

Aus der Klinik für Innere Medizin I  
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie, internistische  
Intensivmedizin, Endokrinologie, Infektiologie, Rheumatologie, Ernährungs- und Alterungsmedizin  
(Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Schreiber)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian–Albrechts–Universität zu Kiel

**PILOTSTUDIE ÜBER DEN NACHWEIS VON NAHRUNGSMITTELALLERGIEN  
MITTELS KONFOKALER LASERENDOMIKROSKOPIE  
IM DUODENUM  
BEI PATIENTEN MIT REIZDARMSYNDROM**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian–Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**STEPHAN KORBINIAN SCHOCH**

aus Weingarten

Kiel 2018

1: Berichterstatter: Prof. Dr. med. Annette Fritscher-Ravens

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

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.12.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider  
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	III
<b>VORBEMERKUNG</b> .....	IV
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	V
I. Einleitung.....	- 1 -
I.I Grundlagen.....	- 3 -
I.I.I Reizdarmsyndrom .....	- 3 -
I.I.I.I Definition.....	- 3 -
I.I.I.II Epidemiologie .....	- 4 -
I.I.I.III Pathophysiologie.....	- 4 -
I.I.I.IV Schweregrad-Scores .....	- 5 -
I.I.I.V Gesundheitsbezogene Lebensqualität .....	- 5 -
I.I.I.VI Einfluss auf Gesundheitssystem und Wirtschaft.....	- 5 -
I.I.II Nahrungsmittelunverträglichkeiten .....	- 6 -
I.I.III Nahrungsmittelunverträglichkeiten beim Reizdarmsyndrom.....	- 9 -
I.I.IV Intestinale Barriere und intestinale Permeabilität.....	- 9 -
I.I.V Epitheliale Lücken, Zellabstoßung und Apoptose.....	- 10 -
I.I.VI Endomikroskopische Darstellung des Darmepithels.....	- 12 -
I.II Fragestellung.....	- 13 -
II. Material und Methoden .....	- 15 -
II.I Patientengruppe .....	- 15 -
II.II Konfokale Laserendomikroskopie (KLE).....	- 16 -
II.II.I Technische Grundlagen der konfokalen Lasermikroskopie .....	- 16 -
II.II.II Fluoreszein.....	- 20 -
II.III Studienablauf .....	- 21 -
II.III.I Voruntersuchung .....	- 22 -
II.III.II Konfokale Laserendomikroskopie Untersuchung .....	- 22 -
II.III.III Auswertung des gewonnen Bildmaterials.....	- 23 -
II.III.III.I Intraepitheliale Lymphozyten (IEL).....	- 24 -
II.III.III.II Epitheliale Lücken (eL).....	- 24 -
II.III.III.III Intervillöser Raum (ivR).....	- 24 -
II.III.IV Auswertung der gewonnen Biopsien .....	- 24 -
II.III.V Behandlung und Nachsorge.....	- 25 -

II.IV Statistik.....	- 26 -
III. Ergebnisse.....	- 27 -
III.I Patienten.....	- 27 -
III.II Sichtbare dynamische Veränderungen.....	- 29 -
III.II.I Intraepitheliale Lymphozyten in den Bildern der KLE.....	- 30 -
III.II.II Epitheliale Lücken.....	- 32 -
III.II.III Intervillöse Räume.....	- 33 -
III.III Intraepitheliale Lymphozyten in der Histologie.....	- 34 -
III.IV Vergleich der IEL in Histologie und KLE.....	- 35 -
III.V Exklusionsdiät und Nachsorge.....	- 36 -
IV. Diskussion.....	- 39 -
V. Zusammenfassung.....	- 46 -
VI. Literaturverzeichnis.....	- 48 -
VII. Anhang.....	- 58 -
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>- 64 -</b>
<b>ERKLÄRUNG ETHIK.....</b>	<b>- 65 -</b>
<b>ERKLÄRUNG DOKTORARBEIT.....</b>	<b>- 66 -</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

TABELLE 1.....	- 4 -
TABELLE 2.....	- 7 -
ABBILDUNG I-1.....	- 8 -
ABBILDUNG I-2.....	- 13 -
TABELLE 3.....	- 16 -
ABBILDUNG II-1.....	- 17 -
ABBILDUNG II-2:.....	- 19 -
ABBILDUNG II-3.....	- 21 -
ABBILDUNG III-1.....	- 27 -
ABBILDUNG III-2.....	- 28 -
ABBILDUNG III-3.....	- 28 -
ABBILDUNG III-4.....	- 29 -
ABBILDUNG III-5.....	- 30 -
ABBILDUNG III-6.....	- 31 -
ABBILDUNG III-7.....	- 32 -
ABBILDUNG III-8:.....	- 32 -
ABBILDUNG III-9.....	- 33 -
ABBILDUNG III-10.....	- 34 -
ABBILDUNG III-11:.....	- 35 -
ABBILDUNG III-12.....	- 36 -
ABBILDUNG III-13.....	- 37 -
TABELLE 4.....	- 38 -

## VORBEMERKUNG

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- FRITSCHER-RAVENS, A., SCHUPPAN, D., ELLRICHMANN, M., SCHOCH, S., ROCKEN, C., BRASCH, J., BETHGE, J., BÖTTNER, M., KLOSE, J. & MILLA, P. J. 2014d. Confocal endomicroscopy shows food-associated changes in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 147, 1012-20 e4.
- FRITSCHER-RAVENS, A., ELLRICHMANN, M., SCHOCH, S., KLOSE, J., RÖCKEN, C., BRASCH, J. & MILLA, P. J. 2013. Mo1641 Post Food Challenge Confocal LASER Endomicroscopy Reveals Changes Undetected by Histology in Patients With Intractable IBS-Like Symptoms. *Gastrointestinal Endoscopy*, 77, AB455.
- FRITSCHER-RAVENS, A., SCHOCH, S., BÖTTNER, M., SCHUPPAN, D., ELLRICHMANN, M., RÖCKEN, C., BRASCH, J., BETHGE, J. & MILLA, P. J. 2014a. 601 Confocal Endomicroscopy Reveals Food-Induced Real Time Dynamic Functional Mucosal Changes in IBS Patients. *Gastrointestinal Endoscopy*, 79, AB155-AB156.
- FRITSCHER-RAVENS, A., SCHOCH, S., BRASCH, J., RÖCKEN, C., ELLRICHMANN, M., BETHGE, J., MÖSINGER, M. J. & BÖTTNER, M. 2014b. Mo1573 Activation of Eosinophils As a Marker of Low-Grade Inflammation Underlying Food-Intolerance in Patients With IBS-Like Symptoms. *Gastrointestinal Endoscopy*, 79, AB488.
- FRITSCHER-RAVENS, A., SCHOCH, S., ELLRICHMANN, M., ARLT, A., WEDEL, T. & BÖTTNER, M. 2014c. Mo1514 Confocal LASER Endomicroscopy (CLE) to Detect Food Intolerances in Patients With IBS-Like Symptoms: Cellular and Ultrastructural Histological Correlates. *Gastrointestinal Endoscopy*, 79, AB465.

**ABKÜRZUNGEN**

E:	Epithelzelle
EGFR:	epidermal growth factor receptor
eL:	epitheliale Lücken
F:	Feld
FODMAP:	engl. Akronym für gärungsfähige Oligo-, Di-, Monosaccharide und Polyole
GIT:	Gastrointestinaltrakt
GK:	Gesunde Kontrollen
IEL:	Intraepithelialer Lymphozyt
IVR:	Intervillöser Raum
J:	Jahre
KI:	Konfidenzintervall
KLE:	Konfokale Laserendomikroskopie
KLE+:	Reaktion der Mukosa während der Untersuchung erkennbar
KLE-:	keine Reaktion der Mukosa während der Untersuchung erkennbar
NM:	Nahrungsmittel
NMU:	Nahrungsmittelunverträglichkeit
IBS:	Reizdarmsyndrom (irritable bowel syndrome)
IBS-D:	Reizdarmsyndrom, Diarrhö-prädominant
IBS-M:	Reizdarmsyndrom mit gemischten Stuhlverhalten
IBS-C:	Reizdarmsyndrom, Konstipation-prädominant
IBS-U:	Reizdarmsyndrom, nicht zuzuordnen
sIgE	allergen-spezifisches IgE
Sw:	Spannweite
TNF:	Tumornekrosefaktor

## I. EINLEITUNG

In den letzten Jahren wurde, dank technischer Innovationen, eine Vielzahl neuer endoskopischer Verfahren entwickelt. Dies ermöglichte neue Ansätze im Bereich der Forschung, Diagnostik und Therapie von Krankheiten des oberen und des unteren Gastrointestinaltrakts (GIT).

Die Konfokale Laserendoskopie (KLE) bedient sich des Laserlichtes innerhalb eines normalen flexiblen Endoskops und erlaubt somit die Vergrößerung und Darstellung von Zellen nach Injektion eines Kontrastmittels. Es wurde zunächst angenommen, dass sie als wertvolle Unterstützung der konventionellen Endoskopie weite Verbreitung finden würde, da sie die Möglichkeit eröffnete, in Echtzeit die Oberfläche des GIT *in vivo* auf mikroskopisch kleinem Niveau zu begutachten (Committee et al., 2009). Durch die teure Anschaffung und den Mangel an klinischen Indikationen, die als essentiell für die tägliche Endoskopie angesehen werden, machte sich die KLE bis vor Kurzem allerdings eher als reines „Forschungsinstrument“ einen Namen.

Die Einsatzmöglichkeiten der konfokalen Laserendomikroskopie (KLE) sind mannigfaltig. Unter anderem kann sie der Erkennung von Neoplasien beim Barrett Ösophagus (Canto et al., 2014) oder beim kolorektalen Karzinom (Kiesslich et al., 2004), der Detektion von *Helicobacter pylori* *in vivo* (Kiesslich et al., 2005) oder dem Nachweis einer Villusatrophie, einer Kryptenhyperplasie und einer erhöhten Anzahl von intraepithelialen Lymphozyten bei der Zöliakie dienen (Gunther et al., 2010).

Mittels monoklonaler Antikörper gegen zelluläre Bestandteile können sogar viele strukturelle und funktionelle Begebenheiten unmittelbar betrachtet werden. So ist es zum Beispiel möglich, während einer KLE, durch Gabe eines fluoreszierenden Antikörpers gegen den epidermal growth factor receptor (EGFR), dessen Expression beim kolorektalen Karzinom anzuzeigen (Goetz et al., 2010, Liu et al., 2013).

Dies sind nur wenige Beispiele für die diagnostischen Möglichkeiten der KLE. Der große Vorteil dieser Untersuchungsmethode besteht darin, die Schleimhaut des GIT *in vivo* und *in situ* mikroskopisch klein darzustellen. Sie ermöglicht daher, auch dynamische Vorgänge am Ort des Geschehens sichtbar zu machen und zu erkennen.

Ansätze, die gastrointestinalen Reaktionen auf Nahrungsmittel (NM) direkt gastrokopisch zu beobachten, gab es bereits früher. Bei bestimmten Patienten führte die Aufnahme gewisser NM zu Symptomen im Sinne einer Intoleranzreaktion. War die Magenschleimhaut diesen NM ausgesetzt, entwickelten sich auf ihr Ödem, Erythem, Petechien, dichter Schleim und eine reduzierte Peristaltik (Pollard and Stuart, 1942).

Unspezifische gastrointestinale Symptome wie abdominale Schmerzen, Blähungen, Durchfall, Verstopfung und Stuhlunregelmäßigkeiten sind häufige Beschwerden in der Bevölkerung. Sie werden oft mit der Aufnahme von NM in Verbindung gebracht.

Eine Befragung im Rahmen einer repräsentativen Stichprobe von Deutschen ergab, dass, über einen siebentägigen Zeitraum betrachtet, 19,8% der Befragten über abdominale Schmerzen, 18,5% über Blähungen, 8% über rege Darmtätigkeit und 8,1% über häufige Durchfälle klagten. 20,6% der Befragten berichteten über derartige Reaktionen nach der Aufnahme von bestimmten Nahrungsmitteln (Hiller et al., 2006).

Auch bei einigen Patienten, die unter Reizdarmsyndrom (IBS, engl. irritable bowel syndrome) leiden, gibt es Hinweise, dass NM verantwortlich sein könnten (Eswaran et al., 2011). Allerdings wurde die KLE hier bisher nicht zur Darstellung des ursächlichen Zusammenhanges eingesetzt, obwohl der obere Dünndarm für die Untersuchung gut zugänglich ist und die Vorgänge beim Reizdarmsyndrom so auf mikroskopischer Ebene untersucht werden können.

Die Vorstellung, eine funktionelle Verbindung des IBS zu Nahrungsmittelunverträglichkeiten (NMU) mittels KLE zu untersuchen, war komplett neu, aber nicht abwegig. Sie imponierte als vielversprechender Forschungsansatz, der Grundlage dieser Arbeit und damit in Zusammenhang stehender Veröffentlichungen war.

Im nachfolgenden Teil der Einleitung soll deshalb näher auf das Reizdarmsyndrom und Nahrungsmittelunverträglichkeiten, sowie deren Beziehung zueinander, eingegangen werden.

## **I.I Grundlagen**

### **I.I.I Reizdarmsyndrom**

#### **I.I.I.I Definition**

Das IBS zählt zu den funktionellen gastrointestinalen Störungen und ist durch die Rom-III-Klassifikation (s. Tabelle 1) definiert. Funktionelle Störungen liegen vor, wenn ohne morphologische Schäden am Organ Beschwerden beim Patienten vorliegen. Sie werden daher nur durch das Vorliegen bestimmter Symptome beschrieben. Neben dem IBS zählen ferner funktionelle Blähungen, funktionelle Diarrhoen, funktionelle Konstipation, sowie unspezifische funktionelle Störungen des Darmes zu den funktionellen gastrointestinalen Störungen (Longstreth et al., 2006). Das IBS ist durch rezidivierende abdominale Schmerzen, Veränderungen der Stuhlfrequenz und Blähungen gekennzeichnet, sowie durch den Ausschluss von zugrundeliegender messbarer Pathologie. Andere unspezifische Störungen des Darmes oder extraintestinale Symptome können sie begleiten (Longstreth et al., 2006). Das IBS ist somit eine reine Ausschlussdiagnose, deren zugrundeliegende Ätiologie bisher nicht ausreichend erklärt ist (Thompson, 2006). Daher sind die Diagnosekriterien einem steten Wandel unterzogen. Aufbauend auf den Kriterien von Manning (Manning et al., 1978) und Kruis (Kruis et al., 1984) wurden die Rom-Kriterien I-III (Thompson et al., 1999, Longstreth et al., 2006, Thompson, 2006) entwickelt. Keine dieser Kriterien erlauben eine Diagnose, sondern beschreiben lediglich den Symptomenkomplex.

Ferner lässt sich das IBS basierend auf der vorwiegenden Stuhlausprägung nach der „Bristol Stool Scale“ (Lewis and Heaton, 1997) in vier Unterkategorien einteilen:

- Diarrhöe prädominant (IBS-D)
- Obstipation prädominant (IBS-C)
- Gemischte Stuhlformen (IBS-M)
- Nichtzuteilbar (IBS-U)

Über die Häufigkeit und die Rolle der einzelnen Unterkategorien wird diskutiert (Yao et al., 2012, Su et al., 2014).

Rezidivierende abdominale Schmerzen oder unangenehmes abdominales Empfinden an mindestens drei Tagen pro Monat in den letzten drei Monaten, verbunden mit zwei oder mehr der folgenden Merkmalen:

- Verbesserung durch Defäkation
- Beginn mit einer Änderung der Häufigkeit des Stuhlgangs verbunden
- Beginn mit einer Änderung der Stuhlform verbunden

Diese Symptome müssen seit mindesten sechs Monaten vor Diagnosestellung bestehen, sowie mindestens an drei Tagen pro Monat während der letzten drei Monate.

#### **Tabelle 1**

Rom-III-Klassifikation - In pathophysiologischer Forschung und klinischen Studien reicht eine Änderung von Schmerz und Unbehagen bei einer Häufigkeit von mindestens zwei Tagen pro Woche für die Patientenauswahl aus (Longstreth et al., 2006).

---

#### **I.I.I.II Epidemiologie**

Die Prävalenz des Reizdarmsyndroms ist variabel und von den Diagnosekriterien abhängig. Jedoch ist sie bei Frauen größer als bei Männern und nimmt bei Patienten über 50 Jahren ab. In einer Meta-Analyse von verschiedenen Studien zur Prävalenz des Reizdarmsyndroms zeigte sich auch eine regionale Schwankung, die niedrigste in Südostasien (7,0%) – die höchste in Südamerika (21,0%) (Lovell and Ford, 2012). Rund die Hälfte der Patienten mit Darmbeschwerden, die zum Hausarzt gehen, haben funktionelle Störungen (Thompson et al., 2000).

#### **I.I.I.III Pathophysiologie**

Die Ansätze zur Erforschung der weitaus ungeklärten Pathophysiologie des IBS sind vielfältig. Dazu gehören die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms (Carroll et al., 2011, Rajilic-Stojanovic et al., 2011), die Barrierendysfunktion der Mukosa mit erhöhter intestinaler Permeabilität (Rao et al., 2011, Martinez et al., 2012) oder Schleimhautentzündungen und neuronale Degeneration im Plexus myentericus im Kolon (Tornblom et al., 2002).

Der Einfluss von Nahrungsmitteln auf die Symptomausprägung oder die Auslösung der Symptome durch Nahrungsmittel wurden zur Zeit der Studie noch kontrovers diskutiert (Halmos et al., 2014, Eswaran et al., 2013, de Roest et al., 2013, Vazquez-Roque et al., 2013).

#### **I.I.I.IV Schweregrad-Scores**

Zur Einteilung und Beschreibung der Schwere der Erkrankung werden verschiedene Skalen verwendet. Die in klinischen Studien am häufigsten verwendete ist das „irritable bowel severity scoring system“ (IBS-SSS) (Francis et al., 1997). Es hilft zur Einschätzung von Schmerzen, Distension, Darmfunktion und generellem Wohlbefinden. Daneben existieren weitere Fragebögen wie der „Gastrointestinal Symptom Rating Score“ (GSRS-IBS) (Wiklund et al., 2003) oder der „Functional Bowel Disorder Severity Index“ (FBDSI) (Drossman et al., 1995). Die „Visual Analogue Scale for Irritable Bowel Syndrom“ (VAS-IBS) (Bengtsson et al., 2007) ist ein kurzer Fragebogen für Patienten um den Behandlungserfolg und das Wohlbefinden der Patienten widerzuspiegeln. Dabei werden auf einer visuellen Analogskala die im Alltag störenden Faktoren wie abdominellen Schmerzen, Diarrhoen, Obstipation, Blähungen und Winde sowie Übelkeit und Erbrechen erfasst. Darüber hinaus wird die seelische Verfassung über den letzten Monat, der Einfluss der Erkrankung auf das tägliche Leben und das Bestehen von Dringlichkeit zur Defäkation und das Gefühl der unvollständigen Darmentleerung nach Defäkation erfragt.

#### **I.I.I.V Gesundheitsbezogene Lebensqualität**

Patienten mit IBS erfahren eine Verminderung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität (health-related quality of life, HRQOL). Neben den prominenten Beschwerden wie krampfartige abdominelle Beschwerden, Blähungen und veränderte Stuhlgewohnheiten leiden Patienten häufig unter Energieverlust und Müdigkeit, sowie unter gesellschaftlicher Rolleneinschränkung durch körperliche Gesundheitsprobleme, Körperschmerzen, und der allgemeinen Gesundheitswahrnehmung (Gralnek et al., 2000). Dazu kommt, dass Personen, die unter IBS leiden, häufiger operiert werden; unter anderem ist die Rate an Cholezystektomien dreifach und an Appendektomien und Hysterketomien zweifach erhöht (Longstreth and Yao, 2004).

#### **I.I.I.VI Einfluss auf Gesundheitssystem und Wirtschaft**

Im Vergleich zu Probanden ohne Reizdarmsyndrom stellen sich IBS-Erkrankte öfter ambulant vor, sind öfter hospitalisiert und haben eine höhere Anzahl an Verschreibungen. Im Jahresvergleich sind die Gesamtkosten für IBS Patienten um 51% höher als bei Patienten,

die nicht unter einem IBS leiden. Dabei sind vor allem die Kosten für ambulante Behandlungen, Medikamente und radiologische sowie laboratorische Untersuchungen erhöht. Die Zunahme der Gesamtkosten geht mit der Schwere der Symptome von mild (35%) über moderat (52%) bis schwer (59%) einher.

Somit ist das IBS mit einem vermehrten Anspruch an das Gesundheitssystem und den hiermit verbunden Kosten verknüpft (Longstreth et al., 2003). Im Jahr 2002 betragen die direkten Kosten eines IBS Patienten 791,48 € pro Jahr; indirekte Kosten für Krankheitsausfall mit einbezogen bei 994,97 € (Muller-Lissner and Pirk, 2002).

### **I.I.II Nahrungsmittelunverträglichkeiten**

Um die Reaktionen auf Nahrungsmittel genauer zu beschreiben, werden verschiedene Begrifflichkeiten benutzt:

Eine Allergie ist eine durch bekannte immunologische Mechanismen hervorgerufene Überempfindlichkeitsreaktion. Sie kann Antikörper- oder Zell-vermittelt sein. Die meisten Reaktionen werden typischerweise durch Antikörper vom IgE-Isotyp vermittelt. Man spricht von einer IgE-vermittelten Allergie.

Indes gibt es auch nicht IgE-vermittelte allergische Reaktionen. (Johansson et al., 2004).

Die immunologisch vermittelten Überempfindlichkeiten lassen sich auch nach Gell und Coombs einteilen (Gell, 1975). Diese Einteilung beinhaltet vier Typen von Reaktionen:

Typ I Reaktion: Mastzell- und IgE-vermittelte Immunreaktion (Sofort-Typ)

Typ II Reaktion: Zytotoxische Immunreaktion

Typ III Reaktion: Immunkomplex-vermittelte Immunreaktion

Typ IV Reaktion: Zellulär-vermittelte Immunreaktion (Verzögerter-Typ)

Der Allergie steht die „nicht allergische“ Überempfindlichkeit gegenüber. Dieser Ausdruck beschreibt eine durch nicht-immunologische oder durch bisher nicht bekannte immunologische Mechanismen hervorgerufene Überempfindlichkeit (Johansson et al., 2004).

