

Aus der Chirurgischen Klinik und Hochschulambulanz I
Abteilung für Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Effekt von Endothelin-1 und Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist
auf die Mikrozirkulation bei TNBS-Colitis**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Tanja Anderson
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Kruschewski
2. Priv.-Doz. Dr. med. B. Siegmund
3. Prof. Dr. med. M. Kirschner

Datum der Promotion: 16.05.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Hintergrund	1
1.1.1. Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Colitis ulcerosa und Morbus Crohn	1
1.1.2. Die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	2
1.1.3. Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	3
1.2. Zielsetzung und Fragestellung.....	5
2. MATERIAL UND METHODE	7
2.1. Versuchstiere	7
2.2. TNBS-Colitis-Induktion	7
2.3. Präparation.....	7
2.4. Intravitalmikroskopie	8
2.4.1. Bestimmung des kapillären Blutflusses.....	10
2.4.2. Bestimmung der funktionellen Kapillardichte.....	11
2.4.3. Bestimmung der Gefäßpermeabilität	11
2.4.4. Bestimmung des Leukozytenstickings	12
2.5. Bestimmung der weiteren Zielparameter	12
2.6. Versuchsaufbau (Gruppen I-IV).....	13
2.7. Histologie	15
2.8. Ausschlusskriterien	15
2.9. Statistik.....	15

3.	ERGEBNISSE	17
3.1.	Kapillärer Blutfluss der Gruppen Ia-IVa.....	17
3.2.	Funktionelle Kapillardichte der Gruppen Ia-IVa	18
3.3.	Gefäßpermeabilität der Gruppen Ia-IVa.....	20
3.4.	Leukozytensticking der Gruppen Ib-IVb	21
3.5.	Gewichtsverlauf der Gruppen I-IV.....	23
3.6.	Hämatokrit der Gruppen I-IV	24
3.7.	Urinausscheidung der Gruppen I-IV	26
3.8.	Stuhlqualität der Gruppen I-IV.....	27
3.9.	Histologie der Gruppen I-IV	27
4.	DISKUSSION	30
4.1.	Ätio-Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	30
4.1.1.	Die Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	30
4.1.2.	Tierexperimentelle Untersuchungen der Mikrozirkulation	32
4.2.	Material und Methode	32
4.2.1.	Die Methodik der Intravitalmikroskopie - Parameter der Mikrozirkulation	32
4.2.2.	Die Präparation der Tiere.....	32
4.2.3.	Charakterisierung des TNBS-Colitis-Modells.....	33
4.2.4.	Histologischer Colitis-Score	34
4.2.5.	Hypothese	34
4.2.6.	Versuchsaufbau.....	35
4.2.7.	Zielparameter	36
4.2.8.	Charakterisierung der Testsubstanzen	37
4.2.8.1.	Endothelin-1	37
4.2.8.2.	Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist LU-135252.....	38

4.3. Ergebnisse	39
4.3.1. Kontrollgruppe (Gruppe I).....	39
4.3.2. Colitisgruppe (Gruppe II)	40
4.3.3. Endothelgruppe (Gruppe III)	40
4.3.4. Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (Gruppe IV).....	40
4.3.5. Gruppenvergleich (Gruppen I-IV).....	41
4.3.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	43
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	45
5.1. Hintergrund	45
5.2. Zielsetzung	45
5.3. Material und Methode	45
5.4. Ergebnisse	46
5.5. Schlussfolgerungen	46
5.6. Ausblick.....	46
6. LITERATURVERZEICHNIS	48
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	61
8. DANKSAGUNG	62
9. ERKLÄRUNG	63
10. LEBENSLAUF	64
11. PUBLIKATIONSLISTE.....	66

1. EINLEITUNG

1.1. Hintergrund

1.1.1. Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Colitis ulcerosa und Morbus Crohn

Die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn sind rezidivierend verlaufende chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), deren Ätio- Pathogenese nicht eindeutig geklärt ist.

Beide Krankheiten weisen mehrere Übereinstimmungen in ihrem Symptomkomplex auf. So klagen Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen häufig über heftige abdominelle Schmerzen, Tenesmen, Diarrhoe und Gewichtsverlust. Auch bestehen Ähnlichkeiten in Bezug auf die extraintestinalen Manifestationen, das Erkrankungsalter und ein Ansprechen auf dieselben Therapeutika. Gleichzeitig unterscheiden sich die CED auch deutlich. Zum Beispiel limitiert sich die Ausdehnung der Colitis ulcerosa auf das Rektum und Kolon, wobei hingegen ein Befall des gesamten Gastrointestinaltrakts bei Morbus Crohn möglich ist. Außerdem breitet sich die Colitis ulcerosa kontinuierlich und proportional aus, der Morbus Crohn hingegen diskontinuierlich und disproportional. Die Inflammation bei Morbus Crohn ist transmural, die bei Colitis ulcerosa weitestgehend auf die Schleimhaut beschränkt. Die zum ersten Mal im Jahre 1885 beschriebene Colitis ulcerosa [1] und der im Jahre 1932 veröffentlichte Morbus Crohn [2] wurden durch die Arbeit von Lockhart-Mummery und Morson im Jahre 1960 [3] nunmehr in zwei nosologische Entitäten geteilt.

Besonders bei alleinigem Befall von Kolon und Rektum kann im Einzelfall die sichere Differenzierung trotzdem schwierig sein, worauf die Zusammenfassung unter dem Begriff „chronisch entzündliche Darmerkrankungen“ hinweist. Daher wird in ca. 10% der Fälle (vorerst) von einer „Colitis indeterminata“ gesprochen [4, 5].

Die Inzidenz beträgt für beide Erkrankungen 7-15/100.000 Einwohner pro Jahr [6-8]. Dabei kommt es zu einer ansteigenden Prävalenz, da überwiegend junge Menschen davon betroffen sind. Heutzutage wird in Mitteleuropa mit 90-300 Erkrankten/100.000 Einwohner gerechnet [9-11].

Trotz intensiver Forschungsbemühungen ist die Ätio-Pathogenese bislang nicht geklärt. Angesichts der teilweise mit erheblichen Nebenwirkungen behafteten bisher etablierten konservativen (Langzeit-)Therapie, wie z.B. dem Cushing-Syndrom, Osteoporose und Knochenmarkschädigung [12, 13], stellen die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen immer noch ein klinisch und wissenschaftlich relevantes Problem dar.

1.1.2. Die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Auch wenn die für die Entstehung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auslösenden ätiologischen Faktoren zum großen Teil unklar sind, deuten vorliegende Daten auf die Bedeutung immunologischer und genetischer Ursachen hin. Zudem dürften darüber hinaus Umwelteinflüsse eine Rolle spielen.

Durchgeführte Familien- und Zwillingsuntersuchungen weisen auf eine gehäufte Prävalenz von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen innerhalb dieser Kreise hin und deuten damit auf eine vorliegende genetische Prädisposition [14]. Auffallend ist dabei die erhöhte Inzidenz der Colitis ulcerosa in „Morbus Crohn-Familien“ und umgekehrt. Durch die Zunahme der Inzidenz der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit zunehmender Industrialisierung und Entwicklung der Umgebung wurden Hinweise auf die Bedeutung von Umweltfaktoren gewonnen [15].

Neben einer Reihe von epidemiologischen Befunden bestehen ebenfalls Hinweise auf eine wahrscheinlich genetisch bedingte, gestörte Immunregulation bei den von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn betroffenen Patienten. Während der akuten Entzündung der intestinalen Schleimhäute ist bei beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Infiltration der Mukosa mit Granulozyten und mononukleären Phagozyten zu beobachten, dem später auch Lymphozyten folgen. Dieses geschieht als Reaktion des intestinalen Immunsystems auf einen noch ungeklärten Faktor und ist gleichzeitig die früheste fassbare morphologische Veränderung des akuten Entzündungsstadiums. Weiterhin sind im Bereich der T-Zell-vermittelten Immunreaktion eine verstärkte Proliferationsrate mukosaler T-Zellen ebenso wie eine erhöhte Frequenz aktivierter T-Zellen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als Reaktion auf bakterielle Antigene dargestellt worden [16]. So gibt es auch Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einem genetisch determinierten Toleranzverlust gegenüber der eigenen Flora und einer damit verbundenen überschießenden immunologischen Reaktion gegen „normale“ Bestandteile des Darminhaltes [17-21]. Im Jahre 2001 gelang es zwei voneinander unabhängigen Forschergruppen, eine relevante NOD2-Genmutation beim Morbus Crohn nachzuweisen, welche mit dem fibrostenotischen Subtyp im Zusammenhang steht. Dabei handelt es sich bei NOD2 um einen vermeintlich intrazellulären Rezeptor für bakterielle Peptidoglycane. Die einen Zusammenhang zwischen dem Protein und der Pathogenese des Morbus Crohn herstellenden molekularen Mechanismen sind weiterhin unklar [22-25]. NOD2 (CARD15) gehört zu einer größeren Proteinfamilie, deren Aufgabe die Abwehr einer bakteriellen Invasion

in den Organismus ist. Vermutlich löst es dabei die Pathogenese des Morbus Crohn aus. Weil die entsprechende Mutation bei weniger als 50% der betroffenen Fälle am Krankheitsgeschehen beteiligt ist, muss infolgedessen nach weiteren Ursachen gesucht werden [26, 27]. Eine direkte Verknüpfung der Ätio-Pathogenese (insbesondere des Morbus Crohn) mit einer Infektion durch spezifische Erreger, wie dem *Mycobacterium paratuberculosis* [28-30] oder einer persistierenden Maserninfektion des Gefäßendothels [31-33], konnte bislang nicht belegt werden.

1.1.3. Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist seit langem Gegenstand des Forschungsinteresses. Ein Jahr nach der Publikation über die „regionale Ileitis“ in 1932 [2] gelang es den damaligen Co-Autoren Ginzburg und Oppenheimer, die klinischen und pathomorphologischen Gemeinsamkeiten zwischen dem untersuchten Morbus Crohn und der ischämischen Colitis zu beschreiben [34]. Die Beziehung zwischen der Ischämie und der Entzündung untersuchte die Gruppe um Marston et al. im Jahre 1969 mithilfe einer tierexperimentellen Studie an Hunden. Die dabei gewonnenen Resultate wiesen auf einen direkten Zusammenhang zwischen der mechanischen Verlegung der Kolondurchblutung und den folgenden Schleimhautulcerationen unterschiedlichen Schweregrades hin [35]. Zuvor hatte die in 1949 veröffentlichte Arbeit über Colitis ulcerosa von Warren und Sommers zudem das Vorkommen einer lokalen Vasculitis dank 19 beobachteter Fälle angedeutet [36].

Ende der 60er Jahre erschienen mehrere angiographische Untersuchungen, deren Ziel die Darstellung der Unterschiede der Colitis ulcerosa zum Morbus Crohn und weniger deren morphologische Charakterisierung war [37-40]. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse waren in Bezug auf die nosologische Differenzierung, die Stadieneinteilung in Früh- und Spätstadium und auch die Bedeutung (primäres oder sekundäres Phänomen) umstritten. Daraufhin folgten mikroangiographische Studien an Operationspräparaten mit dem Hauptanliegen, die bei der Prozedur beobachteten Veränderungen der Vascularisation ausführlich zu schildern [41-44]. Darauf folgend wurde im Jahre 1989 eine neue Theorie durch Wakefield et al. aufgestellt. Diese beschreibt eine bei Morbus Crohn im Gefäßendothel persistierende Maserninfektion als Ursache einer chronisch granulomatösen Vasculitis, der eine durch multifokale Infarkte ausgelöste Ischämie folgt, welche dann wiederum die morphologischen Veränderungen wie beispielsweise

die Epithelnekrose nach sich zieht [33, 45, 46]. Das Endothel, nicht das Epithel, ist demzufolge der primäre Angriffspunkt der Entzündungskette.

Von der Angioarchitektur auf die pathologischen Funktionen zu schließen schien in allen Studienfällen schwierig zu sein, egal welche Herangehensweise gewählt wurde. Aus diesem Grund wurden seit 1966 diverse funktionelle Untersuchungen durchgeführt, ohne eindeutige Ergebnisse zu liefern [47-52].

Darüber hinaus gibt es viele Studien und klinische Beobachtungen, die auf einen pathogenetischen Zusammenhang zwischen der Durchblutung und dem Vorliegen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung hindeuten.

14% aller Morbus Crohn-Erkrankungen treten erst nach dem 60sten Lebensjahr auf [53]. Eine Verschlechterung der gesamten Durchblutung mit zunehmendem Alter ist eine bekannte klinische Erscheinung. Infolgedessen wurde schon vor vielen Jahren der „Alters-Crohn“ mit der Mikrozirkulation verknüpft [53, 54].

Eine Durchblutungsminderung wird ebenfalls mit dem Rauchen assoziiert. Bei rauchenden Morbus Crohn-Patienten wurde wiederholt ein prognostisch ungünstigerer Verlauf beschrieben [55-59]. Diejenigen unter ihnen, denen es für länger als 1 Jahr gelang mit dem Rauchen aufzuhören, hatten eine günstigere Prognose hinsichtlich eines Erkrankungsrezidives im Vergleich zu denjenigen, denen dies nicht gelang. Dieses konnte im Rahmen einer durchgeführten Interventionsstudie belegt werden [60]. Erstaunlicherweise verhält sich die Situation bei der Colitis ulcerosa genau anders herum. Die Inhalation oder Zufuhr von Nikotin über ein Pflaster bedingt eine Verlaufsmilderung der Erkrankung [55, 61-65].

Die Tragweite der Mikrozirkulation bei chronischen entzündlichen Darmerkrankungen wird zusätzlich durch Veröffentlichungen erkennbar, welche durch Heparin-Gaben einen positiven Effekt auf die Colitis-Aktivität bewirkten [66-68]. Eine vorangehend durchgeführte tierexperimentelle Untersuchung demonstrierte gleichermaßen eine günstige Wirkung auf die Colitis durch Heparin-Gabe [69]. Dieser folgte eine weitere Arbeit, welche die vorherig gewonnenen Ergebnisse jedoch nicht bestätigen konnte [70].

Brahme und Lindström berichteten schon im Jahre 1970 über die anatomische Beziehung zwischen Ulceration und mesenterialer Eintrittsstelle der Arterien in die Tunica muscularis bei Morbus Crohn [41]. Diesem Ergebnis wurde nicht viel Aufmerksamkeit geschenkt bis Wakefield et al. dieses Resultat weiter untersuchten und den zuvor beschriebenen Zusammenhang ebenfalls bestätigten [71-73].

Einen weiteren Hinweis auf die potentielle Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogene der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigt der signifikant erhöhte Level von Endothelin, der in homogenisierten Gewebeproben von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten nachgewiesen werden konnte [74-76]. Bei dem Endothelin handelt es sich dabei um den stärksten bekannten vom Gefäßendothel gebildeten Vasokonstriktor. Nach Ansicht der Verfasser der Arbeiten könnte dessen lokale Produktion zu einer intestinalen Ischämie durch Vasokonstriktion führen.

1.2. Zielsetzung und Fragestellung

Trotz zahlreicher Untersuchungen mittels unterschiedlicher Methoden ist der Stellenwert der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nach wie vor unklar.

Um die Bedeutung der Mikrozirkulation für die Ätio-Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen näher zu charakterisieren, wurde in der Arbeitsgruppe ein Colitis-Modell etabliert, an dem intravitalmikroskopische Untersuchungen des mukosalen kapillären Blutflusses im Bereich des Kolons durchgeführt werden können [77].

Bei dem angewandten Modell der TNBS-Colitis kommt es in den ersten 24 Stunden zu einer schweren unspezifischen akuten Entzündung des Rektums und des distalen Kolons, die mit einem tendenziell gesteigerten kapillären Blutfluss einhergeht. Obwohl die Inflammation nach 3 Tagen unverändert fortbesteht, ist die Mikrozirkulation zu diesem Zeitpunkt signifikant vermindert. Nach 15 Tagen ist es histologisch zwar zu einer signifikanten Besserung der Colitis gekommen, es besteht aber immer noch eine mittelgradige akute Inflammation. Daneben lassen sich nunmehr auch Zeichen der chronischen Entzündung, in Form von beispielsweise Granulomen, nachweisen. Interessanterweise hat der kapilläre Blutfluss zu diesem Zeitpunkt den Ausgangswert annähernd wieder erreicht [77].

Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Colitisverlauf u.a. von der (gestörten) Mikrozirkulation abhängig ist. Stimmt diese Hypothese, so müsste auf der anderen Seite eine Besserung der Mikrozirkulation zu einem mildereren Krankheitsverlauf führen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde daher die vorliegende Studie durchgeführt und es wurden in der Frühphase der TNBS-Colitis zwei Substanzen appliziert, die eine direkte Wirkung auf die Mikrozirkulation haben. Dabei handelte es sich zum einen um Endothelin-1, dem stärksten bekannten Vasokonstriktor, und zum anderen um seinen selektiven Antagonisten. Als

Folge dieser Substanzgaben sollte somit eine Verschlechterung bzw. eine Verbesserung der Mikrozirkulation bewirkt werden. Zusätzlich zum kapillären Blutfluss, zur funktionellen Kapillardichte, zur Gefäßpermeabilität und zum Leukozytensticking als Parameter der Mikrozirkulation wurde der Entzündungsgrad der Colitis mittels eines histologischen Colitis-Score's und klinischer Parameter wie Urinausscheidung, Stuhlqualität, Hämatokrit und Gewichtsverlauf erfasst.

Folgende Fragen sollten im Einzelnen beantwortet werden:

1. Welchen Effekt auf die Mikrozirkulation und den Krankheitsverlauf hat die Gabe
 - a.) des hoch potenten Vasokonstriktors Endothelin-1?
 - b.) eines Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten?

2. Welche Parameter der Mikrozirkulation werden jeweils beeinflusst?

3. Sind pathomorphologische Unterschiede nachweisbar?

2. MATERIAL und METHODE

2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten durchgängig männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von $295\text{g} \pm 29\text{g}$. Die Tiere wurden den gesamten Versuch über einzeln in Stoffwechsellkäfigen gehalten und hatten währenddessen freien Zugang zu fester Nahrung (Altromin 1324; Altromin GmbH; Lage) und Trinkwasser.

2.2. TNBS-Colitis-Induktion

Die Induktion der TNBS-Colitis erfolgte modifiziert nach dem in 1989 beschriebenen Protokoll der Arbeitsgruppe um Morris [78]. Nach einer Initialanästhesie mittels Äther (24042; Chinosolfabrik; Seelze) und einer Tiefenanästhesie unter Zuhilfenahme von Rompun[®] (Xylazinhydrochlorid; 0,5ml/kg KG; intramuskulär) und Ketanest[®] (Ketaminhydrochlorid; 0,5ml/kg KG; intramuskulär) wird bei diesem Modell die Colitis durch die einmalige intrarektale Instillation von 0,25ml Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS; P-2297; Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) induziert, welche in 0,25ml reinem Äthanol gelöst ist [78]. Im Anschluss an die intrarektale Applikation wurden die Tiere für 15 Minuten nach Trendelenburg gelagert, um eine Standardisierung der Kontaktzeit zwischen dem verabreichten Agens und der Darmschleimhaut zu erreichen.

