

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-,  
Gefäß- und Kinderchirurgie  
der Universität Würzburg  
(Chirurgische Klinik I)

Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer

**Glucocorticoid-induzierter TNF-Rezeptor (GITR):  
Molekulares Bindeglied zwischen Glucocorticoid-  
Einnahme und komplizierter Sigmadivertikulitis?**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Denise Landmann  
aus Arnstadt

Würzburg, August 2015

**Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Burkhard H. A. von Rahden**

**Korreferent: Prof. Dr. med. Justus Müller**

**Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 08. September 2016**

**Die Promovendin ist Ärztin.**



**Für meine Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 DEFINITION UND EPIDEMIOLOGIE	2
1.2 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE	3
1.3 MATRIXMETALLOPROTEINASEN	4
1.4 GITR	7
1.5 RISIKOFAKTOREN	9
1.6 BEDEUTUNG DER GLUCOCORTICOID-THERAPIE BEI SIGMADIVERTIKULITIS	9
1.7 KLINIK UND DIAGNOSTIK	10
1.8 KLASSIFIKATION	11
1.9 THERAPIE	14
1.10 ZIELSETZUNG	15
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1 PATIENTENKOLLEKTIV	17
2.2 GEWEBESCHNITTE	18
2.3 IMMUNHISTOCHEMIE	19
2.4 IMMUNFLUORESZENZ-DOPPELFÄRBUNG	21
2.5 REAL-TIME-POLYMERASE-KETTENREAKTION	22
2.6 DOKUMENTATION	23
2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG	23
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
3.1 PATIENTENKOLLEKTIV	25
3.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG GEGEN GITR UND MMP-9	27
3.3 IMMUNFLUORESZENZ-DOPPELFÄRBUNG GEGEN GITR UND MMP-9	33
3.4 GENEXPRESSION VON GITR UND MMP-9	36
3.5 ASSOZIATION DER GITR-EXPRESSION MIT HISTOPATHOLOGIE UND KOMORBIDITÄT	38
3.6 BEURTEILUNG DER LIKELIHOOD RATIOS UND VORHERSAGEWERTE FÜR LABORTESTS (WBC/CRP), KÖRPERTEMPERATUR UND GITR-EXPRESSION ZUR DIAGNOSE EINER KOMPLIZIERTEN DIVERTIKULITIS	40

<b>4. DISKUSSION</b>	<b>43</b>
----------------------	-----------

---

<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>52</b>
---------------------------	-----------

---

<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>53</b>
--------------------------------	-----------

---

<b>7. ANHANG</b>	<b>61</b>
------------------	-----------

---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	61
-----------------------	----

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	63
-----------------------	----

TABELLENVERZEICHNIS	64
---------------------	----

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

## 1. Einleitung

Die Divertikulose, eine Veränderung des Kolons, welche mit Schleimhautausstülpungen der Darmwand einhergeht, ist eine der häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen der westlichen Zivilisation. Mit zunehmendem Alter zeigt sie einen deutlichen Inzidenzanstieg auf bis zu 60% der über 70-Jährigen [Parra-Blanco, 2006]. In der Regel verläuft die Divertikulose jedoch völlig asymptomatisch. Klinische Bedeutung erhält die Erkrankung erst, wenn es zu einer Entzündung der Divertikel kommt. Weitert sich dieser Entzündungsprozess aus entwickelt sich eine fokale Perikolitis, welche zu einer Darmperforation führen kann. Trotz ihrer hohen Prävalenz und einer Mortalitätsrate von 2,5/100000 Einwohner wird die Divertikulitis als Forschungsgebiet vernachlässigt [Quigley, 2010; Sandler et al., 2002; von Rahden et al., 2012]. Gegenstand aktueller Studien sind insbesondere die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, welche zwar die Lebensqualität einschränken, aber ein wesentlich geringeres Mortalitätsrisiko aufweisen und mit einer Prävalenz von 1,25 – 2,1/1000 Einwohner seltener auftreten als die Divertikulitis [Quigley, 2010]. Auch ist die Pathophysiologie der Divertikulitis noch nicht vollständig verstanden und die Vielfalt des klinischen Erscheinungsbildes erschweren Diagnostik und Therapie [von Rahden et al., 2012].

Besondere Bedeutung hat die Divertikulitis für immunsupprimierte Patienten, die ein deutlich erhöhtes Risiko haben an Komplikationen zu erkranken [Chapman et al., 2005 und 2006; Ledermann et al., 1998; Sautter et al., 1959].

Die Entzündungsreaktion der Darmwand, welche bei der Divertikulitis vorliegt, geht u.a. mit einer Aktivierung von Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten einher. Jene Aktivierung führt zur Freisetzung löslicher Mediatoren zu denen auch die Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zählt [Mimura et al., 2002; Mimura et al., 2004]. MMPs sind insbesondere für den Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix verantwortlich. Neben dem Gewebeumbau dienen MMPs auch als Signalmoleküle, welche die Zellinteraktion steuern [Medina et al., 2006]. Ein für die Entzündungsreaktionen der Darmwand relevanter Vertreter dieser Familie ist die Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) [Kirkegaard et al., 2004]. Die Bedeutung der

Matrixmetalloproteinasen für die Entwicklung einer Divertikulitis ist bisher nur in wenigen Studien untersucht worden [Medina et al., 2006; Mimura et al., 2002; Mimura et al., 2004].

Um auf die Entzündungsprozesse im Rahmen einer Divertikulitis adäquat reagieren zu können ist der Organismus auf T-Lymphozyten angewiesen. Diese werden unter anderem vom Glucocorticoid-induzierten TNF-Rezeptor (GITR) aktiviert, einem Mitglied der Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie, welcher durch Glucocorticoide reguliert wird und in direkten Zusammenhang mit der Expression von MMPs steht [Lee et al., 2003; Nocentini et al., 1997; Nocentini et al., 2007]. So stellt sich die Frage, ob eine durch Glucocorticoid-Einnahme bedingte Aktivierung von GITR durch die daraus resultierende MMP-Expression einen komplizierten Verlauf der Divertikulitis begünstigt.

### **1.1 Definition und Epidemiologie**

Die Divertikuloze ist eine Veränderung des Kolons welche durch Ausstülpungen der Darmwand gekennzeichnet ist. In der Regel handelt es sich um "falsche" Divertikel, auch als Pseudodivertikel bezeichnet. Hierbei kommt es zu einer Ausstülpung der Mukosa und Submukosa durch eine Schwachstelle der Tunica muscularis, welche im Bereich der Durchtrittsstelle des versorgenden Blutgefäßes vorgefunden wird [Comparato et al., 2007].

Die Prävalenz der Divertikuloze ist schwierig zu bestimmen, da viele Patienten asymptomatisch sind und nicht diagnostiziert werden. Ab dem 70. Lebensjahr weisen ca. 60% der Menschen Kolondivertikel auf. 15-20% erleiden eine Divertikulitis, d.h. eine Entzündung der Divertikel und bei 25% der Patienten kommt es zu Rezidiven [Sheth et al., 2008]. Patienten mit Divertikulitis entwickeln in 20% der Fälle Komplikationen wie z.B. Abszessbildung, phlegmonöse Entzündungen, Fistelbildung und Perforationen des Kolons. Bei jungen Menschen sind Divertikel zwar seltener, finden sich aber dennoch bei 10% der unter 40-jährigen [Stollman et al., 1999]. Ferner wird eine steigende Hospitalisierungsrate in der Altersgruppe der unter 45-Jährigen beobachtet [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014].

Bei 90% der Patienten handelt es sich um eine Sigmadivertikulitis, während bei lediglich 10-15% der Betroffenen eine Divertikulitis des rechten Kolons vorliegt. Dies gilt für die westlichen Industrienationen. Im asiatischen Raum ist überwiegend das rechte Kolon betroffen [Stollman et al., 1999]. Hierbei handelt es sich um "echte"

Divertikel, bei denen sich alle Darmwandschichten ausstülpfen. Diese führen eher zu Blutungskomplikationen als zu Entzündungen [von Rahden et al., 2012].

## **1.2 Ätiologie und Pathogenese**

Die Ätiologie der Divertikulose und Divertikulitis ist bislang unbekannt. Lange Zeit galten eine überwiegend ballaststoffarme Ernährung sowie mangelnde körperliche Bewegung als entscheidende Risikofaktoren für die Entwicklung einer Divertikulose [Bassoti et al., 2003]. Neue Studien stellen dies jedoch in Frage. So zeigten Peery et al., dass eine ballaststoffreiche Ernährung nicht davor schützt eine Divertikulose zu entwickeln [Peery et al., 2012]. Trotz alledem wird die ballaststoffreiche Ernährung und ausreichende körperliche Betätigung weiterhin zur Divertikulose-Prophylaxe empfohlen [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014]. Die Bedeutung der Umweltfaktoren zeigt sich zudem darin, dass Asiaten welche in die USA auswandern ein höheres Risiko haben eine Divertikulose zu entwickeln als ihre Verwandten in der Heimat [Painter et al., 1975]. Außerdem kann Divertikulose im Rahmen anderer Erkrankung wie dem Marfan-Syndrom oder dem Ehlers-Danlos-Syndrom auftreten [von Rahden et al., 2012].

Histologisch zeichnet sich die Divertikulose durch eine Hypertrophie der kontrakten Myozyten aus, während sich bei der Divertikulitis zusätzlich noch eine Fibrosierung der Lamina propria mucosae sowie Schleimhautaufwerfungen mit Kryptitis finden [Goldstein et al., 1997].

Wess et al. zeigte in einer histopathologischen Studie an 25 Individuen zwischen 20 und 80 Jahren, dass sich die Struktur der Kolonwand mit zunehmendem Alter verändert [Wess et al., 1995]. Ursächlich dafür ist die Verdickung der Muskulatur durch die vermehrte Einlagerung kontrahierter Elastinfasern. Diese verursachen wiederum eine Verkürzung der Taenien, welche in einer Verdickung und Raffung der Ringmuskulatur endet. Daraus resultiert eine vermehrte Segmentierung und zunehmende Haustrierung des betroffenen Darmabschnitts [Parra-Blanco et al., 2006; Petruzzello et al., 2006; Stollman et al., 1999]. Parallel zu der verdickten Muskulatur entsteht ein geringeres Darmlumen, welches gekoppelt mit ernährungsbedingter Obstipation und abnormer Kolonmotilität zu einem erhöhten Darminnendruck führt [Petruzzello et al., 2006; Simpson et al., 2002]. Diese Drucksteigerung ermöglicht die Herniation der Mukosa und Submukosa durch die präformierten Schwachstellen in der Muscularis, im Bereich des Durchtrittes der

Vasa recta [Comparato et al., 2007]. Die Rolle der intraluminalen Drucksteigerung als Risikofaktor bleibt jedoch umstritten, da vermutet wird, dass es nur während einer symptomatischen Episode zu einem Druckanstieg kommt [Cortesini et al., 1991].

Neben Elastin spielt vor allem Kollagen eine entscheidende Rolle hinsichtlich der strukturellen Veränderungen der Kolonwand. Kollagen ist in der Submukosa lokalisiert, die maßgeblich für die Zugfestigkeit des Kolons ist. Bei Divertikulose ist ein erhöhter Grad an Kollagen-Quervernetzungen in der Kolonwand beobachtet worden, welche zu einem Elastizitätsverlust des Kolons führt [Wess et al, 1995]. Des Weiteren wird stabiles Kollagen Typ I durch das weniger stabile Kollagen Typ III ersetzt, welches zu einer verminderten Zugfestigkeit der Mukosa führt. Daraus resultiert eine verminderte Resistenz gegenüber Dehnungskräften [Riemann et al., 2007].

Neben den strukturellen Veränderungen der Kolonwand diskutieren einige Studien die Möglichkeit der enterischen Neuropathie bei Divertikulose. So soll es durch strukturelle Veränderungen des enterischen Nervensystems zu einem reduzierten Nervenzellgehalt in den intramuralen Ganglien kommen, welche mit einer Störung des enterischen Neurotransmittersystems einhergehen. Daraus resultiert eine Störung der intestinalen Motilität, welche die Entwicklung einer Divertikulose begünstigen könnte [Bassotti et al., 2005]. Zudem soll durch die Ausschüttung schmerzvermittelnder Neurotransmitter (z.B. Neuropeptid K) und Proliferation entsprechender Nervenfasern eine viszerale Hypersensitivität begünstigt werden [Humes et al., 2012].

### **1.3 Matrixmetalloproteinasen**

Die oben genannten Forschungsergebnisse legen nahe, dass es sich bei der Divertikulose pathophysiologisch um eine Störung des Bindegewebes handelt. Aus diesem Grunde ist es sinnvoll die Familie der Matrixmetalloproteinasen zu betrachten, deren Aufgabe in der Spaltung von Peptidbindungen liegt und die somit entscheidenden Einfluss auf den Abbau des Bindegewebes haben. Bei den Matrixmetalloproteinasen (MMP) handelt es sich um eine Gruppe Zink-abhängiger Endopeptidasen, welche für den Metabolismus des Extrazellulärraumes verantwortlich sind. Für dessen Integrität und Flexibilität sind Kollagen, Proteoglykane und Glykoproteine zuständig. Matrixmetalloproteinasen sind in der Lage diese Bestandteile abzubauen und den Extrazellulärraum neu zu gestalten

[Nagase et al., 1999]. Die Bedeutung der MMPs wurden bereits bei Tumorwachstum und Metastasierung, sowie der Entwicklung von Arteriosklerose diskutiert [Medina et al., 2006].

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 24 Matrixmetalloproteinasen bekannt, welche nach ihrer Substratspezifität und chemischen Struktur in die Gruppen der Kollagenasen (MMP-1, -8, -13, -18), Gelatinasen (MMP-2, -9), Stromelysine (MMP-3, -7, -10, -11), Elastine (MMP-12), Matrilysine (MMP-7, -26), MT(membrane type)-MMPs (MMP-14, -15, -16, -24) und der übrigen MMPs (MMP-19, -20, -23) unterteilt werden [Nagase et al., 2005]. MMPs werden als Präpro-Enzyme synthetisiert und mit Ausnahme der MT-MMPs, welche an der Zelloberfläche gebunden bleiben, als inaktive Pro-Enzyme in den Extrazellulärraum sezerniert [Nagase et al., 1999]. Alle Enzyme besitzen eine konservierte Protease-Domäne, in der drei Histidin-Reste das Zinkatom im katalytischen Zentrum komplexieren. Zusätzlich findet sich eine Prosequenz, die das aktive Zentrum bzw. dessen Zink-Ion mit einer Cystein-Seitenkette abschirmt. Ferner besitzen MMP-2 und MMP-9 drei Fibronectin Typ II Module in ihrem katalytischen Zentrum, welche in der Lage sind Kollagen, Laminin und Gelatin zu binden [Nagase et al., 1999]. Je nach Spezifität können die aktivierten Enzyme bei neutralem pH verschiedene Matrixbestandteile wie z.B. Kollagen spalten [Nagase et al., 1999].

Die Aktivität der MMPs wird auf den Ebenen der Transkriptionskontrolle, posttranslationalen Aktivierung und durch die Gewebeinhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinasen, TIMPs) im Gewebe reguliert [Medina et al., 2006; Nagase et al., 1999]. Unter anderem greifen in die Transkription Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone als Co-Aktivator- oder auch Co-Repressor-Proteine ein, wie z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , EGF [Nagase et al., 1999].

Die posttranslationale Aktivierung kann intrazellulär oder im Extrazellulärraum durch Proteasen bzw. bereits aktivierte Matrixmetalloproteinasen erfolgen. Im Rahmen einer stufenweisen Aktivierung wird zu Beginn ein Teil des Propeptides durch eine Proteinase abgespalten. Es folgt eine Destabilisierung des restlichen Propeptides, welches somit für bereits aktivierte MMPs angreifbarer wird. Diese entfernen den verbliebenen Rest und legen das katalytische Zentrum frei [Nagase et al., 1999; von Lampe et al., 2000].

In letzter Instanz greifen die TIMPs in die Aktivitätskontrolle der MMPs ein. Es sind vier Typen von TIMPs bekannt, welche von zahlreichen Zellen sezerniert werden und



über direkte Interaktion mit den Matrixmetalloproteinasen agieren [Medina et al., 2006; von Lampe et al., 2000].

Die Bedeutung der MMPs konnte bereits bei mehreren intestinalen Krankheiten nachgewiesen werden [Medina et al., 2006]. Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) führt die erhöhte MMP-Expression zu einer Proteolyse der Mukosa und gilt somit ursächlich für Ulzerationen und Fistelbildung. Insbesondere das auf neutrophilen Granulozyten exprimierte MMP-9 ist hierbei verstärkt nachgewiesen worden [Kirkegaard et al., 2004]. Bei der nekrotisierenden Enterokolitis zeigte sich eine verstärkte Expression von MMP-3 und TIMP-1 und auch bei Kollagenöser Kolitis wurde eine vermehrte MMP-Aktivität nachgewiesen [Medina et al., 2006]. Eine erhöhte Expression von MMP-2, MMP-3 und der Gelatinase MMP-9 zeigte sich bei Morbus Crohn Patienten. MMP-9 zeigte sich hierbei vor allem bei akuten Entzündungsreaktionen stark exprimiert und unterstützt die Extravasation von neutrophilen Granulozyten in entzündliches Gewebe [Kirkegaard et al., 2004].

Die in dieser Arbeit im Vordergrund stehende Matrixmetalloproteinase 9 (Gelatinase B) ist vorrangig für den Fibrillin-Abbau, aber auch für die Spaltung von Kollagen IV, V, VII, X und Gelatin verantwortlich. Ferner wird sie sehr stark von neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert [Kirkegaard et al, 2004; Medina et al., 2006; von Lampe et al., 2000]. Aufgrund ihrer hohen Affinität zu Kollagen und ihrer proinflammatorischen Funktion suggeriert sie einen hohen Stellenwert bei der Entwicklung einer Divertikulitis. Durch ihre denaturierende Eigenschaft, welche u.a. zu einer Auflösung der Basalmembran von Blutgefäßen führt wird den neutrophilen Granulozyten der Übertritt in das betroffene Gewebe erleichtert [Nagase et al., 2005].

Einige Studien haben sich bereits mit der Rolle der MMPs in Zusammenhang mit der Entwicklung einer Divertikulitis beschäftigt. Bei einer Studie mit 27 Probanden, welche aufgrund einer komplizierten Divertikulitis (Striktur, Fistel, Perforation) hemikolektomiert wurden, zeigte sich eine erhöhte Expression von MMP-1, MMP-2 und TIMP-1 im Colon sigmoideum. Der Nachweis gelang mittels Immunhistochemie und Elisa. Für MMP-3 und MMP-9 konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Als Kontrolle diente nicht befallenes Gewebe der betroffenen Patienten [Rosemar et al., 2007]. Dabei waren die Proteine vorrangig in der Mukosa lokalisiert. Aufgrund ihrer denaturierenden Eigenschaften, könnten diese

bei einer Überexpression eine Perforation verursachen [Rosemar et al., 2007; von Lampe et al., 2000]. Im Rahmen einer weiteren Studie mit 13 Patienten welche an akuter Divertikulitis erkrankt waren zeigte sich mittels Immunhistochemie signifikant weniger reifes Kollagen vom Typ I. Unreifes Kollagen III war jedoch in der Kontrollgruppe, bestehend aus 14 Patienten mit kolorektalem Karzinom höher exprimiert [Stumpf et al., 2001]. Die Kollagene I und III werden u.a. von MMP-1 und von MMP-13 gespalten [Medina et al., 2006].

In einer anderen Arbeit mit 11 Divertikulitis-Patienten gelang es nicht MMP-1, -2, -3 und -9 nachzuweisen, jedoch ist eine erhöhte Expression der MMP-Inhibitoren TIMP-1 und -2 in der Muscularis beobachtet worden. Auch hier dienten als Kontrolle 11 Patienten mit kolorektalem Karzinom [Mimura et al., 2004].