Eine Hypersensibilität ruft bei prädisponierten Patienten objektiv reproduzierbare Überempfindlichkeitssymptome oder -zeichen hervor, die durch Exposition eines definierten Stimulus auftreten, der von Gesunden problemlos toleriert wird (Johansson et

al., 2004). Hierbei lassen sich die Allergien von den nicht-allergischen Überempfindlichkeiten unterscheiden.

Wie bereits zuvor erwähnt, spricht man von Nahrungsmittelallergie, wenn bekannte immunologische Mechanismen nachgewiesen wurden. Falls IgE in der Reaktion beteiligt ist, ist der Begriff IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergie üblich. Alle anderen Reaktionen sollten als nichtallergische Nahrungsmittelüberempfindlichkeiten bezeichnet werden (Johansson et al., 2004).

Ausbreitungsgrad	Gefährdungsgrad	Häufigkeit (Prozent)
<b>Isolierte Organmanifestation Grad I</b>		
Grad I A: Lokale gastrointestinale Manifestation am Gastrointestinaltrakt oder an bestimmten Abschnitten	-	35
Grad I B: Lokale extraintestinale Manifestation ohne Mitreaktion des Gastrointestinaltraktes (Auge, Bronchialsystem, Haut, Herz etc.)	+	5
<b>Mehrere Organmanifestationen Grad II–IV</b>		
Grad II: Gastrointestinale Allergie und Manifestation an nur einem extraintestinalen Organ	++	40
Grad III: Gastrointestinale Allergie und Manifestation an mehr als einem extraintestinalen Organ	++	20
Grad IV: Gastrointestinale und mehrere extraintestinale Organmanifestationen mit Kreislaufreaktion und/oder anaphylaktischen Symptomen	+++	<1
– keine bzw. + leichte, ++ mittlere oder +++ schwere Gefährdung durch eine starke allergische Reaktion (Anaphylaxie)		

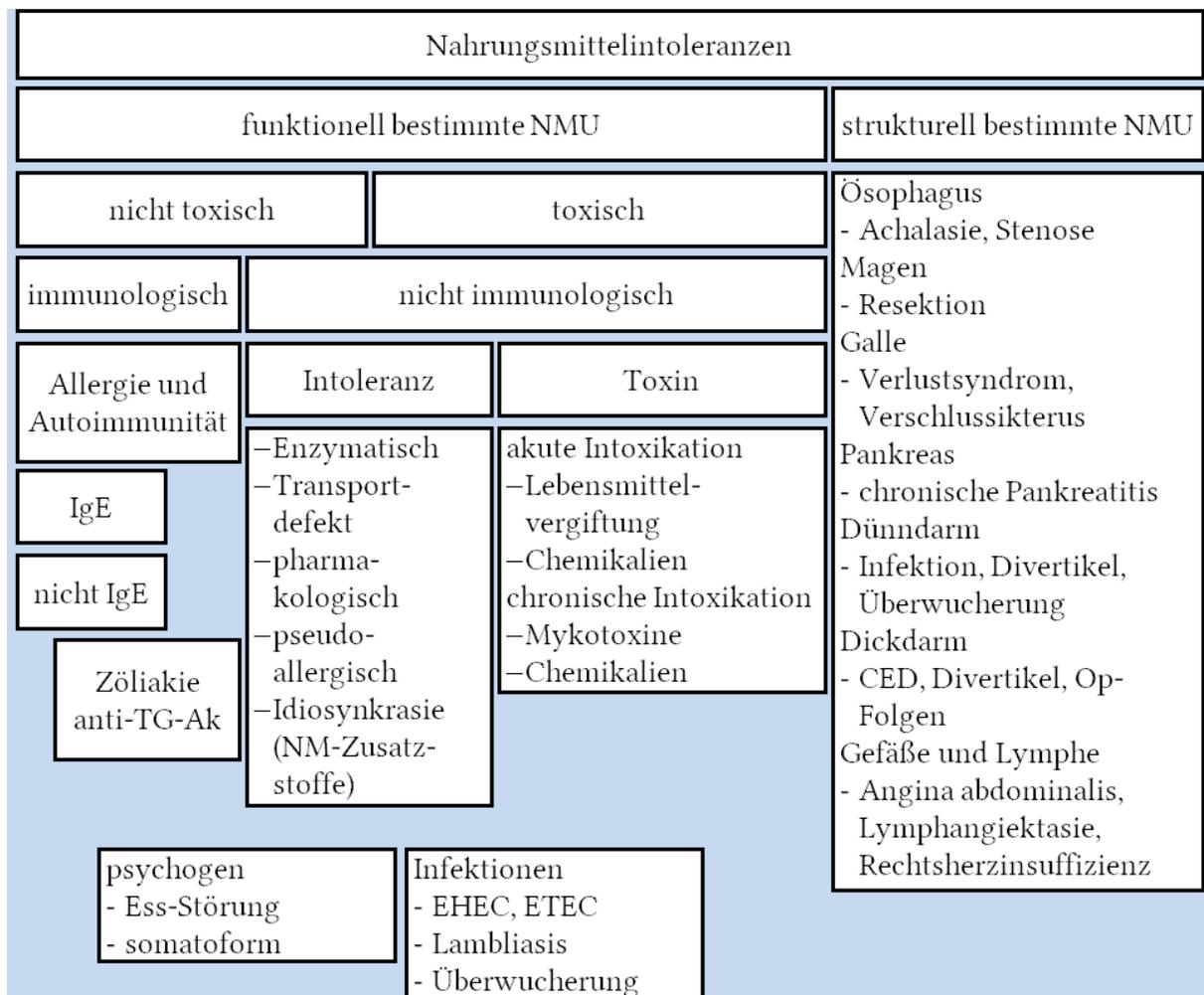
**Tabelle 2**

Klassifikation von Nahrungsmittelallergien (Gastrointestinal vermittelte Allergien Grad I bis IV) (Raithel et al., 2002)

In einer landesweiten Umfrage im Vereinigten Königreich berichteten 20,4% der Befragten über Nahrungsmittelintoleranzen (Young et al., 1994). In Deutschland sind laut der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1)“ 25,5% der Bevölkerung gegen Nahrungsmittelallergene sensibilisiert, wobei in nur 25% der Untersuchten spezifisches IgE gegen bestimmte Nahrungsmittelbestandteile nachweisbar ist. Eine Sensibilisierung kann, muss aber keine allergische Reaktion hervorrufen (Haftenberger et al., 2013). Daher liegt die Lebenszeitprävalenz für Nahrungsmittelallergien, welche in Deutschland derzeit bei 4,7% liegt (Langen et al., 2013), deutlich unter der Häufigkeit für eine Sensibilisierung. Es besteht

also eine auffällige Diskrepanz zwischen einer Sensibilisierung und dem Auftreten klinischer Beschwerden.

Nahrungsmittelallergien lassen sich anhand ihres Ausbreitungsmusters in gastrointestinal vermittelte Allergien von Grad I bis IV klassifizieren (Tabelle 2). Wobei sich bei der Diagnostik Schwierigkeiten ergeben, wenn sich der Immunprozess vorwiegend auf die Mukosa/Submukosa des Gastrointestinaltrakts beschränkt (Raithel et al., 2002). Als diagnostischer Goldstandard gilt die „double-blind, placebo-controlled food challenge“, in Form eines oralen Provokationstest (Sampson et al., 2012, Nowak-Wegrzyn et al., 2009). Die Vielschichtigkeit und Komplexität der Differentialdiagnostik von Nahrungsmittelunverträglichkeiten ist in Abbildung I-1 dargestellt (Zopf et al., 2009).



**Abbildung I-1**  
Differentialdiagnosen der Nahrungsmittelintoleranzen (Zopf, Y. et al. 2009)

### **I.I.III Nahrungsmittelunverträglichkeiten beim Reizdarmsyndrom**

Die Mehrzahl der Patienten mit IBS glaubt, dass bestimmte Nahrungsmittel wichtige Auslöser ihrer gastrointestinalen Symptome sind, und vermeidet daher im Rahmen einer „Diät“ die Aufnahme bestimmter Nahrungsmittelgruppen (Hayes et al., 2014). Dies trifft hauptsächlich auf Nahrungsmittel zu, welche Kohlenhydrate und Fette enthalten (Simren et al., 2001). Dasselbe gilt für Histamin freisetzende Nahrungsmittelbestandteile und solche, die reich an biogenen Aminen sind. Eine selbst angegebene Nahrungsmittelintoleranz ist mit einer schwereren Krankheitserscheinung und einer reduzierten gesundheitsbezogenen Lebensqualität vergesellschaftet (Bohn et al., 2013).

Innerhalb der IBS-Patienten gibt es eine Patientengruppe, die auf eine Ausschlussdiät von fermentierbaren Oligo-, Di- und Monosacchariden und Polyole (FODMAPs) oder Gluten enthaltenden Nahrungsmitteln eine Besserung ihrer Symptome zeigten (Halmos et al., 2014, Eswaran et al., 2013, de Roest et al., 2013, Vazquez-Roque et al., 2013).

In einer demographischen Studie in Berlin betrug die selbst angegebene Lebenszeitprävalenz jeglicher Reaktion auf Nahrungsmittel 34,9%. Die Punktprävalenz, bestimmt durch eine doppelblinde Placebo-kontrollierte orale Nahrungsmittelprovokation bei Erwachsenen betrug 3,7%. Hierbei waren 2,5% IgE-vermittelt und 1,1% nicht IgE-vermittelt (Zuberbier et al., 2004).

70% der Patienten mit IBS geben an, sie hätten gastrointestinale Beschwerden nach Nahrungsaufnahme. Davon haben bereits 62% bestimmte Nahrungsmittel in ihrer Ernährung eingeschränkt oder ausgeschlossen (Monsbakken et al., 2006).

### **I.I.IV Intestinale Barriere und intestinale Permeabilität**

Die grundlegende Funktion des Darmepithels besteht darin, die Barriere zwischen dem Darmlumen mit seinem vielfältigen, teils toxischen Inhalt und der fein regulierten Homöostase des umgebenden Gewebes aufrecht zu erhalten. Dabei vollführt es die Aufgabe, unerwünschte gelöste Bestandteile, Mikroorganismen und luminale Antigene davon abzuhalten, in das Gewebe einzudringen (Clayburgh et al., 2004).

Eine einzige Epithelschicht bildet diese Barriere. Die interzellularen Räume zwischen den Epithelzellen werden durch Tight Junctions (Schlussleisten) und die darunterliegenden Adherens Junctions (Haftkontakte) verschlossen (Farquhar and Palade, 1963). In der Reihe des einschichtigen Epithels des Dünndarms zeigen sich mikroskopisch kleine Lücken (engl.:

gaps). Diese Lücken in der Kontinuität der Schicht aus Enterozyten und Becherzellen sind charakterisiert durch den Verlust von apikalem Bürstensaum, Zytosol und Zellkern und entstehen durch physiologische Abstoßung von ausgewählten Enterozyten ins Darmlumen (Watson et al., 2005).

Eine erhöhte intestinale Permeabilität, in Form eines Flusses durch die Epithelschicht, kann bei entzündlichen Erkrankungen zu einer eingeschränkten Barrierefunktion führen. Hierbei erscheinen drei Schlüsselkomponenten nötig zu sein: die Störung der Epithelbarriere, der Eintritt von Darminhalt in die Lamina propria, insbesondere von Bakterien und anderen Pathogenen, und die daraus resultierende Immunantwort (Clayburgh et al., 2004).

Zu einer Veränderung der mukosalen Durchlässigkeit von Dünndarm und Kolon kommt es vor allem beim Reizdarmsyndrom mit prädominanter Diarrhoe (IBS-D) (Rao et al., 2011). Studien deuten darauf hin, dass eine Veränderung der intestinalen Permeabilität bei Patienten mit IBS-D mit verschiedenen Nahrungsbestandteilen in Verbindung stehen könnten (Vazquez-Roque et al., 2013); die intestinale Permeabilität ändert sich abhängig davon, ob sie NM konsumieren auf die sie eine Überempfindlichkeiten aufweisen oder nicht (Barau and Dupont, 1990).

Ferner zeigen Patienten ohne infektiösen Beginn des IBS einen schwereren Defekt der Permeabilität im Vergleich zu Patienten mit postinfektiösem IBS. Auch Reizdarmpatienten mit extraintestinalen Symptomen wie Hautausschlag, Asthma oder Heuschnupfen, verglichen mit Patienten ohne Atopie (genetische Prädisposition für verschiedene klinische Manifestationen der Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp), haben eine erhöhte Permeabilität im Bereich des Dünndarmes (Dunlop et al., 2006). Als Ursache hierfür werden, wie oben bereits erwähnt, neben undichten Tight Junctions auch die Lücken im Epithel des Darmes angesehen. Eine erhöhte intestinale Permeabilität geht bei IBS Patienten mit einer viszeralen Überempfindlichkeit einher, die zu Schmerzen führt, die als stark wahrgenommen werden (Zhou et al., 2009).

#### **I.I.V Epitheliale Lücken, Zellabstoßung und Apoptose**

Bei Patienten mit IBS kommt es im Vergleich mit Gesunden zu einer erhöhten Dichte epithelialer Lücken in der Mukosa des Dünndarms (Turcotte et al., 2013). Diese Lücken sind zellfreie Stellen im einschichtigen Epithel ohne Zytoplasma, Zellkern und Bürstensaum. Sie scheinen mit einem extrazellulären Material aufgefüllt zu sein, das diese Lücken wieder verschließt (Watson et al., 2005). Diese Lücken können mit Hilfe der KLE sichtbar gemacht

werden und sind somit von Becherzellen und Enterozyten der Schleimhaut visuell abgrenzbar (Kiesslich et al., 2007). In einer Studie mit einer kleinen Anzahl von Patienten (n=34) konnte gezeigt werden, dass IBS Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine erhöhte Dichte von konfokal endomikroskopisch nachgewiesenen intraepithelialen Lücken im terminalen Ileum aufweisen (Turcotte et al., 2013). Bei entzündlichen Darmerkrankungen wurde ebenfalls eine erhöhte Dichte der epithelialen Lücken, diesmal im Kolon, beobachtet (Liu et al., 2011a).

Auch bei Gesunden unterliegt das Darmepithel einer ständigen Erneuerung. Leblond und Stevens wiesen 1948 die Zellabstoßung an der Villusspitze nach (Leblond and Stevens, 1948). Die abgeschilferten Epithelzellen werden durch sich am Grund der Krypten befindliche Stammzellen erneuert, welche heranreifen und in Richtung der Villusspitze wandern. Das Abstoßen der Epithelzellen scheint hierbei nicht nur an der Villusspitze, sondern auch seitlich statt zu finden (Wilson et al., 1985). Der daraus resultierende Enterozytenumsatz wird beim Menschen auf 3,48 ( $\pm 1,55$ ) Tage geschätzt (Darwich et al., 2014). Trotz dieser Unstetigkeit bleibt dabei die epitheliale Barrierefunktion am apikalen Pol der Epithelschicht erhalten (Watson et al., 2005). Eine Überwucherung des Epithels wird unter physiologischen gesunden Bedingungen durch den Prozess der Zellabstoßung vermieden. Hierbei spielt die bei Überwucherung zunehmende Dehnung der Epithelzellen eine Rolle. Sie wird durch das dehnungssensitive Protein Piezo1 (Coste et al., 2010) wahrgenommen (Eisenhoffer et al., 2012) und dient der Homöostase.

Aus histologischer Sicht tritt der Abstoßungsprozess von Enterozyten nicht gehäuft in der Nähe von Blutgefäßen (CD34+) auf (Bullen et al., 2006). Nach dem spontanen Abstoßungsprozess verschließen sich die entstandenen Lücken innerhalb von 10 Minuten. Nach der durch TNF herbeigeführten Zellabstoßung spielen die Vernetzung von Mikrotubuli und Mikrofilamenten und die Umverteilung von mit den Tight Junctions assoziierten Proteinen eine wichtige Rolle (Marchiando et al., 2011). Die Expression von Zonula Occludens 1 (ZO-1), einem Tight Junction assoziiertem Protein, ist bei Patienten mit IBS-D im Jejunum vermindert. Eine Umverteilung der Tight Junctions ins Zytoplasma findet ebenfalls statt. Hierbei sind aktivierte Mastzellen beteiligt (Martinez et al., 2012). Ein Ring aus Aktin und Myosin in den angrenzenden Enterozyten um und in der apoptotischen Zelle selbst kann diese beim Abschilfern herausdrücken (Rosenblatt et al., 2001).

Eine Studie an Mäusen zeigte, dass die Rate apoptoseanzeigender aktiver Caspase-3 in den Villi von Mäusen sehr niedrig ist (Marshman et al., 2001). Auch mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte zeigen wenige pyknische Zellkerne, die auf eine Apoptose hinweisen (Hall et al., 1994). Dies bedeutet, dass in herkömmlichen histologischen Schnitten die Apoptose hierbei nur schwer nachgewiesen werden kann.

Über den Abschilferungsprozess ist wenig bekannt, weil er in der Standardhistologie selten gesehen wird, es sei denn, man bereitet die Schnitte aufwendig auf (Bullen et al., 2006).

Jüngste Forschung zeigte, dass wahrscheinlich zwei unterschiedliche Mechanismen zum Abschilfern führen. Der eine wird beschrieben als „spontaner Zellabgang“, bei welchem Caspase-3 nicht aktiviert wurde, und die intestinalen Epithelzellen erst nach dem Ablösen von der Basalmembran apoptotisch werden. Dieses Phänomen wird als Anoikis bezeichnet (Frisch and Francis, 1994). Beim anderen wird Caspase-3 aktiviert und entspricht somit einer Apoptose (Bullen et al., 2006, Watson et al., 2012).

#### **I.I.VI Endomikroskopische Darstellung des Darmepithels**

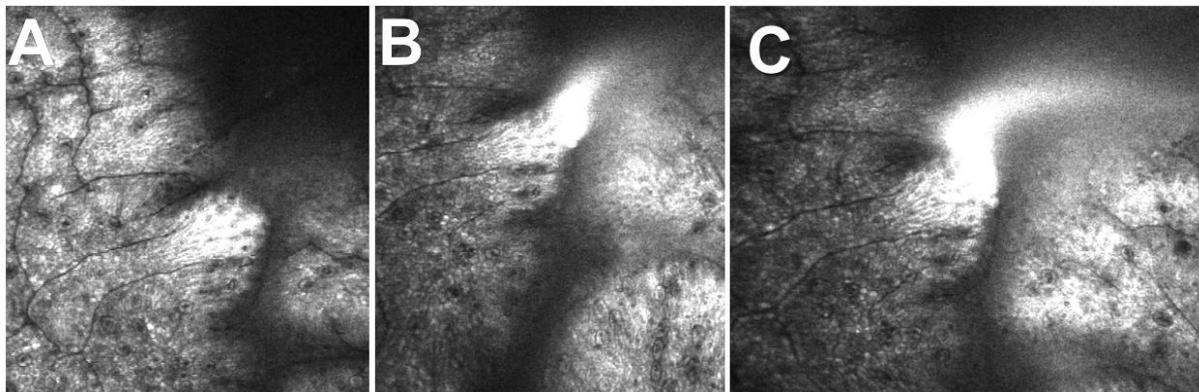
Durch die KLE können die verschiedensten Strukturen der intestinalen Mukosa, sowie die entstandenen Lücken nach Applikation eines Kontrastmittels (Fluorescein) zur Sichtbarmachung dargestellt werden. Im gesunden Intestinum tritt Fluorescein auch in den basolateralen Interzellularraum ein. Jedoch nicht weiter als bis zur apikalen Grenze. Dies beruht wohl auf dem abdichtenden Effekt der Tight Junctions. Demzufolge tritt bei einer intakten Epithelbarriere kein Fluorescein in das Lumen aus (Kiesslich et al., 2012). Das intravenös verabreichte Fluorescein ermöglicht auch die Darstellung der Gefäße im Zottenstoma (Abbildung III-9) umgeben von der Basalmembran (Polglase et al., 2005). Die epithelialen Lücken können von Becherzellen der Mukosa unterschieden werden. Dabei ist die topische Gabe von Acriflavin nötig. Hierfür sind drei Kriterien für eine positive Identifikation und Unterscheidung bekannt:

- a) Becherzellen besitzen unverkennbar geformte zentrale Muzin-haltige Speichervakuolen und einen basal ständigen Kern. In der KLE ist dies gut erkennbar, wenn das Epithel von der Seite betrachtet wird. Im Falle, dass sie von oben betrachtet werden, besitzen Becherzellen eine spezifische Öffnung (Kiesslich et al., 2007).
- b) Das Abschilfern der Epithelzellen kann mittels i.v.-Gabe von Fluorescein nachgewiesen werden (Kiesslich et al., 2007). Vor dem Abstoßen werden die Epithelzellen für das

Fluorescein permeabel und fluoreszieren stark. Dadurch können die durch herausgelöste Zellen entstanden Lücken im Epithel mittels KLE sichtbar gemacht werden.

c) An Stellen, an welchen die Kontinuität der Barriere nicht mehr erhalten bleibt, kann der Austritt von fluoreszierender interzellulärer Flüssigkeit in Form von hellen Schwaden, die aus der Zelle in den interzellulären Raum wandern, erkannt werden (Kiesslich et al., 2012) (Fritscher-Ravens et al., 2014).

Mittels der KLE wurde auch nachgewiesen, dass sich ganze Zellverbände von der Lamina propria ablösen. Diese Mikroerosionen sind mit Weißlichtendoskopie nicht nachweisbar (Kiesslich et al., 2012); zur Verdeutlichung siehe Abbildung I-2.



**Abbildung I-2**

Bildfolge einer einzelnen Stelle im Duodenum, den Ablauf der Reaktion nach Nahrungsmittelexposition anzeigend: A zeigt das noch intakte Epithel, in B entsteht eine Diskontinuität, die in C mit einem Defekt mit sichtlichem Fluoresceinaustritts aus dem Epithel endet

---

Bei Integritätsverlust der intestinalen Barriere kommt es abhängig vom vorherrschenden osmotischen Gradienten zu einem Ein- bzw. Ausfluss durch die entstandenen Lücken im Epithel. Dies wird durch den erkennbaren Austritt von Fluorescein aus dem Gewebe in Form der oben genannten Schwaden ersichtlich (Kiesslich et al., 2012).

