

**Alpha 1-Antitrypsin als objektiver Verlaufsparemeter bei
entzündlichen Darmerkrankungen oder gesteigertem enteralen
Eiweißverlust
- Eine Praxisstudie -**

Muss, C.¹⁾, Schütz, B.²⁾,

1) Ernährungsmediziner , Augsburg

2) Labor Biovis Limburg

für die Verfasser:

Dr. Dr. med. Claus Muss
Arzt/Naturheilverfahren/
Ernährungsmedizin (DGEM),
Chirotherapie
Bahnhofstr. 8
86150 Augsburg

Alpha 1-Antitrypsin als a controlling parameter of the intestinal permeability in inflammatory bowel disease or protein losing of the intestinum - a study from a medical practice -

Abstract

69 patients from a medical practice were selected by strict criteria, to avoid the influence of other factors on the immune system as far as possible. 35 of the volunteers had alpha antitrypsin excretions in feces submitting 27mg/dl and 34 above the this amount. It was shown that alpha-antitrypsin serves a critical lab parameter in determination of leaky gut diagnosis by feces controll.

Keywords:

Leaky gut Syndrome, Inhibition of the gastrointestinal permeability, α -1-Antitrypsin concentrations in faeces, immunmodulative effects of Colibiogen®

Zusammenfassung

In einer Arztpraxis wurden 69 Patienten auf ihre alpha 1-Antitrypsinausscheidung in den Stuhlproben untersucht. Es sollte dabei untersucht werden, ob dieser Laborparameter als objektiver Verlaufsparemeter bei entzündlichen Darmerkrankungen oder gesteigertem enteralem Eiweißverlust geeignet ist. 34 der 69 Patienten (49,3%) zeigten in der Eingangsuntersuchung erhöhte alpha-1 Antitrypsinwerte im Stuhl. Diese Patienten litten an Nahrungsmittelallergien, bzw. an Nahrungsmittelintoleranzen oder an abdominellen Beschwerden unklarer Genese. Einige Patienten wiesen neben abdominellen Beschwerden auch Hautsymptome (Ekzeme) auf. Die Patienten im Abstand von 6 Wochen untersucht. Dabei wurden bis zu 4 Untersuchungen pro Patient über einen Zeitraum von 24 Wochen durchgeführt. Alle Patienten mit erhöhten **α -1-Antitrypsinwerten** wurden mit zellfreier Lösung aus $1,3 \times 10^6$ bzw. $2,3 \times 10^8$ lysierten Escherichia coli (Colibiogen® bzw. Colibiogen Infantibus®) per os behandelt. Nach Gabe von Colibiogen® zeigte sich ein signifikanter Rückgang der α -1-Antitrypsinwerte im Stuhl. Bereits in der zweiten Stuhlkontrolle lag kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Test- und Kontrollgruppe mehr vor. Mit der alpha 1-Antitrypsin- Abnahme stellte sich gleichzeitig eine Verbesserung der subjektiven gastrointestinalen Symptomatik und der Hauteffloreszenzen ein. Es wird gefolgert, dass die Bestimmung der **α -1-Antitrypsinkonzentration im Stuhl** ein geeigneter Verlaufsparemeter zur objektiven Erfassung entzündlicher Schleimhautirritationen im Bereich des oberen und unteren Intestinaltraktes darstellt.

Schlagwörter: Entzündliche Darmerkrankungen, enteraler Eiweißverlust, intestinale Permeabilität, α -1-Antitrypsin im Stuhl, Colibiogen®

Einleitung

Das Alpha 1-Antitrypsin stellt einen primären Inhibitor der Elastase von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) dar, einem proteolytischen Enzym, das im Rahmen von inflammatorischen Prozessen freigesetzt wird. Alpha 1-Antitrypsin sorgt dafür, dass die proteolytische Aktivität der PMN-Elastase im Entzündungsgebiet begrenzt wird. Es besitzt somit eine wichtige regulatorische bzw. anti-inflammatorische Rolle.