#### **1.4 GITR**

Es ist bekannt, dass Immunsuppression und die Einnahme von Glucocorticoiden Risikofaktoren für die Entwicklung einer komplizierten Form der Divertikulitis sind [Chapman et al., 2005]. Glucocorticoide wiederum induzieren die Expression von GITR und begünstigen die Entwicklung einer inflammatorischen Reaktion u.a. im Bereich des Peritoneums [Shin et al., 2003]. GITR stellt sich somit als fragliches molekulares Bindeglied zwischen Glucococorticoid-Einnahme und der Entwicklung einer komplizierten Divertikulitis zur Diskussion.

Der Glucocorticoid-induzierte TNF-Rezeptor (GITR) ist ein Typ 1 Transmembran-Protein und Mitglied der Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie [Kamimura et al., 2009; Nocentini et al., 2007]. GITR enthält drei Cystein Pseudorepeats in seiner extrazellulären Domäne und gleicht in seinem intrazellulären Bereich CD-27 und 4-1BB, einem Transmembranglykoprotein. Es übt seine Hauptfunktion durch Costimulation von T-Zellen bei inflammatorischen Prozessen aus [Nocentini et al., 1997; Nocentini et al., 2007].

GITR wurde ursprünglich in einer Glucocorticoid-behandelten hybridomen T-Zell Reihe geklont und findet sich vor allem in lymphoiden Gewebe [Nocentini et al., 1997]. Es wird vorrangig von CD4+CD25+ regulativen T-Zellen (Treg-Zellen) und aktivierten nicht-regulatorischen T-Zellen exprimiert, ist aber auch in Makrophagen, Monozyten, B-Zellen und dendritischen Zellen (DC) zu finden [Kamimura et al., 2009; Shevach et al., 2006].

GITR wird von seinem Liganden (GITRL) aktiviert, welcher wiederum auf antigenpräsentierenden und endothelialen Zellen (Makrophagen, B-Zellen, DC) exprimiert wird [Shevach et al., 2006].

Nach T-Zell-Rezeptor vermittelter Aktivierung wird die GITR-Expression mittels T-Helferzellen (CD4+CD25- T-Zellen) erhöht. Daraufhin erfolgt eine Interaktion zwischen GITR und GITRL, welche zu einer Steigerung des T-Zell-Überlebens, der Interleukin-2 Produktion und der Differenzierung in Effektorzellen führt [Shevach E.M. et al., 2006]. Je weiter die Immunantwort fortschreitet desto mehr Treg-Zellen, welche konstant GITR exprimieren, interagieren mit GITRL auf dendritischen Zellen. Diese Bindung führt in Anwesenheit von IL-2, welches vorrangig von T-Helferzellen gebildet wird, zu einer verstärkten Aktivierung regulatorischer T-Zellen. Zum Ende der Immunantwort kehrt die GITRL-Expression auf ihr Grundlevel zurück und beendet somit die Reaktion [Shevach et al., 2006].

GITR führt dementsprechend zu einer Hemmung der suppressiven Aktivität regulatorischer T-Zellen und verlängert gleichzeitig das Überleben von CD4+CD25-T-Effektor-Zellen [Shevach et al., 2006]. Seine pro-inflammatorische Rolle übt es zudem über die Modulation von Extravasationsprozessen aus [Shevach et al., 2006].

GITR existiert auch in löslicher Form (sGITR) [Baumgartner-Nielsen et al., 2006]. Eine erhöhte Expression von sGITR geht mit einer reduzierten GITRL-Expression einher, welche wiederum in einer erhöhten Aktivität der Treg-Zellen mündet [Baumgartner-Nielsen et al., 2006]. Dies kann u.a. eine inflammatorische Reaktion des Peritoneums mit verstärkter Neutrophilen- und Monozyten-Infiltration induzieren [Shin et al., 2003]. Auslöser dieser inflammatorischen Reaktion ist u.a. Dexamethason, welches die Expression von GITR in T-Zellen induziert [Shin et al., 2003].

## **1.5 Risikofaktoren**

In einer prospektiv angelegten Kohortenstudie mit 47,228 Probanden sind NSAR- und Aspirin-Einnahme [Strate et al., 2011] sowie Übergewicht als Risikofaktoren für Komplikationen im Rahmen einer Divertikulitis beschrieben wurden [Strate et al., 2009].

Die lange Zeit als Risikofaktor geltende ballaststoffarme Ernährung zeigt vermutlich nicht den Stellenwert, den man ihr bisher hat zukommen lassen [Peery et al., 2012].

Die Entwicklung einer komplizierten Divertikulitis wird mit einer Beeinträchtigung des Immunsystems assoziiert [Jacobs, 2007; Sautter et al., 1959]. Diese kann z.B. durch andere Erkrankungen wie Diabetes mellitus, pulmonale Erkrankungen oder auch kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht sein. Dementsprechend gilt Komorbidität als ein wesentlicher Risikofaktor für die Entwicklung einer komplizierten Verlaufsform [Chapman et al., 2005].

Außerdem wurde die Einnahme von Glucocorticoiden als ein signifikanter Risikofaktor beschrieben [Sautter et al., 1959].

## **1.6 Bedeutung der Glucocorticoid-Therapie bei Sigmadivertikulitis**

Glucocorticoide sind Steroidhormone der Nebennierenrinde, welche Entzündungsreaktionen supprimieren und die Immunantwort unterdrücken. Dies wird durch die Modulation der Transkription verschiedener Gene erreicht, die mit den maßgeblichen Entzündungsprozessen verwandt sind z.B. Cytokine [Lee et al., 2003]. Unter einer Therapie mit Glucocorticoiden zeigte sich ein deutlich erhöhtes Risiko für Perforationen [Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2006]. Als ursächlich für dieses erhöhte Perforationsrisiko werden die durch die Therapie verursachte Hemmung der Lymphozyten- und Phagozytenbildung vermutet, welche zu einer herabgesetzten Abwehrreaktion des Organismus gegenüber entzündlichen Prozessen führen. Zudem wirken Glucocorticoide zellmembran-stabilisierend, so dass die Ausschüttung lysosomaler Enzyme, welche die defekten Zellen zerstören sollen, gehemmt wird. Die Protein- und Kollagensynthese und die reparativen Maßnahmen des Organismus können durch die Glucocorticoidtherapie eingeschränkt werden [Canter et al., 1971; ReMine et al., 1980; Warshaw et al., 1976].

Glucocorticoide werden unter anderem bei Autoimmunerkrankungen, Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, im Rahmen bestimmter Chemotherapien oder

auch zur Therapie pulmonaler Erkrankungen z.B. Asthma bronchiale und COPD eingesetzt [Chapman et al., 2005]. Unter der Einnahme von Glucocorticoiden treten zahlreiche Nebenwirkungen auf [Winkler et al., 2004]. Immunsupprimierte Patienten zeigen eine gesteigerte postoperative Morbidität und Mortalität im Vergleich zu Patienten ohne zusätzliche Komorbidität und Corticoidmedikation [Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2006]. Hinzu kommt, dass Glucocorticoide die Prostaglandin-Synthese maßgeblich hemmen und somit die natürliche körpereigene Abwehrreaktion einschränken. Dies führt zu einer verminderten Reizschwelle für Nozizeptoren und bewirkt, dass das klinische Bild einer akuten Divertikulitis bei immunsupprimierten Patienten häufig maskiert wird [Canter et al., 1971; ReMine et al., 1980; Warshaw et al., 1976]. Der molekulare Mechanismus, der hinter dem Zusammenhang zwischen Glucocorticoidtherapie und der Entstehung der beschriebenen Komplikationen steckt ist unklar.

## **1.7 Klinik und Diagnostik**

Die Symptome einer Divertikulose können gelegentliche krampfartige oder auch diffuse Schmerzen im linken Unterbauch, Flatulenz und wechselnde Stuhlgewohnheiten sein [Comparato et al., 2007; Jacobs, 2007].

Erste Hinweise auf eine Divertikulitis gibt die Klinik des Patienten. Dazu zählen das Vorliegen von linksseitigen Unterbauchschmerzen ("Linksappendizitis") und Fieber, sowie laborchemisch eine Leukozytose und Erhöhung des CRPs. Im Rahmen der klinischen Untersuchung soll eine Palpation und Auskultation des Abdomens sowie rektale Untersuchung erfolgen [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014]. Aufgrund der variablen Lage des Colon sigmoideums und des Vorkommens von Divertikeln im rechten Kolon ist die Schmerzlokalisierung jedoch zu relativieren und nicht spezifisch [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014; Stollman et al., 1999]. Weiterhin erfolgt die Temperaturmessung und Bestimmung der Leukozyten und des CRPs. Eine Leukozytose  $> 10\text{-}12000/\mu\text{l}$  und ein CRP  $> 5\text{mg}/100\text{ml}$  reflektieren das Vorliegen einer Entzündung, sind jedoch ebenfalls nicht spezifisch für die Diagnose einer Divertikulitis [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014]. Im Rahmen der weiterführenden Diagnostik werden eine Röntgenübersichtsaufnahme und eine Sonographie des Abdomens durchgeführt. Im Röntgenbild weist vor allem das Vorliegen von freier abdomineller Luft auf einen komplizierten Verlauf hin [Stollman et al., 1999]. Obwohl das Ergebnis der

Sonographie stark untersucherabhängig ist, lassen sich hiermit häufig Divertikel, Wandverdickungen, Abszesse und freie abdominelle Flüssigkeit nachweisen [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014; Stollman et al., 1999]. Die Computertomographie (CT) eignet sich bei Verdacht auf akute Divertikulitis zur Diagnose und Beurteilung des Schweregrades sowie zur differentialdiagnostischen Abklärung und Planung möglicher chirurgischer Interventionen [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014].

## **1.8 Klassifikation**

Es existieren viele Klassifikationen der Divertikulitis, da es keinen internationalen Standard in der Einteilung der Divertikelkrankheit gibt. Neben der in dieser Arbeit verwendeten Einteilung nach Hansen und Stock, wird insbesondere im angloamerikanischen Raum die Einteilung nach Hinchey verwendet. Diese basiert jedoch ausschließlich auf dem intraoperativen Befund und gibt nur die komplizierten Formen der Divertikulitis wieder [Jurowich et al., 2011]. Für Deutschland hat die neue S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/ Divertikulitis eine Klassifikation der Divertikelkrankheit (CDD) basierend auf der Einteilung nach Hansen und Stock publiziert, welche zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung stand [s. Tab. 1, S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014]. Aus diesem Grund wurde auf die alte Einteilung nach Hansen und Stock zurückgegriffen. Diese spiegelt durch ihre Einteilung in 4 Typen die Vielfalt des Krankheitsbildes wider und eignet sich hervorragend zur prätherapeutischen Klassifizierung [Jurowich et al., 2011]. Typ 0 beschreibt die asymptomatische Divertikulose, die bei 80% aller Betroffenen vorliegt. Diese sind beschwerdefrei, so dass die Diagnose häufig als Zufallsbefund während einer Koloskopie etc. gestellt wird. [Petruzzello et al., 2006; Stollman et al., 1999]. Bei Typ I liegt eine akute unkomplizierte Divertikulitis vor, das heißt die Entzündung beschränkt sich auf die Kolonwand, kann aber unter Umständen auf das umgebende Fettgewebe übergreifen [Jurowich et al., 2011]. Unter Typ II, der akuten komplizierten Divertikulitis, werden drei Subtypen subsumiert. Typ II A beschreibt die Peridivertikulitis, eine phlegmonöse Entzündung der Kolonwand. Bei Typ II B liegt eine gedeckte Perforation vor, während es bei Typ II C zur freien Perforation kommt [von Rahden et al., 2010]. Stadium III beschreibt die chronisch-rezidivierende Form, die mit irreversiblen Veränderungen der Kolonwand einhergeht [von Rahden et al., 2010].

**Tab. 1: Stadieneinteilung der Divertikulitis nach S2k-Leitlinie (CDD), Hansen und Stock & Hinchey [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014]**

	<b>CDD</b>		<b>Hansen und Stock</b>	<b>Hinchey</b>
<b>Typ 0</b>	<b>Asymptomatische Divertikulose</b>		<b>Divertikulose</b>	
		Zufallsbefund, asymptomatisch, keine Krankheit		
<b>Typ 1</b>	<b>Akute unkomplizierte Divertikulitis</b>		<b>Unkomplizierte Divertikulitis</b>	perikolischer Abszess
<b>Typ 1a</b>	Divertikulitis ohne Umgebungsreaktion	Auf die Divertikel beziehbare Symptome, Entzündungszeichen (Labor): optional, Typische Schnittbildgebung		
<b>Typ 1b</b>	Divertikulitis mit phlegmonöser Umgebungsreaktion	Entzündungszeichen (Labor):obligat, Schnittbildgebung: phlegmonöse Divertikulitis		
<b>Typ 2</b>	<b>Akute komplizierte Divertikulitis</b> wie 1b, zusätzlich:		<b>Komplizierte Divertikulitis</b>	abgekapselter Abszess im Unterbauch, Retroperitoneum, kleinen Becken
<b>Typ 2a</b>	Mikroabszess	Gedeckte Perforation, kleiner Abszess ( $\leq 1\text{cm}$ ); minimale parakolische Luft	phlegmonöse Divertikulitis	
<b>Typ 2b</b>	Makroabszess	Para- oder mesokolischer Abszess ( $>1\text{cm}$ )	gedeckt perforierte Divertikulitis	

<b>Typ 2c</b>	Freie Perforation	Freie Perforation, freie Luft / Flüssigkeit generalisierte Peritonitis	frei perforierte Divertikulitis	
<b>Typ 2c1</b>	Eitrige Peritonitis			
<b>Typ 2c2</b>	Fäkale Peritonitis			
<b>Typ 3</b>	<b>Chronische Divertikelkrankheit</b>		<b>Chronische rezidivierende Divertikulitis</b>	freie Perforation mit generalisierter, eitriger Peritonitis
<b>Typ 3a</b>	Symptomatische unkomplizierte Divertikelkrankheit	Typische Klinik, Entzündungszeichen (Labor): optional		
<b>Typ 3b</b>	Rezidivierende Divertikulitis ohne Komplikationen	Entzündungszeichen (Labor) vorhanden, Schnittbildgebung: typisch		
<b>Typ 3c</b>	Rezidivierende Divertikulitis mit Komplikationen	Nachweis von Stenosen, Fisteln, Konglomerat		
<b>Typ 4</b>	<b>Divertikelblutung</b>	Nachweis der Blutungsquelle		freie Perforation mit generalisierter, kotiger Peritonitis



## 1.9 Therapie

Zur Primärprophylaxe einer Divertikulitis werden ballaststoffreiche Ernährung, Normalgewicht und ausreichende Bewegung empfohlen [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014].

Bei der unkomplizierten Divertikulitis Typ II ist regulär eine konservative Therapie mit Breitspektrum-Antibiotika, z.B. Ciprofloxacin und Metronidazol ausreichend, auf welche 85% der Betroffenen positiv ansprechen. Sind die Patienten in der Lage Nahrung zu sich zu nehmen und liegen keine relevanten Komorbiditäten vor, kann die Behandlung auch ambulant erfolgen. Nach Empfehlung der S2k-Leitlinien Divertikelkrankheit/Divertikulitis sollte nur beim Vorliegen bestimmter Risikofaktoren (z.B. Immunsuppression, Corticoideinnahme) eine elektive Sigmaresektion in Erwägung gezogen werden. Dieses Patientenkollektiv spricht häufig schlechter auf die konservative Therapie an und weist ein höheres Risiko für einen komplizierten Verlauf im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung auf [Jacobs, 2007; Parra-Blanco, 2006; Rafferty et al., 2006; S2k-Leitlinie 2014].

Retroperitoneale bzw. parakolische Abszesse (Typ II B) können interventionell z.B. CT-gesteuert drainiert werden und erfordern nicht zwingend eine operative Versorgung [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014]. Jedoch gilt nach erfolgreicher konservativer Therapie einer komplizierten Divertikulitis die Empfehlung zur elektiven Resektion im entzündungsfreien Intervall [Parra-Blanco, 2006; Rafferty et al., 2006; S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014]. Patienten bei denen eine freie Perforation (Typ II C) bzw. eine Peritonitis vorliegt sollten unverzüglich nach Diagnosestellung einer Notfalloperation zugeführt werden [S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014].

Für die chronisch-rezidivierende Divertikulitis (Typ III) galt bis vor kurzem die Therapieempfehlung zur Resektion nach dem zweiten Schub, weil die Meinung vertreten wurde, dass ohne elektive Operation das Risiko für Komplikationen deutlich erhöht ist und somit die Mortalität steigt [Janes et al., 2005]. Neuere Studien zeigten jedoch, dass das Risiko für komplizierte Verläufe nach einem ersten unkomplizierten Schub eher nicht zunimmt [Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2006]. Nach einem ersten Schub liegt das Risiko für einen weiteren Schub, nahe dem Risiko der Normalbevölkerung mit Divertikulose [Meagher et al., 2007]. Auch wurde gezeigt, dass ein langer Krankheitsverlauf mit rezidivierenden Episoden das Risiko für Komplikationen nicht erhöht. Im Gegenteil, das Risiko für Komplikationen ist bei der

ersten Episode der Erkrankung am höchsten [Binda et al., 2012]. Eine generelle prophylaktische Hemikolektomie ist somit nicht mehr gerechtfertigt [Janes et al., 2005; S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014]. Die Therapieentscheidung sollte letztlich abhängig vom Befinden des Patienten und seiner Komorbidität (z.B. Immunsuppression, Diabetes mellitus) getroffen werden [Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2006].

### **1.10 Zielsetzung**

Es ist bekannt, dass für die Bildung von Divertikeln u.a. strukturelle Veränderungen in der Kolonwand verantwortlich sind. Diese Störung des Bindegewebes wird auf molekularer Ebene entscheidend durch die Matrixmetalloproteinasen beeinflusst. So wurde die Bedeutung von MMP-9 bereits bei einigen chronischen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes gezeigt, insbesondere bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen [Medina et al., 2006]. Die Studienlage zu MMP-9 bei Divertikulitis hat bisher noch keine eindeutigen und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse erbracht [Medina et al., 2006; Mimura et al., 2004]. MMP-9 sollte jedoch aufgrund seiner hohen Kollagenaffinität und daraus resultierender Destruktion der Extrazellulärmatrix sowie seiner proinflammatorischen Funktion insbesondere im Bereich der akuten Divertikulitis näher analysiert werden.

Ferner haben wir Kenntnis davon, dass die Einnahme von Glucocorticoiden bei Divertikelträgern eine komplizierte Divertikulitis induzieren kann. In diesem Zusammenhang existiert ein durch Glucocorticoide regulierter Rezeptor (GTR), dessen Expression sowohl durch Corticoide, als auch durch proinflammatorische Umstände induziert wird [Nocentini et al., 1997]. GTR gilt weiterhin als Induktor für die Expression von MMP-9 [Lee et al., 2003]. Dementsprechend könnte GTR als potentielle Verbindung zwischen der Entwicklung einer Entzündungsreaktion und MMP-bedingten Veränderungen der Kolonwand in komplizierten Divertikulitisfällen in Frage kommen.

Im Vordergrund dieser Arbeit steht deshalb die Untersuchung der GTR- und MMP-9-Expression bei Patienten mit Divertikulitis. Werden GTR und MMP-9 im Gewebe von Patienten mit Divertikulitis exprimiert und wenn ja, zeigen sich Unterschiede zwischen komplizierter und unkomplizierter Divertikulitis? Korrelieren GTR- und MMP-9-Expression miteinander? Kann die GTR-Expression als Parameter für die Differenzierung zwischen komplizierter und unkomplizierter Divertikulitis dienen?

Zur signifikanten Darstellung der einzelnen Marker erfolgte die Genexpressionsanalyse auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.