Obwohl es sich beim Abschilferungsprozesses um einen physiologischen Vorgang handelt, könnte eine Zunahme von epithelialen Lücken auf eine pathologische Reaktion hindeuten.

## **I.II Fragestellung**

Innerhalb des Patientenkollektivs mit IBS gibt es eine Untergruppe, die auf gewisse Diätformen oder bei Nahrungsauslass eine Besserung der Beschwerden erfährt. Es ist daher anzunehmen, dass eine Schnittmenge von IBS und NMU besteht.

Da sich die intestinale Mukosa auf mikroskopischem Niveau in vivo mit Hilfe der KLE darstellen lässt, ergibt sich die Frage, ob dynamische Veränderungen nachgewiesen werden können, wenn die Schleimhaut von IBS-Patienten mit Verdacht auf eine Nahrungsmittelsensitivität mit potentiellen Antigenen in Kontakt kommt. Sollte sich beweisen lassen, dass nach Aufbringen bestimmter Nahrungsmittel auf die Schleimhaut eine Reaktion entsteht und sich die Symptome nach dem Verzicht auf das auslösende Nahrungsmittel bessern oder gar nicht mehr auftreten, könnte ein neuer Gold-Standard geschaffen werden, der zur Identifikation dieser Untergruppe von IBS Patienten geeignet ist, und somit die Diagnose einer Nahrungsmittelunverträglichkeit sichert.

In dieser Arbeit wurden hierzu die folgenden Fragen bearbeitet:

- Leiden Patienten mit IBS unter unentdeckten beziehungsweise bisher nicht diagnostizierbaren Nahrungsmittelunverträglichkeiten?
- Ruft das Aufbringen von bestimmten handelsüblichen Nahrungsbestandteilen (Antigenen) auf die duodenale Mukosa bei IBS Patienten eine endomikroskopisch erkennbare Reaktion aus?
  - a) Wenn Ja, welche Charakteristika zeichnen eine solche Reaktion aus?
  - b) Wenn Ja, lassen sich dann die Beschwerden lindern, wenn diese Patienten auf das auslösende Nahrungsmittel verzichten?

## II. MATERIAL UND METHODEN

### II.I Patientengruppe

In die Studie wurden volljährige (>18 Jahre) ambulante Patienten mit Reizdarmsyndrom, gemäß der Rom-III-Kriterien (Longstreth et al., 2006) mit moderaten oder schweren refraktären täglichen Symptomen, die mindestens über ein Jahr lang bestanden, (Funktionale Gastrointestinale Störung C1) aufgenommen. Zu den Rom-III-Kriterien zählen:

- Wiederkehrende abdominale Schmerzen oder unangenehmes Empfinden

plus mindestens zwei der folgenden Kriterien:

- Besserung der Beschwerden durch Defäkation
- Änderung der Stuhlhäufigkeit
- Änderung der Stuhlkonsistenz

Diese Symptome mussten seit mindesten sechs Monaten vor Diagnosestellung bestehen, sowie mindestens an drei Tagen pro Monat während der letzten drei Monate.

Zudem fand eine Aufteilung in die Unterkategorien in IBS-D, IBS-C sowie IBS-M statt. Für die Gruppe IBS-U fand sich kein Patient.

Durch vorher durchgeführte Blutuntersuchungen, Stuhlanalysen, Gastroskopie und Koloskopie, sowie durch eine histologische Aufarbeitung der dabei entnommenen Gewebeproben konnte die Ätiologie der bestehenden Beschwerden nicht geklärt werden. Laboruntersuchungen des Gesamt-IgE und spezifische IgE-Antikörper sowie Provokationstests und Hautpricktests waren unauffällig.

Die Patienten waren unbedingt davon überzeugt, dass ihre Beschwerden von Nahrungsmitteln abhängig waren, und sich ihre Symptome postprandial verschlechterten. Diät-Tagebücher halfen jedoch nicht ein Allergen zu identifizieren.

Eine 3-tägige Reis-Ausschlussdiät hatte die Symptome erheblich lindern können.

Als Kontrollgruppe (gesunde Kontrollen, GK) dienten Patienten ohne IBS, die mittels KLE aufgrund eines Barrett-Ösophagus untersucht wurden.

Patienten, bei denen die in Tabelle 3 zusammengefassten Erkrankungen nachgewiesen worden waren, wurden von der Studie ausgeschlossen.

- Postinfektiöse Symptome
- Infektionen, z.B. Helicobacter pylori und Tropheryma whipplei
- Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
- Bakterielle Fehlbesiedelung des Darmes
- Zöliakie
- Ösophageale Striktur
- Eingeschränkte Nierenfunktion (Kreatinin > 1,2 mg/dl)
- Gastrointestinale Blutung in naher Vergangenheit
- Bekannte Allergien gegen Fluorescein oder Methylenblau
- Anzeichen von Depression oder Angst
- Frauen in Schwangerschaft oder Stillzeit

**Tabelle 3**  
Ausschlusskriterien

---

Frauen wurden nicht während der Menstruationsperiode endoskopiert.

Die Patienten wurden sowohl über die Gastroskopie, als auch über die KLE-Studie aufgeklärt und willigten ein (Aufklärungsbögen finden sich im Anhang). Ein Aussteigen aus der Studie war jederzeit möglich.

Diese Studie wurde vom Ethikkomitee der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zugelassen (AZ: A 139/12) und bei clinicaltrials.gov (Registrierungsnummer: NTC01692613) registriert.

## **II.II Konfokale Laserendomikroskopie (KLE)**

### **II.II.I Technische Grundlagen der konfokalen Lasermikroskopie**

In den späten fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts beschrieb Marvin Minsky, ein Forscher auf dem Gebiet der künstlichen Intelligenz, die konfokale Mikroskopie (Minsky, 1957) und erhielt hierfür das Patent. Sie erlaubt es, hochauflösende Bilder von dicken Gewebeproben zu erstellen. Im Gegensatz zur Durchlichtmikroskopie wird die Probe nicht durch- sondern beleuchtet. Das Abbild kann auf zwei Weisen entstehen, entweder durch Reflexion des

Lichts oder durch Fluoreszenz des Gewebes (Yoshida et al., 2007, Kiesslich and Neurath, 2007).

Das grundlegende Prinzip der konfokalen Mikroskopie ist in Abbildung II-1 dargestellt. Licht tritt aus der Lichtquelle (10) aus und wird in der Linse (2) auf die Fokusebene gebündelt. Der von dem Gewebe reflektierte Lichtstrahl durchläuft dieselbe Linse und wird im Detektor (28) aufgenommen. Der Strahl von der Lichtquelle zum Objekt und der reflektierte Strahl vom Objekt zum Detektor besitzen dabei gemeinsame Brennpunkte und sind somit konfokal.

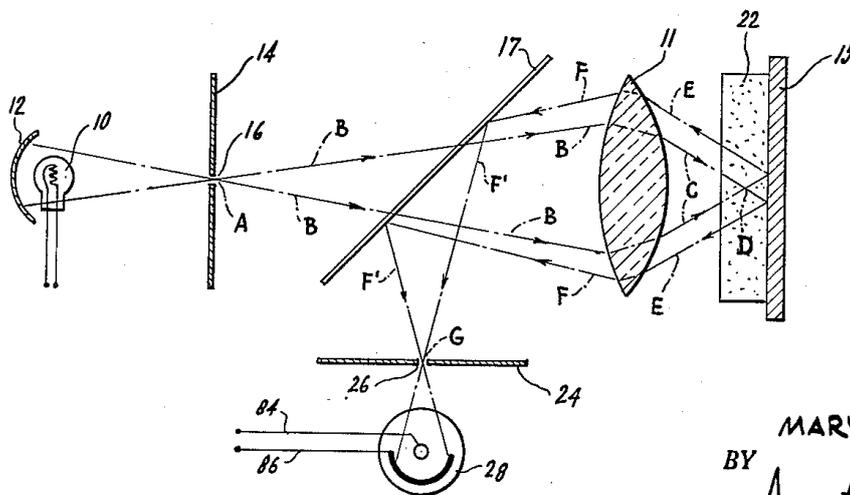


FIG. 3.

INVENTOR.  
MARVIN MINSKY  
BY  
*Ameter & Levy*  
ATTORNEYS

### Abbildung II-1

Grundlegender Aufbau eines konfokalen Mikroskops aus dem US Patent von Marvin Minsky (Minsky 1957)

Das konfokale Mikroskop führt stets zwei Aufgaben parallel zur selben Zeit aus:

Es tastet durch zeilenweises Beleuchten mittels eines fokussierten Laserstrahls der Reihe nach einzelne Punkte in der Fokusebene (Objektebene) ab. Dies geschieht mit Hilfe eines oszillierenden Spiegels in x- und y-Richtung. Und es nimmt die vom jeweils abgetasteten Probenort emittierte Fluoreszenzstrahlung am Detektor pixelweise auf (Conchello and Lichtman, 2005).

Dabei kann nicht die gesamte Probe dargestellt werden, sondern immer nur ein Bildpunkt. Erst durch zusammensetzen einzelner abgetasteter Bildpunkte („scanning“) wird ein Bild erzeugt. „Scanning“ beschreibt einen Prozess, bei dem das Abbild erst durch das

Zusammenführen von Informationen von einzelnen Regionen in der Fokusebene erstellt wird (Conchello and Lichtman, 2005).

Die konfokale Laserendomikroskopie beruht auf der Beleuchtung des Gewebes mit einem Niedrigenergielaser (Neumann et al., 2010). Hierbei wird das Gewebe mittels eines fluoreszierenden Kontrastmittels sichtbar gemacht. Das Laserlicht regt das Fluorochrom an und das emittierte Licht trifft durch dieselbe Linse neu gebündelt auf den Detektor. Es wird nur zurückkehrendes Licht, das die Blende (26) durchtritt, wahrgenommen. Die konfokale Blende („Pinhole“) ermöglicht es, dass der Detektor nur Licht verarbeiten kann, welches durch diese Blende tritt. Licht, das nicht im Fokus entspringt, trifft aus geometrischen Gründen nicht durch die Blende und ist daher von der Detektion ausgeschlossen (Polglase et al., 2005). Damit ist das konfokale Mikroskop inhärent tiefendiskriminierend (Conchello and Lichtman, 2005). Dies bedeutet, dass auf Grund der optischen Konstruktion jeweils nur eine Ebene scharf dargestellt werden kann. Durch die Änderung des Fokus können dann auch andere Ebenen einzeln abgebildet werden.

Das erhaltene Signal wird digitalisiert und kann an einem Bildschirm wiedergegeben werden.

Durch Änderung der Fokusebene können Bilder aus tieferen Schichten der Proben gewonnen werden. Bilder aus anderen Schichten entstehen durch Veränderung der Tiefe in Richtung der z-Achse (Polglase et al., 2005). Schnittbilder und dreidimensionale Bilder können somit rekonstruiert werden.

Demzufolge gestattet die KLE hochauflösende Bilder aufzunehmen und ohne Gefahr einer Blutung eine optische Biopsie und in vivo Histologie in Echtzeit zu erstellen (Neumann et al., 2010).

Um das System für die Endoskopie tauglich zu machen, erfolgte die Miniaturisierung. Eine einzelne Glasfaser wurde zum Entsenden und Empfangen des Laserstrahls verwendet. Dies erlaubt den Verzicht auf die Lochblende (Kimura and Wilson, 1991, Delaney et al., 1994). Ebenfalls zur Verkleinerung führte die elektromagnetische Rasterabtastung (Harris, 2003).

Die KLE-Abbildung entsteht horizontal zur Schleimhaut, also quer zu den Villi. Histologische Schnitte sind meist scheinbar geschnitten; sie treffen die Villi folglich der Länge nach. Die Bildgebung ist daher nicht kongruent zur Histologie.

Bildartefakte können auf Grund von Mukus, Debris, oder Luftblasen zwischen KLE und Mukosa auftreten. Peristaltik, Atembewegungen und der Herzschlag können die Bildqualität mindern (Polglase et al., 2005). Durch Bewegung beim Abtasten können verzerrte Bilder entstehen (Dunbar and Canto, 2010).

Derzeit sind zwei KLE-Systeme geläufig: Eines, bei dem das KLE in die Spitze des Endoskops integriert ist, das Andere beruht darauf, dass das KLE mittels Sonde durch den Arbeitskanal eines gängigen Endoskops zur Spitze geführt wird. (Ersteres wurde in dieser Studie verwendet.) Zur Durchführung der Studie wurde das KLE Pentax EC-387CILK (Tokyo, Japan) verwendet. Der Durchmesser des Endoskops betrug 12,8 mm und die rigide Spitze des Endoskops, welche die Mikroskopieeinheit beheimatete, war 50 mm lang.



**Abbildung II-2:**  
Distale Spitze des Konfokalen Laserendomikroskops

Das Laserendoskop ermöglicht die zeitgleiche Bildbetrachtung auf zwei Monitoren, einem für die Weißlichtendoskopie und einem für die Darstellung des mikroskopischen Bildes. Die Scanrate betrug 1,6 Bilder pro Sekunde (B./s) bei einer Auflösung von 1024/512 Bildpunkten und 0,8 B./s bei einer Auflösung von 1024/1024 Bildpunkten. Die Bilder hatten eine Größe von 475 auf 475  $\mu\text{m}$ . Das laterale Auflösungsvermögen betrug 0,7  $\mu\text{m}$  und die Tiefenauflösung lag bei 7  $\mu\text{m}$ . Die z-Achse (Tiefe) konnte von 0 bis 250  $\mu\text{m}$  verändert werden, wobei eine Eindringtiefe bis zu 250  $\mu\text{m}$  nicht ausreicht, die gesamte Mukosatiefe von 300 bis 400  $\mu\text{m}$  darzustellen (Wang, 2005, Dunbar and Canto, 2010).

### **II.II.II Fluoreszein**

Als fluoreszierendes Agens wurde 5 ml 10%iges Fluoreszein (Fluorescein ALCON® 10% Injektionslösung, Alcon Pharma GmbH, Freiburg, Deutschland) i.v. verabreicht. Es wird bereits seit langem in der Augenheilkunde als fluoreszierendes Kontrastmittel verwendet (Kim, 2000).

Nebenwirkungen nach der Verabreichung von Fluoreszein treten bei 4,8% der Patienten auf. Dazu gehören Übelkeit (2,9%), Erbrechen (1,2%), Jucken/Hautrötungen/Nesselsucht (0,5%) und andere Reaktionen wie Luftnot, Synkopen oder ausgeprägtes Niesen (0,2). Hypoglykämien treten ebenfalls auf (Kwiterovich et al., 1991, Jennings and Mathews, 1994). 1986 wurde bei 221781 durchgeführten Fluoreszenzangiographien das Nebenwirkungsprofil von Fluoreszein erfasst. Die Häufigkeitsrate für moderate Reaktionen lag bei 1:63, für schwere Reaktionen bei 1:1900 und für das Eintreten des Todes bei 1:222000 (Yannuzzi et al., 1986).

Nach Injektion verteilt sich Fluorescein innerhalb von Sekunden im Gefäßsystem und tritt über das Kapillarsystem in die extrazelluläre Matrix ein, markiert diese und ermöglicht die konfokale Bildgebung (Polglase et al., 2005). Mit Fluorescein lassen sich Zellkerne nicht direkt darstellen (Neumann et al., 2010). Die in dieser Studie dargestellten epithelialen Lücken sind durch das Austreten des Fluoresceins durch diese Lücken indirekt dargestellt worden.

### II.III Studienablauf

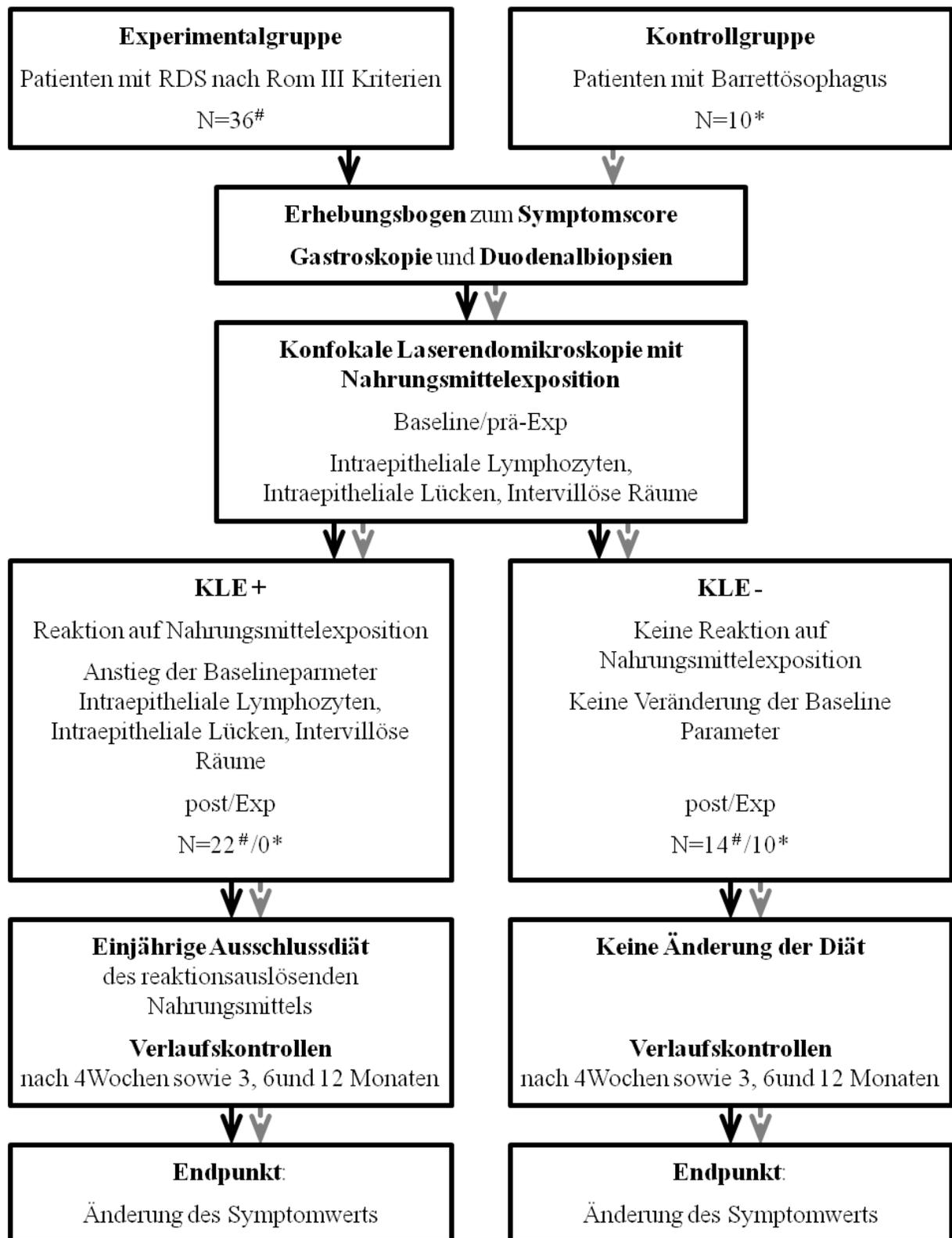


Abbildung II-3  
Studienablauf

### **II.III.I Voruntersuchung**

Eine graphische Darstellung des Studienablaufes ist in Abbildung II-3 dargestellt. Ein bis zwei Wochen vor der KLE wurde eine den üblichen Standards entsprechende Gastroskopie durchgeführt. Hierbei wurden bestehende Pathologien des oberen Gastrointestinaltrakts, welche die Beschwerden der Patienten erklären könnten, ausgeschlossen. Zur Baselinediagnostik wurden acht Biopsien aus dem tiefen Duodenum entnommen, um die Anzahl der intraepithelialen Lymphozyten zum Ausgangszeitpunkt zu bestimmen (prä-Exp/histol) sowie eine herkömmliche histologische Untersuchung durchzuführen.

### **II.III.II Konfokale Laserendomikroskopie Untersuchung**

In tiefer Sedierung mit Propofol i.v. (Propofol-®Lipuro 10mg/ml Emulsion B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland), initial 1 mg/kgKg und anschließender angepasster fraktionierter Gabe, wurde die Untersuchung von stets derselben Ärztin (Prof. Annette Fritscher-Ravens, AFR) durchgeführt. AFR verfügt über eine mehrjährige Erfahrung im Bereich der Endomikroskopie.

Um die Mukosa nicht zu beschädigen, wurde das Endomikroskop mit großer Vorsicht, bis in das tiefe Duodenum vorgeführt. Eine Beschädigung der Mukosa hätte eine falsch positive Bildgebung zur Folge gehabt.

Befand sich das Endoskop im tiefen Duodenum, wurde dem Patienten das Fluorophor Fluorescein und 40 mg Butylscopolaminiumbromid (Buscopan® Ampullen 20 mg/1 ml Injektionslösung, (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland) zur Ruhigstellung des Darmes intravenös injiziert.

Es folgte die Aktivierung des Lasers und damit die Erfassung der endomikroskopischen Grundlinien-Bilder (prä-Exp/KLE) der Duodenalmukosa.

Nahrungsmittel wurden nur über das Endomikroskop auf die Schleimhaut aufgebracht, wenn kein Fluoresceinaustritt erkennbar war und somit die Integrität der Mucosa anhand der Grundlinien-Bilder gewährleistet war.

Es wurden separat jeweils 20 ml der folgenden handelsüblichen Nahrungsmittel Essenzen und Suspensionen über das KLE auf die Schleimhaut aufgebracht:

- Kuhmilch zu 50% mit sterilem Wasser verdünnt
- Getreide als Suspension von 2g auf 20ml sterilem Wasser
- Hefe als Suspension von 1g auf 20ml sterilem Wasser
- Soja als Suspension von 2g auf 20ml sterilem Wasser

Als Kontrolllösung diente eine Mischung von 18ml sterilem Wasser und 2ml Simeticon (Sab simplex®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland). Die verschiedenen Antigene wurden von distal nach proximal im tiefen Duodenum auf die Schleimhaut gespritzt. Zwischen den einzelnen Expositionen fand eine Auswaschphase mit NaCl 0,9% statt. Die Untersucherin war gegenüber den meisten aufzubringenden Nahrungsmitteln, mit Ausnahme der Milch (angesichts ihrer Farbe), verblindet.