Im Allgemeinen geht man davon aus, dass alpha- 1 -Antitrypsin hauptsächlich in der Leber synthetisiert, in den Darm sezerniert und ohne tryptische Spaltung oder Resorption mit dem Stuhl ausgeschieden wird. Bei einer Molekülgröße von ca. 52 kd tritt es bei nicht intakter Darmschleimhaut vermehrt in das Darmlumen über und kann im Stuhl als Marker eines intestinalen Eiweißverlustes oder einer erhöhten Schleimhautpermeabilität nachgewiesen werden. Darüber hinaus wird die Bestimmung der fäkalen *a-1-Antitrypsin*-Konzentration zur Beurteilung der Aktivität chronisch entzündlicher Darmerkrankungen herangezogen. Dieser Laborparameter wird als wichtiger Verlaufsparemeter zur Kontrolle des Therapieerfolges angesehen. Sehr hohe alpha-1-Antitrypsinwerte werden bei Patienten mit Morbus Crohn gefunden (im akuten Schub). Erhöhte Werte finden sich jedoch auch bei Colitis ulcerosa (Kapel et al., 1992) oder anderen Erkrankungen des Darmes, wie Colon-Karzinomen, -Polypen, Divertikulitis, Sprue oder ausgeprägten Nahrungsmittelallergien.

Die Empfindlichkeit der Bestimmung von *a-1-Antitrypsin* im Stuhl als Ausdruck einer okkulten Darmblutung ist deutlich höher einzustufen, wie der sogenannte „Haem-occult-Tests“ (Saitoh et al., 1995; Moran et al., 1993).

Neueren Erkenntnissen zufolge stammt das im Stuhl nachweisbare alpha-1-Antitrypsin nicht ausschließlich aus der Leber. Es liegen auch Hinweise vor, dass auch intestinale Makrophagen, Monozyten und Darmepithelzellen alpha-1-Antitrypsin synthetisieren können (Perlmutter et al. 1989, Isaacson et al., 1981, Hafeez et al., 1992, Molmenti et al. 1993).

Zur Therapie entzündlicher Schleimhautreaktionen werden in der Naturheilkunde Bakterienlysate eingesetzt. So wird u.a. das Präparat Colobiogen®, das aus einem zellfreien Kulturüberstand von $2,3 \times 10^8$ lysierten *Escherichia coli* besteht bei entzündlichen Schleimhautveränderungen im Rahmen einer Colitis erfolgreich eingesetzt. Unter Colibiogen wird eine Induktion der Zytokine IL-1, IL-6 und der TNF- α beobachtet. Durch diese Zytokineffektorantwort wird eine Modulation der Immunantwort im Sinne einer Balancierung der TH1 und TH2-Reaktionen erreicht. Außerdem können Zellmembranen gegenüber dem osmotischen Stress stabilisiert werden (Grimmecke und Kalosek 2000). Dadurch kann eine Interaktion mit pathologisch verändertem Gewebe eintreten und entsprechende Regenerationsvorgänge an der intestinalen Mukosa eingeleitet werden.

In der vorliegende Studie wurde die Aussagekraft von α -1-Antitrypsin als Verlaufsparemeter bei entzündlichen Schleimhautreaktionen überprüft. Gleichzeitig galt es unter standardisierten Bedingungen zu klären, ob die orale Applikation von lysierten *Escherichia coli*-Fraktionen (Colibiogen®), wie in vielen Erfahrungsberichten beschrieben, tatsächlich in der Lage ist, entzündliche Schleimhautirritationen positiv zu beeinflussen.

