

Diplomarbeit

**Der Einfluss der Chemotherapie mit
Cyclophosphamid auf die Darmwandbarriere**

eingereicht von

Theresa Maria Pauer

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Georg Singer

Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Christoph Castellani

Graz, am 19.02.2018

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 19.02.2018

Theresa Maria Pauer eh

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die mich während meiner Diplomarbeit motiviert, unterstützt und begleitet haben.

Ein besonders großer Dank gilt hier meinem Erstbetreuer Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Georg Singer, der mir zu jeder Zeit mit Rat, Lösungsvorschlägen und motivierenden Worten zur Seite stand. Dazu kommt mein Zweitbetreuer und Leiter des Projekts Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Christoph Castellani, ohne den ich wohl noch immer bei meinen Statistik-Auswertungen sitzen würde. Als Dritte im Bunde möchte ich mich noch recht herzlich bei Anna Kuesz bedanken. Anna war von Anfang an eine große Stütze und stand stets mit Rat und Tat zur Seite. Ich fühlte mich immer als Teil des Forschungsteams und schätzte die gute Zusammenarbeit, in der auch der Spaß nicht zu kurz kam.

Weiters möchte ich noch meinem Studienkollegen Gregor Summer danken – wir waren ein eingespieltes Team.

Zum Schluss möchte ich die Möglichkeit nutzen um die Menschen zu nennen, die mich schon lange vor meiner Studienzeit begleitet haben. Ein unendlich großer Dank gilt meiner Familie, die es mir uneingeschränkt möglich gemacht hat meine bisherigen Ziele und Träume zu verfolgen und mich auch in schwereren Zeiten immer unterstützt und bestärkt hat. Ich bin froh euch um mich zu haben und werde es auch immer sein.

Zusammenfassung

Einleitung

Der Einsatz von Chemotherapie ist mittlerweile wesentlicher Bestandteil in der Behandlung von Krebserkrankungen. Die meisten zytotoxischen Substanzen nutzen die rasche Teilungsfähigkeit der Tumorzellen und können dort gezielt eingreifen. Diese Fähigkeit lässt sie auch mit anderen sich rasch teilenden Zellen interagieren, was zu unangenehmen Nebenwirkungen führen kann. Betroffen ist hier u. a. der Gastrointestinaltrakt – insbesondere auf Ebene der Darmwand.

Ziel der Untersuchungen in dieser Diplomarbeit war es, die Auswirkungen der Chemotherapie mit Cyclophosphamid auf die Darmwandbarriere zu untersuchen.

Methodik

Eingeschlossen wurden 20 immundefiziente Mäuse im Alter von 7 Wochen. Diese wurden in 2 Gruppen unterteilt. 10 der Tiere (SH-CTX) erhielten in zwei aufeinanderfolgenden Wochen 2 Gaben Cyclophosphamid mit je 50 mg/kg, die restlichen 10 Tiere (SH) dienten als Kontrollgruppe. Danach wurden Darmabschnitte aus Jejunum, Ileum und Colon entnommen und histologisch (Schweregrad der Infiltration durch Entzündungszellen, Ausmaß dieser Infiltration, Epithelveränderungen, Mukosaveränderungen) sowie elektronenmikroskopisch beurteilt. Zusätzlich wurde die Darmwandpermeabilität mittels der FITC-Dextran Methode sowie die Expression einzelner Darmwandproteine im Ileum (Tight Junction Protein 1, Occludin, Claudin 2, Claudin 4, CD14) mittels PCR gemessen.

Ergebnisse

Während die Chemotherapie in den histologischen Untersuchungen zu keinen entzündlichen Veränderungen der Darmabschnitte führte, zeigten sich elektronenmikroskopisch deutliche Destruktionszeichen (offene Tight Junctions, destruiertes Bürstensaum, Zugrundegehen der Mitochondrien). Sowohl FITC-Dextran im Serum als auch die Expression von Tight Junction Protein 1, Occludin, Claudin 2 und CD14 im Ileum zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede. Der Vergleich der Claudin 4-Expression über beide Gruppen zeigte in der SH-CTX-Gruppe jedoch eine statistisch signifikante Erniedrigung ($p = 0,035$).

Schlussfolgerungen

Die in anderen Studien nachgewiesene Destruktion der Darmwand durch Chemotherapie konnte in unserer Studie nur durch eine Downregulation von Claudin 4, einem Protein der Tight Junctions, nachgewiesen werden. Die Unterschiede zu Resultaten in der Literatur könnten auf differierende Studienabläufe wie zum Beispiel Dosierung und Dauer der Chemotherapie erklärt werden und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Abstract

Introduction

Chemotherapy represents a crucial part in cancer treatment. The majority of the cytotoxic substances use the rapid proliferation of the cancer cells and interrupt this condition. However, this also leads to an interaction with other rapidly separating epithelia implicating adverse effects. This applies especially to the gastrointestinal tract, focussing on the layers of the intestinal gut barrier. The aim of this thesis was to examine the effects of chemotherapy with cyclophosphamide on the intestinal gut barrier.

Methods

In this research 20 immunodeficient mice at the age of seven weeks were included. Those were separated into two groups. 10 of the animals (SH-CTX) received two doses of chemotherapy (50 mg/kg cyclophosphamide each), the other half served as a control group (SH). After euthanasia intestinal segments of jejunum, ileum and colon were extracted and assessed histologically (degree of severity of the infiltration of inflammatory cells, extension of this infiltration, epithelial changes, alterations in the mucosa) and with electronmicroscopy. Additionally, an investigation of the permeability of the intestinal barrier was conducted via FITC-dextrane and protein expression of the intestinal gut barrier (tight junction protein 1, occludin, claudin 2, claudin 4, CD14) was assessed using PCR.

Results

Although the histological investigations did not show any inflammatory alterations in the gut barrier due to chemotherapy, electron-microscopic images showed signs of destruction (open tight junctions, destructive brush border, destruction of mitochondria). Both, FITC-dextrane in serum as well as the expression of tight junction protein 1, occludin, claudin 2, and CD14 in the ileum showed no statistically significant differences. However, claudin 4-expression was significantly reduced in the SH-CTX-group ($p = 0.035$).

Conclusion

In this study, the destruction of the gut barrier due to chemotherapy, which has already been described in other research studies, could only be proven by the downregulation of the tight junction protein claudin 4.

The disparities to previous studies can be based on different study designs, concerning dose or duration of the chemotherapy. Finally, this would require further investigations.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	v
Inhaltsverzeichnis	vii
Glossar und Abkürzungen	ix
Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xii
1 Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Neuroblastom	2
1.2.1 Definition	2
1.2.2 Symptomatik	2
1.2.3 Stadieneinteilung und Risikostratifizierung	3
1.2.4 Therapiemöglichkeiten	5
1.2.5 Prognose	8
1.3 Darmwandbarriere	9
1.3.1 Histologischer Aufbau	9
1.3.2 Zellkontakte	12
2 Ziel der Studie: Wirkung der Chemotherapie mit Cyclophosphamid auf die Darmwandbarriere	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Grundkollektiv	17
3.2 Chemotherapie	17
3.3 Euthanasie und Probenentnahme	18
3.4 Probenaufbereitung und Paraffineinbettung	19
3.5 H.E.-Färbung	19
3.6 Elektronenmikroskopie	20
3.7 FITC-Dextran-Messung	20
3.8 PCR	20
3.9 Statistik	21
4 Ergebnisse	22
4.1 Organgewichte bei Euthanasie	22
4.2 Histologische Beurteilung der Darmwand	22
4.2.1 Jejunum	22
4.2.2 Ileum	24
4.2.3 Colon	26

4.3	Elektronenmikroskopische Beurteilung der Darmwand	27
4.4	FITC	28
4.5	PCR.....	29
4.5.1	Expression des Tight Junction Protein 1.....	29
4.5.2	Expression des Occludin	30
4.5.3	Expression des Claudin 2	31
4.5.4	Expression des Claudin 4	32
4.5.5	Expression von CD14	33
5	Diskussion	34
6	Literaturverzeichnis.....	39

Glossar und Abkürzungen

CD14	Cluster of differentiation (Oberflächenprotein)
COG	Children's Oncology Group
CT	Computertomographie
ct	Threshold cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FITC-Dextran	Fluoreszinoisothiocyanol-Dextran
GMCSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GPOH	Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
H.-E.-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
IDRF	Image-defined risk factors
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INSS	International Neuroblastoma Staging System
IQR	Interquartilenbereich
IVC	Individually ventilated cages
JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül
M.	Musculus
Max	Maximum
Mb.	Morbus
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
MIBG	Metaiodbenzylguanidin
Min	Minimum
µm	Mikrometer
MRT	Magnetresonanztomographie
MYCN	MYCN-Onkogene
NB	Neuroblastomtiere
NB-CTX	Neuroblastomtiere mit Chemotherapie
PCR	Polymerase Chain Reaction
SH	Shamtiere
SH-CTX	Shamtiere mit Chemotherapie
SIOPEN	International Collaboration for Neuroblastoma Research
SPF	Specific pathogen free
VOC	Volatile organic compounds

WAT

White adipose tissue

ZO

Zona occludens

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wandschichten des Verdauungskanals.....	10
Abbildung 2: Überblick Zellkontakte	13
Abbildung 3: Histologische Beurteilung Jejunum.....	23
Abbildung 4: Kryptentiefe Jejunum.....	24
Abbildung 5: Histologische Beurteilung Ileum	25
Abbildung 6: Kryptentiefe Ileum.....	25
Abbildung 7: Histologische Beurteilung Colon.....	26
Abbildung 8: Kryptentiefe Colon	27
Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Epithelzellen in der Darmwand.....	27
Abbildung 10: FITC-Dextran Werte	28
Abbildung 11: Expression von Tight Junction Protein 1	29
Abbildung 12: Expression von Occludin	30
Abbildung 13: Expression von Claudin 2.....	31
Abbildung 14: Expression von Claudin 4.....	32
Abbildung 15: Expression von CD14.....	33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung INSS (5)	3
Tabelle 2: Stadieneinteilung INRG (7).....	4
Tabelle 3: Organgewichte bei Euthanasie	22

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Die vorliegende Diplomarbeit stellt einen Teil des Forschungsprojektes „*Der Einfluss des Neuroblastoms und dessen Chemotherapie auf die Darmwandbarriere, den Metabolismus und die Entzündungsreaktion*“ (Fördergeber MEFOgraz – Vereinigung Forschungsförderung Med Uni Graz und Monika Kutzner Stiftung, Deutschland, PI: Ass. Prof. Priv.-Doz. Dr. Castellani) dar. Ziel der experimentellen Untersuchungen war es, festzustellen, ob das Neuroblastom und dessen Chemotherapie mit Cyclophosphamid zu Alterationen des intestinalen Mikrobioms, der volatilen organischen Substanzen und zu Alterationen der Darmwandbarriere und des Metabolismus führen.

In dieser Diplomarbeit wird hauptsächlich auf die direkten Auswirkungen der Chemotherapie mit Cyclophosphamid auf die Darmwandbarriere eingegangen. Hierzu wurden Darmwandabschnitte aus Jejunum, Ileum und Colon von Nacktmäusen entnommen, histologisch (lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch) untersucht, beurteilt und die gewonnenen Daten anschließend statistisch ausgewertet. Im Ergebnisteil der vorliegenden Diplomarbeit wird nur auf die Sham-Gruppe und die mittels Chemotherapie behandelte Sham-Gruppe eingegangen.

Der theoretische Kern dieser Arbeit befasst sich mit dem Neuroblastom (hier wird vor allem auf die Symptomatik, die Stadieneinteilung und die Therapiemöglichkeiten eingegangen), der Funktion der Darmwandbarriere sowie ihrem histologischen Aufbau.

1.2 Neuroblastom

1.2.1 Definition

Das Neuroblastom ist nach den Tumoren des Zentralnervensystems der zweithäufigste solide Tumor des Kindesalters. Ausgehend von unreifen Zellen des sympathischen Nervensystems entstehen 60% dieser Tumorentitäten im Bereich des abdominellen Grenzstranges, 30% in den Nebennieren und deutlich seltener in den Bereichen Hals, Brustkorb und Becken.

Das mittlere Alter bei Diagnosestellung beträgt rund 19 Monate (1).

1.2.2 Symptomatik

Abhängig von Tumorlokalisation und Ausbreitung der Erkrankung weist das Neuroblastom ein breites Spektrum an klinischen Symptomen auf.

Zur Einteilung werden drei Hauptsymptomkomplexe unterschieden – dabei sind die klinischen Erscheinungen bei lokalisierten Tumoren, die bei bereits bestehenden Metastasen und der spezielle 4S-Typ gemeint.

Lokalisierte Tumoren

- Thorakaler Tumor: Husten, Dyspnoe, Horner-Syndrom (2)
- Paraspinaler Tumor: motorische Lähmungserscheinungen, sensible Ausfälle, Schmerzsyndrome
- Abdomineller Tumor: regionale Schwellung, Harnverhalt bis hin zu Hydronephrose

Etwaige paraneoplastische Syndrome zeigen sich in rezidivierenden Diarrhöen, Gedeihstörungen oder Opsomyoklonus-Erscheinungen (schnelle Augenbewegungen, Ataxien, irreguläre Muskelbewegungen (3)).