Nach jedem Stimulus wurde die Schleimhaut für mindestens fünf Minuten endomikroskopisch betrachtet und Bilder (post-Exp/KLE) erstellt.

Im Falle einer ersichtlichen mukosalen Veränderung auf ein appliziertes Nahrungsmittel (KLE [+]) wurde die Untersuchung beendet. Der Patient wurde dann auf keine weiteren Nahrungsbestandteile getestet, da die mukosalen Veränderungen zu ausgeprägt waren, um verlässliche weitere Tests durchzuführen. Die Untersuchung wurde zeitlich auf 25 bis 30 Minuten begrenzt, da durch spontanen und aktiven Abtransport des Fluoresceins die Bilder nach diesem Zeitraum verwässerten. Wie bei der Ausgangsgastroskopie wurden am Ende der KLE acht Biopsien zur Gewinnung der Histologie nach Exposition (post-Exp/histol) aus dem tiefen Duodenum entnommen.

### **II.III.III Auswertung des gewonnenen Bildmaterials**

Nach der Untersuchung wurden die KLE-Bilder von verschiedenen, gegenüber den aufgetragenen Antigenen verblindeten Medizinern, auf eine Reaktion auf das aufgetragene Nahrungsmittel (post-Exp/KLE), überprüft: es wurden Anzahl der intraepithelialen Lymphozyten (IEL), der epithelialen Lücken und die Größe des intervillösen Raumes in einem vorher/nachher System erfasst und etwaige Veränderungen notiert.

Hierfür wurde die Software ImageJ 1.46 (National Institutes of Health) verwendet.

Eine positive Reaktion (KLE+) auf ein NM wurde makroskopisch im KLE Bild sichtbar als Veränderung von mindestens zwei der drei folgenden Parameter:

#### **II.III.III.I Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)**

Zur Bestimmung der IEL wurden jeweils drei verwertbare qualitativ gute Bilder (ohne Artefakte) aus den Bildsammlungen prä-Exp/KLE und post-Exp/KLE pro Proband ausgewählt.

In jedem Bild wurden drei standardisierte Bildausschnitte mit der Größe von 250 auf 250 Bildpunkten, entsprechend einer realen Quadratfläche von 116 x 116  $\mu\text{m}$  (1 Bildpunkt entspricht 0,46 $\mu\text{m}$  (475 $\mu\text{m}$ /1024pixel)) im Bereich der abgebildeten Villi festgelegt. Die in diesen Fenstern abgebildeten IEL wurden gezählt und pro Feld (F) angegeben (IEL/F).

#### **II.III.III.II Epitheliale Lücken (eL)**

Epitheliale Lücken sind zellfreie Stellen im einschichtigen Epithel ohne Zytoplasma, Zellkern und Bürstensaum (Watson et al., 2005). Wenige dieser Lücken werden physiologisch nachgewiesen. Innerhalb der Bildsätze prä-Exp/KLE und post-Exp/KLE wurden diese eL im Bereich der Zonula occludens (Schlussleiste, Tight Junctions) auf 1000 Epithelzellen ermittelt.

#### **II.III.III.III Intervillöser Raum (ivR)**

Der ivR wurde in den Bildersammlungen prä-Exp/KLE und post-Exp/KLE an jeweils vier Stellen als Distanz zwischen den Zotten gemessen. Wanderte das Fluorescein in das Darmlumen zwischen den Zotten, galt eine Erweiterung des ivR als nachgewiesen.

#### **II.III.IV Auswertung der gewonnenen Biopsien**

Die Auswertung der für die Histologie gewonnenen Biopsien fand durch das Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel statt. Zur Färbung der histologischen Schnitte wurden Hämatoxylin und Eosin (H.E.), PAS-Reaktion und immunhistochemische Verfahren zur Darstellung von CD3-Rezeptoren (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) als T-Zell-Marker angewandt. Eine automatische Antigendemaskierung wurde mit der Citrat-basierten Lösung ER1 (Citratpuffer, pH 6) durchgeführt. Dabei wurde das automatische Färbesystem Bond-Max und Polymer Refine Detection (Leica, Berlin, Deutschland) verwendet. Die Anzahl der IEL

wurde in einem ununterbrochenen und gut dargestellten Zottenepithel mit mindestens 50 aneinandergereihten villösen Epithelzellen ermittelt, wobei insgesamt 200 Epithelzellen ausgezählt wurden.

### **II.III.V Behandlung und Nachsorge**

Abhängig vom Ergebnis der endomikroskopischen Untersuchung wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt. Die eine Gruppe zeigte eine erkennbare Reaktion (KLE+) auf ein Nahrungsmittel, die andere zeigte keine Reaktion (KLE-). Alle Patienten, unabhängig ob sie bei der KLE auf ein Nahrungsmittel reagiert hatten (KLE+) oder nicht (KLE-), erhielten ein umfassendes Arztgespräch. KLE+ Patienten wurden gebeten, das Antigen, auf das sie reagiert hatten, aus Ihrer Nahrung komplett zu entfernen. Die KLE- Patienten wurden aufgeklärt, dass die Testung keine Reaktion ergeben hatte. Sie konnten ihre gewohnte Diät beibehalten. KLE+ Patienten wurden nach 4 Wochen, 3 Monaten, 6 Monaten und nach einem Jahr wieder vorgestellt. Viele erhielten nach den ersten 4 Wochen eine zusätzliche Diätberatung. Bei allen Vorstellungsterminen wurden die KLE+ Patienten auf ihre Beschwerdesymptomatik hin befragt.

Die IBS Beschwerden - abdominale Schmerzen, Blähungen, Diarrhöen, Obstipation - der Patienten wurden mittels eines Fragebogens evaluiert und entsprechend eingestuft. Dieser Fragebogen beinhaltete die körperlichen Elemente der visuellen Analogskala (VAS)-IBS (Bengtsson et al., 2007) sowie eine numerische Ratingskala von 1 bis 10. Der zu Beginn der Studie erhobene Ausgangswert der Symptomstärke von Schmerz, Blähung, Obstipation und Diarrhö wurde mit dem Wert während und nach der Diät verglichen.

Da kein Studienteilnehmer klinische Anzeichen einer Depression oder Angststörung aufwies, wurde auf Erhebung der Werte für psychosozialen Stress und Somatisierung verzichtet.

Eine Änderung der Diät oder Medikamenteneinnahme zur Symptomlinderung war den Studienteilnehmern untersagt. Die Überprüfung mittels Fragebögen fand im Rahmen der Nachbetreuung statt. Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf der Einhaltung der Diät. Falls ein Bruch der Diät bemerkt wurde, wurden Ernährungshinweise gegeben oder eine Diätberatung durchgeführt.

Bei jedem Nachgespräch fand mit Hilfe des VAS-IBS sowie der numerischen Ratingskala eine Neueinschätzung der Symptomstärke statt. Der klinische Endpunkt der Studie war die Änderung des Symptomwertes nach einem Jahr.

## **II.IV Statistik**

Diese Studie wurde im Sinne einer Machbarkeitsstudie durchgeführt. Es waren keine früheren vergleichbaren Daten verfügbar. Daher wurde kein Stichprobenumfang ermittelt.

Patienteneigenschaften und Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt und mittels parametrischer Statistik analysiert.

Ergebnisse vor und nach Nahrungsmittelprovokation wurden je Anwendungsgebiet mittels gepaartem T-Test oder  $\chi^2$ -Test verglichen.

Die Ergebnisse der KLE+ und KLE- Gruppe und die Kontrollgruppe wurden mit Hilfe eines ungepaarten T-Tests ermittelt. Beim zweiseitigen t-Test wurde ein p-Wert unter 0,05 als signifikanter Unterschied erachtet.

Sämtliche statistischen Analysen und Erhebungen von Korrelationen wurden mit GraphPad Prism, Version 6.0 (La Jolla, CA) durchgeführt.

### III. ERGEBNISSE

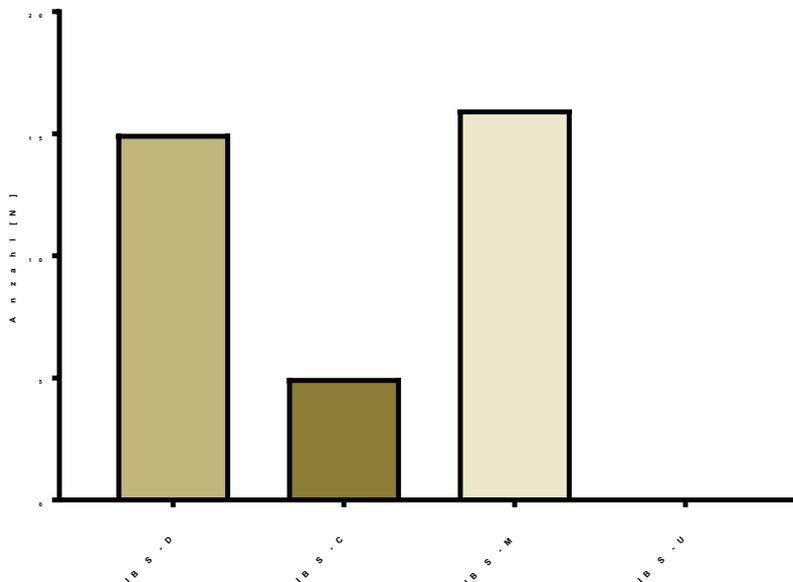
#### III.I Patienten

Es wurden 40 Patienten im Alter von 21 bis 76 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 44,6 Jahren mit einer Standardabweichung von 2,8 Jahren evaluiert, davon waren elf männlich.

Während der Nachsorge mussten vier Patienten von der Studie ausgeschlossen werden. Grund hierfür war bei zwei Studienteilnehmern ein Umzug, bei einem Patienten wurde eine Nachsorge vom Hausarzt für nicht nötig empfunden und ein Patient hatte kein Interesse an einer weiteren Nachsorge. Den Letzteren beiden ging es unter einer Ausschlussdiät besser.

In die Studie wurden 36 Teilnehmer im Alter von 21 bis 76 Jahren eingeschlossen, davon waren 27 weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 43,8 Jahre, bei einer Standardabweichung von 2,8.

Die Untergruppen des IBS waren wie folgt vertreten: 16 Patienten mit IBS-M, 15 Patienten mit IBS-D und 5 Patienten mit IBS-C. Bei vier Patienten lagen weitere Symptome wie Schwindel und Juckreiz vor. Für IBS-U fand sich, wie bereits erwähnt, kein Patient.

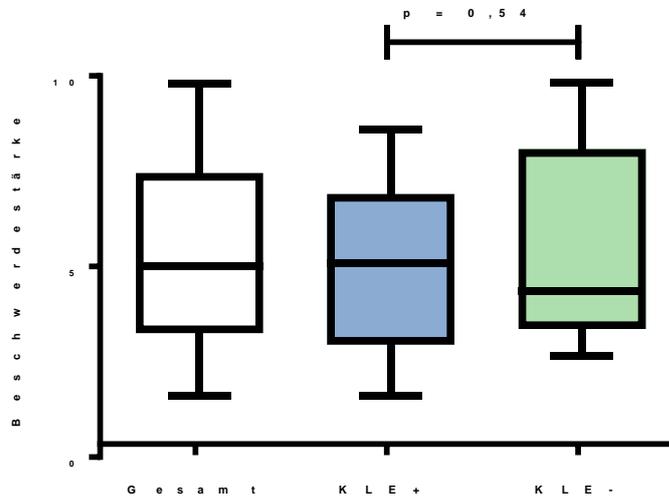


**Abbildung III-1**  
Verteilung der Untergruppen des IBS innerhalb der Studienteilnehmern

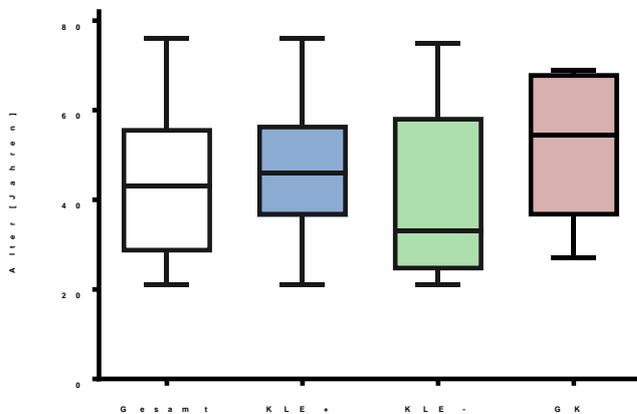
---

In Bezug auf das Alter gab es zwischen den beiden Gruppen der KLE + (46,0 (± 3,2) J., Altersspanne: 21 – 76 J.) und KLE – (40,3 (± 5,1) J., Altersspanne: 21 - 75 J.) keinen signifikanten Unterschied (p=0.33).

Die Ausgangsbeschwerdestärke zwischen den beiden Gruppen der KLE+ und KLE- wies keinen statistischen signifikanten Unterschied auf (KLE+: 5,0 ( $\pm 0,5$ ) Streubreite 1,6-8,6; KLE- : 5,6 ( $\pm 0,7$ ); Streubreite 2,7-9,8  $p > 0,05$ ).



**Abbildung III-2**  
Vergleich der Ausprägung  
der Beschwerden vor der  
KLE-Untersuchung der  
später als KLE+  
beziehungsweise KLE-  
Identifizierten



**Abbildung III-3**  
Altersübersicht der  
Patientengruppen

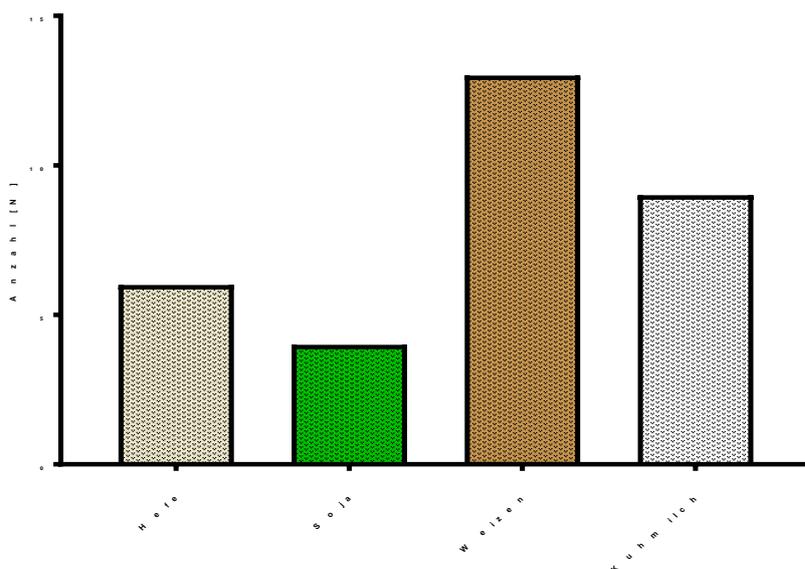
Bezüglich der IBS-Subgruppen, beziehungsweise der Hauptsymptome, konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied erhoben werden.

Die aus zehn Patienten bestehende Kontrollgruppe (gesunde Kontrollen, GK), davon sechs weiblich, mit einem Altersdurchschnitt von 50,7 ( $\pm 5,6$ ) J. und einer Altersspanne von 27 bis 69 J., zeigte hinsichtlich der Altersverteilung keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Gruppe der KLE+ und KLE- ( $p > 0,05$ ).

### III.II Sichtbare dynamische Veränderungen

Nach Injektion des Fluoreszeins wurde das duodenale Epithel bei allen Patienten innerhalb von ca. 30 sec sichtbar. Bei zwei Patienten wurde die KLE unterbrochen, da beim Vorschieben ins tiefe Duodenum das Endoskop die Mukosa verletzte. Hierdurch konnte Fluoreszein ungehindert in das Lumen ausströmen und eine positive Reaktion imitieren. Die Untersuchung dieser beiden Patienten konnten zu einem späteren Zeitpunkt erfolgreich wiederholt werden.

Nach der endoskopischen Gabe der einzelnen NM zeigten 22 der 36 Patienten eine deutliche sofortige Reaktion auf der Mukosaebene (22 KLE+). Im Einzelnen reagierten neun Patienten auf Milch, 13 auf Weizen, sechs auf Hefe und vier auf Soja. Bei sechs Patienten führte bereits das erste oder zweite NM zu einer effektvollen Veränderung, sodass die Untersuchung dann abgebrochen werden musste. Die verbleibenden Antigene wurden später nachgetestet.



**Abbildung III-4**  
Verteilung der  
Häufigkeit der  
Reaktionen auf  
bestimmte  
Nahrungsmittel

---

Die erkennbaren Veränderungen traten bei allen KLE+ Patienten stets in einem klaren zeitlichen Ablauf auf. Zuerst nahm die Dichte der IEL zu. Anschließend folgten die Abstoßung von Epithelzellen und das Aufbrechen des Epithelzellverbandes. Durch das Abschilfern wurden Zellteile, Zellen und ganze Epithelzellreihen in das Lumen abgegeben. Dadurch bildeten sich Lücken im Epithel, durch welche sich das Fluoreszein eruptionsartig ins Lumen ergoss. Durch diesen Einstrom füllte sich der Raum zwischen den Zotten mit

weiß leuchtenden Fluorescein. Dies ermöglichte die Darstellung des ivR. Diese Veränderungen zeigten sich innerhalb der ersten fünf Minuten nach der NM Gabe.

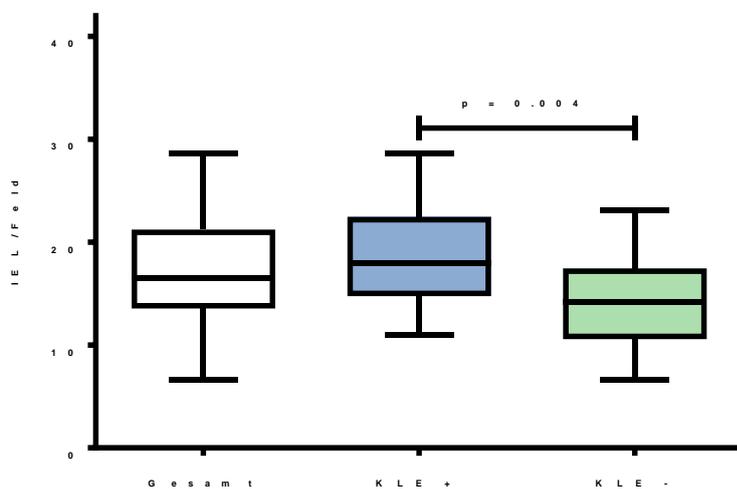
Keine dieser beschriebenen Veränderungen zeigte sich bei den zehn Kontrollprobanden. Auch nach Gabe der Kontrollsubstanz (Simeticon (Sab simplex®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland)) blieb eine Reaktion stets aus.

### III.II.I Intraepitheliale Lymphozyten in den Bildern der KLE

Zur Bestimmung der IEL/F wurden von jedem der 36 Patienten Bilder von jeweils vor und nach dem Aufbringen der NM, zur Bestimmung der IEL/F Baseline und zur Bestimmung der IEL/F nach der NM Exposition ausgewertet.

Aus der Gesamtheit aller Patienten konnten prä-Exp/KLE 16,8 ( $\pm 0,8$ ) IEL/F (Sw: 6,7-28,7; 95% KI: 15,1-18,6) ermittelt werden. Dies bedeutet, dass vor Exposition 16,8 IEL pro ausgewertetem Fenster zu sehen waren.

Die Anzahl der prä-Exp/KLE ermittelten IEL war bei KLE + Patienten signifikant höher als bei KLE - Patienten (KLE+, 18,7 ( $\pm 0,9$ ) IEL/F; Sw: 11,0-28,7; 95% KI: 16,7-20,8; KLE-, 13,8 ( $\pm 1,2$ ) IEL/F; Sw: 6,7-23,1; 95% KI: 11,1-16,5;  $p=0,004$ ).

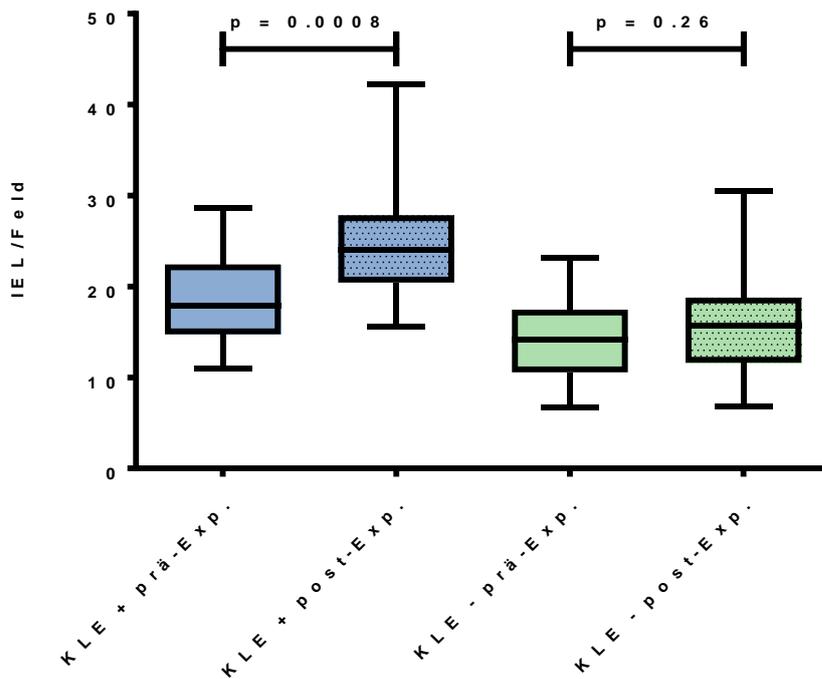


**Abbildung III-5**  
Anzahl IEL pro Feld in der Gesamtheit und in den später als KLE + oder KLE - Identifizierten vor Exposition.