Patientenkollektiv

Aus dem Patientengut einer naturheilkundlich-orientierten Kassenarztpraxis mit Schwerpunkt Ernährungsmedizin wurden 69 Patienten mit unklaren abdominalen Beschwerden bzw. Nahrungsmittelunverträglichkeiten sowie -Allergien bzw. ausgewählt. Einige dieser Patienten wiesen unspezifische chronische Ekzeme auf. Es wurde eine strenge Vorselektion der Patienten durchgeführt (siehe Anhang Selektionskriterien) Insbesondere wurden nur Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen keine akute entzündliche Darmerkrankung wie z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa vorlag. Auch wurde darauf geachtet, dass keine parasitäre Darminfektion oder massiv erhöhte Keimzahlen mit fakultativ-pathogener Hefen im Stuhl vorhanden waren. Weiterhin wurden Patienten mit Zöliakie bzw. Glutensensibilisierung nicht in dieser Erhebung berücksichtigt. Zum Ausschluß einer akuten generalisierten Entzündung bzw. einer Lebererkrankung wurde bei jedem Patienten eine Blutsenkung und die Bestimmung der Transaminasen durchgeführt sowie der Stuhl zum Ausschluß einer Endoparasitose im Flotationsverfahren auf Helmintheneier überprüft. Nur Patienten, deren Laborwerte sich im Referenzbereich bewegten und deren parasitologischen Stuhlkontrollen unauffällig waren, wurden in das Kollektiv eingeschlossen. Die Patienten wurden nach ihrem spontanen Erscheinen in der Praxis nach dem Zufallsprinzip randomisiert. Sämtliche Patienten wurde über die Studie aufgeklärt und beteiligten sich freiwillig daran.

Methoden

Alpha-1-Antitrypsin im Stuhl wurde lange mit Hilfe der radialen Immundiffusion (RID, Gregory et al. (1984), Lopez et al. (1994) oder der Nephelometrie bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein ELISA-Test (Enzyme-Linked Immuosorbent Assay) verwendet. Dabei wird das alpha-1-Antitrypsin durch zwei Antikörper detektiert (Brouwer und Smekens, 1990). Mit dem eingesetzten Verfahren konnte ein großer Meßbereich erfaßt werden, so dass in einem Ansatz sehr niedrige sowie sehr hohe alpha-1-Antitrypsinkonzentrationen zu bestimmen waren. Die ELISA-Technik bat darüber hinaus den Vorteil, dass Trübungen im Stuhl oder Farbstoffe im Stuhl, diese Meßtechnik nicht beeinträchtigten.

Testprinzip

Alpha-1-Antitrypsin aus den Stuhlproben wurde an polyklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper gebunden. Gebundenes Antitrypsin wurde dann mit Hilfe eines peroxidasemarkierten anti-a 1-Antitrypsin Antikörpers detektiert. Die gebundene Peroxidase war direkt proportional dem Antitrypsingehalt der Stuhlprobe. Als Substrat wurde TMB eingesetzt. Die entstehende chromogene Verbindung wurde photometrisch bei 450 nm gemessen.

Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 9.0, SPSS-Software GmbH München. Da insbesondere die Werte nicht normal (Untersuchung auf Normalverteilung nach Kolmogorov-Smirnov) verteilt waren, erfolgte die statistische Auswertung nach Rangtransformation mit dem U-Test nach Mann-Whitney bzw. der Rangkorrelation nach Spearman. Die statistische Absicherung erfolgte beim U-Test 2-seitig, bei der Rangkorrelation einseitig. „Statistisch signifikant“ bedeutete eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ und wurde mit * bzw. ** für hochsignifikant $p < 0,01$ gekennzeichnet.

Ergebnisse

35 von 69 Patienten (50,3%) wiesen in der Eingangsuntersuchung alpha-1-Antitrypsin-Ausscheidungen im Stuhl unter dem Referenzbereich von 27,5 mg/dl auf. Der Mittelwert (\pm Standardabweichungen) dieser Patientengruppe lag in der Eingangsuntersuchung bei 9,9 mg/dl \pm 7,2 mit einem Minimal- bzw. Maximalwert von 1,0 bzw. 24,4 mg/dl und in der Kontrolluntersuchung bei 11,0 mg/dl \pm 9,1 mit einem Minimal- bzw. Maximalwert von 1,5 bzw. 41,5 mg/dl. 34 von 69 Patienten (49,7%) zeigten alpha-1-Antitrypsin-Ausscheidung über den Referenzwert von 27,5 mg/dl. Der Mittelwert (\pm Standardabweichung) der Stuhluntersuchungen dieser Patienten betrug 70,5 \pm 34,9 in der ersten und 34,2 \pm 32,4 (n = jeweils 34) sowie 29,9 \pm 21,4 (n= 6) in der zweiten bzw. dritten Untersuchung (n= 2). Bei einem Patienten lag in der vierten Untersuchung eine alpha-1-Antitrypsin-Ausscheidungen im Stuhl von 1,6 mg/dl vor. Die Maximal- bzw. Minimalwerte der alpha-1-Antitrypsin-Ausscheidungen im Stuhl lagen im Testkollektiv lag in der Eingangsuntersuchung bei 220,0 mg/dl bzw. 27,8 mg/dl sowie in der zweiten Untersuchung bei 44,6 bzw. 4,1 mg/dl und bei 55,2 bzw. 4,0 in der dritten Untersuchung. Alle Untersuchungswerte im Kollektiv waren nicht normal verteilt.

