aktenzeichen: 002/97).

3.2.2 Feinpräparation der Muskelstreifen

Da sich bereits nach kurzer Zeit eine kontraktionsbedingte Schrumpfung des Muskelpräparates zeigte, wurde die entnommene Darmwand mit Hilfe von kleinen Fixiernadeln auf ihre in-situ-Länge gedehnt. Mit einer feinen Präparierschere wurden Mukosa und Submukosa mit Hilfe einer Lupenbrille abpräpariert und das Präparat anschließend gewendet, um ggf. noch Reste der Serosa oder Fettanhängsel zu entfernen. Um sicherzustellen, dass der zwischen Ring- und Längsmuskelschicht lokalisierte Plexus myentericus in jedem Präparat vollständig erhalten blieb, wurde keine Separation der Muskelschichten vorgenommen, sondern Vollwandstreifen von 25 mm Länge mit einem speziellen Stanzinstrument aus fünf parallel im Abstand von 1 mm angeordneten Rasierklingen herausgestanzt. Dabei wurde parallel zu der mit der Lupenbrille auf der Mukosaseite gut sichtbaren Ringmuskulatur geschnitten, um isoliert Ringmuskelstreifen zu gewinnen (Abb. 1).

Abbildung 1: *Feinpräparation des Darmwandpräparates*



Nach Entfernung der Mukosa, Submukosa und Serosa sowie Dehnung des Präparates auf seine in-situ-Länge werden mit Hilfe eines Stanzinstrumentes Ringmuskelstreifenpräparate gewonnen. Die Enden werden mit nicht dehnbaren Haltefäden umschlungen.

Auf diese Weise entstanden Muskelstreifenpräparate mit einheitlichem Kaliber, die beide Muskelschichten enthielten, wobei jedoch die quer durchtrennte Längsmuskelschicht in den anschließenden Kontraktionsmessungen funktionslos blieb.

Beide Enden des Muskelstreifenpräparates wurden mit einem nicht dehnbaren Haltefaden umschlungen. Die fertigen Präparate waren circa 20 mm lang, 1 mm breit und besaßen eine Querschnittsfläche von etwa 1 mm². Während der Präparation wurde die Präparierlösung häufig erneuert, um die Temperatur von 4°C zu halten. Die Funktionstüchtigkeit der Muskelstreifen ließ sich schon während der Präparation durch ihr spiralförmiges Zusammenziehen erkennen.

3.3 Lösungen

3.3.1 Präparierlösung

Die Präparierlösung wurde aus isotonen Stammlösungen zusammengestellt und diente zur Frischhaltung und Kühlung der Muskelpräparate während des Transports und der Präparation. Der Kalziumgehalt war höher als in der interstitiellen Flüssigkeit und diente dem Schutz vor präparationsbedingten Schädigungen des Gewebes. Es wurde dadurch eine Verminderung der neuromuskulären Erregbarkeit erzielt, da die Membranerregbarkeit der Muskelzelle durch den György-Quotienten ($K = (K^+ \times HCO_3^- \times HPO_4^{4-}) / (Ca^{2+} \times Mg^{2+} \times H^+)$) beschrieben wird, dessen Größe sich umgekehrt proportional zum extrazellulären Kalziumspiegel verhält. Die Präparationslösung hatte folgende Zusammensetzung: Na⁺ 144; K⁺ 5,9; Ca²⁺ 3,7; Cl⁻ 157 (je in mmol/l).

3.3.2 Physiologische Puffer- und Nährlösung

Um die Funktionstüchtigkeit des isolierten glatten Muskels über längere Zeit aufrecht zu erhalten, wurde das Gewebe unter Bedingungen gehalten, die den in-vivo-Bedingungen möglichst entsprechen. Hierzu wurde eine nach Krebs-Henseleit modifizierte physiologische Puffer- und Nährlösung verwendet, die durch Mischen verschiedener isotoner Stammlösungen hergestellt wurde und folgende Zusammensetzung hatte: Na⁺ 137; K⁺ 5,9;

Ca^{2+} 2,5; Mg^{2+} 1,2; Cl^- 124; HCO_3^- 25; H_2PO_4^- 1,2; Glukose 11,5 (je in mmol/l).

Die für Bakterienbefall besonders empfindliche Glukoselösung wurde an jedem Versuchstag frisch angesetzt. Die Kalziumchloridlösung wurde der Lösung erst nach Begasung zugeführt, da sonst im alkalischen Milieu Kalziumkristalle (Kalziumphosphat, Kalziumkarbonat) ausfallen können. Die Lösung wurde mit einem Gasgemisch (Carbogen) aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid (Volumenprozent) durchperlt, wobei sich ein pH-Wert von 7,4 bei einer Temperatur von 37°C einstellte. Die Lösung wich in zwei Punkten von der interstitiellen Flüssigkeit bzw. den in-vivo-Verhältnissen ab: einer höheren Sauerstoff- und einer höheren Glucosekonzentration, die die durch längere Diffusionswege bedingte Transportbehinderung ausgleichen sollten.

3.4 Pharmaka und bakterielle Überstände

In der nachstehenden Tabelle (Tab.1) sind die verwendeten Pharmaka und Reinsubstanzen, jeweils mit Angabe des Konzentrationsbereichs, des Handelsnamens, des Herstellers und der in der Arbeit verwendeten Abkürzung aufgeführt:

Tabelle 1: *Liste der benutzten Pharmaka bzw. Substanzen*

Substanz	Dosierung	Wirkung	Hersteller
Acetylcholinchlorid (ACh)	10^{-7} – 10^{-4} mol/l	Kontraktion der glatten Muskulatur	Sigma
Atropinsulfat (AT)	5×10^{-5} mol/l	Blockade der muskarinergen ACh-Rezeptoren	Sigma
Papaverin Hydrochlorid (PAP)	2×10^{-3} mol/l	Hemmung der Phosphodiesterase	Karls-Pharma
Phentolamin Mesilat (Phe)	10^{-5} mol/l	Blockade der α_1 und α_2 Rezeptoren	Sigma
Propranolol Hydrochlorid (Pro)	10^{-5} mol/l	Blockade der β_1 und β_2 Rezeptoren	Sigma
Tetrodotoxin (TTX)	10^{-5} mol/l	Blockade neuronaler Natriumkanäle	Sigma
Standard-I-Medium (St.-I-Medium)	1:50 und 1:5		Merck
Bakterielle Überstände	1:50 und 1:5		Ardeypharm

Das St.-I-Medium (Merck, Art. 1.07882) ist ein Komplexmedium für die Bebrütung mit Bakterien, das 15 g/l Peptone, 3 g/l Hefeextrakte, 6 g/l Natriumchlorid und 1 g/l D(+)Glucose enthält. Die bakteriellen Überstände wurden durch die Firma Ardeypharm (Herdecke) hergestellt. Es handelt sich dabei um einen steril filtrierten Kulturüberstand von EcN (9.2×10^8 cfu/ml) aus der stationären Phase der Kultur, der nach 16 h Bebrütung bei 37°C durch Zentrifugation und Filtration über einen Sterilfilter der Porengröße 0,45 µm gewonnen wurde.

3.5 Versuchsanordnung zur Messung der mechanischen glattmuskulären Aktivität

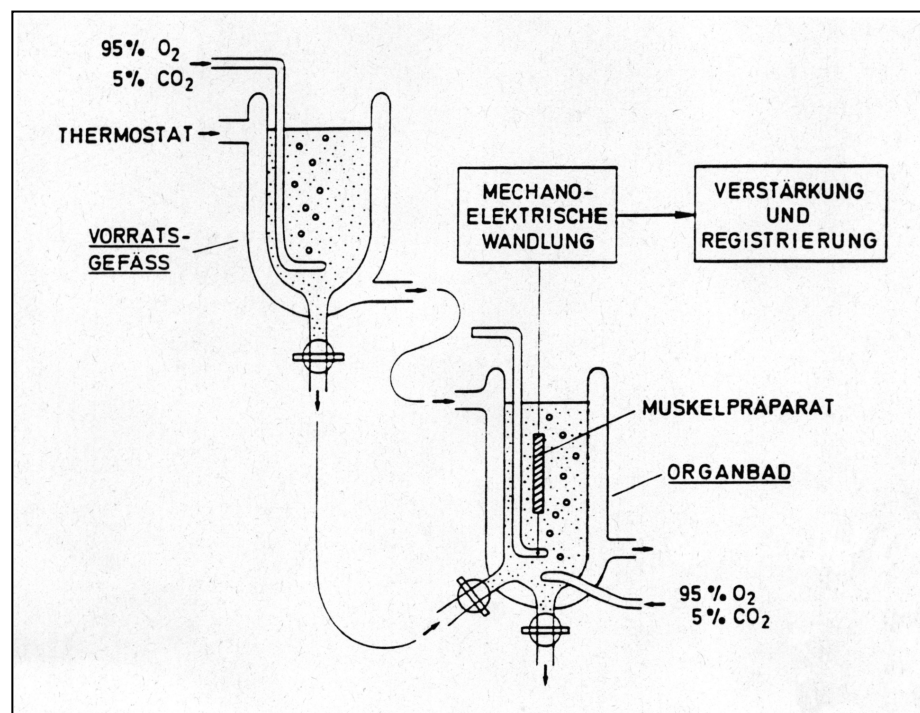
3.5.1 Organbad

Die Muskelstreifen wurden in ein begastes, mit 30 ml Puffer- und Nährlösung gefülltes Organbad überführt. Das beheizte, doppelwandige

Glasgefäß konnte sechs Präparate aufnehmen. An der Unterseite des Gefäßes befanden sich Anschlüsse für die Begasung, für Zu- und Ablauf der Lösung und für das in der Doppelwandung zirkulierende, auf 37°C temperierte Wasser. Ein ebenfalls auf 37°C temperiertes Vorratsgefäß enthielt frische begaste Krebslösung für den schnellen Austausch beim Spülen des Organbads (Abb. 2).

Zur Messung der Kontraktionskraft wurden die Muskelstreifen über die Haltefäden dicht über dem Boden des Organbades befestigt und mit dem oberen Ende an einem Kraftaufnehmer (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Typ F30 bzw. Typ K30) fixiert.

Abbildung 2: Aufbau des Organbades



Schematische Darstellung des Organbades zur Messung von glattemuskulärer Aktivität (nach Golenhofen 1983).

3.5.2 Kraftaufnahme und Signalverarbeitung

Die Kraftentwicklung wurde isometrisch gemessen. Die Kraftaufnehmer waren mit Zwei-Kanal Brückenverstärkern (Hugo Sachs Elektronik, Typ 301) zu einer Wheatstone'schen Brücke verschaltet. Das verstärkte Messsignal wurde zur kontinuierlichen Aufzeichnung der Messwerte mit Hilfe einer 12-

Bit-Analog-Digital-Wandler-Karte (analog digital converter, ADC, Data Translation GmbH, Bietigheim-Bissingen, Typ DT21-EZ) auf eine PC-Anlage weitergeleitet.

Vor Beginn eines Versuchs wurde die Brückenspannung der Messverstärker in der Weise abgeglichen, dass auf jedem Messkanal bei unbelasteten Kraftaufnehmern keine Spannung anlag (Brückenabgleich). Anschließend wurde jeder Messkanal so kalibriert, dass eine Kraft von 10 mN einer Ausgangsspannung des Messverstärkers von 330 mV entsprach. Danach wurde das Aufnahmeprogramm für jeden Kanal mit Eichgewichten kalibriert. Die Brückenverstärker waren mit einem analogen Hochpassfilter für Frequenzen über 10 Hz ausgestattet, um Störungen im Signal zu reduzieren. Eine galvanische Trennung von Sensoren und Rechner war nicht nötig.

Um die 12-Bit-Auflösung (entspricht 4096 Abstufungen) des ADC voll auszunutzen und den quantitative Messfehler zu verringern, wurde der interne Messverstärker des ADC auf einen Eingangsbereich von 0 bis 10 V eingestellt und das Signal mit einer Abtastrate von 400 Hz aufgezeichnet. Anschließend wurde jeweils der Mittelwert von 100 Messwerten bestimmt und abgespeichert. Die für jeden Kanal entstandene Messkurve besaß damit eine Abtastrate von 4 Hz – eine ideale Voraussetzung für die Langzeiterfassung glattmuskulärer Aktivitäten mit relativ niedrigen Änderungsgeschwindigkeiten.

3.5.3 Software

Die für die Aufzeichnung der Signale und Weiterverarbeitung der Messkurven verwendeten Programme wurden von uns speziell für diese Aufgaben entwickelt. Als Grundlage dazu diente das Visual Engineering Environment (VEE, Hewlett Packard, Version 5.0.), das eine objektorientierte Programmierumgebung für Test- und Messanwendungen erlaubt.

3.5.4 Elektrische Feldstimulation

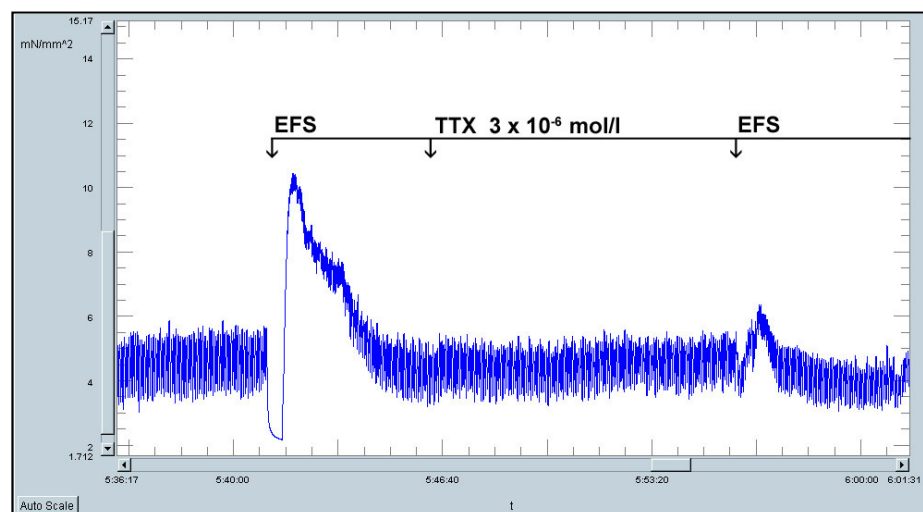
Zur Durchführung der elektrischen Feldstimulation (EFS) wurden mit

geringem Abstand (ca. 1 mm) und über die ganze Länge jedes Muskelstreifens Platinelektroden angeordnet, ohne das Präparat jedoch direkt zu berühren. Jeweils 4 Elektroden bildeten eine Reihe, in der sich Anoden und Kathoden im Abstand von ca. 6 mm abwechselten, und wurden mit einem Reizstromgerät (Hugo Sachs Elektronik, Stimulator IV, Typ 215) angesteuert.

Es wurden Rechteckimpulse mit einer Spannung von 50 V und einer Einzelpulsbreite von 0,5 ms erzeugt und über eine Zeitspanne von 30 s appliziert. Eine starke Relaxation der Muskelstreifenpräparate wurde besonders bei niedrigen Reizfrequenzen zwischen 1–10 Hz erreicht, die typischerweise eine Depolarisierung von Nervenfasern auslösen [65], [68]. Für alle Versuche wurde deshalb eine EFS mit 5 Hz über einen Zeitraum von 30 s angewendet.

Die dadurch regelmäßig auslösbare Relaxation war ausschließlich nerval bedingt und ließ sich durch die Applikation des Nervengiftes TTX, welches durch Blockade schneller nervaler Natriumkanäle eine Ausbreitung von Aktionspotentialen verhindert, komplett ausschalten (Abb. 3).

Abbildung 3: EFS vor und nach Gabe von TTX



Elektrische Feldstimulation (EFS) vor und nach Gabe von Tetrodotoxin (TTX, 3×10^{-6} mol/l). Nach Applikation von TTX in das Organbad war bei den Muskelstreifenpräparaten keine Relaxation mehr durch die EFS auslösbar.

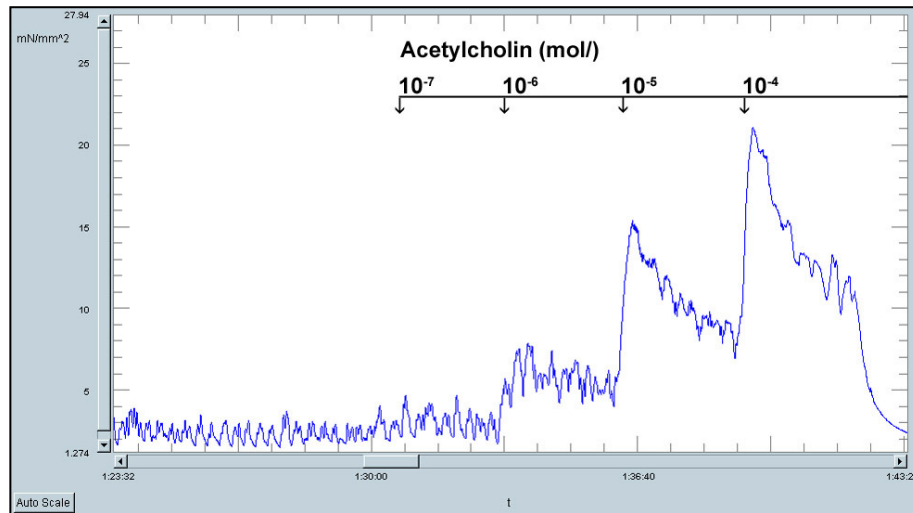
3.6 Versuchsablauf

Zu Versuchsbeginn wurden die Präparate auf ihre in-situ-Länge gedehnt und vorgespannt. Die Stärke dieser Vorspannung ließ sich folgendermaßen bestimmen. Es wurde ein überzähliger siebter Streifen präpariert, sein Feuchtgewicht und seine Länge im relaxierten Zustand bestimmt und daraus der Querschnitt berechnet. Da alle Muskelstreifen eines Versuchstages in etwa das gleiche Kaliber aufwiesen, konnte auf diese Weise eine standardisierte Vorspannung von 10 mN/mm² für jeden Muskelstreifen gewährleistet werden. Durch diese Vordehnung wird ein physiologischer Spannungszustand der Muskelzellen hergestellt, durch den Erregung, Kontraktion und somit Spontanaktivität durch eine optimale Überlappung der Aktin- und Myosinfilamente erst möglich werden. Bei korrekter Begasung und Temperatur wurde eine Adaptationszeit von 60 Minuten eingehalten, während der mehrmaliges Spülen mit frischer Lösung die Entfernung aus dem Gewebe herausdiffundierender Substanzen (z. B. Prostaglandine) gewährleistete.