Metastasierte Tumoren

Bei Diagnosestellung hat der Tumor etwa in der Hälfte aller Neuroblastom-Erkrankungen schon metastasiert. Hier wird die Ansiedelung in benachbarte Lymphknoten von der in entferntere Körperregionen unterschieden.

Häufig sind die Leber, die Haut, die Knochen und insbesondere das darin liegende Knochenmark, seltener auch das Zentralnervensystem betroffen. Dazu kommt

ungeklärter Weise die Infiltration der knöchernen Augenhöhle mit konsekutiven periorbitalen Einblutungen sowie etwaigem Exophthalmus.

In seltenen Fällen kann eine erhöhte Reninproduktion oder eine Überaktivität an Katecholaminen zu Hypertonie und Flush-Symptomatik führen (4).

4S-Typ

In 5% der Neuroblastom-Fälle handelt es sich um den sogenannten 4S-Typ (S steht für „Special“). Dabei handelt es sich um eine Kombination aus kleinen lokalisierten Tumoren mit Metastasen in Leber, Haut oder Knochenmark.

Prognostisch gilt diese Entität als günstig, da sich beinahe alle Tumoren dieser Gruppe spontan zurückbilden.

Bei Säuglingen unter 2 Monaten erfolgt zumeist eine sehr rasante Infiltration der Leber, die durch Vergrößerung zu einem Druck auf die kranial liegende Lunge und somit zu respiratorischen Problemen führen kann (4).

1.2.3 Stadieneinteilung und Risikostratifizierung

Aktuell erfolgt die Stadieneinteilung anhand der Kriterien des International Neuroblastoma Staging System (INSS). Hier werden das postoperative Resektionsausmaß, das Vorhandensein von Metastasen und die lokale Ausdehnung des Tumors in Bezug auf eine mögliche Mittellinienüberschreitung durch Einschätzung des Chirurgen miteinbezogen.

Stadieneinteilung International Neuroblastoma Staging System	
Stadium 1	Lokalisierter Tumor. Makroskopisch komplette Resektion.
Stadium 2a	Lokalisierter Tumor. Inkomplette Resektion. Kein Lymphknotenbefall.
Stadium 2b	Lokalisierter Tumor. Inkomplette Resektion. Ipsilateraler Lymphknotenbefall.
Stadium 3	Nicht resektabler, die Mittellinie überschreitender Tumor. Kontralateraler Lymphknotenbefall.
Stadium 4	Metastasierung in andere Organe.
Stadium 4S	Tumor im Säuglingsalter mit Metastasierung in Leber, Haut oder Knochenmark. Keine Skelettmetastasen.

Tabelle 1: Stadieneinteilung INSS (5)

Mit dem International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System wurde im Jahr 2008 ein weiteres System zur Stadieneinteilung entwickelt. Die Berücksichtigung klinischer Parameter und Bildgebungsverfahren (Image-defined risk factors = IDRF) ermöglicht eine prätherapeutische Stadieneinteilung (6). Die IDRF beschreiben die Ausbreitung des Tumors anhand bildgebender Verfahren – üblich sind hier Magnetresonanztomographie (MRT), Szintigrafie und/oder Computertomographie (CT). Eine detaillierte Ausführung dieser Faktoren wird in (7) beschrieben.

Stadieneinteilung International Neuroblastoma Risk Group	
Stadium	Beschreibung
L1	Lokalisierter Tumor. Kein IDRF. Begrenzung auf ein Körperkompartiment.
L2	Lokalisierter Tumor. Mindestens ein IDRF.
M	Metastasierender Tumor. Stadium MS ausgenommen.
MS	Metastasierender Tumor bei Säuglingen unter 18 Monaten. Metastasierung ausschließlich in Haut, Leber und/oder Knochenmark.

Tabelle 2: Stadieneinteilung INRG (7)

Um eine optimalere Stadieneinteilung zu gewährleisten, kommen in diesem Einteilungssystem noch weitere Faktoren hinzu. Neben dem Stadienstyp nach INRG und dem Alter des Kindes ermöglichen molekulare Faktoren (histologischer Subtyp, Differenzierungsgrad, MYCN-Amplifikation, Chromosomenanzahl (Ploidie), Veränderungen des Chromosom 11q → „biologisches Profil“) eine prognostische Einschätzung und infolgedessen eine risikoadaptierte Behandlung.

Zur Risikostratifizierung kommen in Österreich, ähnlich den Richtlinien der COG (Children's Oncology Group) in den USA oder denen der Kliniken Deutschlands und in den deutschsprachigen Teilen der Schweiz (GPOH), die Richtlinien der Europäischen Neuroblastomstudien-Gruppe der Internationalen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie (SIOPEN) zur Anwendung (8). Hier erfolgt die Unterteilung in drei Risikogruppen. Diese kombinieren Kriterien der Einteilung des INSS sowie der INRG.

1) Niedriges Risiko

- INSS Stadium 1 und 2
 - Resektabler Tumor
 - Keine MYCN-Amplifikation
 - Günstiges biologisches Profil
- INSS Stadium 4S
 - Keine MYCN-Amplifikation
 - Günstiges biologisches Profil

2) Mittleres Risiko

- INSS Stadium 2A/2B und 3
 - Inkomplett bis nicht resektabler Tumor
 - Keine MYCN-Amplifikation
 - Günstiges biologisches Profil
- INSS Stadium 4S
 - Keine MYCN-Amplifikation
 - Ungünstiges biologisches Profil
- INSS Stadium 4
 - Keine MYCN-Amplifikation

3) Hohes Risiko

- INSS Stadien 2 – 4
 - MYCN-Amplifikation
 - Günstiges und ungünstiges biologisches Profil

Diese Einteilung ist nicht nur als Orientierungshilfe zur Erstellung eines adäquaten Therapiekonzeptes, sondern auch zur Prognosestellung äußerst hilfreich.

1.2.4 Therapiemöglichkeiten

Die vielfältige Ausprägung des Neuroblastoms erfordert multimodale Therapiekonzepte und sollte auf jeden Fall in einem kideronkologischen Zentrum durchgeführt werden. Insofern reichen die Therapieelemente von reinen Verlaufskontrollen („watchful waiting“) über Resektion, Polychemotherapie,

Bestrahlung und dem Einsatz von biotechnologisch hergestellten Medikamenten (Biologika) bis hin zur Stammzelltransplantation.

In Österreich orientiert sich die Erstellung der individuellen Therapiekonzepte an der oben beschriebenen Einteilung der Erkrankung in die drei Risikogruppen – niedriges, mittleres und hohes Risiko.

Die Empfehlungen für die Gruppe mit niedrigem Risiko sind „watchful waiting“ und eine primäre Resektion.

Bei inkomplett beziehungsweise nicht resezierbaren Tumoren, die zu der Gruppe des mittleren Risikos zählen, sollte vor der Tumorresektion mit einer neoadjuvanten Chemotherapie begonnen werden.

In der Hochrisikogruppe wird der Einsatz einer maximalen Therapieintensität empfohlen. Dazu gehören eine hochdosierte Polychemotherapie, die Primärtumorresektion, Bestrahlung, autologe Stammzelltransplantation sowie der Einsatz von Biologika. Als Rezidiv-Prophylaxe erfolgt anschließend eine Erhaltungstherapie sowie Bestrahlung (8,9).

1.2.4.1 Chirurgische Therapiemöglichkeiten

Zur optimalen Operationsplanung sind die von der INRG definierten Image defined risk factors (IDRF) eine gute Orientierungshilfe. Diese ermöglichen eine bestmögliche Resektion des Tumors. Ziel der chirurgischen Therapie ist die komplette Resektion, die in vielen Fällen allerdings nicht möglich ist.

Ob der Tumor vollständig oder nur partiell entfernt werden kann, hängt vom Tumorstadium ab. Manchmal ist lediglich eine Biopsie möglich, die für die weitere Therapieplanung jedoch durchaus sinnvoll ist.

1.2.4.2 Konservative Therapiemöglichkeiten

Chemotherapie

Eine Hauptsäule der konservativen Therapie ist die Chemotherapie. Stadiumsabhängig erfolgt diese als neoadjuvante oder als adjuvante Therapie.

In verschiedenen Kombinationen werden die Zytostatika Cisplatin, Carboplatin, Etoposid, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Vincristin, Vindesin und Dacarbacin eingesetzt. Bei der in der Hochrisiko-Gruppe gegebenen Hochdosis-Therapie kommen weitere Zytostatika wie Mephalan (im europäischen Raum additiv Busulphan) in Kombination mit Carboplatin und Etoposid zum Einsatz.

Als Erhaltungstherapie zur Rezidivprophylaxe nach initialer Akuttherapie wird die orale Gabe von Cyclophosphamid und Cis-Retinsäure empfohlen (1,4,8).

In dieser Diplomarbeit wird auf die Auswirkungen und Folgen der Chemotherapie mit Cyclophosphamid auf die Darmwandbarriere näher eingegangen. Aus diesem Grund folgt eine ausführlichere Beschreibung dieses Medikaments.

Cyclophosphamid

Cyclophosphamid wird seit dem Jahr 1958 als Tumorthapeutikum eingesetzt und zählt auch heute noch zu den wesentlichsten Medikamenten in der Gruppe der alkylierenden Zytostatika. Aufgrund der zytotoxischen und immunsuppressiven Wirkungen kommt es nicht nur bei zahlreichen Malignomen (Mamma-, Ovarial-, Bronchialkarzinom, Neuroblastom, Knochentumoren, maligne Lymphome), sondern auch bei schwer verlaufenden Autoimmunerkrankungen (z.B. Kollagenosen) und im Rahmen der Konditionierung vor Knochenmarkstransplantationen zum Einsatz.

Nach der Verabreichung, die entweder oral oder intravenös erfolgen kann, kommt es zu einer CYP450-induzierten Aktivierung von Cyclophosphamid in der Leber. Die aktive Form des Moleküls (alkylierende Metaboliten) führt zu Brüchen und Veränderungen in den DNA-Strängen und infolgedessen zu der gewollten zytotoxischen Wirkung – der Apoptose der Tumorzellen.

Die immunsuppressive Wirkung dieses Medikaments erklärt sich durch die hohe Empfindlichkeit der Lymphozyten gegenüber Cyclophosphamid. Die Zellreihen der T- und B-Lymphozyten sind hierbei fast gleichermaßen betroffen.

Als wichtigste unerwünschte Wirkung wird die Knochenmarkdepression beobachtet, bei der es zur Verminderung aller Zellreihen des Blutes (Panzytopenie) kommt. Häufiger sind jedoch Symptome wie reversibler Haarausfall, Gastroenteritiden und die Stomatitis zu beobachten. Des Weiteren kann es zu hämorrhagischen Zystitiden und Hämaturie kommen, die jedoch durch die zusätzliche Gabe von Mesna (2-Mercaptoethansulfonat-Natrium) gut zu therapieren sind.

In hohen Dosen wirkt Cyclophosphamid kardiotoxisch. Gefürchtet ist hier die fulminante Herzinsuffizienz, welche mit hämorrhagischen Myokardnekrosen einhergeht.

Seltene Nebenwirkungen im Rahmen der Hochdosistherapien sind interstitielle Pneumonien, pulmonale Fibrosen oder Enzephalopathien (10,11).

Strahlentherapie

Generell gelten Neuroblastome als strahlensensible Tumoren. Dennoch muss – gerade im Kindesalter – unbedingt an eine Nutzen-Risiko-Abwägung gedacht werden. Aus diesem Grund ist im Therapiekonzept der SIOOPEN-Gruppe die lokale Bestrahlung in den Stadien ohne MYCN-Amplifikation (INSS Stadien 1-3 und L1-L2) nicht vorgesehen. Im INSS Stadium 3 mit MYCN-Amplifikation sowie dem Stadium 4 sollte jedoch nach initialer Therapie immer bestrahlt werden.

Auch bei akuten Symptomen (z.B. bei der Rückenmarkskompression oder bei massiver Leberinfiltration) und als palliative Maßnahme zur Schmerzreduktion wird eine externe Bestrahlungstherapie durchgeführt.

Des Weiteren zeigt auch eine Metaiodbenzylguanidin-Szintigrafie (MIBG-Szintigrafie) in Kombination mit den Beta-Strahlern ¹²³Jod oder ¹³¹Jod in der Gruppe der Hochrisiko-Neuroblastome und in der Therapie von Rezidivtumoren gute Therapieergebnisse (12).

Biologika

Im Vergleich zu anderen neuronalen Zellen konnte an der Oberfläche der Tumorzellen des Neuroblastoms eine erhöhte Dichte an Gangliosidmolekülen GD2 gefunden werden. Diese sind Angriffspunkte der Therapie mit gentechnisch hergestellten Anti-GD2-Antikörpern, die zu einer gezielten Tumorlyse führen. In einer randomisierten Studie konnte gezeigt werden, dass mittels der Kombination dieser Antikörper mit zwei weiteren Substanzen, nämlich GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) und Interleukin 2, signifikante Verbesserungen der Heilungsraten erzielt werden können (13).