Außerdem existieren wenige Daten über die Aussagekraft der klinischen Parameter hinsichtlich der Divertikulitis-Klassifizierung. Es stellt sich die Frage, wie sensitiv die üblichen klinischen Standardparameter (Leukozytose, CRP, Fieber) im Hinblick auf die Differenzierung zwischen komplizierter und unkomplizierter Divertikulitis sind.

Die Bedeutung der Komorbidität als Risikofaktor für die Entwicklung einer komplizierten Divertikulitis wurde bereits in anderen Studien gezeigt [Chapman et al., 2005; Lorimer et al., 2007]. In der vorliegenden Arbeit sollen diese Ergebnisse ebenso wie die Bedeutung der Corticoid-Einnahme bestätigt werden. In vorangegangenen Studien, welche eine Assoziation zwischen komplizierten Verläufen und Glucocorticoideinnahme zeigten, wurde nicht untersucht mit welcher Indikation Glucocorticoide verordnet und wie sie appliziert worden sind [Chapman et al., 2005]. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist somit die statistische Analyse, in deren Rahmen die Indikation und Einnahmeform der Glucocorticoidmedikation bei Patienten mit Divertikulitis untersucht wird.

Als abschließendes Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, ob GITR im Hinblick auf neue diagnostische und therapeutische Optionen als molekulares Bindeglied zwischen Immunsuppression und komplizierter Sigmadivertikulitis in Frage kommt.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

In dieser Arbeit wurden insgesamt 101 Patienten (n=101) untersucht, bei denen aufgrund einer Sigmadivertikulitis vom 01.01.2008 bis 31.12.2009 eine Sigmaresektion am Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt wurde. Die Aufteilung der Patienten erfolgte nach der klinischen Klassifikation nach Hansen und Stock in zwei Gruppen [Jurowich et al., 2011]. Gruppe A (n=57) schloss Patienten mit der komplizierten Form der Divertikulitis (Hansen und Stock Typ II) ein, Gruppe B (n=44) Patienten mit nicht komplizierter Divertikulitis (Hansen und Stock Typ I) bzw. chronischer Divertikulitis (Hansen und Stock Typ III). Die Einteilung erfolgte anhand der histopathologischen Befunde. Gruppe A setzte sich aus 12 Patienten mit Phlegmone (12%), 42 Patienten mit gedeckter Perforation (42%) und 3 Patienten mit freier Perforation (3%) zusammen. In der pathologischen Aufarbeitung zeigten sich hier ausgeprägte entzündliche Infiltrate von neutrophilen Granulozyten. Gruppe B setzte sich aus 3 Patienten mit unkomplizierter Divertikulitis (3%) und 41 Patienten mit chronisch-rezidivierender Sigmadivertikulitis (41%) zusammen. In Gegensatz zu Gruppe A zeigte sich immunhistochemisch eine geringere Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Eine Sigmaresektion erfolgte bei den Patienten mit nicht komplizierter Divertikulitis aufgrund des chronisch-rezidivierenden Verlaufs. In einer prospektiv geführten Datenbank (EXCEL, Microsoft) wurden Alter, Geschlecht, Komorbidität und individuelle Besonderheiten (Rauch- und Alkoholanamnese) der Patienten dokumentiert.

Das Durchschnittsalter +/- SD für Gruppe A lag bei 56,9 +/- 13,2 Jahre und für Gruppe B bei 61,5 +/- 12,1 Jahre. In Bezug auf die Gesamtpopulation betrug das Durchschnittsalter 59 +/- 12,8 Jahre.

Das präoperative Staging umfasste klinische Untersuchung, Laborergebnisse (CRP, Leukozyten) und Computertomographie (CT). Die CT erfolgte nach standardisierten Protokoll, nach oraler Gabe von 900 ml verdünntem wasserlöslichem Kontrastmittel (Gastrografin, Schering, Weimar, Deutschland) über einen Zeitraum von zwei Stunden, mit einem 16-Schnitt-CT-Scan. Kurz vor Aufnahme erfolgte ein Kontrast-Einlauf mit 900 ml Gastrografin, sowie mit Untersuchungsbeginn die i.v.-Gabe von

120 ml Kontrastmittel (Solutrust 300, Altana, Wesel, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/s.

Das postoperative Staging ergab sich aus den intraoperativen sowie den histopathologischen Befunden.

## **2.2 Gewebeschnitte**

Das chirurgische Resektat des Colon sigmoideum war in 4%iger Formalinlösung für mindestens acht Stunden fixiert worden. Es folgte eine makroskopische Inspektion und die Anfertigung 3-4 mm dicker Schnitte. Bei der Inspektion wurden entzündlich veränderte Divertikel-tragende Abschnitte gewählt, welche anschließend in Paraffin eingebettet wurden. Hierbei handelte es sich um eine routinemäßige histopathologische Aufarbeitung. Mittels eines Mikrotoms wurden 2 µm dicke Schnitte aus den Paraffinblöcken angefertigt. Nach der Durchführung der Standard-Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) erfolgte die histopathologische Analyse der Schnitte. Hierbei wurde insbesondere das Vorliegen von Entzündungsinfiltraten berücksichtigt. Paraffinblöcke mit repräsentativ hohem Anteil an infiltrierenden Immunzellen wurden für die Weiterverarbeitung ausgewählt.

Die 2 µm-Schnitte wurden auf Histobond adhäsive Objektträger (Hartenstein, Würzburg) aufgebracht. Durch die silanisierte Oberfläche der Objektträger konnten mehrere Waschvorgänge ausgeübt werden ohne dass es zum Abschwimmen von Gewebeschnitten kam. Die Schnitte wurden über 24 Stunden getrocknet. Es folgte die Entparaffinierung in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe, sowie die Rehydrierung in Wasser (Xylol 100% für 15 Minuten, Xylol 100% für 10 Minuten, EtOH 100% für 3 Minuten, EtOH 90% für 3 Minuten, EtOH 80% für 3 Minuten, EtOH 70% für 3 Minuten, Aqua dest. (Millipore) für 3 Minuten, Tris-NaCl-Puffer für 5 Minuten). Bei allen Waschschritten wurde als Waschpuffer der gleiche Tris-NaCl-Puffer mit einem pH von 7,4 verwendet. Durch die Waschvorgänge sind Reste des Lösungsmittels sowie nicht-gebundene Antikörper entfernt worden.

### 2.3 Immunhistochemie

Nach der Entparaffinierung erfolgte die Hitze-induzierte Demaskierung der Epitope (HIER) mittels Citratpuffer (pH=6,0) (Dako, Hamburg). Hierfür wurden die Präparate in der mit Citratpuffer gefüllten Küvette in den vorgeheizten Dampfgerar gestellt und für 10 Minuten erhitzt. Nach einer 20minütigen Unterbrechung bei Raumtemperatur folgte die Waschung im Tris-NaCl-Puffer für zwei Minuten. Der Peroxidase-Block (Dako, Hamburg) wurde für 3 Minuten in 0,3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung durchgeführt. Es folgte eine weitere Waschung. Anschließend wurde nacheinander ein Tropfen Strept-Avidin und Biotin aufgetragen (Biotin Blocking System: Dako X0590, Hamburg). Diese wurden jeweils getrennt voneinander nach 10 Minuten abgespült. Daraufhin erfolgte, nach Auftropfen des Primärantikörpers (200 µl) in der jeweils benötigten Verdünnung (Dako Real Antikörperverdünnungsmedium S2030, Hamburg) auf den Gewebeschnitt (s. Tab. 2), die Inkubation der Präparate über Nacht in einer feuchten Kammer (4 °C).

**Tab. 2: Übersicht über die für die Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper**

Anti-körper	Vorhandensein	Hersteller	Verdünnung	Typ
GITR	CD4+CD25+Lymphozyten (Treg) CD4+/ CD8+ T-Zellen	R&D Systems Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	1:50	monoklonaler Mäuseantikörper gegen humanes Gewebe
MMP-9	Neutrophile Granulozyten [Kirkegaard T. et al., 2004]	Santa Cruz, CA, USA	1:50	monoklonaler Ziegenantikörper gegen humanes Gewebe

Nach 24 Stunden wurden die Präparate drei Mal für je zwei Minuten im Tris-NaCl-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte für 20 Minuten bei RT die Inkubation in einer feuchten Kammer mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Lightning-Link® Biotin, Babraham, Großbritannien). Daran schloss sich eine dreifache Waschung für

je zwei Minuten an. Die Präparate wurden für weitere 20 Minuten mit dem HRP-konjugierten Streptavidin (Lightning-Link® Streptavidin, Babraham, Großbritannien) in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert und im Tris-NaCl-Puffer gewaschen. Daraufhin folgte für 5–10 Minuten die Inkubation mit Chromogen (DAB Chromogen, DAB Substrate Buffer, DAB Substrate; Dako Cytamation) bei RT (feuchte Kammer). Der Fortschritt der Braun-Färbung wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt und nach 10 Minuten gestoppt, indem die Präparate dreifach für je zwei Minuten im Tris-NaCl-Puffer gewaschen wurden. Es folgte für drei Minuten die Kernfärbung der Präparate mit Hämatoxylin, welche anschließend für 10 Minuten unter fließendem Wasser abgespült wurden. Abschließend wurden die Präparate mit Glycergel® (Dako, Hamburg) und Deckgläschen (Hartenstein, Würzburg) eingedeckt, um sie haltbar zu machen.

Die Auswertung der Einfachfärbung erfolgte mit einem Lichtmikroskop und einer Zählkammer. Zuerst wurde die 20-fache Vergrößerung verwendet um sich einen Überblick über die Präparate zu verschaffen. Daraufhin wurden für jedes Präparat je sechs repräsentative High Power Fields (HPF) ausgewählt und bei einer 400-fachen Vergrößerung einzeln für GTR und MMP-9 ausgezählt. Hierbei wurden alle Zellen gezählt, welche sich innerhalb eines HPF befanden. In einem zweiten Schritt wurden daraufhin alle GTR- bzw. MMP-9- "positiven" Zellen innerhalb desselben Rasters gezählt. Die Ergebnisse ermittelten sich dann als "positive Zellen in Prozent", indem die Anzahl der positiven Zellen durch die Anzahl aller gezählten Zellen dividiert wurde. Die Analyse erfolgte blind für die Patientendaten. Als Kontrolle diente normales Kolongewebe von gesunden Menschen.

## 2.4 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde am ersten Versuchstag analog zur immunhistochemischen Färbung prozessiert. Um unspezifische Bindungen zu blockieren sind die Schnitte 20 Minuten lang sowohl in Normalserum (2%), als auch in Rinder-Serumalbumin (BSA, 0.5%) bei RT inkubiert worden. Daraufhin folgte die nächtliche Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer (4 °C) mit den MMP-9- bzw. Kontroll-Antikörper sowie am folgenden Tag die Inkubation mit polyklonalen FITC-markierten IgG Esel-gegen-Ziege-Sekundärantikörper (s. Tab. 3) für 30 Minuten bei RT. Die Schnitte sind daraufhin mit dem zweiten Primärantikörper GTR über Nacht inkubiert wurden. Es folgte die 30-minütige Inkubation mit polyklonalen Cy3-markierten IgG Esel-gegen-Maus-Sekundärantikörper (s. Tab. 3) bei RT. Daraufhin folgte die Gegenfärbung mit 4.6-Diamidino-2-phenylindoldi-hydrochlorid (DAPI, Sigma-Aldrich, München). Zum Abschluss wurden die Schnitte mit Polyvinyl-alcohol mounting medium (DABCO, Sigma-Aldrich, München) bedeckt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgten jeweils ausgiebige Waschungen (3x für je 2 Minuten) in Tris-NaCl-Puffer.

**Tab. 3: Übersicht über die für die Immunfluoreszenz verwendeten Sekundärantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
FITC Esel-gegen-Ziege IgG	Jackson Immuno Research Laboratories Inc, Suffolk, England	1:200
Cy3 Esel-gegen-Maus IgG	Jackson Immuno Research Laboratories Inc, Suffolk, England	1:200



## 2.5 Real-Time-Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Analyse der Genexpression von GITR und MMP-9 bei komplizierter und unkomplizierter Divertikulitis wurde die Real-Time-semiquantitative-Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) genutzt. Aus je 5 Gewebelöcken der beiden Patientenkollektive wurden jeweils 10 µm Schnitte angefertigt, welche von Hand mikrodiseziert wurden (2x1,5 cm<sup>2</sup> Oberflächenabschnitt pro Bereich). Für die Extraktion der zellulären RNA und die Durchführung der cDNA-Synthese wurde das RNA FFPE Kit und AffinityScript QPCR cDNA Synthese Kit von Stratagene (Waldbronn) verwendet. Um die RNase zu inaktivieren wurde eine Ethanollösung (75% mit Diethyldicarbonat) dem Lysat beigefügt. Es folgte die RNA-Isolierung und die Zwischenlagerung der konzentrierten RNA bei -70 °C. Die Konzentration der RNA wurde spektralphotometrisch bei 260 nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) bestimmt. Die für die Real-Time-PCR verwendeten Primersequenzen wurden mit der Primer Express Software hergestellt (s. Tab. 4).

**Tab. 4: Verwendete Primersequenzen für die RT-PCR**

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer
GITR	5'- ACCATGGCACAGCACGGGG - 3'	5'- GCGTCCGTTCCCGTCCCAAG - 3'
MMP-9	5'- CACTGTCCACCCCTCAGAGC - 3'	5'- GCCACTTGTGGCGATAAGG - 3'
GAPDH	5'- ATCCCATCACCATCTTCCAGG - 3'	5'- CGCCCCACTTGATTTTGG - 3'

Die RNA wurde mittels Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (MMLV-RT; Promega, USA) in cDNA umgeschrieben. In 20 µl Konzentrat wurden hierfür 200 Einheiten MMLV-RT, sowie 0,1 µg/µl Primer pipettiert. Die folgenden Reaktionen wurden mit dem DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Biozym, Oldendorf) erfasst. Die Reaktionsschritte erfolgen nach standardisierten Kriterien in 38 Zyklen: Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Primerhybridisierung bei 60,9 °C für 30 s und die Primerverlängerung für 40 s bei 72 °C. Die Menge der DNA wurde durch die Fluoreszenzmessung quantifiziert.

Es wurde sowohl für die Gruppe der unkomplizierten Divertikulitis-Fälle, als auch für die Gruppe der komplizierten Fälle die gleiche Menge an Gewebematerial (2x1,5 cm<sup>2</sup> Oberflächenabschnitt pro Bereich, Dicke 10 µm) verwendet. Als Kontrolle diente

menschliche Kolon-cDNA von BioChain (Hayward, CA, USA). Als Referenzgen für die relative Quantifizierung und die cDNA-Qualitätskontrolle wurde das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase (GAPDH) genutzt [Barber et al., 2005].

## **2.6 Dokumentation**

Die Präparate wurden in verschiedenen Vergrößerungen und Ausschnitten mit einer Zeiss Kamera (Jena) am Zeiss Mikroskop (Jena) fotografiert. Die Fotografien sind mit dem Metamorph Software Packet (Visitron Systems, Puchheim) in den Microsoft Office Picture Manager importiert worden.

## **2.7 Statistische Auswertung**

Für die Zusammenfassung und den statistischen Vergleich der demographischen Kenndaten und der grundlegenden klinischen Parameter der Patienten beider Gruppen wurde die MedCalcSoftware, Version 11.3.2 (Mariakerke, Belgien) genutzt. Da der D'Agostino-Pearson-Test eine Normalverteilung für Proteine, aber nicht für die Genexpression zeigte, wurden die Werte für GTR und MMP-9 entweder als Mittelwert +/- Standardabweichung (SD) oder aber als Median +/- Interquartilabstand (IQR) angegeben. Um die immunhistochemischen Präparate in zwei Gruppen zu teilen (hohe und niedrige GTR-Expression), wurde der Mittelwert für GTR genutzt. Daraus ergab sich für die GTR-Expression aller Fälle (n=101), ein Cut-off-Wert bei 41%. Ein Wert unter 10% galt als negativ. Um die Beziehung zwischen zwei Variablen exakt zu beurteilen, wurden der Pearson's Chi-Quadrat und der Fisher's exact-Test angewendet. Für die exakte Festlegung der Trennbereiche wurde die ROC-Analyse (receiver operating characteristic curves) genutzt. Daraus ließ sich die entsprechende Sensitivität und Spezifität kalkulieren. Die qualitative Messung von CRP, WBC, Fieber und der GTR-Expression erfolgte mittels der Area under the curve (AUC)-Analyse. Als Trennwert galt hierbei der Wert, der mit dem höchsten diagnostischen Durchschnitt bezüglich der Sensitivität und Spezifität korrelierte (höchste diagnostische Exaktheit). Um die Exaktheit jedes einzelnen Testes zu untersuchen erfolgte die graphische Darstellung in einem interaktiven Punkt-Diagramm.

Basierend auf Sensitivität und Spezifität wurden die Likelihood Ratios (LR) berechnet: +LR = Sensitivität/ (1-Spezifität) und -LR = (1-Sensitivität)/ Spezifität.

Des Weiteren wurde der Vorhersagewert (PV = predictive value in Prozent) angewandt, wobei der positive Vorhersagewert (+PV) die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Erkrankung angibt, wenn der Test positiv ausfällt. Der negative Vorhersagewert (-PV) gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass bei negativem Testergebnis die Erkrankung nicht vorliegt. Für die Kalkulation des Vorhersagewertes der Divertikulitis-Prävalenz unter Divertikulose-Patienten wurden 10-25% angenommen (Durchschnitt 17,5%).

Um die Effekte der Risikofaktoren besser einzuschätzen wurden Quotenverhältnis (Odds Ratio = OR) und exakte doppelseitige Konfidenzintervalle gewählt. Die Datenanalyse erfolgte anschließend mit dem Student's Test- und Mann-Whitney U-Test.

p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angenommen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Patientenkollektiv**

Die Datenbank beinhaltete 101 prospektiv dokumentierte Patienten (n=101), welche in zwei Gruppen aufgeteilt worden sind. Die spezifischen Charakteristika aller Patienten und ihre Begleiterkrankungen sind in Tabelle 5 dargestellt. Für die Komorbidität ergab sich pro Patient ein Mittelwert von 1,76 +/- 1,25. Es zeigte sich eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten einer komplizierten Form der Sigmadivertikulitis (p=0,027). In diesem Zusammenhang zeigten sich mit 59% kardiovaskuläre Erkrankungen (Arterielle Hypertonie, KHK) als häufigste Begleiterkrankung.

In 22% der Fälle nahmen die Patienten während ihrer Divertikulitis-Episode im Rahmen von Begleiterkrankungen Glucocorticoide ein. Bei 11 Patienten erfolgte die Applikation inhalativ. Bei den übrigen 11 erfolgte diese oral bzw. intranasal. Eine Glucocorticoid-Medikation fand sich in 3 von 44 unkomplizierten, sowie in 19 von 57 komplizierten Fällen (s. Tab. 4). Von den 22 Patienten, welche Glucocorticoide einnahmen, erlitten 19 eine komplizierte Episode der Divertikulitis. Von diesen komplizierten Fällen erkrankten 4 Patienten an der phlegmonösen Form, 14 zeigten eine gedeckte und ein Patient eine freie Perforation des Kolons. Zwei Patienten verstarben in Folge der Perforation an einem septischen Multiorganversagen. Die Einnahme von Glucocorticoiden war statistisch signifikant mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer komplizierten Sigmadivertikulitis (Odds Ratio [OR], 6,3; 95%CI, 1,73 bis 23,19; p=0,0053) assoziiert. Es zeigte sich, dass die Einnahme der Glucocorticoide in erster Linie aufgrund von Lungenerkrankungen (z.B. Asthma bronchiale, Allergische Rhinitis) erfolgte (Odds Ratio [OR], 23,2; 95%CI, 5,6 bis 97,1; p<0,0001) (s. Tab. 5).