2.3. Präparation

Nach der Induktion wurden die Versuchstiere gewogen und deren Halsbereich mit einer Schermaschine rasiert. Im Anschluss an eine quere cervicale Hautinzision, Gefäßdarstellung, Anschlingung des Gefäßes nach proximal und distal mit Seidenfäden und Verknoten der distalen Ligatur erfolgte die quere Venotomie der V. jugularis interna dextra mithilfe einer Mikroschere. In die Veneninzisionsstelle wurde nun vorsichtig ein Katheter (interner \varnothing 0,5mm; B. Braun Melsungen AG; Melsungen) vorgeschoben und mit der distalen Ligatur befestigt. Der Katheter wurde dann von der Halsvorderseite subcutan zum Nacken durchgezogen, durch die Haut ausgeleitet und zum Beißschutz durch eine flexible Stahlscheide gezogen, welche die Tiere nur geringfügig in ihrer Bewegungsfreiheit einschränkte. Das Katheterisieren diente der späteren intravenösen Applikation der Versuchssubstanzen Endothelin-1 (E 7764; Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) und Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist (LU-135252; Knoll AG; Ludwigshafen) (s. Kap. 2.6., Seite 13). Um einem etwaigen Katheterverschluss vorzubeugen und um die allgemeinen Bedingungen konstant zu halten, wurde den Ratten von Beginn der

Induktion an kontinuierlich über 48 Stunden Ringer-Lactat-Lösung (2ml/kg KG/Std.; B. Braun Melsungen AG; Melsungen) infundiert.

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen am Rattenkolon erfolgten nach einem standardisierten Schema. 36 Stunden nach Beginn der Applikation der Testsubstanzen bzw. 48 Stunden nach der Colitisinduktion wurden die Versuchstiere abermals mittels Rompun[®] und Ketanest[®] anästhesiert. Nach erneuter Gewichtskontrolle wurde über die nochmalige Eröffnung des collaren Zugangs neben dem schon vorhandenen Venenkatheter ein weiterer Katheter in die A. carotis communis zur direkten Blutdruckmessung und zur Blutgasanalyse implantiert (s. Kap. 2.8., Seite 15). Hierüber entnommenes Blut wurde ferner zur Bestimmung des Hämatokrits (Htk) verwendet, der als Indikator für die Krankheitsaktivität diente. Über den Venenkatheter wurden im Weiteren die Markersubstanzen zur Intravitalmikroskopie appliziert (s. Kap. 2.4., Seite 8).

Innerhalb des vorweg rasierten Abdomens erfolgte schließlich eine Medianlaparotomie, bei der das distale Kolon atraumatisch im Bereich der avasculären Zone des Mesenteriums mobilisiert und spannungsfrei vor die Bauchdecke auf eine eigens dafür angefertigte Kunststoffschiene ausgelagert wurde. Anschließend erfolgte die antimesenteriale Lumeneröffnung des Kolons in der weitgehend avasculären Zone und die Armierung der Darmwand mittels 4 Prolene-Fäden der Stärke 7/0 zur Fixierung zur Intravitalmikroskopie der Mukosa (Abb. 1, Seite 9).

2.4. Intravitalmikroskopie

Neben der Bestimmung des kapillären Blutflusses unter Zuhilfenahme der Intravitalmikroskopie lassen sich damit auch die funktionelle Kapillardichte, die Gefäßpermeabilität und das so genannte Leukozytensticking als Parameter der Mikrozirkulation untersuchen.

Da die Tests sich zeitlich aufwendig gestalteten, wurden die Tiere zur Stabilisierung und zum Ausschluss von systematischen Fehlern auf eine thermostatisch geregelte Heizmatte gelegt. Diese hielt die durch rektale Messungen überprüfte Körpertemperatur konstant bei einem Sollwert von 37,5°C [79]. Im selben Rahmen wurde darum zum Schutz vor Austrocknung der eröffnete Darmabschnitt mit 37°C warmer Ringer-Lactat-Lösung äquilibriert [79].

Alle intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden für die nachfolgende Offline-Analyse auf Videokassetten (FUJI Super VHS PRO) aufgezeichnet. Auf der folgenden Abbildung 2 (Seite 9) ist der schematische Aufbau der verwendeten intravitalmikroskopischen Untersuchungseinheit dargestellt.



Abb. 1: Präparation zur Untersuchung der mukosalen Mikrozirkulation. Das Colon descendens ist vor die Bauchdecke mobilisiert, antimesenterial eröffnet, mit feinen Fäden armiert und locker aufgespannt (entnommen aus [77]).

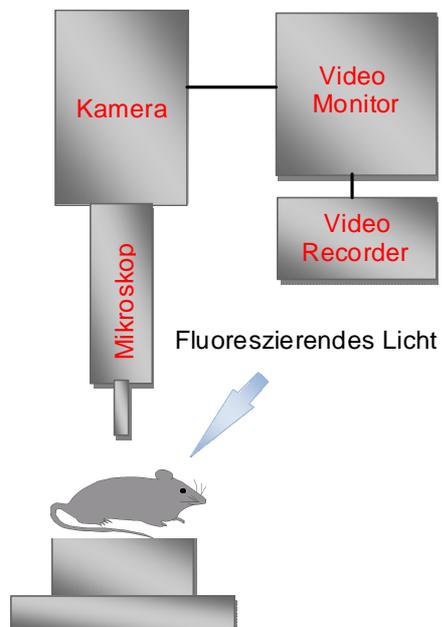


Abb. 2: Der schematische Aufbau eines intravitalmikroskopischen Messplatzes.

2.4.1. Bestimmung des kapillären Blutflusses

Nach Blutentnahme für die arterielle Blutgasanalyse (BGA; ABL-System 625; Radiometer A/S Copenhagen; Kopenhagen; Dänemark) wurden FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierte autologe Erythrozyten (0,05ml/100g KG; FITC; Isomer I; No. F-7250, Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) über den in der V. jugularis interna dextra gelagerten Katheter injiziert. Erst die FITC-Markierung macht die Erythrozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop erkenntlich. Um die vorherig notwendige Färbung der an dieser Stelle verabreichten Erythrozyten zu ermöglichen, mussten diese initial in einem gesonderten Arbeitsgang von gesunden Tieren gewonnen werden, die keiner Versuchsgruppe angehörten. Daraufhin wurden sie nach der von Mithöfer et al. detailliert beschriebenen Methode markiert [79]. 25 Minuten nach Applikation der FITC-markierten Erythrozyten begannen die intravitalmikroskopischen Bestimmungen des kapillären Blutflusses (cbf), um eine gleichmäßige Dispersion derer im Blut des Versuchstieres zu garantieren [79]. Dann wurden die Versuchstiere mit dem vorher präparierten Darm (s. Kap. 2.3., Seite 7) unter das Fluoreszenzmikroskop (Objektiv: Apo 25/0.65 Fluoreszenz; Leitz; Wetzlar) gelegt und es erfolgte die Messung von 10 unterschiedlichen Mukosafeldern des Colon descendens. Die untersuchten Felder konnten dank des mit dem Monitor verbundenen Mikroskops optisch dargestellt werden (Abb. 3, Seite 11). Jedes Feld wurde 1 Minute lang auf einem Videoband zur späteren Auswertung aufgenommen. Zur Bestimmung des Anteils der FITC-markierten Erythrozyten bezogen auf das Volumen (n_{FITC}) wurde den Ratten zum Versuchsende Blut abgenommen. Ein Teil dessen wiederum unterlag einer erneuten BGA-Analyse zwecks Stabilitätskontrolle des Versuchstieres. Die Messdatenauswertung gelang unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Kammer (Neubauer IMPROVED Bright-line; Tiefe 0,100 mm; Superior; Marienfeld). Nach Beendigung der Messungen wurden die 10 aufgezeichneten Mukosafelder einzeln betrachtet, innerhalb jedes Feldes 10 Kapillaren nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und an einem Fixpunkt innerhalb dieses Gefäßes über einen Zeitraum von 1 Minute alle vorbeifließenden, markierten Erythrozyten gezählt. Bei 10 untersuchten Feldern mit jeweils 10 ausgezählten Kapillaren wurden somit 100 Gefäße pro Tier ausgezählt, deren Mittelwert den Wert f_{FITC} (markierte Erythrozyten pro Minute und Kapillare) ergab. Aus dem f_{FITC} und dem dazugehörigen Neubauer-Kammer-Wert konnte sodann der kapilläre Blutfluss eines Tieres nach der von Mithöfer et al. angegebenen Formel ($V_{\text{nl/min/cap}} = f_{\text{FITC}} / (n_{\text{FITC}} \times 0,76)$) kalkuliert werden. Er entspricht dem volumetrischen Blutfluss (V), angegeben in Nanoliter (nl), pro Minute (min) pro Kapillare (cap). Durch Mittelwertbildung des V aller Gruppentiere erhält man den jeweiligen kapillären Gruppenflow [79].

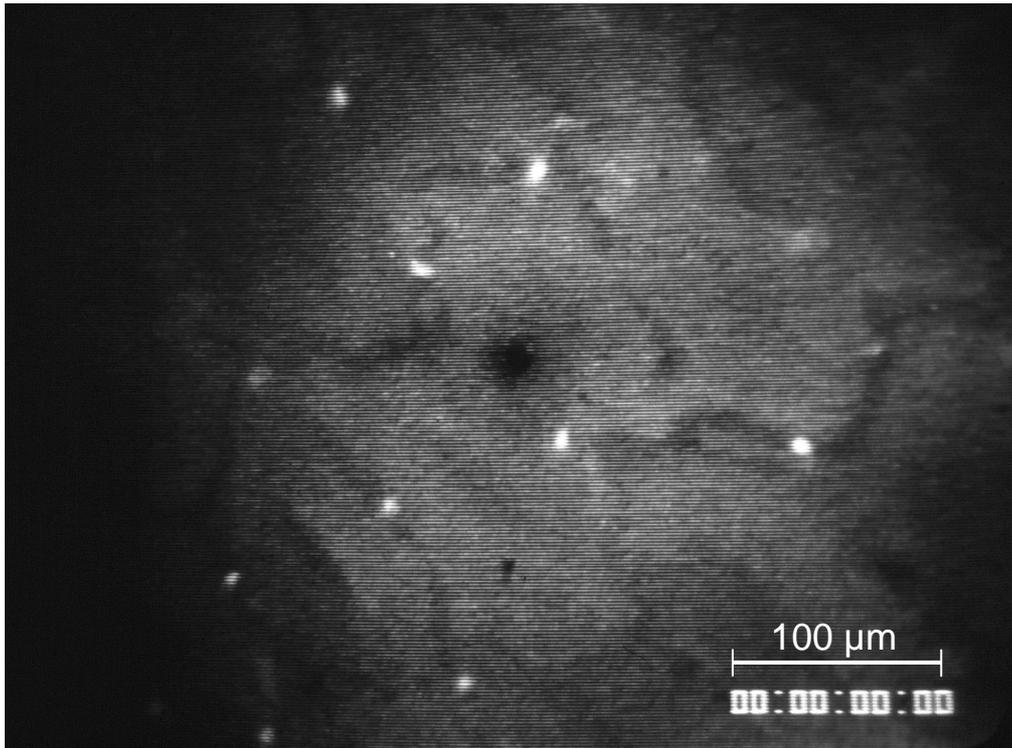


Abb. 3: Intravitalmikroskopische Aufnahme der Kolonmukosa der Ratte zur Bestimmung des kapillären Blutflusses (x320) (entsprechend einem Feld): Die schwarzen, geschlängelten Linien entsprechen den Kapillaren, in denen als weiße Punkte die fluoreszierenden FITC-markierten Erythrozyten zu erkennen sind.

2.4.2. Bestimmung der funktionellen Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte (fKD) ist das Maß der mikrovaskulären Perfusion und gibt die Länge aller durchbluteten Kapillaren innerhalb eines Beobachtungsfeldes in cm/cm^2 an [80].

Unter Anwendung eines speziellen Computerprogramms namens CAP-IMAGE (Version 6.01; Dr. Zeintl; Heidelberg) zur Analyse der funktionellen Kapillardichte erfolgte die Messdatenauswertung anhand der bereits für die Untersuchung des kapillären Blutflusses aufgezeichneten 10 Video-Felder pro Versuchstier [81].

2.4.3. Bestimmung der Gefäßpermeabilität

Unter Gefäßpermeabilität wird die Durchlässigkeit eines Gefäßes für Substanzen verstanden. Sie entspricht der relativen Änderung des perivaskulären Grauwertes (Helligkeit) vom Ausgangswert (in %). Sie wird durch die Verabreichung eines Plasmamarkers namens FITC-Dextran (Fluorescein-Isothiocyanate-Dextran; FD-150S, Molekulargewicht 70.000 Da; Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) determiniert. Zuerst erfolgte die einminütige Referenzmessung eines

Sichtfeldes der Kolonmukosa durch Zufallsauswahl, dann die Injektion von 0,2ml 5% FITC-Dextran i.v.. Um eine gleichmäßige Verteilung des Plasmamarkers zu erlauben, begannen die Videoaufnahmen von 5 wiederum zufällig ausgesuchten Feldern für jeweils 1 Minute (Objektiv: ACHROPLAN 20x/0,50w Ph2; Zeiss, Deutschland) erst nach 30-minütiger Wartezeit [82, 83]. Die nachgestellte Auswertung geschah wiederum unter Verwendung des Computervideoanalyse-system CAP-IMAGE (s. Kap. 2.4.2.). Die ermittelten Ergebnisse wurden mit dem Ausgangswert in Relation gesetzt und der Mittelwert der Gruppe gebildet.

2.4.4. Bestimmung des Leukozytenstickings

Als „Sticker“ wurden Leukozyten definiert, die mindestens 30 Sekunden an einer Stelle der Gefäßwand haften und sich nicht fortbewegen [82, 84, 85]. Die zur Beurteilung notwendige Leukozytenfärbung geschah anhand der i.v.-Gabe von 0,3ml Rhodamine 6G (C.I. 45160; Basic Red 1; Sigma Chemical Co.; St. Louis; USA). Nun wurde 10 Minuten abgewartet um abermals eine gleichmäßige Dispersion zu gewährleisten. Am Messplatz (Abb. 2, Seite 9) wurden hiernach wieder 5 Gesichtsfelder zufällig unter Verwendung des 20x/0,50w Ph2-Objektivs (ACHROPLAN; Zeiss, Deutschland) bestimmt und erneut 1 Minute lang auf Video aufgenommen. Die Anzahl der Leukozytensticker eines Versuchstieres wird in Zellen/mm² angegeben und berechnet sich aus dem Mittelwert der ausgezählten 5 Felder.

2.5. Bestimmung der weiteren Zielparameter

Während sämtlicher Messungen am Intravitalmikroskopischen Messplatz wurden alle Versuchstiere kontinuierlich auf ihre kardiorespiratorische Stabilität hin überprüft, um zufällige wie auch systematische Fehler auszuschließen (s. Ausschlusskriterien, Kap. 2.8., Seite 15). So konnte der arterielle Blutdruck direkt über den an einem Druckwandlermodul (Fa. Hellige GmbH; Freiburg im Breisgau) angeschlossenen in der A. carotis communis liegenden Katheter (s. Kap. 2.3., Seite 7) gemessen werden. Darüber hinaus wurde vor Versuchsbeginn wie auch nach Versuchsende eine arterielle BGA gemacht.

Abgesehen davon wurden der Gewichtsverlauf, der Hämatokrit, die Urinausscheidung und die Änderung der Stuhlqualität als Indikatoren für die Krankheitsaktivität dokumentiert. Vor der Colitisinduktion, wie auch vor der Präparation für die Intravitalmikroskopie, erfolgten daher Gewichtskontrollen der Ratten, um Aussagen über den Verlauf zu erlauben. Des Weiteren wurde vor dem Intravitalmikroskopiebeginn der Hämatokrit bestimmt. Damit eine Beobachtung der

Stuhlqualitätsänderung und die Messung der Diurese erfolgen konnten, wurden die Versuchstiere das gesamte Experiment über einzeln in Stoffwechsellösungen gehalten.

2.6. Versuchsaufbau (Gruppen I-IV)

Zur Beantwortung der Fragestellungen in Kapitel 1.2. auf Seite 6 wurden die Folgen der vasoaktiven Substanzapplikation auf die Parameter der Mikrozirkulation und auf die Erkrankungsschwere der Ratten getestet. Dazu wurden 12 Stunden nach der Colitis-Induktion einerseits Endothelin-1 (E 7764) und andererseits ein Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist (LU-135252) i.v. appliziert.

Als Versuchstiere dienten 64 männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von $295\text{g} \pm 29\text{g}$. Unmittelbar vor der TNBS-Colitis-Induktion erfolgte die Randomisierung in 4 Versuchsgruppen (Gruppen I-IV) mit jeweils 16 Tieren (Tabelle 1, Seite 13).

Gruppen	Gruppenbezeichnung	Gruppenbeschreibung	Anzahl (n)
I	Kontrollgruppe	Gesunde Tiere + Ringer-Lösung i.v.	16
II	Colitisgruppe	TNBS-Colitis + Ringer-Lösung i.v.	16
III	Endothelgruppe	TNBS-Colitis + Endothelin-1 i.v.	16
IV	ET-RA-Gruppe	TNBS-Colitis + Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist i.v.	16

Tabelle 1: Subgruppenbildung (I-IV).

Die Kontrollgruppe (Gruppe I) setzte sich aus gesunden Versuchstieren zusammen, bei denen mittels intrarektaler Kochsalzinjektion (0,5ml 0,9% NaCl-Lösung; B. Braun Melsungen AG; Melsungen) eine Scheininduktion durchgeführt wurde. Über den Venenkatheter erhielten sie kontinuierlich über 48 Stunden, welches der gesamten Versuchsdauer entspricht, Ringer-Lactat-Lösung (2ml/kg KG/Std.) infundiert, um einem etwaigen Katheterverschluss vorzubeugen und um die allgemeinen Bedingungen gegenüber den Gruppen III und IV konstant zu halten. Dasselbe galt auch für die Colitisgruppe (Gruppe II) nach erfolgter Induktion. 12 Stunden nach der Colitis-Induktion wurden den Gruppen III und IV nach bisheriger ausschließlicher Ringer-Lactat-Zufuhr die jeweiligen Testsubstanzen verabreicht. Die Endothelgruppe (Gruppe III) erhielt von da an kontinuierlich über 24 Stunden hin Endothelin-1 (1,25µg/kg KG/Std.) i.v. [83], während der ET-RA-Gruppe (Gruppe IV) der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist LU-135252

(50mg/kg KG) [83, 86-88] in Form eines intravenösen Bolus appliziert wurde. Weitere 12 Stunden später erfolgte bei der Gruppe IV eine erneute Bolusgabe. Zwischen den Bolusgaben und bis zum Ende der Versuchsdauer wurde der ET-RA-Gruppe (Gruppe IV), wie auch der Endothelingruppe (Gruppe III) nach Infusionsende bis zum Versuchsende, zur Standardisierung Ringer-Lactat-Lösung i.v. dargereicht. Insgesamt 48 Stunden nach der Colitis-Induktion begannen die Messungen am intravitalmikroskopischen Messplatz (Abb. 4, Seite 14).