Stammzelltransplantation

Die Transplantation autologer Stammzellen stellt die ultimo ratio in der Therapie aggressiver Neuroblastome dar. Hinsichtlich der Rezidivprophylaxe werden damit gute Ergebnisse erzielt. Inwiefern sich diese Therapie jedoch insgesamt auf die Überlebensrate auswirkt, ist noch nicht gut evaluiert (14).

1.2.5 Prognose

Aufgrund der Entwicklung von zahlreichen auf die verschiedenen Erkrankungsstadien abgestimmten multimodalen Therapieformen konnte die

insgesamte 5-Jahres-Überlebensrate der Kinder in den letzten Jahren auf 75% angehoben werden.

Diese ist jedoch je nach Ausprägung der Erkrankung sehr stark vom jeweiligen Tumorstadium abhängig. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate in der Gruppe mit niedrigem Risiko bei 95%, in der Gruppe mit mittlerem Risiko bei 86% und in der Hochrisiko-Gruppe nur noch bei maximal 50%.

Bei Kindern im Stadium 4 liegen die Heilungschancen im Bereich von 40-45%, bei Hinzukommen von einer MYCN-Amplifikation fällt diese in den Bereich von unter 40% (8,15).

1.3 Darmwandbarriere

Täglich passieren tausende von Mikroorganismen und Nahrungsmittelbestandteilen unseren Verdauungstrakt. Parallel dazu laufen komplexe Vorgänge wie die Aufnahme von Nahrungsbestandteilen, die Abwehr von pathogenen Organismen, die Interaktion zwischen der Darmflora und dem intestinalen Immunsystem und unzählige andere ab (16). Um diese Aufgaben zu erfüllen, ist ein multifunktionelles System unentbehrlich. Dafür ist unsere menschliche Darmwand mit ihrem mehrschichtigen Aufbau bestens gerüstet.

1.3.1 Histologischer Aufbau

Die Beurteilung des histologischen Aufbaus der Darmwandbarriere stellt einen Hauptteil dieser Arbeit dar. Nach einer kurzen Beschreibung des allgemeinen Wandaufbaus des Verdauungstraktes wird in den folgenden Kapiteln auf die Histologie der einzelnen Darmabschnitte (Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon) genauer eingegangen.

Der Verdauungskanal (von Ösophagus bis Rektum) zeigt generell einen gleichartigen Wandaufbau. Vom Darmlumen ausgehend gliedern sich die Schichten von innen nach außen grob in Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis und der darüber liegenden Tunica adventitia (Abbildung 1) (17).

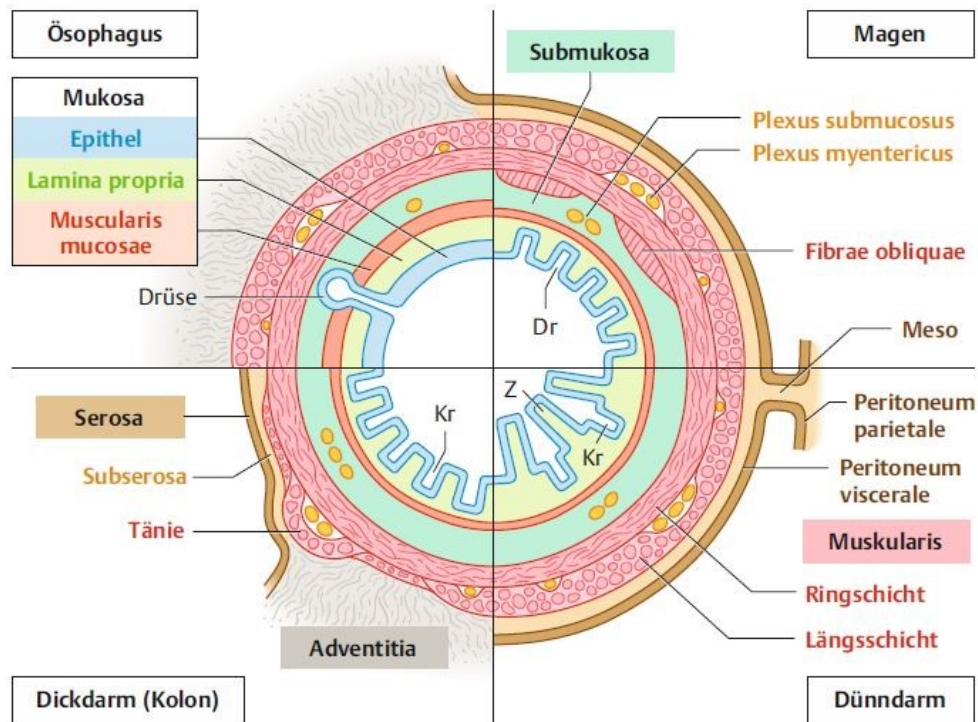


Abbildung 1: Wandschichten des Verdauungskanal (Querschnitt). Dr, Drüse. Kr, Krypte. Z, Zotte.
(übernommen aus (18))

Tunica mucosa

Die dem Darmlumen zugewandte Tunica mucosa lässt sich in drei Schichten unterteilen – in die Lamina epithelialis mucosae, die Lamina propria mucosae und die Lamina muscularis mucosae. Das Oberflächenepithel zeigt regionale Unterschiede. Das unverhornte mehrschichtige Plattenepithel im Ösophagus geht ab dem Magen in eine einschichtig hochprismatische Epithelschicht über.

An das Epithel schließt die Lamina propria mucosae an. Zwischen lockerem Bindegewebe sowie kleineren Blut- und Lymphgefäßen findet man hier zahlreiche freie Zellen – davon vor allem Lymphozyten. Abhängig vom jeweiligen Darmabschnitt sind hier außerdem Lymphfollikel und Drüsen zu finden.

Den Abschluss der Tunica mucosa bildet eine Schicht längsorientierter glatter Muskelzellen, die Lamina muscularis mucosae (17).

Tela submucosa

Kennzeichnend für diesen Abschnitt ist das lockere Bindegewebe, in dem mehrere Fettzellen eingebettet sind. Dazu kommen größere Lymph- und Blutgefäße, der Meißner-Plexus (vegetativer Nervenplexus) und gehäuft Drüsen und Lymphfollikel (17).

Tunica muscularis

Für die Durchmischung des Speisebreies und die Weiterbeförderung durch den Darmkanal ist die Tunica muscularis zuständig. Mit Ausnahme von einzelnen Stellen im Ösophagus besteht diese Schicht aus glatter Muskulatur. Diese lässt sich in das Stratum circulare (Ringmuskelschicht) innen und das Stratum longitudinale (Längsmuskelschicht) außen unterteilen. In der dazwischenliegenden schmalen Bindegewebsschicht befindet sich ein weiterer vegetativer Nervenplexus – der sogenannte Auerbach-Plexus.

Angrenzend an diese Muskelschichten schließt je nach topografischer Lage im Verdauungskanal entweder die Tunica serosa (Peritonealüberzug) oder die Tunica adventitia an (17,18).

1.3.1.1 Dünndarm

Mit einer Länge von 3-5 Metern ist der Dünndarm der längste Abschnitt des Darmrohres. Untergliedert wird er in drei große Abschnitte – das kraniale Teilstück ist das Duodenum, nach kaudal gefolgt von Jejunum und Ileum.

Zahlreiche Faltungen, Zotten, Krypten sowie Mikrovilli an der Oberfläche der Enterozyten sorgen für eine enorme Vergrößerung der Darmschleimhautfläche.

Bis zur Mitte des Jejunums ragen die sogenannten Plicae circulares (Kerckring-Falten) in das Darmlumen. Diese ringförmigen, quer zur Längsachse stehenden Ausstülpungen werden von den obersten zwei Schichten der Darmwand – der Tunica mucosa und der Tela submucosa – gebildet. Ab der Mitte des Jejunums werden diese deutlich niedriger und am Ende des Ileums fehlen sie meist komplett. Auch die Tunica mucosa selbst zeigt fingerförmige Ausstülpungen, die sogenannten Zotten (Villi intestinales). Beteiligte Schichten sind hier die Lamina epithelialis und die Lamina propria der Tunica mucosa. Die in der Lamina epithelialis sitzenden Enterozyten tragen dichtstehende feine Mikrovilli, die in ihrer Gesamtheit den sogenannten Bürstensaum bilden. Zwischen diesen Saumzellen liegen eingestreut Becherzellen sowie enteroendokrine Zellen. Um eine adäquate Schleimproduktion zu gewährleisten, nimmt die Dichte an Becherzellen analwärts deutlich zu. Innerhalb der Zotten liegen Arteriolen, jeweils ein feines Lymphgefäß und glatte Muskelzellen („Zottenpumpe“).

Einsenkungen zwischen diesen Ausstülpungen werden als Krypten (auch Lieberkühn-Krypten) bezeichnet. Gebildet werden sie durch Einstülpungen der

Lamina epithelialis in die darunterliegende Lamina propria. Diese Region ist für die Regeneration des Darmepithels zuständig. Hier findet man Ansammlungen von undifferenzierten Stammzellen. Dazwischen, vor allem am Grund der Krypten, sind Paneth-Körnerzellen zu finden. Dabei handelt es sich um exokrine Drüsenzellen mit zahlreichen azidophilen Granula in ihrem Zellplasma.

Eine Besonderheit im Bereich des Ileums sind neben der hohen Dichte an Becherzellen die Peyer-Plaques – physiologisch angelegte Lymphfollikel, die bis in die Tela submucosa reichen können (17,18).

1.3.1.2 Dickdarm

Der Dickdarm gliedert sich in zwei Abschnitte – das Caecum mit der Appendix vermiformis und das längere Colon.

Dieser Darmabschnitt ist besonders reich an Krypten, die analwärts an Dichte und Tiefe zunehmen. Plicae circulares und Zotten fehlen hier vollständig.

Das Oberflächenepithel im Colon ist reich an Becherzellen. Dazwischen sind wie im Dünndarm Saumzellen sowie undifferenzierte Stammzellen zu finden.

Die darunterliegende Tela submucosa ist hier im Vergleich zum Dünndarm wesentlich breiter angelegt. Grund dafür sind die vermehrte Einlagerung von Fettzellen sowie das Vorhandensein von Lymphfollikeln.

Wie in den zuvor beschriebenen Darmabschnitten besteht auch die Tunica muscularis des Colons aus einer Rings- und einer Längsmuskelschicht. Die Längsmuskelschicht ist hier durch drei bandartige Strukturen (Taenien) verdickt.

Als äußerste Schicht überzieht je nach topografischer Lage entweder die Tunica adventitia (retroperitoneale Anteile) oder die Tunica serosa mit der ihr unterlagerten fettzellreichen Tela subserosa (intraperitoneale Anteile) die Abschnitte des Colons (17).

1.3.2 Zellkontakte

Für die Adhäsion zwischen den im Kapitel 1.3.1 näher beschriebenen Epithelzellen sorgen sogenannte Zellkontakte. Dazu zählen auf molekularer Ebene drei Zellkontakttypen – die Desmosomen, die Adherens Junctions und die apikal gelegenen Tight Junctions. Während die beiden erstgenannten hauptsächlich den mechanischen Kontakt zwischen den Epithelzellen herstellen, regulieren die Tight Junctions zusätzlich den essentiellen parazellulären Transport (19).

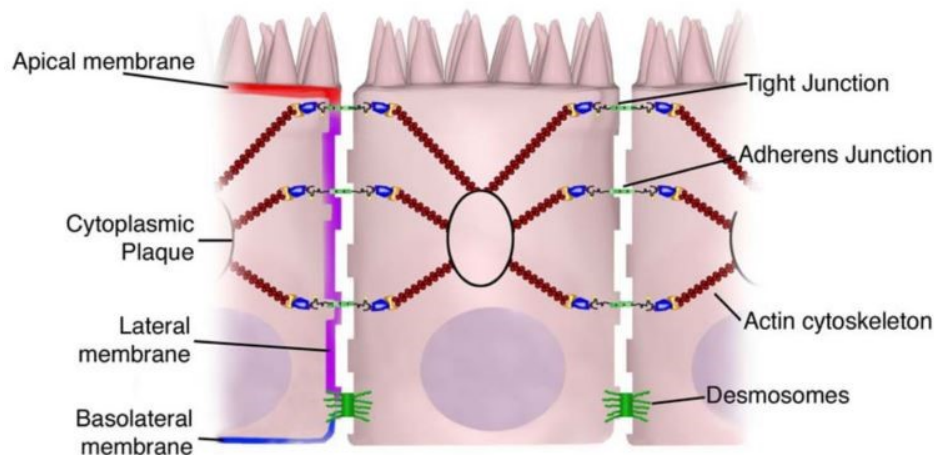


Abbildung 2: Überblick Zellkontakte (übernommen aus (19))

Da in dem dieser Diplomarbeit zugrundeliegenden Forschungsprojekt zur Evaluierung der Darmwandpermeabilität vor allem Bestandteile der Tight Junctions von Bedeutung sind, folgt eine nähere Beschreibung dieser Zellkontakte und der in der PCR-Untersuchung bestimmten Proteinsubtypen.