In der Kontrollgruppe ergab die Bestimmung der IEL prä-Exp/KLE 11,7 ( $\pm 1,2$ ) IEL/F (Sw: 5,0-17,0; 95% KI: 8,9-14,4) und unterschied sich nicht signifikant von Werten der KLE- prä-Exp/KLE ( $p>0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied wurde jedoch im Vergleich zu den KLE+ festgestellt. Die IEL prä-Exp/KLE der Kontrollgruppe waren signifikant niedriger als die der KLE+ ( $p=0,002$ ). (s. Abbildung III-5)

Es war kein signifikanter Anstieg ( $p=0,26$ ) der IEL/F in der KLE - Gruppe von prä-Exp/KLE auf post-Exp/KLE ( $16,3 (\pm 1,6)$  IEL/F; Sw: 6,8-30,4; 95% KI: 12,7-19,5) erkennbar.

Ein signifikanter Anstieg ( $p=0,0008$ ) zeichnete sich auch innerhalb der KLE + von  $18,7 (\pm 0,9)$  IEL/F prä-Exp/KLE auf  $24,7 (\pm 1,4)$  IEL/F post-Exp/KLE nach dem Aufbringen der NM auf die Mukosa ab (Sw: 15,6-42,2; 95% KI: 21,9-27,6). (s. Abbildung III-6)



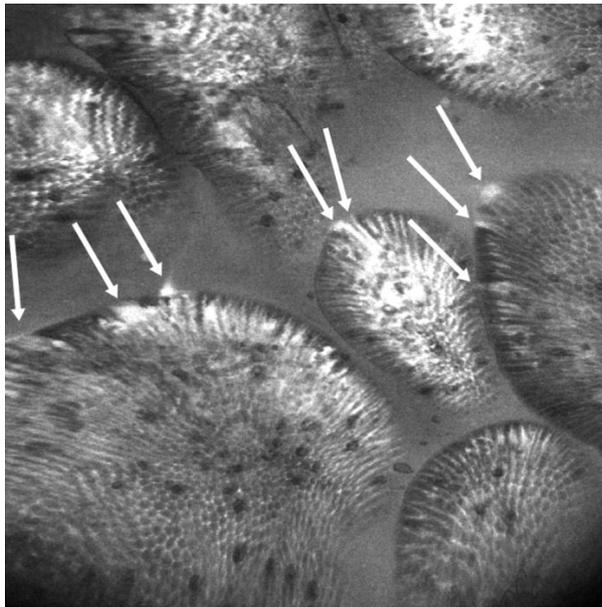
**Abbildung III-6**  
Innerhalb der KLE + zeigte sich durch NM-Exposition ein signifikanter Anstieg der IEL/F; innerhalb der KLE - blieb dieser aus.

---

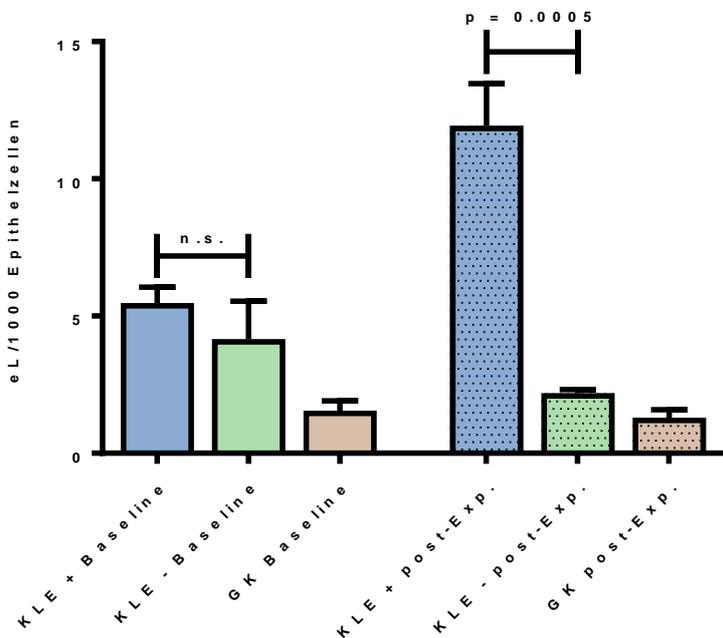
Eine signifikante Veränderung der IEL zeigte sich nach der Gabe von Wasser und Simethicon weder bei den KLE + ( $17,5 (\pm 1,3)$  IEL/F;  $p>0,05$ ) noch innerhalb der KLE - ( $11,5 (\pm 1,1)$  IEL/F;  $p>0,05$ ).

### III.II.II Epitheliale Lücken

Die Ausgangsdichte betrug bei der KLE + Gruppe 5,5 ( $\pm 0,6$ ) Lücken auf 1000 Epithelzellen (Spannweite: 2,0-10,0; 95% KI: 4,2-6,7) und stieg nach mukosaler Reaktion signifikant ( $p < 0,001$ ) auf 11,5 ( $\pm 1,5$ ) (Spannweite: 2,8-25,0; 95% KI: 8,3-14,7;) an. Innerhalb der KLE - Gruppe gab es keinen signifikanten Anstieg der Dichte.



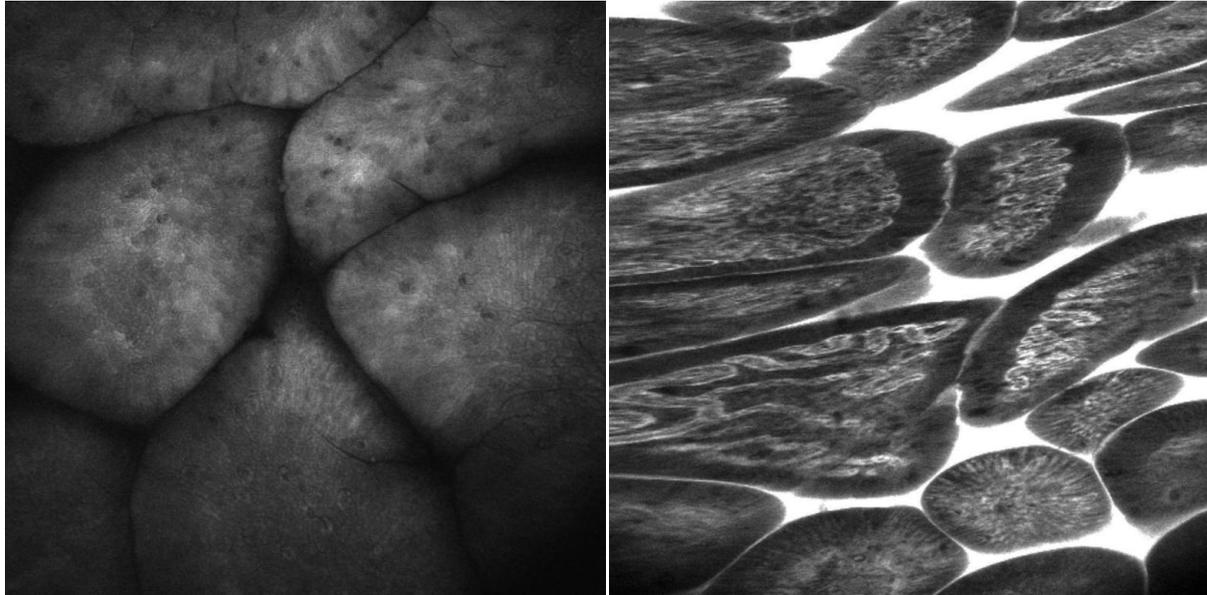
**Abbildung III-7**  
Die Pfeile markieren die Stellen im Epithel, aus denen Fluorescein austritt. Hierdurch werden Lücken im Epithelverbund angezeigt.



**Abbildung III-8:**  
Quantitative Veränderung der epithelialen Lücken auf 1000 Epithelzellen vor und nach Nahrungsmittlexposition.

### III.II.III Intervillöse Räume

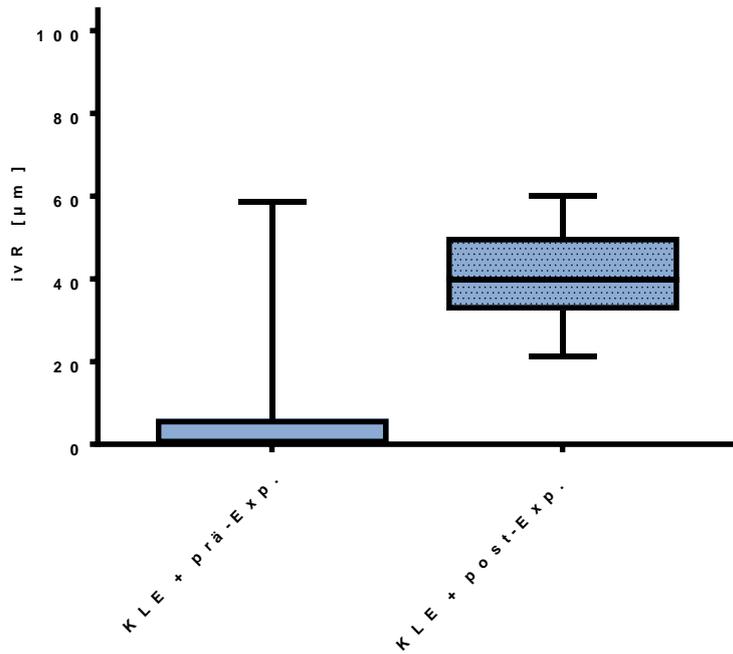
Vor Exposition lagen bei 31 Patienten der Experimentalgruppe die Zotten dicht aneinander. Bei 5 Patienten war bereits vor der Exposition ein Saum von Fluorescein zwischen den Zotten erkennbar. Bemerkenswert ist, dass diese sich im Laufe der Untersuchung als KLE+ herausstellten.



**Abbildung III-9**

Nach der Nahrungsmittlexposition wird bei KLE+ der intervillöse Raum rasch mit ausgetretenem Fluorescein gefüllt (rechtes Bild). Im Vergleich zu Aufnahmen vor Nahrungsmittel-Exposition (linkes Bild) sind die Intervillösen Räume erweitert. Im Bild nach Exposition sind auch die Gefäße im Zottenstoma gut zu erkennen.

Der Grundabstand der KLE + lag bei  $8,1 (\pm 3,5) \mu\text{m}$  (Spannweite: 0-58,6; 95% KI: 0,8-15,4). Nach Nahrungsmittlexposition erweiterte sich bei den KLE+ der IVR erkennbar auf  $41,1 (\pm 2,5) \mu\text{m}$  (Sw: 21,4-60,1; 95% KI: 35,9-46,2;  $P=0.0001$ ). Innerhalb der KLE- war kein ivR vor oder nach Exposition ersichtlich.



**Abbildung III-10**  
Vergleich der ivR bei KLE vor  
und nach der Exposition mit  
NM

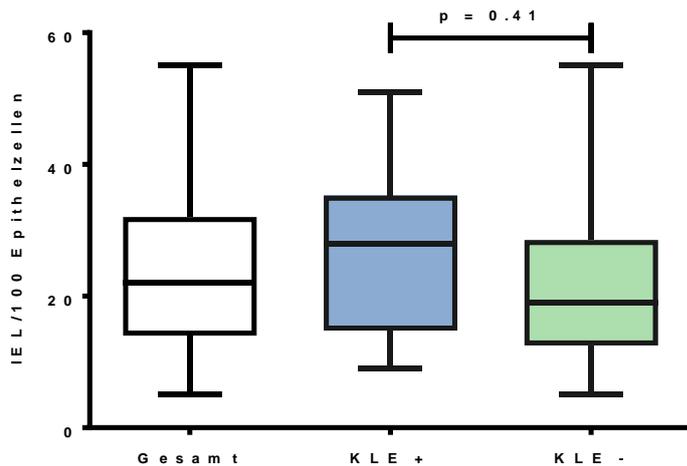
---

### III.III Intraepitheliale Lymphozyten in der Histologie

Die Histologie der Voruntersuchung (prä-Exp/Histol) und der unmittelbar nach der KLE Untersuchung (post-Exp/Histol) gewonnenen Biopsien zeigten bei allen Patienten eine normale Zotten- und Kryptenmorphologie.

Die Bestimmung der IEL prä-Exp/Histol und post-Exp/Histol erfolgte bei CD3-gefärbten Schnitten. Die Anzahl der IEL wurde auf 100 Epithelzellen (E) angegeben.

Die Grundanzahl der IEL prä-Exp/Histol betrug, KLE+ und KLE- zusammengenommen, 24,9 ( $\pm 2,3$ ) IEL/100 E (Sw 5-55; 95% KI, 20,4–29,6).



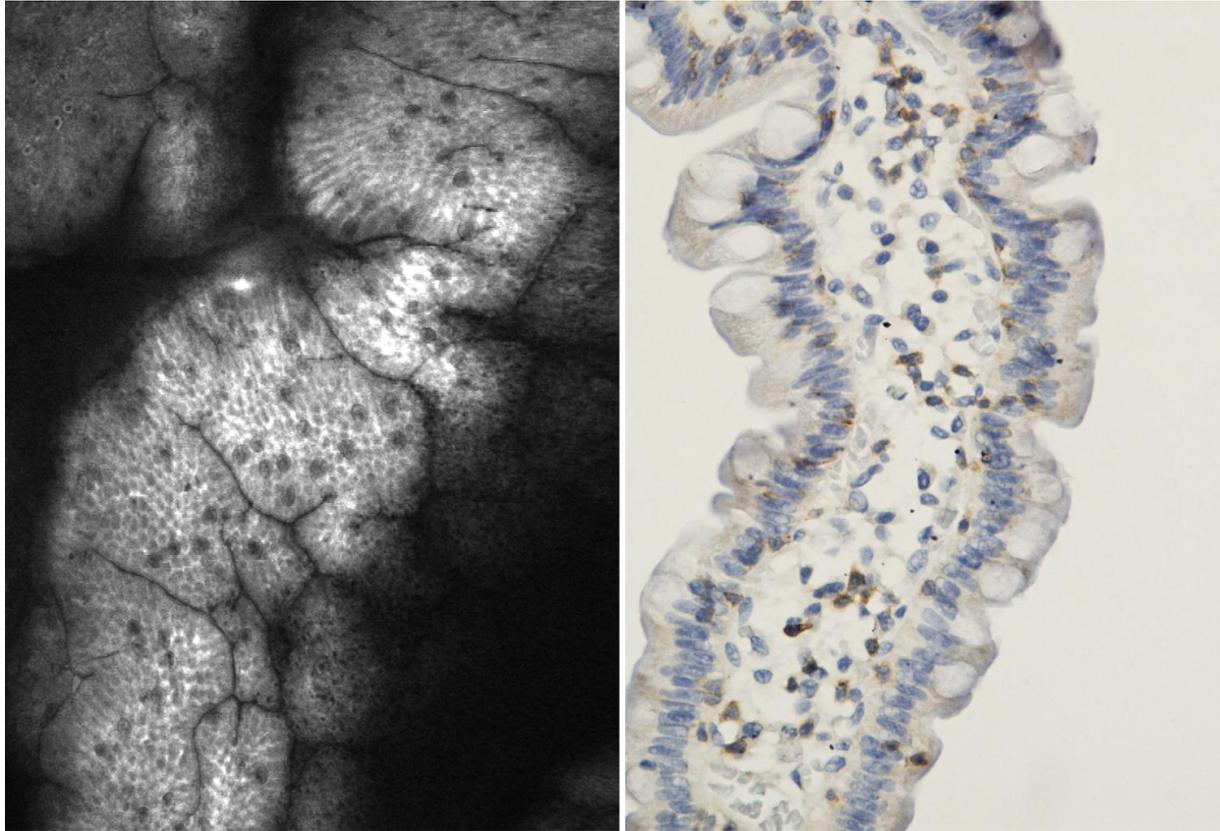
**Abbildung III-11:**  
Anzahl der IEL prä-  
Exp/Histol auf 100  
Epithelzellen - gesamt und  
aufgeteilt in später als KLE+  
und KLE- Identifizierte

Es gab zwischen den KLE+ und KLE- Patienten keinen signifikanten Unterschied der Grundlinienanzahl der IEL/100 E ( $P=0,41$ ; KLE+,  $26,4 (\pm 2,7)$  IEL/100 E; Spannweite 9-51; 95% KI: 20,8-29,6;  $N=22$ ) (KLE-,  $22,4 (\pm 4,2)$  IEL/100 E; Spannweite 5-55; 95% KI: 13,2-31,7;  $N=12$ ).

Nach der Exposition fand sich in den histologischen Schnitten kein signifikanter Unterschied zu den Werten der Voruntersuchung.

### III.IV Vergleich der IEL in Histologie und KLE

Die Grenze für den Normalwert ( $<25$  IEL/100E) wurde bereits in einer früheren Grundlagenarbeit von Majorie Walker, London (Walker et al., 2010), beschrieben und ist allgemein anerkannt. Wenn Sie zugrunde gelegt wird, zeigte sich in der Histologie lediglich eine Übereinstimmung von 70,6 % zur KLE, und somit kein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,89$ ;  $r^2=0,027$ ). Wurde die Höchstgrenze für die physiologische Anzahl der IEL in der Histologie auf mehr als 40/100E erhöht, zeigte sich nur noch eine Übereinstimmung in 58,8% der Fälle. (s. Abbildung III-12). Die Unterschiede der Anzahl der IEL in den endomikroskopisch erstellten Bildern und der in der klassischen Histologie nachgewiesenen ergeben sich möglicherweise durch die Zeitverschiebung der Bestimmung/Entnahme der Proben.



**Abbildung III-12**

Links: Darstellung der Lymphozyten durch KLE

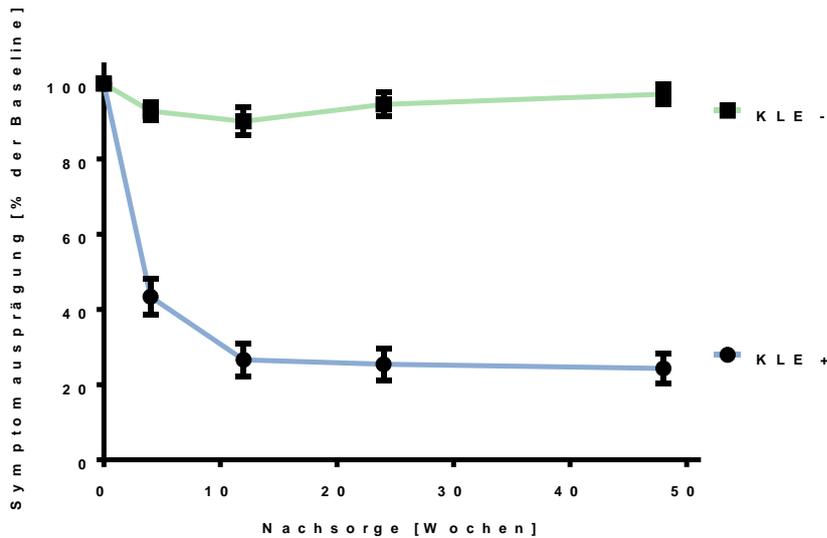
Rechts: histologische Darstellung durch eine immunhistochemische Färbung gegen CD3

---

### **III.V Exklusionsdiät und Nachsorge**

Nach der ausführlichen Aufklärung begannen die KLE+ Patienten mit ihrer individualisierten Diät. Nach vier Wochen zeigten bereits 19 von 22 KLE+ eine Besserung ihrer Symptome um mehr als die Hälfte des Ausgangswertes. Sechs Patienten hatten keinerlei Beschwerden mehr. Nach der ersten Nachbetreuung berichteten nicht alle Patienten, dass sie die Diät strikt eingehalten hatten; die Einhaltung der Diät war für die ersten vier Wochen anhand eines Diät-Tagebuchs überprüft worden. Es erfolgten weitere Anweisungen und Erläuterungen zur Diät und eine Diätberatung. Daraufhin wurde bis zum Ende der Nachbetreuung ein besseres Diätergebnis (mit Ausnahme einzelner Brüche) erzielt. Das Ausmaß der Symptome sank bis drei Monate nach KLE weiter, weil die Patienten ihre Diät immer besser in den Griff bekamen. Nach einem halben Jahr waren die Beschwerden um 74% reduziert. Bei fünf Patienten lag eine Verminderung Ihrer Symptome auf 50-70% des Ausgangswertes vor, bei elf Patienten um 80-90% und sechs Patienten waren beschwerdefrei. Im weiteren Verlauf des Jahres wurde keine weitere signifikante Verbesserung der Beschwerdesymptomatik erzielt. Mit Ausnahme einer Person gab es in

der Gruppe der KLE- während der Nachbetreuung keine ausgeprägten Veränderungen in der Symptomatik. Für die zuvor genannte Person ergab sich eine Reduzierung des Symptomwertes im Rahmen der Nachsorge innerhalb der ersten drei Monate um 30%; er erlangte aber nach einem halben Jahr wieder das Ausgangsniveau. Die kurzfristige und nicht permanente Veränderung der Symptome zum Besseren ist bei diesem Patienten mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen Placeboeffekt zurückzuführen.



**Abbildung III-13**  
Verlauf der  
Symptomausprägung  
während der  
Nachsorge -  
aufgeteilt in KLE+  
und KLE-

---

**Anmerkung:**

Außerhalb des Studienprotokolls wurden nach einem Jahr neun von 22 KLE+ Patienten erneut untersucht. Jeder dieser Patienten reagierte in dieser Wiederholung der Untersuchung auf dasselbe Nahrungsmittel, auf welches er bereits in der ersten Untersuchung eine Reaktion zeigte. Dabei sah man, dass sich die Anzahl der CD3+ Lymphozyten in der klassischen Histologie über das Jahr der Exklusionsdiät vermindert hatte.