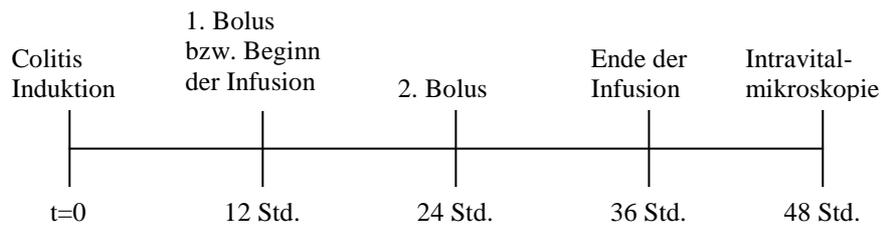


Abb. 4: Schema des Versuchsablaufs der Studie (Gruppen I-IV). (In Anlehnung an [89])

Wegen der damit verbundenen Belastung der Ratten und aus methodischen Gründen konnten die gesamten Untersuchungen nicht an einem einzelnen Versuchstier durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden die Tiere innerhalb aller vier Gruppen nach der zu testenden Substanzapplikation nochmals randomisiert. Die Gruppen I-IV mit jeweils 16 Versuchstieren wurden somit in 2 Untergruppen (Ia-IVa und Ib-IVb) mit je 8 Versuchstieren aufgeteilt (Tabelle 2, Seite 14). Die Tiere der Subgruppen Ia-IVa unterzogen sich den Messungen des kapillären Blutflusses (cbf), der funktionellen Kapillardichte (fKD) und der Gefäßpermeabilität (GPM), die der Subgruppen Ib-IVb andererseits lediglich dem Leukozytensticking (LS).

Zielparameter	Gruppen			
	I	II	III	IV
cbf + fKD + GPM	Ia	IIa	IIIa	IVa
LS	Ib	IIb	IIIb	IVb

Tabelle 2: Randomisierung der Gruppen I-IV (mit jeweils 16 Tieren) in Subgruppen mit entsprechend 8 Tieren (cbf = kapillärer Blutfluss, fKD = funktionelle Kapillardichte, GPM = Gefäßpermeabilität, LS = Leukozytensticking).

2.7. Histologie

Am Ende der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden alle Versuchstiere durch Injektion von 0,3ml T61[®] (Hoechst Roussel Vet. Vertrieb GmbH; Unterschleißheim) eingeschläfert. Im Anschluss wurde das für die Experimente präparierte Darmsegment entnommen und zur weiteren histologischen Untersuchung in 4%-igem Formalin fixiert.

Bereits vor dem Anfang dieser Colitis-Studie wurde in Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Charité - Campus Benjamin Franklin ein histologischer Colitis-Score entwickelt [77]. Dieses geschah zum Zweck der Beurteilung der Colitisexpression nach erfolgter Induktion und zur Analyse des Entzündungsverlaufes. Der Colitis-Score unterscheidet dabei zuerst allgemein zwischen akuten und chronischen Zeichen der Entzündung. Je nach Ausprägung dieser Zeichen vergibt er Punkte für den jeweils vorliegenden Entzündungsgrad. Ein leichtgradiger Entzündungsgrad entspricht 1-4 Punkten, ein mittelgradiger 5-8 Punkten und ein hochgradiger 9-12 Punkten. Dieses gilt für akute wie auch chronische Entzündungszeichen gleichermaßen (Abb. 5, Seite 16). Die histologische Aufarbeitung der Darmpräparate, deren Schnitt, HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) und Auswertung unternahmten zwei verblindete Pathologen des Pathologischen Instituts der Charité - Campus Benjamin Franklin. Beiden war das Versuchsprotokoll unbekannt.

2.8. Ausschlusskriterien

Nur während der intravitalmikroskopischen Untersuchungen kardiorespiratorisch und hämodynamisch stabile Ratten wurden analysiert.

Die im Vorfeld definierten Ausschlusskriterien waren ein systolischer Blutdruck von <80 mm Hg sowie eine (schlechte) BGA mit (1) $pO_2 < 10,6$ kPa (≈ 80 mm Hg) und/oder (2) $pCO_2 > 6,6$ kPa (≈ 50 mm Hg) und/oder (3) $pH < 7,3$ bzw. $> 7,5$ [83, 88].

Versuchstiere, welche keine entsprechende Colitis-Expression aufwiesen (Histologischer Colitis-Score <5), wurden ebenfalls aus der Bewertung genommen.

2.9. Statistik

Sämtliche Zielparameter unterlagen abschließend der statistischen Auswertung mittels Student's T-Test für unabhängige Stichproben. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit <5% wurden als statistisch signifikant angesehen. Alle folgenden Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM (Standard Error of Mean) angegeben.

Abb. 5: Histologischer Colitis-Score (entnommen aus [77])

Akute Entzündungszeichen	Befund	Punkte	
Schleimhautintegrität	Einzelzelluntergang	= 2	
	Erosionen	= 4	
	Floride Ulcerationen	= 6	
Infiltration von neutrophilen Granulozyten in der Lamina propria mucosae	Zellzahl (n) =		
	n = 1-5	= 1	
	n = 6-10	= 2	
	n > 10	= 3	
Kryptitis (Granulozyten in Kryptenepithelien)	Entzündungszellen	= 1	
	Kryptenabszeß	= 2	
Ödem der Mukosa / Submukosa	vorhanden	= 1	
Summe			
Chronische Entzündungszeichen	Befund	Punkte	
Schleimhautumbau	vereinzelt verzweigte Krypten	= 3	
	deutlich veränderte Kryptenarchitektur	= 6	
Rundzellinfiltrate in der Lamina propria mucosae	Zellzahl (n) =		
	n = 0-20	= 0	
	n = 21-40	= 1	
	n = 41-60	= 2	
	n > 60	= 3	
Becherzellen	Untergang	= 1	
Fibrose der Tela submucosa	vorhanden	= 1	
Granulome	vorhanden	= 1	
Summe			

Schweregradeinteilung

akut: keine Entzündung (0)
leichtgradige Entzündung (1-4)
mittelgradige Entzündung (5-8)
hochgradige Entzündung (9-12)

chronisch: keine Entzündung (0)
leichtgradige Entzündung (1-4)
mittelgradige Entzündung (5-8)
hochgradige Entzündung (9-12)

Bei der Auswertung hat zunächst die Sichtung sämtlicher Schnitte zu erfolgen, um wesentliche Befunde nicht zu übersehen. Scheinen die Veränderungen regelmäßig zu sein, so werden 5 Regionen zufällig ausgewählt und ausgezählt. Dazu wird ein Netzmikrometer (10x10/5, 10, d=19mm; Fa. Carl Zeiss Jena GmbH, Best.-Nr. 434008) bei einer Vergrößerung von 40x12,5 verwendet. Es werden jeweils 10 Felder entlang einer Diagonalen von links oben nach rechts unten ausgezählt und addiert. Der Wert (n) wird in die Tabelle eingetragen.

3. ERGEBNISSE

Entsprechend der Versuchsvorlage wurden die Untersuchungen an der Schleimhaut des Colon descendens gemacht. Während des Versuchszeitraumes verstarb kein Tier. Zeichen der kardiorespiratorischen oder hämodynamischen Insuffizienz, die gemäß den Anforderungen in Kapitel 2.8. (Seite 15) einen Ausschluss erforderten, lagen nicht vor. Insgesamt 3 Versuchstiere mussten allerdings aufgrund ungenügender Colitis-Expression (Score <5) aus der Wertung herausgenommen werden.

3.1. Kapillärer Blutfluss der Gruppen Ia-IVa

Die scheininduzierten, gesunden Tiere der Kontrollgruppe Ia zeigen einen kapillären Blutfluss von 2.25 ± 0.02 nl/min/cap. Im Kontrast dazu ist der Flow aller Colitis-Tiere (Gruppen IIa-IVa) signifikant vermindert ($p < 0.01$). Bei der Colitisgruppe IIa (0.62 ± 0.02 nl/min/cap) und bei der Endothelgruppe IIIa (0.68 ± 0.01 nl/min/cap) ist der kapilläre Blutfluss sehr deutlich im Hinblick auf die Kontrollgruppe Ia vermindert. Dem gegenübergestellt bewirkt die Applikation des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten bei der Gruppe IVa (1.85 ± 0.02 nl/min/cap) eine signifikante Verbesserung des Flows ($p < 0.01$) (Abb. 6, Seite 18).

Die Tabelle 3 auf Seite 17 subsumiert die kompletten Einzelwerte aller Versuchstiere, wobei diese Ergebnisse auf den Untersuchungen von insgesamt 2849 Kapillaren basieren.

Versuchsgruppe	Kontrollgruppe Ia n=800 Kapillaren	Colitisgruppe IIa n=650 Kapillaren	Endothelgruppe IIIa n=727 Kapillaren	ET-RA-Gruppe IVa n=672 Kapillaren
Tier 1	1.79 ± 0.02	0.73 ± 0.02	0.57 ± 0.01	1.42 ± 0.02
Tier 2	2.00 ± 0.01	0.98 ± 0.01	0.80 ± 0.02	2.16 ± 0.02
Tier 3	2.17 ± 0.02	Ausschluss	0.61 ± 0.01	2.00 ± 0.01
Tier 4	2.07 ± 0.01	0.70 ± 0.03	0.81 ± 0.01	1.75 ± 0.01
Tier 5	2.53 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.64 ± 0.02	Ausschluss
Tier 6	2.38 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.68 ± 0.01	1.84 ± 0.02
Tier 7	2.40 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.82 ± 0.01	1.92 ± 0.02
Tier 8	2.63 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.48 ± 0.02	1.85 ± 0.02
Gruppenmittelwert	2.25 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.68 ± 0.01	1.85 ± 0.02

Tabelle 3: Einzelwerte und Mittelwerte des kapillären Blutflusses (cbf) mit Standardabweichung (in nl/cap/min) im Bereich der Mukosaschleimhaut des Colon descendens nach 48 Stunden (Gruppen Ia-IVa).

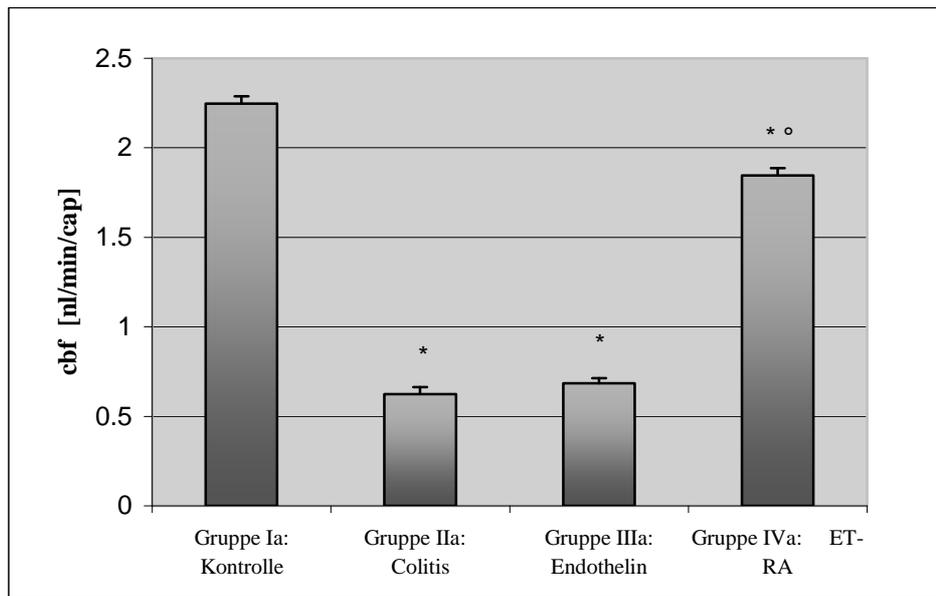


Abb. 6: Der kapilläre Blutfluss (cbf) der Gruppen Ia-IVa.

* = $p < 0.01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ia).

° = $p < 0.01$ im Vergleich zur Colitisgruppe (IIa).

3.2. Funktionelle Kapillardichte der Gruppen Ia-IVa

Die Resultate der funktionellen Kapillardichte entsprechen in etwa denen des kapillären Blutflusses. Im Vergleich zu den gesunden Tieren der Gruppe Ia mit einer fKD von $390 \pm 3 \text{ cm/cm}^2$ ist die Dichte der funktionellen Kapillaren bei allen anderen Versuchstieren nach Colitis-Induktion (Gruppen IIa-IVa) signifikant vermindert ($p < 0.01$). Nach Applikation des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten der Gruppe IVa ist ihr Wert im Vergleich zur Colitisgruppe IIa mit $240 \pm 8 \text{ cm/cm}^2$ signifikant erhöht ($p < 0.01$, Abb. 7, Seite 19). Zwischen der Colitisgruppe IIa und der Endothelingrouppe IIIa liegt kein deutlicher Unterschied vor (IIa: $106 \pm 8 \text{ cm/cm}^2$ im Vergleich zu IIIa: $90 \pm 4 \text{ cm/cm}^2$). Die Tabelle 4 auf Seite 19 zeigt eine Aufstellung der Einzelwerte der 300 ausgewerteten Felder.

Versuchsgruppe	Kontrollgruppe Ia n=80 Felder	Colitisgruppe IIa n=70 Felder	Endothelgruppe IIIa n=80 Felder	ET-RA-Gruppe IVa n=70 Felder
Tier 1	399 ± 2	84 ± 9	71 ± 4	208 ± 8
Tier 2	382 ± 3	97 ± 7	86 ± 4	305 ± 9
Tier 3	388 ± 3	Ausschluss	74 ± 3	273 ± 7
Tier 4	397 ± 3	80 ± 9	88 ± 5	111 ± 9
Tier 5	381 ± 4	120 ± 8	92 ± 6	Ausschluss
Tier 6	394 ± 3	132 ± 8	102 ± 3	250 ± 7
Tier 7	396 ± 2	70 ± 6	123 ± 4	308 ± 8
Tier 8	382 ± 3	162 ± 9	87 ± 4	228 ± 8
Gruppenmittelwert	390 ± 3	106 ± 8	90 ± 4	240 ± 8

Tabelle 4: Einzelwerte und Mittelwerte der funktionellen Kapillardichte (fKD) mit Standardabweichung (in nl/cap/min) im Bereich der Mukosaschleimhaut des Colon descendens nach 48 Stunden (Gruppen Ia-IVa).

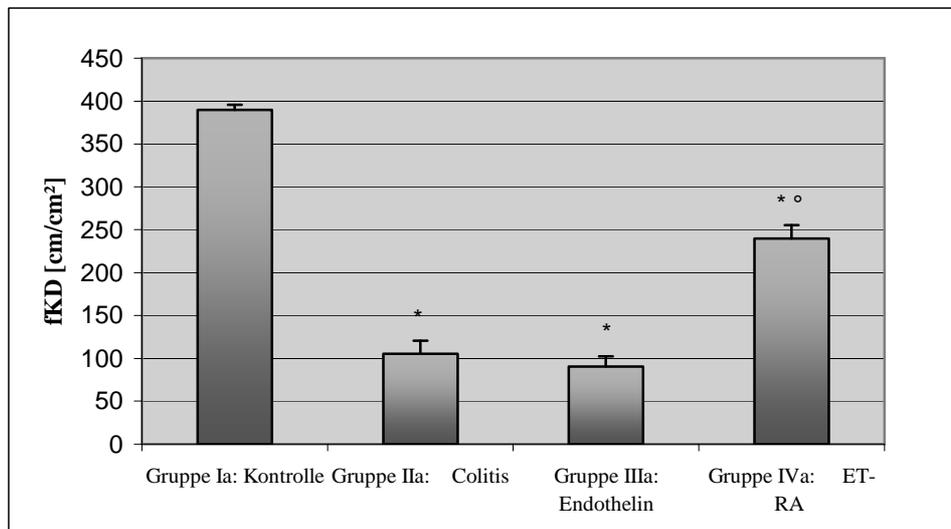


Abb. 7: Die funktionelle Kapillardichte (fKD) der Gruppen Ia-IVa.

* = $p < 0.01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ia).

° = $p < 0.01$ im Vergleich zur Colitisgruppe (IIa).

3.3. Gefäßpermeabilität der Gruppen Ia-IVa

Der Ausgangswert der Gefäßpermeabilität liegt bei 100%. Bei der Kontrollgruppe Ia sinkt der Wert auf $79 \pm 5\%$ ab. Dieses ist ein Ausdruck der fehlenden Permeabilität für die innerhalb dieser Studie verwendeten Dextrane mit einer Molekularmasse von 70.000 Da. Im Gegensatz dazu weisen alle Colitisgruppen (IIa-IVa) einen signifikanten Anstieg der Gefäßpermeabilität auf ($p < 0.01$). Die Ergebnisse der Colitisgruppe IIa und der Endothelgruppe IIIa sind sich dabei ähnlich (IIa: $329 \pm 8\%$ und IIIa: $315 \pm 6\%$). Die Gefäßpermeabilität der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonistengruppe IVa ist mit $125 \pm 6\%$ im Vergleich zur Colitisgruppe IIa signifikant reduziert ($p < 0.01$, Abb. 8, Seite 21). Den Ergebnissen in Tabelle 5 auf Seite 20 liegt die Auswertung von insgesamt 150 Feldern zu Grunde.

Versuchsgruppe	Kontrollgruppe Ia n=40 Felder	Colitisgruppe IIa n=35 Felder	Endothelgruppe IIIa n=40 Felder	ET-RA-Gruppe IVa n=35 Felder
Tier 1	54 ± 5	287 ± 9	290 ± 7	96 ± 7
Tier 2	74 ± 4	280 ± 9	325 ± 6	121 ± 6
Tier 3	98 ± 5	Ausschluss	357 ± 6	113 ± 5
Tier 4	78 ± 4	293 ± 7	317 ± 6	138 ± 5
Tier 5	66 ± 5	310 ± 7	397 ± 8	Ausschluss
Tier 6	101 ± 5	422 ± 8	248 ± 6	142 ± 6
Tier 7	109 ± 62	467 ± 8	330 ± 6	154 ± 7
Tier 8	55 ± 6	256 ± 8	255 ± 6	112 ± 6
Gruppenmittelwert	79 ± 5	329 ± 8	315 ± 6	125 ± 6

Tabelle 5: Einzelwerte und Mittelwerte der Gefäßpermeabilität (GPM) mit Standardabweichung (in nl/cap/min) im Bereich der Mukosaschleimhaut des Colon descendens nach 48 Stunden (Gruppen Ia-IVa).