Tight Junctions

Diese gürtelförmig um die Epithelzellen angeordneten Proteinkomplexe gewährleisten eine selektive semipermeable Barriere in der dem Darmlumen zugewandten Darmschleimhaut und sind somit für den interzellulären Stofftransport unabhkmmlich. Sie sind dafür mit intrazellulär als auch extrazellulär liegenden Anteilen bestens ausgestattet.

Die zwischen den Zellen gelegenen Anteile (extrazellulär) können grob in vier Proteinuntergruppen unterteilt werden - die Transmembranproteine Occludin und Claudin, die junctionalen Adhäsionsmolekülen (JAMs) sowie das Tricellulin (19). Bei den im Zellinneren gelegenen Anteilen kommen noch weitere Proteintypen hinzu. Hier finden Interaktionen mit dem Zytoskelett der Epithelzellen statt. Von diesen Proteinen ist für dieses Forschungsprojekt das Tight Junction Protein 1 (lat. Zonula occludens) von Bedeutung (19,20).

Claudine

Claudine sind weitere wesentliche Bestandteile der Tight Junctions. Bis heute sind in dieser Proteingruppe 24 Subtypen bekannt, welche Molekulargewichte von 20-27 kDa aufweisen (21). Zwei der vier Transmembrananteile ragen als extrazelluläre Schleifen in die Zwischenzellräume. Diese bilden semipermeable Ionenkanäle, die

für den selektiven Ionentransport zwischen den Zellen zuständig sind. Des Weiteren sind sie in der Lage, sowohl homophile (mit demselben Proteintyp) als auch heterophile (mit anderen Proteintypen) Bindungen einzugehen. Diese Fähigkeit lässt sie mit unterschiedlichen intrazellulären Gerüstproteinen interagieren (19).

In der PCR-Untersuchung, auf die in den folgenden Unterkapiteln näher eingegangen wird, wurden Claudin 2 und Claudin 4 isoliert bestimmt.

Das Claudin 2 ist der am meisten erforschte Subtyp der Familie der Claudine und kommt im Tubulussystem der Nieren, aber vor allem auch in den Tight Junctions der Darmschleimhaut vor. Neben seiner Barrierefunktion bildet Claudin 2 einen Ionenkanal, der kleine Kationen und Wasser passieren lässt. Bei Läsionen in Epithelgeweben kommt es zu einer Überexpression dieser Proteine. Anschaulich darzustellen ist dies bei entzündlichen Darmerkrankungen wie zum Beispiel Morbus Crohn und bei Colitis ulcerosa, kann aber auch bei Zöliakie und anderen Infektionen des Gastrointestinaltraktes beobachtet werden (20,22,23).

Auch Claudin 4 kommt in Teilen der Niere vor, man findet es aber auch im Alveolarsystem der Lunge und im Colon. Hauptaufgabe dieses Claudins ist die Barriere- bzw. „Zaunfunktion“. Im Gegensatz zum Claudin 2 verhindert es den parazellulären Stofftransport und verringert die Membranpermeabilität. Bei Entzündungsvorgängen kommt es zu einer deutlichen Verminderung der Claudin 4-Expression (20).

Occludin

Dieses integrale Membranprotein wurde erstmals im Jahr 1993 von der Arbeitsgruppe um Mikio Furuse und Shoichiro Tsukita (24) beschrieben.

Wie auch bei den Claudinen weist die Molekülstruktur des Occludins vier Untereinheiten auf. Zwei dieser Anteile kommen transmembranal, die zwei übrigen als Schleifen im Extrazellulärraum zu liegen. Die molekulare Masse beträgt rund 65 kDa.

Exprimiert wird Occludin hauptsächlich in Epithel- und Endothelzellen, jedoch konnte es auch in Astrozyten, neuronalen und dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Neben der Funktion als Adhäsionsmolekül spielt dieses Protein außerdem beim parazellulären Ionentransport eine essentielle Rolle. Intrazellulär finden Interaktionen mit Gerüstproteinen des Zytoskeletts – hier vor allem mit den Tight Junction Proteinen ZO-1 und ZO-2 – statt (25,26).

Alterationen im Strukturaufbau des Moleküls führen zu einer deutlichen Steigerung der Permeabilität und somit wiederum zu einem Verlust der Barrierefunktion (27).

Tight Junction Protein 1

Tight Junction Protein 1 (auch Zonula occludens 1 (ZO-1) genannt) ist ein Polypeptid mit einer Molekularmasse von ungefähr 225 kDa.

Wie die beiden zuvor beschriebenen Proteine nimmt auch das Tight Junction Protein 1 eine wesentliche Rolle in der Verlinkung der Tight Junctions mit den Gerüstproteinen im Zellinneren (hier vor allem mit den Aktinfilamenten) ein (28).

2 Ziel der Studie: Wirkung der Chemotherapie mit Cyclophosphamid auf die Darmwandbarriere

Bis heute ist noch nicht genau untersucht, ob und über welche Mechanismen die Chemotherapie mit Cyclophosphamid die Darmwandbarriere beeinflusst.

Unsere Studie widmete sich genau dieser Fragestellung.

Folgende Hypothesen wurden formuliert:

Nullhypothese: Die Chemotherapie mit Cyclophosphamid führt nicht zu Alterationen der Darmwandbarriere oder zu einer Permeabilitätssteigerung.

Alternativhypothese: Die Chemotherapie mit Cyclophosphamid führt zu Alterationen der Darmwandbarriere sowie zu einer deutlichen Permeabilitätssteigerung.

3 Material und Methoden

Die vorliegende Diplomarbeit stellt einen Teilbereich des Forschungsprojektes „Der Einfluss des Neuroblastoms und dessen Chemotherapie auf die Darmwandbarriere, den Metabolismus und die Entzündungsreaktion“ dar. Im Rahmen dieses Projekts entsteht neben der vorliegenden Diplomarbeit eine weitere. Mein Studienkollege Gregor Alfons Summer beschäftigt sich mit den Auswirkungen des Tumors auf die Darmwandbarriere und etwaige Alterationen diesbezüglich. Dementsprechend wird es im theoretischen Teil und vor allem auch im Teilbereich der Methodik zu etwaigen Überschneidungen oder Gleichwertigkeiten kommen.

In den folgenden Unterkapiteln werden die für diese Diplomarbeit relevanten Arbeitsschritte beschrieben. Die vollständige Beschreibung aller im Forschungsprojekt enthaltenen Arbeitsschritte kann im Antrag dieses Projekts nachgelesen werden.

Die zugrundeliegenden Tierversuche wurden unter der Geschäftszahl BMWFW66.010/0156-WF/V/3b/2016 vom zuständigen Ministerium genehmigt.

3.1 Grundkollektiv

Eingeschlossen wurden 40 männliche immundefiziente Mäuse (Hsd:Fox1nu, Envigo Laboratories, San Pietro al Natisone, Italien) im Alter von 7 Wochen. Diese wurden in 4 Gruppen zu je 10 Tieren unterteilt. Für die Haltung der Tiere wurden von der Medizinischen Universität Graz im Institut für Biomedizinische Forschung SPF Räume (specific pathogen free) und IVC Käfige (individually ventilated cages) zur Verfügung gestellt. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Wasser sowie – bis auf den kurzfristigen Entzug vor Inkretinmessungen – zu Nahrung.

Die Gruppeneinteilung erfolgt in die folgenden 4 Gruppen – Shamtiere (SH), Shamtiere mit Chemotherapie (SH-CTX), Neuroblastomtiere (NB) und Neuroblastomtiere mit Chemotherapie (NB-CTX).

In dieser Diplomarbeit wird auf die beiden Sham-Gruppen (SH und SH-CTX) näher eingegangen.

3.2 Chemotherapie

Für die Chemotherapie wurden von der Krankenhausapotheke Lösungen mit 10mg/ml Cyclophosphamid zu Verfügung gestellt. Den Tieren der

Chemotherapiegruppe (SH-CTX) wurden in der 8. und 9. Woche nach Injektion von Kulturmedium intraperitoneal 2 Lösungen mit je 50 mg/kg Cyclophosphamid verabreicht.

3.3 Euthanasie und Probenentnahme

16 Stunden vor der Euthanasie wurde den Mäusen in einer Pufferlösung gelöstes Fluoreszinoisothiocyanol-Dextran (FITC-Dextran[®], Sigma-Aldrich Handels GmbH, Wien, Österreich) in einer Dosierung von 500 mg/kg verabreicht. Parallel dazu wurden 2 Stuhlproben entnommen. Eine davon wurde für die Mikrobiom-Analyse bei -21°C in einem Eppendorfgefäß aufbewahrt, die andere in einem licht- und luftdichten Gefäß bei 6°C für die VOC (volatile organic compounds)-Analyse vorbereitet.

Die Narkose vor der Euthanasie erfolgte intraperitoneal mittels 0.05 mg/kg Fentanyl (Fentanyl-Janssen[®], Janssen Pharmaceutical N.V., Beerse, Belgien), 5 mg/kg Midazolam (Midazolam Erwo[®], Erwo Pharma GmbH, Brunn/Gebirge, Österreich) und 0.5 mg/kg Medetomidin (Domitor[®], Orion Pharma GmbH, Wien, Österreich). Unter Narkose wurde eine Laparotomie durchgeführt. Zur Blutabnahme erfolgte zunächst die Punktion des Herzens. Die Blutproben wurden in standardisierte Serum-Röhrchen gefüllt und nach 30 Minuten mit 10.000 Umdrehungen pro Minute insgesamt 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen und für weitere Untersuchungen vorbereitet.

Als nächster Schritt erfolgte die Entnahme der Organe Leber, Milz, Lunge sowie beider Nieren. Zusätzlich wurden je 3 cm der Darmabschnitte Jejunum (2 cm distal des gastroduodenalen Übergangs), Ileum (1 cm oral der Ileocoecalklappe) und Colon (1 cm distal der Ileocoecalklappe) sowie das gonadale, perirenale, viszerale und inguinale weiße Fettgewebe und die Muskeln M. soleus und M. gastrocnemius herauspräpariert und entnommen. Die Organe, die Anteile des Fettgewebes sowie die zwei Muskeln wurden abgewogen. Zur Normierung der entnommenen Organe, der Fettgewebsanteile und der entnommenen Muskeln in Bezug auf die Tibialänge wurde zum Schluss die rechte Tibia herauspräpariert und in einer Salzlösung konserviert.

3.4 Probenaufbereitung und Paraffineinbettung

Nach Entnahme der Darmabschnitte aus Jejunum, Ileum und Colon wurden diese in einer gepufferten 4% Formaldehydlösung nach Lillie für mindestens 24h fixiert. Danach wurden die Proben in einem Histokinet (Tissue-Tek VIP, Sakura) in Paraffin eingebettet und anschließend zu Paraffinblöcken gegossen (Tissue-Tek TEC, Sakura). Nach Abkühlung bei -15°C wurden die in Paraffin eingebetteten Darmabschnitte mit dem Rotationsmikrotom (Microm HM 355 S) in 2,5µm dicke Schichten geschnitten, auf Objektträger aufgebracht, eingedeckelt und durch Trocknung bei 40°C für die anschließende H.E.-Färbung vorbereitet.

3.5 H.E.-Färbung

Die H.E.-Färbung erfolgte maschinell in dem Färbeautomaten Tissue-Tek DRS2000 von Sakura. In 21 Arbeitsschritten wurden die Proben über Alkoholreihen, verschiedene Färbungsschritte (Hämalaun und Eosin) und Waschvorgänge gefärbt. Der genaue Ablauf der Arbeitsschritte kann in den Vorgaben der standardisierten H.E.-Färbung oder in der Anleitung des Geräteherstellers nachgelesen werden.

Nach der Färbung wurden die Schnitte lichtmikroskopisch beurteilt (Mikroskop Olympus BX51) und in drei verschiedenen Vergrößerungen (x40, x100, x200) abfotografiert (Kamera Olympus DP71).

Die Beurteilung der gefärbten Proben erfolgte anhand der von Erben et al. erstellten Kriterien zur histomorphologischen Beurteilung entzündeter Darmwandsegmente im Mausmodell (29).

In Jejunum und Ileum wurden die Kriterien Epithelveränderungen (Hyperplasie der Epithelzellen), Schweregrad (prozentualer Anteil der entzündlichen Infiltration in der Mukosa), Ausdehnung (Infiltration in Bezug auf die Schichttiefe) und Mukosaveränderungen (Verhältnis der Zottenlängen zur Kryptentiefe) beurteilt.

Zur Beurteilung der Colonabschnitte wurde vor allem auf Mukosaveränderungen – Ulzerationen und Pseudopolypen – geachtet. Bezüglich der Epithelveränderungen werden etwaige Becherzellverluste untersucht.

Zusätzlich wurden in allen drei Darmsegmenten die Kryptentiefen abgemessen.

3.6 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Proben in einem Natrium-Phosphat-Puffer mit 2% Paraformaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Nach zwei Spülvorgängen und einer Kontrastverstärkung mittels 2% OsO₄-Pufferlösung erfolgte für insgesamt zweieinhalb Stunden die Dehydratation mittels aufsteigender Alkoholreihe. Als Vorbereitung für den Schneidevorgang erfolgte eine Einbettung in Schnittblöcke. Zur Beurteilung und Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder wurde das Elektronenmikroskop Zeiss 900 (Institut für Histologie, Medizinische Universität Graz) verwendet.