**Tab. 5: Übersicht über die Patientencharakteristika und p-Werte.**

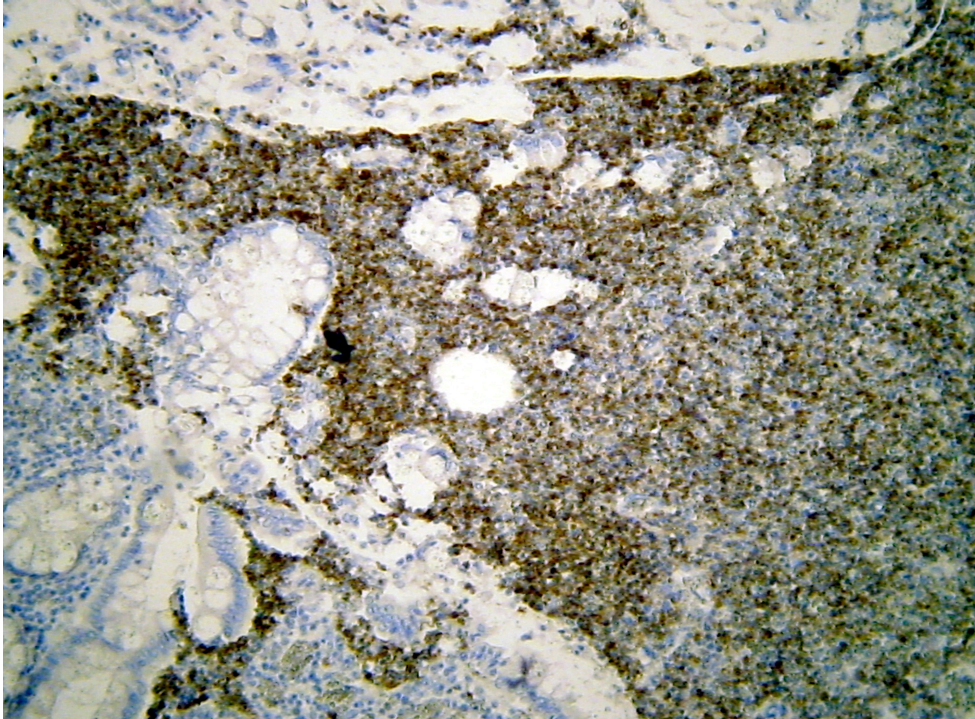
<b>Patientencharakteristika</b>	<b>Gruppe A (komplizierte Divertikulitis) n = 57</b>	<b>Gruppe B (unkomplizierte Divertikulitis) n = 44</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter (Durchschnitt)</b>			0,072
< 59 Jahre	30 (53%)	15 (34%)	
> 59 Jahre	27 (47%)	29 (53%)	
<b>Geschlecht</b>			0,548
Männlich	30 (53%)	20 (45%)	
Weiblich	27 (47%)	24 (54%)	
<b>Komorbidität</b>			0,028*
Nein	3 (5%)	9 (20%)	
Ja	54 (95%)	35 (80%)	
Kardiovaskuläre Erkrankungen	38 (67%)	23 (52%)	0,158
Pulmonale Erkrankungen	12 (21%)	2 (5%)	0,020*
Endokrine Erkrankungen	18 (32%)	13 (30%)	1,000
Rheumatische Erkrankungen	1 (2%)	0 (0%)	1,000
Dermatologische Erkrankungen	4 (7%)	1 (2%)	0,383
Nephrologische Erkrankungen	9 (16%)	5 (12%)	0,575
Hämatologische Erkrankungen	5 (9%)	3 (7%)	1,000
Gastrointestinale Erkrankungen	8 (14%)	10 (23%)	0,300
Infektiöse Erkrankungen	0 (0%)	1 (2%)	0,435
Corticoideinnahme	19 (33%)	3 (7%)	0,001*
<b>Rauchen</b>	9 (16%)	2 (5%)	0,169
<b>Alkoholabusus</b>	4 (7%)	3 (7%)	0,582

\* Signifikant (p<0,05) Fisher's exact Test

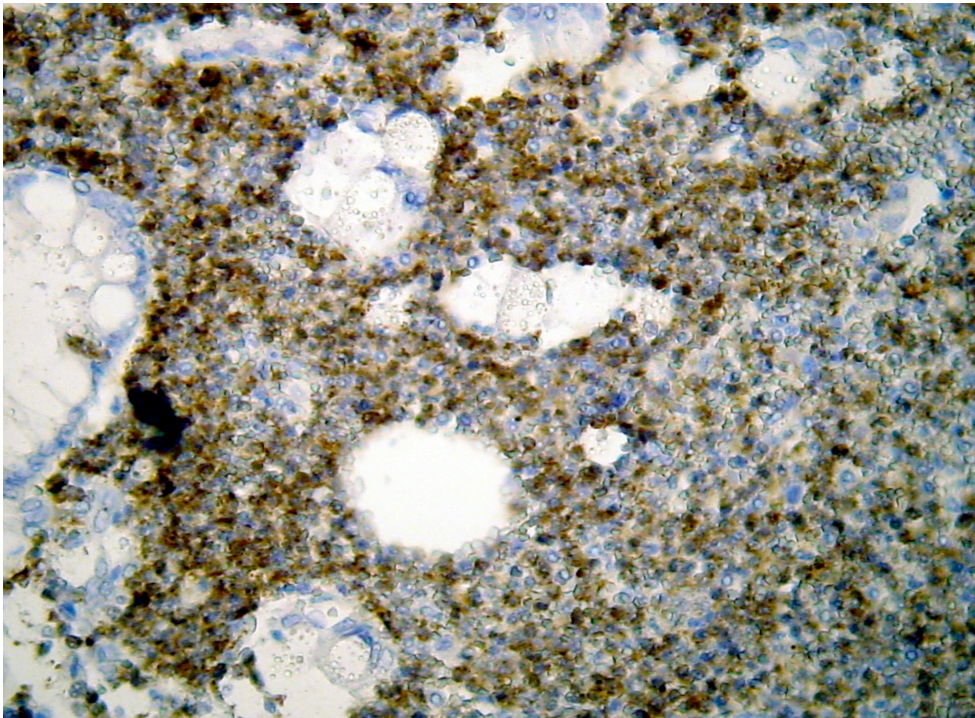
### **3.2 Immunhistochemische Färbung gegen GTR und MMP-9**

Die immunhistochemische Untersuchung im Kolongewebe gesunder Probanden zeigte keine Expression von GTR und MMP-9 im Kolonepithel und den Stromazellen. Jedoch fand sich bei 93% (n=94/101) der Divertikulitis-Patienten eine signifikante GTR- und MMP-9-Expression in den Stromazellen der Lamina propria. Hierbei ließ sich eine leichte Expression in den unkomplizierten Divertikulitis-Fällen nachweisen (n=37/44), sowie eine ausgeprägte Expression in den komplizierten Fällen (n=57/57). Insgesamt bestand eine starke Assoziation zwischen GTR-/ MMP-9-Expression und komplizierter Divertikulitis (Abb.1 und 2).

Der Unterschied zwischen komplizierter und unkomplizierter Divertikulitis zeigt sich insbesondere in den Immunfluoreszenz-Färbungen (Abb. 3).



**Abb. 1a: GITR; 20-fache Vergrößerung; Immunhistochemie**



**Abb. 1b: GITR; 200-fache Vergrößerung; Immunhistochemie**

**Abb. 1: Immunhistochemische GITR-Färbung des Colon sigmoideums eines Patienten mit komplizierter Divertikulitis.** Gezeigt ist ein repräsentatives Präparat eines Patienten im Hansen&Stock-Stadium II bei 1a) 20-facher und 1b) 200-facher Vergrößerung. Die Stromazellen der Lamina propria dieses Patienten zeigen eine starke Anfärbung mit dem Antikörper gegen GITR.



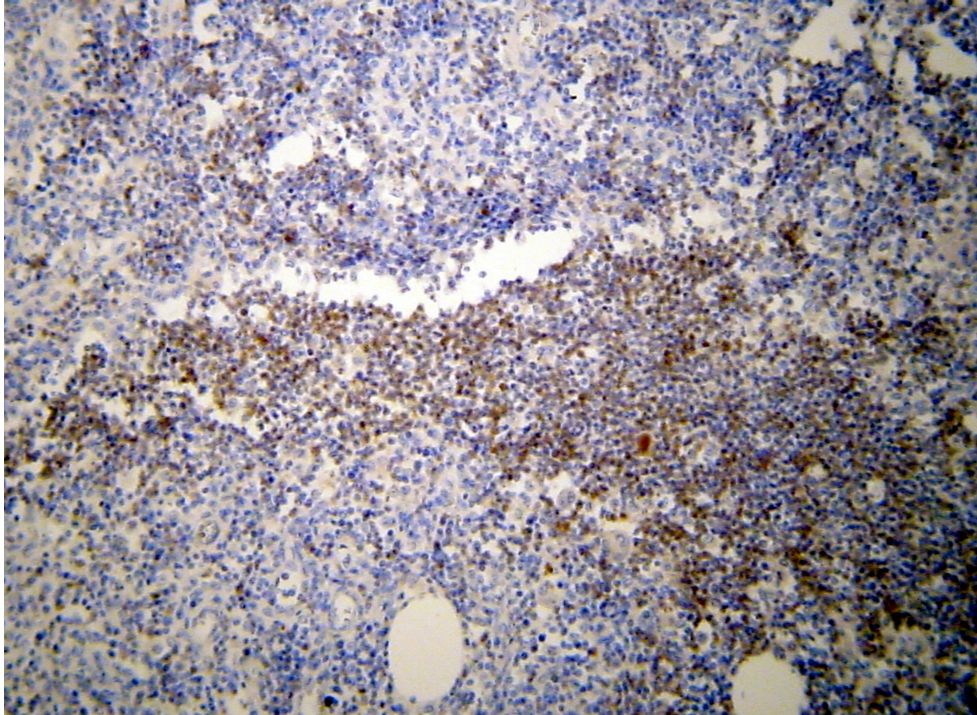


Abb. 2a: MMP-9; 20-fache Vergrößerung; Immunhistochemie

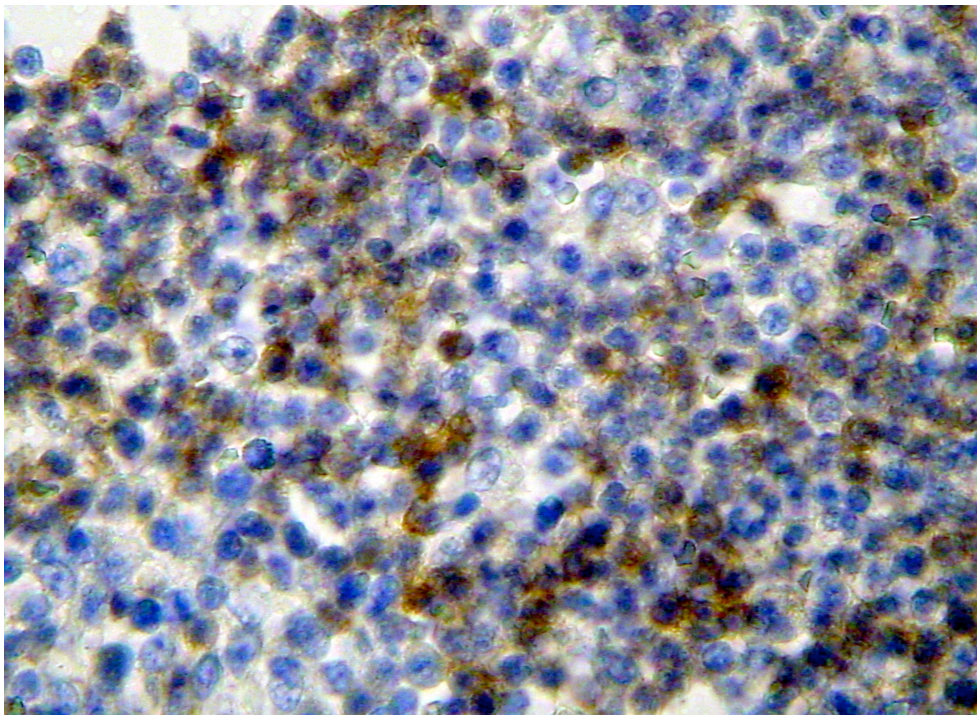
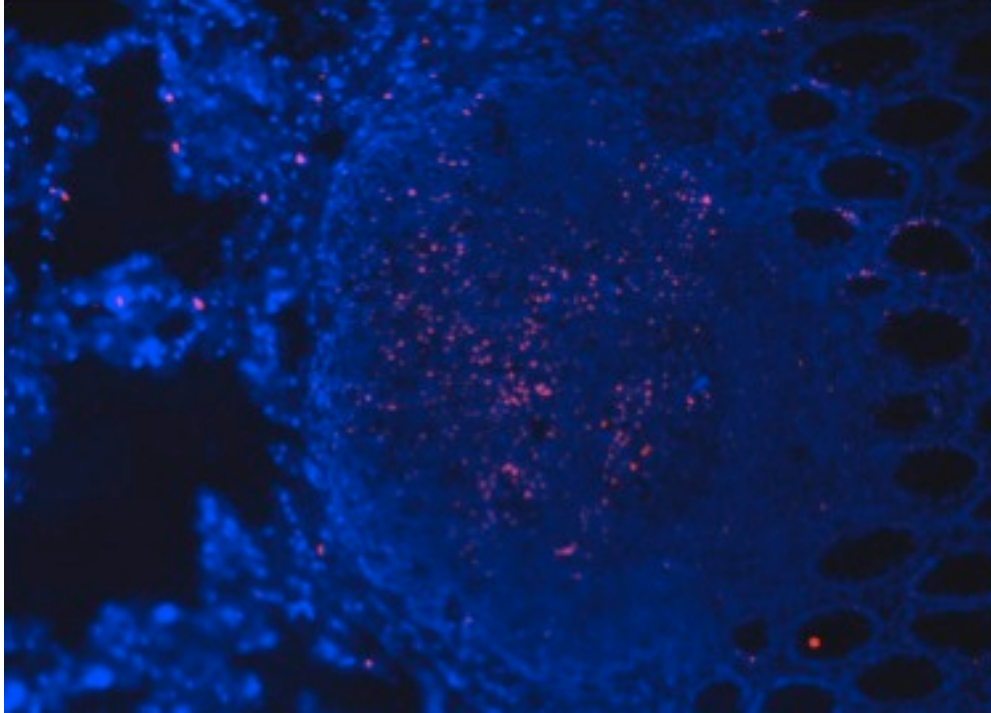


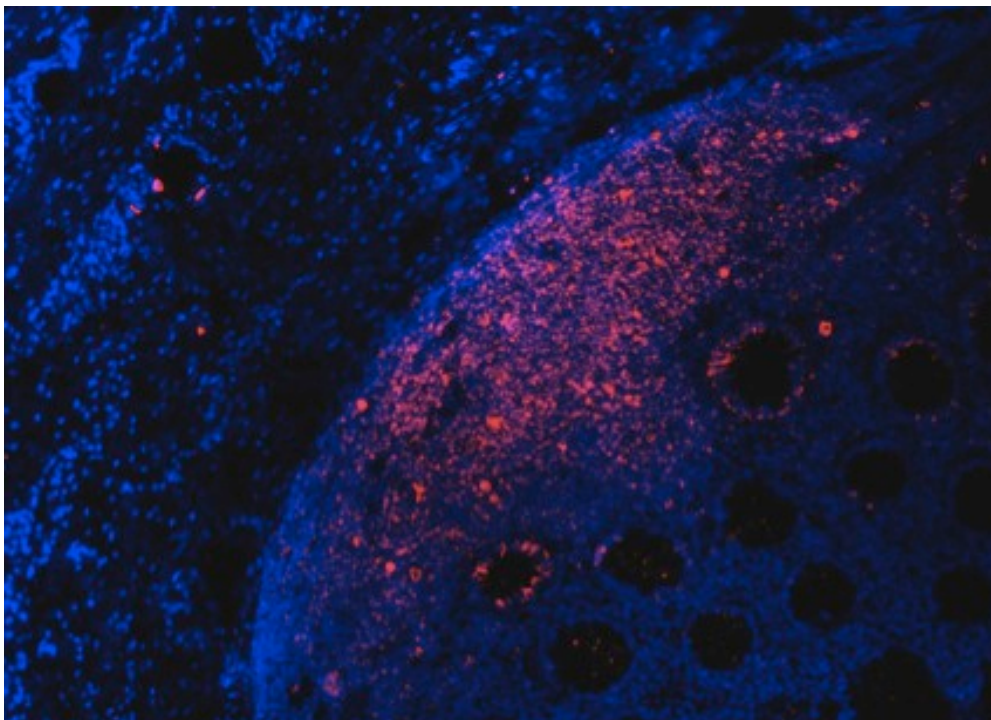
Abb. 2b: MMP-9; 400-fache Vergrößerung; Immunhistochemie

**Abb. 2: Immunhistochemische MMP-9-Färbung des Colon sigmoideums eines Patienten mit komplizierter Divertikulitis.** Gezeigt ist ein repräsentatives Präparat eines Patienten mit Hansen&Stock-Typ II bei 2a) 20-facher und 2b) 400-facher Vergrößerung. Die Stromazellen der Lamina propria dieses Patienten zeigen eine starke Anfärbung mit dem Antikörper gegen MMP-9.





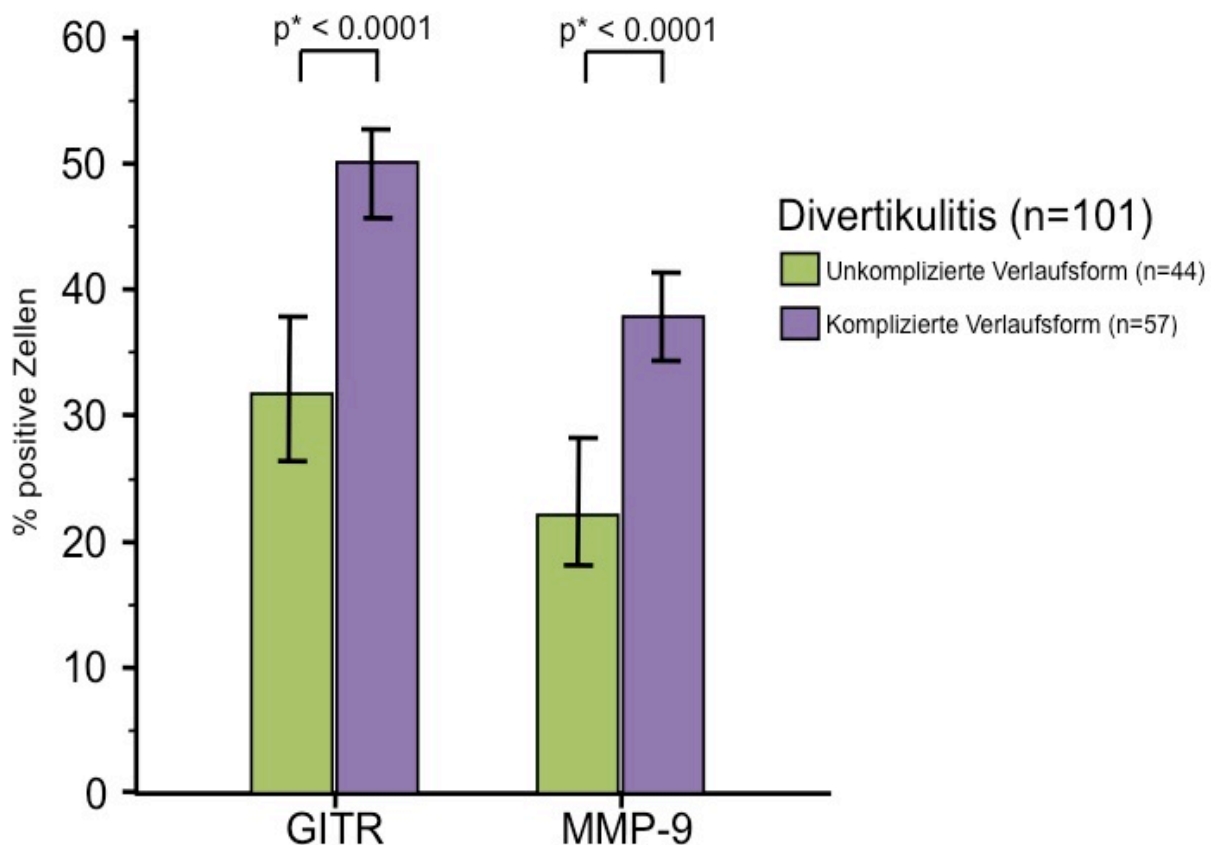
**Abb. 3a: GITR-unkompliziert; Immunfluoreszenz; 50µm;  
Cy3 Rot und DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid Blau**



**Abb. 3b: GITR-kompliziert; Immunfluoreszenz; 50µm;  
Cy3 Rot und DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid Blau**

**Abb. 3: Immunfluoreszenz-Färbung des Colon sigmoideums mit dem Antikörper gegen GITR.** Gezeigt ist ein repräsentatives Präparat 3a) eines Patienten mit unkomplizierter Divertikulitis (Hansen&Stock I) und 3b) eines Patienten mit komplizierter Divertikulitis (Hansen&Stock II). In Abb. 3b ist im Vergleich zu Abb. 3a eine deutlich stärkere Expression von GITR in den Stromazellen der Lamina propria ersichtlich.