	GK		KLE +		KLE -		p-Wert
	Baseline	post-Exp.	Baseline	post-Exp.	Baseline	post-Exp.	
Patienten [n]	10		22		14		-
Alter [J] (Spannweite)	50.7 ± 5.6 (21-69)		46.0 ± 3.2 (21-76)		40.3 ± 5.1 (21-75)		n.s.
IEL histol. [IEL/100 Zellen] (Spannweite)	18.7 ± 3.1 (4-32)	22.2 ± 3.2 (8-38)	26.4 ± 2.7 (9-51)	28.7 ± 4.8 (12-61)	22.4 ± 4.2 (5-55)	18.4 ± 3.7 (8-24)	n.s.
IEL KLE [IEL/Feld] (Spannweite)	11.7 ± 1.2 (5.1-17.0)	13.2 ± 2.1 (6.2-24.0)	18.7 ± 0.9* (11.0-28.7)	24.7 ± 1.4* (15.6-42.2)	13.8 ± 1.2 (6.7-23.1)	16.3 ± 1.6 (6.8-30.4)	*.004
IES [eL/1000 Zellen] (Spannweite)	1.5 ± 0.4 (0.0-3.2)	1.3 ± 0.3 (0.0-2.4)	5.5 ± 0.6* (2.0-10.0)	11.9 ± 1.5* (2.8-25.0)	4.2 ± 1.4 (1.0-9.0)	2.2 ± 0.1 (1.7-2.8)	*.001
IVR [µm] (Spannweite)	-	-	8.1 ± 3.5* (0-58.6)	41.1 ± 2.5* (21.4-60.1)	-	-	*.0001

**Tabelle 4**

Gesamtübersicht über die ermittelten Werte der GK, KLE+ und KLE-; angegeben wird der p-Wert für die KLE+ Gruppe im Vergleich prä – post-Exposition.

## IV. DISKUSSION

Innerhalb der am Reizdarmsyndrom leidenden Patienten kann man eine substantielle Untergruppe ausmachen, die angibt, dass Nahrungsmittel ihre Symptome auslösen oder verschlimmern (Atkinson et al., 2004, Bohn et al., 2013, Soares, 2014). Abgesehen von der kürzlich beschriebenen FODMAP-armen Diät, gab es zum Zeitpunkt unserer Studie keine weiteren wissenschaftlich fundierten Beweise, dass die Beschwerden von Patienten mit Reizdarmsyndrom nahrungsmittelabhängig sind. In einigen sehr beachteten Studien wurde gezeigt, dass die FODMAP-Diät IBS-Beschwerden in rund 70% der Patienten lindern kann (Halmos et al., 2014) (Bohn et al., 2015), weitere randomisierte kontrollierte Studien zeigten eine nur mäßige Wirksamkeit (Barrett and Gibson, 2012) und sogar, dass FODMAPs Blähungen hervorrufen und als Auslöser von IBS-Symptomen fungieren können (Halmos et al., 2014, Gibson and Shepherd, 2012, Barrett and Gibson, 2012, Biesiekierski et al., 2011, Biesiekierski et al., 2013, de Roest et al., 2013, Junker et al., 2012).

Die Annahme, dass Gluten durch Erhöhung der mukosalen Permeabilität bei Patienten mit IBS ähnliche Symptome auslösen kann, wird diskutiert (Biesiekierski et al., 2013, Vazquez-Roque et al., 2013, Barrett and Gibson, 2012). Eine neue Studie weist darauf hin, dass der mögliche größte Nutzen einer glutenfreien Ernährung darin besteht, dass diese Diätform nur wenige FODMAPs aufweist (Biesiekierski et al., 2013). Es wird aber vermutet, dass Nahrungsmittelbestandteile, wie im speziellen Fall Gliadin, Veränderung hervorrufen, welche Einfluss auf die intestinale Permeabilität haben, aber durch die klassische Histologie unerkant bleiben (Sander et al., 2005, Clemente et al., 2003).

Diese Studien legen nahe, dass Nahrungsmittelbestandteilen eine wesentliche Rolle beim IBS zukommen kann, die allerdings bisher nicht wissenschaftlich objektivierbar waren. So könnte der Darstellung von mikroskopisch kleinen, dynamischen Veränderungen der Schleimhaut durch Nahrungsmittel eine besondere Bedeutung zukommen. Die endoskopische in vivo Darstellung von dynamischen Veränderungen der Mukosaarchitektur des GIT, die durch Reaktion auf Antigene verursacht werden, war allerdings bis zu dieser Studie ein bis dato unerreichtes Ziel in der Diagnostik der NMU.

Da die klassische Histologie bei Patienten mit NMU keine verlässliche Pathologie gezeigt hatte, hatten wir uns in dieser Studie für die Darstellung der Dünndarm-Mukosa auf mikroskopischem Niveau mittels Endomikroskopie entschieden. Diese Methode bietet als

Einzig die Möglichkeit, die Schleimhaut des Darmes in 1000-facher Auflösung in vivo auf mikroskopischem Niveau darzustellen und auch Veränderungen nach Auftragen eines Nahrungsmittels direkt am lebenden Patienten innerhalb weniger Minuten sichtbar zu machen.

Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten berichteten über tägliche Symptome kurz nach Nahrungsmittelaufnahme. Dies war das wichtigste Kriterium, um NMU als Auslöser der Reaktion zu vermuten. So wurden Komponenten von NM zur Exposition verwendet, die üblicherweise alltäglich verzehrt werden: Soja, Weizen, Hefe und Milch. Durch die Limitierung auf nur wenige große Nahrungsmittelkomponenten war es hingenommen worden, dass wahrscheinlich Antigene übersehen werden und Patienten, die als KLE- eingestuft wurden, unter Umständen in die Gruppe der KLE+ gefallen wären, wenn andere NM Antigene verwendet worden wären. Obwohl eine Ausweitung der verwendeten NM innerhalb dieser Studie nicht umsetzbar war, kann dies in zukünftigen Untersuchungen erfolgen. Dennoch erlaubte die Verwendung von nur vier großen Antigenen in Form von handelsüblichen NM ein großes Spektrum von klinisch relevanten Auslösern von NMU abzudecken.

So konnte in mehr als die Hälfte unserer Probanden mit IBS und vermeintlicher klinischer Reaktion auf Nahrungsmittel innerhalb von Minuten, nachdem die einzelnen Nahrungsmittelantigene auf die duodenale Schleimhaut aufgebracht worden waren, eine Veränderung der Schleimhaut verifiziert werden. Dabei ist zu erwähnen, dass es trotz der sorgsamten Verlagerung des Applikationsortes im Duodenum von aboral nach oral zu einer Verbreitung der bereits applizierten NM im Duodenum kam und die Untersuchung immer bei einer positiven Reaktion abgebrochen werden musste, weil die umliegende Schleimhaut auch auf das Antigen reagiert hatte. Weitere Nahrungsmittel konnten dann nicht mehr getestet werden und die Untersuchung der restlichen potentiellen Antigene musste zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt werden.

Zu Beginn einer solchen Reaktion erfolgte das Einwandern von intraepithelialen Lymphozyten in die Oberflächenschleimhaut, sowie funktionelle und strukturelle Veränderungen. Diese Beobachtungen sind vereinbar mit den gewonnenen Erkenntnissen bei IBS-Patienten nach Exposition mit Gluten (Vazquez-Roque et al., 2013). Dort konnten die Untersucher bei Reagierenden eine erhöhte intestinale Permeabilität messen. Speziell unser endomikroskopische Nachweis der Ausbildung von epithelialen Aufbrüchen, die Lücken

verursachten und nachfolgendem Austritt von Flüssigkeit, war mit einer solchen erhöhten intestinalen Permeabilität vereinbar.

Das Besondere an unserer Studie ist, dass wir objektiv nachweisen konnten, dass der Beginn der oben beschriebenen Reaktion allein durch Aufbringen von NM hervorgerufen wurde. Desweiteren konnte der Beginn des Herauslösen der Epithelzellen, das Heraussprengen von Zellen aus dem Zellverband an den Tight Junctions, direkt mit dem Auftragen der Antigene in Verbindung gebracht werden.

Bisherige Studien zeigen, dass die intestinale Zellabsprennung und die daraus resultierenden Lücken in der Epithelschicht mit einer Umorganisation des Schlussleistenkomplexes und seiner Proteine einhergehen (Marchiando et al., 2011, Guan et al., 2011), wobei es bei den abgesprengten Zellen zur Auslösung von Apoptose kommen kann (Bullen et al., 2006). Die Expression der am Schlussleistenkomplex beteiligten Proteine Occludin und Claudin-1 war bei Patienten mit IBS-D vermindert und diese Patienten nahmen auch viszerale Schmerzen vermehrt wahr (Bertiaux-Vandaele et al., 2011). Andere Studien haben bei Patienten mit IBS-D eine erhöhte intestinale Permeabilität festgestellt. Patienten mit einer Nicht-Zöliakie-Weizenunverträglichkeit und IBS-D wiesen unter einer Gluten enthaltenden Diät eine Reduktion von Zonula Occludens 1, Claudin-1, und Occludin auf (Vazquez-Roque et al., 2013). Nach Verletzungen der Epithelschicht könnte es zur Kontraktion der subepithelial gelegenen Myofibroblasten mit daraus resultierender Verkürzung und Verkleinerung der Oberfläche des Villus kommen. Dadurch würde die freiliegende Fläche der Lamina Propria verkleinert werden (Moore et al., 1989, Lee, 1971). Dies könnte die in der KLE beobachtete Erweiterung des intervillösen Raumes erklären.

Studien, welche die KLE im terminalen Ileum bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen anwandten, zeigten ebenfalls eine erhöhte Anzahl von epithelialen Lücken im Vergleich zu Gesunden (Kiesslich et al., 2012, Liu et al., 2011b). Dasselbe wurde bei Patienten mit IBS festgestellt (Turcotte et al., 2013). Hierfür wurde allerdings eine gesteigerte Aktivität von Entzündungsmediatoren verantwortlich gemacht, da man bei Exposition der Mukosa mit TNF- $\alpha$  ein vermehrtes Abstoßen von Epithelzellen nachwies (Kiesslich et al., 2007). Ob die Epithelfunktion bei vermehrter Lückenbildung bestehen bleibt, ist derzeit noch unklar; es ist eher wahrscheinlich, dass es dadurch zu einer erhöhten Permeabilität kommt, was wir in neueren Studien bereits nachweisen konnten. Ein erster Hinweis darauf ergab sich durch den von uns registrierten Ausfluss von Fluorescein in das

Darmlumen durch die entstandenen Lücken. Allerdings wurden in der vorliegenden Studie keine Tests verwendet, welche die intestinale Permeabilität mit herkömmlichen Methoden überprüften. Dies lag zum einen an der mangelnden finanziellen Unterstützung eines so neuen diagnostischen Ansatzes, zum anderen daran, dass die auftretende Reaktion in einem nur kleinen Gebiet des Duodenums auftrat und nicht sicher festzustellen war, wie lange sie zeitlich dauern würde, und welches Gesamtausmaß an Reaktion auf die Beschwerdesymptomatik zu erwarten war. Die signifikant erhöhte Anzahl von Lücken bereits bei der Baseline-Untersuchung der später positiven Patienten, die dann noch einmal nach Nahrungsmittlexposition signifikant zunahm, lässt allerdings auf eine wesentliche Beteiligung der epithelialen Lücken an dem Beschwerdekomples der Patienten schließen.

Um deren funktionellen Einfluss zu beweisen, sollten weiterführende Studien eine nähere Untersuchung der Permeabilitätsveränderung beinhalteten. Das „Heraussprengen von Zellen mit anschließender Ausbildung von epithelialen Lücken,“ erwies sich als der verlässlichste Parameter um Reaktionen auf NM auszuschließen oder zu beweisen. Eine Einteilung bezüglich des Ausmaßes der beobachteten Reaktion, ähnlich des Watson Scores beim Morbus Crohn wäre möglich (Kiesslich et al., 2012).

Ein weiterer, initialer Bestandteil eine positive Mukosareaktion (KLE+) anzunehmen, war die Zunahme der IEL. Hierfür wurde auch der Vergleich zur konventionellen Histologie hinzugezogen. Betrachtet man die intraepithelialen Lymphozyten, so wurde die obere Grenze der als normal betrachteten Anzahl von IEL mit 25 CD3+ Lymphozyten auf 100 Epithelzellen in einer Studie von M. Walker klar definiert (Walker et al., 2010) (Hayat et al., 2002). Hierbei ist die Verteilung der IEL entlang des Villus zu beachten. Eine Abnahme Richtung Villus-Spitze wird als physiologisch angesehen. Eine Zunahme oder selbst eine gleichmäßige Verteilung sind verdächtig und können auf eine Glutensensitivität hinweisen (Goldstein and Underhill, 2001). Auch bei Zöliakie kann das Betrachten dieser Verteilung die Diagnosestellung erleichtern (Jarvinen et al., 2004, Biagi et al., 2004).

In unserer Studie hatten nur 70% der Patienten eine auffällige Histologie, die aber kongruent zu den Ergebnissen der in der KLE bestimmten IEL war. Erhöhte man den Grenzwert auf 40 IEL pro 100 Epithelzellen, sank die Übereinstimmung auf 42%. Obwohl die Erhebungen der Daten aus der KLE Ungenauigkeiten aufweisen können, stehen sie in Einklang mit den Erkenntnissen aus früheren Untersuchungen, die zeigten, dass „funktionelle“ Veränderungen aufgrund einer Reaktion auf NM nicht durch die konventionelle Histologie

dargestellt werden können. Auch müssen die in der Histologie aufgearbeiteten IEL nicht denen entsprechen, die genau zum oder unmittelbar nach dem Zeitpunkt der Exposition mit einem Nahrungsmittel zu finden sind. Studien zeigen, dass die Lymphozyten innerhalb von rund 10 Minuten wieder abgewandert sind (Edelblum et al., 2012). Dies bedeutet, dass sie zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme nach der Untersuchung bereits nicht mehr vor Ort waren.

Die endomikroskopischen Beobachtungen unserer Studie zeigen hingegen eine sehr hohe Erkennungsrate von Reaktionen auf die getesteten Nahrungsmittelbestandteile. 61% aller getesteten IBS Patienten hatten auf eines oder mehrere der getesteten Allergene reagiert, was eine klare Beteiligung von Nahrungsmitteln an der Ausbildung des IBS vermuten lässt.

Dem Ergebnis der KLE entsprechend wurden die KLE+ Patienten angehalten das für die Reaktion verantwortliche Antigen aus ihrer Diät zu eliminieren. Hierbei zeigte sich, dass 50% (11/22 KLE+) der Patienten durch Auslassen des Antigens eine bis zu 80-90% gebesserte Symptomatik hatten oder in 27% (6/22 KLE+) sogar gänzlich beschwerdefrei wurden. Erwartete Placeboeffekte traten während der Langzeitdiät kaum auf, sind aber speziell bei den KLE negativen Patienten in den ersten sechs Wochen in der Verlaufskurve zu sehen (s. Abbildung III-13). Hier zeigt die Beschwerdekurve initial einen Verlauf zum Besseren, kehrt aber im weiteren Verlauf zur initialen Schwere der Symptomatik zurück.

Im Studienprotokoll war es nicht vorgesehen, eine Endoskopie zur Überprüfung der Mukosamorphologie nach der Langzeit-Ausschlussdiät von einem Jahr einzuplanen. Es bestand allerdings der Wunsch bei einigen Patienten, zu sehen, ob die Reaktion nach eingehaltener Langzeitdiät nachgelassen hatte. Nach einem Jahr wurden so außerhalb des Studienprotokolls neun von 22 KLE+ Patienten erneut untersucht. Alle zeigten weiterhin eine Reaktion auf dasselbe Antigen, das bereits bei der anfänglichen KLE bei ihnen als reaktionsauslösendes NM identifiziert worden war. Bei dieser Stichprobe zeigte sich allerdings auch, dass sich die Anzahl der CD3+ Lymphozyten über das Jahr der Exklusionsdiät signifikant vermindert hatte. Die nach einem Jahr weiterhin vorhandene Reaktion auf dasselbe NM weist darauf hin, dass sich die Fähigkeit zur Immunantwort durch alleiniges Weglassen der Diät im Prinzip nicht ändert und daher nicht zu erwarten ist, dass eine kurzzeitige Diät einen dauerhaften Heilungserfolg darstellen kann. Dennoch zeigt die Reaktion der CD3+ Zellen bei Auslassdiät eine Verminderung des Reizzustandes.

Wir nahmen in unsere Studie nur Patienten auf, bei denen kein erhöhtes IgE nachgewiesen werden konnte. Es ist jedoch darüber zu diskutieren, ob ein unter der Nachweisgrenze liegendes allergen-spezifisches IgE (sIgE) eine Allergie ausschließt. Bei Patienten mit allergischem Asthma, bei denen am Anfang ihrer Therapie mit Omalizumab (monoklonaler Antikörper gegen IgE) kein sIgE nachzuweisen war, konnte im Verlauf sIgE nachgewiesen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass bereits am Anfang der Therapie nicht nachweisbares, aber funktionsfähiges sIgE vorhanden war (Mizuma et al., 2015). So könnte es in unserem Fall bedeuten, dass es sich bei den erkennbaren Reaktionen trotz negativem sIgE um allergische Reaktionen handelt.

Die deutliche Verbesserung der Beschwerden von KLE+ Patienten unter einer spezifischen Diät legt nahe, dass das die Reaktion auslösende Agens als Verursacher der Beschwerden anzusehen ist. Die Ergebnisse dieser endomikroskopisch darstellbaren und quantitativ bestimmbaren Veränderungen sind hinsichtlich der offenkundig fähigen und vielversprechenden diagnostischen Methode zur Therapiebestimmung bei ersichtlich beeinträchtigten Patienten von Bedeutung und könnten möglicherweise als „Gold-Standard“ für die Bestimmung solcher Patienten für weitere wissenschaftliche Studien dienen. Denn eine deutliche Besserung war ausschließlich nur bei den KLE+ Patienten zu sehen und bei keinem der KLE- Patienten oder bei einem Patienten der Kontrollgruppe.

Nur einer von elf KLE- Patienten zeigte Anzeichen eines Placeboeffekts in Form einer Besserung der Symptome nach der KLE ohne Einhalten einer spezifischen Diät. Dies weist darauf hin, dass die langzeitige Vorgehensweise bezüglich der Nachsorge grundsätzlich die Fähigkeit besitzt einen Placeboeffekt aufzudecken.

In unserer Studie fiel auf, dass im Vergleich zur durchschnittlichen Bevölkerung eine deutliche Häufung von NMU nachgewiesen werden konnte. Diese überdurchschnittliche Anzahl von endomikroskopisch nachweisbaren Reaktionen (22 KLE+ / 36) ist darauf zurückzuführen, dass ausschließlich, den Rom-III-Kriterien entsprechend, kranke IBS Patienten, die angaben, nach Nahrungsaufnahme Beschwerden zu haben, in die Studie eingeschlossen wurden. Es zeigt auch, dass mit einer Wahrscheinlichkeit >50% IBS Patienten nahrungsmittelintolerant sind und dieses die Ursache ihrer Erkrankung darstellt.

Eine Schwäche unserer Studie besteht darin, dass ein Crossover-Design bezüglich der Diät unmöglich war, da sie bedarfsgerecht auf die einzelnen Patienten, beruhend auf der individuellen Reaktion während der KLE, abgestimmt war, und eine Standardisierung nicht

möglich war. Um diesen Schwachpunkt auszugleichen und um einen möglichen Placebo-Effekt zu umgehen, wurde eine einjährige Diät und Nachsorge gewählt. Der Grund für die langzeitige Nachbetreuung war neben dem Ausschluss eines Placeboeffektes die Annahme, dass, falls ein Patient eine Besserung durch Ausschließen des die Reaktion auslösenden Antigens aus seiner Diät erfuhr, er diese auch freiwillig über eine lange Zeit beibehalten würde. Denn wir gingen davon aus, dass Re-Exposition die Symptome wieder hervorrufen würde. Diese Annahme bestätigte sich. Auch nach einem Jahr behielten die Patienten ihre Diät freiwillig. So erreichten wir zudem eine große Zuverlässigkeit im Einhalten der Diät während der Nachsorge.

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass das Aufbringen von bestimmten handelsüblichen Nahrungsbestandteilen auf die duodenale Mukosa bei Patienten mit IBS eine endomikroskopisch erkennbare Reaktion auslöst. Diese wird durch das Einwandern von intraepithelialen Zellen, der Bildung von intraepithelialen Lücken und einer Erweiterung des intervillösen Raumes gekennzeichnet. Dabei decken sich unsere Studienergebnisse mit den Erkenntnissen früherer Studien hinsichtlich der dargestellten Zellabschilferung, vergrößerter intervillöser Räume und einem transmukosalem Flüssigkeitsaustritt in das Darmlumen.

Mit Hilfe der individualisierten Exklusionsdiät gelang es die bestehenden Beschwerden der Patienten deutlich zu lindern oder zu heilen. Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass es innerhalb der Patienten mit IBS eine Gruppe gibt, die an einer bisher noch nicht diagnostizierten NMU leidet, die ursächlich für ihre Symptome ist.

Für die Einführung dieser Untersuchung in die klinische Praxis ist die Wiederholbarkeit durch andere Untersucher nötig. Für größere erkennbare Veränderungen bei der Endomikroskopie gibt es unter erfahrenen Endoskopikern eine gute Übereinstimmung der ermittelten Ergebnisse (Canto et al., 2014). Dabei erlaubt die KLE die Diagnostik in Echtzeit innerhalb von Minuten. Ein schnelles Testergebnis ist hiermit erzielbar.

Leider ist die Endomikroskopie eine invasive Untersuchung und daher nicht völlig frei von endoskopietyptischen Komplikationsmöglichkeiten, auch wenn es bereits zu einer weiteren Miniaturisierung der Systeme gekommen ist. Wegen der großen Kosten kann sich diese Technik vor allem in der Diagnostik für Studien und Grundlagenforschung im Bereich der NMU und des IBS als hilfreich erweisen.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studie war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Reizdarmsyndrom und Nahrungsmittelunverträglichkeiten herzustellen. Hierfür wurde ein neues Verfahren, die konfokale Laserendomikroskopie, angewandt, um mikroskopisch kleine Reaktionen an der Darmoberfläche in vivo sichtbar zu machen.