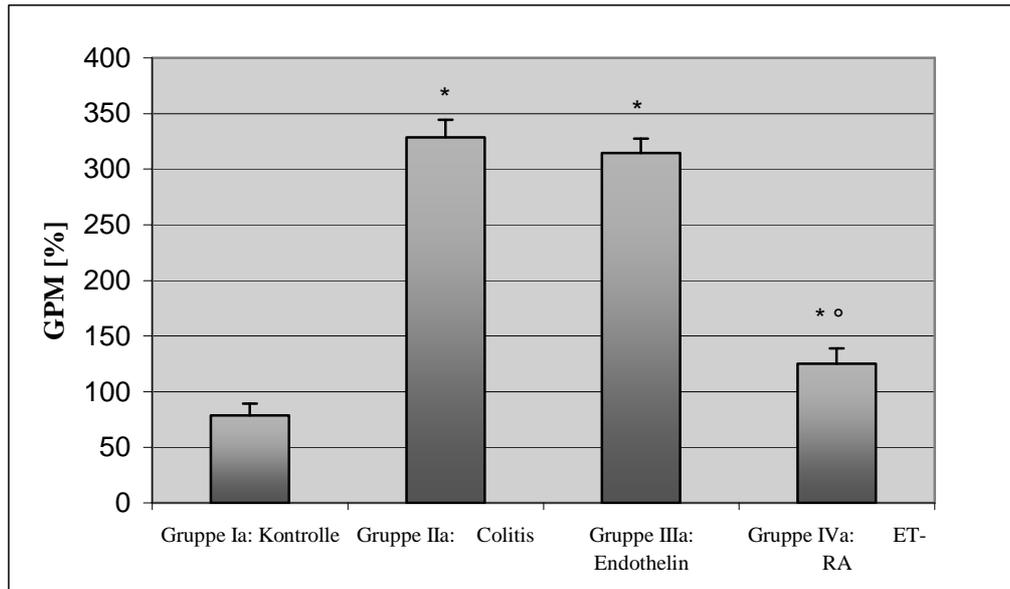


Abb. 8: Die Gefäßpermeabilität (GPM) der Gruppen Ia-IVa.

* = $p < 0.01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ia).

° = $p < 0.01$ im Vergleich zur Colitisgruppe (IIa).

3.4. Leukozytensticking der Gruppen Ib-IVb

Die Ergebnisse des Leukozytenstickings sind mit denen der Gefäßpermeabilität vergleichbar. Sind die Tiere wie bei der Kontrollgruppe Ib gesund, so tritt die Erscheinung des Leukozytenstickings fast nicht auf (0.4 ± 0.2 Zellen/ mm^2). Das Gegenteil ist bei jedem Colitis-Tier der Gruppen IIb-IVb zu beobachten. Bei allen ist ein signifikanter Anstieg ($p < 0.01$) des Leukozytenstickings im Vergleich zur Kontrollgruppe Ib zu verzeichnen, wobei auch in diesem Fall wieder nur eine geringe Differenz zwischen der Colitisgruppe IIb und der Endothelingrouppe IIIb zu erkennen ist (IIb: 52.2 ± 4.9 Zellen/ mm^2 gegenüber IIIb: 48.7 ± 5.0 Zellen/ mm^2). Das Leukozytensticking nimmt bei Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gabe (Gruppe IVb) mit 17.2 ± 1.4 Zellen/ mm^2 im Unterschied zur Colitisgruppe IIb mit 52.2 ± 4.9 Zellen/ mm^2 signifikant ab ($p < 0.01$, Abb. 9, Seite 22). Es wurden 155 Felder ausgezählt. Die Einzelwerte sind in Tabelle 6 auf Seite 22 zusammengefasst.

Versuchsgruppe	Kontrollgruppe Ib n=40 Felder	Colitisgruppe IIb n=40 Felder	Endothelgruppe IIIb n=40 Felder	ET-RA-Gruppe IVb n=35 Felder
Tier 1	0.4 ± 0.1	50.6 ± 5.3	69.8 ± 5.3	15.4 ± 1.9
Tier 2	0.6 ± 0.2	80.6 ± 4.5	51.8 ± 4.7	12.8 ± 1.8
Tier 3	0.7 ± 0.3	58.9 ± 6.4	16.6 ± 5.9	Ausschluss
Tier 4	0.6 ± 0.2	62.7 ± 4.6	26.9 ± 4.5	17.9 ± 1.0
Tier 5	0.2 ± 0.2	13.9 ± 3.9	33.3 ± 4.6	14.1 ± 1.6
Tier 6	0.5 ± 0.2	61.4 ± 4.7	59.5 ± 5.0	23.2 ± 1.3
Tier 7	0.2 ± 0.2	46.1 ± 5.7	48.6 ± 5.4	19.8 ± 1.1
Tier 8	0.3 ± 0.2	43.5 ± 4.3	81.9 ± 4.6	17.2 ± 1.1
Gruppenmittelwert	0.4 ± 0.2	52.2 ± 4.9	48.7 ± 5.0	17.2 ± 1.4

Tabelle 6: Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des Leukozytenstickings (LS) im Bereich der Mukosa des distalen Kolons nach 48 Stunden (Gruppen Ib-IVb).

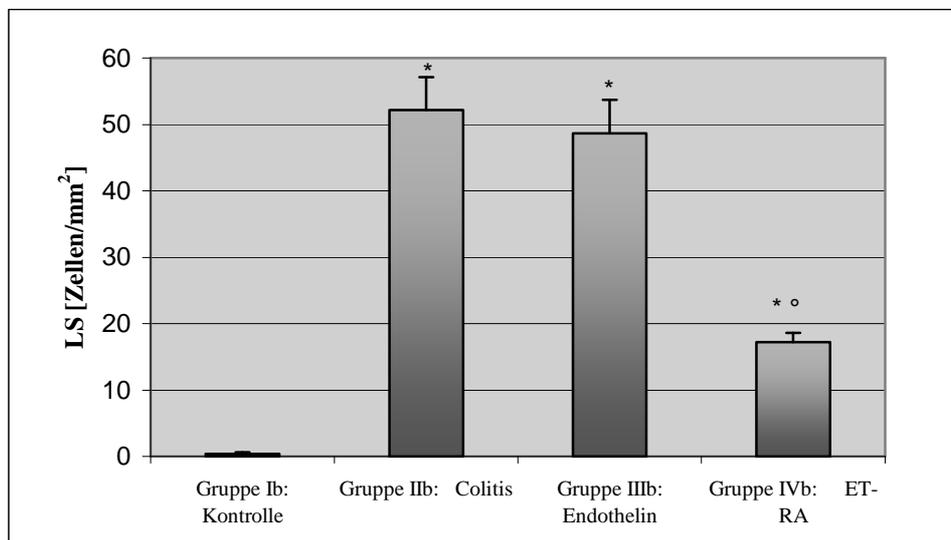


Abb. 9: Das Leukozytensticking (LS) der Gruppen Ib-IVb.

* = $p < 0.01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ib).

° = $p < 0.01$ im Vergleich zur Colitisgruppe (IIb).

3.5. Gewichtsverlauf der Gruppen I-IV

Bis zum Untersuchungszeitpunkt nehmen die Kontrolltiere (Gruppe I) generell an Gewicht zu ($1.6 \pm 0.4\%$). Dem gegenübergestellt verlieren die Colitis-Tiere der Gruppen II-IV ausnahmslos und signifikant an Gewicht ($p < 0.01$). Besonders drastisch ist die Abnahme bei der Colitisgruppe II ($-12.8 \pm 1.1\%$) und der Endothelgruppe III ($-10.8 \pm 1.2\%$). Weniger stark ist das bei der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe IV ($-8.2 \pm 0.8\%$) der Fall, während die Differenz zur Colitisgruppe II signifikant ist ($p < 0.01$, Abb. 10, Seite 24). In Tabelle 7 auf Seite 23 werden die Einzelwerte zusammengefasst. Bei drei Versuchstierausschlüssen wurden hierfür und für alle weiteren Zielparameter 61 der ursprünglich 64 Tiere ausgewertet.

Versuchsgruppe	Kontrollgruppe I n=16 Tiere	Colitisgruppe II n=15 Tiere	Endothelgruppe III n=16 Tiere	ET-RA-Gruppe IV n=14 Tiere
Tier 1	2.4	-14.3	-9.3	-9.1
Tier 2	1.1	-11.3	-11.3	-8.8
Tier 3	0.9	Ausschluss	-9.8	-7.9
Tier 4	1.8	-12.1	-10.1	-8.1
Tier 5	2.0	-11.7	-10.4	Ausschluss
Tier 6	1.5	-11.6	-11.2	-6.9
Tier 7	1.4	-13.4	-12.1	-8.7
Tier 8	1.9	-12.3	-13.4	-9.2
Tier 9	1.1	-14.0	-10.2	-8.8
Tier 10	0.9	-13.8	-9.2	-7.3
Tier 11	1.7	-12.7	-11.9	Ausschluss
Tier 12	1.5	-13.6	-10.3	-7.5
Tier 13	1.6	-11.5	-10.6	-6.9
Tier 14	1.7	-12.5	-11.4	-8.9
Tier 15	1.8	-11.9	-9.9	-9.2
Tier 16	1.7	-14.6	-12.4	-7.8
Gruppenmittelwert	1.6 ± 0.4	-12.8 ± 1.1	-10.8 ± 1.2	-8.2 ± 0.8

Tabelle 7: Einzelwerte und Mittelwerte des Gewichtsverlaufes mit Standardabweichung innerhalb von 48 Stunden (Gruppen I-IV).

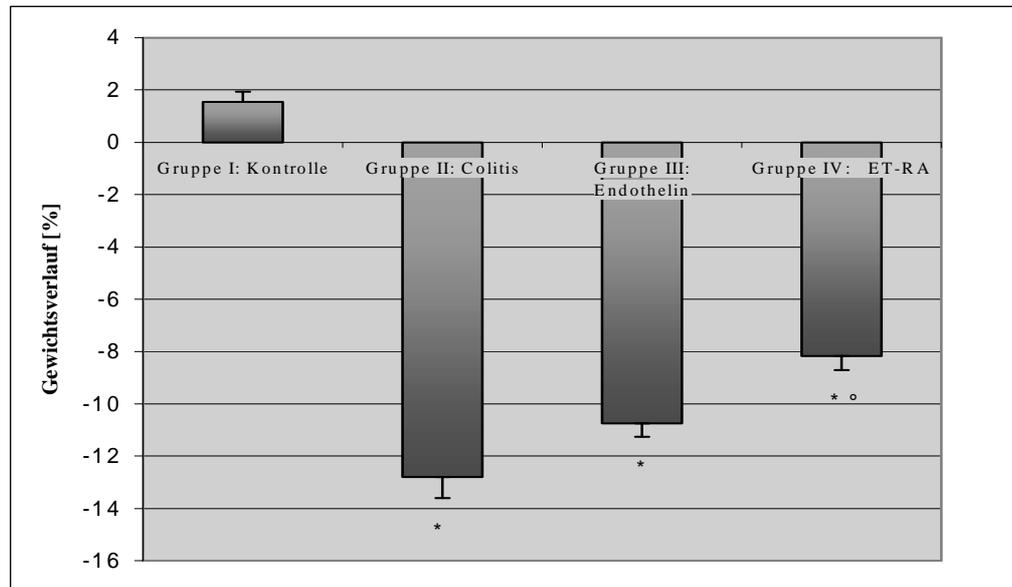


Abb. 10: Der Gewichtsverlauf der Gruppen I-IV.
 * = $p < 0.01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (I).
 ° = $p < 0.01$ im Vergleich zur Colitisgruppe (II).

3.6. Hämatokrit der Gruppen I-IV

Der Hämatokrit der gesunden Kontrolltiergruppe I liegt bei $45.8 \pm 2.0\%$. Die Ratten der Endothelingupe III bieten einen leicht angestiegenen, dennoch nicht signifikanten Hämatokrit dar ($46.6 \pm 2.5\%$), gemessen an den Kontrollen. Zum anderen ist dieser bei den Versuchstieren der Colitisgruppe (II) mit $48.8 \pm 2.0\%$ signifikant erhöht ($p < 0.01$). Auffällig ist der Hämatokritlevel der Tiere der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (IV). Er liegt bei $39.0 \pm 2.8\%$ und ist damit im Vergleich zur Kontrollgruppe I ebenso wie zur Colitisgruppe II signifikant erniedrigt ($p < 0.01$, Abb. 11, Seite 25). Die entsprechenden Einzelwerte sind in der Tabelle 8 auf Seite 25 angeordnet.

Versuchsgruppe	Kontrollgruppe I n=16 Tiere	Colitisgruppe II n=15 Tiere	Endothelgruppe III n=16 Tiere	ET-RA-Gruppe IV n=14 Tiere
Tier 1	44	49	45	35
Tier 2	47	53	44	38
Tier 3	42	Ausschluss	46	39
Tier 4	47	50	47	40
Tier 5	44	51	49	Ausschluss
Tier 6	42	48	46	38
Tier 7	45	48	47	40
Tier 8	48	50	50	45
Tier 9	47	46	45	42
Tier 10	47	47	50	37
Tier 11	45	47	44	Ausschluss
Tier 12	49	49	51	42
Tier 13	45	47	43	36
Tier 14	47	52	44	40
Tier 15	47	48	46	36
Tier 16	47	47	48	38
Gruppenmittelwert	45.8 ± 2.0	48.8 ± 2.0	46.6 ± 2.5	39.0 ± 2.8

Tabelle 8: Einzelwerte und Mittelwerte des Hämatokrits mit Standardabweichung nach 48 Stunden (Gruppen I-IV).

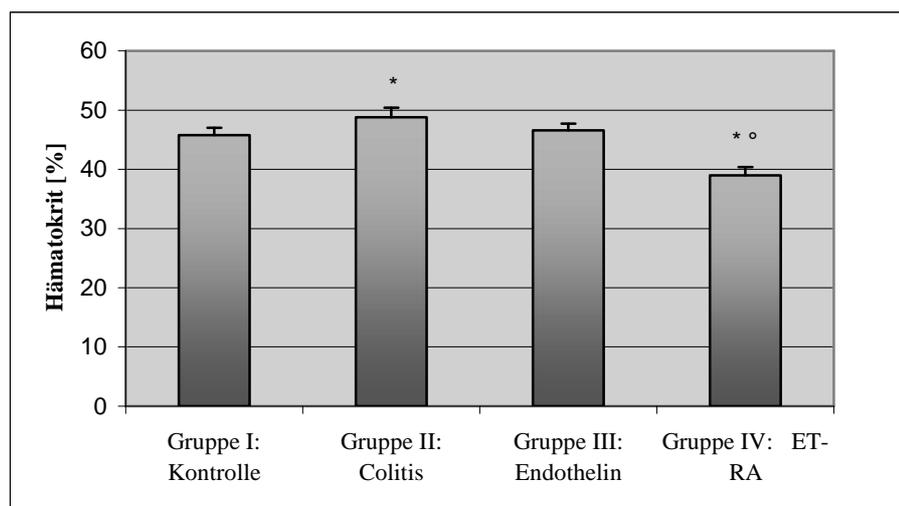


Abb. 11: Der Hämatokrit der Gruppen I-IV.

* = $p < 0.01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (I).

° = $p < 0.01$ im Vergleich zur Colitisgruppe (II).

3.7. Urinausscheidung der Gruppen I-IV

Die Kontrolltiere (Gruppe I) scheiden in dem Untersuchungszeitraum von 48 Stunden 22.3 ± 1.0 ml Urin aus. Die Diurese der Colitisgruppe (II) ist mit derjenigen der Endothelgruppe vergleichbar (II: 12.4 ± 1.3 ml vs. III: 14.5 ± 1.0 ml), sie ist gegenüber der Kontrollgruppe (I) signifikant vermindert ($p < 0.01$). Nach Gabe des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten (Gruppe IV) kommt es sowohl gegenüber der Kontrollgruppe (I) als auch gegenüber der Colitisgruppe (II) zu einer signifikanten Steigerung der Urinmenge (IV: 33.2 ± 1.8 ml, $p < 0.01$) (Abb. 12, Seite 27). In Tabelle 9 auf Seite 26 sind die Einzelergebnisse aufgeführt.

Versuchsgruppe	Kontrollgruppe I n=16 Tiere	Colitisgruppe II n=15 Tiere	Endothelgruppe III n=16 Tiere	ET-RA-Gruppe IV n=14 Tiere
Tier 1	22.4	12.4	14.3	35.0
Tier 2	21.9	13.1	16.2	32.2
Tier 3	23.2	Ausschluss	13.5	36.4
Tier 4	21.6	10.2	11.9	34.2
Tier 5	21.7	11.4	15.4	Ausschluss
Tier 6	23.1	13.5	14.6	32.6
Tier 7	21.4	14.0	13.9	32.9
Tier 8	23.6	14.2	14.1	31.9
Tier 9	21.7	12.7	15.1	32.5
Tier 10	22.4	11.4	15.5	31.7
Tier 11	22.6	10.8	14.4	Ausschluss
Tier 12	24.3	11.2	14.7	35.2
Tier 13	21.4	13.2	15.1	31.2
Tier 14	21.0	14.3	14.3	30.9
Tier 15	23.3	12.7	14.1	35.9
Tier 16	21.1	11.3	14.9	31.8
Gruppenmittelwert	22.3 ± 1.0	12.4 ± 1.3	14.5 ± 1.0	33.2 ± 1.8

Tabelle 9: Einzelwerte und Mittelwerte der Diurese mit Standardabweichung innerhalb von 48 Stunden (Gruppen I-IV).

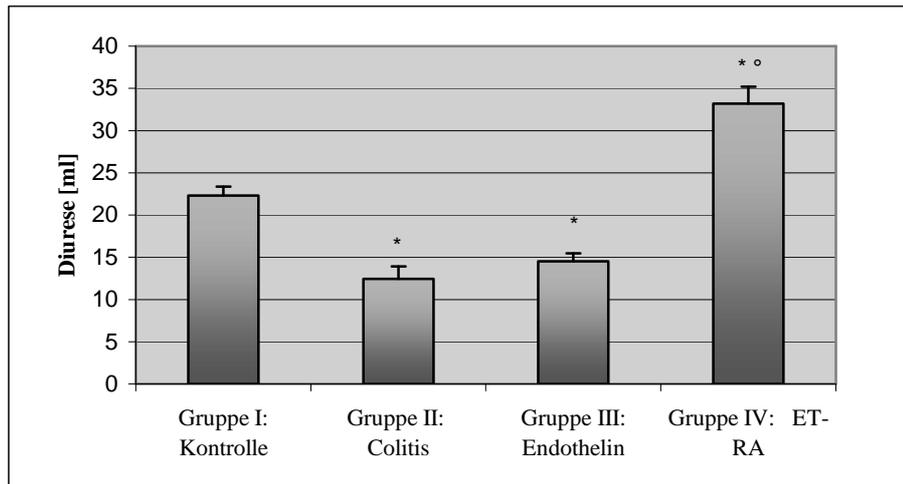


Abb. 12: Die Diuresis der Gruppen I-IV.

* = $p < 0.01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (I).

° = $p < 0.01$ im Vergleich zur Colitisgruppe (II).

3.8. Stuhlqualität der Gruppen I-IV

Der Stuhl gesunder Ratten (Gruppe I) ist fest und geformt, der der Colitistiere der Gruppe II und der Endothelingupe III demgegenüber wässrig und ungeformt. Dieses entspricht dem Bild einer floriden Diarrhoe. Im Gegensatz dazu ist der Stuhl der Versuchstiere nach Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gabe (Gruppe IV) teilweise geformt und weicher als bei den Kontrolltieren (I).

