

## 6 Zusammenfassung

Für die vorliegende Arbeit wurde die Reaktion der Intestinalmucosa auf singular, peroral appliziertes Endotoxin (LPS, Lipopolysaccharid) von *E. coli* (Serotyp O55:B5) unter besonderer Berücksichtigung ihrer sezernierten Mucine untersucht.

Es wurden 8-9 Wochen alte Mäuse beiderlei Geschlechts der Stämme Ztm.NMRI (GF und SPF), C3H/HeJZtm (GF und SPF) und C3H/HeNZtm (SPF) eingesetzt. C3H/HeJ-Mäuse fanden Anwendung, da deren Makrophagen eine weitgehende Resistenz gegenüber Endotoxinen aufweisen. Hierdurch sollte der Einfluß der Makrophagen auf die LPS-stimulierte Mucinsynthese und -sekretion bestimmt werden. Die isolierten Mucine wurden durch Gelfiltration auf Sepharose®CL-4B-Gel in epitheliale (Peak I) und lumenale (Peak II und III) Mucine aufgetrennt. Die drei Peaks wurden getrennt bearbeitet. LPS-bedingte Veränderungen der isolierten Mucine aus Jejunum, Caecum und Colon wurden hinsichtlich Menge, teilweise auch Zusammensetzung und Viskosität untersucht. Parallel dazu wurde in einer histologischen Untersuchung auf Veränderungen in den jeweiligen Darmabschnitten und in der Leber geachtet.

Das durchschnittliche Körpergewicht der NMRI-Mäuse betrug  $29,54 \pm 3,51$ g, bei C3H/HeJ-Mäusen  $22,46 \pm 3,34$ g und  $21,02 \pm 2,03$ g bei C3H/HeN-Mäusen. Die verwendete LPS-Menge betrug  $200\mu\text{g}$  LPS/NMRI-Maus bzw.  $150\mu\text{g}$  LPS/ C3H/HeJ- und C3H/HeN-Maus, was einer Dosierung von etwa  $7\mu\text{g}$  LPS/g Maus entspricht. Kontrolliere erhielten 0,2ml PBS-Puffer. Die Isolierung der Intestinalmucine erfolgte am 1. und 3. Tag nach peroraler LPS-Applikation.

Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

1. Grundsätzlich kam es bei Mäusen der Stämme NMRI und C3H/HeN zu einer Stimulierung der Mucinsynthese in den einzelnen Darmabschnitten. Die Reaktionen im Colon waren im allgemeinen am stärksten. Ergebnisse der C3H/HeN-Mäuse waren statistisch überwiegend signifikant, bei NMRI-Mäusen war eine tendentielle Zunahme zu verzeichnen. Bei C3H/HeJ-Mäusen, deren Makrophagen eine weitgehende Resistenz gegenüber Endotoxinen aufweisen, kam es nach LPS zu keiner gesteigerten Mucinsynthese.

2. Als Reaktion auf LPS veränderte sich die Zusammensetzung der Mucine. Fucose, Mannose und Galactose nahmen nach LPS-Applikation einen prozentual geringeren, N-Acetyl-Galactosamin, N-Acetyl-Glucosamin und Sialinsäuren nahmen einen prozentual höheren Anteil ein als in den Kontrollgruppen.

3. In den Kontrollgruppen wurde mit abnehmendem Molekulargewicht der Mucine eine abnehmende Viskosität festgestellt. Nach LPS-Applikation nahm die Viskosität der epithelialen Mucine ab. Die hochmolekularen, epithelialen Mucine waren nach LPS-Applikation weniger viskos als die niedermolekularen, luminalen Mucine. Die Molekulargröße kann also nicht den alleinigen Faktor für den Grad der Viskosität darstellen. Sonstige Faktoren, die die Viskosität beeinflussen können, wurden konstant gehalten, so daß Ladungsträger wie Sulfatester möglicherweise eine große Rolle für die Ausbildung der Viskosität spielen.

4. Histologisch sichtbare Reaktionen der Intestinalmucosa auf das LPS beschränkten sich zumeist auf das Vorkommen von Ödemen. Leichte Infiltrate mononukleärer Zellen waren nur bei Einzeltieren in geringer Ausprägung zu finden. Makroskopisch fielen mehrfach Lebern mit brüchiger Konsistenz des Parenchyms auf, histologisch konnten mit der H.E.-Färbung nur bei höheren LPS-Gaben (70 µg LPS/g Maus) Veränderungen festgestellt werden.

Makrophagen bzw. ihre Cytokine scheinen bei Mäusen die Menge der Mucine nach LPS-Stimulation zu regulieren, ohne daß histologisch gravierende Veränderungen sichtbar werden. Bei C3H/HeJ-Mäusen kam es zu keiner gesteigerten Mucinsynthese, aber die Veränderungen im Glykosilierungsmuster trafen auch für C3H/HeJ-Mäuse zu. Es scheinen somit unabhängige Steuerungsmechanismen für Art und Menge der synthetisierten Mucine vorzuliegen.