In dieser Untersuchung korrelierten die Ergebnisse der Eingangsuntersuchungen jeweils signifikant mit den Zweit- ($r_s=0,783^{**}$) bzw. Drittuntersuchungen ($r_s=0,714^*$). In der Kontrollgruppe (n= 35) unterschieden sich die Eingangs- und Kontrollwerte

nicht von einander signifikant ($p=0,400$). Zwischen der Kontroll- und der Testgruppe ($n= 34$) unterschieden sich die Eingangswerte ($p<0,01$), nicht aber die Folgeuntersuchung voneinander signifikant ($p=0,857$).

Im Testkollektiv nahm unter oraler Zufuhr von lysierten Escherichia coli-Fractionen (Colibiogen®) der Mittelwert der alpha 1-Antitrypsinausscheidung in den Stuhlproben signifikant von der Erstuntersuchung bis zur dritten Stuhlkontrolle ab ($p= p<0,001$ bzw. $p= 0,028$; Abb. 3).

Abbildung 1 zeigt die Korrelation der auf alpha-1-Trypsin Untersuchungswerte ($r_s=0,783^{**}$) zwischen den Erst- und Zweituntersuchungen im Kollektiv ($p<0,01$; $n=69$).

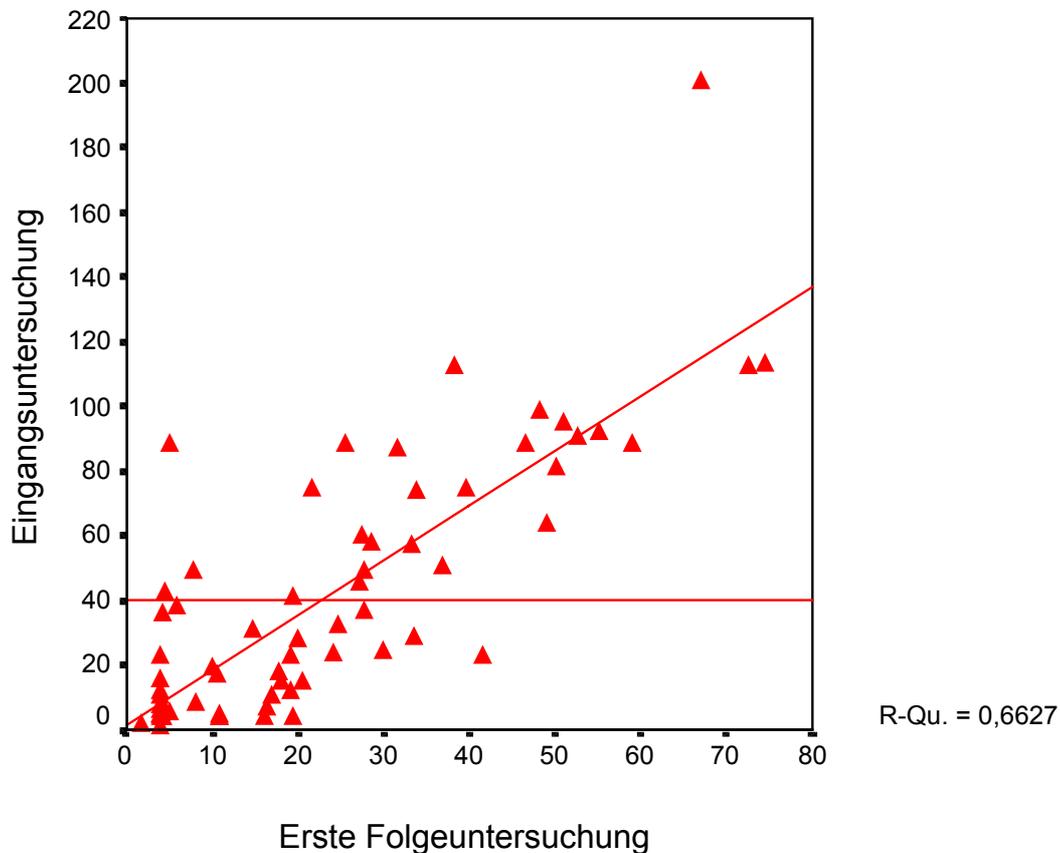


Abbildung 2 zeigt die Korrelation der auf alpha-1-Trypsin Untersuchungswerte ($r_s=0,783^{**}$) zwischen den Erst- und Drittuntersuchungen im Kollektiv ($p<0,01$; $n=69$).

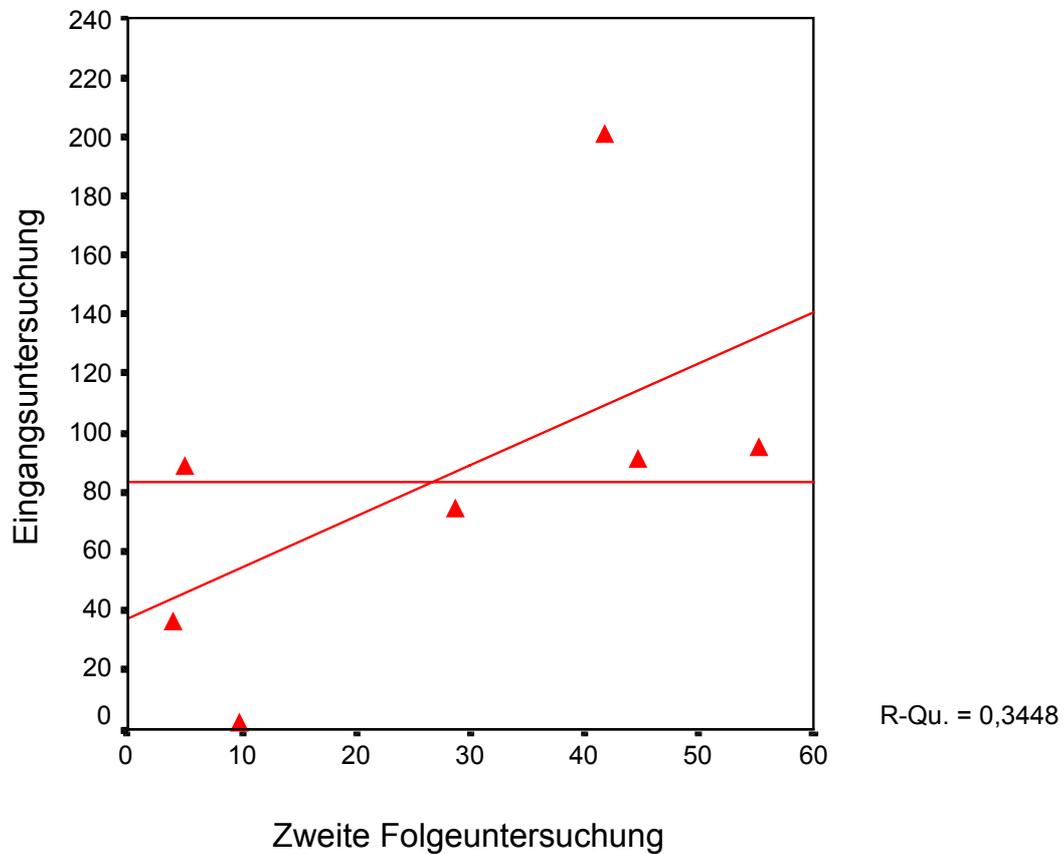
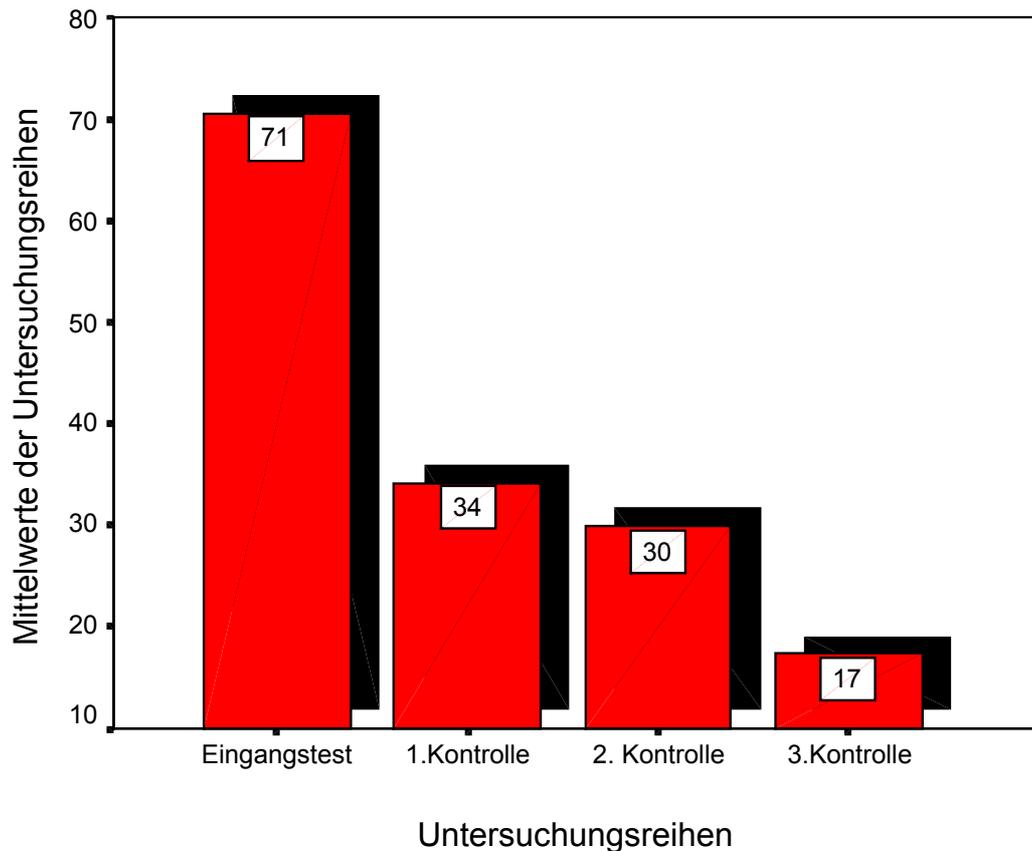