3.9. Histologie der Gruppen I-IV

48 Stunden nach der Colitis-Induktion zeigen sämtliche kranken Versuchstiere mit Colitis-Expression (Gruppen II-IV) zum Versuchsende das histologische Bild einer hochgradigen akuten Entzündungsreaktion mit floriden Schleimhautulcerationen, Kryptenabszessen, massenhafter Infiltration von neutrophilen Granulozyten in der Lamina propria mucosae und einem ausgedehnten Submukosaödem (Abb. 14, Seite 29). Beurteilt nach dem im Kapitel 2.7. auf Seite 15 beschriebenen histologischen Score ist dieser bei allen Colitisgruppen (II-IV) im Hinblick auf die Kontrollgruppe I signifikant erhöht ($p < 0.01$). Die Scorewerte stellen sich wie gefolgt dar: I: 0.1 ± 0.3 , II: 9.8 ± 0.9 , III: 10.3 ± 0.9 , IV: 9.3 ± 0.8 . Werden die Colitisgruppen (II-VI) untereinander verglichen, so zeigen sich nur minimale, nicht signifikante Abweichungen der Messwerte (Abb. 13, Seite 28). Die Tabelle 10 auf Seite 28 fasst die dazugehörigen Einzelwerte zusammen.

Versuchsgruppe	Kontrollgruppe I n=16 Tiere	Colitisgruppe II n=15 Tiere	Endothelgruppe III n=16 Tiere	ET-RA-Gruppe IV n=14 Tiere
Tier 1	0	10	10	10
Tier 2	0	10	9	9
Tier 3	0	Ausschluss	9	9
Tier 4	1	11	11	10
Tier 5	0	9	10	Ausschluss
Tier 6	0	9	10	11
Tier 7	0	11	11	8
Tier 8	0	11	11	9
Tier 9	0	9	9	10
Tier 10	0	10	11	9
Tier 11	0	9	11	Ausschluss
Tier 12	1	11	10	8
Tier 13	0	10	11	9
Tier 14	0	9	12	9
Tier 15	0	9	10	9
Tier 16	0	9	10	10
Gruppenmittelwert	0.1 ± 0.3	9.8 ± 0.9	10.3 ± 0.9	9.3 ± 0.8

Tabelle 10: Einzelwerte und Mittelwerte des histologischen Entzündungsgrades mit Standardabweichung (Score) nach 48 Stunden (Gruppen I-IV).

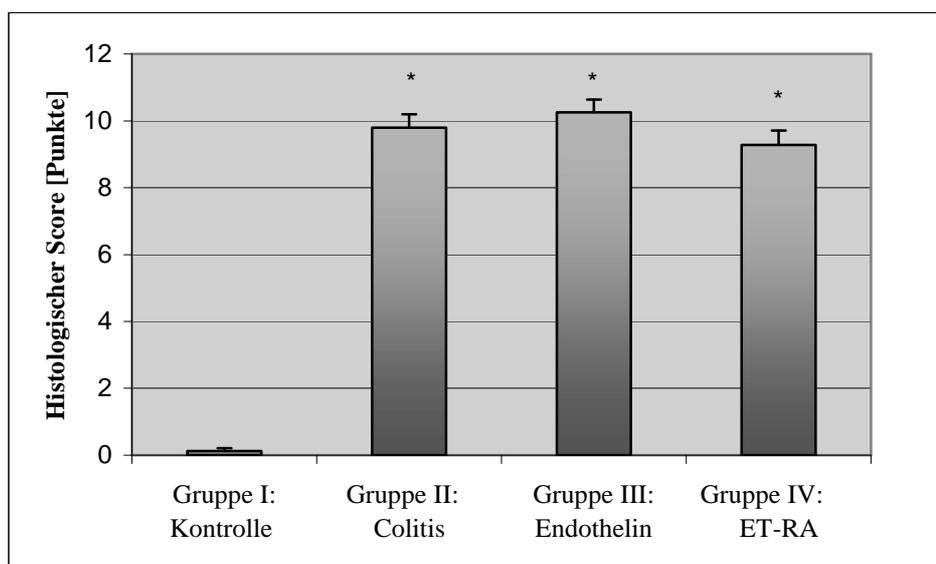


Abb. 13: Der histologische Entzündungsgrad der Gruppen I-IV nach dem Colitis-Score. * = $p < 0.01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (I).

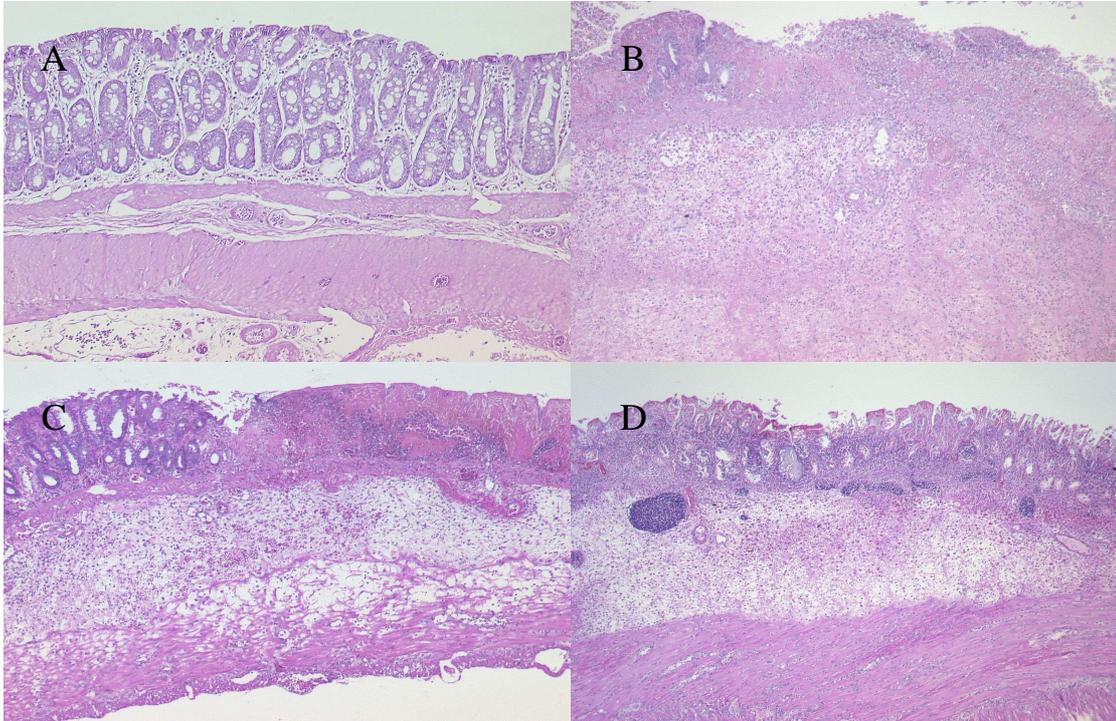


Abb. 14: Histologisches Bild bei TNBS-Colitis des Colon descendens 48 Stunden nach Induktion. Im Vergleich zu dem eines gesunden Kontrolltieres (A) zeigen die Bilder von Colitis-Tieren (B, C und D) eine hochgradige akute Entzündung mit uniformem Bild: floride Schleimhautulceration bzw. -erosion, Infiltration von Granulozyten, Zerstörung der Lamina muscularis mucosae, aktivierte Lymphfollikel (D) und massives Submukosaödem.

- (A) Kontrollgruppe I (HE-Färbung, x100)
- (B) Colitisgruppe II (HE-Färbung, x100)
- (C) Endothelgruppe III (HE-Färbung, x40)
- (D) ET-RA-Gruppe IV (HE-Färbung, x40)

4. DISKUSSION

4.1. Ätio-Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Trotz intensiver Bemühungen zur Erforschung der Ätio-Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, konnte diese noch immer nicht eindeutig entschlüsselt werden. Unterdessen scheint der Einfluss von genetischen Faktoren, immunologischen Mechanismen und Umwelteinflüssen eine besonders starke Rolle in deren Entstehung zu spielen. Vermutlich lösen infektiöse und/oder exogene Faktoren den Ausbruch der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen aus oder beeinflussen zumindest den Verlauf ihrer Pathogenese. In dieser Hinsicht wird die Gewebeschädigung durch die dann auftretenden immunologischen Abläufe eingeleitet. Über die Wichtigkeit einer genetischen Veranlagung im Bezug auf die Entwicklung der Erkrankungen besteht allgemeiner Konsens [90].

Trotz mittlerweile wachsendem wissenschaftlichen Verständnis der immunologischen Abläufe in der Darmschleimhaut und der damit verbundenen Entwicklung von neuen Therapiemöglichkeiten wie beispielsweise Infliximab (anti-TNF α) haben auch diese ein unübersehbares Nebenwirkungsprofil [91-94]. Aufgrund der unzureichenden Kenntnis der Ätio-Pathogenese gibt es bis heute noch keine wirklich spezifische Therapie. Alle bisher verfügbaren Therapiemöglichkeiten, ob bewährt oder neu, haben mitunter folgenreiche Nebenwirkungen [12, 13, 93]. Die weiterführende Forschung zum Zweck der Herstellung besserer, spezifischerer Therapieformen mit weniger starken Nebenwirkungen ist somit unerlässlich.

Auf der Suche danach wird wiederholt die Mikrozirkulation und deren Einfluss auf den Verlauf der Pathogenese bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen betrachtet. Im Falle der Vermutungsbestätigung eines solchen Effektes könnten dann darauf basierend neue und möglicherweise besser verträgliche Therapieoptionen entwickelt werden.

4.1.1. Die Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Trotz zahlreicher morphologischer und funktioneller Untersuchungen ist der Stellenwert der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unklar und weiterhin in der Diskussion (Übersicht [95, 96]).

Neben diesen Untersuchungen gibt es verschiedene klinische Beobachtungen, die als Hinweis auf eine pathogenetische Bedeutung der Durchblutung bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen interpretiert werden.

Seit längerer Zeit wird die Mikrozirkulation mit dem Vorkommen eines „Alters-Crohn“ nach dem 60. Lebensjahrs in Verbindung gebracht [53, 54]. Die Arbeitsgruppe um Fürst et al. analysierte Morbus Crohn-Resektate. Diese wurden bei Operationen von Patienten entnommen, welche 65 Jahre oder älter waren. Dabei konnten bei 80% der Resektate Veränderungen der Wandstruktur kleinerer Gefäße sowie eine Neigung zur Einblutung und/oder Thrombose nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen einer vorliegenden Ischämie und der Pathogenese des „Alters-Crohn“ abgeleitet [53].

Einig ist man sich bezüglich rauchender Morbus Crohn-Patienten und dem Auftreten eines ungünstigeren Krankheitsverlaufs. Die Zufuhr von Nikotin scheint im Zuge dessen eine Durchblutungsminderung des Darms nach sich zu ziehen, gefolgt von Exazerbationen [55-58, 60]. Bei der Colitis ulcerosa verhält es sich erstaunlicherweise andersherum. Die Zufuhr des Nikotins durch Inhalation oder Pflaster bedingt hier eine Milderung des Erkrankungsverlaufs [55, 61, 63-65].

Darüber hinaus scheint die Heparin-Gabe durch direkte Wirkung auf die Mikrozirkulation einen positiven Einfluss auf den Erkrankungsverlauf bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu haben. Dieses unterstützt die Zusammenhangshypothese zwischen der Mikrozirkulation und den chronischen entzündlichen Darmerkrankungen [66-69].

Außerdem erfährt die Vascularisation durch Arbeiten, die eine Assoziation zwischen mesenterialer Eintrittsstelle der Arterien in die Tunica muscularis und den Ulcera hergestellten, einen bedeutsamen Stellenwert [41, 71-73]. Die die mesenteriale Schleimhaut versorgenden Vasae rectae breves des terminalen Ileums stellen nach Annahme der Arbeitsgruppe um Anthony et al. funktionelle Endarterien dar. Kommt es nun zu einer Ischämie, so ist folglich dieser Bereich hauptsächlich betroffen und erklärt somit das Vorkommen der Ulcerationen im Bereich des Mesenterialansatzes [71].

Zu guter Letzt wurden in homogenisierten Biopsien von an Morbus Crohn und Colitis ulcerosa erkrankten Patienten signifikant angestiegene Level des Vasokonstriktors Endothelin festgestellt. Dessen lokale Produktion könnte durch Vasokonstriktion eine intestinale Ischämie bewirken, welche für die Pathogenese und den Erkrankungsverlauf der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von Bedeutung wäre [74-76].

4.1.2. Tierexperimentelle Untersuchungen der Mikrozirkulation

Bis zum jetzigen Zeitpunkt stehen noch immer systematische Untersuchungen der pathogenetischen Relevanz der Mikrozirkulation bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen aus.

Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe zunächst an gesunden Tieren die Intravitalmikroskopie des Rattenkolons etabliert und diese Kenntnisse auf Colitis-Modelle übertragen. Dadurch konnte eine Charakterisierung verschiedener Modelle erfolgen [77]. Infolgedessen wurden die Voraussetzungen für weiterführende Untersuchungen zur pathogenetischen Bedeutung sowie zur Evaluation alternativer Therapieoptionen geschaffen.

4.2. Material und Methode

4.2.1. Die Methodik der Intravitalmikroskopie - Parameter der Mikrozirkulation

Die Intravitalmikroskopie ist bislang die unübertroffene Methode zur Studie der Mikrozirkulation [79, 97]. Sie ermöglicht eine Untersuchung des kapillären Blutflusses, des Leukozytenstickings und unter Zuhilfenahme eines speziellen Computerprogramms zur Datenauswertung sogar die der Gefäßpermeabilität und der funktionellen Kapillardichte [81]. Bei allen handelt es sich um Parameter der Mikrozirkulation. Die gesamten Messungen wurden vorerst auf Videokassetten aufgenommen, um nach Beendigung der Versuche analysiert werden zu können. Dabei wurde die Methode nach Mithöfer et al. zur Bewertung des kapillären Blutflusses verwendet [79]. Bedingt durch die hierdurch gewonnene große Menge an ausgezählten Kapillaren fällt der SEM (Standard Error of Mean) vergleichsweise klein aus. Zur Auswertung der funktionellen Kapillardichte und der Gefäßpermeabilität wurde sodann das Computerprogramm CAP-IMAGE (Version 6.01; Dr. Zeintl; Heidelberg) hinzugezogen [81]. Des Weiteren wurden dann als Leukozytensticker diejenigen Leukozyten definiert, welche mindestens 30 Sekunden an demselben Ort haften und sich nicht fortbewegen [82, 84, 85].

4.2.2. Die Präparation der Tiere

Die Mikrozirkulation wird durch viele Umstände beeinflusst. Zur Entwicklung eines beständigen Modells und damit verbundener unvoreingenommener Untersuchungsergebnisse muss dieses beachtet werden. Im Rahmen der Tierpräparation kommt es zu einem Blutverlust, da diese von invasiver Natur ist. Um die Mikrozirkulation nicht negativ durch eine damit verbundene Abnahme des Blutvolumens zu beeinflussen, muss diese so klein wie möglich gehalten werden. Dieses lässt sich insgesamt durch die Anwendung atraumatischer Operationstechniken erreichen.

Zu diesem Zweck wurde das distale Kolon mobilisiert und so spannungsfrei wie nur möglich auf eine eigens dafür angefertigte und eingebuchtete Kunststoffschiene vor die Bauchdecke verlagert. Das Lumen wurde antimesenterial in dem fast avasculären Bereich eröffnet. Mit Hilfe feiner atraumatischer Fäden (Prolene 7/0) wurde das eröffnete Kolon sodann armiert und locker aufgespannt (Abb. 1, Seite 9). Neben dem Ausbau einer normierten Methodik konnte so eine Blutungsminderung wie auch eine Durchblutungsstörung durch Gewebeüberspannung vermieden werden.

Zudem gibt es zusätzliche Faktoren, welche die Mikrozirkulation beeinflussen können. Um systematische Fehler zu verhindern, mussten diese konstant gehalten werden. Aus diesem Grund erfolgte die Lagerung der Ratten die gesamte Versuchsdauer über auf einer thermostatisch geregelten Heizmatte und eine Äquilibration mit 37°C warmer Ringer-Lactat-Lösung, um die Körpertemperatur konstant zu halten. Außerdem wurden am Anfang und zum Ende der Versuche Blutgasanalysen sowie kontinuierlich eine direkte Blutdruckmessung zum Zweck des Ausschlusses kardiorespiratorisch insuffizienter Versuchstiere durchgeführt.

4.2.3. Charakterisierung des TNBS-Colitis-Modells

Das 1989 beschriebene Modell nach Morris et al. ruft eine Colitis durch einmalige intrarektale Instillation von zuvor in 100%igem Alkohol gelöster Trinitrobenzensäure (TNBS) hervor [78]. Durch das Äthanol wird die gesunde Kolonschleimhaut geschädigt und somit dem TNBS der Eintritt in die Darmwand ermöglicht. Binnen weniger Stunden entsteht eine akute transmurale Entzündung. Diese wandelt sich dann graduell in ein bei Ratten bis zu 8 Wochen anhaltendes chronisches Stadium um. Dabei scheint die chronische Entzündung durch T-Lymphozyten (T_{H1}) getriggert zu werden, welches anhand von Experimenten an Mäusen dargestellt werden konnte. Das verwendete TNBS agiert in diesem Fall als Hapten. Es bindet sich an die E-Aminogruppe der Aminosäure Lysin, formt dabei die Oberflächenantigenstruktur um und löst so eine Immunreaktion vom verzögerten Typ aus (Hapten-Colitis) [78, 98-103]. Der genaue Pathomechanismus bei der Ratte ist aber noch unklar. Der Einfluss von toxischen Noxen in diesem Rahmen wird untersucht [18].

Besonders stark ist die Entzündungsreaktion an der Induktionsstelle im Rektum und im aboralen Kolon. Von da aus dehnt sie sich ununterbrochen mit fokalen Ulcerationen aus. Im Zuge dessen zeigt sich makroskopisch das Bild eines paralytischen Ileus: der Darm ist dilatiert, die Darmwand verdickt und die Mukosa nekrotisch-ulcerös verändert. Auf histologischer Ebene

präsentiert sich beim akuten Stadium eine bis in die Submukosa reichende transmurale ödematöse granulozytenreiche Entzündung mit Nekrosen und Ulcerationen der Mukosa. Die chronische Phase indessen imponiert durch das Vorliegen von Langerhans-Riesenzellen, Granulombildung [100], Mukosaumwandlung und Darmwandfibrose. Gleichzeitig ist die Schleimhaut deutlich mit T-Lymphozyten infiltriert. Bei der Maus handelt es sich hierbei weitestgehend um Lymphozyten vom Typ CD4⁺ [101]. Als klinische Symptome sind Durchfall, Appetitlosigkeit, Gewichtsabnahme und Apathie zu beobachten, ebenso wie eine Ansprechbarkeit auf die in der Praxis bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verwendeten Pharmaka [104, 105]. Ist das Versuchstier gesundet so treten spontan keine Rückfälle auf.