Zusätzlich wurde die Anzahl der GITR- und MMP-9-positiven Zellen für die einzelnen Patienten ermittelt und miteinander verglichen (Abb. 4). Es zeigte sich, im Vergleich zu den unkomplizierten Divertikulitis-Fällen in den komplizierten Verlaufsformen eine signifikante (jedes  $p < 0,0001$ ) Erhöhung der Expression von GITR (Tab. 6) und MMP-9 (Tab. 7).



**Abb. 4: Immunhistochemische Analyse.** GITR-Färbung bei Divertikulitis-Patienten und Korrelation von GITR und MMP-9. Im Vergleich mit den unkomplizierten Fällen sind sowohl GITR als auch MMP-9 bei den komplizierten Fällen signifikant ( $p < 0,0001$ ) höher exprimiert.

Die Analyse bezieht sich auf den Prozentsatz an positiven Zellen, welche in den immunhistochemischen Färbungen gezählt worden sind.

**Tab. 6: Auswertung der GITR-Expression bei unkomplizierter und komplizierter Sigmadivertikulitis.** Signifikante Erhöhung der GITR-Expression bei komplizierter Form.

<b>Krankheitsverlauf</b>	<b>Mittelwert %</b>	<b>SD %</b>	<b>95%CI</b>	<b>Patientenzahl n</b>
Unkomplizierte Divertikulitis	31,86	18,65	26,21-37,57	44
Komplizierte Divertikulitis	49,03	15,06	45,03-53,03	57

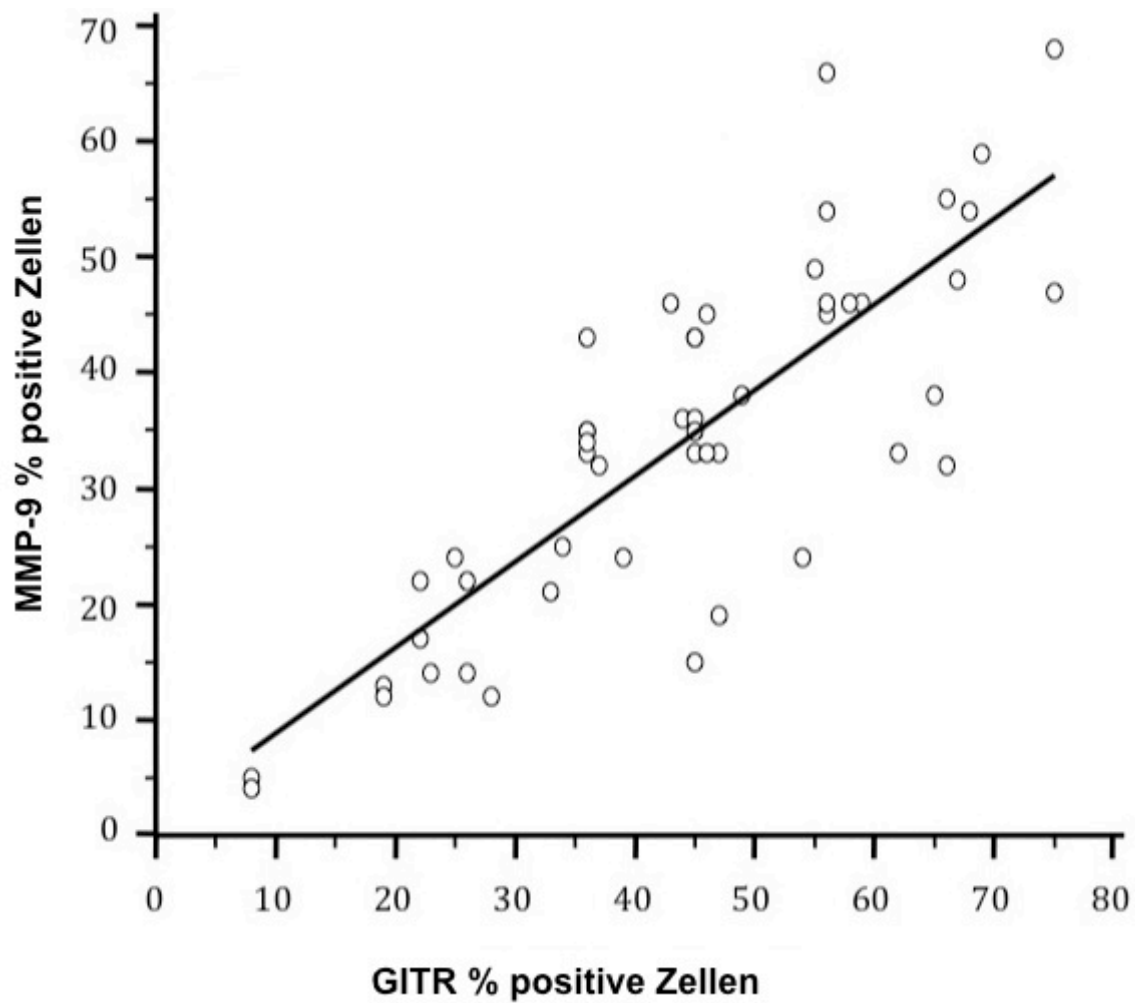
**Tab. 7: Auswertung der MMP-9-Expression bei unkomplizierter und komplizierter Sigmadivertikulitis.** Signifikante Erhöhung der Expression von MMP-9 bei komplizierter Divertikulitis.

<b>Krankheitsverlauf</b>	<b>Mittelwert %</b>	<b>SD %</b>	<b>95%CI</b>	<b>Patientenzahl n</b>
Unkomplizierte Divertikulitis	23,15	14,59	18,72-27,59	44
Komplizierte Divertikulitis	37,80	13,88	34,12-41,49	57

### **3.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen GTR und MMP-9**

Um festzustellen, ob die MMP-9-Expression im Colon sigmoideum von Divertikulitispatienten mit der GTR-Expression korreliert, wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt (Abb. 5) [Watson, 1964]. Dafür wurden die zuvor bestimmten prozentualen Anteile an positiven Zellen von GTR und MMP-9 für jeden histologischen Schnitt in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen. Wenn dabei die GTR-Expression als konstante Variable betrachtet wurde, zeigte diese eine starke direkte Korrelation zwischen der GTR- und MMP-9-Expression im Colon sigmoideum der Divertikulitispatienten ( $R^2=0,7268$ ,  $p<0,0001$ ,  $r=0,85$ ).

Dies wurde durch die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung bestätigt. In Abb. 6a und 6b zeigt sich die bereits beschriebene erhöhte Expression von MMP-9 und GTR bei komplizierter Divertikulitis (Hansen und Stock II). Des Weiteren wird in Abb. 6c deutlich, dass GTR und MMP-9 zur gleichen Zeit von denselben Zellen exprimiert werden.



**Abb. 5: Regressionsanalyse.** Die Regressionsanalyse zwischen den quantitativen immunhistochemischen Ergebnissen von GTR und MMP-9 zeigt, dass die GTR-Expression stark positiv mit der Expression von MMP-9 korreliert ( $R^2=0,7268$ ,  $p<0,0001$ ,  $r=0,85$ ).

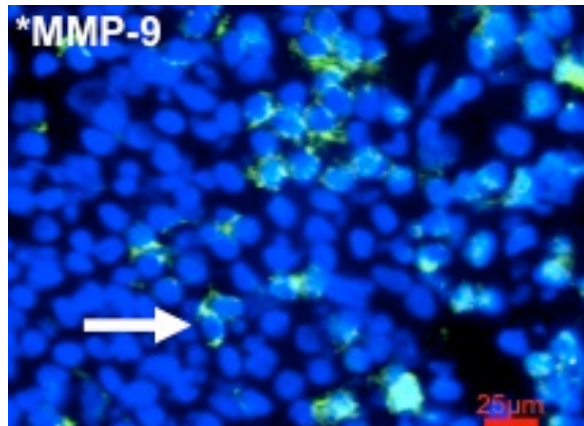


Abb. 6a: MMP-9; Immunfluoreszenz; 25  $\mu\text{m}$ ; FITC Grün Fluoresceinisothiocyanat, Cy3 Rot und DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid Blau

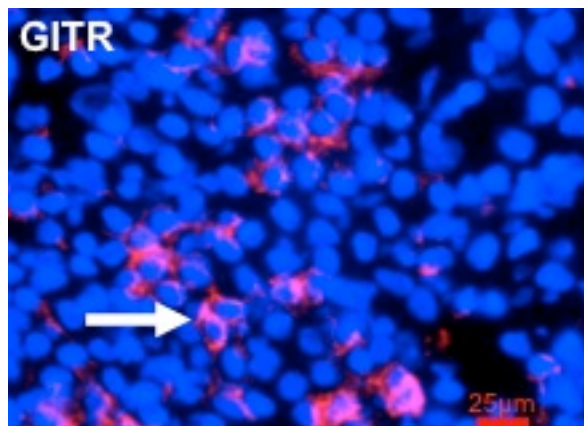


Abb. 6b: GITR; Immunfluoreszenz; 25  $\mu\text{m}$ ; FITC Grün Fluoresceinisothiocyanat, Cy3 Rot und DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid Blau

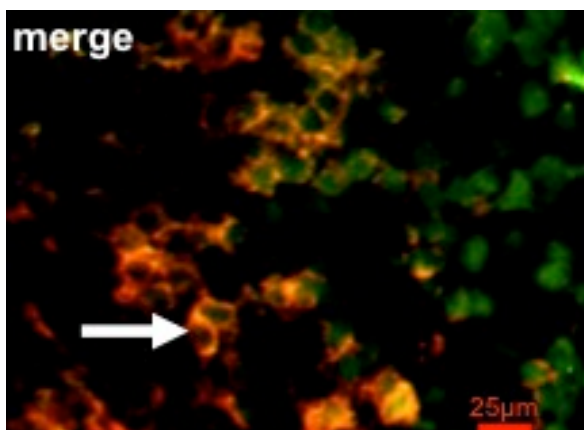


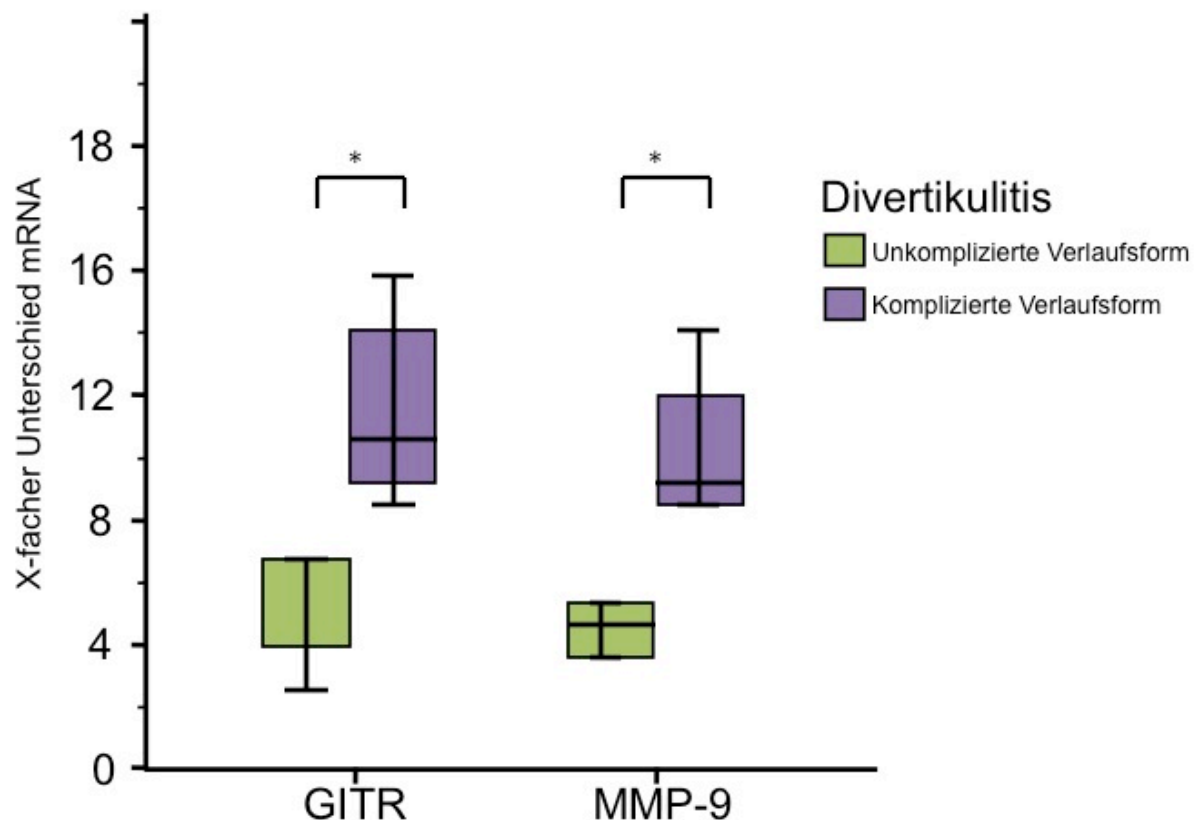
Abb. 6c: GITR und MMP-9; Immunfluoreszenz-Doppelfärbung; 25  $\mu\text{m}$ ; FITC Grün Fluoresceinisothiocyanat, Cy3 Rot und DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid Blau

**Abb. 6: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung (Abb. 6c) von MMP-9 (Abb. 6a) und GITR (Abb. 6b).** Exprimiert in den Stroma-Zellen (Pfeile) der Lamina propria in einem repräsentativen Fall der komplizierten Divertikulitis (Hansen&Stock II). Präparat in Abb. 6c ohne Gegenfärbung mit DAPI.

### 3.4 Genexpression von GITR und MMP-9

Es wurde eine Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene von GITR und MMP-9 in komplizierten und unkomplizierten Divertikulitis-Fällen durchgeführt. Es zeigte sich bei Patienten mit unkomplizierter Divertikulitis eine signifikant (jedes  $p=0,009$ ) niedrigere Genexpression von GITR (Abb. 7, Tab. 8) und MMP-9 (Abb. 7, Tab. 9) als bei Patienten mit komplizierter Divertikulitis .

Diese Ergebnisse bestätigten, die bereits in der Immunhistochemie beobachtete erhöhte Expression von GITR und MMP-9 bei Divertikulitis-Patienten, insbesondere in den komplizierten Fällen.



**Abb. 7: GITR- und MMP-9-Genexpression.** Diese ist bei unkomplizierter Divertikulitis (n=5) signifikant (p-Wert=0,009) niedriger als bei komplizierter Divertikulitis (n=5). Diese Ergebnisse bestätigen die bereits in der Immunhistochemie beobachtete erhöhte GITR-Expression.

**Tab. 8: Genexpression von GTR bei unkomplizierter und komplizierter Divertikulitis in der Real-Time-PCR.** Dargestellt ist der x-fache Unterschied zum Colon sigmoideum nicht erkrankter Personen.

<b>Krankheitsverlauf</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>IQR</b>	<b>Patientenzahl n</b>
Unkomplizierte Divertikulitis	6,8	3,90-6,98	5
Komplizierte Divertikulitis	10,6	8,95-13,98	5

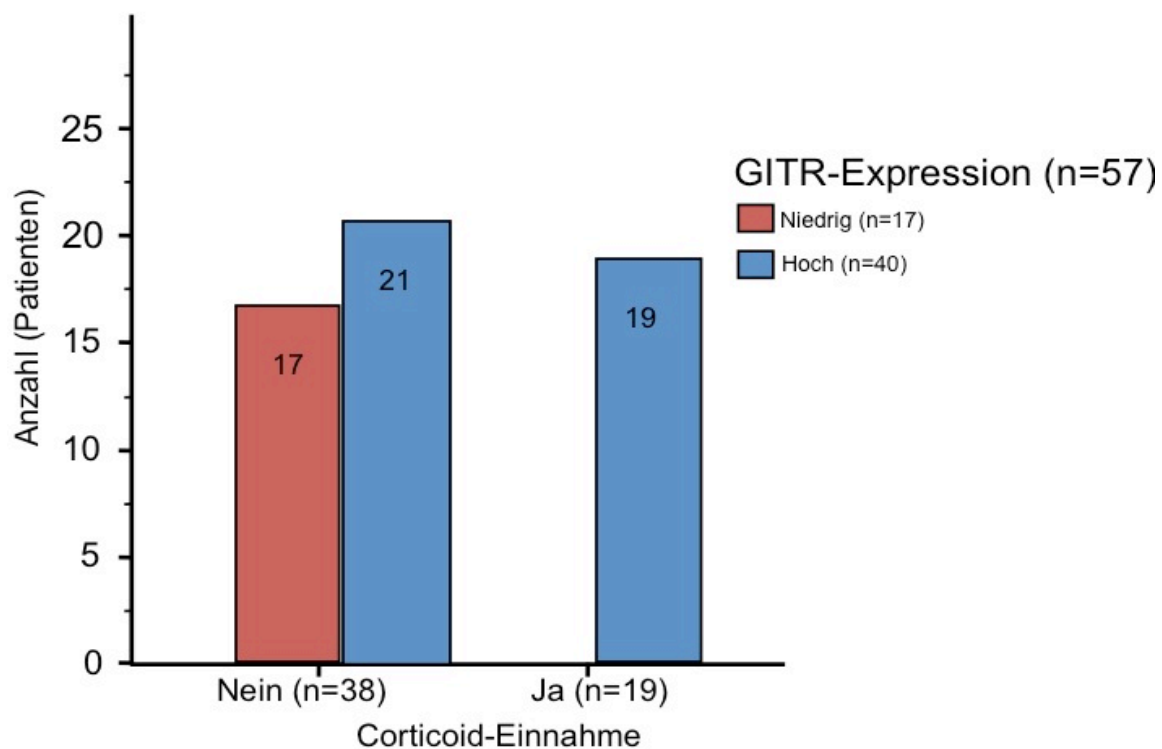
**Tab. 9: Genexpression von MMP-9 bei unkomplizierter und komplizierter Divertikulitis in der Real-Time-PCR.** Dargestellt ist der x-fache Unterschied zum Colon sigmoideum nicht erkrankter Personen.