Abbildung 3 zeigt die Verteilung der Mittelwerte der Stuhluntersuchungen auf alpha-1-Trypsin 1-3 im untersuchten Kollektiv.



Diskussion

Seit einigen Jahren wird die Bestimmung der fäkalen *a-1-Antitrypsin*-Konzentration im Stuhl als Marker zur Beurteilung der Aktivität chronisch entzündlicher Darmerkrankungen herangezogen. Diese Untersuchung wurde bislang als wichtiger objektiver Verlaufsparemeter zur Kontrolle des Therapieerfolges angesehen. Darüber hinaus wird alpha 1-Antitrypsin auch als Marker eines intestinalen Eiweißverlustes oder einer erhöhten Schleimhautpermeabilität eingesetzt.

In der vorliegende Arbeit sollte die Aussagekraft von α -1-Antitrypsin als Verlaufsparemeter bei entzündlichen Schleimhautreaktionen unter kontrollierten Bedingungen in einer Praxisstudie überprüft werden. Gleichzeitig galt es zu klären, ob die orale Gabe eines zellfreien Kulturüberstandes von $2,3 \times 10^8$ lysierten *Escherichia coli* (Colibiogen®) tatsächlich in der Lage ist, entzündliche Schleimhautirritationen abzubauen.

Die alpha-Antitrypsinausscheidungen in den Stuhlproben korrelierten im untersuchten Kollektiv (n=69) zwischen der Eingangs- und Erst- bzw. Zweituntersuchung (Folgeuntersuchungen) signifikant ($p < 0,01$ bzw. $p = 0,036$). Bei 94,2 % (33/35) der Patienten der Kontrollgruppe stieg der Antitrypsinnachweis in den Stuhlproben zwischen der Erst- und Kontrolluntersuchung nicht über dem Referenzwert von 27,5 mg/dl, so daß mit diesen Ergebnissen von einer hohen Spezifität der Untersuchungsmethode ausgegangen werden kann.