3.7 FITC-Dextran-Messung

Die FITC-Dextran-Bestimmung erfolgte mittels Photometrie bei 485 und 535 nm. Zur Standardisierung der erfassten Werte wurden die vorgegebenen Normwerte des Herstellers zugezogen.

3.8 PCR

Für die PCR-Untersuchung wurden die eingefrorenen Ileumabschnitte verwendet. Zur Evaluierung der Darmpermeabilität wurden – den Empfehlungen der Forschungsgruppe Buchheister et al. zufolge (30) – einige Marker (Tight junction Protein 1, Occludin, Claudin 4, Claudin 2, CD14) festgelegt.

Die Isolierung der RNA aus den Ileumsegmenten erfolgte mittels Qiagen miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durch ein spezielles DNase Verfahren (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dies lief nach Anleitung des Herstellers ab.

Die Quantifizierung des RNA-Anteils wurde mit einem NanoDrop 2000c Spektrophotometer durchgeführt. Für die Transkription wurde 1 µg der RNA isoliert und nach Anleitung des Herstellers dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific) zugeführt. Die entstandene cDNA diente als Vorlage für die quantitative RT-PCR Reaktion in einem BioRad CFX 384 Echtzeit PCR System. Bestimmt werden β -Actin (Actb; Mm00607939_s1), Hydroxymethylbilan (Hmbs; Mm01143545_m1), Tight junction Protein-1 (Tjp1; Mm00493699_m1), Occludin-1 (Ocln1; Mm00500912_m1), CD14 (Mm00438094_g1), Claudin 4 (Cldn4; Mm00515514_s1) und Claudin 2 (Cldn2; Mm00516703_s1) (ThermoFisher Scientific). Kurz zusammengefasst ergab die PCR Reaktion in 10 µl Reagenz die

Verdreifachung von 4 μ l cDNA mit 5 μ l TaqMan Genexpression MasterMix (ThermoFisher Scientific), 0,5 μ l Probe und 0,5 μ l Aqua dest. Im PCR-Zyklus erfolgte initial eine zweiminütige UDG-Inkubation (Uracil-DNA Glycosylase) bei einer Temperatur von 50°C. Anschließend fand bei 95°C für 10 Sekunden die Enzymaktivierung statt. Zur Denaturierung erfolgten 40 Zyklen bei 95°C zu je 15 Sekunden. Die abschließende Abkühlung wurde für 1 Minute lang bei 60°C durchgeführt. Als Referenz-Gene für die Normierung wurden β -Actin und Hmbs verwendet.

3.9 Statistik

Die Daten wurden mittels Microsoft Excel 2016[®] gesammelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 22.0[®]. Nominale Daten werden als Anzahl und Prozent dargestellt, ordinale und metrische Daten als Median und Interquartilenbereich (IQR). Zur graphischen Darstellung werden Balkendiagramme und Boxplots verwendet. Zum Gruppenvergleich wird ein nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney-U-Test) herangezogen, da aufgrund der geringen Gruppengröße nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann. P-Werte < 0,05 werden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Organgewichte bei Euthanasie

Die Organgewichte von Leber, Milz, Nieren und Lunge zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen SH (n = 10) und SH-CTX (n = 10). Gleichermäßen führte die Chemotherapie zu keiner signifikanten Reduktion der Fettgewebsanteile WAT inguinal, WAT gonadal, WAT perirenal, WAT viszeral und WAT total und der Muskeln M. soleus und M. gastrocnemius ($p > 0,05$).

Tabelle 3 zeigt eine detaillierte Darstellung der Mediane, der Interquartilbereiche (IQR) und der entsprechenden p-Werte beider untersuchter Gruppen.

ORGANE	SHAM		SHAM-CTX		p-Werte
	Median	IQR	Median	IQR	
Leber	0,10600	0,00810	0,11370	0,01840	0,481
Milz	0,00765	0,00150	0,00685	0,00260	0,393
Nieren	0,03330	0,00150	0,03395	0,00660	0,851
Lunge	0,01090	0,00260	0,01090	0,00170	0,912
WAT inguinal	0,00750	0,00750	0,00625	0,00350	0,247
WAT gonadal	0,01450	0,00900	0,01575	0,00580	0,684
WAT perirenal	0,00495	0,00300	0,00480	0,00220	0,481
WAT viszeral	0,01195	0,00930	0,01500	0,01250	0,912
WAT total	0,04300	0,01860	0,03980	0,02220	0,971
M. sol. + M. gastr.	0,01120	0,00160	0,01015	0,00310	0,436

Tabelle 3: Organgewichte (normiert auf Tibialänge in g/mm) bei Euthanasie; **WAT** white adipose tissue, **M** Musculus

4.2 Histologische Beurteilung der Darmwand

4.2.1 Jejunum

In Abbildung 3 sind die Mediane der in der histologischen Beurteilung erfassten Scores im Darmabschnitt Jejunum dargestellt. Der Median unter dem Kriterium Schweregrad (Infiltration) betrug sowohl in der SH-Gruppe als auch in der SH-CTX-Gruppe den Wert 1,0. In Bezug auf das Ausmaß (Infiltration bezogen auf die Schichtentiefe) lag der Median mit 1,5 in der Gruppe der SH-Tiere höher als der in der Gruppe der SH-CTX-Tiere – hier betrug dieser 1,0. Die Mediane der Kriterien Epithelveränderungen (Hyperplasie der Epithelzellen) und der

Mukosaveränderungen (Verhältnis Zottenlängen zu Kryptentiefen) ergaben in beiden Fällen einen Wert von 0 und sind daher in Abbildung 3 nicht dargestellt. Der Vergleich der Gesamtscores (Summe der Scores aller Kriterien) zeigte in der SH-Gruppe mit dem Median von 2,0 einen höherliegenden Wert als in der SH-CTX-Gruppe (Median = 1,5). Die mittels Mann-Whitney-U-Test errechneten p-Werte der Kriterien Schweregrad, Ausmaß, Epithelveränderungen, Mukosaveränderungen und dem Gesamtscore im Jejunum waren allesamt größer als 0,05.

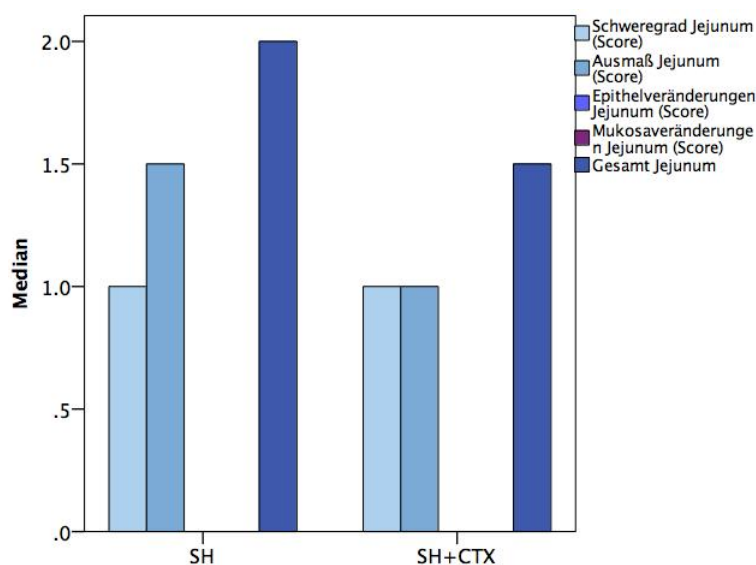


Abbildung 3: Histologische Beurteilung Jejunum

Wie in Abbildung 4 ersichtlich bewegten sich die Kryptentiefen im Jejunum in der SH-Gruppe in einem Bereich zwischen 62 μm (Minimum) und 163 μm (Maximum). In der SH-CTX-Gruppe reichten diese von 88 μm bis 175 μm . Die Mediane betragen 119 μm (SH) und 113 μm (SH-CTX), die Mittelwerte 115,7 μm (SH) und 115,3 μm (SH-CTX). Der IQR in der SH-Gruppe war mit 52 μm höher als der in der SH-CTX-Gruppe (IQR = 16 μm). Dennoch waren die Unterschiede zwischen den Gruppen statistisch nicht signifikant ($p = 0,853$).

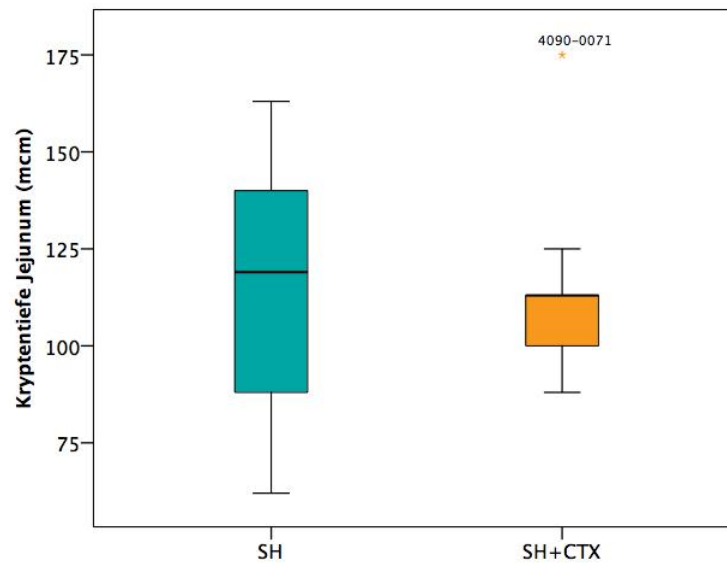


Abbildung 4: Kryptentiefe Jejunum

4.2.2 Ileum

Die in Abbildung 5 dargestellten Balken zeigen die Mediane der histologischen Beurteilungsscores im Ileum. Schweregrad und Ausmaß waren in beiden Gruppen mit den Medianen von jeweils 2,0 konstant. Unter dem Kriterium Epithelveränderungen ergab sich ein Median von 0 – hier fehlt in Abbildung 5 die Balkendarstellung. Bei den Veränderungen in der Mukosa lag der Median in der SH-Gruppe (Median = 3) über dem der SH-CTX-Gruppe (Median = 0). Beim Gesamtscore zeigte sich in der Gruppe mit Chemotherapie ein Median von 3, in der Kontrollgruppe betrug dieser 2. Die Berechnung der p-Werte fand in keiner der Gruppen einen signifikanten Unterschied. In der Anordnung Schweregrad, Ausmaß, Epithelveränderungen, Mukosaveränderungen und Gesamtscore ergaben sich p-Werte > 0,05.

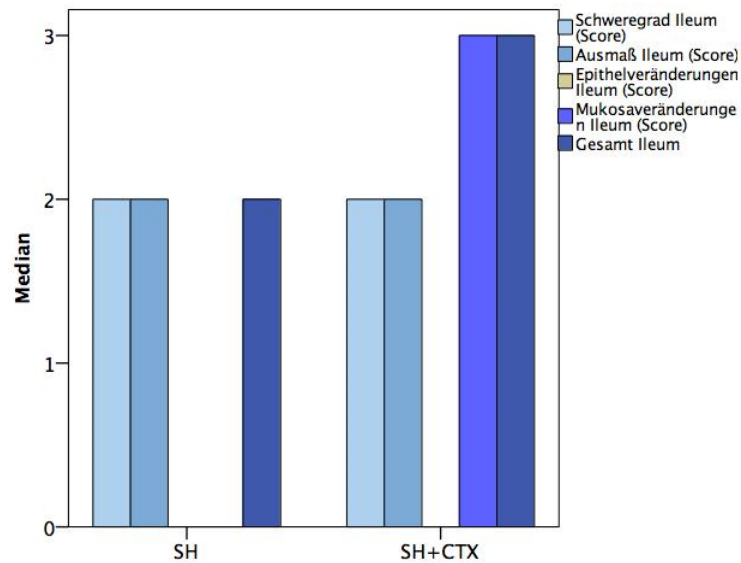


Abbildung 5: Histologische Beurteilung Ileum

Die Kryptentiefen im Ileum sind in Abbildung 6 dargestellt. Diese reichten bei den SH-Tieren von einem Minimum von 88 µm bis zu einem Maximum von 163 µm. In der SH-CTX-Gruppe erstreckte sich dieser Bereich von 100 bis 175 µm. Der Median in der Kontrollgruppe lag mit dem Wert von 138 µm etwas höher als der in der Gruppe mit Chemotherapie – hier betrug dieser 125 µm. Ähnlich dazu verhielten sich die Mittelwerte. In der SH-Gruppe lag der Mittelwert bei 135,3 µm, in der SH-CTX-Gruppe bei 126,4 µm. Die IQR ergaben 34,50 µm in der SH-, und 18,25 µm in der SH-CTX-Gruppe. Der statistische Vergleich der Kryptentiefen zwischen den beiden Gruppen ergab jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied.