Die konfokale Laserendomikroskopie erwies sich dabei im Vergleich zu herkömmlichen Untersuchungsmethoden, wie der klassischen Histologie, als sehr nützlich, um Unverträglichkeitsreaktionen schnell und zuverlässig zu erfassen und darauf aufbauend eine wirkungsvolle Behandlung der Patienten zu konzipieren. Außerdem stellt die konfokale Laserendomikroskopie eine Möglichkeit dar, neue Einblicke in die Pathophysiologie der Nahrungsmittelunverträglichkeiten zu erlangen.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass bei einem Teil von Patienten mit Reizdarmsyndrom, deren duodenale Mukosa handelsüblichen Nahrungsmittelantigenen ausgesetzt wurde, eine dynamische Reaktion auf Schleimhautebene vorstattgeht. Es wurde eine Zunahme der intraepithelialen Lymphozyten und Veränderungen des Epithels mit Abstoßung von Zellen und Zellverbänden aus dem Oberflächenepithel nachgewiesen. Dies führte zu Lücken im Epithel und zum Verlust der epithelialen Integrität, was durch den Austritt von Fluorescein in das Darmlumen nachgewiesen werden konnte. Somit liegt der Beginn der erkennbaren Reaktion unmittelbar mit dem Aufbringen des Nahrungsmittels zusammen und löst eine Permeabilitätsstörung aus. Diese ausgeprägten mikroskopisch kleinen Veränderungen traten ausschließlich nach Reaktion auf ein Nahrungsmittelantigen auf und wenn das entsprechende Antigen aus der Nahrung gestrichen wurde führte dies zu einer deutlichen klinischen Besserung des Beschwerdebildes. Diese deutliche Verbesserung der Beschwerden der Patienten, die auf ein Nahrungsmittel reagiert hatten, unter der spezifischen Diät unterstreicht den Zusammenhang zwischen den aufgetragenen Nahrungsmittelantigenen und der daraus entstehenden Beschwerden. Da nach einer längeren Exklusionsdiät weiterhin Reaktionen in der konfokalen Laserendomikroskopie reproduzierbar waren, ist ein immunologisches Gedächtnis, mit erhaltener Fähigkeit zur Immunantwort, erkennbar.

Insgesamt wurde eine Besserung um mehr als 50% nach vier Wochen und 74% nach einem Jahr erreicht. Bei den Patienten, bei denen keine Reaktion nachweisbar war, blieben die

Beschwerden bestehen und die Reaktion wurde bei keinem der gesunden Probanden nachgewiesen. Die Ergebnisse untermauern die Annahme, dass bei einer bedeutenden Untergruppe von Reizdarm-Patienten Nahrungsmittelintoleranzen ursächlich für die Beschwerden sind.

Die konfokale Laserendomikroskopie eröffnet hierbei neue Perspektiven für weitere Ursachenforschung für die Pathogenese des Reizdarmsyndroms und ist in der Lage, die Therapiegrundlage für eine bedeutende Untergruppe der Reizdarm-Patienten zu bilden.

In der Zukunft wird die konfokale Laserendomikroskopie durch die Verwendung von Minisonden, die durch den Arbeitskanal eines gängigen Endoskops eingeführt werden, auch in weniger spezialisierten Spitälern der Krankenversorgung durchgeführt werden können. Die Endomikroskopie wird daher sicher eine wichtige Rolle in der zukünftigen gastrointestinalen Endoskopie des Reizdarmsyndroms einnehmen. Technische Innovationen werden weitere Anwendungsmöglichkeiten durch eine Verbesserung der Optiken eröffnen.

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

- ATKINSON, W., SHELDON, T. A., SHAATH, N. & WHORWELL, P. J. 2004. Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. *Gut*, 53, 1459-64.
- BARAU, E. & DUPONT, C. 1990. Modifications of intestinal permeability during food provocation procedures in pediatric irritable bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 11, 72-7.
- BARRETT, J. S. & GIBSON, P. R. 2012. Fermentable oligosaccharides, disaccharides, monosaccharides and polyols (FODMAPs) and nonallergic food intolerance: FODMAPs or food chemicals? *Therap Adv Gastroenterol*, 5, 261-8.
- BENGTSSON, M., OHLSSON, B. & ULANDER, K. 2007. Development and psychometric testing of the Visual Analogue Scale for Irritable Bowel Syndrome (VAS-IBS). *BMC Gastroenterol*, 7, 16.
- BERTIAUX-VANDAELE, N., YOUNBA, S. B., BELMONTE, L., LECLEIRE, S., ANTONIETTI, M., GOURCEROL, G., LEROI, A. M., DECHELOTTE, P., MENARD, J. F., DUCROTTE, P. & COEFFIER, M. 2011. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am J Gastroenterol*, 106, 2165-73.
- BIAGI, F., LUINETTI, O., CAMPANELLA, J., KLERSY, C., ZAMBELLI, C., VILLANACCI, V., LANZINI, A. & CORAZZA, G. R. 2004. Intraepithelial lymphocytes in the villous tip: do they indicate potential coeliac disease? *J Clin Pathol*, 57, 835-9.
- BIESIEKIERSKI, J. R., NEWNHAM, E. D., IRVING, P. M., BARRETT, J. S., HAINES, M., DOECKE, J. D., SHEPHERD, S. J., MUIR, J. G. & GIBSON, P. R. 2011. Gluten causes gastrointestinal symptoms in subjects without celiac disease: a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol*, 106, 508-14; quiz 515.
- BIESIEKIERSKI, J. R., PETERS, S. L., NEWNHAM, E. D., ROSELLA, O., MUIR, J. G. & GIBSON, P. R. 2013. No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology*, 145, 320-8 e1-3.
- BOHN, L., STORSRUD, S., LILJEBO, T., COLLIN, L., LINDFORS, P., TORNBLOM, H. & SIMREN, M. 2015. Diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome as well as traditional dietary advice: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*, 149, 1399-1407 e2.
- BOHN, L., STORSRUD, S., TORNBLOM, H., BENGTSSON, U. & SIMREN, M. 2013. Self-reported food-related gastrointestinal symptoms in IBS are common and associated with more severe symptoms and reduced quality of life. *Am J Gastroenterol*, 108, 634-41.

- BULLEN, T. F., FORREST, S., CAMPBELL, F., DODSON, A. R., HERSHMAN, M. J., PRITCHARD, D. M., TURNER, J. R., MONTROSE, M. H. & WATSON, A. J. 2006. Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Lab Invest*, 86, 1052-63.
- CANTO, M. I., ANANDASABAPATHY, S., BRUGGE, W., FALK, G. W., DUNBAR, K. B., ZHANG, Z., WOODS, K., ALMARIO, J. A., SCHELL, U., GOLDBLUM, J., MAITRA, A., MONTGOMERY, E., KIESSLICH, R. & CONFOCAL ENDOMICROSCOPY FOR BARRETT'S ESOPHAGUS OR CONFOCAL ENDOMICROSCOPY FOR BARRETT'S ESOPHAGUS TRIAL, G. 2014. In vivo endomicroscopy improves detection of Barrett's esophagus-related neoplasia: a multicenter international randomized controlled trial (with video). *Gastrointest Endosc*, 79, 211-21.
- CARROLL, I. M., RINGEL-KULKA, T., KEKU, T. O., CHANG, Y. H., PACKEY, C. D., SARTOR, R. B. & RINGEL, Y. 2011. Molecular analysis of the luminal- and mucosal-associated intestinal microbiota in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 301, G799-807.
- CLAYBURGH, D. R., SHEN, L. & TURNER, J. R. 2004. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest*, 84, 282-91.
- CLEMENTE, M. G., DE VIRGILIIS, S., KANG, J. S., MACATAGNEY, R., MUSU, M. P., DI PIERRO, M. R., DRAGO, S., CONGIA, M. & FASANO, A. 2003. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*, 52, 218-23.
- COMMITTEE, A. T., KANTSEVOY, S. V., ADLER, D. G., CONWAY, J. D., DIEHL, D. L., FARRAYE, F. A., KAUL, V., KETHU, S. R., KWON, R. S., MAMULA, P., RODRIGUEZ, S. A. & TIERNEY, W. M. 2009. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc*, 70, 197-200.
- CONCHELLO, J. A. & LICHTMAN, J. W. 2005. Optical sectioning microscopy. *Nat Methods*, 2, 920-31.
- COSTE, B., MATHUR, J., SCHMIDT, M., EARLEY, T. J., RANADE, S., PETRUS, M. J., DUBIN, A. E. & PATAPOUTIAN, A. 2010. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*, 330, 55-60.
- DARWICH, A. S., ASLAM, U., ASHCROFT, D. M. & ROSTAMI-HODJEGAN, A. 2014. Meta-analysis of the turnover of intestinal epithelia in preclinical animal species and humans. *Drug Metab Dispos*, 42, 2016-22.
- DE ROEST, R. H., DOBBS, B. R., CHAPMAN, B. A., BATMAN, B., O'BRIEN, L. A., LEEPER, J. A., HEBBLETHWAITE, C. R. & GEARRY, R. B. 2013. The low FODMAP diet improves gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome: a prospective study. *Int J Clin Pract*, 67, 895-903.
- DELANEY, P. M., HARRIS, M. R. & KING, R. G. 1994. Fiber-optic laser scanning confocal microscope suitable for fluorescence imaging. *Appl Opt*, 33, 573-7.

- DROSSMAN, D. A., LI, Z., TONER, B. B., DIAMANT, N. E., CREED, F. H., THOMPSON, D., READ, N. W., BABBS, C., BARREIRO, M., BANK, L. & ET AL. 1995. Functional bowel disorders. A multicenter comparison of health status and development of illness severity index. *Dig Dis Sci*, 40, 986-95.
- DUNBAR, K. B. & CANTO, M. I. 2010. Confocal endomicroscopy. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, 12, 90-99.
- DUNLOP, S. P., HEBDEN, J., CAMPBELL, E., NAESDAL, J., OLBE, L., PERKINS, A. C. & SPILLER, R. C. 2006. Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am J Gastroenterol*, 101, 1288-94.
- EDELBLUM, K. L., SHEN, L., WEBER, C. R., MARCHIANDO, A. M., CLAY, B. S., WANG, Y., PRINZ, I., MALISSEN, B., SPERLING, A. I. & TURNER, J. R. 2012. Dynamic migration of gammadelta intraepithelial lymphocytes requires occludin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 7097-102.
- EISENHOFFER, G. T., LOFTUS, P. D., YOSHIGI, M., OTSUNA, H., CHIEN, C. B., MORCOS, P. A. & ROSENBLATT, J. 2012. Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature*, 484, 546-9.
- ESWARAN, S., GOEL, A. & CHEY, W. D. 2013. What role does wheat play in the symptoms of irritable bowel syndrome? *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 9, 85-91.
- ESWARAN, S., TACK, J. & CHEY, W. D. 2011. Food: the forgotten factor in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin North Am*, 40, 141-62.
- FARQUHAR, M. G. & PALADE, G. E. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, 17, 375-412.
- FRANCIS, C. Y., MORRIS, J. & WHORWELL, P. J. 1997. The irritable bowel severity scoring system: a simple method of monitoring irritable bowel syndrome and its progress. *Aliment Pharmacol Ther*, 11, 395-402.
- FRISCH, S. M. & FRANCIS, H. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 124, 619-26.
- FRITSCHER-RAVENS, A., SCHUPPAN, D., ELLRICHMANN, M., SCHOCH, S., ROCKEN, C., BRASCH, J., BETHGE, J., BOTTNER, M., KLOSE, J. & MILLA, P. J. 2014. Confocal endomicroscopy shows food-associated changes in the intestinal mucosa of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 147, 1012-20 e4.
- GELL, P. G. H. 1975. *Clinical aspects of immunology*, Oxford [u.a.], Blackwell Scient. Publ.
- GIBSON, P. R. & SHEPHERD, S. J. 2012. Food choice as a key management strategy for functional gastrointestinal symptoms. *Am J Gastroenterol*, 107, 657-66; quiz 667.

- GOETZ, M., ZIEBART, A., FOERSCH, S., VIETH, M., WALDNER, M. J., DELANEY, P., GALLE, P. R., NEURATH, M. F. & KIESSLICH, R. 2010. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology*, 138, 435-46.
- GOLDSTEIN, N. S. & UNDERHILL, J. 2001. Morphologic features suggestive of gluten sensitivity in architecturally normal duodenal biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*, 116, 63-71.
- GRALNEK, I. M., HAYS, R. D., KILBOURNE, A., NALIBOFF, B. & MAYER, E. A. 2000. The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life. *Gastroenterology*, 119, 654-60.
- GUAN, Y., WATSON, A. J., MARCHIANDO, A. M., BRADFORD, E., SHEN, L., TURNER, J. R. & MONTROSE, M. H. 2011. Redistribution of the tight junction protein ZO-1 during physiological shedding of mouse intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300, C1404-14.
- GUNTHER, U., DAUM, S., HELLER, F., SCHUMANN, M., LODDENKEMPER, C., GRUNBAUM, M., ZEITZ, M. & BOJARSKI, C. 2010. Diagnostic value of confocal endomicroscopy in celiac disease. *Endoscopy*, 42, 197-202.
- HAFTENBERGER, M., LAUSSMANN, D., ELLERT, U., KALCKLOSCH, M., LANGEN, U., SCHLAUD, M., SCHMITZ, R. & THAMM, M. 2013. [Prevalence of sensitisation to aeroallergens and food allergens: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56, 687-97.
- HALL, P. A., COATES, P. J., ANSARI, B. & HOPWOOD, D. 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci*, 107 ( Pt 12), 3569-77.
- HALMOS, E. P., POWER, V. A., SHEPHERD, S. J., GIBSON, P. R. & MUIR, J. G. 2014. A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 146, 67-75 e5.
- HARRIS, M. 2003. Scanning microscope with miniature head. Google Patents.
- HAYAT, M., CAIRNS, A., DIXON, M. F. & O'MAHONY, S. 2002. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? *J Clin Pathol*, 55, 393-4.
- HAYES, P., CORISH, C., O'MAHONY, E. & QUIGLEY, E. M. 2014. A dietary survey of patients with irritable bowel syndrome. *J Hum Nutr Diet*, 27 Suppl 2, 36-47.

- HILLER, W., RIEF, W. & BRAHLER, E. 2006. Somatization in the population: from mild bodily misperceptions to disabling symptoms. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 41, 704-12.
- JARVINEN, T. T., COLLIN, P., RASMUSSEN, M., KYRONPALO, S., MAKI, M., PARTANEN, J., REUNALA, T. & KAUKINEN, K. 2004. Villous tip intraepithelial lymphocytes as markers of early-stage coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*, 39, 428-33.
- JENNINGS, B. J. & MATHEWS, D. E. 1994. Adverse reactions during retinal fluorescein angiography. *J Am Optom Assoc*, 65, 465-71.
- JOHANSSON, S. G., BIEBER, T., DAHL, R., FRIEDMANN, P. S., LANIER, B. Q., LOCKEY, R. F., MOTALA, C., ORTEGA MARTELL, J. A., PLATTS-MILLS, T. A., RING, J., THIEN, F., VAN CAUWENBERGE, P. & WILLIAMS, H. C. 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*, 113, 832-6.
- JUNKER, Y., ZEISSIG, S., KIM, S. J., BARISANI, D., WIESER, H., LEFFLER, D. A., ZEVALLOS, V., LIBERMANN, T. A., DILLON, S., FREITAG, T. L., KELLY, C. P. & SCHUPPAN, D. 2012. Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *J Exp Med*, 209, 2395-408.
- KIESSLICH, R., BURG, J., VIETH, M., GNAENDIGER, J., ENDERS, M., DELANEY, P., POLGLASE, A., MCLAREN, W., JANELL, D., THOMAS, S., NAFE, B., GALLE, P. R. & NEURATH, M. F. 2004. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology*, 127, 706-13.
- KIESSLICH, R., DUCKWORTH, C. A., MOUSSATA, D., GLOECKNER, A., LIM, L. G., GOETZ, M., PRITCHARD, D. M., GALLE, P. R., NEURATH, M. F. & WATSON, A. J. 2012. Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease. *Gut*, 61, 1146-53.
- KIESSLICH, R., GOETZ, M., ANGUS, E. M., HU, Q., GUAN, Y., POTTEN, C., ALLEN, T., NEURATH, M. F., SHROYER, N. F., MONTROSE, M. H. & WATSON, A. J. 2007. Identification of epithelial gaps in human small and large intestine by confocal endomicroscopy. *Gastroenterology*, 133, 1769-78.
- KIESSLICH, R., GOETZ, M., BURG, J., STOLTE, M., SIEGEL, E., MAEURER, M. J., THOMAS, S., STRAND, D., GALLE, P. R. & NEURATH, M. F. 2005. Diagnosing *Helicobacter pylori* in vivo by confocal laser endoscopy. *Gastroenterology*, 128, 2119-23.
- KIESSLICH, R. & NEURATH, M. F. 2007. Endomicroscopy is born - do we still need the pathologist? *Gastrointestinal Endoscopy*, 66, 150-153.
- KIM, J. 2000. The use of vital dyes in corneal disease. *Curr Opin Ophthalmol*, 11, 241-7.

- KIMURA, S. & WILSON, T. 1991. Confocal Scanning Optical Microscope Using Single-Mode Fiber for Signal-Detection. *Applied Optics*, 30, 2143-2150.
- KRUIS, W., THIEME, C., WEINZIERL, M., SCHUSSLER, P., HOLL, J. & PAULUS, W. 1984. A diagnostic score for the irritable bowel syndrome. Its value in the exclusion of organic disease. *Gastroenterology*, 87, 1-7.
- KWITEROVICH, K. A., MAGUIRE, M. G., MURPHY, R. P., SCHACHAT, A. P., BRESSLER, N. M., BRESSLER, S. B. & FINE, S. L. 1991. Frequency of adverse systemic reactions after fluorescein angiography. Results of a prospective study. *Ophthalmology*, 98, 1139-42.
- LACY, B. E., MEARIN, F., CHANG, L., CHEY, W. D., LEMBO, A. J., SIMREN, M. & SPILLER, R. 2016. Bowel Disorders. *Gastroenterology*, 150, 1393-1407.e5.
- LANGEN, U., SCHMITZ, R. & STEPPUHN, H. 2013. [Prevalence of allergic diseases in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56, 698-706.
- LEBLOND, C. P. & STEVENS, C. E. 1948. The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. *Anat Rec*, 100, 357-77.
- LEE, J. S. 1971. Contraction of villi and fluid transport in dog jejunal mucosa in vitro. *Am J Physiol*, 221, 488-95.
- LEWIS, S. J. & HEATON, K. W. 1997. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*, 32, 920-4.
- LIU, J., ZUO, X., LI, C., YU, T., GU, X., ZHOU, C., LI, Z., GOETZ, M., KIESSLICH, R. & LI, Y. 2013. In vivo molecular imaging of epidermal growth factor receptor in patients with colorectal neoplasia using confocal laser endomicroscopy. *Cancer Lett*, 330, 200-7.
- LIU, J. J., MADSEN, K. L., BOULANGER, P., DIELEMAN, L. A., MEDDINGS, J. & FEDORAK, R. N. 2011a. Mind the gaps: confocal endomicroscopy showed increased density of small bowel epithelial gaps in inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*, 45, 240-5.
- LIU, J. J., WONG, K., THIESEN, A. L., MAH, S. J., DIELEMAN, L. A., CLAGGETT, B., SALTZMAN, J. R. & FEDORAK, R. N. 2011b. Increased epithelial gaps in the small intestines of patients with inflammatory bowel disease: density matters. *Gastrointest Endosc*, 73, 1174-80.
- LONGSTRETH, G. F., THOMPSON, W. G., CHEY, W. D., HOUGHTON, L. A., MEARIN, F. & SPILLER, R. C. 2006. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*, 130, 1480-91.
- LONGSTRETH, G. F., WILSON, A., KNIGHT, K., WONG, J., CHIOU, C. F., BARGHOUT, V., FRECH, F. & OFMAN, J. J. 2003. Irritable bowel syndrome, health care use, and costs: a U.S. managed care perspective. *Am J Gastroenterol*, 98, 600-7.

- LONGSTRETH, G. F. & YAO, J. F. 2004. Irritable bowel syndrome and surgery: a multivariable analysis. *Gastroenterology*, 126, 1665-73.
- LOVELL, R. M. & FORD, A. C. 2012. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 10, 712-721 e4.
- MANNING, A. P., THOMPSON, W. G., HEATON, K. W. & MORRIS, A. F. 1978. Towards positive diagnosis of the irritable bowel. *Br Med J*, 2, 653-4.
- MARCHIANDO, A. M., SHEN, L., GRAHAM, W. V., EDELBLUM, K. L., DUCKWORTH, C. A., GUAN, Y., MONTROSE, M. H., TURNER, J. R. & WATSON, A. J. 2011. The epithelial barrier is maintained by in vivo tight junction expansion during pathologic intestinal epithelial shedding. *Gastroenterology*, 140, 1208-1218 e1-2.
- MARSHMAN, E., OTTEWELL, P. D., POTTEN, C. S. & WATSON, A. J. 2001. Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine. *J Pathol*, 195, 285-92.
- MARTINEZ, C., VICARIO, M., RAMOS, L., LOBO, B., MOSQUERA, J. L., ALONSO, C., SANCHEZ, A., GUILARTE, M., ANTOLIN, M., DE TORRES, I., GONZALEZ-CASTRO, A. M., PIGRAU, M., SAPERAS, E., AZPIROZ, F. & SANTOS, J. 2012. The jejunum of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome shows molecular alterations in the tight junction signaling pathway that are associated with mucosal pathobiology and clinical manifestations. *Am J Gastroenterol*, 107, 736-46.
- MINSKY, M. 1957. *Microscopy apparatus*. United States patent application. December 19, 1961.
- MIZUMA, H., TANAKA, A., UCHIDA, Y., FUJIWARA, A., MANABE, R., FURUKAWA, H., KUWAHARA, N., FUKUDA, Y., KIMURA, T., JINNO, M., OHTA, S., YAMAMOTO, M., MATSUKARA, S., ADACHI, M. & SAGARA, H. 2015. Influence of Omalizumab on Allergen-Specific IgE in Patients with Adult Asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 168, 165-72.
- MONSBAKKEN, K. W., VANDVIK, P. O. & FARUP, P. G. 2006. Perceived food intolerance in subjects with irritable bowel syndrome-- etiology, prevalence and consequences. *Eur J Clin Nutr*, 60, 667-72.
- MOORE, R., CARLSON, S. & MADARA, J. L. 1989. Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury. *Am J Physiol*, 257, G274-83.
- MULLER-LISSNER, S. A. & PIRK, O. 2002. Irritable bowel syndrome in Germany. A cost of illness study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 14, 1325-9.
- NEUMANN, H., KIESSLICH, R., WALLACE, M. B. & NEURATH, M. F. 2010. Confocal Laser Endomicroscopy: Technical Advances and Clinical Applications. *Gastroenterology*, 139, 388-392.