4.2.4. Histologischer Colitis-Score

Die Auslösungswahrscheinlichkeit einer Colitis mittels rektaler TNBS-Instillation liegt bei 90%. Gleichzeitig ist die Ausprägung dessen unbeständig. Bislang gelang es Forschungsgruppen eine Abhängigkeit zwischen dem Grad der Entzündung und der Tierart nachzuweisen. Ebenso scheint die Rasse, die Mikroflora des jeweiligen Versuchstieres wie auch die verwendete Konzentration der TNBS eine direkte Wirkung darauf zu haben. Darum werden weiterhin Versuche zur Dosisfindung benötigt und durchgeführt [106, 107]. Um einen Ergebnisvergleich bei Colitisstudien durchführen zu können, ist dafür das Vorliegen eines histologischen Scores unverzichtbar. Dieser ermöglicht neben einer Auftrennung in Schweregrade auch eine Beurteilung von Verlaufsarbeiten. Infolgedessen wurde in Vorarbeiten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité – Campus Benjamin Franklin der notwendige histologische Colitis-Score erarbeitet (s. Kap. 2.7., Seite 15 und Abb. 5, Seite 16). Dieser Score unterscheidet zwischen einer akuten und einer chronischen Entzündung.

4.2.5. Hypothese

Nach Induktion der TNBS-Colitis entwickelt sich innerhalb von 24 Stunden ein schweres akutes Inflammationsbild des Rektums wie auch des aboralen Kolons. Dabei ist anfänglich die Mikrozirkulation eher erhöht. Drei Tage später hat sich makroskopisch nichts an diesem Zustand geändert, während der kapilläre Blutfluss deutlich abgefallen ist. Schließlich zeigt sich histologisch 15 Tage später eine mittelgradige akute Entzündung und damit eine signifikante Rekonvaleszenz der Colitis. Zeitgleich können auch chronische Inflammationszeichen in Form von Granulomen erkannt werden. Unterdessen hat der kapilläre Blutfluss den anfänglichen Wert fast wiedererlangt [77]. Die funktionellen Veränderungen (die Mikrozirkulation) scheinen somit

den pathomorphologischen (der Entzündung) vorgeschaltet zu sein. In diesem Sinn bedingt die gestörte Mikrozirkulation die funktionellen Störungen und diese prägen dann die Schwere der Erkrankung. Bestätigt sich die Annahme des krankheitsbedingten Einflusses der gestörten Mikrozirkulation, so dürfte eine Verbesserung der Mikrozirkulation im Frühstadium der Colitis den Krankheitsverlauf mildern.

Um diese Vermutung zu hinterfragen, wurde das Endothelin-1 als Testsubstanz bestimmt, weil dieses als stärkster bekannter vom Gefäßendothel gebildeter Vasokonstriktor eine direkte Wirkung auf die Mikrozirkulation hat. Außerdem mutet es an, einen Effekt auf die experimentelle Colitis wie auch auf die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu haben. In homogenisierten Biopsien und im Serum von an Colitis ulcerosa und Morbus Crohn erkrankten Patienten konnten signifikant gesteigerte Endothelinlevel festgestellt werden [74, 75, 108]. Diese hatten besonders während der aktiven Phase der Erkrankung zugenommen [76], ebenso wie die Menge der Endothelin-Rezeptoren am Darmgefäßendothel [108]. In bereits durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen bedingte die Applikation eines Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ET-RA) eine Besserung des Colitisverlaufs [109, 110].

Daraus lässt sich folgende Hypothese ableiten: (1) die Endothelingabe in der Colitisfrühphase verschlimmert durch eine zusätzliche Verminderung des kapillären Blutflusses die Erkrankung und (2) die Endothelin-Rezeptor-Blockade hingegen verbessert den kapillären Blutfluss und damit den Erkrankungsverlauf.

4.2.6. Versuchsaufbau

Die Vorversuche der Arbeitsgruppe konnten bereits 24 Stunden nach Induktion eine hochgradige akute Entzündung nachweisen. Dieser Zustand war auch nach 72 Stunden gleich. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Frühphase der Colitis zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde für die notwendige Intravitalmikroskopie der Untersuchungszeitpunkt auf 48 Stunden nach erfolgter Colitisinduktion angesetzt. Die Testsubstanzen wurden nach 12 Stunden verabreicht und die Bolusgabe 12 Stunde später wiederholt. Damit war für sämtliche Testsubstanzen derselbe Wirkungszeitraum von 36 Stunden gegeben (Abb. 4, Seite 14).

Im Rahmen dieser Studie wurden Untersuchungen an gesunden (Kontrollgruppe I), unbehandelten (Colitisgruppe II), mit Endothelin-1 behandelten (Endothelingruppe III) und mit einem Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten behandelten Tieren (ET-RA-Gruppe IV)

vorgenommen. Aus methodischen Gründen ist die Messung aller Zielparameter an einer Ratte unmöglich. Deswegen mussten die Gruppen bestehend aus 16 Versuchstieren ohne Ausnahme in jeweils zwei Untergruppen mit 8 Versuchstieren randomisiert werden (Gruppen Ia-IVa und Ib-IVb, Tabelle 2, Seite 14).

4.2.7. Zielparameter

Bewirkte die Endothelin-A-Rezeptor-Antagonistengabe eine Verbesserung der Mikrozirkulation, so kommt es nach den Erkenntnissen der Vorversuche zur Charakterisierung des TNBS-Colitis-Modells nicht innerhalb von 48 Stunden zu einer histologischen Wandlung des Befundes. Wenn auch die funktionellen Veränderungen vor den morphologischen abliefen, so ist ein Zeitabschnitt von 36 Stunden dafür nicht ausreichend. Um nun die Erkrankungsschwere bewerten zu können, war die Festlegung funktioneller Zielparameter erforderlich, weil bei fehlender Sterblichkeit dieses Colitis-Modells diese hierfür nicht herangezogen werden konnte.

Bei einer vorliegenden Inflammation erhöht sich das Bestreben der zirkulierenden Leukozyten, sich mit dem Gefäßendothel zu vereinigen. Dieses führt schließlich zum Durchtritt der Leukozyten in das inflammatorische Gewebe. Anfangs ist deren Kontakt zur Gefäßwand eher akzidentell. Dann fangen die Leukozyten an, erst langsam an diesem entlang zu „rollen“ (Rolling), bis sie dann sprichwörtlich am Gefäßendothel haften bleiben (Sticking) und zu guter Letzt durch dieses hindurchtreten [84, 111-116]. Der gesamte Ablauf wird unter dem Namen „Homing“ zusammengefasst und wird mittels sich auf den Leukozyten wie auch auf den Endothelzellen befindlicher Adhäsionsmoleküle hervorgerufen [117-120]. Die Menge der Leukozytensticker stellt in der Literatur einen Ausdruck der Krankheitsaktivität dar, weil diese in direktem Zusammenhang mit der Leukozyten-Endothel-Interaktion zu stehen scheint [114, 121-124]. Nimmt die Interaktion zwischen den Leukozyten und dem Endothel zu, so ist meist auch gleichzeitig die Gefäßpermeabilität gesteigert [114, 125, 126]. Klinisch imponieren Ödeme, welche durch den vermehrten Durchtritt von Plasmaproteinen und Wasser bei gesteigerter Durchlässigkeit zustande kommen [127]. Deutlich sichtbar wird die durch das „Capillary Leakage“ bewirkte Verlagerung der intravasalen Flüssigkeit ins Interstitium bei Patienten mit einem Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und/oder Sepsispatienten [128]. Eine zunehmende Gefäßpermeabilität kann daher ebenfalls als Maßstab für die Inflammationsschwere und -aktivität angesehen werden. Vorliegende Arbeiten bei akuter Pankreatitis deuten ebenfalls darauf hin [83, 86, 129].

Der Vermehrung des interstitiellen Volumens folgt anschließend eine Zunahme des Perfusionsdrucks. Daraus resultiert eine Verringerung der Anzahl durchbluteter Kapillaren [83], welches mit einer Minderung der funktionelle Kapillardichte im Rahmen der Entzündung gleichgesetzt werden darf [130]. Bei der funktionellen Kapillardichte handelt es sich somit gleichermaßen um ein Maß der Entzündungsaktivität. Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte die Mikrozirkulation bei Sepsis und berichtet auch von einer Reduzierung der Anzahl durchbluteter Kapillaren [131].

Um die Erkrankungsschwere noch näher zu charakterisieren, wurden neben den bisher beschriebenen intravitalmikroskopischen zusätzlich noch andere klinische Zielparameter gemessen. So wurde vor Beginn der mikroskopischen Untersuchung der Hämatokrit (Htk) bestimmt. Die durch die Inflammation bedingte Flüssigkeitsverschiebung ins Interstitium bewirkt im gleichen Zuge auch eine Zunahme des Htk. Aus diesem Grund wird dieser Parameter in dieser Studie, wie auch in anderen, z.B. bei der akuten Pankreatitis, ebenso zur Beschreibung der Erkrankungstärke verwendet [132-135]. Da die Nierentätigkeit in direktem Zusammenhang mit dem intravasalen Volumen steht, stellen die Messergebnisse der Urinausscheidung ein weiteren wichtigen Evaluationsparameter dar [136]. Die gängigste Methode zur Einschätzung der Krankheitsaktivität gibt die Verwendung des Crohn's disease activity index (CDAI) wieder [137]. Bei diesem werden u.a. die Qualität der Faeces und der Gewichtsverlauf miteingeschlossen. Aus diesem Grund wurden diese beiden Parameter auch in dieser Arbeit analysiert. Erstaunlicherweise laufen alle beschriebenen Abläufe bei der Ratte, im Vergleich zum Menschen, vielfach schneller ab [129, 138].

4.2.8. Charakterisierung der Testsubstanzen

4.2.8.1. Endothelin-1

Das Endothelin ist ein sich aus 21 Aminosäuren zusammensetzendes Peptid und ist seit 1988 der stärkste bekannte körpereigene Vasokonstriktor [139, 140]. Davon existieren drei Isoformen. Endothelin-1 kommt in allen Endothel- und Gefäßmuskelzellen, das Endothelin-2 in unterschiedlichen Geweben, ausgenommen der Gefäße und das Endothelin-3 im Nervengewebe vor. Der Körper speichert normalerweise kein Endotehlin-1, sondern bildet dieses innerhalb kürzester Zeit reaktiv bei Hypoxie und/oder Ischämie. Dabei liegt seine Halbwertszeit bei 4-7 Minuten [141-143]. Dieses unterstützt eine rasche Adaptation der Vasomotorik und des damit verbundenen Blutflusses an die jeweils gegebene Situation [144, 145].

Im Jahre 1992 deuteten die Arbeitsergebnisse der Gruppe um Murch zum ersten Mal auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Endothelin-1 und der Erkrankungsschwere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hin [74]. In Resektaten von CED-Patienten fanden sie gesteigerte Endothelin-1-Werte. Ihrer Interpretation nach wurde die Ischämie durch eine Vasokonstriktion bewirkt, die durch die zunehmende Endothelinausschüttung hervorgerufen wurde. Weitere Veröffentlichungen konnten ebenfalls angestiegene Endothelin-1-Werte bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachweisen. In diesem Rahmen verglich die Arbeitsgruppe um Letizia die Endothelin-1-Werte zwischen gesunden und an CED erkrankten Menschen. Dabei zeigte sich eine signifikante Steigerung der Werte innerhalb des Pools der Erkrankten gegenüber denen der Gesunden (Kontrolle: 6.2 ± 1.5 pg/ml, Colitis ulcerosa: 11.2 ± 2.7 pg/ml und Morbus Crohn: 22.3 ± 8.2 pg/ml) [75]. Gleichzeitig scheint die Endothelin-1-Erhöhung auch in Wechselbeziehung zur Krankheitsstärke zu stehen [76].

Die in dieser Studie verwendete kontinuierliche intravenöse Verabreichungsart sowie die Dosismenge von $1,25 \mu\text{g/kg KG/Std.}$ wurden in Anlehnung an eine andere Studie gewählt [83].

4.2.8.2. Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist LU-135252

Es gibt 3 unterschiedliche Endothelin-Rezeptor-Arten: Endothelin-A-, Endothelin-B- und Endothelin-C-Rezeptoren. Die Bindungsaffinität der drei Isoformen des Endothelins an die jeweiligen Endothelin-Rezeptoren ist verschiedenartig. Beispielsweise ist die Neigung des Endothelin-1, sich an den Endothelin-A-Rezeptor zu binden, im Vergleich zum Endothelin-3 zehnmal stärker [146]. Dieses macht die Affinität des Endothelin-1 zu dem besonders auf glatten Gefäßmuskeln verbreiteten Endothelin-A-Rezeptor damit verhältnismäßig spezifisch [147]. Die Aktivierung des Endothelin-A-Rezeptors resultiert sodann in einem Anstieg des freien intrazellulären Calciums und daraus folgend in einer Konstriktion der Gefäße [148].

Der Endothelin-B-Rezeptor kommt vermehrt auf Endothelzellen vor [149] und hat eine schwache Affinität gegenüber allen drei Endothelinisofomen [150]. Dem gegenüber gestellt bindet der Endothelin-C-Rezeptor mehrheitlich das Endothelin-3 [151].

Menschen, die an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leiden, weisen gesteigerte Level an Endothelin-1 auf [74-76]. Um der postulierten Hypothese nachzugehen, erhielt die dritte Versuchsgruppe (Endothelingruppe) innerhalb dieser Arbeit Endothelin-1 intravenös. Demzufolge wurde der vierten Versuchsgruppe (ET-RA-Gruppe) der selektive Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist LU-135252 verabreicht. Bislang liegen der Fachliteratur nur Ergebnisse von Arbeiten vor, die am Colitis-Modell exklusiv mit Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

gewonnen wurden, welche nicht selektiv waren [108-110, 152, 153]. Diese wurden auch noch nicht beim Menschen eingesetzt.

Die Wahl der Verabreichung des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 in Form von i.v.-Boli ebenso wie die Dosismenge von 50 mg/kg KG geschah in Übereinstimmung mit vorliegenden Veröffentlichungen [83, 86, 87, 129].

4.3. Ergebnisse

Alle Untersuchungen liefen wie geplant ab und es starb keine der Ratten innerhalb des gesamten Versuchsablaufes. Zur Vermeidung systemischer wie auch zufälliger Fehler in Bezug auf die Mikrozirkulation wurde die kardiorespiratorische Stabilität der Versuchstiere überwacht und dokumentiert. Dieses erfolgte mittels fortdauernder Messung des arteriellen Blutdrucks und Durchführung einer arteriellen Blutgasanalyse zu Beginn und am Ende der Versuche. Keine der Versuchsratten musste entsprechend der Anforderungen (s. Kap. 2.8., Seite 15) aufgrund kardiorespiratorischer oder hämodynamischer Insuffizienz ausgeschlossen werden. Aufgrund einer jedoch mangelnden Colitisaktivität (Histologischer Colitis-Score <5) bei 3 Versuchstieren, mussten diese aus der Wertung herausgenommen werden.

4.3.1. Kontrollgruppe (Gruppe I)

Weil innerhalb dieser Arbeit der kapilläre Blutfluss, die funktionelle Kapillardichte, die Gefäßpermeabilität und das Leukozytensticking zum ersten Mal an den Kapillaren des Kolons der Ratte analysiert wurden, existieren hierzu keine Daten zum Vergleich.

Interessanterweise beläuft sich der perivaskuläre Grauwert der Kontrollgruppe auf $79 \pm 5\%$ des Ausgangswertes. Dazu kommt es, da das FITC-Dextran mit einer Molekularmasse von 70.000 Da innerhalb des Gefäßes einen onkotischen Druck aufbaut. Bei intaktem Endothel des gesunden Versuchstieres bedingt dieser sodann eine Diffusion des interstitiellen Wassers in das Gefäßlumen und damit verbunden eine Zunahme der Zelldichte, welche wiederum den perivaskulären Grauwert absinken lässt. Insgesamt besteht also keine wirkliche Durchlässigkeit für Dextrane dieser Größe. Das Phänomen des Leukozytensticking ist bei den Kontrolltieren fast nicht existent. Zusätzlich haben alle Tiere einen Htk von 45.8%, scheiden geformten, soliden Stuhl aus und nehmen den Versuchsablauf über zu.

4.3.2. Colitisgruppe (Gruppe II)

Zum Versuchsende weisen die kranken Ratten makroskopisch wie auch histologisch das Bild einer hochgradigen akuten Colitis auf. Dieses entspricht insgesamt den Ergebnissen der Literatur [77]. Der kapilläre Blutfluss und die funktionelle Kapillardichte sind im Vergleich zur Gruppe I signifikant verringert. Derweil sind die Gefäßpermeabilität und das Leukozytensticking signifikant erhöht. Während die Versuchstiere Gewicht verlieren und unter Durchfall leiden, bewirkt der Volumenverlust Richtung Interstitium gleichzeitig einen Anstieg des Htk auf 48.8% und eine Reduktion der Urinausscheidung.

4.3.3. Endothelgruppe (Gruppe III)

Die makroskopische und histologische Erkrankungsschwere der Endothelgruppe gleicht denen der Colitisgruppe. Stimmt unsere in Kap. 4.2.5. auf Seite 34 beschriebene Annahme, so müsste die Gabe von Endothelin-1 die Krankheitsschwere verschlimmern. Dieses konnte so in Pankreatitisstudien nachgewiesen werden [154, 155]. Wider Erwarten löst die Endothelin-1-Gabe im Rahmen dieser Studie, verglichen mit der Colitisgruppe, keine signifikante Verschlechterung aus. Beim Ablauf einer Colitis produziert der Körper eigenes Endothelin-1 [74-76], welches an seinem entsprechenden Rezeptor bindet. Die exogene Verabreichung von Endothelin-1 bewirkt wahrscheinlich keinen Unterschied mehr, weil die exprimierten Rezeptoren schon damit komplett belegt sind [83].

4.3.4. Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (Gruppe IV)

Das histologische Erkrankungsstadium und die -schwere der ET-RA-Gruppe ist wiederum vergleichbar mit denen der Gruppe II. Die Endothelin-Rezeptor-Blockade durch die Applikation des Antagonisten LU-135252 hingegen steigert den kapillären Blutfluss signifikant, erlangt dennoch nicht den Wert der gesunden Kontrollgruppe (Gruppe I). Aus diesem Ergebnis und aus der signifikanten Besserung aller ergänzend gemessenen mikrozirkulatorischen und klinischen Parameter lässt sich folglich eine Milderung der Krankheitsaktivität ableiten (s. Kap. 4.2.5., Seite 34). In Studien über die Pankreatitis konnte bereits der Zusammenhang zwischen einer Zunahme des kapillären Blutflusses wie auch der funktionellen Kapillardichte und der Verabreichung des Endothelinantagonisten LU-135252 gezeigt werden [83, 86, 129]. Im Hinblick auf den Hämatokrit springt einem seine signifikante Reduktion auf 39% gegenüber der Gruppe I sofort ins Auge. Die Urinausscheidung ist gleichzeitig erhöht. Wahrscheinlich liegt das u.a. an der signifikanten Besserung der Gefäßpermeabilität und der damit verbundenen Reduktion des Flüssigkeitsshifts von intra- nach extravasal. Der genaue Einfluss des Endothelin-1 und des

LU-135252 darauf ist bis jetzt noch nicht entschlüsselt worden [83, 86, 127, 129]. Darüber hinaus liegt dieses vermutlich auch am Endothelin-1-Effekt auf die Nierenfunktion. Endothelin-1 bewirkt bekanntermaßen einen Rückgang der Diurese [156]. In diesem Sinne bedingt die Applikation von LU-135252 eine Steigerung der Diurese. Deswegen wird die Gabe von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten bei Niereninsuffizienz im Rahmen anderer Arbeiten untersucht [157].