<b>Krankheitsverlauf</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>IQR</b>	<b>Patientenzahl n</b>
Unkomplizierte Divertikulitis	4,9	3,78-5,60	5
Komplizierte Divertikulitis	9,1	8,45-11,97	5



### 3.5 Assoziation der GTR-Expression mit Histopathologie und Komorbidität

Bei der Analyse der Ergebnisse zeigte sich zum einen, dass eine Glucocorticoid-Einnahme mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der GTR-Expression einherging (OR 12,6; 95%CI 2,75-57,47;  $p=0,013$ ; Tab. 10). Zum anderen zeigte sich bei einer hohen GTR-Expression eine erhöhte Wahrscheinlichkeit an der komplizierten Form der Divertikulitis zu erkranken (OR 4,5; 95%CI 1,95-10,57;  $p<0,001$ ; Tab. 10). Des Weiteren zeigte sich bei 91% der Patienten, welche Glucocorticoide einnahmen eine erhöhte Expression von GTR (n=20 von 22 Patienten) und nur zwei Patienten mit einer niedrigen GTR-Expression nahmen Glucocorticoide ein (n=2 von 22 Patienten, 9%). 19 Patienten mit Glucocorticoid-Einnahme entwickelten eine komplizierte Divertikulitis und zeigten eine erhöhte GTR-Expression (n=19 von 57; Tab. 5; Abb. 8). Jedoch zeigte sich eine hohe Expression von GTR auch bei Patienten, welche nicht mit Glucocorticoiden behandelt wurden (n=35 von 55 Patienten mit hoher GTR-Expression, 64%; Tab. 10). Hiervon konnte bei 21 Patienten mit komplizierter Divertikulitis, welche keine Glucocorticoide eingenommen hatten, eine hohe GTR-Expression nachgewiesen werden (Abb. 8).



**Abb. 8: Zusammenhang zwischen Glucocorticoid-Einnahme und GTR-Expression bei Patienten mit komplizierter Divertikulitis.** Glucocorticoid-Einnahme wird mit einer erhöhten Rate an komplizierten Divertikulitisfällen assoziiert ( $p=0,013$ ).

**Tab. 10: Übersicht über individuelle Merkmale der Divertikulitis-Patienten in Zusammenhang zur GTR-Expression.**

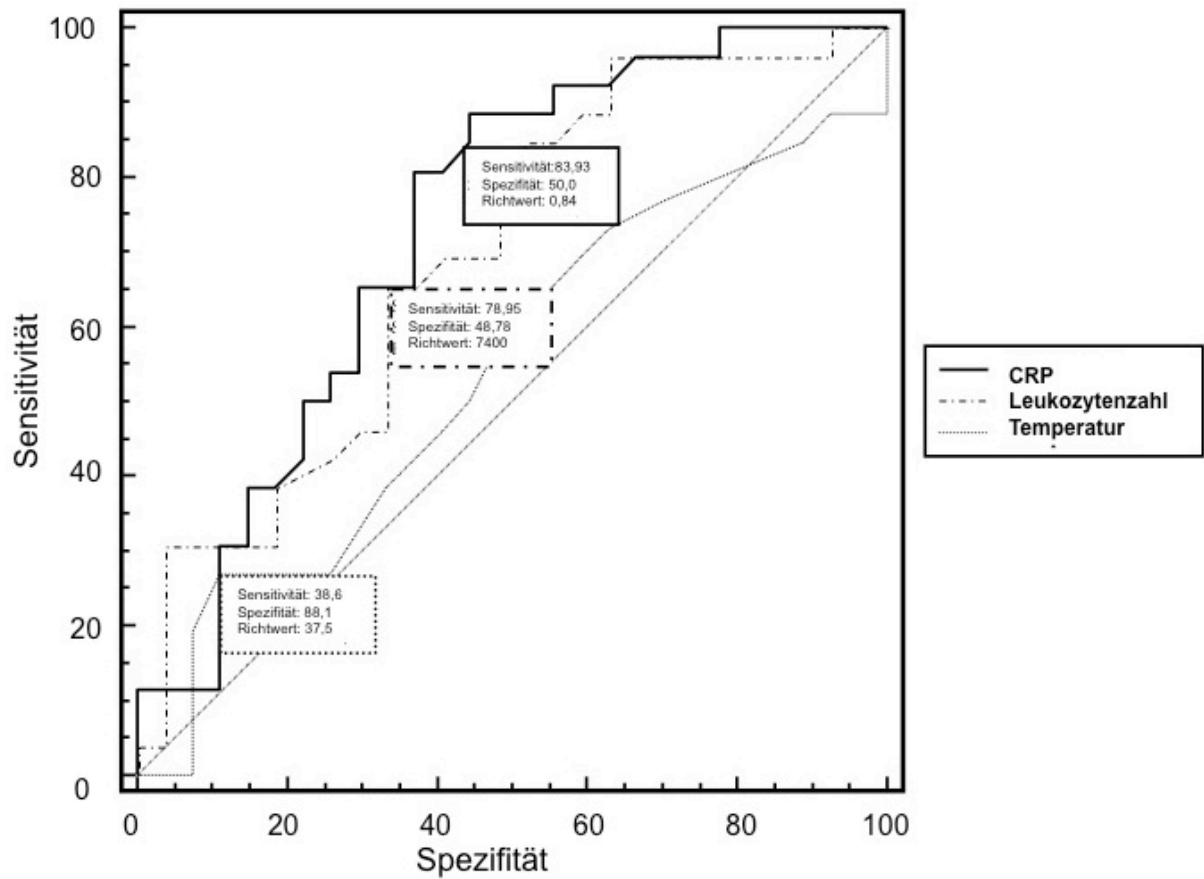
<b>Merkmale</b>	<b>GTR-Expression niedrig (&lt;41%) n = 46</b>	<b>GTR-Expression hoch (&gt;41%) n = 55</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Alter (Durchschnitt)</b>			0,227
< 59 Jahre	17 (37%)	28 (51%)	
> 59 Jahre	29 (63%)	27 (49%)	
<b>Geschlecht</b>			0,551
Männlich	21 (46%)	29 (53%)	
Weiblich	25 (54%)	26 (47%)	
<b>Komorbidität</b>			0,541
Nein	6 (13%)	5 (9%)	
Ja	40 (87%)	50 (91%)	
Kardiovaskuläre Erkrankungen	25 (54%)	36 (65%)	0,309
Pulmonale Erkrankungen	2 (4%)	12 (22%)	0,018*
Endokrine Erkrankungen	15 (33%)	16 (29%)	0,828
Rheumatische Erkrankungen	0 (0%)	1 (2%)	1,000
Dermatologische Erkrankungen	0 (0%)	5 (9%)	0,061
Nephrologische Erkrankungen	3 (6%)	11 (20%)	0,080
Hämatologische Erkrankungen	2 (4%)	6 (11%)	0,285
Gastrointestinale Erkrankungen	10 (22%)	8 (15%)	0,300
Infektiöse Erkrankungen	0 (0%)	1 (2%)	0,435
Corticoideinnahme	2 (4%)	20 (36%)	<0,001*
<b>Nikotinabusus</b>	4 (9%)	7 (13%)	0,148
<b>Alkoholabusus</b>	4 (9%)	3 (5%)	0,370
<b>Komplizierte Divertikulitis</b>	17 (37%)	40 (73%)	<0,001*

\* Signifikant (p<0,05) Fisher's exact Test

### **3.6 Beurteilung der Likelihood Ratios (LR) und Vorhersagewerte (PV) für Labortests (WBC/ CRP), Körpertemperatur und GTR-Expression zur Diagnose einer komplizierten Divertikulitis**

Die Sensitivität und Spezifität der Cut-off-Punkte von C-reaktivem Protein (CRP), Leukozytenzahl und der Körpertemperatur (Einheit: Celsius Grad) sind im Rahmen der ROC-Analyse in Abbildung 9 dargestellt. Es zeigte sich für keinen der angegebenen Werte eine signifikante Aussagekraft bezüglich Sensitivität und Spezifität zur Diagnose einer komplizierten Divertikulitis.

Die LRs und PVs für CRP (kalkulierter Cut-off-Value bei 0,84 mg/dl), Körpertemperatur (kalkulierter Cut-off-Value von 37,5 °C) und Leukozytenzahl (kalkulierter Cut-off-Value von 7400/ $\mu$ l) von Patienten mit Divertikulitis sind in Tabelle 11 dargestellt. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine fehlende Signifikanz der Entzündungsparameter (CRP:  $p=0,0016$ ; Leukozytenzahl:  $p=0,0021$ ) und Klinik (Körpertemperatur:  $p=0,044$ ). Im Vergleich dazu ist die GTR-Expression (kalkulierter Cut-off-Value bei 37% positiver Zellen) im Colon sigmoideum mit einem  $p$ -Wert  $<0,0001$  als signifikantes Kriterium für die Diagnose einer komplizierten Sigmadivertikulitis gezeigt worden.



**Abb. 9: ROC-Analyse der klinischen Parameter.** Diese zeigt für die Diagnose einer komplizierten Divertikulitis kalkulierte Cut-off-Values mit der höchsten diagnostischen Sicherheit für CRP, Leukozyten und Körpertemperatur.

**Tab. 11: Vergleich der klinischen Parameter.** Angegeben sind die kalkulierten Cut-off Values, Sensitivität, Spezifität, Positive Likelihood Ratios, Negative Likelihood Ratios, Positive Vorhersagewerte und Negative Vorhersagewerte von Labortests (CRP/ Leukozytenzahl), Körpertemperatur und GTR-Expression zum Screening auf komplizierte Divertikulitis.

	<b>CRP (mg/l)</b>	<b>Leukozytenzahl (Anzahl/<math>\mu</math>l)</b>	<b>Körpertemperatur (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>GTR – Expression (%)</b>
<b>Cut-off Value*</b> (Cut-off-Wert)	0,84	7400	37,5	37
<b>Sensitivität</b> (95% CI)	83,93 (71,7 – 92,4)	78,95 (66,1 – 88,6)	38,60 (26,0 – 52,4)	77,19 (64,2 – 87,3)
<b>Spezifität</b> (95% CI)	50,00 (33,8 – 66,2)	48,78 (32,9 – 64,9)	88,10 (74,4 – 96,0)	63,64 (47,8 – 77,6)
<b>+LR</b> (95% CI)	1,68 (1,2 – 2,3)	1,54 (1,1 – 2,2)	3,24 (2,3 – 4,6)	2,12 (1,6 – 2,8)
<b>-LR</b> (95% CI)	0,32 (0,2 – 0,6)	0,43 (0,2 – 0,8)	0,70 (0,3 – 1,6)	0,36 (0,2 – 0,7)
<b>+PV (%)</b> (95% CI)	26,3 (15,1 – 40,2)	24,6 (13,9 – 38,3)	40,7 (17,5 – 67,5)	31,0 (17,8 – 47,0)
<b>-PV (%)</b> (95% CI)	93,6 (81,6 – 98,8)	91,6 (79,1 – 97,9)	87,1 (77,9 – 93,5)	92,9 (82,9 – 98,0)
<b>AUC</b> (95% CI)	0,682 (0,57 – 0,77)	0,671 (0,5 – 0,7)	0,614 (0,5 – 0,7)	0,758 (0,6 – 0,8)
<b>p-Wert**</b>	0,0016	0,0021	0,044	<0,0001

\*Höchste diagnostische Exaktheit; +LR, Positive Likelihood Ratio; - LR, Negative Likelihood Ratio; CI, Vertrauensintervall; +PV, Positiver Vorhersagewert; -PV, Negativer Vorhersagewert; AUC, Area under the ROC curve.

\*\*Wenn  $p < 0,05$  lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Area under the ROC-Kurve sich signifikant von 0,5 unterscheidet und somit Evidenz vorliegt, dass der Labortest dafür geeignet ist die beiden Gruppen voneinander zu unterscheiden.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der komplizierten und unkomplizierten Divertikulitis in Bezug auf die Expression von GITR und MMP-9, Komorbidität und Glucocorticoid-Einnahme. Mittels Immunhistochemie haben wir eine erhöhte GITR-Expression in den infiltrierenden Leukozyten des Colon sigmoideums von Patienten mit komplizierter Divertikulitis nachgewiesen und lediglich eine dezente Expression von GITR bei Patienten mit unkomplizierter Divertikulitis. Diese Beobachtung könnte die Hypothese der proinflammatorischen Rolle von GITR stützen, die es über die Aktivierung regulatorischer T-Zellen ausübt [Shevach et al., 2006]. In dieser Arbeit ist die erhöhte GITR-Expression in den infiltrierenden Leukozyten bei komplizierter Divertikulitis sowohl durch die Immunfluoreszenz, als auch durch die Real-Time-PCR bestätigt wurden. Insbesondere Patienten welche Glucocorticoide einnahmen, zeigten eine hohe GITR-Expression. Diese war zwar nicht spezifisch mit der Glucocorticoid-Einnahme assoziiert, zeigte sich jedoch hoch sensitiv. 91% der Patienten, welche Glucocorticoide einnahmen wiesen eine hohe GITR-Expression auf. Hingegen fand sich nur bei zwei Patienten mit niedriger GITR-Expression eine Begleitmedikation mit Glucocorticoiden. Frühere Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von Glucocorticoiden und einer erhöhten Perforationsgefahr bei der akuten Sigmadivertikulitis gezeigt [Canter et al., 1971; Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2006; ReMine et al., 1980; Warshaw et al., 1976]. Chapman et al. zeigten in einer retrospektiven Serie mit 150 Patienten eine deutlich erhöhte Perforationsrate (43% / 14%), postoperative Morbidität (65% / 24%) und Mortalität (39% / 2%) bei Patienten die Glucocorticoide einnahmen. Diese Ergebnisse sind konsistent mit früheren Beobachtungen von ReMine et al., welche ebenfalls eine erhöhte Morbidität und Mortalität bei Patienten mit Divertikulitis und gleichzeitig bestehender Immunsuppression gezeigt haben. Die Autoren interpretierten diese Beobachtung so, dass ein geschwächtes Immunsystem durch die eingeschränkte Lymphozytenfunktion nur zu unspezifischen Symptomen führt und somit die Diagnosestellung erschwert. Dhabhar et al. haben anhand eines Tiermodells gezeigt, dass pharmakologisch hohe Dosierungen und die chronische Einnahme von Glucocorticoiden zu einer Schwächung des Immunsystems führen.

Insbesondere Dexamethason übt durch seine hohe Affinität zu Glucocorticoid-Rezeptoren diesen Effekt aus [Dhabhar et al., 1999]. Das stimmt mit Ergebnissen von Shin et al. überein: diese zeigten zudem eine durch Dexamethason ausgelöste Expression von GTR [Shin et al., 2003]. Unter Beachtung der oben genannten Studien könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die Einnahme von Glucocorticoiden die GTR-Expression fördert und dadurch einen komplizierten Verlauf begünstigt. Dementsprechend lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Corticoid-Einnahme, GTR-Expression und Morbidität / Mortalität vermuten. Die fehlende Spezifität lässt sich vermutlich auch auf die geringe Studienpopulation zurückführen. Ferner legen die Ergebnisse von Nocentini et al. nahe, dass eine hohe Expression von GTR auch durch andere Stimuli als Glucocorticoide verursacht sein kann, wie z.B. proinflammatorische Umstände, welche auch im Rahmen einer akuten Sigmadivertikulitis vorliegen [Nocentini et al., 1997]. Auch wenn die erhöhte GTR-Expression nicht ausschließlich auf Corticoide zurückzuführen ist, so könnte sie nach eigenen Ergebnissen dennoch durch sie begünstigt werden.

Des Weiteren ist in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Expression von MMP-9 in infiltrierenden Leukozyten mittels Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und Real-Time-PCR nachgewiesen wurden. Wie schon beim molekularen Marker GTR war die Expression im Colon sigmoideum von Patienten mit komplizierter Divertikulitis signifikant höher als in der Gruppe der Patienten mit unkomplizierter Divertikulitis. MMP-9, welches insbesondere in mononukleären Leukozyten und Granulozyten exprimiert wird, spielt eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungsreaktionen [Lee et al., 2003; Medina et al., 2006; von Lampe et al., 2000]. Kirkegaard et al. beschrieben in einer Serie mit 11 Morbus Crohn-Patienten MMP-9 als möglichen Verursacher der Fistelbildung und machte hierfür die verstärkte MMP-9-induzierte Proteolyse verantwortlich [Kirkegaard et al., 2004]. Zudem unterstützt MMP-9 die Extravasation neutrophiler Granulozyten in entzündliches Gewebe. Eine ausgeprägte Expression findet sich insbesondere im akuten Entzündungsstadium und weniger bei chronischen Entzündungsreaktionen [Kirkegaard et al., 2004]. Das stimmt mit Ergebnissen von Medina et al. überein, welche ebenfalls eine durch MMP-9 verursachte Proteolyse der Mukosa bei entzündlichen Erkrankungen des GI-Traktes beobachtet haben [Medina et al., 2006].

Die in dieser Arbeit beobachtete verstärkte Expression lässt vermuten, dass MMP-9 bei Divertikulitis eine Infiltration neutrophiler Granulozyten fördert und somit einen komplizierten Verlauf begünstigt. Daneben spielt MMP-9 als denaturierende Gelatinase eine Rolle in der Zerstörung der Extrazellulärmatrix. Die Spaltung von Kollagen IV, Kollagen V, Fibronectin und Laminin, welche beim Morbus Crohn für die Fistelbildung verantwortlich gemacht wird, könnte dementsprechend ursächlich für die Perforation im Bereich des Colon sigmoideums bei komplizierten Verläufen sein [Kirkegaard et al., 2004; Lee et al., 2003]. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass MMP-9 in dieser Arbeit auch in der Gruppe der Patienten mit unkomplizierter Divertikulitis exprimiert wird. Diese Expression ist jedoch schwächer, als in der Gruppe der Patienten mit komplizierter Divertikulitis.

Die Resultate dieser Arbeit stehen in Kontrast zu denen anderer Studien, welche zeigten dass MMP-9 kaum [Mimura et al., 2004] oder nicht verstärkt [Rosemar et al., 2007] bei komplizierter Divertikulitis exprimiert wird. Ursächlich hierfür könnte die Wahl des Patientenkollektives sein. Da für die Divertikulitis nach wie vor zahlreiche Einteilungen existieren, variiert die Zuordnung der einzelnen Fälle zu den bekannten Formen stark bzw. erfolgte überhaupt keine weiterführende Einteilung. Auch wurden in einer Arbeit von Mimura et al. Patienten mit kolorektalem Karzinom als Kontrollgruppe verwendet, was die Vergleichbarkeit mit dieser Arbeit deutlich erschwert [Mimura et al., 2004]. Außerdem weisen diese Arbeiten jeweils ein sehr kleines Patientenkollektiv auf, während in der vorliegenden Arbeit ein Kollektiv von 101 Patienten untersucht wurden ist [Kirkegaard et al., 2004; Mimura et al., 2004].

Weiterhin lässt sich vermuten, dass die Aktivierung von GITR für eine verstärkte MMP-9-Expression verantwortlich ist [Lee et al., 2003]. In dieser Arbeit ist bei der komplizierten Divertikulitis in der Regressionsanalyse eine starke direkte Korrelation zwischen GITR- und MMP-9-Expression nachgewiesen wurden. Diese Beobachtung könnte die funktionelle Beziehung zwischen beiden Molekülen in der Kolonwand von Patienten mit akuter Divertikulitis stützen. GITR fördert zum einen direkt die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Lamina propria. Zum anderen stimuliert es direkt und indirekt durch die Aktivierung der nötigen Metabolite (z.B.  $\text{INF-}\gamma$ ) die MMP-9-Expression [Lee et al., 2003]. Zusammen mit der inflammatorischen Reaktion, welche GITR ausübt, könnte die Gewebedenaturierung durch MMP-9 die Veränderungen in der Kolonwand komplizierter Divertikulitis-Fälle erklären.



Aufgrund der geringen Mortalitätsrate war es in dieser Arbeit nicht möglich ein Mortalitätsrisiko zu kalkulieren. Aus diesem Grund erfolgte die Analyse relevanter Komorbiditäten, welche mit dem klinischen "Staging" der Divertikulitis nach Hansen und Stock, assoziiert wurden.