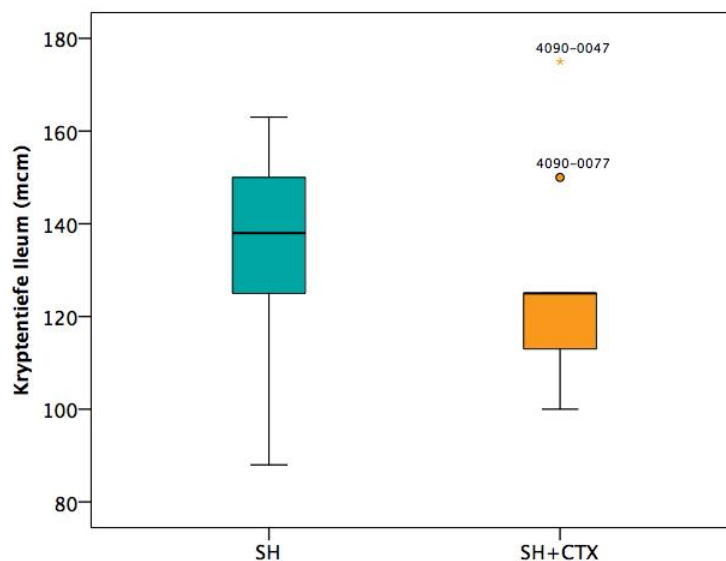


Abbildung 6: Kryptentiefe Ileum

4.2.3 Colon

Wie bereits im Ileum waren auch im Colon die Mediane der Kriterien Schweregrad und Ausmaß in beiden Gruppen mit dem Wert 1,0 konstant. Bei den Epithelveränderungen zeigte sich in der Gruppe der SH-Tiere ein Median von 0, in der Gruppe der SH-CTX-Tiere betrug dieser 2. Die Mediane der Veränderungen in der Mukosa ergaben in beiden Gruppen 0 und werden daher in Abbildung 7 nicht dargestellt. Die der Gesamtscores ergaben beide Male den Wert 2. Auch in diesem Darmabschnitt ergaben sich in keiner der Beurteilungskriterien signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die p-Werte aller Kriterien (Schweregrad, Ausmaß, Epithelveränderungen, Mukosaveränderungen, Gesamtscore) waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

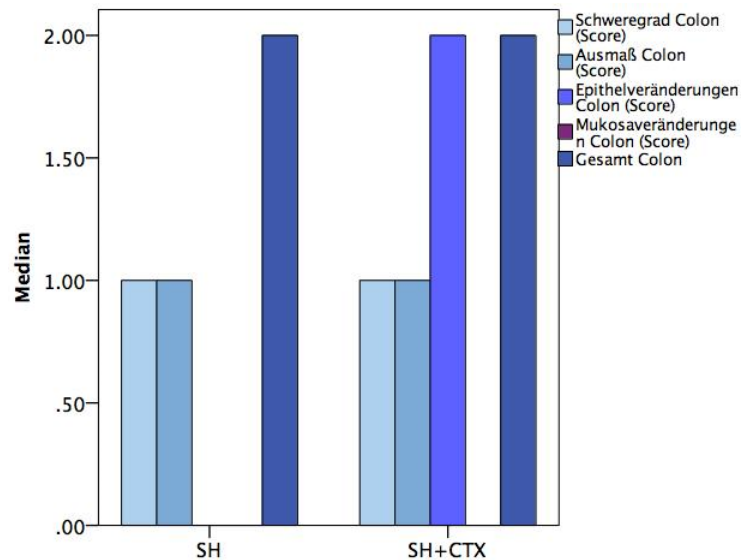


Abbildung 7: Histologische Beurteilung Colon

Im Colon der SH-Tiere erstreckten sich die Tiefen der Krypten in dem Bereich zwischen 100 μm und 225 μm . Bei den SH-CTX-Tieren lagen diese zwischen 125 μm und 200 μm . Die Mediane waren 150 μm in der SH-Gruppe und 200 μm in der SH-CTX-Gruppe. Im Mittel betrug die Kryptenlängen 162,5 μm (SH) und 180 μm (SH-CTX). Die IQR lagen bei 56,25 μm in der Kontrollgruppe und 50,00 μm in der Gruppe mit Chemotherapie. Mit dem p-Wert von 0,315 waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant.

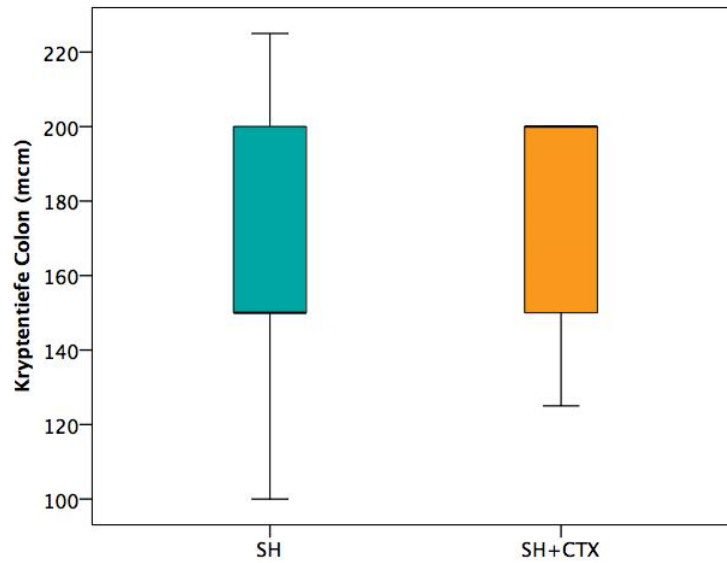


Abbildung 8: Kryptentiefe Colon

4.3 Elektronenmikroskopische Beurteilung der Darmwand

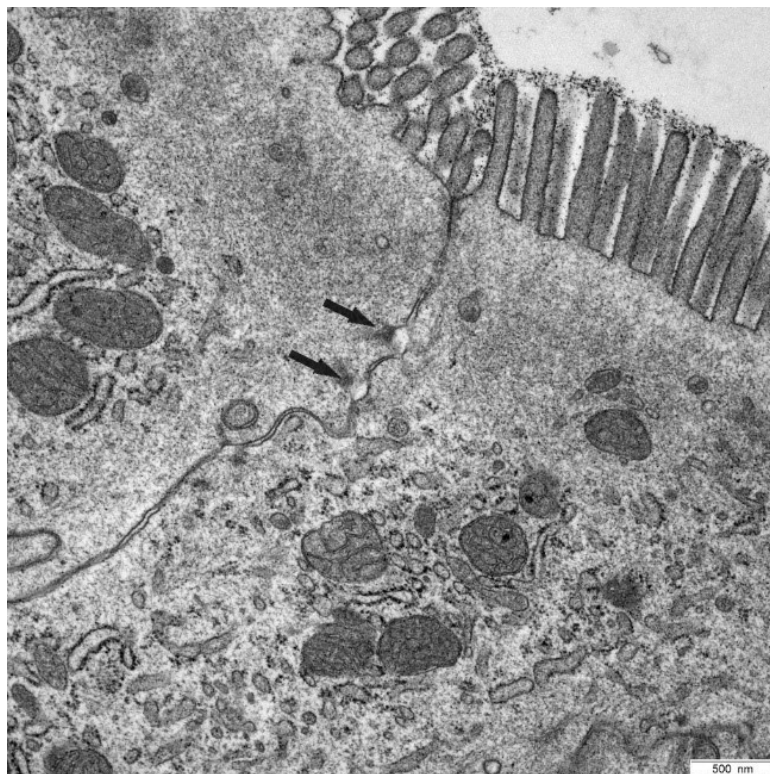


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Epithelzellen in der Darmwand

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zweier Epithelzellen in der obenstehenden Abbildung 9 zeigt deutlich offene Tight Junctions (mit schwarzen Pfeilen markiert). Die Struktur der Mitochondrien deutet sehr wahrscheinlich auf

eine Destruktion und das damit verbundene Zugrundegehen dieser Zellorganellen hin. Auch in der dem Darmlumen zugewandten Schicht des Bürstensaums sind Zeichen einer Destruktion (Abschilferung, Abstumpfung) zu erkennen.

4.4 FITC

Die photometrisch bestimmten FITC-Dextran-Werte im Blut reichten in der SH-Gruppe (n = 10) von 0 bis zu dem Maximum von 0,77 µg/ml. In der SH-CTX-Gruppe (n = 10) erreichten diese mit dem Maximum von 0,49 µg/ml einen niedrigeren Wert. Die Mediane betragen 0,25 µg/ml (SH) und 0,17 µg/ml (SH-CTX). Im Mittel ergaben sich folgende Werte – in der Kontrollgruppe betrug der Mittelwert 0,29 µg/ml, in der Gruppe mit Chemotherapie 0,17 µg/ml. Die IQR der beiden Gruppen betragen 0,19 (SH-Gruppe) und 0,24 (SH-CTX-Gruppe). Wiederum führte der Vergleich der beiden Gruppen zu keinem statistisch signifikanten Unterschied in der Darmwanddurchlässigkeit (p = 0,105).

Die genaue Verteilung der FITC-Dextran-Werte beider Gruppen ist in Abbildung 10 dargestellt.

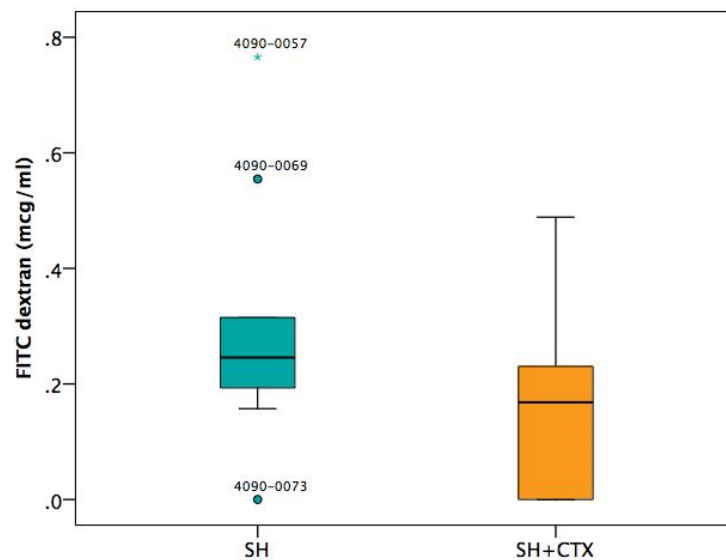


Abbildung 10: FITC-Dextran Werte

4.5 PCR

4.5.1 Expression des Tight Junction Protein 1

In der SH-Gruppe reichte die Expression des Tight Junction Protein von einem Minimum von -1,76 ct (threshold cycle) bis zu einem Maximum von 1,57 ct – in der SH-CTX-Gruppe erstreckte sich dieser Bereich von -1,20 ct bis 1,19 ct. Im Vergleich zum Median von 0,035 ct in der Kontrollgruppe (SH) betrug dieser in der Gruppe mit Chemotherapie (SH-CTX) 1,045 ct. Die Mittelwerte lagen bei -0,008 ct (SH) und 0,428 ct (SH-CTX), die IQR ergaben 2,31 ct (SH) und 2,20 ct (SH-CTX). Die Verteilung über die beiden Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede in der Expression des Tight Junction Protein 1.

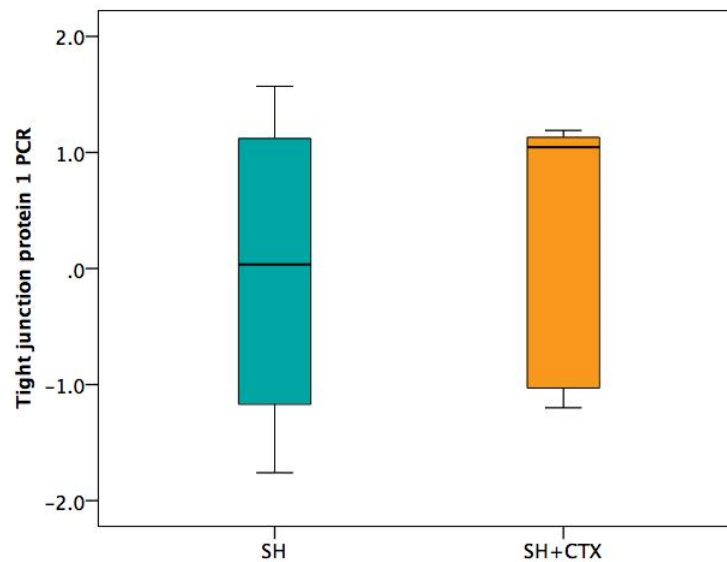


Abbildung 11: Expression von Tight Junction Protein 1

4.5.2 Expression des Occludin

Mit dem Minimalwert von -2,11 ct und dem Maximalwert von 2,34 ct war die Expressionsbreite des Occludin in der SH-Gruppe breiter als die in der SH-CTX-Gruppe. Die Werte in der Gruppe mit Chemotherapie lagen zwischen dem Minimalwert -1,51 ct und dem Maximalwert von 1,59 ct. Die Mediane der beiden Gruppen lagen dicht beieinander (Median = 1,0750 ct in der SH-Gruppe, Median = 1,1500 ct in der SH-CTX-Gruppe). Der Mittelwert in der Gruppe der Kontrolltiere lag bei 0,400 ct, der in der Gruppe der Tiere mit Chemotherapie bei 0,519 ct. Die IQR betragen 2,44 ct (SH) und 2,36 ct (SH-CTX). Der Vergleich der Expression des Occludin in beiden Gruppen führte zu keinem signifikanten Unterschied.