Publikationen in Bezug auf die Wirkung von nichtselektiven Endothelin-Rezeptor-Antagonisten anhand der Gabe von Ro 47-0203 (Bosentan) wie auch Ro 48-5695 (Bosentanderivat) stellen eine Besserung der TNBS-Colitis fest [108-110, 152, 153]. In einer speziellen Veröffentlichung wurde zusätzlich zum nichtselektiven Ro 47-0203 auch das A-Rezeptor-selektive BQ-485 und das B-Rezeptor-selektive BQ-788 untersucht. Ein, drei und fünf Tage im Anschluss an die TNBS-Einleitung war der gemessene Blutfluss der *A. mesenterica inferior* signifikant eingeschränkt. Die Gabe von Bosentan oder BQ-485, aber nicht die von BQ-788, zeigte anschließend einen signifikanten Anstieg des Blutflusses und gleichzeitig auch eine Besserung des Colitisverlaufs. Den Ergebnissen entsprechend scheinen exklusiv Endothelin-A-Rezeptoren einen Einfluss auf den Verlauf der TNBS-Colitis zu haben, zu einer deutlichen Steigerung der Mikrozirkulation zu führen [152] und damit die hier formulierte Hypothese zu unterstützen.

4.3.5. Gruppenvergleich (Gruppen I-IV)

Werden alle Gruppen mit der Kontrollgruppe I verglichen, so liegt bei den weiteren Gruppen II bis IV ausnahmslos eine starke histologisch bestätigte Colitis vor (Abb. 14, Seite 29), auch wenn sie bezüglich der sonst noch gemessenen Parameter partiell deutlich voneinander abweichen. Das ist nicht verwunderlich, da dieses bereits in Vorversuchen nachgewiesen werden konnte. Dieses bestärkt alles in allem unsere Annahme der zuerst ablaufenden funktionellen Transformationen, welchen dann die morphologischen folgen (s. Kap. 4.2.5., Seite 34). Zur Beurteilung der Colitis-Expression und des Entzündungsverlaufs wurde der histologische Colitis-Score hinzugezogen. Dieses wurde ferner zur Gewährleistung einer qualitativ sicheren Gegenüberstellung zwischen den Gruppen getan (s. Kap. 3.9., Seite 27 und Kap. 4.2.4., Seite 34).

Bei der Colitisgruppe II zeigt sich 48 Stunden nach durchgeführter TNBS-Colitis-Induktion, gemessen an der Kontrollgruppe I, eine signifikante Reduktion des kapillären Blutflusses. Die Applikation von Endothelin-1 innerhalb der Endothelingrouppe III setzt diesen nicht weiter herab. In anderen Arbeiten wies Endothelin-1 nicht nur eine besonders effektive Wirkung bei der Minderung der Pankreasdurchblutung auf, sondern auch bei der des Kolons [158, 159]. Zudem

präsentieren sich bei der TNBS induzierten Colitis gesteigerte Endothelin-Werte [160]. Die nicht vorhandene Wirkungszunahme deutet auf eine mögliche komplette Besetzung aller Endothelin-Rezeptoren hin, weil das applizierte Endothelin-1 keinen Unterschied mehr herbeiführen kann. Dieses wird noch durch den fehlenden Kontrast bei der Colitisgruppe II und der Endothelengruppe III unterstrichen.

Gegenüber der Colitisgruppe II sind bei der ET-RA-Gruppe IV sämtliche mikrozirkulatorischen (kapillärer Blutfluss, funktionelle Kapillardichte, Gefäßpermeabilität und Leukozytensticking) wie auch klinischen Zielparameter (Diurese, Faecesqualität, Hämatokrit und Gewichtsverlauf) signifikant gebessert. Die Werte der Kontrollgruppe I wurden dabei aber nicht erlangt.

Allem Anschein nach spielt die Wechselbeziehung zwischen den im Blut befindlichen Leukozyten und dem Gefäßendothel eine wichtige Rolle beim pathogenetischen Verlauf der CED und hängt mit der Inflammationsstärke zusammen [108, 114, 117-123]. Ein Anstieg dieser Interaktion konnte gleicherweise bei Colitis-Studien konstatiert werden [161, 162] und bedingt vermutlich eine Beeinträchtigung des kapillären Blutflusses [124]. Die Verabreichung von Endothelin-1 innerhalb der Gruppe III zog keinen Anstieg des Leukozytenstickings nach sich. Dieses korreliert höchstwahrscheinlich auch in diesem Fall mit der angenommenen Besetzung der Endothelin-Rezeptoren und lässt sich durch die Gabe des in dieser Arbeit verwendeten selektiven Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 positiv beeinflussen (Reduktion des Leukozytenstickings). Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Studiengruppe um Anthoni im Jahre 2006 nach erfolgreicher DSS (Dextran-Natriumsulfat)-Colitis-Induktion bei der Maus. Sie gab ihren Versuchstieren Bosentan, welches zu einer Entzündungsabnahme und zu einer Verminderung des Leukozytenstickings im betrachteten Untersuchungsfeld führte [153].

Während die Gefäßpermeabilität der unbehandelten Colitisgruppe II vergleichsweise hoch ist, sinkt diese durch die Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Applikation bei der ET-RA-Gruppe IV signifikant ab. Dieses befürwortet eine Verknüpfung zwischen der Gefäßpermeabilität und der Leukozyten-Endothel-Interaktion (s. Kap. 4.2.7., Seite 36) indem die Leukozyten, die der Gefäßwand anhaften, eine Veränderung dieser nach sich zieht, welche dann wiederum das „Capillary Leakage“ verursacht [33, 114, 125-127, 163]. Durch die Besserung der Gefäßpermeabilität nach Verabreichung von LU-135252 kommt es zur Zunahme des Blutvolumens, welches mit einer Abnahme des Hämatokrits einhergeht.

Eine Zunahme des kapillären Blutflusses in der Colitisfrühphase bedingt eine abgeschwächte Entzündungsprogression und hebt damit den pathogenetischen Stellenwert der Mikrozirkulation bezüglich des Verlaufs bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hervor.

4.3.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war die Hinterfragung der pathogenetischen Relevanz der (eingeschränkten) Mikrozirkulation in Bezug auf die Entzündungsaktivität anhand des TNBS-Colitis-Modell der Ratte. In diesem Rahmen wurde den Versuchstieren zum einen Endothelin-1 und zum anderen dessen selektiver Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist LU-135252 gegeben. Abgesehen von den hiermit beschriebenen zwei Gruppen (Endothelgruppe III und ET-RA-Gruppe IV) wurden außerdem sowohl eine gesunde Kontrollgruppe I als auch eine unbehandelte Colitisgruppe II untersucht. Bei den mikrozirkulatorischen Zielparametern handelte es sich um den kapillären Blutfluss, gefolgt von der funktionellen Kapillardichte, der Gefäßpermeabilität und dem Leukozytensticking. Des Weiteren wurden klinische Zielparameter (Diurese, Stuhlqualität, Gewichtsverlauf und Hämatokrit) zur Evaluierung der Colitisaktivität erfasst. Zum Ausschluss systemischer Störungen der Mikrozirkulation wurden regelmäßig arterielle Blutgasanalysen und allzeit Blutdruckmessungen betrieben. Die morphologische Colitisaktivität wurde anhand der histopathologischen Alterationen unter Zuhilfenahme des Colitis-Score's beurteilt.

Nachstehende Ergebnisse lassen sich beobachten: (1) Abgesehen von einer signifikanten Abnahme des kapillären Blutflusses und der funktionelle Kapillardichte in der Frühphase der TNBS-Colitis kommt es auch zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßpermeabilität und des Leukozytenstickings innerhalb der untersuchten Kolonmukosa. Davon abgesehen ist sie durch eine signifikante Steigerung des Hämatokrits wie auch einer Reduktion des Gewichts und der Urinausscheidung charakterisiert. (2) Die Verabreichung von exogenem Endothelin-1 verändert diesen Zustand nicht. (3) Die Gabe des selektiven Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 verursacht eine signifikante Verbesserung aller klinischer Parameter wie auch der Parameter der Mikrozirkulation gemessen an den Ergebnissen der Colitisgruppe.

Als Fazit dieser Arbeit ist hervorzuheben: (1) Die Folgen der akuten TNBS-Colitis zeichnen sich durch eine umfangreiche Beeinträchtigung der Mikrozirkulation bis zum SIRS aus. (2) Die Applikation von exogenem Endothelin-1 zieht höchstwahrscheinlich wegen einer Endothelin-A-Rezeptor-Blockade beruhend auf endogenem Endothelin-1 keine Verschlechterung dieser Veränderungen nach sich. (3) Die Endothelin-A-Rezeptor-Blockade mittels Applikation seines

Antagonisten bessert diesen Zustand signifikant. (4) Die Resultate untermauern demnach den pathogenetischen Stellenwert der Mikrozirkulation für Colitisverlauf.

5. ZUSAMMENFASSUNG und AUSBLICK

5.1. Hintergrund

Die Ätio-Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist ungeachtet vieler wissenschaftlicher Feststellungen nicht vollständig geklärt. Die aufgrund des besseren Verständnisses der Immunologie dieser Erkrankungen basierenden Therapieansätze besitzen ein nicht zu vernachlässigendes teilweise schweres Nebenwirkungsprofil. Charakteristisch für diese Darmerkrankungen sind die hohe Rezidivrate, die durch zunehmende Erkrankung junger Individuen wachsende Prävalenz und eine fehlende kausale Therapie. Daher wird weiter nach Ansätzen geforscht, um daraus neue und bessere Behandlungsformen entwickeln zu können.

Bislang gibt es zum Teil widersprüchliche Hinweise auf die Rolle der Mikrozirkulation beim Krankheitsverlauf der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Zur Beantwortung der daraus resultierenden Fragen und zur Beurteilung neuer entsprechender Therapieansätze wurde deswegen innerhalb der Arbeitsgruppe ein Tiermodell etabliert. An dem TNBS-Colitis-Ratten-Modell konnte die Mikrozirkulation intravitalmikroskopisch analysiert und charakterisiert werden.

5.2. Zielsetzung

Arbeitsziel war die Hinterfragung des Stellenwerts der (gestörten) Mikrozirkulation bei der Pathogenese und dem experimentellen Colitisverlauf. Bei Bestätigung der Hypothese würde eine Mikrozirkulationsbesserung in der Colitisfrühphase zu einem milderen Erkrankungsverlauf führen.

5.3. Material und Methode

Die Untersuchungen wurden anhand des TNBS-Modells zwei Tage nach Induktion an der Mukosa des aboralen Kolons einer gesunden Kontrollgruppe, einer unbehandelten Colitisgruppe und zwei mit vasoaktiven Testsubstanzen behandelten Gruppen durchgeführt. Bei den Testsubstanzen handelt es sich einerseits um Endothelin-1 und andererseits um seinen selektiven Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252. Neben dem kapillären Blutfluss waren auch die funktionelle Kapillardichte, die Gefäßpermeabilität, das Leukozytensticking, der Hämatokrit, die Diurese, der Gewichtsverlauf und die Stuhlqualität Zielparameter. Der Inflammationsgrad wurde unter Zuhilfenahme eines histologischen Colitis-Score's bestimmt.

5.4. Ergebnisse

(1) Das Akutstadium der TNBS-Colitis weist eine signifikante Minderung des kapillären Blutflusses, der funktionellen Kapillardichte, der Urinausscheidung und des Gewichts auf. Gleichzeitig sind die Gefäßpermeabilität, das Leukozytensticking und der Hämatokrit signifikant erhöht. (2) Die Gabe des Endothelin-1 verändert diese Resultate nicht. (3) Die Applikation des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 führt zu einer signifikanten Erholung der Parameter der Mikrozirkulation als auch der klinischen Befunde. (4) Zwischen den jeweiligen Colitisgruppen sind keine histopathologischen Differenzen nachweisbar.

5.5. Schlussfolgerungen

(1) Bei der akuten TNBS-Colitis ist die Mikrozirkulation mit Merkmalen des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) umfangreich gestört. (2) Die Gabe des Endothelin-1 bedingt nicht die postulierte Verschlechterung dieses Zustandes. Wahrscheinlich hängt dieses Ergebnis mit einer schon vorhandenen Endothelin-A-Rezeptorsättigung durch körpereigenes Endothelin-1 zusammen. (3) Die Endothelin-A-Rezeptorblockade mittels Applikation seines Antagonisten bewirkt eine signifikante Zustandsbesserung. (4) Eine Besserung des kapillären Blutflusses zu Beginn des akuten Erkrankungsstadiums korreliert mit einem insgesamt milderen Colitisverlauf. Die Mikrozirkulation spielt somit eine bedeutende Rolle im Rahmen der Pathogenese und des Krankheitsverlaufs bei experimenteller Colitis.

5.6. Ausblick

Die tierexperimentellen Untersuchungen am TNBS-Colitis-Modell der Ratte unterstreichen die Relevanz der Mikrozirkulation bezüglich Pathogenese und Verlauf bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Der hier verwendete Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist bessert die Mikrozirkulation und die Colitisaktivität signifikant. Auf der Suche nach neuen besseren Therapieformen ist der hieraus gewonnene Hinweis auf den Einsatz von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von enormer Bedeutung. Im Gegensatz zur Anwendung bei arteriellem Hypertonus [164], koronarer Herzkrankheit [165], dekompensierter Herzinsuffizienz [166], primärem pulmonalen Hypertonus [167, 168] und Vasculitis [169] ist diese Option bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bislang unerforscht. Diese viel versprechenden klinischen Studien sowie die eigenen experimentellen Ergebnisse sprechen daher für weiterführende Untersuchungen zum Einsatz von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung, zumal die oral verabreichte Form gut vertragen wird [170, 171]. Der nächste Schritt wäre nun die klinische

Überprüfung in Verträglichkeits- und Dosisfindungsstudien bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Auch andere Autoren sehen im Endothelin-Rezeptor-Antagonisten einen neuen Ansatzpunkt in der „supportiven“ Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [153, 172].

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Allchin WH (1885) Case of acute extensive ulceration of the colon. *Trans Pathol Soc London* 36:199-202.
2. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD (1932) Regional ileitis. A pathologic and clinical entity. *J Am Med Assoc* 99:1323-1329.
3. Lockhart-Mummery HE, Morson BC (1960) Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut* 1:87-105.
4. Geboes K (2001) Crohn's disease, ulcerative colitis or indeterminate colitis--how important is it to differentiate? *Acta Gastroenterol Belg* 64:197-200.
5. Chutkan RK (2001) Inflammatory bowel disease. *Prim Care* 28:539-556, vi.
6. Trallori G, Palli D, Saieva C, et al. (1996) A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92). *Scand J Gastroenterol* 31:892-899.
7. Loftus EV, Jr., Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR (2000) Ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gut* 46:336-343.
8. Loftus EV, Jr., Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR (1998) Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. *Gastroenterology* 114:1161-1168.
9. Casati J, Toner BB (2000) Psychosocial aspects of inflammatory bowel disease. *Biomed Pharmacother* 54:388-393.
10. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Wajda A (1999) Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am J Epidemiol* 149:916-924.
11. Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z (2000) The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol* 35:154-167.
12. Buchman AL (2001) Side effects of corticosteroid therapy. *J Clin Gastroenterol* 33:289-294.
13. Persley KM, Present DH (2001) Neutropenia is not required for clinical remission during azathioprine therapy in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:1053-1055.
14. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V (1991) Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324:84-88.

15. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO (1991) The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 100:350-358.
16. Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath M (1996) Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 26:934-938.
17. Yamada T, Sartor RB, Marshall S, Specian RD, Grisham MB (1993) Mucosal injury and inflammation in a model of chronic granulomatous colitis in rats. *Gastroenterology* 104:759-771.
18. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH (1995) Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109:1344-1367.
19. Fiocchi C (1998) Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115:182-205.
20. Strauch UG, Obermeier F, Grunwald N, et al. (2005) Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. *Gut* 54:1546-1552.
21. Schultz M, Scholmerich J, Rath HC (2003) Rationale for probiotic and antibiotic treatment strategies in inflammatory bowel diseases. *Dig Dis* 21:105-128.
22. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. (2001) Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357:1925-1928.
23. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599-603.
24. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, et al. (2003) NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 17:1465-1470.
25. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53:1658-1664.
26. Mascheretti S, Schreiber S (2005) Genetic testing in Crohn disease: utility in individualizing patient management. *Am J Pharmacogenomics* 5:213-222.
27. Rosenstiel P, Sina C, End C, et al. (2007) Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J Immunol* 178:8203-8211.

28. Stainsby KJ, Lowes JR, Allan RN, Ibbotson JP (1993) Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* and nine species of environmental mycobacteria in Crohn's disease and control subjects. *Gut* 34:371-374.
29. Thayer WR, Jr., Chitnavis V (1994) Inflammatory bowel disease. The case for an infectious etiology. *Med Clin North Am* 78:1233-1247.
30. Dell'Isola B, Poyart C, Goulet O, et al. (1994) Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. *J Infect Dis* 169:449-451.
31. Lewin J, Dhillon AP, Sim R, Mazure G, Pounder RE, Wakefield AJ (1995) Persistent measles virus infection of the intestine: confirmation by immunogold electron microscopy. *Gut* 36:564-569.
32. Thompson NP, Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ (1995) Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet* 345:1071-1074.
33. Wakefield AJ, Ekblom A, Dhillon AP, Pittilo RM, Pounder RE (1995) Crohn's disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* 108:911-916.
34. Ginzburg L, Oppenheimer GD (1933) Non-specific granulomata of the intestines. *Ann Surg* 98:1046-1062.
35. Marston A, Marcuson RW, Chapman M, Arthur JF (1969) Experimental study of devascularization of the colon. *Gut* 10:121-130.
36. Warren S, Sommers SC (1949) Pathogenesis of ulcerative colitis. *Am J Path* 25:657-674.
37. Dombrowski H, Korb G (1970) [Angiographic findings in regional enteritis (Crohn's disease) and their diagnostic significance]. *Radiologe* 10:17-24.
38. Erikson U, Fagerberg S, Krause U, Olding L (1970) Angiographic studies in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 110:385-392.
39. Lunderquist A (1967) Angiography in ulcerative colitis. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 99:18-23.
40. Lunderquist A, Knutsson H (1967) Angiography in Crohn's disease of the small bowel and colon. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 101:338-344.
41. Brahme F, Lindstrom C (1970) A comparative radiographic and pathological study of intestinal vaso-architecture in Crohn's disease and in ulcerative colitis. *Gut* 11:928-940.
42. Carr ND, Pullan BR, Schofield PF (1986) Microvascular studies in non-specific inflammatory bowel disease. *Gut* 27:542-549.