Es fand sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Komorbiditäten und dem Vorliegen einer komplizierten Divertikulitis. Hierbei überwogen insbesondere die Kardiovaskulären Erkrankungen (59%), wie z.B. Arterielle Hypertonie. Bereits Chapman et al. haben gezeigt, dass das Vorliegen eines Diabetes mellitus, kollagenös-vaskulärer Erkrankungen und ein geschwächtes Immunsystem die Morbidität und Mortalität von Patienten mit Divertikulitis deutlich erhöhen [Chapman et al., 2005]. Daneben findet sich Übereinstimmung mit einer Studie von Lorimer et al., welche eine starke Assoziation zwischen einem Charlson-Komorbiditäts-Index von  $\geq 3$  und dem Auftreten einer komplizierten Divertikulitis gezeigt haben. Der Charlson-Score gibt dabei die Summe relevanter Begleiterkrankungen hinsichtlich der Lebenserwartung an [Lorimer et al., 2007]. Die Ergebnisse legen nahe, dass ein im Rahmen von systemischen Erkrankungen geschwächtes Immunsystem die Entwicklung einer komplizierten Divertikulitis begünstigt.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, besteht eine starke Assoziation zwischen der Glucocorticoideinnahme und dem Auftreten einer komplizierten Divertikulitis. Glucocorticoide führen zu einer Immunsuppression, indem sie die humorale und zelluläre Immunantwort unterdrücken. Dhabhar et al. haben jedoch anhand ihres Tiermodells gezeigt, dass Glucocorticoide in niedrigen Dosierungen eine immunstimulatorische Funktion ausüben. In diesem Zusammenhang induzieren sie die Produktion von Akut-Phase-Proteinen, stimulieren die T-Zell-Mitogenese und führen zu einer Steigerung der allergischen Reaktion vom Spättyp. Ferner besitzen sie die Fähigkeit durch Kontrolle der Genexpression, Enzymaktivität und Zellmigration die Leukozytenfunktion zu modulieren [Dhabhar et al., 1999]. In hohen Dosierungen wirken Glucocorticoide jedoch immunsuppressiv. Das stimmt mit Ergebnissen von Wiegers et al. überein, die ebenfalls einen immunsuppressiven Effekt hoher Glucocorticoiddosen nachgewiesen haben. Die Immunsuppression üben sie durch die Unterdrückung der Makrophagenfunktion und T-Lymphozyten-Mitogenese aus [Wiegers et al., 1993]. Lim et al. haben diese Beobachtung anhand

einer Studie mit Peritonealmakrophagen von Ratten, welche sowohl Glucocorticoid- als auch Mineralcorticoid-Rezeptoren exprimieren, bestätigt. Auch hier führten niedrige Glucocorticoid-Level über den Glucocorticoid-Rezeptor, zu einer Aktivierung des Immunsystems. Durch therapeutisch hohe Konzentrationen synthetischer Glucocorticoide, wie sie für die Therapie von Autoimmunerkrankungen vonnöten sind wird das Immunsystem jedoch wunschgemäß geschwächt [Lim et al., 2007].

Bereits Chapman et al. beobachteten, dass die Einnahme von Glucocorticoiden zu einer erhöhten Perforationsgefahr und Mortalität führt. Jedoch wurde in dieser Studie nicht untersucht, aus welcher Indikation die Glucocorticoide verordnet und auf welche Art und Weise sie eingenommen worden sind [Chapman et al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Einnahme der Glucocorticoide nicht nur oral erfolgte, sondern auch inhalativ. Der Anteil des inhalativ applizierten Glucocorticoids, der tatsächlich in die Lunge gelangt, ist vor allem von der pulmonalen Bioverfügbarkeit abhängig. Nach der Inhalation werden ca. 40-90% der Dosis geschluckt und stehen somit der systemischen Absorption im GI-Trakt zur Verfügung. Dieser oral absorbierte Anteil der Glucocorticoiddosis hat keinen therapeutischen Nutzen, kann jedoch sehr wohl systemische Nebenwirkungen verursachen. Hinzu kommt, dass der Anteil der Dosis, welcher in den Lungen deponiert und nicht sofort verbraucht wird, ebenfalls systemisch absorbiert wird und somit Nebenwirkungen verursachen kann [Lipworth et al., 2000]. Hier zeigt sich Übereinstimmung mit einer Studie von Lipworth et al., welche diese Mechanismen der Glucocorticoidabsorption auch für die intranasale Applikation beobachtet haben. Nach dem intranasalen Transport erfolgt die rasche mukoziliäre Clearance von der Nase bis zum Rachen und somit das Schlucken von bis zu 70% der applizierten Dosis [Lipworth et al., 2000]. Auf Grundlage dieser Beobachtungen lässt sich vermuten, dass Glucocorticoide den GI-Trakt beeinflussen, auch wenn sie inhalativ appliziert werden. Diese These wird durch die Beobachtung der vorliegenden Arbeit unterstützt, dass ein Großteil der Patienten die Glucocorticoide inhalativ zu sich genommen hat.

Die in dieser Arbeit beobachtete Morbiditäts-Steigerung unter Glucocorticoid-Einnahme deckt sich mit dem bereits von Chapman et al. beobachteten Anstieg der Morbiditätsrate von 24% auf 65% und der Mortalitätsrate von 2% auf 39% unter Immunsuppression [Chapman et al., 2005]. Kommt es durch

Glucocorticoideinnahme zu Komplikationen, so sind die Symptome durch die Immunsuppression in der Regel sehr unspezifisch. Die Diagnose einer potentiell tödlichen Darmperforation wird häufig zu spät gestellt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass für immunsupprimierte Patienten mit Sigmadivertikulitis andere Therapieempfehlungen gelten sollten als für nicht immunsupprimierte Patienten.

Die Indikationsstellung zur Sigmaresektion hat sich in den letzten Jahren zunehmend verändert. Die Annahme, dass mit zunehmenden Divertikulitis-Schüben Morbidität und Mortalität steigen beruhte auf den Beobachtungen von Parks et al. aus den 70er Jahren, einer Zeit in der die radiologische Bildgebung erst ihren Anfang nahm. Heute steht die Computertomographie praktisch jeder Klinik zur Verfügung und zeichnet sich durch hohe Sensitivität und Spezifität aus. Bei Patienten mit unklarem Verlauf kann somit schnell ein kompliziertes Geschehen wie z.B. eine Perforation mittels Bildgebung ausgeschlossen werden. Yoo et al. haben in einer retrospektiven Studie mit 112 Patienten, welche an Divertikulitis erkrankten gezeigt, dass 85,7% im Rahmen der Diagnostik ein CT erhalten haben. Bei 38,4% wurde so eine freie Perforation diagnostiziert, welche anschließend operativ versorgt werden musste [Yoo et al., 2008].

Anders stellt sich die Situation bei Patienten mit chronischer Divertikulitis dar. Chapman et al. zeigten, dass 75% der erstmalig Betroffenen nie wieder eine Divertikulitis-Episode entwickeln und die 25% welche rückfällig werden keine Perforationen aufweisen. 78% der Patienten mit Perforationen sind gemäß der Daten von Chapman et al. in ihrem Leben noch nie an einer Divertikulitis erkrankt gewesen [Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2006]. Die Erste Episode gilt daher als die aggressivste mit der höchsten Perforationsgefahr und Mortalität, während Folgeepisoden in der Regel komplikationsarm verlaufen und somit eine elektive Sigmaresektion nicht zwingend erforderlich machen [Binda et al., 2012; Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2006].

Dies gilt jedoch nicht für den immunsupprimierten Patienten. Eine Immunsuppression führt unabhängig ob sie exogen durch eine Glucocorticoid-Therapie oder endogen durch z.B. einen Hyperkortisolismus hervorgerufen wird zu einer erhöhten Perforationsgefahr. So zeigten Tyau et al. in einer retrospektiven Studie, dass die Perforationsrate bei immunsupprimierten Patienten um 29% höher lag, als bei nicht immunsupprimierten Patienten [Tyau et al., 1991]. Insbesondere die ersten drei Wochen der Glucocorticoid-Therapie gehen mit einem erhöhten Perforationsrisiko

einher, wobei auch die Dosierung von entscheidender Bedeutung ist. Je höher dosiert, desto höher ist auch das Risiko für eine Perforation [Re Mine et al., 1980]. Weiner et al. empfehlen aus diesem Grund bei Patienten mit bekannter Divertikulitis eine von vornherein niedrigere Dosierung anzuwenden [Weiner et al., 1993]. Da Glucocorticoide die Symptome einer akuten Sigmadivertikulitis maskieren können, indem sie die Entzündungsreaktion vermindern, sind Patienten welche unter Immunsuppression stehen und mit Bauchschmerzen bzw. Fieber auffallen genauestens zu untersuchen und zu beobachten [Re Mine et al., 1980; Weiner et al., 1993]. Unter anderem aufgrund der erschwerten Diagnose liegt die Mortalität bei immunsupprimierten Patienten nach Tyau et al. bei bis zu 39% [Tyau et al., 1991]. Um das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko für dieses Patientenkollektiv möglichst gering zu halten gilt hier nach wie vor die Therapieempfehlung zur frühzeitigen elektiven Sigmaresektion [Chapman et al., 2005; Chapman et al., 2006]. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Therapieempfehlung.

Zur Unterscheidung zwischen komplizierter und unkomplizierter Divertikulitis erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Analyse der klinischen Parameter (CRP, WBC und Temperatur) und von GITR. Die Ergebnisse zeigten einen scheinbar signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen für die klinischen Parameter (p-Werte), dabei sind die entsprechenden Cut-off-Werte mit der höchsten diagnostischen Exaktheit (CRP: 0,84 mg/l; Leukozytenzahl: 6900/ $\mu$ l; Körpertemperatur: 37,6 °C) jedoch nur innerhalb der normalen Parameter kalkuliert worden. Für keinen der angegebenen Werte zeigte sich eine signifikante Spezifität und Sensitivität bezüglich der Diagnose einer komplizierten Divertikulitis. Das gleiche gilt für die kalkulierten Likelihood Ratios und Positiven Vorhersagewerte für CRP, WBC und Körpertemperatur. Sensitivität und Spezifität zeigten sich jedoch als relativ stabile Test-Eigenschaften. Ebenso die zusammenfassende Darstellung ihrer reziproken Beziehung zueinander in einer ROC-Kurve. Im Gegensatz zu den klinischen Parametern zeigte sich GITR hoch sensitiv bei der komplizierten Form der Divertikulitis.

Trotz hoher Inzidenz und Prävalenz ist die Unterscheidung zwischen komplizierter und unkomplizierter Divertikulitis auch ohne Immunsuppression bei unspezifischen klinischen Symptomen nicht immer einfach [Comparato et al., 2007; Jacobs, 2007]. Bei noch nicht vollständig verstandener Pathophysiologie und Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes sind Diagnose und Therapie noch nicht standardisiert

und permanenten Veränderungen unterworfen [Jurowich et al., 2011; von Rahden et al., 2012]. Im klinischen Alltag sollen die Kombination aus Klinik (Temperatur) und Laborparametern (CRP und Leukozytose) erste Hinweise auf die Schwere des Krankheitsbildes geben [Stollman et al., 1999].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl Labortests als auch die klinischen Daten bei der Unterscheidung zwischen komplizierter und unkomplizierter Divertikulitis versagen. Diverse Studien haben sich bereits mit der Aussagekraft dieser Labortests beschäftigt. So zeigten Käser et al. in einer retrospektiven Studie mit 247 Patienten, dass die WBC zwar im Wilcox-Test signifikant mit einer Perforation des Colon sigmoideums korrelierten. In der anschließenden Regressionsanalyse war jedoch keinerlei Signifikanz nachweisbar. Es zeigte sich allerdings eine signifikante Korrelation zwischen Perforation und einem CRP > 20 mg/dl, während ein CRP < 5 mg/dl eine Perforation eher unwahrscheinlich machte [Käser S.A. et al., 2010]. Erhöhte Entzündungsparameter im Blut insbesondere ein erhöhtes CRP können dem behandelten Arzt somit Hinweise auf einen komplizierten Verlauf geben. Wenn zusätzlich eine eindeutige Klinik mit linksseitigen Unterbauchschmerzen, Schmerzzunahme bei Bewegung und fehlendem Erbrechen vorliegt, kann die diagnostische Korrektheit nach Andeweg et al. bei bis 86% liegen [Andeweg et al., 2011]. Schwierig wird die Diagnostik bei Patienten, die weder sehr hohe noch niedrige Entzündungswerte oder eine eindeutige Klinik vorweisen können. In diesem Zusammenhang stellt sich GITR als neuer Screeningfaktor zur Diskussion. Die eigenen Resultate legen nahe, dass bei einer erhöhten GITR-Expression eine erhöhte Wahrscheinlichkeit vorliegt, an der komplizierten Form der Divertikulitis zu erkranken. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zu CRP, Leukozytose und Fieber eine Erhöhung von GITR einen eindeutigen Hinweis auf komplizierende Faktoren, wie z.B. eine Perforation geben könnte. Da sich die eigenen Beobachtungen jedoch nur auf die immunhistochemische Analyse beziehen bedarf es diesbezüglich weiterer Untersuchungen.

In diesem Fall könnte das Augenmerk auf der Analyse von sGITR liegen. Bei sGITR handelt es sich um die lösliche Form des Mitglieds der TNF-Rezeptor-Familie. Shin et al. zeigten in ihrer Arbeit am Mausmodell, dass die Injektion von sGITR zu einer inflammatorischen Reaktion des Peritoneums führt. In vorangegangenen Studien sind unter anderem die löslichen Formen von CD27 und CD137, welche in ihrer Zusammensetzung große Ähnlichkeit mit GITR haben, in hoher Korrelation im Serum

von Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Rheumatoider Arthritis nachgewiesen wurden [Shin et al., 2003]. Als weitere Untersuchung wäre jetzt die Analyse von sGTR im Serum von Patienten mit Divertikulitis sinnvoll. Sollte sich hierbei ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit komplizierter und unkomplizierter Divertikulitis herausstellen, hätte man einen neuen diagnostischen Marker zur besseren Differenzierung gewonnen und könnte somit schneller und einfacher zu einer Therapieentscheidung kommen.

## 7. Zusammenfassung

Immunsuppression und Glucocorticoid-Einnahme wurden bereits als Risikofaktoren für die Entwicklung eines komplizierten Verlaufs der akuten Sigmadivertikulitis erkannt. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Ziel dieser Arbeit war es den Glucocorticoid-induzierten TNF Rezeptor (GITR) und die Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) als potentielles molekulares Bindeglied zwischen Immunsuppression und der Entwicklung einer komplizierten Form der Divertikulitis zu untersuchen.

Hiefür erfolgte die Analyse von GITR und MMP-9 auf Proteinebene (Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, Doppelmarkierungen) und mRNA-Ebene (semiquantitative RT-PCR) im Colon sigmoideum von Patienten, welches aufgrund einer Sigmadivertikulitis (kompliziert und unkompliziert) reseziert worden war. Abschließend folgte die Korrelation mit den klinischen Parametern. Die Wertigkeit der GITR-Expression als diagnostischer Test wurde mittels ROC-Analyse untersucht.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten eine hohe GITR- und MMP-9-Expression im entzündlichen Infiltrat bei komplizierten Sigmadivertikulitiden, während sich bei den unkomplizierten Formen nur eine geringe Expression nachweisen ließ. Die immunhistochemischen Ergebnisse sind auf mRNA-Ebene bestätigt worden. Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zeigte eine deutliche Korrelation zwischen MMP-9- und GITR-Expression ( $R^2=0,6678$ ;  $p<0,001$ ). Eine hohe GITR-Expression war signifikant mit der Einnahme von Glucocorticoiden assoziiert ( $p<0,001$ ). Die ROC-Analyse bestätigte die Überlegenheit von GITR als diagnostischer Test gegenüber Labortests (CRP, WBC) und klinischen Parametern (Körpertemperatur) bei der Differenzierung zwischen komplizierter und unkomplizierter Divertikulitis.

Die erhöhte MMP-9-Expression, welche durch GITR induziert wird, könnte die bereits bekannten Veränderungen der Kolonwand bei Patienten mit komplizierter Divertikulitis erklären. Darüber hinaus lassen diese Ergebnisse GITR als mögliches molekulares Bindeglied zwischen Glucocorticoid-Einnahme und komplizierten Verlaufsformen der Sigmadivertikulitis vermuten und unterstützen somit die frühzeitige Indikation zur elektiven Sigmaresektion bei Immunsuppression.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Andeweg CS, Knobben L, Hendriks JC, Bleichrodt RP, van Goor H: How to diagnose acute left-sided colonic diverticulitis: proposal for a clinical scoring system. *Ann Surg* 2011; 253(5): 940-6.
2. Bassotti G, Battaglia E, Bellone G et al. Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease. *J Clin Pathol* 2005; 58: 973-977.
3. Bassoti G, Chistolini F, Morelli A: Pathophysiological aspects of diverticular disease of colon and role of large bowel motility. *World J Gastroenterol* 2003; 9(10): 2140-2142.
4. Baumgartner-Nielsen J, Vestergaard C, Thestrup-Pedersen K, Deleuran M, Deleuran B: Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR) and its ligand (GITRL) in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 2006; 86(5): 393-398.
5. Binda GA, Arezzo A, Serventi A, Bonelli L: Multicentre observational study of the natural history of left-sided acute diverticulitis. *Brit J Surg* 2012; 99: 276-285.
6. Bode MK, Karttunen TJ, Makela J, Risteli L, Risteli J: Type I and III Collagens in Human Colon Cancer and Diverticulitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 747-752.
7. Canter JW, Shorb PE Jr: Acute perforation of colonic diverticula associated with prolonged adrenocorticosteroid therapy. *Am J Surg* 1971; 121: 46-51.
8. Chapman J, Davies M, Wolff B, Dozois E, Tessier D, Harrington J, Larson D: Complicated diverticulitis: is it time to rethink the rules? *Ann Surg* 2005; 242(4): 576-581; discussion 581-573.
9. Chapman JR, Dozois EJ, Wolff BG, Gullerud RE, Larson DR. Diverticulitis: a progressive disease? Do multiple recurrences predict less favorable outcomes? *Ann Surg* 2006; 243(6): 876-830; discussion 880-873.
10. Comparato G, Pilotta A, Franzé A, Franceschi M, Di Mario F: Diverticular disease in the elderly. *Dig Dis* 2007; 25: 151-159.
11. Comparato G, Di Mario F: Recurrent diverticulitis. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42(10): 1130-1134.



12. Constantinides VA, Tekkis PP, Athanasiou T: Primary Resection with anastomosis vs. Hartmann's procedure in nonelective surgery acute colonic diverticulitis: a systematic review. *Dis Colon Rectum* 2006; 49: 966-981.
13. Cortesini C, Pantalone D: Usefulness of colonic motility study in identifying patients at risk for complicated diverticular disease. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 339-342.
14. Cuzzocrea S, Nocentini G, Di Paola R, Mazzon E, Ronchetti S, Genovese T, Muia C, Caputi AP, Riccardi C: Glucocorticoid-induced TNF receptor family gene (GITR) knockout mice exhibit a resistance to splanchnic artery occlusion (SAO) shock. *J Leukoc Biol* 2004; 76(5): 933-940.
15. Cuzzocrea S, Nocentini G, Di Paola R, Agostini M, Mazzon E, Ronchetti S, Crisafulli C, Esposito E, Caputi AP, Riccardi C: Proinflammatory role of glucocorticoid-induced TNF receptor-related gene in acute lung inflammation. *J Immunol* 2006; 177(1): 631-641.
16. Dhabhar FS, McEwen BS: Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(3): 1059-1064.
17. Etzioni DA, Mack TM, Beart RW, Jr., Kaiser AM: Diverticulitis in the United States: 1998-2005: changing patterns of disease and treatment. *Ann Surg* 2009; 249(2): 210-217.
18. Gallagher EJ: Clinical utility of likelihood ratios. *Ann Emerg Med* 1998; 31(3): 391-397.
19. Goldstein NS, Ahmad E: Histology of the mucosa in sigmoid colon specimens with diverticular disease: observations for the interpretation of sigmoid colonoscopic biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 438-444.
20. Goh H, Bourne R: Non-steroidal anti-inflammatory drugs and perforated diverticular disease: a case-control study. *Ann R Coll Surg Engl* 2002; 84: 93-96.
21. Grimm M, Gasser M, Bueter M, Strehl J, Wang J, Nichiporuk E, Meyer D, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Thalheimer A: Evaluation of immunological escape mechanisms in a mouse model of colorectal liver metastases. *BMC Cancer*; 10: 82.
22. Hawkins RC: The Evidence Based Medicine approach to diagnostic testing: practicalities and limitations. *Clin Biochem Rev* 2005; 26(2): 7-18.