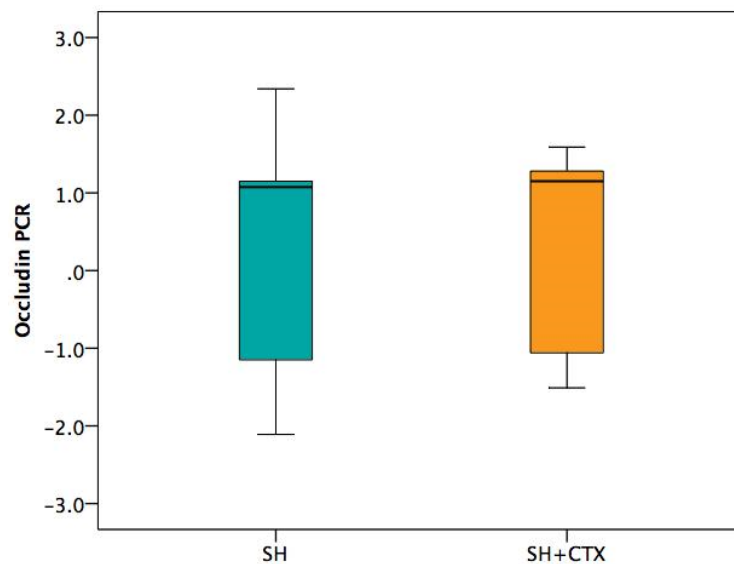


Abbildung 12: Expression von Occludin

4.5.3 Expression des Claudin 2

Die Expression des Claudin 2 reichte in der SH-Gruppe von dem Minimalwert -1,92 ct bis zu dem Maximalwert 1,96 ct. In der SH-CTX-Gruppe war dieser Bereich mit Werten von -1,60 ct bis 1,76 ct niedriger. Der Median der SH-Gruppe lag mit -0,065 ct deutlich unter dem der SH-CTX-Gruppe – in dieser betrug dieser 1,230 ct. Ähnlich dazu verhielten sich die Mittelwerte. Diese betragen 0,0110 ct in der Kontroll-, sowie 0,5740 ct in der Gruppe mit Chemotherapie. Die IQR ergaben 2,92 ct (SH) und 2,51 ct (SH-CTX).

Der Vergleich der beiden Gruppen ergab ein statistisch nicht signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$).

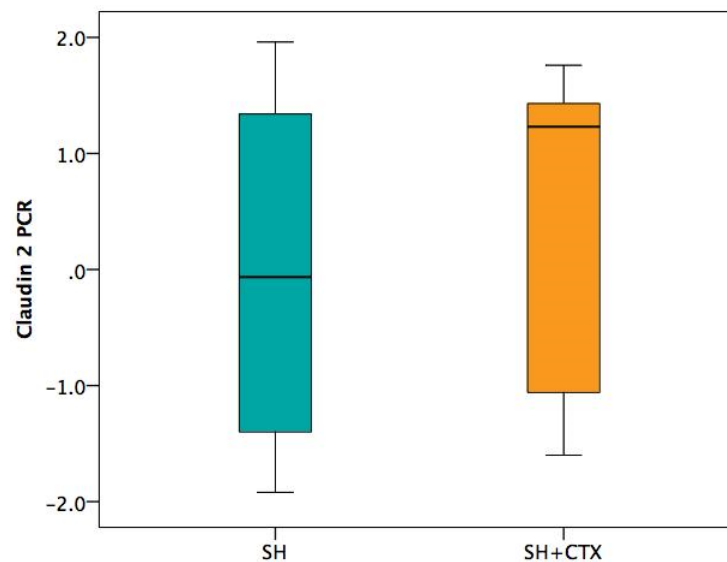


Abbildung 13: Expression von Claudin 2

4.5.4 Expression des Claudin 4

Im Vergleich mit der SH-Gruppe (Minimum = -2,05 ct, Maximum = 2,17 ct) zeigte sich in der SH-CTX-Gruppe (Minimum = -2,28 ct, Maximum = 1,27 ct) eine deutlich geringere Expressionsbreite des Claudin 4. Die Mediane betragen -0,1550 ct (SH) und -2,03 ct (SH-CTX). Die Mittelwerte waren 0,0170 ct (SH) und -1,541 ct (SH-CTX). Analog dazu verhielten sich auch die IQR (IQR = 3,92 ct in der Kontrollgruppe, IQR = 0,86 ct in der Gruppe mit Chemotherapie).

Der Test zum Vergleich der Expressionsmuster führte mit einem p-Wert von 0,035 zu einem eindeutig signifikanten Ergebnis – in der SH-CTX-Gruppe zeigte sich eine deutliche Reduktion dieses Claudins. In diesem Fall wurde die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen.

Eine Darstellung der Verteilungsmuster über die beiden Gruppen ist in Form von Boxplots in Abbildung 14 abgebildet.

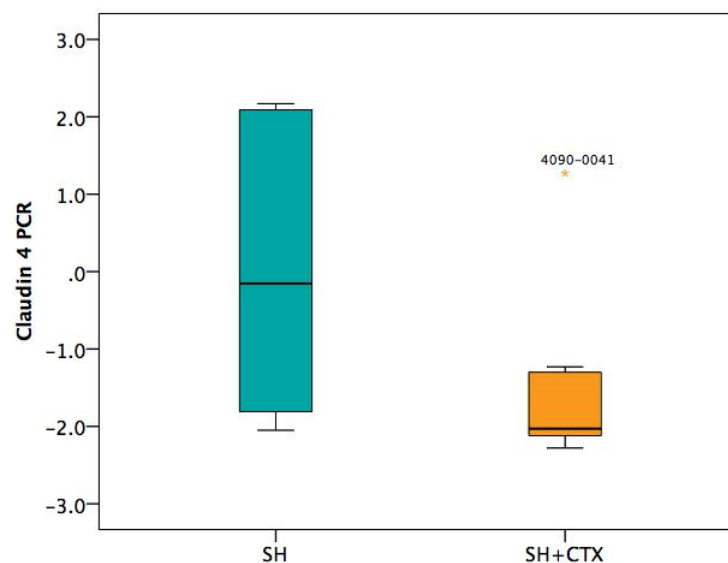


Abbildung 14: Expression von Claudin 4

4.5.5 Expression von CD14

Zur Überprüfung der inflammatorischen Situation in der Darmwand wurde zusätzlich die Expression des Entzündungsmarkers CD14 bestimmt.

Hier reichte die Expression in der SH-Gruppe von -2,55 ct (Minimum) bis 1,80 ct (Maximum), in der SH-CTX-Gruppe von -1,51 ct (Minimum) bis 1,33 ct (Maximum). Die Mediane ergaben 0,0550 ct in der SH-, und -1,035 ct in der SH-CTX-Gruppe. Auch bei dem Mittelwert lag die Kontrollgruppe mit -0,0330 ct über dem der Chemotherapie-Gruppe mit -0,2800 ct. Die IQR ergaben 2,70 ct (SH) und 2,58 ct (SH-CTX).

Mit einem p-Wert > 0,05 war das Ergebnis nicht signifikant.

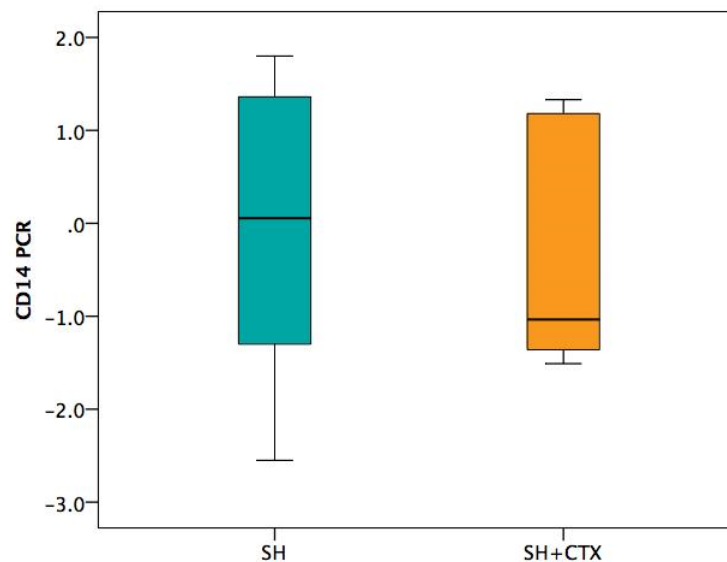


Abbildung 15: Expression von CD14

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von Chemotherapie mit Cyclophosphamid auf die Darmwanddurchlässigkeit im Mausmodell untersucht. Dazu wurden Darmabschnitte aus Jejunum, Ileum und Colon histologisch (Lichtmikroskop) und elektronenmikroskopisch beurteilt. Zusätzlich wurden in einer PCR Untersuchung die Proteine Tight Junction Protein 1, Occludin, Claudin 2, Claudin 4 sowie der Entzündungsmarker CD14 bestimmt. Zur Prüfung der Darmwandpermeabilität wurde eine FITC-Dextran-Messung durchgeführt.

Lediglich die Claudin 4-Expression im Ileum war in der Chemotherapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erniedrigt. Die restlichen untersuchten Parameter zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Die Forschungsgruppe unter J. Ueda, die sich mit dem colorektalen Karzinom und dessen Auswirkungen u.a. auf die Claudin 4-Expression beschäftigte, kam auf vergleichbare Ergebnisse. Ähnlich unserer Untersuchung zeigte sich eine verringerte Expression des Claudin 4 in der PCR-Untersuchung im Rahmen entzündlicher Prozesse. Auch konnte in der Arbeit von Ueda et. al eine Korrelation zwischen der Metastasierung des Tumors und der Claudinexpression nachgewiesen werden. Mit zunehmender Invasivität des Tumors (Metastasierung) kam es zu einer Abnahme der Expression des Claudin 4.

Diese Beobachtung war Anlass dafür, dass Claudin 4 als weiterer Biomarker für das colorektale Karzinom eingeführt wurde (31).

Auch die Entzündungskapazität bei chronischen Darmerkrankungen wie zum Beispiel Morbus Crohn steht in Korrelation mit einer Abnahme des Claudin 4. Dies wurde durch die Forschungsgruppe unter S. Prasad im Jahr 2005 bewiesen. Es zeigte sich in den entzündeten Darmabschnitten die zu erwartende verringerte Expression des Claudins sowie die damit vergesellschaftete Permeabilitätssteigerung der Darmwand (23). Nicht nachgewiesen werden konnte dieser Zusammenhang allerdings in einer anderen Studie, in der sich eine Forschungsgruppe mit entzündlichen Darmveränderungen im Rahmen der Adipositas bei Mäusen beschäftigte (32).

Auch die Destruktion anderer Bestandteile der Darmwandbarriere war Gegenstand verschiedener Forschungsprojekte in der Vergangenheit. So spielen die Tight Junctions aber auch die Adherens Junctions eine wesentliche Rolle in der Zunahme der Darmwandpermeabilität. Yang et al. beobachteten einen Funktionsverlust dieser Zellkontakte unter Chemotherapie. Sie verabreichten Mäusen eine Chemotherapie mit 25 mg/kg, 50 mg/kg und 100 mg/kg Cyclophosphamid über 5 Tage. Vor allem unter den hohen Dosen des Medikaments veränderte sich die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora deutlich. Es kam zu einer Zunahme pathogener Bakterien (*Escherichia coli*, *Enterobacteraceae*, *Pseudomonas*, *Enterococci*) und zu einer erhöhten Permeabilität der Darmwand. Grund für letztere waren die durch die pathogenen Keime verursachten Alterationen im Darmwandepithel, insbesondere auf Ebene der Zell-Zell-Kontakte wie den zuvor genannten Adherens Junctions und Tight Junctions. Hierzu wurden ZO-1 Protein, Occludin und E-Cadherin – alle drei Proteine zeigten eine verminderte Expression – untersucht (33).

In unseren Untersuchungen konnten hinsichtlich Claudin 2, Occludin und ZO-1 Protein jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Grund dafür könnten eine zu kürzere angesetzte Zeitspanne der Chemotherapie beziehungsweise eine geringere Dosis gewesen sein.

Die durch Chemotherapie nicht veränderte Claudin 2-Expression im Ileum widerspricht zahlreichen anderen Studien. Diese belegten deutlich, dass diese Proteine mit inflammatorischen Prozessen in der Darmwand in Verbindung stehen. Gegenstand der Studien waren jedoch die entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, die Zöliakie und anderen infektiöse Enteropathien (23,34). Demzufolge kann angenommen werden, dass die Chemotherapie mit Cyclophosphamid als alleinige Entzündungsursache auszuschließen ist. Möglicherweise führt erst das Zusammenspiel zwischen einer Pathologie und Chemotherapie zu entzündlichen Prozessen und konsekutiv zu Alterationen in der Darmwandbarriere.

Auch die Forschungsgruppe unter X. Liu, die sich mit den Auswirkungen von Lebensmittelallergien sowie anderen bakteriellen Toxinen auf die Darmwand beschäftigten, konnte eine erhöhte Expression von Claudin 2 zeigen (35).