Die einzelnen Versuchsabschnitte werden in den folgenden Unterkapiteln genauer erläutert.

3.6.1 Parasympathische Stimulation mit Acetylcholin

Jeder Versuch begann mit der Applikation von ACh, das im Abstand von 3 min kumulativ appliziert wurde („Acetylcholin-Treppe“). Die Konzentrationen wurden von 10⁻⁷ mol/l auf 10⁻⁴ mol/l gesteigert. Als parasympathischer Neurotransmitter führte ACh zu einer dosisabhängigen Kontraktion der glatten Muskulatur (Abb. 4). Hiermit ließ sich gleichzeitig die Vitalität der Muskelstreifenpräparate überprüfen.

Abbildung 4: Versuchsteil I - *Acetylcholintreppe*

Acetylcholin wurde viermal in steigender Konzentration von 10^{-7} mol/l – 10^{-4} mol/l im Abstand von jeweils 3 Minuten kumulativ in das Organbad appliziert.

3.6.2 Elektrische Feldstimulation am nativen Darm

Nach Herausspülen von ACh und einer weiteren Adaptationszeit von etwa 20 min, u.a. zur Nachregulierung der Vorspannung auf 10 mN/mm², wurden die ersten elektrischen Feldstimulationen (EFS) durchgeführt. Begonnen wurde mit zwei EFS mit einer Reizfrequenz von 5 Hz im Abstand von jeweils 5 min. Zweck der Wiederholung der EFS war, die Uniformität in der Antwort der Muskelstreifen zu zeigen, um diese mit späteren Stimulationen unter veränderten Versuchsbedingungen vergleichen zu können.

3.6.3 Zugabe von St.-I-Medium und EFS

Im folgenden Teil wurde den Organbädern St.-I-Medium zugesetzt, kumulativ zunächst 600 µl (Verdünnung 1:50, bezogen auf 30 ml Organbadvolumen) und nach 10 Minuten weitere 6 ml (Verdünnung 1:5, bezogen auf 30 ml Organbad). Dies entspricht einer Konzentration von 0,02 M bzw. 0,2 M im Organbad. Während der Expositionszeiten wurden die Kraftentwicklungen kontinuierlich aufgezeichnet. Nach der Einwirkzeit wurde eine EFS durchgeführt und anschließend das Organbad gespült und eine Erholungszeit von 15 min eingehalten.

3.6.4 Zugabe von bakteriellen Überständen und EFS

Nun wurden die aus bebrütetem St.-I-Medium gewonnenen bakteriellen Überstände zugeführt, ebenfalls kumulativ (erst 600 µl, dann 6 ml) mit einer jeweiligen Einwirkzeit von 10 Minuten zur Aufzeichnung der Kontraktionskräfte. Im Anschluss erfolgte eine EFS mit nachfolgender Spülung und Erholungszeit von 15 Minuten.

3.6.5 EFS unter NANC-Bedingungen

In diesem Versuchsteil wurden zunächst non-adrenerge-non-cholinerge (NANC) Versuchsbedingungen hergestellt durch Zugabe von 10^{-5} mol/l Phentolamin (Phe), 10^{-5} mol/l Propanolol (Pro) und 5×10^{-5} mol/l Atropin (AT). Nach einer Einwirkzeit von 10 min folgten 2 EFS im Abstand von 5 min, analog der Vorgehensweise unter nativen Bedingungen, um auch unter NANC-Bedingungen die Uniformität der Antwort auf die EFS aufzuzeigen. Wie unter nativen Bedingungen, diente auch hier die EFS-Antwort der Muskelstreifen als Referenzwert, um davon später die Effekte des St.-I-Mediums bzw. der bakteriellen Überstände auf die EFS-Antwort abzugrenzen.

3.6.6 Zugabe von St.-I-Medium und EFS unter NANC-Bedingungen

Jetzt wurde unter NANC-Bedingungen St.-I-Medium zugegeben. Die Gabe erfolgte kumulativ (zunächst 600 µl, dann 6 ml) mit einer jeweiligen Einwirkzeit von 10 Minuten zur Aufzeichnung der Kontraktionskräfte mit anschließender EFS, Spülung und Erholungszeit von 15 Minuten.

3.6.7 Zugabe von bakteriellen Überständen und EFS unter NANC-Bedingungen

Darauf folgend wurde der Effekt von bakteriellen Überständen unter NANC-Bedingungen überprüft, die erneut durch Gabe von Phe, Pro und AT geschaffen werden mussten. Die Exposition mit bakteriellem Überstand erfolgte wieder kumulativ (600 µl, 6 ml) mit einer jeweiligen Einwirkzeit von 10 min zur Aufzeichnung der Kontraktionskräfte mit anschließender EFS, Spülung und Erholungszeit von 15 min.

3.6.8 Zugabe von St.-I-Medium unter TTX-Bedingungen

Im Anschluss an die Untersuchung unter NANC-Bedingungen erfolgte die Applikation von 10^{-5} mol/l Tetrodotoxin (TTX) mit 10-minütiger Einwirkzeit. Durch die damit induzierte Blockade der schnellen neuronalen Na^+ -Kanäle, d.h. Ausschaltung aller nervaler Einflüsse, ließ sich der nicht nerval vermittelte Effekt des St.-I-Mediums und der bakteriellen Überstände auf die Kontraktibilität der Muskelstreifen ermitteln. Eine EFS wurde nur zu Beginn durchgeführt, da die muskuläre Antwort auf eine EFS ausschließlich nerval bedingt ist und unter TTX ausbleibt (siehe auch 3.5.4). Die initiale EFS mit ausbleibender Antwort diente hier lediglich der Kontrolle einer suffizienten TTX-Wirkung. Anschließend wurden die Effekte des St.-I-Mediums auf die Kontraktibilität nach kumulativer Gabe (600 μl , 6 ml) mit einer jeweiligen Einwirkzeit von 10 Minuten gemessen. Es erfolgte eine Spülung und Erholungszeit von 15 Minuten.

3.6.9 Zugabe von bakteriellen Überständen unter TTX-Bedingungen

Nach erneuter Applikation von TTX und Kontrolle durch eine EFS wurden in gleicher Weise die nicht nerval vermittelten Effekte der bakteriellen Überstände auf die Kontraktibilität der Muskelstreifen untersucht.

3.6.10 Vollständige Relaxation der Muskelstreifen

Zum Versuchsende wurde 1 ml Papaverin (2×10^{-3} mol/l, PAP) in das Organbad appliziert, das durch Hemmung der Phosphodiesterase eine vollständige Relaxation der glatten Muskelzellen hervorruft. Der so ermittelte Resttonus ist nicht durch eine aktive Muskelkontraktion, sondern durch passive Ruhekräfte bedingt und diente zur Ermittlung des Referenzwertes im Sinne einer physiologischen Nulllinie. Nach Festlegung dieser „Komplett-Relaxation“ ließen sich die tatsächlich aktiven Kontraktionskräfte der Muskelstreifenpräparate bestimmen.

Zum Abschluss wurden bei allen Präparaten die Länge und das Feuchtgewicht bestimmt. Der daraus errechnete Muskelquerschnitt (unter der Annahme einer Dichte von 1 g/cm^3) diente zur Umrechnung der jeweiligen Kontraktionskräfte auf eine normierte Querschnittsfläche von

1 mm² (Kraft/Querschnittsfläche, in mN/mm²).

3.6.11 Zugabe von Essigsäure gespicktem St.-I-Medium

Nachdem die Auswertung der unter 3.6.1 bis 3.6.10 dargestellten Versuche Unterschiede zwischen St.-I-Medium und bakteriellem Überstand hinsichtlich der Kontraktilität gezeigt hatte, wurde nach einem Substanz-„Kandidaten“ gesucht, der ggf. für die unterschiedlichen Effekte verantwortlich gemacht werden könnte. Dazu wurde durch die Fa. Ardeypharm eine gaschromatografische Analyse des St.-I-Mediums und der bakteriellen Überstände durchgeführt, die aufzeigte, dass die SCFA Essigsäure im St.-I-Medium in einer Konzentration von 10 mM, im bakteriellen Überstand jedoch von 17.5 mM vorlag.

Diese erhöhte Essigsäure-Konzentration entspricht einem natürlichen Stoffwechselendprodukt von EcN und stellt damit einen möglichen Mediator bzw. Kandidaten für die gefundenen Effekte auf die glattmuskuläre Kontraktilität dar, zumal aus Literaturdaten ein direkter Einfluss von SCFA auf die GIT-Motilität bekannt ist (siehe 1.5).

Zur Überprüfung der Hypothese, ob die SCFA Essigsäure maßgeblich an den Effekten des bakteriellen Überstandes beteiligt ist, wurde normales St.-I-Medium mit St.-I-Medium verglichen, dem zusätzlich Essigsäure-Konzentrationen von jeweils 10 mM, 30 mM und 70 mM zugefügt wurden.

Analog zu den unter 3.6.1 - 3.6.10 beschriebenen Versuchsteilen, mit Ausnahme der Versuchsabschnitte unter NANC-Bedingungen, wurde an 24 Muskelstreifenpräparaten natives St.-I-Medium mit Essigsäure-gespicktem St.-I-Medium verglichen. Auf die Durchführung einer EFS wurde bis auf eine Vitalitätskontrolle zu Versuchsbeginn verzichtet.

Der pH-Wert wurde durch eine Messung im Blutgasanalyse-Gerät (BGA) registriert, um einen bloßen Effekt durch pH-Wert-Erniedrigung auszuschließen. Zu einer stärkeren pH-Werterniedrigung kam es lediglich nach Zugabe hoher Mengen Essigsäure (Zugabe von 6 ml und Proben mit Zusatz von 30 bzw. 70 mM Essigsäure) (Tab.2).

Tabelle 2: *Liste der resultierenden pH-Wertänderung nach Zugabe der Essigsäure-gespickten St.-I-Medien*

Substanz	Dosis	pH-Wert
Organbad nativ		7,64
St.-I-Medium	600µl = 1:50	7,63
St.-I-Medium	6ml = 1:5	7,46
St.-I-Medium + 10mM Essigsäure	600µl = 1:50	7,57
St.-I-Medium + 10mM Essigsäure	6ml = 1:5	7,30
St.-I-Medium + 30mM Essigsäure	600µl = 1:50	7,53
St.-I-Medium + 30mM Essigsäure	6ml = 1:5	7,03
St.-I-Medium + 70mM Essigsäure	600µl = 1:50	7,49
St.-I-Medium + 70mM Essigsäure	6ml = 1:5	6,66

3.7 Datenauswertung und statistische Verfahren

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit Hilfe eines Software-Programms, welches auf Basis des Visual Engineering Environment (siehe 3.5.3) von uns speziell für diese Zwecke entwickelt wurde. Die ermittelten Werte der einzelnen Muskelstreifenpräparate wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und zur Berechnung der verschiedenen Parameter sowie zur statistischen Auswertung in das Statistikprogramm SPSS (Statistical Package for Social Sciences) eingegeben. Dabei wurden die Messdaten, die an den 5-6 Muskelstreifen eines einzelnen Patienten erhoben worden sind, zunächst gemittelt, um für jeden Patienten aus den 5-6 Einzelwerten einen aussagekräftigen Mittelwert zu erheben. Anschließend wurden die Medianwerte der beiden Patientengruppen mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für verteilungsfreie, abhängige Stichproben verglichen und als box-whisker plots grafisch dargestellt. Die horizontale schwarze Linie stellt dabei den Median dar, 50% der Werte sind in der box enthalten und die whiskers umfassen 99% der Werte. Die Anzahl der für die statistische Berechnung

eingegangenen Werte werden im Ergebnisteil für die verschiedenen Messbedingungen jeweils separat angegeben. Ein P-Wert ≤ 0.05 wurde als signifikant, ein P-Wert ≤ 0.01 als hochsignifikant bezeichnet.

3.7.1 Parasympathische Stimulation

Es wurden die maximalen Kräfte pro Querschnittsfläche in mN/mm^2 ermittelt, die von den Muskelstreifenpräparaten unter den jeweiligen ACh-Konzentrationen erreicht wurden.

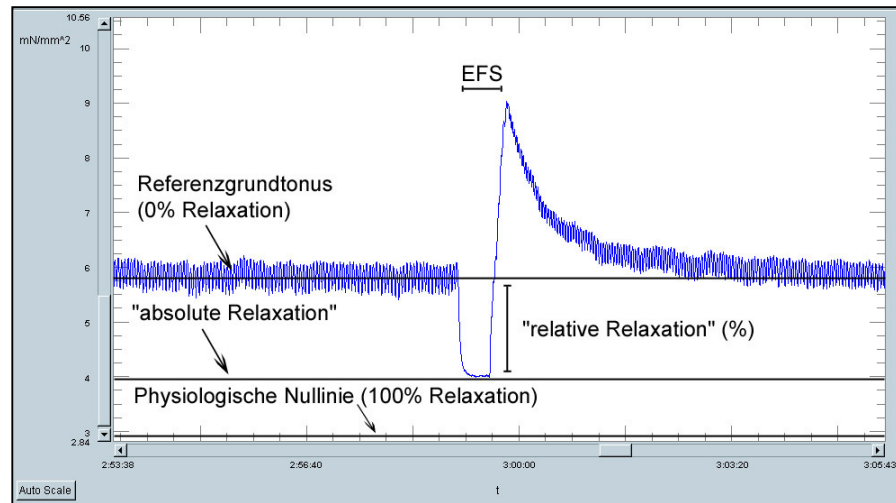
3.7.2 Relaxation nach elektrischer Feldstimulation

Zur Auswertung der EFS-Effekte erfolgte zunächst die Bestimmung des sog. Referenzgrundtonus für die einzelnen Muskelstreifenpräparate. Dazu wurde jeweils vor Beginn der ersten EFS ein Mittelwert des Grundtonus aus 480 Punkten (entspricht 120 s) gebildet. Die Ermittlung der absoluten Relaxation während der EFS erfolgte durch Mittelwertbildung aus 80 Punkten (entspricht 20 s) während der Plateauphase der Relaxation. Am Ende des Versuchs wurde die physiologische Nulllinie durch Mittelung von 480 Punkten (entspricht 120 s) nach Gabe von Papaverin bestimmt (siehe 3.6.10).

3.7.2.1 Relative Relaxation

Um die gemessenen Absolutwerte der Relaxation der einzelnen Muskelstreifenpräparate während der EFS vergleichbar zu machen, wurden diese als Relativwert zum Grundtonus angegeben. Zur Berechnung dieser sog. relativen Relaxation wurden die Werte der absoluten Relaxation mit dem Referenzgrundtonus ins Verhältnis gesetzt. Der Referenzgrundtonus entsprach hierbei null Prozent, die physiologische Nulllinie hundert Prozent Relaxation. Nach der Formel $(\text{Referenzgrundtonus} - \text{absolute Relaxation}) / (\text{Referenzgrundtonus} - \text{physiologische Nulllinie}) * 100$ wurden die Werte der relativen Relaxation berechnet (Abb. 5).

Abbildung 5: Berechnung der sog. relativen Relaxation



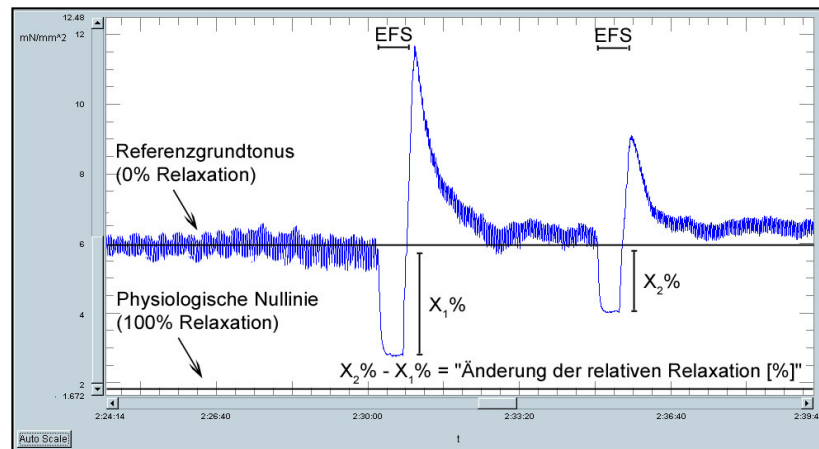
Bestimmung der „relativen Relaxation“ nach der Formel

$$\frac{(\text{Referenzgrundtonus} - \text{absolute Relaxation})}{(\text{Referenzgrundtonus} - \text{physiologische Nulllinie})} \cdot 100.$$

3.7.2.2 Änderung der relativen Relaxation

Die relative Relaxation wurde vor und nach Blockade der einzelnen Transmittersysteme verglichen, da die auftretende Änderung der Relaxation während der EFS nach Blockade des jeweiligen Transmitters den Effekt dieses Transmitters widerspiegelt. Die Änderung der relativen Relaxation wurde durch Subtraktion der jeweiligen relativen Relaxation vor und nach der Blockade berechnet (Abb. 6). Auf diese Weise ließen sich die Effekte der einzelnen Transmitter direkt miteinander vergleichen.