Bei vergleichbarer Versuchsdurchführung kam es bei Ratten des Stammes AS/Ztm und Han:SPRD zum Bild einer Colitis, nicht jedoch bei den untersuchten GF- und SPF-Mäusen. Bei Mäusen scheint somit ein grundsätzlich anderer Abwehrmechanismus auf peroral appliziertes LPS vorzuliegen als bei Ratten. Der Vorgang der LPS-Signaltransduktion ist nach Literaturangaben vermutlich nicht in die LPS-Clearance involviert. Es ist vorstellbar, daß bei Mäusen die LPS-Clearance nach peroraler LPS-Applikation stärker als die LPS-Signaltransduktion ist.

Eine höhere Viskosität der Mucine geht mit einem besseren Schutz der Mucosa einher. Die Viskosität der epithelialen Mucine nahm nach LPS-Applikation ab. Dadurch ist einerseits ein besserer Abtransport der einwirkenden Noxe aus dem Darm gewährleistet, andererseits ist die Mucosa weniger geschützt. Unterschreiten die Mucine ein bestimmtes Maß an Viskosität, so kann der Schutz der Mucosa vermutlich nicht mehr aufrechterhalten werden.

Ulrike Urlaub: Reactions of the intestinal mucosa of germfree and colonized mice to a single peroral application of endotoxin with special consideration of its secreted mucins

### Summary

The present study aimed to define the reaction of the intestinal mucosa to a single peroral application of endotoxin (LPS, lipopolysaccharide) from *E. coli* (O55 B5) with special consideration of its secreted mucins

The following strains of mice were used: Ztm:NMRI (GF, germfree and SPF, specified pathogen free), C3H/HeJZtm (GF and SPF) and C3H/HeNZtm (SPF). Mice were of both sexes and 8-9 weeks old.

C3H/HeJ mice were used because their macrophages show resistance to endotoxins. By this, it is possible to determine the influence of macrophages on the LPS-stimulated synthesis and secretion of mucin. The isolated mucins were separated in epithelial (peak I) and luminal (peak II and III) mucins by use of gel filtration on Sepharose<sup>®</sup>CL-4B. Subsequent analyses were done separately for each peak. LPS-induced alterations in quantity, composition, and viscosity of mucins isolated from jejunum, caecum and colon were determined. Furthermore intestinal segments and the liver were examined histologically.

Mean body weights were  $29.54 \pm 3.51$  g for NMRI mice,  $22.46 \pm 3.34$  g for C3H/HeJ mice and  $21.02 \pm 2.03$  g for C3H/HeN mice. NMRI mice received 200  $\mu$ g LPS and C3H/HeJ and C3H/HeN mice received 150  $\mu$ g LPS which is equivalent to a dose of about 7  $\mu$ g LPS/g body weight. Control mice received 0.2 ml PBS-buffer only. The intestinal mucins were isolated one and three days after application of LPS.

The following results were obtained:

1. Synthesis of mucins in the intestinal segments of C3H/HeN mice were statistically significant stimulated. The results of NMRI mice showed a tendency in increase of mucin synthesis. The greatest reactions were seen in the colon. C3H/HeJ mice did not show an increase in mucin synthesis.
2. As a reaction to LPS the composition of mucins changed. After application of LPS, the percentage of fucose, mannose and galactose were reduced, the percentage of N-acetyl galactosamine, N-acetyl glucosamine and sialic acids were higher as in the control groups.

3. In the control groups low viscosity of mucins was correlated with low molecular weight. After application of LPS the viscosity of epithelial mucins was reduced. The high molecular, epithelial mucins were less viscous than the low molecular, luminal mucins. Therefore the molecular weight can not be the single factor influencing the grade of viscosity. Other factors that could influence viscosity were hold constant. It is possible that sulfate, which impart a strong negative charge to O-glycan chains of mucins play an important part for viscosity.

4. Histologic reaction of the intestine to LPS was mostly limited to the occurrence of edema. Slight infiltrations with mononuclear cells were occasionally found. Macroscopically, the consistence of the parenchym of many livers was fragile, histologic alterations were only found in mice who received a higher dose of LPS (70 $\mu$ g LPS/g body weight).

Macrophages or their cytokines seem to regulate the amount of mucin after stimulation. In parallel to the increase of mucin synthesis there were no intensely histological alterations. C3H/HeJ mice did not show an increase in mucin synthesis, but the alteration in the pattern of glycosilation was found in C3H/HeJ mice as well. Therefore, there may be independent mechanisms to regulate the kind and amount of synthesized mucins.

In comparable experiments, germfree AS/Ztm and Han SPRD rats showed a colitic reaction. The germfree and colonized mice did not show these inflammatory reactions in the present study. It could be possible that the mechanisms of defence to perorally applied LPS are different in mice compared with rats. It is widely thought in the literature that LPS signal transduction is not involved in LPS clearance. It is conceivable that clearance of LPS occurs more intense than signal transduction in mice.

A high viscosity of mucin is correlated with a high protection of the mucosa. After application of LPS the viscosity of epithelial mucins was reduced. On the one hand pathogenic organisms that bind to mucins are removed with mucus flow, on the other hand there is less protection of the mucosa. If the viscosity of mucin is reduced too much, the protection of mucosa can not be maintained.