23. Hjern F, Josephson T, Altman D, Holmstrom B, Johansson C: Outcome of younger patients with acute diverticulitis. *Br J Surg* 2008; 95(6): 758-764.
24. Huizinga JD, Waterfall WE, Stern HS: Abnormal response to cholinergic stimulation in the circular muscle layer of the human colon in diverticular disease. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34(7): 683-688.
25. Humes DJ, Simpson J, Smith J et al. Visceral hypersensitivity in symptomatic diverticular disease and the role of neuropeptides and low grade inflammation. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2012; 24: 318-e163.
26. Jacobs DO: Clinical practice. Diverticulitis. *N Engl J Med* 2007; 357(20): 2057-2066.
27. Janes S, Meagher A, Frizelle FA: Elective surgery after acute diverticulitis. *Brit J Surg* 2005; 92: 133-142.
28. Jurowich CF, Jellouschek S, Adamus R, Loose R, Kaiser A, Isbert C, Germer CT, von Rahden BHA: How complicated is complicated diverticulitis? – Phlegmonous diverticulitis revisited. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26: 1609-1617.
29. Käser SA, Fankhauser G, Glauser PM, Toia D, Maurer CA.: Diagnostic value of inflammation markers in predicting perforation in acute sigmoid diverticulitis. *World J Surg* 2010; 34(11): 2717-22.
30. Kamimura Y, Iwai H, Piao J, Hashiguchi M, Azuma M: The Glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein (GITR)-GITR ligand pathway acts as a mediator of cutaneous dendritic cell migration and promotes T cell-mediated acquired immunity. *J Immunol* 2009; 182: 2708-2716.
31. Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J: Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 2004; 53(5): 701-709.
32. Klarenbeek BR, Veenhof AA, Bergamaschi R: Laparoscopic sigmoid resection for diverticulitis decreases major morbidity rates: a randomized control trial: short-term results of the sigma trial. *Ann Surg* 2009; 249(1): 39-44.
33. Klinge U, Rosch R, Junge K, Krones CJ, Stumpf M, Lynen-Jansen P, Mertens PR, Schumpelick V: Different matrix micro-environments in colon cancer and diverticular disease. *Int J Colorectal Dis* 2006; 22: 515-520.

34. Krausz LT, Bianchini R, Ronchetti S, Fettucciari K, Nocentini G, Riccardi C: GITR-GITRL system, a novel player in shock and inflammation. *Scien Wo Jour* 2007; 7: 533-566.
35. Lee HS, Shin HH, Kwon BS, Choi HS: Soluble glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (sGITR) increased MMP-9 activity in murine macrophage. *J Cell Biochem* 2003; 88(5): 1048-1056.
36. Lim HY, Muller N, Herold MJ, van den Brandt J, Reichardt HM: Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology* 2007; 122(1): 47-53.
37. Lipworth BJ, Jackson CM: Safety of inhaled and intranasal corticosteroids: lessons for the new millennium. *Drug Saf* 2000; 23(1): 11-33.
38. Lorimer JW, Doumit G: Comorbidity is a major determinant of severity in acute diverticulitis. *Am J Surg* 2007; 193(6): 681-685.
39. Meagher AP, Frizelle FA, Janes S: Practice parameters for sigmoid diverticulitis. *Dis Colon Rectum* 2007; 50(5): 683-685.
40. Medina C, Radomski MW: Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J Pharm Exp Ther* 2006; 318: 933-938.
41. Mimura T: Pathophysiology of diverticular disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 563-576.
42. Mimura T, Bateman AC, Lee RL, Johnson PA, McDonald PJ, Talbot IC, Kamm MA, MacDonald TT, Pender SL: Up-regulation of collagen and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in colonic diverticular disease. *Dis Colon Rectum* 2004; 47(3): 371-378; discussion 378-379.
43. Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardio Res* 2005; 12.002: 562-573.
44. Nagase H, Woesser JF Jr: Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 21491-21494.
45. Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati G, Riccardi C: A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(12): 6216-6221.
46. Nocentini G, Cuzzocrea S, Bianchini R, Mazzon E, Riccardi C: Modulation of acute and chronic inflammation of the lung by GITR and its ligand. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1107: 380-391.

47. Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C: GITR/ GITRL: More than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol* 2007; 37: 1165-1169.
48. Painter NS, Burkitt DP: Diverticular disease of the colon: A deficiency disease of western civilization. *Br Med J* 1971; 2: 450-454.
49. Parra-Blanco, A: Colonic diverticular disease: pathophysiology and clinical picture. *Digestion* 2006; 73: 47-57.
50. Peery AF, Barrett PR, Park D, Rogers AJ, Galanko JA, Martin CF, Sandler RS: A high-fiber diet does not protect against asymptomatic diverticulosis. *Gastroenterol* 2012; 142: 266-272.
51. Petruzzello L, Iacopini F, Bulajic M, Shah S, Costamagna G: Review article: uncomplicated diverticular disease of the colon. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23(10): 1379-1391.
52. Piroth W, Haage P, Hohl C, Günther RW: Bildgebende Diagnostik der Sigmadivertikulitis. *Dtsch Arztebl* 2007; 104(49): A 3400-07.
53. Quigley EMM: Gut Microbiota, Inflammation and Symptomatic Diverticular Disease. *New Insights into an old and neglected Disorder. J Gastrointestin Liver Dis* 2010; 19(2): 127-129.
54. Rafferty J, Shellito P, Hyman NH, Buie WD: Practice parameters for sigmoid diverticulitis. *Dis Colon Rectum* 2006; 49(7): 939-944.
55. Ratzinger G, Stoitzner P, Ebner S: Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migrations of langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *J Immunol* 2002; 168: 4361-4371.
56. Reichardt HM. Immunomodulatory activities of glucocorticoids: insights from transgenesis and gene targeting. *Curr Pharm Des* 2004; 10(23): 2797-2805.
57. ReMine SG, McIlrath DC: Bowel perforation in steroid treated patients. *Ann Surg* 1980; 3: 581-586.
58. Riemann JF, Galle PR, Fischbach W: Gastroenterologie. Das komplette Referenzwerk für Klinik und Praxis. Thieme 2007; 3-13-158361-4: 789-805.
59. Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, Ayroldi E, Riccardi C: GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* 2004; 34: 613-622.

60. Rosemar A, Ivarsson ML, Borjesson L, Holmdahl L: Increased concentration of tissue-degrading matrix metalloproteinases and their inhibitor in complicated diverticular disease. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42(2): 215-220.
61. S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/ Divertikulitis. *Z Gastroenterol* 2014; 52(07): 663-710.
62. Sandler RS, Everhart JE, Donowitz M, Adams E, Cronin K, Goodman C, Gemmen E, Shah S, Avdic A, Rubin R: The Burden of Selected Digestive Diseases in the United States. *Gastroenterol* 2002; 122: 1500-1511.
63. Santucci L, Agostini M, Bruscoli S, Mencarelli A, Ronchetti S, Ayroldi E, Morelli A, Baldoni M, Riccardi C: GITR modulates innate and adaptive mucosal immunity during the development of experimental colitis in mice. *Gut* 2007; 56: 52-60.
64. Sautter RD, Ziffren SE: Adrenocortical steroid therapy resulting in unusual gastrointestinal complications. *Arch Surg* 1959; 79: 641-649.
65. Sheth AA, Longo W, Floch MH: Diverticular Disease and Diverticulitis. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1550-1556.
66. Shevach EM, Stephens GL: The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nature* 2006; 6: 613-618.
67. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S: Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3(2): 135-142.
68. Shin HH, Lee MH, Kim SG, Lee YH, Kwon BS, Choi HS: Recombinant glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (rGITR) induces NOS in murine macrophage. *FEBS Lett* 2002; 514(2-3): 275-280.
69. Shin HH, Kim SG, Lee MH, Suh JH, Kwon BS, Choi HS. Soluble glucocorticoid-induced TNF receptor (sGITR) induces inflammation in mice. *Exp Mol Med* 2003; 35(5): 358-364.
70. Simpson J, Scholefield JH, Spiller RC: Pathogenesis of colonic diverticula. *Br J Surg* 2002; 89: 546-554.
71. Stollman NH, Raskin JB: Diagnosis and management of diverticular disease of the colon in adults. Ad Hoc Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(11): 3110-3121.

72. Strate LL, Liu YL, Syngal S, Aldoori WH, Giovannucci EL: Nut, Corn and Popcorn Consumption and the Incidence of Diverticular Disease. *JAMA* 2008; 300(8): 907-914.
73. Strate LL, Liu YL, Aldoori WH, Syngal S, Giovannucci EL: Obesity increases the risks of diverticulitis and diverticular bleeding. *Gastroenterol* 2009; 136: 115-122.
74. Strate LL, Liu YL, Aldoori WH, Giovannucci EL: Physical activity decreases diverticular complications. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 1221-1230.
75. Strate LL, Liu YL, Huang ES, Giovannucci EL; Chan AT: Use of aspirin or nonsteroidal anti-inflammatory drugs increases risk for diverticulitis and diverticular bleeding. *Gastroenterol* 2011; 140: 1427-1433.
76. Stumpf M, Cao W, Klinge U, Klosterhalfen B, Kasperk R, Schumpelick V: Increases distribution of collagen type III and reduced expression of matrix metalloproteinases 1 in patients with diverticular disease. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16: 271-275.
77. Tone M, Tone Y, Adams E, Yates SF, Frewin MR, Cobbold SP, Waldmann H: Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *PNAS*; 100(25): 15059-15064.
78. Tyau ES, Prystowsky JB, Joehl RJ, Nahrwold DL: Acute diverticulitis: a complicated problem in the immunocompromised patient. *Arch Surg* 1991; 126(7): 855-858.
79. van Olfen RW, Koning N, van Gisbergen K, Wensveen FM, Hoek RM, Boon L, Hamann J, van Lier R, Nolte MA: GITR triggering induces expansion of both effector and regulatory CD4+ T cells in vivo. *J Immunol* 2009; 182: 7490-7500.
80. von Lampe B, Barthel B, Coubland SE: Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47: 63-73.
81. von Rahden BHA, Isbert C, Jurowich C, Germer CT: Sigmadivertikulitis – Gibt es heute harte Kriterien zur Operationsindikation? *Chirurgische Praxis* 2010; 71(3): 415.
82. von Rahden BHA, Kircher S, Thiery S, Landmann D, Jurowich CF, Germer CT, Grimm M: Association of steroid use with complicated diverticulitis: potential role of activated CD68+/CD163+ macrophages. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396: 759-768.

83. von Rahden BHA, Jurowich C, Kircher S, Lazariotou M, Jung M, Germer CT, Grimm M: Allergic Predisposition, Histamine and Histamine Receptor Expression (H1R, H2R) are associated with Complicated Courses of Sigmoid Diverticulitis. *J Gastrointest Surg* 2012; 16: 173-182.
84. von Rahden BHA, Germer CT: Pathogenesis of colonic diverticular disease. *Langenbecks Arch Surg* 2012; 397: 1025-1033.
85. Warshaw AL, Welch JP, Ottinger LW: Acute perforation of the colon associated with chronic corticosteroid therapy. *Am J Surg* 1976; 131(4): 442-446.
86. Watson GS: Smooth Regression Analysis. *Ind J Statistic, Series A* 1964; 26(4): 359-372.
87. Watters DAK, Smith AN, Eastwood MA: Mechanical properties of the colon: comparison of the features of the African and European colon in vitro. *Gut* 1985; 26: 384-392.
88. Weiner HL, Rezai AR, Cooper PR: Sigmoid diverticular perforation in neurosurgical patients receiving high-dose corticosteroids. *Neurosurgery* 1993; 33(1): 40-43.
89. Wess L, Eastwood MA, Wess TJ, Busutti A, Miller A: Crosslinking of collagen is increases in colonic diverticulosis. *Gut* 1995; 37: 91-94.
90. Wieggers GJ, Croiset G, Reul JM, Holsboer F, de Kloet ER: Differential effects of corticosteroids on rat peripheral blood T-lymphocyte mitogenesis in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 1993; 265(6 Pt 1): E825-830.
91. Winkler J, Hochhaus G, Derendorf H: How the lung handles drugs: pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1(4): 356-363.
92. Yoo PS, Garg R, Salamone LF, Floch MH, Rosenthal R, Longo WE: Medical comorbidities predict the need for colectomy for complicated and recurrent diverticulitis. *Am J Surg* 2008; 196(5): 710-714.
93. Zweig MH, Campbell G: Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39(4): 561-577.

## 7. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AUC	Area under the curve
BSA	Rinder-Serumalbumin
CDD	Classification of diverticular disease
c-DNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CI	Vertrauensintervall
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
DC	Dendritische Zellen
dest.	Destilliert
Div.	Divertikulitis
EGF	Epidermal growth factor
EtOH	Ethanol
FFPE-Gewebe	Formalin-fixiertes paraffin-eingebettetes Gewebe
FITS	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GITR	Glucocorticoid-induzierter TNF-Rezeptor
GITRL	GITR-Ligand
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	Hitze-induzierte Demarkierung der Epitope
HPF	High power field
HRP	Horseradish peroxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
IQR	Interquartilabstand



LR	Likelihood Ratio
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
OR	Odds Ratio
PV	Vorhersagewert
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver operating characteristic
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
sGITR	soluble GITR
Tab.	Tabelle
TIMP	Tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases
TBS	Tris-buffered saline
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
WBC	White blood cell

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Immunhistochemische GITR-Färbung des Colon sigmoideums eines Patienten mit komplizierter Divertikulitis
- Abb. 1a GITR; 20-fache Vergrößerung; Immunhistochemie
- Abb. 1b GITR; 200-fache Vergrößerung; Immunhistochemie
- Abb. 2 Immunhistochemische MMP-9-Färbung des Colon sigmoideums eines Patienten mit komplizierter Divertikulitis
- Abb. 2a MMP-9; 20-fache Vergrößerung; Immunhistochemie
- Abb. 2b MMP-9; 400-fache Vergrößerung; Immunhistochemie
- Abb. 3 Immunfluoreszenz-Färbung des Colon sigmoideums mit dem Antikörper gegen GITR
- Abb. 3a GITR-unkompliziert; Immunfluoreszenz; 50µm; Cy3 Rot und DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid Blau
- Abb. 3b GITR-kompliziert; Immunfluoreszenz; 50µm; Cy3 Rot und DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid Blau
- Abb. 4 Immunhistochemische Analyse
- Abb. 5 Regressionsanalyse
- Abb. 6 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung
- Abb. 6a MMP-9; Immunfluoreszenz; 25µm; FITC Grün Fluoresceinisothiocyanat, Cy3 Rot und DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid Blau
- Abb. 6b GITR; Immunfluoreszenz; 25µm; FITC Grün Fluoresceinisothiocyanat, Cy3 Rot und DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid Blau
- Abb. 6c GITR und MMP-9; Immunfluoreszenz-Doppelfärbung; 25µm; FITC Grün Fluoresceinisothiocyanat, Cy3 Rot und DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid Blau
- Abb. 7 GITR- und MMP-9-Genexpression.
- Abb. 8 Zusammenhang zwischen Glucocorticoiden und GITR-Expression
- Abb. 9 ROC-Analyse der klinischen Parameter

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Stadieneinteilung der Divertikulitis nach S2k-Leitlinie (CDD), Hansen und Stock & Hinchey
Tab. 2	Übersicht über die für die Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper
Tab. 3	Übersicht über die für die Immunfluoreszenz verwendeten Sekundärantikörper
Tab. 4	Verwendete Primersequenzen für die Real-Time-PCR
Tab. 5	Übersicht über die Patientencharakteristika und p-Werte
Tab. 6	Auswertung der GITR-Expression bei unkomplizierter und komplizierter Sigmadivertikulitis
Tab. 7	Auswertung der MMP-9-Expression bei unkomplizierter und komplizierter Sigmadivertikulitis
Tab. 8	Genexpression von GITR bei unkomplizierter und komplizierter Divertikulitis in der Real-Time-PCR
Tab. 9	Genexpression von MMP-9 bei unkomplizierter und komplizierter Divertikulitis in der Real-Time-PCR
Tab. 10	Übersicht über individuelle Merkmale der Divertikulitis-Patienten in Zusammenhang zur GITR-Expression
Tab. 11	Vergleich der klinischen Parameter

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Burkhard von Rahden, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, sowie die gute Betreuung und Unterstützung zu jedem Zeitpunkt der Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Martin Grimm, für die exzellente Betreuung, hervorragende Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und unermüdliche Bereitschaft mich in meiner Arbeit zu unterstützen.

Mein weiterer Dank gilt dem Team der Experimentellen Chirurgie, insbesondere Frau Manuela Schneider und Frau Sabine Gahn, ohne deren Hilfe bei der Anfertigung der Schnitte, diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die Unterstützung im Bereich der PCR-Methodik danke ich Frau Dr. Maria Lazariotou.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. Stefan Kircher vom Pathologischen Institut für seine Beratung im histologischen Bereich.

Meinen Mitdoktoranden, Frau Luisa Stürmer und Herrn Christoph Reiber, danke ich für die gute Zusammenarbeit und insbesondere die Unterstützung zu Beginn meiner Labortätigkeit.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die mich zu jeder Zeit unermüdlich unterstützt und mir immer das Gefühl vermittelt haben, alles erreichen zu können was ich mir vorgenommen habe.

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten:

Name Denise Landmann

---

### Schulbildung:

1993-1997 Besuch Geschwister Scholl Grundschule Arnstadt, Thüringen

1997-2005 Besuch Neideck Gymnasium Arnstadt, Thüringen (Abschluss Abitur 2005)

---

### Studium:

2006-2012 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg

- 2008: 1. Staatsexamen abgelegt
- 03/09: Famulatur Allgemein Chirurgie  
Ilm-Kreis-Klinikum Arnstadt
- 09/09: Famulatur Gynäkologie/Geburtshilfe  
Praxis Dr. Hecht, Erfurt
- 03/10: Famulatur Anästhesiologie  
Universitätsklinikum Würzburg
- 03/11: Famulatur Gynäkologie/Geburtshilfe  
Spital Langenthal, Schweiz
- 08/11-12/11: Praktisches Jahr Innere Medizin  
Klinikum Coburg
- 12/11-03/12: Praktisches Jahr Urologie  
Universitätsklinikum Würzburg
- 03/12-07/12: Praktisches Jahr Chirurgie  
Universitätsklinikum Würzburg
- 2012: 2. Staatsexamen abgelegt

---

### Beruflicher Werdegang:

Seit 03/13 Assistenzärztin für Urologie, Klinikum Bayreuth GmbH

---

Promotion:

2009-dato            Laborarbeit in der Chirurgischen Klinik I der  
Universität Würzburg im Rahmen der Erstellung  
meiner medizinischen Promotionsarbeit zum Thema:  
„Glucocorticoid-induzierter TNF-Rezeptor (GITR):  
Molekulares Bindeglied zwischen Glucocorticoid-  
Einnahme und komplizierter Sigmadivertikulitis?“

---

Sonstiges:

2005-2006            Teilnahme am Programm Work and Travel in  
Neuseeland

2008-2010            Aktive Mitarbeit als Local Exchange Officer der  
Sparte Austausch der Bundesvertretung der  
Medizinstudierenden in Deutschland e.V.

02/2015              Erwerb der Fachkunde im Strahlenschutz

Bayreuth, 21.08.2015