Abbildung 6: Berechnung der Änderung der relativen Relaxation

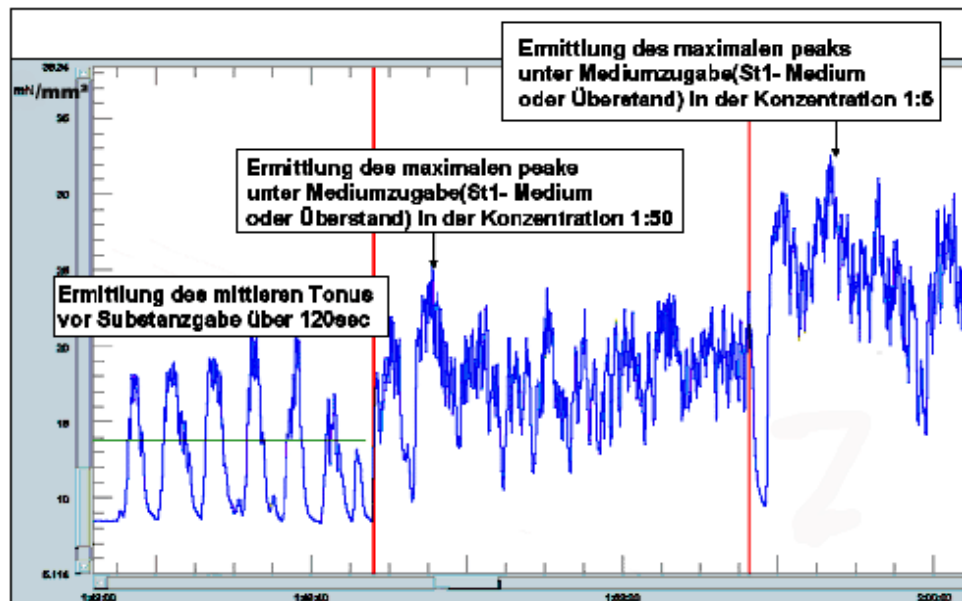


Die Berechnung des „Änderung der Relaxation“ erfolgte durch Subtraktion der jeweiligen „relativen Relaxation“ (X_2) nach Blockade des Transmitters von der vorherigen (X_1). So konnte die Wirkung der Blockade der einzelnen Transmitter auf die „relative Relaxation“ während der EFS genau ermittelt werden.

3.7.3 Änderung der maximalen Vielfachen des Grundtonus (xGT)

Um die Effekte des St.-I-Mediums bzw. der bakteriellen Überstände auf die Kontraktilität zu überprüfen, wurde zunächst der mittlere Tonus des Muskelstreifens ermittelt. Nach Zugabe von 600 μ l Medium (entspricht Konzentration 1:50 im Organbad) wurde während der Expositionszeit von 10 min der Ausschlag mit der größten Kontraktionskraft ausgewählt und als „peak 1:50“ gespeichert. Ebenso wurde mit der höheren Konzentration (1:5) verfahren, so dass 3 Messwerte zu Grunde gelegt werden konnten: „Grundtonus über 120 s vor Medium-Zugabe“, „peak 1:50“ und „peak 1:5“. Daraus wurde jeweils die maximale Vervielfachung des Grundtonus (xGT) berechnet, indem der Wert „peak 1:50“ bzw. „peak 1:5“ durch den gemittelten Grundtonus geteilt wurde (Abb. 7).

Abbildung 7: Berechnung der Änderung der maximalen Vielfachen des Grundtonus

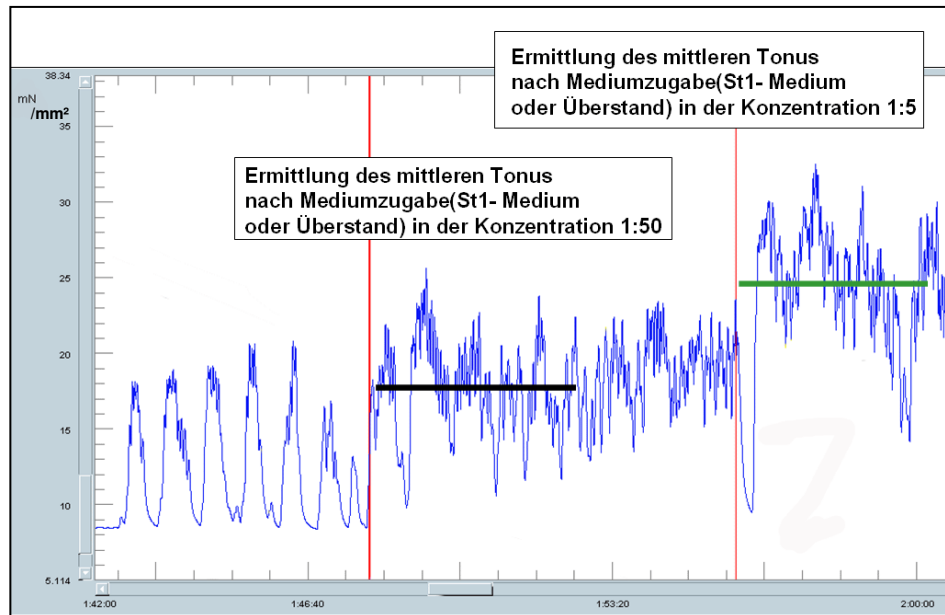


Die Berechnung der „Änderung der maximalen Vielfachen des Grundtonus“ erfolgte durch Division der jeweiligen „peaks“ (s. schwarze Pfeile) nach Mediumzugabe durch den mittleren Tonus vor Mediumzugabe (s. grüne Linie). (siehe auch Text)

Beispiel: Der gemittelte Grundtonus betrage 15 mN/mm². Es wird Überstand hinzugegeben und man ermittelt einen maximalen Ausschlag (peak 1:50) von 33 mN/mm². Dann beträgt $x_{GT} = 33/15 = 2.2$. Der maximale Tonus hat sich also etwas mehr als verdoppelt. Bei der höheren Konzentration an Überstand ergebe die Kurve einen maximalen Ausschlag von 45 mN/mm². In diesem Fall beträgt $x_{GT} = 45/15 = 3$. Damit hat die hohe Konzentration des Überstandes maximal eine Verdreifachung des zuvor gemessenen Grundtonus bewirkt.

3.7.4 Änderung des mittleren Tonus (dmT)

Die Veränderung des mittleren Tonus wurde bestimmt, um zu prüfen, ob sich neben der Änderung der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (= peaks) auch der mittlere Tonus insgesamt verändert hat. Dazu wurde der mittlere Tonus über 480 Punkte (entspricht 120 s) nach Zugabe der Medien in niedriger und hoher Konzentration ermittelt (Abb. 8).

Abbildung 8: *Ermittlung der Änderung des mittleren Tonus*

Ermittlung des mittleren Tonus nach jeweiliger Substanzgabe durch Mittelung von 480 Punkten (= 120 s), schwarze Linie in der Konzentration 1:50, grüne Linie in der Konzentration 1:5.

4 ERGEBNISSE

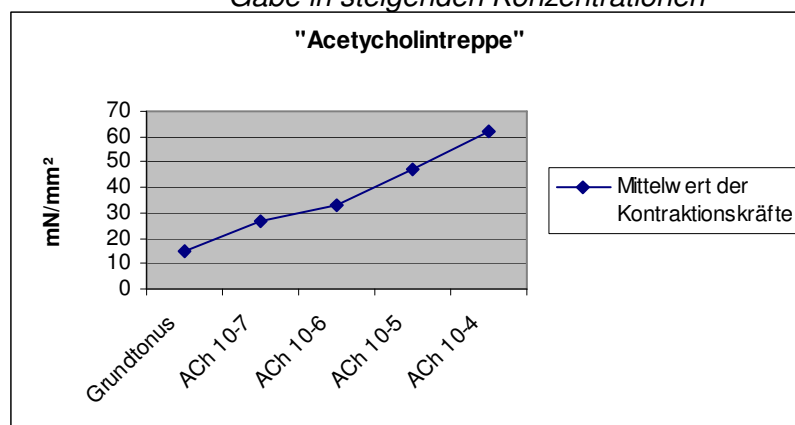
Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen in der Reihenfolge dargestellt, wie sie unter 3.6 beschrieben wurden. Die in die Auswertung eingegangene Anzahl der Muskelstreifenpräparate wird für jeden Versuchsteil separat angegeben, da einige Präparate aufgrund von technischen Mängeln (z.B. Lösen des Haltefadens, Zerreißen der Muskelstreifen, Vitalitätsverlust, technische Probleme bei Applikation der EFS) von der Auswertung ausgeschlossen werden mussten.

4.1 Kontraktilität nach parasymphischer Stimulation

Es gingen insgesamt 94 Präparate (17 Patienten) in die Bewertung ein. Untersucht wurde die maximale Kraftentwicklung der Muskelstreifenpräparate nach Applikation von ACh in steigender Konzentration (10^{-7} – 10^{-4} mol/l). Es wurden die unter der jeweiligen Konzentration erreichten maximalen Kräfte pro Querschnittsfläche (mN/mm^2) ermittelt, u.a. als Indikator für die Vitalität der Präparate.

Mit zunehmender Konzentration steigerte sich die Kontraktilität („Acetylcholin-Treppe“) (Abb. 9). Unter der maximalen ACh-Konzentration entwickelten die Muskelstreifen durchschnittliche Werte von $62.1 \text{ mN}/\text{mm}^2$. Signifikante Geschlechtsunterschiede ließen sich nicht beobachten.

Abbildung 9: Maximale Kontraktionskräfte nach ACh-Gabe in steigenden Konzentrationen



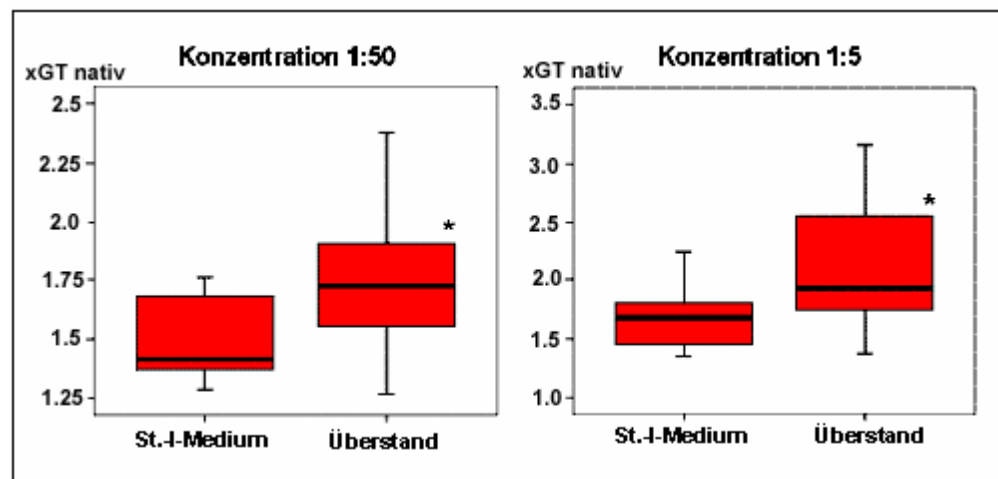
Die Abbildung zeigt den Vergleich der Mittelwerte der maximalen Kontraktionskräfte (in mN/mm^2) unter steigender ACh-Stimulation (10^{-7} bis 10^{-4} mol/l) aller Muskelstreifen (=Acetylcholintreppe).

4.2 Kontraktilität nach Gabe von St.-I-Medium vs. Überstand unter nativen Bedingungen

In die Auswertung gingen insgesamt 94 Streifen von 16 Patienten ein. Die Muskelstreifen zeigten unter Zugabe von bakteriellem Überstand in beiden Konzentrationen (1:50, 1:5) eine signifikant stärkere Zunahme der maximalen Vervielfachung des Grundtonus als nach Gabe von St.-I-Medium ($p < 0.05$).

Zugabe von St.-I-Medium führte zu einer maximalen Vervielfachung des Grundtonus um 1.4 in der Konzentration 1:50 und um 1.7 in der Konzentration 1:5. Die Zugabe des bakteriellen Überstandes führte hingegen bereits in der niedrigeren Konzentration zu einer maximalen Vervielfachung des Grundtonus um 1.8, in der höheren Konzentration um 2.0. Damit kontrahierten sich die Muskelstreifen unter Zugabe des mit EcN bebrüteten Überstandes unter nativen Bedingungen maximal um 28% (1:50) bzw. 18% (1:5) stärker (Abb. 10).

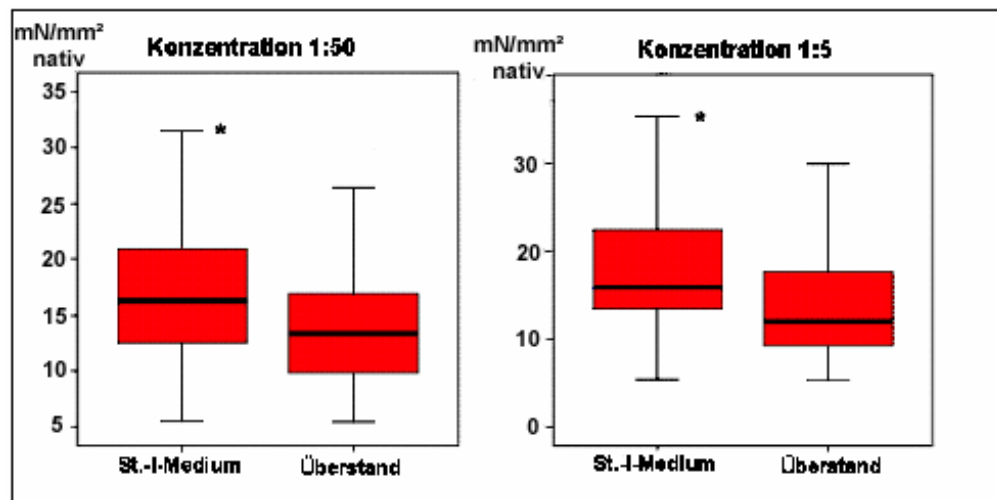
Abbildung 10: Maximale Vervielfachung des Grundtonus nach Gabe von St.-I-Medium und bakteriellem Überstand unter nativen Bedingungen



Die maximale Vervielfachung des Grundtonus ist signifikant höher nach Gabe von bakteriellem Überstand als nach Gabe von St.-I-Medium in den Konzentrationen 1:50 und 1:5. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) sind mit * markiert. xGT, maximale Vervielfachung des Grundtonus

In die Berechnung des mittleren Tonus gingen 63 Muskelstreifen von 11 Patienten ein. Im Durchschnitt lag der mittlere Tonus nach Zugabe von St.-I-Medium in der Konzentration 1:50 bei 17mN/mm² und damit um 30% höher als nach Zugabe des bakteriellen Überstandes (14.2mN/mm²). In der Konzentration 1:5 erhöhte sich der mittlere Tonus beim St.-I-Medium auf 20.5 mN/mm² und lag damit um 45% höher als nach Zugabe der bakteriellen Überstände (14.1 mN/mm²) (Abb. 11).

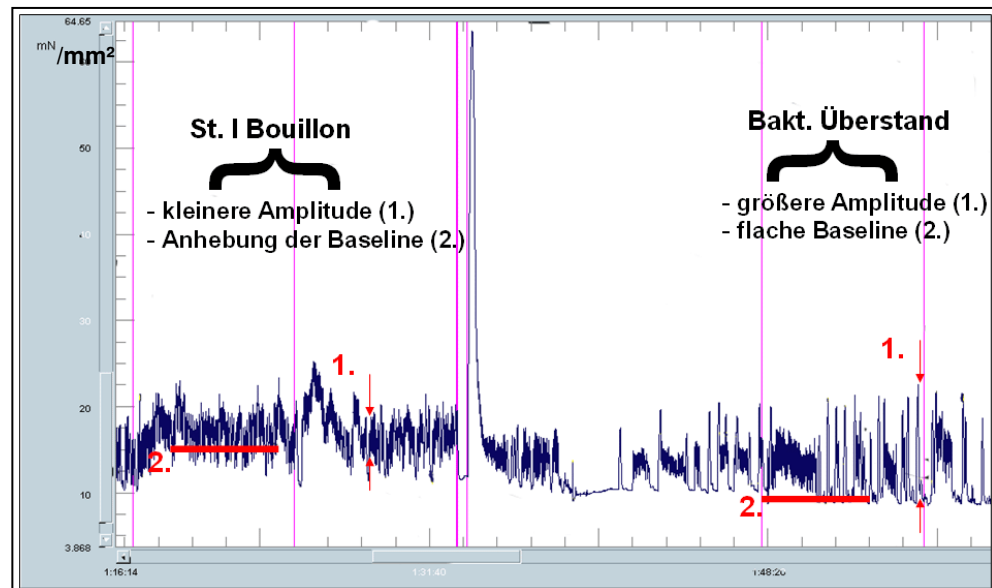
Abbildung 11: Mittlerer Tonus nach Gabe von St.-I-Medium und bakteriellem Überstand unter nativen Bedingungen



Der mittlere Tonus ist hochsignifikant höher nach Gabe von St.-I-Medium als nach Gabe von bakteriellem Überstand in den Konzentrationen 1:50 und 1:5. Hochsignifikante Unterschiede ($p < 0.01$) sind mit * markiert

Unter nativen Bedingungen führte das St.-I-Medium in beiden Konzentrationen zu einer Anhebung der Baseline und damit zu einer Erhöhung des mittleren Tonus, während die maximalen Kontraktionskräfte unbeeinträchtigt blieben. Im Gegensatz dazu führte der bakterielle Überstand führte nicht zu einer Anhebung des mittleren Tonus, allerdings zu einer signifikanten Steigerung der maximalen Kontraktionskräfteausschläge im Vergleich zum St.-I-Medium (Abb.12).