Ebenfalls untersucht wurde in unserer Studie die Expression des Entzündungsmarkers CD14. Wiederum zeigte sich kein signifikanter Unterschied

zwischen den beiden Gruppen (Sham und Sham mit Chemotherapie). Dies war insofern verwunderlich, da R. Blumberg im Jahr 1999 sehr wohl eine Korrelation zwischen der Expression des Entzündungsmarkers CD14 mit entzündlichen Prozessen der Darmwand beschrieb. Im Tiermodell führte die Anhäufung von Makrophagen – gemessen durch einen Anstieg des Entzündungsmarkers CD14 – zu Disruptionen und Inflammation in der Darmwandbarriere (36).

Auch die Untersuchungen in Bezug auf die Darmdurchlässigkeit mittels FITC-Dextran erzielten keine signifikanten Ergebnisse.

In der Forschungsgruppe Yang et al. konnte dies sehr wohl gezeigt werden. Hier ergaben die Messungen unter den Tieren mit Chemotherapie deutlich höhere FITC-Dextran-Werte als in der Kontrollgruppe. Noch dazu stiegen diese mit zunehmender Chemotherapiedosis signifikant an. Mit der Einnahme höherer Chemotherapiedosen kam es somit zu einer anschaulich relevanten Zunahme der Darmwanddurchlässigkeit. Dieser Anstieg zeigte sich bereits ab einer Dosis von 25 mg/kg Cyclophosphamid. In der Gruppe mit 50 mg/kg (diese Dosis wurde auch in unserer Studie verwendet) und in der mit der Höchstdosis von 100 mg/kg stiegen die FITC-Dextran-Konzentrationen weiter an (33).

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten sich in unseren Untersuchungen deutliche Anzeichen einer Darmwanddestruktion durch die Chemotherapie. Als sichtbare Zeichen kann man offene Tight Junctions, destruierte Mitochondrien sowie Abschilferung und Abstumpfung im Bereich des Bürstensaumes annehmen.

In Studien von S. Balzan und dessen MitarbeiterInnen konnte Ähnliches beobachtet werden. Sie fanden strukturelle Alterationen im Bereich des Bürstensaumes der Enterozyten, die sie auf entzündliche Prozesse zurückführten. Die Forschungsgruppe beschäftigte sich u.a. mit dem Erkrankungsbild der akuten Pankreatitis und ihren entzündlichen Auswirkungen auf die Darmwand. Als Ursache für die strukturellen Veränderungen im Bereich des Bürstensaumes fanden sie Makrophagen und Leukozyten und die dadurch gebildeten Sauerstoffradikale (37). Keines der festgelegten Kriterien zur histologischen Untersuchung der Darmwandsegmente (Schweregrad, Ausmaß, Epithelveränderungen, Mukosaveränderungen) – orientiert nach den Vorgaben der Forschungsgruppe von U. Erben (29) – zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den SH- und SH-CTX-Tieren.

Die histologische Beurteilung der Darmwand lässt allerdings noch viele Forschungsfragen offen. Aspekte wie die Infiltration durch Entzündungszellen, Läsionen in der Epithelschicht oder generelle Alterationen in der Darmwandarchitektur ließen Rückschlüsse auf die Beeinflussung von verschiedenen Noxen (in unserem Fall die Chemotherapie) auf die Zellen der Darmwandbarriere ziehen. Diese Zusammenhänge gilt es künftig noch zu explorieren.

In einer Studie aus dem Jahr 2013 beschäftigte sich die Forschungsgruppe unter F. Russo mit Teilen dieser Fragestellungen. Ziel ihrer Arbeiten war es, Zusammenhänge zwischen der Chemotherapie mit Fluorouracyl, Epirubicin und Cyclophosphamid und ihren Auswirkungen auf die Darmwand bei einer Gruppe von Brustkrebspatientinnen zu untersuchen. Sie konnten zeigen, dass die zytotoxischen Medikamente sehr wohl zu Alterationen in der Darmwand führten (38). Hier nannten sie vor allem Modifikationen in der Schleimhaut und den konsekutiv vermehrten Kontakt zwischen den Molekülen und Flüssigkeiten im Darmlumen mit dem Darmepithel. Eine deutliche Zunahme der parazellulären Permeabilität konnte nachgewiesen werden (38). Während F. Russo et al. mit drei zytotoxischen Medikamenten arbeiteten, wurde in unseren Forschungsarbeiten nur eines – Cyclophosphamid – beforscht. Dadurch können unsere Arbeiten nur teilweise verglichen werden. Auch das Versuchskollektiv – Brustkrebspatientinnen bei F. Russo versus Versuchstiere (Mäuse) in unserer Studie waren different.

Eine mögliche Limitation und Grund für die nicht signifikanten Ergebnisse in unseren Forschungsarbeiten könnte die kleine Fallzahl ($n = 40$ Tiere) gewesen sein. Zudem wurden diese in weitere 4 Untergruppen zu je 10 Tieren unterteilt. In meiner Diplomarbeit untersuchte ich 20 Tiere. Sowohl die Kontrollgruppe als auch die Gruppe mit Chemotherapie umfassten je 10 Tiere.

Ein weiterer Aspekt in der Beurteilung der Untersuchungsergebnisse war die Verabreichungsdauer der Chemotherapie. Die 2 Gaben intraperitonealer Lösungen zu je 50 mg/kg Cyclophosphamid könnten ein weiterer Grund für die nicht signifikanten Ergebnisse gewesen sein. Möglicherweise handelte es sich um eine zu kurz angesetzte Zeitspanne und infolgedessen auch um eine in Summe zu geringe Dosierung der Chemotherapie, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen zu können.

Dazu muss man auch anmerken, dass es sich bei den Tieren, denen Cyclophosphamid verabreicht wurde, um tumorlose Tiere handelte, die in absolut keimfreien Räumen in sogenannten IVC Käfigen gehalten wurden. Auch bei den Kontrolltieren handelte es sich um gesunde Tiere. Infolgedessen kann man annehmen, dass diese Tiere einen anfangs noch völlig intakten Darmwandmetabolismus hatten. Für zukünftige Forschungsprojekte wären hier noch einige interessante Fragestellungen offen. Möglicherweise würden die Beurteilung und der Vergleich der Darmwandbarriere von Tumortieren und der von Tumortieren mit Chemotherapie neue Erkenntnisse liefern. Diese Tiere wären somit vorbelastet und es würden sich möglicherweise größere – signifikante – Unterschiede zeigen. Noch dazu müssten vollständigkeithalber zahlreiche andere die Darmwand beeinflussende Faktoren (u.a. das Mikrobiom, verschiedene Stoffwechselprodukte oder auch die Ernährung) berücksichtigt werden.

Auch muss bedacht werden, dass unsere Forschungsarbeiten im Mausmodell stattgefunden haben. Somit wurde zwar mit menschenähnlichen, jedoch tierischen Organen und Geweben gearbeitet. Der Vergleich lässt sich daher nur begrenzt ziehen und für die Ergebnisse könnte dies durchaus einen limitierenden Faktor darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Louis CU, Shohet JM. Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. *Annu Rev Med.* 2015;66(1):49–63.
2. Rabaday DZ, Simon JW, Lopasic N. Pediatric Horner Syndrome: Etiologies and Roles of Imaging and Urine Studies to Detect Neuroblastoma and Other Responsible Mass Lesions. *Am J Ophthalmol.* 2007;144(3):481–2.
3. Matthay KK, Blaes F, Hero B, Plantaz D, De Alarcon P, Mitchell WG, et al. Opsoclonus myoclonus syndrome in neuroblastoma a report from a workshop on the dancing eyes syndrome at the advances in neuroblastoma meeting in Genoa, Italy, 2004. *Cancer Lett.* 2005;228(1–2):275–82.
4. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet.* 2007;369(9579):2106–20.
5. Gortner L, Meyer S, Sitzmann FC. *Duale Reihe Pädiatrie.* 4. Auflage. Thieme; 2012. 489-491 p. (Duale Reihe).
6. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: An INRG task force report. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):289–97.
7. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: An INRG Task Force report. *J Clin Oncol.* 2009;27(2):298–303.
8. Schweinitz D, Ure B. *Kinderchirurgie: Viszerale und allgemeine Chirurgie des Kindesalters.* Springer Berlin Heidelberg; 2013. 635-646 p. (SpringerLink : Bücher).
9. Schmiedebergs N, Pharmacol A. A Prospective Study of Expectant Observation as Primary Therapy for Neuroblastoma in Young Infants, a Children's Oncology Group Study. *Ann Surg.* 2012;256(4):1–23.
10. Lemmer B, Palm D, Fülgraff G, Brune K. *Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie.* 14. Auflag. Springer Berlin Heidelberg; 2010. (Springer-Lehrbuch).
11. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K, Studio GT. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel.* 12. Auflag. Elsevier Health Sciences; 2017.
12. Hannover S, Kotzerke J, Schmidt AM, Pfluger T, Hahn K, Beteiligte W. DGN

- Handlungsempfehlung (S1 - Leitlinie) mIBG - Szintigraphie bei Kindern [Internet]. 2013 [cited 2017 Nov 19]. Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szeitleinien/031-040I_S1_mIBG-Szintigraphie_bei_Kindern_04-2013.pdf
13. Ph D, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Ph D, Anderson B, et al. Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma. 2011;363(14):1324–34.
 14. Yalçın B, Kremer LCM, van Dalen EC. High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma. *Cochrane database Syst Rev.* 2015;10(10).
 15. Simon T, Häberle B, Hero B, von Schweinitz D, Berthold F. Role of Surgery in the Treatment of Patients With Stage 4 Neuroblastoma Age 18 Months or Older at Diagnosis. *J Clin Oncol.* 2013;31(6):752–8.
 16. Viggiano D, Ianiro G, Vanella G, Bruno G, Simeone G, Mele G. Gut barrier in health and disease: focus on childhood. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19:1077–85.
 17. Hartmann M, Pabst MA, Dohr G. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie: licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas.* 5. Auflage. Graz, Medizinische Universität Graz: Facultas.wuv; 2011. 115-123 p.
 18. Lüllmann-Rauch R. *Histologie.* 3. Auflage. Kiel: Thieme; 2009. 367-392 p.
 19. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(1):3-20-2.
 20. Gunzel D, Yu ASL. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol Rev.* 2013;93(2):525–69.
 21. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connection to the Actin Cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(3):660–9.
 22. Luettig J, Rosenthal R, Barmeyer C, Schulzke J. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers.* 2015;3(1–2):e977176.
 23. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Investig.* 2005;85(9):1139–62.
 24. Tstlkita S. Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight

- Junctions. *J Cell Biol.* 1993;123(6):1777–88.
25. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol.* 1994;127(6):1617–26.
 26. Furuse M, Fujimoto K, Sato N, Hirase T, Tsukita S. Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures. *J Cell Sci.* 1996;109:429–35.
 27. Klingler C, Kniesel U, Bamforth SD, Wolburg H, Engelhardt B, Risau W. Disruption of epithelial tight junctions is prevented by cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors. *Histochem Cell Biol.* 2000;113(5):349–61.
 28. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with tight junction (zonula occludens) in a. *J Cell Biol.* 1986;103(September):755–66.
 29. Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, Spieckermann S, Haller D, Heimesaat M, et al. Original Article A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(8):4557–76.
 30. Basic M, Buettner M, Keubler LM, Smoczek A, Bruesch I, Buchheister S, et al. Loss of CD14 leads to disturbed epithelial-B cell crosstalk and impairment of the intestinal barrier after *E. coli* Nissle monoassociation. *Nat Sci reports.* 2018;(March 2017):1–14.
 31. Ueda J, Semba S, Chiba H, Sawada N, Seo Y, Kasuga M, et al. Heterogeneous expression of claudin-4 in human colorectal cancer: Decreased claudin-4 expression at the invasive front correlates cancer invasion and metastasis. *Pathobiology.* 2007;74(1):32–41.
 32. Kawano M, Miyoshi M, Ogawa A, Sakai F, Kadooka Y. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 inhibits adipose tissue inflammation and intestinal permeability in mice fed a high-fat diet. *J Nutr Sci.* 2016;5:1–8.
 33. Yang J, Liu KX, Qu JM, Wang XD. The changes induced by cyclophosphamide in intestinal barrier and microflora in mice. *Eur J Pharmacol.* 2013;714(1–3):120–4.
 34. Luettig J, Rosenthal R, Barmeyer C, Schulzke J, Luettig J, Rosenthal R, et al. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation.

- Tissue Barriers. 2014;3:1, e9771(June):1–2.
35. Liu X, Yang G, Geng XR, Cao Y, Li N, Ma L, et al. Microbial Products Induce Claudin-2 to Compromise Gut Epithelial Barrier Function. *PLoS One*. 2013;8(8).
 36. Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol*. 1999;11(6):648–56.
 37. Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(4):464–71.
 38. Russo F, Linsalata M, Clemente C, D'Attoma B, Orlando A, Campanella G, et al. The effects of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC60) on the intestinal barrier function and gut peptides in breast cancer patients: An observational study. *BMC Cancer*. 2013;13(1):1–11.