Die Mittelwerte der alpha-Antitrypsin-Untersuchungen differierten zwischen der Kontrollgruppe (n=35) und der Testgruppe (n= 34) in der Eingangsuntersuchung signifikant ($p < 0,01$). Unter Therapie der Testgruppe mit einem zellfreien Kulturüberstand $2,3 \times 10^8$ von lysierten Escherichia coli (Colibiogen®), konnte eine Regression der alpha-1-Antitrypsinwerte in den Stuhlproben der Kontrollgruppe nachgewiesen werden, so daß bereits in der ersten Kontrolluntersuchung kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Testgruppe mehr erhoben wurde ($p = 0,617$). In der therapierten Testgruppe nahm der alpha-Antitrypsin-Nachweis von der Eingangs- bis zur zweiten Kontrolluntersuchung signifikant ab ($p < 0,01$ bzw. $p = 0,028$). Dieses Ergebnis läßt einerseits auf eine hohe Sensitivität der gewählten Untersuchungsmethode schließen. Der Parameter ist daher auch in Stuhlproben als Verlaufparameter bei entzündlichen Darmerkrankungen oder gesteigertem enteralem Eiweißverlust geeignet. Andererseits konnte in dieser Studie damit die entzündungshemmende Eigenschaften von Colibiogen® belegt werden. Die vorliegenden Ergebnisse im untersuchten Kollektiv bestätigen damit die bereits zuvor in tierexperimentellen Beobachtungen dokumentierte Wirkung durch Einleitung von Zellreparaturmechanismen an der gastrointestinalen Membran bei entzündlichen Verhältnissen an der intestinalen Mucosa durch eine Symbionten-Therapie. Parallel zur Abnahme von alpha 1-Antitrypsin-Ausscheidung im Stuhl kam es bei den Patienten der Testgruppe mit unklaren abdominalen Beschwerden bzw. Nahrungsmittelallergien zu einer Verbesserung ihrer subjektiven gastrointestinalen Symptomatik und/oder der Hauteffloreszenzen. Zusammenfassend wird angeregt, bei Verdacht auf entzündliche Prozesse an der gastrointestinalen Schleimhaut die Diagnostik u.a. durch eine Untersuchung auf alpha-1-Antitrypsin zu ergänzen. Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen ebenfalls den Einsatz der Symbionten-Therapie bei entzündlichen Darmerkrankungen.

Tabelle 1: Einschlusskriterien für das Kollektiv

- Patienten mit unklaren bzw. nicht abgeklärten abdominalen Beschwerden
- Patienten mit Nahrungsmittelintoleranzen bzw. -Allergien

Tabelle 2: Ausschlusskriterien für das Kollektiv

- Patienten in einem Alter unter 12 und über 60 Jahre.
- Patienten mit akuten fieberhaften Infekten und Entzündungen.
- Patienten mit akuter Diarrhoe, Fettstühlen oder parasitären Darmerkrankungen.
- Patienten, die vor weniger als 6 Monaten folgende Medikamente erhalten hatten: Antibiotika, Steroide, Zink-, immunmodulierende oder immunsuppressive Medikamente.
- Patienten mit endokrinen Störungen wie z.B. Diabetes mellitus.
- Patienten mit folgender Grunderkrankung im akuten Stadium: Colitis ulcerosa, Morbus Crohn.
- Patienten mit Morbus Wilson, aktiver Tuberkulose, Acrodermatitis enteropathica, primäre Immundefekterkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder rheumatischen Kollagenosen.
- Patienten mit HIV-Erkrankung, chronischer Virushepatitis oder nach frischem Herzinfarkt. Patienten mit Lymphom- bzw. Malignomerkrankungen.
- Patienten, die zum Zeitpunkt der Studie eine Reduktionsdiät durchführten.

- Schwangere oder stillende Frauen.
- Alkoholiker und Drogenkonsumenten.

Literatur

Wird noch ergänzt (Arbeiten liegen vor!)