Abbildung 12: Vergleich der Effekte auf die Kontraktionsmuster nach Gabe von St.-I-Medium vs. bakterieller Überstand unter nativen Bedingungen



St.-I-Medium führt zu einer Anhebung der Baseline (siehe Parameter 2.) bei kleinen Kontraktionsamplituden (siehe Parameter 1.), bakterieller Überstand beeinflusst die Baseline nicht (vgl. Parameter 2.), führt aber zu größeren Kontraktionsamplituden (vgl. Parameter 1.).

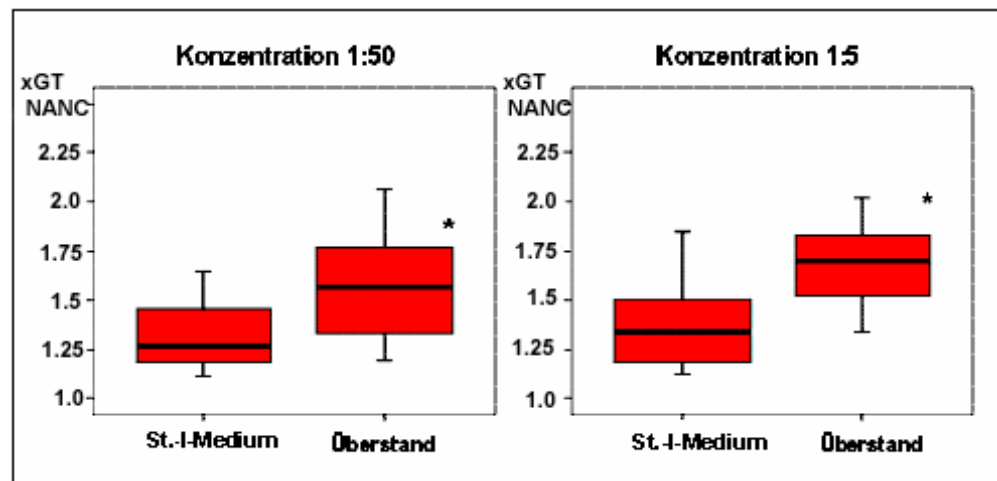
4.3 Kontraktilität nach Gabe von St.-I-Medium vs. Überstand unter NANC-Bedingungen

Nach Blockade cholinergere Einflüsse durch Atropin und adrenerger Einflüsse durch Phentolamin und Propranolol konnte überprüft werden, ob auch unter NANC-Bedingungen weitere Effekte der bakteriellen Überstände auf die Kontraktilität bestehen. In die Auswertung gingen insgesamt 88 Streifen von 15 Patienten ein.

Die Muskelstreifen zeigten unter Zugabe von bakteriellem Überstand in der Konzentration 1:50 und 1:5 eine hochsignifikant stärkere Zunahme der maximalen Vervielfachung des Grundtonus als unter St.-I-Medium allein ($p < 0.01$). Zugabe von St.-I-Medium führte zu einer maximalen Vervielfachung des Grundtonus um 1.28 in der Konzentration 1:50 und um 1.33 in der Konzentration 1:5. Die Zugabe des bakteriellen Überstandes führte hingegen bereits in der niedrigeren Konzentration zu einer maximalen Vervielfachung des Grundtonus um 1.6, in der höheren Konzentration um

1.7. Damit kontrahierten sich die Streifen unter Zugabe des mit EcN bebrüteten Überstandes unter NANC-Bedingungen um 25% (1:50) bzw. 28% (1:5) stärker (Abb. 13).

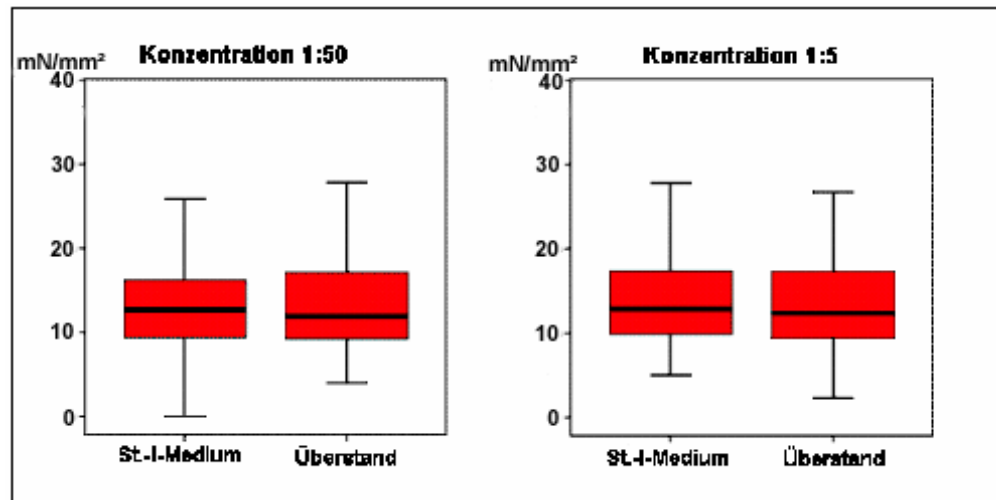
Abbildung 13: Maximale Vervielfachung des Grundtonus nach Gabe von St.-I-Medium und bakteriellem Überstand unter NANC-Bedingungen



Die maximale Vervielfachung des Grundtonus ist hochsignifikant höher nach Gabe von bakteriellem Überstand als nach Gabe von St.-I-Medium in den Konzentrationen 1:50 und 1:5. Hochsignifikante Unterschiede ($p < 0.01$) sind mit * markiert. xGT, maximale Vervielfachung des Grundtonus

Der mittlere Tonus wurde unter NANC-Bedingungen durch den bakteriellen Überstand im Vergleich zum St.-I-Medium nicht beeinflusst. In die Bewertung gingen 63 Streifen von 11 Patienten ein. Der mittlere Tonus lag nach Zugabe des St.-I-Mediums bei 14.1 mN/mm² (1:50) bzw. 13.6 mN/mm² (1:5), nach Zugabe des Überstands bei 13.5 mN/mm² (1:50) bzw. 13.7 mN/mm² (1:5) und zeigte damit keine signifikanten Unterschiede (Abb. 14).

Abbildung 14: Mittlerer Tonus nach Gabe von St.-I-Medium und bakteriellem Überstand unter NANC-Bedingungen



Der mittlere Tonus ist nach Gabe von St.-I-Medium nicht höher als nach Gabe von bakteriellem Überstand in den Konzentrationen 1:50 und 1:5. Keine signifikanten Unterschiede.

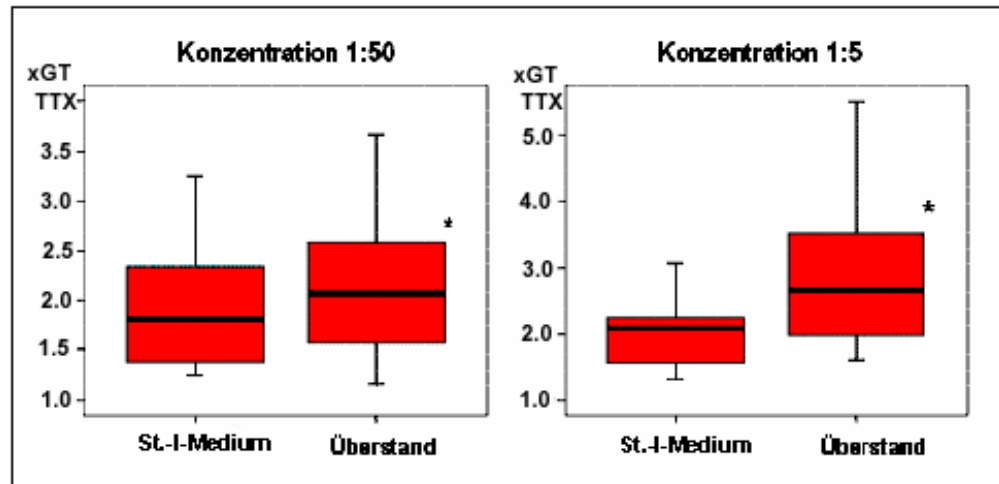
4.4 Kontraktilität nach Gabe von St.-I-Medium vs. Überstand unter TTX-Bedingungen

Nach Blockade schneller Na-Kanäle durch Tetrodotoxin (TTX) konnte überprüft werden, ob auch unter kompletter Ausschaltung des ENS ein Effekt der bakteriellen Überstände auf die Kontraktilität nachweisbar ist. In die Bewertung gingen insgesamt 82 Streifen von 14 Patienten ein.

Die Muskelstreifen zeigten unter Zugabe von bakteriellem Überstand in der Konzentration 1:50 und 1:5 eine hochsignifikant stärkere Zunahme der maximalen Vervielfachung des Grundtonus als unter St.-I-Medium allein ($p < 0.01$). Zugabe von St.-I-Medium führte zu einer maximalen Vervielfachung des Grundtonus um 1.8 in der Konzentration 1:50, in der Konzentration 1:5 zu einer Erhöhung um 2.1. Die Zugabe des bakteriellen Überstandes führte in der niedrigeren Konzentration zu einer maximalen Vervielfachung des Grundtonus um 2.1, in der höheren Konzentration um 2.8. Damit kontrahierten sich die Streifen unter Zugabe des mit EcN bebrüteten Überstandes unter TTX-Bedingungen im hohen Konzentrationsbereich (1:5) um 33% stärker. Im niedrigen

Konzentrationsbereich verstärkte sich die Kontraktion um 17% gegenüber dem St.-I-Medium (Abb. 15).

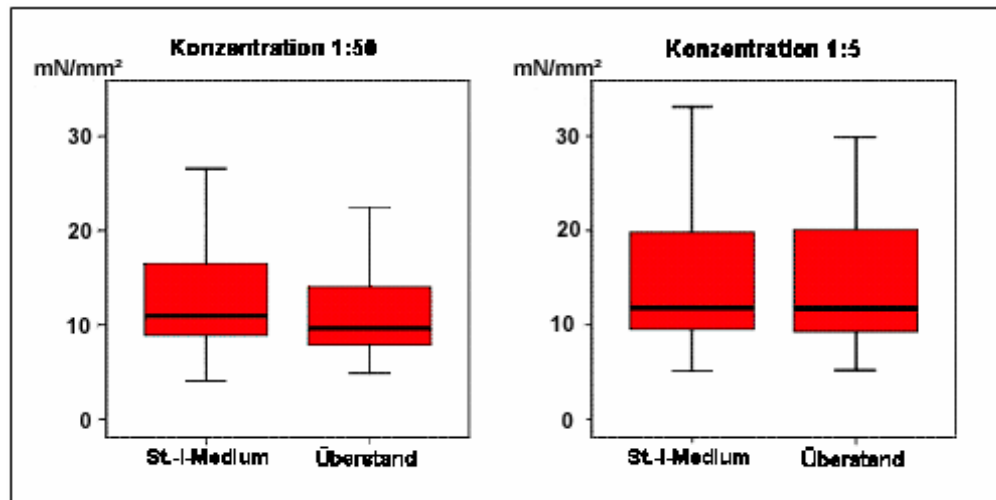
Abbildung 15: Maximale Vervielfachung des Grundtonus nach Gabe von St.-I-Medium und bakteriellem Überstand unter TTX-Bedingungen



Die maximale Vervielfachung des Grundtonus ist hochsignifikant höher nach Gabe von bakteriellem Überstand als nach Gabe von St.-I-Medium in der Konzentration 1:5. Hochsignifikante Unterschiede ($p < 0.01$) sind mit * markiert. xGT, maximale Vervielfachung des Grundtonus

Der mittlere Tonus unter TTX-Bedingungen wurde durch den bakteriellen Überstand im Vergleich zum St.-I-Medium nicht beeinflusst. In die Bewertung gingen 63 Streifen von 11 Patienten ein. Der Tonus lag nach Zugabe des St.-I-Mediums bei 12.7 mN/mm² (1:50) bzw. 15.1 mN/mm² (1:5), nach Zugabe des bakteriellen Überstands bei 12.2 mN/mm² (1:50) bzw. 15.9 mN/mm² (1:5) und zeigte damit keine signifikanten Unterschiede (Abb. 16).

Abbildung 16: Mittlerer Tonus nach Gabe von St.-I-Medium und bakteriellem Überstand unter TTX-Bedingungen



Der mittlere Tonus ist nach Gabe von St.-I-Medium nicht höher als nach Gabe von bakteriellem Überstand in den Konzentrationen 1:50 und 1:5. Keine signifikanten Unterschiede.

4.5 Dosisabhängigkeit der Effekte

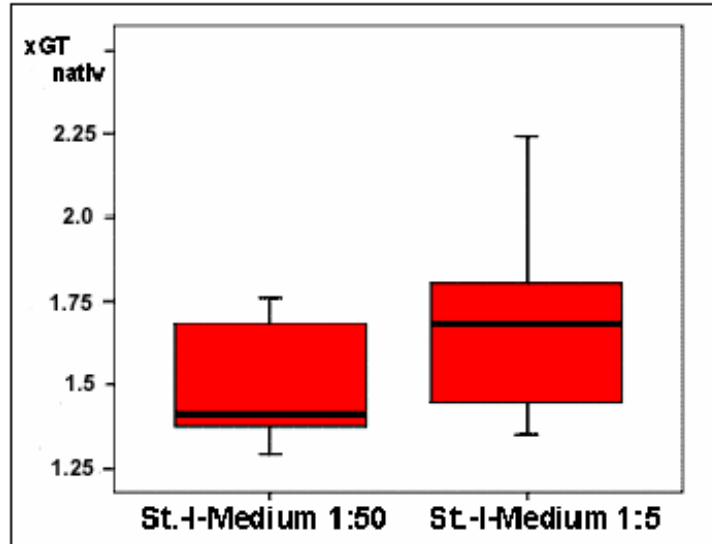
St.-I-Medium und bakterieller Überstand wurden jeweils in den Konzentrationen 1:50 und 1:5 appliziert, um eine Dosisabhängigkeit der Effekte auf die Kontraktilität der Muskelstreifen zu überprüfen. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

4.5.1 Dosisabhängigkeit für St.-I-Medium

Ein Vergleich der maximalen Vervielfachung des Grundtonus zeigte, dass eine Verzehnfachung der zugegebenen Menge an St.-I-Medium von 1:50 auf 1:5 sowohl unter nativen Bedingungen als auch unter NANC- und TTX-Bedingungen nicht zu signifikanten Unterschieden der Effekte auf die Kontraktilität führte.

Unter **nativen Bedingungen** gingen 94 Muskelstreifen von 16 Patienten in die Auswertung ein. Die maximale Vervielfachung des Grundtonus lag bei 1.4 (1:50) bzw. bei 1.7 (1:5) ohne signifikante Unterschiede ($p= 0.079$), (Abb. 17).

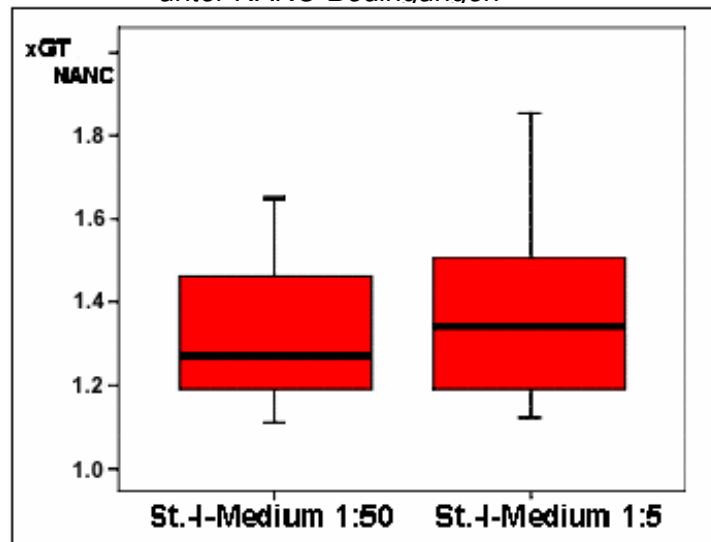
Abbildung 17: Maximale Vervielfachung des Grundtonus nach Gabe von St.-I-Medium in niedriger und hoher Konzentration unter nativen Bedingungen



Die Konzentrationssteigerung des St.-I-Medium führt zu keiner signifikanten Veränderung der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (xGT).

Unter **NANC-Bedingungen** gingen 88 Muskelstreifen von 15 Patienten in die Auswertung ein. Die maximale Vervielfachung des Grundtonus lag bei 1.28 (1:50) bzw. bei 1.33 (1:5) ohne signifikante Unterschiede ($p= 0.14$) (Abb. 18).