- NOWAK-WEGRZYN, A., ASSA'AD, A. H., BAHNA, S. L., BOCK, S. A., SICHERER, S. H., TEUBER, S. S., ADVERSE REACTIONS TO FOOD COMMITTEE OF AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, A. & IMMUNOLOGY 2009. Work Group report: oral food challenge testing. *J Allergy Clin Immunol*, 123, S365-83.
- POLGLASE, A. L., MCLAREN, W. J., SKINNER, S. A., KIESSLICH, R., NEURATH, M. F. & DELANEY, P. M. 2005. A fluorescence confocal endomicroscope for in vivo microscopy of the upper- and the lower-GI tract. *Gastrointest Endosc*, 62, 686-95.
- POLLARD, H. M. & STUART, G. J. 1942. Experimental reproduction of gastric allergy in human beings with controlled observations on the mucosa. *Journal of Allergy*, 13, 467-473.
- RAITHEL, M., HAHN, E. G. & BAENKLER, H.-W. 2002. Klinik und Diagnostik von Nahrungsmittelallergien: Gastrointestinal vermittelte Allergien Grad I bis IV. *Dtsch Arztebl International*, 99, 780-.
- RAJILIC-STOJANOVIC, M., BIAGI, E., HEILIG, H. G., KAJANDER, K., KEKKONEN, R. A., TIMS, S. & DE VOS, W. M. 2011. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 141, 1792-801.
- RAO, A. S., CAMILLERI, M., ECKERT, D. J., BUSCIGLIO, I., BURTON, D. D., RYKS, M., WONG, B. S., LAMSAM, J., SINGH, R. & ZINSMEISTER, A. R. 2011. Urine sugars for in vivo gut permeability: validation and comparisons in irritable bowel syndrome-diarrhea and controls. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 301, G919-28.
- ROSENBLATT, J., RAFF, M. C. & CRAMER, L. P. 2001. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr Biol*, 11, 1847-57.
- SAMPSON, H. A., GERTH VAN WIJK, R., BINDSLEV-JENSEN, C., SICHERER, S., TEUBER, S. S., BURKS, A. W., DUBOIS, A. E., BEYER, K., EIGENMANN, P. A., SPERGEL, J. M., WERFEL, T. & CHINCHILLI, V. M. 2012. Standardizing double-blind, placebo-controlled oral food challenges: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology-European Academy of Allergy and Clinical Immunology PRACTALL consensus report. *J Allergy Clin Immunol*, 130, 1260-74.
- SANDER, G. R., CUMMINS, A. G., HENSHALL, T. & POWELL, B. C. 2005. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett*, 579, 4851-5.
- SIMREN, M., MANSSON, A., LANGKILDE, A. M., SVEDLUND, J., ABRAHAMSSON, H., BENGTTSSON, U. & BJORNSSON, E. S. 2001. Food-related gastrointestinal symptoms in the irritable bowel syndrome. *Digestion*, 63, 108-15.
- SOARES, R. L. 2014. Irritable bowel syndrome: a clinical review. *World J Gastroenterol*, 20, 12144-60.

- SU, A. M., SHIH, W., PRESSON, A. P. & CHANG, L. 2014. Characterization of symptoms in irritable bowel syndrome with mixed bowel habit pattern. *Neurogastroenterol Motil*, 26, 36-45.
- THOMPSON, W. G. 2006. The road to rome. *Gastroenterology*, 130, 1552-6.
- THOMPSON, W. G., HEATON, K. W., SMYTH, G. T. & SMYTH, C. 2000. Irritable bowel syndrome in general practice: prevalence, characteristics, and referral. *Gut*, 46, 78-82.
- THOMPSON, W. G., LONGSTRETH, G. F., DROSSMAN, D. A., HEATON, K. W., IRVINE, E. J. & MULLER-LISSNER, S. A. 1999. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut*, 45 Suppl 2, II43-7.
- TORNBLOM, H., LINDBERG, G., NYBERG, B. & VERESS, B. 2002. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 123, 1972-9.
- TURCOTTE, J. F., KAO, D., MAH, S. J., CLAGGETT, B., SALTZMAN, J. R., FEDORAK, R. N. & LIU, J. J. 2013. Breaks in the wall: increased gaps in the intestinal epithelium of irritable bowel syndrome patients identified by confocal laser endomicroscopy (with videos). *Gastrointest Endosc*, 77, 624-30.
- VAZQUEZ-ROQUE, M. I., CAMILLERI, M., SMYRK, T., MURRAY, J. A., MARIETTA, E., O'NEILL, J., CARLSON, P., LAMSAM, J., JANZOW, D., ECKERT, D., BURTON, D. & ZINSMEISTER, A. R. 2013. A controlled trial of gluten-free diet in patients with irritable bowel syndrome-diarrhea: effects on bowel frequency and intestinal function. *Gastroenterology*, 144, 903-911 e3.
- WALKER, M. M., MURRAY, J. A., RONKAINEN, J., ARO, P., STORSKRUBB, T., D'AMATO, M., LAHR, B., TALLEY, N. J. & AGREUS, L. 2010. Detection of celiac disease and lymphocytic enteropathy by parallel serology and histopathology in a population-based study. *Gastroenterology*, 139, 112-9.
- WANG, T. D. 2005. Confocal microscopy from the bench to the bedside. *Gastrointestinal Endoscopy*, 62, 696-697.
- WATSON, A. J., CHU, S., SIECK, L., GERASIMENKO, O., BULLEN, T., CAMPBELL, F., MCKENNA, M., ROSE, T. & MONTROSE, M. H. 2005. Epithelial barrier function in vivo is sustained despite gaps in epithelial layers. *Gastroenterology*, 129, 902-12.
- WATSON, A. J., HALL, L. J. & HUGHES, K. R. 2012. Cell shedding: old questions answered. *Gastroenterology*, 143, 1389-91.
- WIKLUND, I. K., FULLERTON, S., HAWKEY, C. J., JONES, R. H., LONGSTRETH, G. F., MAYER, E. A., PEACOCK, R. A., WILSON, I. K. & NAESDAL, J. 2003. An irritable bowel syndrome-specific symptom questionnaire: development and validation. *Scand J Gastroenterol*, 38, 947-54.

- WILSON, T. J., PONDER, B. A. & WRIGHT, N. A. 1985. Use of a mouse chimaeric model to study cell migration patterns in the small intestinal epithelium. *Cell Tissue Kinet*, 18, 333-44.
- YANNUZZI, L. A., ROHRER, K. T., TINDEL, L. J., SOBEL, R. S., COSTANZA, M. A., SHIELDS, W. & ZANG, E. 1986. Fluorescein angiography complication survey. *Ophthalmology*, 93, 611-7.
- YAO, X., YANG, Y. S., CUI, L. H., ZHAO, K. B., ZHANG, Z. H., PENG, L. H., GUO, X., SUN, G., SHANG, J., WANG, W. F., FENG, J. & HUANG, Q. 2012. Subtypes of irritable bowel syndrome on Rome III criteria: a multicenter study. *J Gastroenterol Hepatol*, 27, 760-5.
- YOSHIDA, S., TANAKA, S., HIRATA, M., MOURI, R., KANEKO, I., OKA, S., YOSHIHARA, M. & CHAYAMA, K. 2007. Optical biopsy of GI lesions by reflectance-type laser-scanning confocal microscopy. *Gastrointest Endosc*, 66, 144-9.
- YOUNG, E., STONEHAM, M. D., PETRUCKEVITCH, A., BARTON, J. & RONA, R. 1994. A population study of food intolerance. *Lancet*, 343, 1127-30.
- ZHOU, Q., ZHANG, B. & VERNE, G. N. 2009. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain*, 146, 41-6.
- ZOPF, Y., BAENKLER, H. W., SILBERMANN, A., HAHN, E. G. & RAITHEL, M. 2009. The differential diagnosis of food intolerance. *Dtsch Arztebl Int*, 106, 359-69; quiz 369-70; 4 p following 370.
- ZUBERBIER, T., EDENHARTER, G., WORM, M., EHLERS, I., REIMANN, S., HANTKE, T., ROEHR, C. C., BERGMANN, K. E. & NIGGEMANN, B. 2004. Prevalence of adverse reactions to food in Germany - a population study. *Allergy*, 59, 338-45.

## VII. ANHANG

Anmerkung:

Im Mai 2016 wurden neue Diagnosekriterien (Rom-IV) für das IBS veröffentlicht (Lacy et al., 2016):

- Wiederkehrende abdominale Schmerzen, im Mittel mindestens an einem Tag pro Woche in den letzten drei Monaten,

verbunden mit zwei oder mehr der folgenden Kriterien:

- zusammenhängend mit der Defäkation
- verbunden mit einer Änderung der Stuhlhäufigkeit
- verbunden mit einem Wechsel der Form (Aussehen) des Stuhls

Die Kriterien müssen für die letzten drei Monate mit Symptombeginn mindestens sechs Monate vor Diagnosestellung erfüllt sein.



UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein, Campus Kiel,  
Klinik für Innere Medizin I, Haus 6, Arnold-Heller-Straße 3, 24105 Kiel

## UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Campus Kiel,

**Klinik für Innere Medizin I**

**m. S. Allgemeine Innere Medizin,  
Gastroenterologie, Hepatologie,  
Pneumologie, Endokrinologie, Ernäh-  
rungs- und Altersmedizin**

**Direktor: Prof. Dr. S. Schreiber**

Zufahrt und Lieferanschrift:

**Schittenhelmstr. 12, 24105 Kiel**

**Ansprechpartner:**

**Prof. Dr. A. Fritscher-Ravens**

**Leitung der Forschungseinheit**

**„Experimentelle Endoskopie“**

**Tel.: 0431-597-2133/-1464**

**Fax: 0431-597-3757**

**e-mail: [fri.rav@btopenworld.com](mailto:fri.rav@btopenworld.com)**

**Internet: [www.uk-sh.de](http://www.uk-sh.de)**

### Aufklärungs- und Einverständnisbogen

\_\_\_\_\_  
Vor- und Zuname Patient

\_\_\_\_\_  
Geburtsdatum

#### **Forschungsprojekt:**

**„Nachweis von Nahrungsmittelunverträglichkeiten bei Patienten mit „Reizdarmsyndrom“ - Bauchschmerzen und/oder Blähungen- durch konfokale Laserendomikroskopie“**

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

zur Klärung der Frage nach Nahrungsmittelunverträglichkeit bieten wir Ihnen im Rahmen dieses Forschungsprojekts die Untersuchung mit einer neuartigen Methode an, die bisher nicht in der Medizin etabliert ist. Unser Ziel ist es, mit einer neuen Laser- Vergrößerungstechnik die Schleimhaut des Zwölffingerdarmes auf mikroskopisch kleiner Ebene sichtbar zu machen. So hoffen wir nachweisen zu können, dass die Zellen auf der Darmschleimhaut, die sonst nur mit einem Mikroskop außerhalb der Körpers untersucht werden können, auf bestimmte Nahrungsmittel reagieren und sichtbar gemacht werden können.

Während der Untersuchung werden verschiedene, im Vorfeld ermittelte, Nahrungsmittel auf die Oberfläche des Zwölffingerdarmes aufgebracht und die Reaktion der Darmschleimhaut daraufhin untersucht. Sollten Sie auf eine der getesteten Substanzen reagieren, so können Ihnen die dadurch gewonnenen Erkenntnisse evtl. bei der Auswahl Ihrer

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Anstalt des öffentlichen Rechts  
Vorstandsmitglieder:  
Prof. Dr. Jens Scholz  
Dipl.-VerW. Pansegrau  
Christa Meyer

☎ Pforte: (0431) 597-1393  
☎ Kliniksekretariat: (0431) 597-1273  
☎ Ambulanzen: (0431) 597-1358  
☎ Intensivstation: (0431) 597-1287  
☎ Notfallaufnahme: (0431) 597-1243



Nahrungsmittel helfen, die Bauchschmerzen zu verbessern oder sogar zu stoppen. Sie helfen aber auch uns in der Medizin, weitere Erkenntnisse auf dem Gebiet der Nahrungsmittelenverträglichkeiten und der Reaktion der Schleimhaut des Darmes darauf, zu gewinnen.

Für eine feingewebliche Untersuchung werden Proben und Spülflüssigkeit aus dem Darm entnommen und auf bestimmte Zellen untersucht. Dieses stellt einerseits eine Routinemaßnahme bei allen endoskopischen Untersuchungen des Magens und Darmes dar, soll in diesem Falle aber zusätzlich helfen, die noch nicht bekannten Vorgänge im Darm bei Nahrungsmittelenverträglichkeit aufzuklären. Diese Zellanalysen werden, soweit sie die Studie betreffen, anonym gehandhabt, d.h. Ihre persönlichen Daten werden nicht weitergegeben, oder veröffentlicht.

Für die Magen-Darm-Spiegelung (Gastroskopie) verwenden wir ein sogenanntes Endomikroskop. Dieser ganz spezielle flexible Schlauch hat ein integriertes Mikroskop, welches uns ermöglicht, über eine 1000-fache Vergrößerung die Oberfläche des Darmes zu begutachten. Es wird bereits für andere Untersuchungen am Magen-Darm-Trakt eingesetzt.

Um die Zellen darstellen zu können benötigen wir einen Farbstoff, den wir in Ihre Vene injizieren. Er heißt Fluorescein und wird in der Routine als Kontrastmittel in der Augenheilkunde seit vielen Jahren eingesetzt. Dieser Farbstoff wird vom Körper rückstandslos abgebaut und mit dem Urin wieder ausgeschieden. Der Urin wird für kurze Zeit „neonfarben“ gelb. Nur in ganz seltenen Fällen (in 6 von 1000 Patienten) kann es eine allergische Reaktion oder Übelkeit hervorrufen. Er verursacht für einige Stunden auch eine Gelbfärbung der Haut und der Schleimhaut des Auges, die sich aber wieder vollständig auflöst.

Nach Injektion mit diesem Kontrastmittel (Fluorescein) in eine Ihrer Körpervenen, kann das in das Endoskop eingebaute Laserlicht mikroskopisch kleine Zellen und Zellveränderungen sichtbar machen. Wir werden dann 5-6 verschiedene Nahrungsmittel auf die Oberfläche Ihres Zwölffingerdarmes geben und nach Zellveränderungen Ausschau halten.

Die Magenspiegelung ist ein allgemein verbreitetes, sehr sicheres und schonendes Verfahren zur Inspektion des oberen Verdauungstraktes und wird in der Routine sogar von niedergelassenen Kollegen in der Praxis durchgeführt. Auch Gewebeproben werden routinemäßig entnommen. Sie werden hierzu noch einen gesonderten Aufklärungsbogen erhalten.

Ich stimme der Untersuchung mittels Endomikroskopie zu, um einen Nahrungsmitteltest durchführen zu lassen. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene, krankheitsbezogene Daten aufgezeichnet und in anonymisierter Form ausgewertet und ggf. veröffentlicht werden.

Ich hatte Gelegenheit, weitere Fragen zu stellen und kann meine freiwillige Zustimmung jederzeit zurückziehen.

\_\_\_\_\_  
Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Patient

\_\_\_\_\_  
Name Arzt

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Arzt

**Zusatz:**

Für alle Patienten / Probanden wurde eine Versicherung abgeschlossen, die unabhängig vom Verschulden in einem Schadensfall wirksam wird. Die Versicherungsbedingungen werden Ihnen ausgehändigt. Auf die §§ 6 (Versicherungsleistung) und 14 Abs.2 (Obliegenheiten des Versicherten) der Versicherungsbedingungen wird besonders hingewiesen.

Während der Dauer der klinischen Prüfung sollte eine andere medizinische Behandlung mit Ausnahmen von Notfallsituation, nur im Einvernehmen mit dem Prüfarzt erfolgen. Der Prüfarzt ist von einer Notfallbehandlung unverzüglich zu unterrichten.

Bei Verdacht auf einen studienbedingten Gesundheitsschaden sind Sie verpflichtet, dies der Versicherung und dem Prüfarzt unverzüglich anzuzeigen. Es besteht andernfalls die Gefahr, dass der Versicherungsschutz verloren geht. Sie müssen den Versicherer entweder selbst benachrichtigen, oder können sich zur Vereinfachung an den Prüfarzt wenden, der dann in Ihrem Auftrag die Versicherung informiert. Der Prüfarzt wird Ihnen eine Kopie dieser Anzeige aushändigen.

Die Versicherung mit der Versicherungsscheinnummer **AS-900160838** wurde bei der **Allianz Versicherungs-Aktiengesellschaft** abgeschlossen.



UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein, Campus Kiel,  
Klinik für Innere Medizin I, Haus 6, Arnold-Heller-Straße 3, 24105 Kiel

## UNIVERSITÄTSKLINIKUM Schleswig-Holstein

Campus Kiel,

**Klinik für Innere Medizin I**

**m. S. Allgemeine Innere Medizin,  
Gastroenterologie, Hepatologie,  
Pneumologie, Endokrinologie, Ernäh-  
rungs- und Altersmedizin**

**Direktor: Prof. Dr. S. Schreiber**

Zufahrt und Lieferanschrift:

**Schittenhelmstr. 12, 24105 Kiel**

**Ansprechpartner:**

**Prof. Dr. A. Fritscher-Ravens**

**Leitung der Forschungseinheit**

**„Experimentelle Endoskopie“**

**Tel.: 0431-597-2133/-1464**

**Fax: 0431-597-3757**

**e-mail: [fri.rav@btopenworld.com](mailto:fri.rav@btopenworld.com)**

**Internet: [www.uk-sh.de](http://www.uk-sh.de)**

### Einverständniserklärung

Titel der Studie:

**„ Erkundung von Nahrungsmittelunverträglichkeiten bei Patienten mit Reizdarm-  
syndrom durch konfokale Laserendomikroskopie“**

Vor- und Nachname der Patientin / des Patienten

Ich bin ausreichend in mündlicher und schriftlicher Form über die Ziele und Methoden, die möglichen Risiken und den Nutzen der Studie informiert worden. Ich habe die Patienteninformation gelesen und den Inhalt verstanden.

Ich hatte ausreichend Gelegenheit, die Studie mit einem Arzt zu besprechen und Fragen zu stellen. Alle meine Fragen und Bedenken wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich weiß, dass meine Studienteilnahme freiwillig ist und dass ich jederzeit ohne Angabe von Gründen meine Zusage zur Teilnahme zurückziehen kann und mir daraus für meine weitere Behandlung keine Nachteile entstehen.

Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen der Studie meine Daten über Alter, Geschlecht, Gewicht, Körpergröße, Laborauswertungen und Untersuchungsbefunde aufgezeichnet und anonymisiert (d.h. ohne Namensnennung) zur Auswertung der Ergebnisse verwendet werden. Alle im Rahmen der Studie erhobenen Daten werden streng vertraulich gemäß dem Datenschutz behandelt.

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein  
Anstalt des öffentlichen Rechts

Vorstandsmitglieder:  
Prof. Dr. Jens Scholz  
Dipl.-VerW. Pansegrau  
Christa Meyer

☎ Pforte: (0431) 597-1393  
☎ Kliniksekretariat: (0431) 597-1273  
☎ Ambulanzen: (0431) 597-1358  
☎ Intensivstation: (0431) 597-1287  
☎ Notfallaufnahme: (0431) 597-1243



---

Einer wissenschaftlichen Auswertung der anonymisierten Daten und einer möglichen Veröffentlichung stimme ich zu.

Mit einer Information meines Hausarztes über die Studie bin ich einverstanden.

Ich gebe hiermit meine freiwillige Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie. Eine Kopie dieser Einwilligung und eine Kopie der Patienteninformationsschrift habe ich erhalten.

\_\_\_\_\_  
Name der Patienten / des Patienten

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

Der Patient wurde von mir über Ziele, Bedeutung, Tragweite sowie etwaige Risiken der Studie aufgeklärt.

\_\_\_\_\_  
Name der Ärztin / des Arztes

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

## DANKSAGUNG

Diese Dissertation wurde an der Klinik für Innere Medizin I der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich allen Beteiligten, sowie dem Direktor der Klinik Herrn Prof. Dr. Stefan Schreiber meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Im Besonderen möchte ich dabei meine Doktormutter Frau Prof. Dr. Annette Fritscher-Ravens hervorheben. Ich danke ihr für die Überlassung des Themas und die Einführung in die wissenschaftlichen Grundlagen. Ihr unermüdlicher Drang Neues zu erforschen und zu entdecken trieb diese Arbeit voran. Auch danke ich ihr für die umfassende Betreuung und Unterstützung.

Ein großer Dank gebührt auch meinem Betreuer Herrn PD Dr. Mark Ellrichmann für die Unterstützung in all den Fragen, die sich mir während der Arbeit an dieser Dissertation stellten, insbesondere im Bereich der Statistik.

Weiter möchte ich allen Mitarbeitern der Interdisziplinären Endoskopie des Universitätsklinikums Kiel für ihre freundliche Aufnahme in der Abteilung und Unterstützung danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Röcken und seinen Mitarbeitern vom Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Aufarbeitung und Auswertung der Dünndarmbiopsien.

Ebenfalls möchte ich Frau PD Dr. Martina Böttner vom Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danken, dass sie beim Vergleichen der histologischen Schnitte mit den Bildern der konfokalen Laserendomikroskopie zur Identifikation der intraepithelialen Lymphozyten geholfen hat.

## **ERKLÄRUNG ETHIK**

Die im Rahmen der Studie durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Universität Kiel genehmigt (AZ: A 139/12).

## ERKLÄRUNG DOKTORARBEIT

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation

*Pilotstudie über den Nachweis von Nahrungsmittelallergien  
mittels konfokaler Laserendomikroskopie im Dünndarm  
bei Patienten mit Reizdarmsyndrom*

abgesehen von Ratschlägen meiner Doktormutter und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist und dass ich, außer den in der Arbeit aufgeführten, keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe und dass meine Arbeit bisher weder ganz noch in Teilen keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Ort, Datum \_\_\_\_\_ Unterschrift \_\_\_\_\_