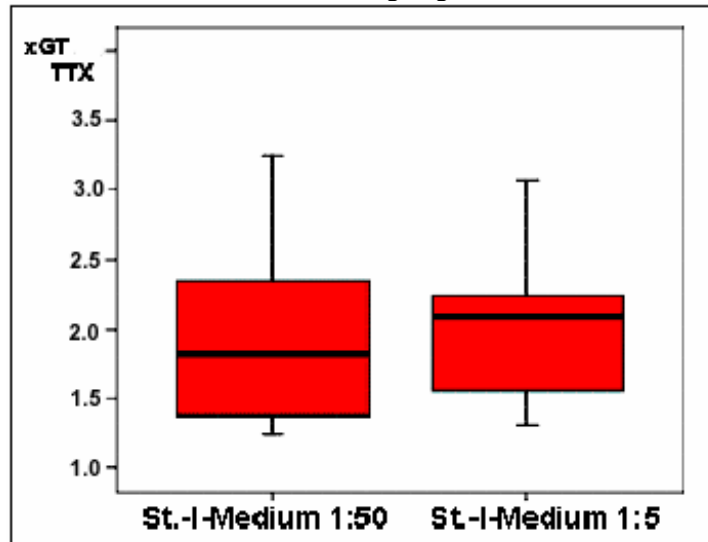
Abbildung 18: Maximale Vervielfachung des Grundtonus nach Gabe von St.-I-Medium in niedriger und hoher Konzentration unter NANC-Bedingungen



Die Konzentrationssteigerung des St.-I-Medium führt zu keiner signifikanten Veränderung der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (xGT).

Unter **TTX-Bedingungen** gingen 82 Muskelstreifen von 14 Patienten in die Auswertung ein. Die maximale Vervielfachung des Grundtonus lag bei 1.8 (1:50) bzw. bei 2.1 (1:5) ohne signifikante Unterschiede ($p=0.22$) (Abb. 19).

Abbildung 19: Maximale Vervielfachung des Grundtonus nach Gabe von St.-I-Medium in niedriger und hoher Konzentration unter TTX-Bedingungen



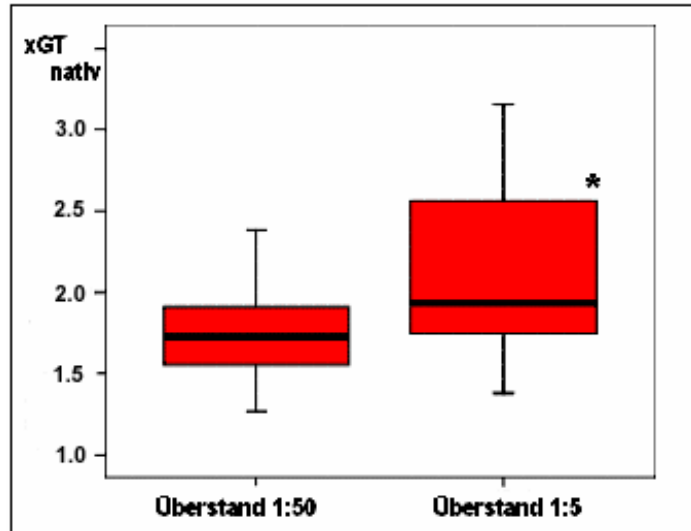
Die Konzentrationssteigerung des St.-I-Medium führt zu keiner signifikanten Veränderung der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (xGT).

4.5.2 Dosisabhängigkeit für bakteriellen Überstand

Ein Vergleich der maximalen Vervielfachung des Grundtonus zeigte, dass eine Verzehnfachung der zugegebenen Menge von bakteriellen Überständen von 1:50 auf 1:5 sowohl unter nativen Bedingungen als auch unter NANC- und TTX-Bedingungen im Gegensatz zum St.-I-Medium zu signifikanten Veränderungen führte. Unter allen Bedingungen kam es nach Applikation des höher konzentrierten bakteriellen Überstandes zu einer Kontraktionsverstärkung der Muskelstreifen.

Unter **nativen Bedingungen** gingen 94 Muskelstreifen von 16 Patienten in die Auswertung ein. Die maximale Vervielfachung des Grundtonus lag bei 1.8 (1:50) bzw. bei 2.0 (1:5) und wies damit eine signifikante Zunahme auf ($p < 0.05$), (Abb. 20).

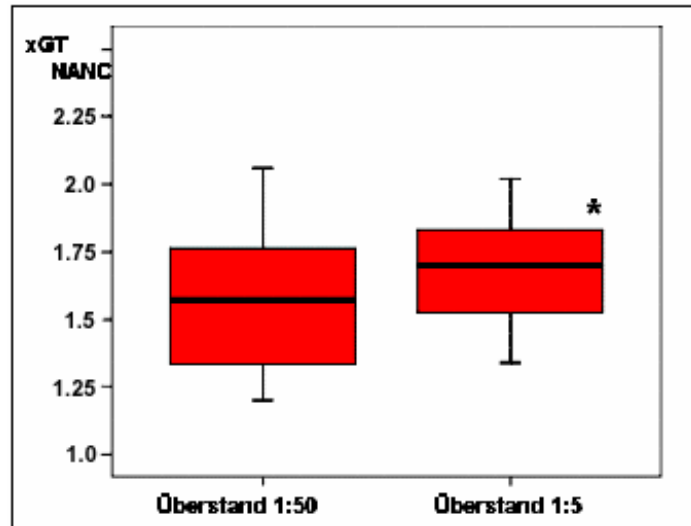
Abbildung 20: Maximale Vervielfachung des Grundtonus nach Gabe von bakteriellem Überstand in niedriger und hoher Konzentration unter nativen Bedingungen



Die Konzentrationssteigerung des bakteriellen Überstandes führt zu einer signifikanten Veränderung der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (xGT). Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) sind mit * markiert.

Unter **NANC-Bedingungen** gingen 88 Muskelstreifen von 15 Patienten in die Auswertung ein. Die maximale Vervielfachung des Grundtonus lag bei 1.6 (1:50) bzw. bei 1.7 (1:5) und wies damit eine signifikante Zunahme auf ($p < 0.05$), (Abb. 21).

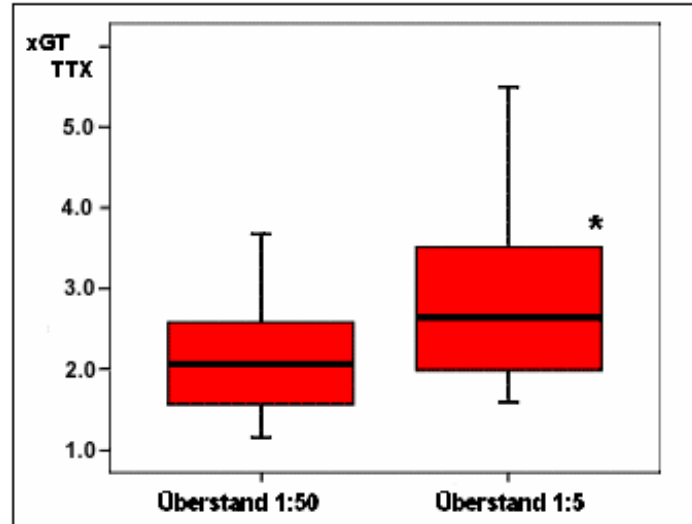
Abbildung 21: Maximale Vervielfachung des Grundtonus nach Gabe von bakteriellem Überstand in niedriger und hoher Konzentration unter NANC-Bedingungen



Die Konzentrationssteigerung des bakteriellen Überstandes führt zu einer signifikanten Veränderung der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (xGT). Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) sind mit * markiert.

Unter **TTX- Bedingungen** gingen 82 Muskelstreifen von 14 Patienten in die Auswertung ein. Die maximale Vervielfachung des Grundtonus lag bei 2.1 (1:50) bzw. bei 2.8 (1:5) und wies damit eine signifikante Zunahme auf ($p < 0.05$), (Abb. 22).

Abbildung 22: Maximale Vervielfachung des Grundtonus nach Gabe von bakteriellem Überstand in niedriger und hoher Konzentration unter TTX-Bedingungen

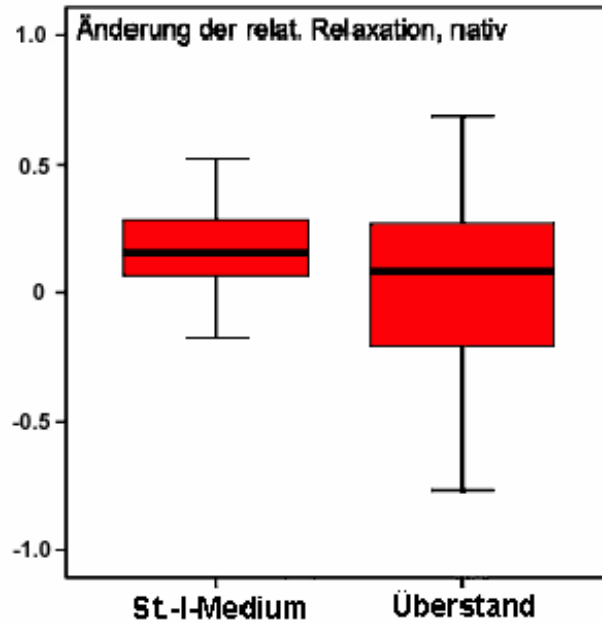


Die Konzentrationssteigerung des bakteriellen Überstandes führt zu einer signifikanten Veränderung der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (xGT). Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) sind mit * markiert.

4.6 Effekte auf die EFS unter nativen Bedingungen

Unter nativen Bedingungen führt sowohl die Zugabe des St.-I-Mediums als auch die Zugabe der bakteriellen Überstände nicht zu einer signifikanten Änderung der EFS-induzierten relativen Relaxation. In die Bewertung gingen 48 Muskelstreifenpräparate von 11 Patienten ein. Die relative Relaxation nahm nach St.-I-Medium-Gabe um 12.2 %, nach Zugabe der bakteriellen Überstände um 9.2 % zu, ohne dass die Effekte signifikant waren (Abb. 23).

Abbildung 23: Vergleich der Änderung der relativen Relaxation nach Gabe von St.-I-Medium vs. bakterieller Überstand unter nativen Bedingungen

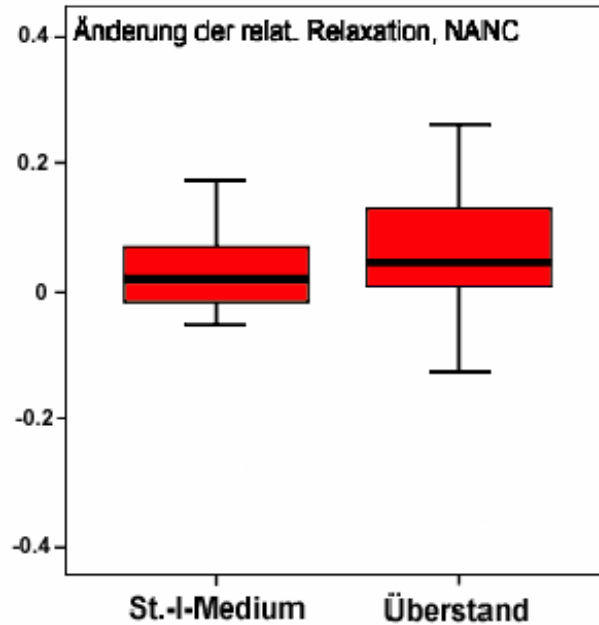


Die Änderung der relativen Relaxation nach Gabe von St.-I-Medium und bakteriellem Überstand zeigte keinen signifikanten Unterschied.

4.7 Effekte auf die EFS unter NANC-Bedingungen

In die Bewertung unter NANC-Bedingungen gingen 48 Muskelstreifenpräparate von 11 Patienten ein. Die EFS-induzierte relative Relaxation nahm nach St.-I-Medium-Gabe um 2.7 %, nach Zugabe der bakteriellen Überstände um 3.0 % zu. Die Effekte beider Agentien zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 24).

Abbildung 24: Vergleich der Änderung der relativen Relaxation nach Gabe von St.-I-Medium vs. bakterieller Überstand unter NANC-Bedingungen



Die Änderung der relativen Relaxation nach Gabe von St.-I-Medium und bakteriellem Überstand zeigte keinen signifikanten Unterschied.

4.8 Effekte von Essigsäure

Um die Wirkung von Essigsäure auf die glattmuskuläre Kontraktilität zu testen, wurde an 4 Patienten (3 Männer, 1 Frau, mittleres Alter: 51 Jahre) natives St.-I-Medium (enthält 10 mM Essigsäure) gegen St.-I-Medium, dem zusätzlich Essigsäure in den Konzentrationen 10 mM, 30 mM und 70 mM zugefügt wurde, verglichen. Beide Ansätze wurden in Anlehnung an die vorherigen Versuche in den Verdünnungen 1:5 und 1:50 in das Organbad appliziert.

Unter nativen Bedingungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der maximalen Vervielfachung des Grundtonus zwischen dem nativen Nährmedium und den mit Essigsäure gespickten Medien (Tab. 3).

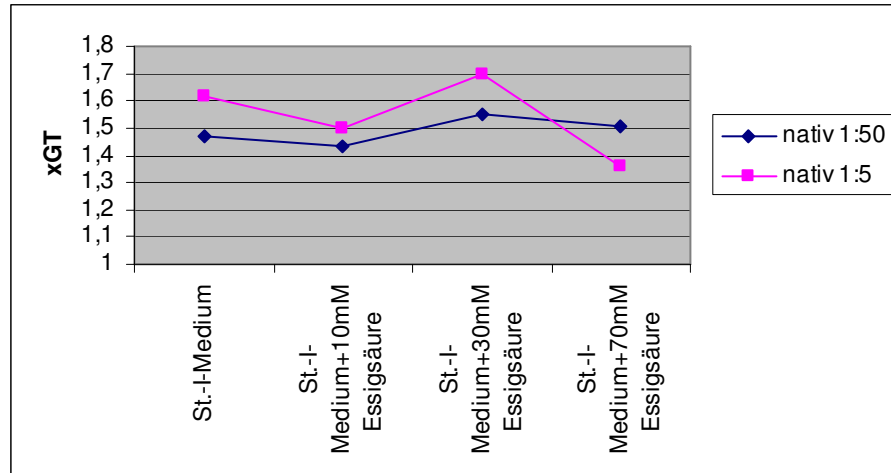
Tabelle 3: *Statistischer Vergleich der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (p-Werte) zwischen St.-I-Medium und mit Essigsäure gespickten Medien in steigender Konzentration unter nativen Bedingungen*

Kontrolle	Verum	Konzentration	p-Wert
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 10 mM Essigsäure(=20mM E.s.)	1:50	0.814
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 10 mM Essigsäure(=20mM E.s.)	1:5	0.313
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 30 mM Essigsäure(=40mM E.s.)	1:50	0.439
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 30 mM Essigsäure(=40mM E.s.)	1:5	0.398
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 70 mM Essigsäure(=80mM E.s.)	1:50	0.622
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 70 mM Essigsäure(=80mM E.s.)	1:5	0.087

Die Berechnung der p-Werte ergibt, dass sich die maximale Vervielfachung des Grundtonus zwischen Zugabe von St.-I-Medium und der Zugabe Essigsäure gespickter St.-I-Medien unter nativen Bedingungen nicht signifikant unterscheidet (E.s.= Essigsäure).

Auch die Betrachtung der Dosis-Wirkungs-Kurve bezüglich der steigenden Essigsäure-Konzentrationen lässt keine signifikante Veränderung der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (xGT) bei Erhöhung der Essigsäure-Konzentration erkennen (Abb. 25).

Abbildung 25: Dosis-Wirkungskurve des Essigsäure-gespickten Mediums unter nativen Bedingungen



Steigende Essigsäure-Konzentrationen führen weder bei Verdünnungen von 1:50 noch 1:5 zu signifikanten Veränderungen der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (xGT).

Wurde jedoch das ENS durch TTX-Gabe vollständig blockiert, konnte durch Essigsäuregabe eine signifikante Erhöhung der maximalen Vervielfachung des Grundtonus gegenüber dem St-I-Medium beobachtet werden (Tab. 4).

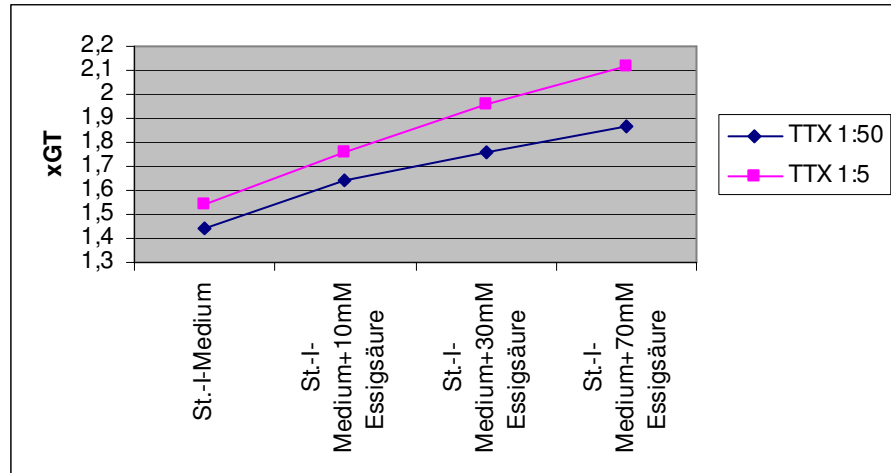
Tabelle 4: *Statistischer Vergleich der maximalen Vervielfachung des Grundtonus (p -Werte) zwischen St.-I-Medium und mit Essigsäure gespickten Medien in steigender Konzentration unter TTX-Bedingungen*

Kontrolle	Verum	Konzentration	p-Wert
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 10 mM Essigsäure(=20mM E.s.)	1:50	0.015
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 10 mM Essigsäure(=20mM E.s.)	1:5	0.026
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 30 mM Essigsäure(=40mM E.s.)	1:50	0.011
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 30 mM Essigsäure(=40mM E.s.)	1:5	0.014
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 70 mM Essigsäure(=80mM E.s.)	1:50	0.002
St.-I-Medium (10 mM E.s.)	St.-I-Medium + 70 mM Essigsäure(=80mM E.s.)	1:5	0.091

Die Berechnung der p -Werte ergibt, dass sich die maximale Vervielfachung des Grundtonus zwischen Zugabe von St.-I-Medium und der Zugabe Essigsäure gespickter St.-I-Medien unter TTX-Bedingungen in den meisten Fällen signifikant unterscheidet (E.s.= Essigsäure).

Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt, dass bei ansteigenden Essigsäure-Konzentrationen die Vervielfachung des maximalen Grundtonus ebenfalls kontinuierlich gesteigert wird (Abb.26).

Abbildung 26: Dosis-Wirkungskurve des Essigsäure-gespickten Mediums unter TTX-Bedingungen



Steigende Essigsäure-Konzentrationen führten bei beiden Verdünnungen zu einer kontinuierlichen Erhöhung der maximalen Vervielfachung des Grundtonus.

5 DISKUSSION

5.1 Methodischer Vergleich mit anderen Untersuchungen

Methodisch basierte die vorliegende Studie auf Untersuchungen der Kontraktilität von humanen Ringmuskelstreifenpräparaten unter standardisierten in-vitro-Bedingungen. Dabei wurden der Einfluss von bakteriellen Überständen des Keims EcN auf die glattmuskuläre Kontraktilität überprüft. Durch die EFS konnten gezielt die Effekte des bakteriellen Überstandes auf das ENS und seine verschiedenen Transmittersysteme (cholinerg, adrenerg, non-cholinerg non-adrenerg) analysiert werden.

In der Literatur lassen sich nur wenige Vorarbeiten finden, die in-vitro-Untersuchungen der glattmuskulären Darmwand und deren Beeinflussung durch probiotische Überstände vorgenommen haben. Drei in-vitro Untersuchungen, die gezielt den Effekt von Probiotika auf die gastrointestinale Motilität untersuchten, können angeführt werden: In der ersten Studie [71] wurde der Einfluss verschiedener Probiotika (Bifidobacterium, Lactobacillus) auf die Motilität isolierter Ileum- und Kolonvollwandsegmente des Meerschweinchens im Organbad untersucht. Die Zugabe von Bakterien als lebende Organismen und die Zugabe desintegrierter Zellwandbestandteile hatte dabei auf die Kontraktilität keinen Einfluss. Lediglich die Zugabe der zytoplasmatischen, proteinfreien Bestandteile der Probiotika führte dosisabhängig zu einer Kontraktionsinduktion im Ileum und zu einer verstärkten Relaxation in den Kolonsegmenten. Die Zugabe von Atropin hob diese Effekte nicht auf, so dass muskarinerge Rezeptoren für die Vermittlung der beobachteten motilitätsmodulierenden Wirkung keine Bedeutung zu haben scheinen. Eine weitere Differenzierung der zytoplasmatischen Bestandteile, die für die vorgefundenen Befunde verantwortlich gemacht werden könnten, findet sich ebenso wenig wie eine weitere Differenzierung der verschiedenen enterischen Transmittersystem.

In einer weiteren Studie [44] wurde der Effekt von Laktobazillen auf eine postinfektiös induzierte intestinale Hyperkontraktilität bei Mäusen untersucht.

Dazu wurden die untersuchten Mäuse zunächst mit *Trichinella spiralis* infiziert, um dadurch ein postinfektiöses Reizdarmsyndrom mit reaktiver Hyperkontraktilität auszulösen. Nach Zufütterung von *Lactobacillus paracasei* zeigte sich in den im Organbad registrierten Muskelkräften eine signifikant niedrigere Muskelspannung für die mit dem Probiotikum therapierten Mäuse.

In einer dritten Studie wurde im Rahmen einer Doktorarbeit [72] der Einfluss des Probiotikum EcN auf die Motilität isolierter Muskelstreifen des Colon ascendens und Colon descendens der Ratte untersucht. Hierbei wurden sowohl Ring- als auch Längsmuskelstreifen in das Organbad überführt und die Effekte von EcN-Überständen durch die Applikation einer EFS oder durch Carbacholstimulation überprüft. Insgesamt sind in dieser Untersuchung zu viele verschiedene Variablen untersucht worden, so dass die Auswertung nur Tendenzen aufzeigte und einige Befunde im Widerspruch zueinander standen. Dennoch lässt sich aus der Studie ableiten, dass die alleinige Zugabe von St.-I-Medium zu einer Abnahme der Kolonkontraktilität führte, die zusätzliche Gabe von bakteriellen Überständen den Kontraktilitätsabfall jedoch wieder aufhob, so dass der bakterielle Überstand die Motilität des Rattenkolon zu stimulieren scheint. Diese Schlussfolgerung lässt sich auch in Einklang bringen mit den Ergebnissen unserer eigenen Untersuchung.

In einer in-vivo Untersuchungen an Schweinen [43] wurde der Einfluss von Probiotika (*Lactobacillus*) auf die Kolonringmuskulatur durch intraabdominelle Kraftaufnehmer im Caecum, Colon ascendens und Colon sigmoideum registriert. Nach Zugabe der Probiotika ins Futter der Schweine über zwei Wochen zeigte sich eine verstärkte Motilität im Caecum und im Colon sigmoideum, ohne dass jedoch die Defäkationsfrequenz signifikant anstieg.

Alle bisherigen Arbeiten, die Effekte von Probiotika auf die Motilität des Gastrointestinaltraktes untersucht haben, konnten nicht auf humanes Kolongewebe zurückgreifen und differenzierten nicht den Einfluss der verschiedenen enterischen Transmittersysteme. Diese Lücke wird mit der

vorliegenden Untersuchung geschlossen, indem erstmalig humane Kolonmuskulatur unter standardisierten in-vitro-Bedingungen rekrutiert und u.a. hinsichtlich der ENS-Komponenten untersucht wurde.

Bezüglich der Methodik zur Registrierung der glattmuskulären in-vitro-Kontraktilität wurden in anderen Organbad-Studien überwiegend isotonische Messungen durchgeführt [66],[67],[69],[70]. Die humanen Präparate stammten von gesunden Kontrollgruppen bzw. Patienten mit Divertikelkrankheit, wobei in keiner der Studien der Einfluss von Probiotika Gegenstand der Untersuchung war. Gegenüber isotonischen Messungen hat das von uns benutzte isometrische Verfahren den Vorteil, dass während der Messung keine Längenänderung der Muskelstreifenpräparate auftritt und somit immer unter gleichen Bedingungen gemessen werden kann.

5.2 Interpretation der Untersuchungsergebnisse

5.2.1 Einfluss von bakteriellem Überstand auf die Kontraktilität des Darms unter nativen Bedingungen

Die glatte Ringmuskulatur des humanen Kolons reagierte auf die Zugabe bakterieller Überstände unter nativen Bedingungen mit einer Zunahme der maximalen Kontraktionskraft. Dabei waren die Unterschiede zwischen St.-I-Medium und bakteriellen Überständen sowohl im niedrigeren (1:50) als auch im höheren Konzentrationsbereich (1:5) signifikant. Bakterielle Überstände führten zu einer um 28% (1:50) bzw. 18% (1:5) stärkeren maximalen Kontraktionszunahme, als unter Zugabe des St.-I-Mediums allein zu beobachten war. Der mittlere Tonus, d.h. die Baseline, wurde jedoch durch die bakteriellen Überstände unter nativen Bedingungen nicht stärker angehoben. Hier war sogar zu beobachten, dass das St.-I-Medium den Grundtonus in beiden Konzentrationsbereichen signifikant stärker an hob als der bakterielle Überstand.

Daraus lässt sich schließen, dass das Medium allein zu einer Anhebung der Baseline bei kleinen Oszillationsamplituden führt, die Zugabe bakterieller Überstände hingegen bei unveränderter Baseline zu einer Zunahme der Amplituden der maximalen Kontraktionsoszillationen (siehe auch Abb. 12 in

Kapitel 4.2).

Eine Dosisabhängigkeit der maximalen Kontraktionskraftsteigerung ließ sich nur beim bakteriellen Überstand nachweisen. Eine Verzehnfachung der applizierten Konzentration führte nur bei den bakteriellen Überständen nochmals zu einer Erhöhung der maximalen Kontraktionskraft. Die Effekte des St.-I-Mediums wurden durch eine Dosiserhöhung hingegen nicht weiter verstärkt.

Die am nativen Darm durchgeführte elektrische Feldstimulation (EFS) enterischer Nerven führte erwartungsgemäß zu einer Relaxation der Muskelstreifen. Die relative Relaxation wurde sowohl durch das St.-I-Medium als auch durch die verwendeten bakteriellen Überstände um etwa 10% verstärkt, ohne dass zwischen beiden Gruppen signifikante Unterschiede bestanden. Daraus lässt sich folgern, dass probiotische Überstände per se die Effekte des ENS auf die glatte Muskulatur nicht modulieren, sondern direkt auf das Muskelgewebe wirken.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Bestandteile des St.-I-Mediums zwar den Grundtonus humaner Kolonmuskulatur anheben, die Bebrütung mit EcN hingegen zu einer deutlichen Zunahme der maximalen Kontraktionskräfte führt. Ein Beleg dafür, dass Stoffwechselprodukte von EcN die maximale Kontraktionskraft steigern, ist u. a. die Dosisabhängigkeit der Effekte, die beim St.-I-Medium allein nicht beobachtet werden konnte. Es ist anzunehmen, dass die Kontraktionssteigerung hervorgerufen wird durch eine Substanz, die bereits im St.-I-Medium enthalten ist, deren Konzentration jedoch durch Bebrütung mit EcN erhöht werden kann. Dies lässt sich in Einklang bringen mit dem objektiven Befund einer um den Faktor zwei höheren Konzentration an Essigsäure in den bakteriellen Überständen im Vergleich zum unbebrüteten Komplexmedium und deutet darauf hin, dass den SCFA in der Vermittlung der von uns beobachteten Effekte ein maßgebliche Rolle zukommt (siehe 5.2.4).

5.2.2 Einfluss von bakteriellem Überstand auf die Kontraktilität unter NANC-Bedingungen

Durch pharmakologische Blockierung adrenerger und cholinergere Transmitter konnte geprüft werden, ob die bakteriellen Überstände ihre kontraktile Effekte unabhängig von adrenergen und cholinergen enterischen Neurotransmittern entfalten bzw. selektiv auf die nicht blockierten intrinsische NANC-Transmittersysteme wirken.

Es zeigte sich, dass die bakteriellen Überstände auch unter NANC-Bedingungen die maximale Kontraktionskraft signifikant gegenüber dem St.-I-Medium steigerten. Somit scheinen Adrenalin, Noradrenalin und insbesondere Acetylcholin als kontraktionssteigernde Transmitter eine untergeordnete Rolle im Zusammenhang mit der Wirkung von EcN zu spielen.

Während die durch bakterielle Überstände induzierte Kontraktionszunahme unter nativen Bedingungen 28% (1:50) bzw. 18% (1:5) betrug, steigerte sie sich unter NANC-Bedingungen auf 25% (1:50) bzw. 28% (1:5). Daher ist anzunehmen, dass das adrenerge Transmittersystem die Wirkung der bakteriellen Überstände auf die maximalen Kontraktionsamplituden abschwächt und es erst unter partieller Ausschaltung des ENS zur vollen Entfaltung der kontraktilitätssteigernden Wirkung der bakteriellen Überstände kommt.

Wie bereits unter nativen Bedingungen beobachtet, findet sich auch unter NANC-Bedingungen eine Dosisabhängigkeit lediglich für den bakteriellen Überstand. Dies spricht weiterhin dafür, dass durch die Stoffwechsellistung des Probiotikums EcN ein kontraktionsfördernder Wirkstoff im St.-I-Medium angereichert worden ist.

Wie beim nativen Darm zeigten sich auch unter NANC-Bedingungen keine Unterschiede bezüglich der EFS-induzierten relativen Relaxation zwischen St.-I-Mediums und bakteriellem Überstand. Diese Beobachtung unterstreicht die Annahme, dass die Effekte des bakteriellen Überstände direkt muskulär und nicht über eine Modulierung des ENS bzw. die Beeinflussung der

enterischen Transmittersysteme vermittelt werden.

5.2.3 Einfluss von bakteriellem Überstand auf die Kontraktilität nach vollständiger nervaler Blockade

Um zu überprüfen, ob die durch die bakteriellen Überstände induzierten Effekte auf die maximalen Kontraktionsamplituden nerval oder muskulär vermittelt werden, wurde durch Blockade nervaler Na⁺-Kanäle (TTX-Gabe) jeglicher Einfluss des ENS unterbunden.

Auch unter diesen Bedingungen führte der bakterielle Überstand weiterhin zu stärkeren maximalen Kontraktionskräften, als es das St.-I-Medium allein tat. Da ein nerval vermittelter Effekt über das ENS nach TTX-Gabe sicher auszuschließen ist, muss postuliert werden, dass die Wirkung der probiotischen Überstände auf die maximalen Kontraktionsamplituden direkt an der glatten Muskulatur ansetzt.

Unter vollständiger Blockade des ENS zeigte sich die maximale Vervielfachung des Grundtonus sogar am ausgeprägtesten: Die Zugabe des bakteriellen Überstandes in hoher Konzentration führte zu einer Steigerung um 33% - was der höchsten maximalen Vervielfachung des Grundtonus in den von uns untersuchten Bedingungen entspricht.

Die Beobachtung, dass sich die maximale Kontraktionskraft von den nativen (18%) über die NANC- (28%) bis hin zu den TTX-Bedingungen (33%) (jeweils für 1:5) kontinuierlich gesteigert hat, ließe sich wie folgt erklären: Normalerweise hat das ENS als Summenettoeffekt eine relaxierende Wirkung auf die Darmmuskulatur – insbesondere durch das große Spektrum der inhibitorisch, d.h. relaxierend wirkenden NANC-Transmitter. Entsprechend treten nach sukzessiver Ausschaltung dieser hemmenden Einflüsse die kontraktionssteigernden Effekte der bakteriellen Überstände zusehends deutlicher zutage und führen zur ausgeprägtesten Steigerung der maximalen Kontraktionskraft nach vollständiger Blockade des ENS.

Die kontraktionsfördernde Wirkung der bakteriellen Überstände scheint direkt an der glatten Muskulatur anzusetzen. Sie kann zum einen durch die Freisetzung intrazellulären Kalziums bedingt sein, durch eine

Wiederaufnahmehemmung freigesetzten Kalziums in die intrazellulären Speicher oder auch durch Wirkung auf membranständige Kalziumkanalproteine im Sinne eines verstärkten Kalziumeinstroms in die Muskelzellen. Die genauen Mechanismen lassen sich nicht aus den Untersuchungen ableiten. Allerdings wurde durch andere Arbeitsgruppen eine ionale Beeinflussung von Kalziumkanälen durch H⁺-Ionen, wie sie aus von Probiotika produzierten kurzkettigen Fettsäuren stammen können, angenommen [52], [47]. Dieser Mechanismus ist insofern naheliegend, als dass EcN größere Mengen Essigsäure als Stoffwechselprodukt in das Nährmedium abgibt und die Effekte direkt nach Zugabe der Substanzen einsetzen.

5.2.4 Einfluss von Essigsäure auf die Kontraktilität

Da sich in allen Versuchsansätzen signifikante Unterschiede zwischen den bakteriellen Überständen und dem St.-I-Medium hinsichtlich ihrer Wirkung auf die glattmuskuläre Kontraktilität zeigten, wurde die Zusammensetzung beider Medien verglichen. Insbesondere waren solche Substanzen von Interesse, die im bakteriellen Überstand deutlich höher konzentriert als im St.-I-Medium vorlagen. Eine gaschromatografische Analyse (durchgeführt von der Fa. Ardeypharm) ergab, dass Essigsäure im bakteriellen Überstand in einer fast zweifach höheren Konzentration vorlag (17.5-20.1 mM) als im St.-I-Medium, das nicht mit EcN bebrütet wurde (9.8-10.0 mM). Dieser Befund machte Essigsäure zu einem möglichen Substanzkandidaten, der für die zu beobachtende Kraftsteigerung der humanen Kolonmuskulatur in Frage kommt.

In den daraufhin zusätzlich durchgeführten Versuchsreihen wurden unter nativen und TTX-Bedingungen die Effekte des St.-I-Medium mit denen des St.-I-Medium verglichen, das mit steigenden Essigsäure-Konzentrationen gespickt worden war (10 mM, 30 mM und 70 mM). Mit diesem Ansatz konnte nachgewiesen werden, dass vor allem die zusätzliche Zugabe von 10 mM und 30 mM Essigsäure annähernd die gleichen Effekte hervorrief, wie sie zuvor der bakterielle Überstand ausgelöst hatte.

Damit lässt sich Essigsäure als ein von EcN synthetisiertes

Stoffwechselprodukt identifizieren, das direkt und dosisabhängig die Kontraktilität der glatten Darmmuskulatur steigern kann und möglicherweise neben anderen Substanzen eines der verantwortlichen Stimulanzien der von uns beschriebenen Kontraktilitätssteigerung ist. Aufgrund des pK_a -Wertes von Essigsäure liegt diese kurzkettige Fettsäure im Lumen des Kolon in ionaler Form vor. Dies könnte die oben bereits angeführte Öffnung von Kalziumkanälen durch H^+ -Ionen induzieren, zur Anhebung des intrazellulären Kalziums führen und damit die Kontraktilitätssteigerung erklären.

5.3 Ausblick

Obwohl das Probiotikum EcN klinisch nachweisliche Wirkung auf die intestinale Motilität hat, sind die zugrunde liegenden Mechanismen bisher nicht aufgeklärt. Insbesondere liegen bisher keine Studien vor, die an humanem Material unter standardisierten Bedingungen die Effekte von EcN auf die intestinale glattmuskuläre Kontraktilität charakterisiert haben. Die vorliegende Untersuchung liefert hierzu einen Beitrag und konnte erstmalig aufzeigen, dass EcN-Überstände die in-vitro Kontraktilität humaner Kolonmuskulatur steigern und dieser Effekt direkt muskulär und nicht neural vermittelt ist.

Weitere in-vitro Untersuchungen müssen zeigen, welche Vorgänge dafür auf zellulärer Ebene verantwortlich sind. Folgende Ansätze wären geeignet, um die oben skizzierten Wirkmechanismen aufzuklären zu können: (1) Intrazelluläre Kalziummessung nach Zugabe bakterieller Überstände zur Untersuchung des Ca^{++} -Anstiegs in den glatten Muskelzellen, (2) Zugabe bakterieller Überstände in kalziumfreiem Medium zur Untersuchung der Beeinflussung des Kalzium-Influx durch Essigsäure, (3) Zugabe selektiver Kalziumkanalblocker zur Untersuchung der beteiligten Kalziumkanäle, (4) Zugabe anderer Protonendonatoren zur Untersuchung der kontraktionssteigernden Effekte von H^+ -Ionen.

Obwohl in-vitro Untersuchungen maßgeblich dazu beitragen können, grundlegende Wirkprinzipien von Probiotika aufzudecken, unterliegen diese Ansätze naturgemäß auch Schwächen, da sie die in-vivo Verhältnisse nur

eingeschränkt widerspiegeln. Eine Limitierung erfährt vorliegende Studie insbesondere dadurch, dass die Muskelstreifenpräparate aus dem Gewebeverband der Darmwand artifiziell isoliert, d.h. von Submukosa und Mukosa getrennt wurden. Einerseits ist nur dadurch eine reliable Untersuchung der glattmuskulären Kontraktilität einschließlich der EFS möglich, andererseits interagieren die bakteriellen Überstände nicht mehr mit der natürlichen luminalen Grenzschicht, der Tela mucosa, sondern direkt mit der Tunica muscularis. Diese unphysiologische Nähe zum muskulären Kompartiment schränkt die Aussagekraft der Befunde sicherlich ein.

Dennoch ist davon auszugehen, dass ein Großteil der probiotischen Stoffwechselprodukte, insbesondere die niedermolekularen Substanzen, die epitheliale Barriere passiert und über den Blutstrom den tieferen Darmwandschichten und damit auch der Tunica muscularis zugeführt wird. Dies ist insbesondere für die SCFA Essigsäure anzunehmen, so dass die in-vitro Ergebnisse auf die in-vivo Situation extrapolierbar scheinen.

Bei Fermentationsprozessen durch bakterielle Anaerobier entstehen je nach Rechenmodell im menschlichen Kolon etwa 200-700 mmol SCFA pro Tag [57]. Wesentliche Substrate sind hierbei Zellwand-Polysaccharide wie z. B. Zellulose, Pektin und Hemizellulose. Die physiologischen Funktionen sind vielfältig und umfassen die Energieversorgung der Darmmucosa (bis zu 10%), die Interaktion im Elektrolyttransport sowie die Vermittlung antibakterieller Effekte [58]. Hauptanion ist dabei Azetat als Salz der Essigsäure (siehe auch 1.5).

In einer Autopsieuntersuchung [59] an verstorbenen Patienten (Zeitraum post mortem bis zur Autopsie <4 h) wurde in verschiedenen Kompartimenten die SCFA-Konzentration bestimmt. Im terminalen Ileum wurden 13 mmol/kg SCFA registriert, im Zaekum 131 mmol/kg und im Colon descendens 81 mmol/kg. Alle drei Anionen der SCFAs (Azetat, Butyrat, Propionat) konnten auch im Blut der Vena portae in einer Konzentration von etwa 375 $\mu\text{mol/l}$ nachgewiesen werden. Diese Befunde belegen, dass die SCFA-Anionen resorbiert werden und damit systemisch zur Verfügung stehen. Im Blut peripherer Venen betrug die Konzentration der SCFA-Anionen lediglich 80

$\mu\text{mol/l}$, so dass von einer Verstoffwechslung der SCFA in der Leber ausgegangen werden muss. Den Hauptanteil mit über 90% der im peripheren Blut nachweisbaren SCFA-Anionen stellte dabei Azetat mit einer Konzentration von 30-140 $\mu\text{mol/l}$. Damit steht Azetat als möglicher Mediator der von uns beschriebenen Effekte auf die Motilität des humanen Kolons auch in-vivo zur Verfügung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die vorliegende in-vitro Untersuchung den modulierenden Effekt des Probiotikum EcN auf die glattmuskuläre Kontraktilität der humanen Darmwand bestätigt. Damit kann ein Erklärungsansatz geliefert werden, der den klinisch-empirischen Einsatz von EcN bei intestinalen Motilitätsstörungen auf eine wissenschaftlich nachvollziehbare Basis stellt.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Während die Wirksamkeit von Probiotika in der klinischen Anwendung mittlerweile für ein breites Indikationsspektrum (chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Reizdarmsyndrom, Diarrhoe, chronische Obstipation) nachgewiesen ist, sind die zugrundeliegenden Mechanismen, über die Probiotika die gastrointestinale Motilität beeinflussen, noch weitgehend ungeklärt.

Das Ziel der experimentellen elektrophysiologischen in-vitro Studie war es daher, die Effekte des Probiotikums *Escherichia coli* Nissle (EcN) 1917 (Mutaflor®) auf die Motilität des humanen Kolons zu charakterisieren und zwischen nervaler und muskulärer Modulation zu differenzieren. Als ein wesentliches EcN-Stoffwechselprodukt konnte die kurzkettige Fettsäure (short-chain fatty acid, SCFA) Essigsäure identifiziert werden, deren Einfluss auf die Kolon-Motilität zusätzlich überprüft wurde.

Es wurden isolierte Ringmuskelstreifen (n=94) des distalen Kolons von Patienten (n=17, 9 Frauen, 8 Männer, 41-86 Jahre, Altersdurchschnitt 65,1 Jahre), die wegen nicht stenosierender kolorektaler Neoplasien operiert wurden, unter standardisierten Bedingungen im Organbad untersucht. Nach Gewinnung und Präparation der Muskelstreifen erfolgte die Messung der isometrischen glattmuskulären Kontraktionen über Kraftaufnehmer, deren Signale digital aufgezeichnet wurden.

Verglichen wurden die Effekte verschiedener Konzentrationen (1:50, 1:5) von EcN-Kulturüberständen und Kulturmedium ohne EcN-Überstände (Kontrolle) auf die Kontraktilität der Muskelstreifen. Die Messungen wurden durchgeführt unter (1) nativen Bedingungen, nach (2) elektrischer Feldstimulation (EFS), unter (3) non-adrenergen-non-cholinergen (NANC) Bedingungen sowie (4) nach kompletter Blockade des enterischen Nervensystems (ENS) durch Tetrodotoxin (TTX).

EcN-Überstände führten dosisabhängig zur signifikanten Steigerung der maximalen Kontraktionsamplituden der Muskelstreifen im Vergleich zum Kulturmedium ohne Zusatz von EcN-Überstand. Die maximale

Vervielfachung des Grundtonus nach Gabe von EcN-Überstände steigerte sich von 18% (native Bedingungen) über 28% (NANC-Bedingungen) auf 33% (TTX-Bedingungen) jeweils im Vergleich zum Kontrollmedium. Die SCFA Essigsäure, die gaschromatografisch in EcN-Überständen nachgewiesen werden konnte, war ebenfalls in der Lage, die bei EcN-Überständen beobachteten Effekte hervorzurufen. Dagegen blieben die EFS-induzierte, d.h. durch das ENS vermittelte Relaxation sowie der mittlere Grundtonus der Muskelstreifen durch EcN-Überstände unbeeinflusst.

Aus den Befunden lässt sich schließen, dass EcN-Überstände die in-vitro Kontraktilität humaner Kolonmuskelstreifen in dosisabhängiger Weise steigern. Da sowohl die teilweise als auch komplette Blockade des ENS diese Effekte nicht aufhob und auch die EFS-induzierte, neural getriggerte Relaxation der Muskelstreifen unbeeinflusst blieb, ist eine direkte Stimulation der glatten Muskelzellen durch EcN-Überstände anzunehmen. Die von EcN als Metabolit synthetisierte SCFA Essigsäure scheint eines der für die Vermittlung der beschriebenen Effekte verantwortlichen Stoffwechselprodukte zu sein.

Auch wenn die in-vitro erhobenen Befunde nicht direkt auf die in-vivo-Verhältnisse übertragbar sind, so belegen die Daten das Potential des Probiotikum EcN, die intestinale Motilität zu triggern, und stellen damit eine Rationale für die klinisch erfolgreiche Applikation von EcN bei gastrointestinalen Motilitätsstörungen dar.

7 LITERATUR

1. Loew, D., Leben und Werk von Alfred Nissle, in 4. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität, S. 11- 19. 2000, Hrsg. A.-Nissle- Gesellschaft e.V., Hagen: Berlin, 10.- 11. November 2000.
2. Hof, H. and Dörries, R., Medizinische Mikrobiologie. 2005: Georg Thieme Verlag.
3. Isolauri, E., Probiotics for infectious diarrhoea. Gut, 2003: 52: 436-437.
4. Isolauri, E., Probiotics in human disease. American Journal of Clinical Nutrition, 2001: 73 (Suppl): 1142S- 1146S.
5. Isolauri, E., Kirjavainen, P.V. and Salminen, S., Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. Gut, 2002: 50(Suppl III): iii54- iii59.
6. Saavedra, J.M., Clinical applications of probiotic agents. American Journal of Clinical Nutrition, 2001: p. 73 (Suppl): 1147S- 1151S.
7. de Roos, N.M. and Katan, M.B., Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. American Journal of Clinical Nutrition, 2000: 71: 405- 411.
8. Schütz, E., Mutaflor[®] in der Therapie von Darmerkrankungen- Erfahrungen in der gastroenterologischen Praxis. notabene medici, 2002: 9/10: 348-352.
9. Altenhoefer, A., Oswald, S., Sonnenborn, U., Enders, C., Schulze, J., Hacker, J., Oelschlaeger, T. A., The probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. Immunology and Medical Microbiology, 2004: 40: 223- 229.
10. Koebnick, C., Wagner, I., Leitzmann, P., Stern, U., Zunft, H. J. F., Probiotic beverage containing Lactobacillus casei Shirota improves

- gastrointestinal symptoms in patients with chronic constipation. *The Canadian Journal of Gastroenterology*, 2003: p. Vol17, No11: 655-659.
11. Möllenbrink, M. and Buckschen, E., Behandlung der chronischen Opstipation mit physiologischen Escherichia- coli- Bakterien. *Medizinische Klinik*, 1994: Nummer 11, 587- 593.
 12. Müller- Lisner, S., Kolonflora und chronische Opstipation, in 3. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität, S. 145- 151. 1997, Hrsg. A.-Nissle- Gesellschaft e.V., Hagen: Ansbach, 28.- 29. November 1997.
 13. Müller- Lisner, S., Pathophysiologie und Therapie funktioneller Störungen des unteren Intestinaltraktes, in 4. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität, S. 171- 180. 2000, Hrsg. A.-Nissle- Gesellschaft e.V., Hagen: Berlin 10.-11. November 2000.
 14. Fric, P. and Zavoral, M., Offene Pilotstudie zur Wirkung von Mutaflor[®] bei symptomatischer Kolondivertikulose, in 4. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität, S. 197- 201. 2000, Hrsg. A.- Nissle- Gesellschaft e. V., Hagen: Berlin 10.-11. November 2000.
 15. Fric, P. and Zavoral, M., The effect of non-pathogenic Escherichia coli in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2003: 15: 313- 315.
 16. Goerg, K.J., Diarrhoe bei erregerinduzierter Kolitis- Ansatzpunkte einer antagonistischen mikrobiellen Therapie, in 4. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität, S. 181- 189. 2000, Hrsg. A.- Nissle- Gesellschaft e. V., Hagen: Berlin 10.-11. November 2000.
 17. Goerg, K.J. and Schlörer, E., Probiotische Therapie einer pseudo-membranösen Kolitis- Kombination aus intestinaler Lavage und oraler

- Gabe von *Escherichia coli*. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1998; 123: 1274- 1278.
18. Bennet, J.D. and Brinkman, M., Treatment of ulcerative colitis by implantation of normal colonic flora. *The Lancet*, 1989; 1: 164.
 19. Swidsinski, A., Swidsinski, S., Godzun, A., Orthner, M., Lochs, H., Therapy with *E. coli* Nissle reduces concentrations of mucosa associated colonic flora in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 2001; p. 118 (Suppl): A1138.
 20. Boudeau, J., Colombel, F. and Darfeuille-Michaud, A., *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inhibits adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* isolated from a Crohn's disease patient. *Gastroenterology*, 2001; p. 120 (Suppl): A190.
 21. Kruis, W., Beeinflussung der Darmökologie: Therapeutisches Konzept mit Zukunft?, in 3. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität, S. 161- 167. 1997, Hrsg. A.- Nissle-Gesellschaft e. V., Hagen: Ansbach, 28.- 29. November 1997.
 22. Oelschlaeger, T.A., Altenhoefer, A. and Hacker, J., Inhibition of *Salmonella typhimurium* invasion into intestinal cells by the probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Gastroenterology*, 2001; p. 120 (Suppl): A326.
 23. Borruel, N., Carol, M., Casellas, F., Antolín, M., de Lara, F., Espín, E., Naval, J., Guarner, F., Malagelada, J. R., Increased mucosal tumour necrosis factor α production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut*, 2002; 51: 659- 664.
 24. Shanahan, F., Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and eotherapeutics. *Gastroenterology*, 2001; 120: 622- 635.
 25. Sartor, R.B., Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*, 2004; 1620- 1630.

26. Kruis, W., Fric, P. and Stolte, M., Maintenance of remission in ulcerative colitis is equally effective with *Escherichia coli* Nissle 1917 and with standard mesalazine. *Gastroenterology*, 2001: p.120 (Suppl): A127.
27. Kruis, W., Fric, P., Pokrotnieks, J., Lukás, M., Fixa, B., Kascák, M., Kamm, M. A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., Schulze, J., Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, 2004: 53: 1617- 1623.
28. Rembacken, B.J., Snelling, A. M., Hawkey, P. M., Chalmers, D. M., Axon, A. T. R., Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *The Lancet*, 1999: 354: 635-639.
29. Kruis, W., Klinische Bedeutung von Mutaflor® (*E.coli* Stamm Nissle 1917) in der Therapie der Colitis ulcerosa und des Morbus Crohn, in 4. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität, S. 131- 139. 2000, Hrsg. A.- Nissle-Gesellschaft e.V., Hagen: Berlin 10.-11. November 2000.
30. Rembacken, B. J., Snelling, A. M., Vail, A., Hawkey, P. M., Axon, A. T. R., Adhäsive *Escherichia coli* bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, in 3. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität, S. 153- 158. 1997, Hrsg. A.- Nissle- Gesellschaft e. V., Hagen: Ansbach, 28.- 29. November 1997.
31. Schultz, M., Strauch, U. G., Linde, H.-J., Watzl, S., Obermeier, F., Göttl, C., Dunger, N., Grunwald, N., Schölmerich, J., Rath, H. C., Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004: 11: 372- 378.
32. Kamada, N., Inoue, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Matsuoka, K., Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 prevents murine

- acute and chronic colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2005: 11: 455-463.
33. Faubion, W.A. and Sandborn, W. J., Probiotic therapy with *E. coli* for ulcerative colitis: take the good with the bad. *Gastroenterology*, 2000: 118: 630- 631.
 34. Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Manon Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Poggioli, G., Miglioli, M., Campieri, M., ., Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 2003: 124: 1202- 1209.
 35. Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzocchi, G., Poggioli, G., Miglioli, M., Campieri, M., Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 2000: 119: 305- 309.
 36. Mimura, T., Rizzello, F., Helwig, U., Poggioli, G., Schreiber, S., Talbot, I. C., Nicholls, R. J., Campieri, M., Kamm, M. A., Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut*, 2004: 53: 108- 114.
 37. Kuzela, L., Kascak, M. and Vavrecka, A., Induction and maintenance of remission with nonpathogenic *Escherichia coli* in patients with pouchitis. *American Journal of Gastroenterology*, 2001: 96: 3218-3219.
 38. Lodinová- Zádňíková, R. and Sonnenborn, U., Effect of preventive administration of a nonpathogenic *Escherichia coli* strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants. *Biology of the Neonate*, 1997: 71: 224-232.
 39. Lodinová- Zádňíková, R., Kolonisationsprophylaxe gegen die Ansiedlung von Hospitalkeimen durch orale *E.-coli*-Besiedlung bei Neugeborenen, in 3. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität, S. 137- 143. 1997, Hrsg. A.- Nissle-Gesellschaft e.V., Hagen: Ansbach, 28.- 29. November 1997.

40. Cukrowska, B., Lodinová- Zádňiková, R., Enders, C., Sonnenborn, U., Schulze, J., Tlaskalová- Hogenová, H., Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic *E. coli* strain Nissle 1917. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2002: 55: 204- 209.
41. Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E., Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, 2001: 357: 1076- 1079.
42. Schulze, L., *Mutaflor in der Pädiatrie- Aktuelle Forschungsergebnisse, Empfehlungen für die Praxis*. Ardeypharm GmbH, Herdecke, 2005.
43. Ohashi, Y., Inoue, R., Tanaka, K., Umesaki, Y., Ushida, K., Strain gauge force transducer and its application in an pig model to evaluate the effect of probiotic on colonic motility. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2001: 47: 351- 356.
44. Verdu, E.F., Bercik, P., Bergonzelli, G. E., Huang, X.- X., Blennerhasset, P., Rochat, F., Fiaux, M., Mansouria, R., Corthesy-Theulaz, I., Collins, S. M., *Lactobacillus paracasei* normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology*, 2004: 826- 837.
45. Kamath, P.S., Hoepfner, M. T. and Philips, F., Short- chain fatty acids stimulate motility of the canine ileum. *American Journal of Physiology*, 1987: 253: G427- G433.
46. Kamath, P.S. and Philips, F., Initiation of motility in canine ileum by short chain fatty acids and inhibition by pharmacological agents. *Gut*, 1988: 29: 941- 948.
47. Mc Manus, C.M. and Michel, K. E., Effect of SCFA on contraction of smooth muscle in canine colon. *American Journal of Veterinary Research*, 2002: 63: 295- 300.

48. Yajima, T., Contractile Effect Of Short- Chain Fatty Acids On The Isolated Colon Of The Rat. *Journal of Physiology*, 1985: 368: 667-678.
49. Binder, H. and Mehta, P., Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. *Gastroenterology*, 1989: 96: 989- 996.
50. Richardson, A., Delbridge, A.T., Brown, N.J., Rumsey, R.D.E., Read, N.W., Short chain fatty acids in the terminal ileum accelerate stomach to caecum transit time in the rat. *Gut*, 1991: 32: 266- 269.
51. Squires, P.E., Rumsey, R. D. E., Edwards, C. A., Read, N. W., Effect of short-chain fatty acids on contractile activity and fluid flow in rat colon in vitro. *American Journal of Physiology*, 1992: 262: G813- G817.
52. Cherbut, C., Aube, A.-C., Blottiere, H. M., Pacaud, P., Scarpignato, C., Galmiche, J.- P., In vitro contractile effects of short-chain fatty acids in the rat terminal ileum. *Gut*, 1996: 38: 53- 58.
53. Cherbut, C., Ferrier, L., Roze, C., Anini, Y., Blottiere, H. M., Lecanu, G., Galmiche, J.- P., Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *American Journal of Physiology*, 1998: 275: G1415- G1422.
54. Cuche, G. and Malbert, C. H., Short- chain fatty acids present in the ileum inhibit fasting gastrointestinal motility in conscious pigs. *Neurogastroenterology and Motility*, 1999: 11(3): 219-226.
55. Cuche, G., Cuber, J. C. and Malbert, C. H., Ileal short-chain fatty acids inhibit gastric motility by a humoral pathway. *American Journal of Physiology*, 2000: 279: G925- G930.
56. Cuche, G., Blat, C. and Malbert, C. H., Desensitization of ileal vagal receptors by short-chain fatty acids in pigs. *American Journal of Physiology*, 2001: 280: G1013- G1021.

57. Fleming, S.E. and Arce, D. S., Volatile fatty acids: their production, absorption, utilization, and roles in human health. *Clinics in gastroenterology*, 1986: 15: 787- 814.
58. Cummings, J.H., Short-chain fatty acids in the human colon. *Gut*, 1981: 22: 763- 779.
59. Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P. E., Macfarlane, G. T., Short-chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic an venous blood. *Gut*, 1987: 28: 1221- 1227.
60. Kamath, P.S., Philips, S. F. and Zinsmeister, A. R., Short-chain fatty acids stimulate ileal motility in humans. *Gastroenterology*, 1988: 95: 1496- 1502.
61. Masliah, C., Cherbut, C., Bruley des Varannes, S., Barry, J. L., Dubois, A., Galmiche, J. P., Short-chain fatty acids do not alter jejunal motility in man. *Digestive Diseases and Sciences*, 1992: 37: 193-197.
62. Gorbachev, C., Jouet, P., Coffin, B., Flourie, B., Lemann, M., Franchisseur, C., Jian, R., Rambaud, J. C., Effects of schort-chain fatty acids on the phasic and tonic motor activity in the unprepared colon of healthy humans. *Gastroenterology*, 1998: 114: G3119.
63. Kvietys, P. R. and Granger, D. N., Effect of volatile fatty acids on blood flow and oxygen uptake by the dog colon. *Gastroenterology*, 1981: 80: 962- 969.
64. Mortensen, F. V., Nielsen, H., Mulvany, M. J., Hesson, I., Short chain fatty acids dilate isolated human colonic resistance arteries. *Gut*, 1990: 31: 1391- 1394.
65. Hoyle, C. H., Kamm, M. A., Lennard-Jones, J. E., Burnstock, G., An in vitro electrophysiological study of the colon from patients with idiopathic chronic constipation. *Clinical Autonomic Research*, 1992: 2(5): 327-33.

66. Rees, B. I., Bond, J., Spriggs, T. L., Hughes, L. E., Observations on the muscle abnormality of the human sigmoid colon in diverticular disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1980: 9(3): 229-32.
67. Tomita, R., Munakata, K., Aoki, N., Tanjoh, K., Kurosu, Y., A study on the peptidergic nerves (VIP, substance P) in the colon of patients with diverticular disease. *Regulatory Peptides*, 1993: 46(1-2): 244-6.
68. Tomita, R., Tanjoh, K., Fujisaki, S., Fukuzawa, M., Physiological studies on nitric oxide in the right sided colon of patients with diverticular disease. *Hepatology*, 1999: 46(29): 2839-44.
69. Tomita, R., Fujisaki, S., Tanjoh, K., Fukuzawa, M., Role of nitric oxide in the left-sided colon of patients with diverticular disease. *Hepatology*, 2000: 47(33): 692-6.
70. Golder, M., Burleigh, D. E., Belai, A., Ghali, L., Ashby, D., Lunniss, P. J., Navsaria, H. A., Williams, N. S., Smooth muscle cholinergic denervation hypersensitivity in diverticular disease. *The Lancet*, 2003: 361(9373): 1945-51.
71. Maasi, M., Ioan, P., Budriesi, R., Chiarini, A., Vitali, B., Lammers, K., Gionchetti, P., Campieri, M., Lembo, A., Brigidi, P., Effects of probiotic bacteria on gastrointestinal motility in guinea-pig isolated tissue. *World Journal of Gastroenterology*, 2006: 12(37): 5987-5994.
72. Bark, J., Experimentelle Studien zum Einfluß von *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917-Kulturüberständen auf die Motilität isolierter Colon-Segmente der Ratte unter in vitro-Bedingungen; Med. Diss. unter der Betreuung von Dr. med. W. A. Vorderholzer, Medizinische Klinik der Universität zu München, 2000.
73. Stammcharakteristik *E. coli* Stamm Nissle 1917, in 4. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität, S. 218- 221. 2000, Hrsg. A.-Nissle- Gesellschaft e.V., Hagen: Berlin, 10.- 11. November 2000.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACh	Acetylcholin
AT	Atropin
cfu	colony forming unit= Kolonie bildende Einheit
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (Mutaflor®)
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EFS	elektrische Feldstimulation
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
ENS	enterisches Nervensystem
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxinbildende <i>E. coli</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
NO	Stickoxyd
NANC	nonadrenerg-noncholinerg
ORF	open reading frames
PAP	Papaverin
Phe	Phentolamin
Pro	Propanolol
SCFA	short-chain fatty acid
TTX	Tetrodotoxin

9 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt dem Direktor des Instituts für Anatomie der Universität zu Lübeck, Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Westermann, für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, des großzügigen Arbeitsplatzes, der Geräte und Materialien sowie seiner stetigen Unterstützung bei der Durchführung und schriftlichen Niederlegung der Arbeit.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei den Herren Prof. Dr. med. Thilo Wedel (Institut für Anatomie, Universität Kiel, ehemals Universität Lübeck) und Hanno von Koschitzky (Klinik für Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck) sowohl für die engagierte und umfassende fachliche Betreuung als auch für ihre stets zugewandte und humorvolle Unterstützung. Beide haben sich durch ihre kontinuierliche Hilfestellungen als eine wesentliche Stütze bei der Konzeption, Durchführung und Analyse der Untersuchungen erwiesen und hatten stets ein offenes Ohr und einen Lösungsweg parat bei technischen und inhaltlichen Problemen.

Für ihre Unterstützung in der praktischen Durchführung dieser Arbeit danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aus dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck.

Für die freundliche und reibungslose Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Untersuchungspräparate danke ich Herrn Prof. Dr. med. Hans-Peter Bruch (Direktor der Klinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck) sowie seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, insbesondere im OP-Bereich.

Für die Bereitstellung des Kulturmediums, die Bebrütung mit EcN und die Gewinnung der bakteriellen Überstände sowie die Durchführung der gaschromatischen Untersuchungen möchte ich den Herren Dr. Ullrich Sonnenborn und Dr. Lothar Schulze sowie ihren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern von der Firma Ardeypharm in Herdecke herzlich danken.

10 LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Florian Bär

Anschrift: Trendelenburgstraße 36
23562 Lübeck

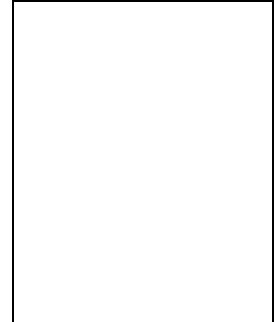
Telefon: 0451/ 4095042

Email: Florian_Baer@gmx.de

Geburtsdatum: 07/12/1981 in Eutin

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch



SCHULAUSSBILDUNG

09/88 – 07/92: Hochtör-Grundschule Neustadt

09/92 – 07/94: Orientierungsstufe Kreisgymnasium Neustadt

09/94 – 05/01: Kreisgymnasium Neustadt, Abschluss Abitur

HOCHSCHULAUSSBILDUNG

04/10/02: Beginn Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck

20/08/04: Ärztliche Vorprüfung

10/08: schriftliches Staatsexamen

12/08: mündliches Staatsexamen

PROMOTION

01/11/04: Beginn der Dissertation im Institut für Anatomie, Universität Lübeck

Titel der Arbeit: „Einfluss des Probiotikum Escherichia coli Nissle 1917 auf die in-vitro Motilität humaner Kolonmuskulatur“

FAMULATUREN / PRAKTIKA

15/08/05 – 09/09/05:	Department of Cardiology, University Hospital „Saint Ekaterina“, Sofia, Bulgarien
30/09/05 – 14/10/05:	Klinik für Orthopädie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck
14/08/06 – 27/08/06:	Klinik für Gastroenterologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck
28/08/06 – 10/09/06:	Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. T. Steiner, Neustadt
11/09/06 – 01/10/06:	Radiologie, Praxis Dres. Ollrogge et al., Lübeck
02/10/06 – 15/10/06:	Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck
12/02/07 – 25/02/07	Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck
20/08/07 – 07/12/07	1.Tertial PJ, Klinik für Urologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck
10/12/07 – 28/03/08	2.Tertial PJ, Klinik für Chirurgie, Sana-Krankenhaus, Lübeck
31/03/08 – 23/05/08	1.Hälfte 3.Tertial PJ, Department of Gastroenetrology, Royal Hallamshire Hospital, University of Sheffield, Sheffield, England
26/05/08 – 18/07/08	2. Hälfte 3. Tertial PJ, Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Lübeck

ZUSÄTZLICHE QUALIFIKATIONEN / PREISE / STIPENDIEN

WS02/03– WS03/04:	Medizinische Ethik nach dem „Lübecker Modell“
WS04/05:	Medical English
WS04/05:	Zentrales Doktorandenseminar
SS04– WS04/05:	Plastische Chirurgie auf anatomischer Basis

SS05– WS05/06:	Spanischer Grund- und Mittelstufenkurs
SS06:	Grundkurs „Evidenzbasierte Medizin“
Mai 2008:	Verleihung des Yakult „Science for health“ Preises in Frankfurt
März 2008:	Reisestipendium der Freunde und Förderer der Universität Lübeck für den Vortrag im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität e.V. vom 23.-25. März 2007, Schloss Hohenkammer bei Freising
September 2007:	Reisestipendium der Freunde und Förderer der Universität Lübeck für den Postervortrag im Rahmen der 62. Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten in Bochum vom 12.-15. September 2007
November 2008:	Martin-Wienbeck-Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität e. V. für den Postervortrag im Rahmen des Joint International Meeting Neurogastroenterology and Motility, 06.-09.11.2008, Lucerne, Switzerland

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

ab 01/09:	Assistenzarzt der Medizinischen Klinik I, Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Lübeck
-----------	--

WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

Vorträge

1. F. **Bär**, H. von Koschitzky, U. Roblick, H.-P. Bruch, M. Böttner, T. Wedel: Escherichia coli Nissle 1917 influences human colonic motility- results of an in-vitro organ bath study. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität e.V. vom 23.- 25. März 2007, Schloss Hohenkammer bei Freising
2. M. Böttner, F. **Bär**, H. von Koschitzky, K. Tafazzoli, H.-P. Bruch, U. Roblick, H.J. Krammer, T. Wedel: Altered mRNA expression of neurotransmitter receptors and neurotrophin-3 in patients with diverticular disease- preliminary data. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität e.V. vom 23.- 25. März 2007, Schloss Hohenkammer bei Freising
3. von Koschitzky H, Schrader S, **Bär** F, Roblick UJ, Wessel L, Wedel T: In-vitro study of colonic motility in patients with Hirschsprung's Disease. 20th International Symposium of Paediatric Surgical Research, Berne, Switzerland, 04. – 06.10.2007
4. F. **Bär**, H. von Koschitzky, U. Roblick, H.-P. Bruch, M. Böttner, T. Wedel: Escherichia coli Nissle 1917 influences human colonic motility- results of an in-vitro organ bath study. Yakult-Kolloquium „Probiotika und Darmgesundheit“ vom 29.-30.Mai 2008 in Frankfurt mit Verleihung des Yakult „science for health“-Preises
5. Böttner M, Zorenkov D, **Bär** F, Roblick UJ, Bruch HP, Wedel T: Serotonin receptor 4 mRNA expression is modulated in patients with diverticular disease. Deutsche Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität, Jahrestagung 2009, Hohenkammer, 28.-30.03.2009

Poster

1. von Koschitzky H, Schrader S, Roblick UJ, **Bär** F, Wessel L, Wedel T: In-Vitro Study of Colonic Motility in Patients with Hirschsprung's Disease. European Paediatric Surgeons Congress, Gdansk, 26.- 28.05.2005

2. von Koschitzky H, Schrader S, **Bär** F, Roblick UJ, Wessel L, Wedel T: Elektrophysiologische in-vitro-Untersuchungen der Kolonmuskulatur bei Patienten mit primärer chronischer Obstipation. 9. Chirurgische Forschungstage, Frankfurt a.M., 19. - 21.09.2005
3. von Koschitzky H, Schrader S, **Bär** F, Roblick UJ, Wessel L, Wedel T: In-vitro study of colonic contractility after pharmacological and electrical field stimulation in patients with primary chronic constipation. Joint International Society Meeting in Neurogastroenterology and GI Motility, Boston, Massachusetts, 14 – 17.09.2006
4. F. **Bär**, H. von Koschitzky, U. Roblick, H.P. Bruch, H.J. Krammer, M. Böttner, T. Wedel: Escherichia coli Nissle 1917 beeinflusst die Motilität humaner Colonmuskulatur- Ergebnisse einer Organbaduntersuchung. 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Bochum, 12.-15.09.2007 (abstract erschienen in der Zeitschrift für Gastroenterologie, Thieme Verlag, 45.Jahrgang, August 2007, S. 758)
5. F. **Bär**, H. von Koschitzky, U. Roblick, H.P. Bruch, H.J. Krammer, M. Böttner, T. Wedel: Einfluss des Probiotikum Escherichia coli Nissle 1917 (Mutaflor[®]) auf die in-vitro Motilität humaner Colonmuskulatur. Doktorandentag der Med. Universität Lübeck, Lübeck, 04. Juni 2008
6. F. **Bär**, H. von Koschitzky, U. Roblick, H.-P. Bruch, M. Böttner, T. Wedel: Escherichia coli Nissle 1917 influences human colonic motility- results of an in-vitro organ bath study. Joint International Meeting Neurogastroenterology and Motility, Lucerne, Switzerland, 06.-09.11.2008

Originalarbeiten

1. **Bär** F, von Koschitzky H, Roblick U, Bruch HP, Schulze L, Sonnenborn U, Böttner M, Wedel T: Cell-free supernatants of Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) modulate human colonic motility: evidence from an in-vitro organ bath study. Neurogastroenterol Motil 2009, 11 (Epub ahead of print) (IF=3,4)
2. Boettner M, **Bär** F, von Koschitzky H, Tafazzoli K, Roblick UJ, Bruch HP, Wedel T: Laser microdissection as a new tool to investigate site-specific gene expression in enteric ganglia of the human intestine. Neurogastroenterol Motil (im Review-Verfahren)