43. Thiede A, Poser H, Deltz E (1983) Mikroangiographische Untersuchungen bei M. Crohn und anderen entzündlichen Darmerkrankungen an frischen Operationspräparaten. In: Gall FP, Groitl H (eds) Entzündliche Erkrankungen des Dün- und Dickdarmes. 2. Aufl., Perimed-Verlag, Erlangen, 93-98.
44. Johansson H, Krause U, Olding L (1972) Microangiographic studies in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Acta Chir Scand* 138:409-414.
45. Wakefield AJ, Sawyerr AM, Dhillon AP, et al. (1989) Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. *Lancet* 2:1057-1062.
46. Wakefield AJ, Sankey EA, Dhillon AP, et al. (1991) Granulomatous vasculitis in Crohn's disease. *Gastroenterology* 100:1279-1287.
47. Hulten L, Lindhagen J, Lundgren O, Fasth S, Ahren C (1977) Regional intestinal blood flow in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* 72:388-396.
48. Åhrén CL, Hultén L, Lindhagen J (1977) Pathological aspects. In: *Gastrointestinal emergencies*. Pergamon Press, Oxford, 81-88.
49. Bacaner MB (1966) Quantitative measurement of regional colon blood flow in the normal and pathological human bowel. *Gastroenterology* 51:764-777.
50. Su KC, Leung FW, Guth PH (1989) Assessment of mucosal hemodynamics in normal human colon and patients with inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc* 35:22-27.
51. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. (1995) Colonic mucosal hemodynamics and tissue oxygenation in patients with ulcerative colitis: investigation by organ reflectance spectrophotometry. *J Gastroenterol* 30:183-188.
52. Guslandi M, Polli D, Sorghi M, Tittobello A (1995) Rectal blood flow in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 90:579-580.
53. Furst H, Storck M, Jauch KW, Scheurlen C, Kaltenecker A, Wiebecke B (1992) [Crohn disease in advanced age]. *Chirurg* 63:26-30.
54. Marston A, Pheils MT, Thomas ML, Morson BC (1966) Ischaemic colitis. *Gut* 7:1-15.
55. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G (1988) Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 29:352-357.
56. Rhodes J, Thomas GA (1994) Smoking: good or bad for inflammatory bowel disease? *Gastroenterology* 106:807-810.
57. Somerville KW, Logan RF, Edmond M, Langman MJ (1984) Smoking and Crohn's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 289:954-956.
58. Wakefield AJ, Sawyerr AM, Hudson M, Dhillon AP, Pounder RE (1991) Smoking, the oral contraceptive pill, and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 36:1147-1150.

59. Reese GE, Nanidis T, Borysiewicz C, Yamamoto T, Orchard T, Tekkis PP (2008) The effect of smoking after surgery for Crohn's disease: a meta-analysis of observational studies. *Int J Colorectal Dis* 23:1213-1221.
60. Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, Gendre JP (2001) Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* 120:1093-1099.
61. Benoni C, Nilsson A (1984) Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 19:824-830.
62. Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ (2002) In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* 51:21-25.
63. Holdstock G, Savage D, Harman M, Wright R (1984) Should patients with inflammatory bowel disease smoke? *Br Med J (Clin Res Ed)* 288:362.
64. Harries AD, Baird A, Rhodes J (1982) Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 284:706.
65. Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, et al. (1994) Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 330:811-815.
66. Ang YS, Mahmud N, White B, et al. (2000) Randomized comparison of unfractionated heparin with corticosteroids in severe active inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 14:1015-1022.
67. Torkvist L, Thorlacius H, Sjoqvist U, et al. (1999) Low molecular weight heparin as adjuvant therapy in active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 13:1323-1328.
68. Vrij AA, Jansen JM, Schoon EJ, de Bruine A, Hemker HC, Stockbrugger RW (2001) Low molecular weight heparin treatment in steroid refractory ulcerative colitis: clinical outcome and influence on mucosal capillary thrombi. *Scand J Gastroenterol Suppl*:41-47.
69. Fries W, Pagiaro E, Canova E, et al. (1998) The effect of heparin on trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 12:229-236.
70. Panes J, Esteve M, Cabre E, et al. (2000) Comparison of heparin and steroids in the treatment of moderate and severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 119:903-908.
71. Anthony A, Dhillon AP, Pounder RE, Wakefield AJ (1997) Ulceration of the ileum in Crohn's disease: correlation with vascular anatomy. *J Clin Pathol* 50:1013-1017.
72. Anthony A, Pounder RE, Dhillon AP, Wakefield AJ (1997) Vascular anatomy defines sites of indomethacin induced jejunal ulceration along the mesenteric margin. *Gut* 41:763-770.

73. Anthony A, Pounder RE, Dhillon AP, Wakefield AJ (2000) Similarities between ileal Crohn's disease and indomethacin experimental jejunal ulcers in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 14:241-245.
74. Murch SH, Braegger CP, Sessa WC, MacDonald TT (1992) High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Lancet* 339:381-385.
75. Letizia C, Boirivant M, De Toma G, et al. (1998) Plasma levels of endothelin-1 in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 30:266-269.
76. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima T, Kagiya M, Kikuchi K (2001) VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 96:822-828.
77. Kruschewski M, Foitzik T, Perez-Canto A, Hubotter A, Buhr HJ (2001) Changes of colonic mucosal microcirculation and histology in two colitis models: an experimental study using intravital microscopy and a new histological scoring system. *Dig Dis Sci* 46:2336-2343.
78. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL (1989) Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96:795-803.
79. Mithofer K, Schmidt J, Gebhard MM, Buhr HJ, Herfarth C, Klar E (1995) Measurement of blood flow in pancreatic exchange capillaries with FITC-labeled erythrocytes. *Microvasc Res* 49:33-48.
80. Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K (1995) Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 15:244-249.
81. Klyszcz T, Junger M, Jung F, Zeintl H (1997) [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)* 42:168-175.
82. Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD (1999) A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. *Shock* 12:355-364.
83. Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ, Foitzik T (2000) Effect of endothelin and endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimental pancreatitis. *Gut* 46:390-394.
84. Granger DN, Kubes P (1994) The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 55:662-675.

85. Granger DN, Kvietys PR, Perry MA (1993) Leukocyte--endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 71:67-75.
86. Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ (1998) Endothelin receptor blockade improves fluid sequestration, pancreatic capillary blood flow, and survival in severe experimental pancreatitis. *Ann Surg* 228:670-675.
87. Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Hotz B, Kirchengast M, Buhr HJ (1999) Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: effectiveness of platelet-activating factor receptor blockade vs. endothelin receptor blockade. *J Gastrointest Surg* 3:244-251.
88. Foitzik T, Eibl G, Buhr HJ (2000) Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: comparison of delayed therapy with ICAM-1 antibodies and a specific endothelin A receptor antagonist. *J Gastrointest Surg* 4:240-246; discussion 247.
89. Kruschewski M, Anderson T, Buhr HJ, Loddenkemper C (2006) Selective COX-2 inhibition reduces leukocyte sticking and improves the microcirculation in TNBS colitis. *Dig Dis Sci* 51:662-670.
90. Yang H, Taylor KD, Rotter JI (2001) Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology. *Mol Genet Metab* 74:1-21.
91. Schreiber S, Campieri M, Colombel JF, et al. (2001) Use of anti-tumour necrosis factor agents in inflammatory bowel disease. European guidelines for 2001-2003. *Int J Colorectal Dis* 16:1-11; discussion 12-13.
92. Keating GM, Perry CM (2002) Infliximab: an updated review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *BioDrugs* 16:111-148.
93. Brown SL, Greene MH, Gershon SK, Edwards ET, Braun MM (2002) Tumor necrosis factor antagonist therapy and lymphoma development: twenty-six cases reported to the Food and Drug Administration. *Arthritis Rheum* 46:3151-3158.
94. Bell SJ, Kamm MA (2000) Review article: the clinical role of anti-TNFalpha antibody treatment in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 14:501-514.
95. Kruschewski M, Busch C, Dorner A, Lierse W (1995) [Angio-architecture of the colon in Crohn disease and ulcerative colitis. Light microscopy and scanning electron microscopy studies with reference to the morphology of the healthy large intestine]. *Langenbecks Arch Chir* 380:253-259.
96. Foitzik T, Kruschewski M, Kroesen A, Buhr HJ (1999) Does microcirculation play a role in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases? Answers from intravital microscopic studies in animal models. *Int J Colorectal Dis* 14:29-34.

97. Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14:519-522.
98. Kim HS, Berstad A (1992) Experimental colitis in animal models. *Scand J Gastroenterol* 27:529-537.
99. Yamada Y, Marshall S, Specian RD, Grisham MB (1992) A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* 102:1524-1534.
100. Shibata Y, Taruishi M, Ashida T (1993) Experimental ileitis in dogs and colitis in rats with trinitrobenzene sulfonic acid--colonoscopic and histopathologic studies. *Gastroenterol Jpn* 28:518-527.
101. Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W (1995) Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182:1281-1290.
102. Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, et al. (1996) Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol* 157:2174-2185.
103. Dohi T, Fujihashi K, Rennert PD, Iwatani K, Kiyono H, McGhee JR (1999) Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses. *J Exp Med* 189:1169-1180.
104. Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL (1989) Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 96:29-36.
105. Higa A, McKnight GW, Wallace JL (1993) Attenuation of epithelial injury in acute experimental colitis by immunomodulators. *Eur J Pharmacol* 239:171-176.
106. Beagley KW, Black CA, Elson CO (1991) Strain differences in susceptibility to TNBS-induced colitis. *Gastroenterology* 100:A560.
107. Wirtz S, Neurath MF (2000) Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 15:144-160.
108. Hogaboam CM, Muller MJ, Collins SM, Hunt RH (1996) An orally active non-selective endothelin receptor antagonist, bosentan, markedly reduces injury in a rat model of colitis. *Eur J Pharmacol* 309:261-269.
109. Gulluoglu BM, Kurtel H, Gulluoglu MG, et al. (1999) Role of endothelins in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Digestion* 60:484-492.

110. Padol I, Huang JQ, Hogaboam CM, Hunt RH (2000) Therapeutic effects of the endothelin receptor antagonist Ro 48-5695 in the TNBS/DNBS rat model of colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12:257-265.
111. Arndt H, Palitzsch KD, Anderson DC, Rusche J, Grisham MB, Granger DN (1995) Leucocyte-endothelial cell adhesion in a model of intestinal inflammation. *Gut* 37:374-379.
112. Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068-2101.
113. del Zoppo GJ (1997) Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 823:132-147.
114. Panes J, Granger DN (1998) Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 114:1066-1090.
115. Sanz MJ, Johnston B, Issekutz A, Kubes P (1999) Endothelin-1 causes P-selectin-dependent leukocyte rolling and adhesion within rat mesenteric microvessels. *Am J Physiol* 277:H1823-1830.
116. Vapaatalo H, Mervaala E (2001) Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit* 7:1075-1085.
117. Albelda SM, Smith CW, Ward PA (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J* 8:504-512.
118. Jones SC, Banks RE, Haidar A, et al. (1995) Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gut* 36:724-730.
119. Koizumi M, King N, Lobb R, Benjamin C, Podolsky DK (1992) Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 103:840-847.
120. Malizia G, Calabrese A, Cottone M, et al. (1991) Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100:150-159.
121. Binion DG, West GA, Ina K, Ziats NP, Emancipator SN, Fiocchi C (1997) Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 112:1895-1907.
122. Binion DG, West GA, Volk EE, et al. (1998) Acquired increase in leucocyte binding by intestinal microvascular endothelium in inflammatory bowel disease. *Lancet* 352:1742-1746.

123. Nakamura S, Ohtani H, Watanabe Y, et al. (1993) In situ expression of the cell adhesion molecules in inflammatory bowel disease. Evidence of immunologic activation of vascular endothelial cells. *Lab Invest* 69:77-85.
124. Oda M, Han JY, Nakamura M (2000) Endothelial cell dysfunction in microvasculature: relevance to disease processes. *Clin Hemorheol Microcirc* 23:199-211.
125. Bertuglia S, Colantuoni A, Intaglietta M (1993) Effect of leukocyte adhesion and microvascular permeability on capillary perfusion during ischemia-reperfusion injury in hamster cheek pouch. *Int J Microcirc Clin Exp* 13:13-26.
126. He P, Wang J, Zeng M (2000) Leukocyte adhesion and microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1686-1694.
127. Michel CC, Curry FE (1999) Microvascular permeability. *Physiol Rev* 79:703-761.
128. Muckart DJ, Bhagwanjee S (1997) American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* 25:1789-1795.
129. Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ (2000) Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery* 128:399-407.
130. Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ (1998) [Endothelin receptor block in acute pancreatitis--improvement of microcirculation and decrease of capillary permeability also distant from the pancreas]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 115:427-429.
131. Lush CW, Kvietys PR (2000) Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation* 7:83-101.
132. Foitzik T, Hotz HG, Kinzig M, et al. (1996) Improvement of pancreatic capillary blood flow does not augment the pancreatic tissue concentration of imipenem in acute experimental pancreatitis. *Eur Surg Res* 28:395-401.
133. Foitzik T, Stufler M, Hotz HG, et al. (1997) Glutamine stabilizes intestinal permeability and reduces pancreatic infection in acute experimental pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 1:40-46; discussion 46-47.
134. Foitzik T, Hotz HG, Kinzig M, Sorgel F, Buhr HJ (1997) Influence of changes in pancreatic tissue morphology and capillary blood flow on antibiotic tissue concentrations in the pancreas during the progression of acute pancreatitis. *Gut* 40:526-530.

135. Hotz HG, Foitzik T, Rohweder J, et al. (1998) Intestinal microcirculation and gut permeability in acute pancreatitis: early changes and therapeutic implications. *J Gastrointest Surg* 2:518-525.
136. Karnik AM, Bashir R, Khan FA, Carvounis CP (1998) Renal involvement in the systemic inflammatory reaction syndrome. *Ren Fail* 20:103-116.
137. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F, Jr. (1976) Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70:439-444.
138. Lankisch PG, Pohl U, Otto J, Rahlf G (1988) When should treatment of acute experimental pancreatitis be started? The early phase of bile-induced acute pancreatitis. *Res Exp Med (Berl)* 188:123-129.
139. Leppaluoto J, Ruskoaho H (1992) Endothelin peptides: biological activities, cellular signalling and clinical significance. *Ann Med* 24:153-161.
140. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415.
141. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T (1989) The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 264:14954-14959.
142. Nakamura S, Naruse M, Naruse K, Demura H, Uemura H (1990) Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry* 94:475-477.
143. Rubanyi GM, Polokoff MA (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46:325-415.
144. McMillen MA, Sumpio BE (1995) Endothelins: polyfunctional cytokines. *J Am Coll Surg* 180:621-637.
145. Levin ER (1995) Endothelins. *N Engl J Med* 333:356-363.
146. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348:730-732.
147. Traish AM, Moran E, Saenz de Tejada I (1991) Physicochemical characterization and solubilization of endothelin receptors. *Receptor* 1:229-242.
148. Simonson MS, Dunn MJ (1990) Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *Faseb J* 4:2989-3000.
149. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, et al. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348:732-735.
150. Urade Y, Fujitani Y, Oda K, et al. (1992) An endothelin B receptor-selective antagonist: IRL 1038, [Cys11-Cys15]-endothelin-1(11-21). *FEBS Lett* 311:12-16.

151. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 268:19126-19133.
152. Deniz M, Cetinel S, Kurtel H (2004) Blood flow alterations in TNBS-induced colitis: role of endothelin receptors. *Inflamm Res* 53:329-336.
153. Anthoni C, Mennigen RB, Rijcken EJ, et al. (2006) Bosentan, an endothelin receptor antagonist, reduces leucocyte adhesion and inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 21:409-418.
154. Plusczyk T, Bersal B, Westermann S, Menger M, Feifel G (1999) ET-1 induces pancreatitis-like microvascular deterioration and acinar cell injury. *J Surg Res* 85:301-310.
155. Plusczyk T, Bersal B, Menger MD, Feifel G (2001) Differential effects of ET-1, ET-2, and ET-3 on pancreatic microcirculation, tissue integrity, and inflammation. *Dig Dis Sci* 46:1343-1351.
156. Naicker S, Bhoola KD (2001) Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol Ther* 90:61-88.
157. Pollock DM (2001) Endothelin antagonists in the treatment of renal failure. *Curr Opin Investig Drugs* 2:513-520.
158. Miura S, Kurose I, Fukumura D, et al. (1991) Ischemic bowel necrosis induced by endothelin-1: an experimental model in rats. *Digestion* 48:163-172.
159. Filep JG, Sirois MG, Rousseau A, Fournier A, Sirois P (1991) Effects of endothelin-1 on vascular permeability in the conscious rat: interactions with platelet-activating factor. *Br J Pharmacol* 104:797-804.
160. McCartney SA, Ballinger AB, Vojnovic I, Farthing MJ, Warner TD (2002) Endothelin in human inflammatory bowel disease: comparison to rat trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Life Sci* 71:1893-1904.
161. Lienenluke B, Stojanovic T, Fiebig T, Fayyazi A, Germann T, Hecker M (2001) Thalidomide impairment of trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in the rat - role of endothelial cell-leukocyte interaction. *Br J Pharmacol* 133:1414-1423.
162. Boros M, Massberg S, Baranyi L, Okada H, Messmer K (1998) Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology* 114:103-114.
163. Souto JC, Martinez E, Roca M, et al. (1995) Prothrombotic state and signs of endothelial lesion in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 40:1883-1889.

164. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V (1998) The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. Bosentan Hypertension Investigators. *N Engl J Med* 338:784-790.
165. Wenzel RR, Fleisch M, Shaw S, et al.(1998) Hemodynamic and coronary effects of the endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease. *Circulation* 98:2235-2240.
166. Sutsch G, Kiowski W, Yan XW, et al. (1998) Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 98:2262-2268.
167. Williamson DJ, Wallman LL, Jones R, et al. (2000) Hemodynamic effects of Bosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with pulmonary hypertension. *Circulation* 102:411-418.
168. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, et al. (2001) Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358:1119-1123.
169. Kramer BK, Ittner KP, Beyer ME, Hoffmeister HM, Riegger GA (1997) Circulatory and myocardial effects of endothelin. *J Mol Med* 75:886-890.
170. Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, et al. (1996) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects. *Clin Pharmacol Ther* 60:124-137.
171. Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, et al. (1999) Multiple-dose pharmacokinetics, safety, and tolerability of bosentan, an endothelin receptor antagonist, in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 39:703-714.
172. Angerio AD, Bufalino D, Bresnick M, Bell C, Brill S (2005) Inflammatory bowel disease and endothelin-1: a review. *Crit Care Nurs Q* 28:208-213.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
BGA	Blutgasanalyse
°C	Grad Celsius
cbf	Kapillärer Blutfluß
CDAI	Crohn's disease activity index
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Da	Dalton
DSS	Dextran sulfate sodium (Dextran-Natriumsulfat)
ET-RA	Endothelin-Rezeptor-Antagonist
f_{FITC}	Markierte Erythrozyten pro Minute und Kapillare
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-Dextran	Fluorescein-Isothiocyanate-Dextran
fKD	Funktionelle Kapillardichte
GPM	Gefäßpermeabilität
HE	Hämatoxylin-Eosin
Htk	Hämatokrit
Kap.	Kapitel
kg KG	Kilogramm-Körpergewicht
LS	Leukozytensticking
n_{FITC}	Markierte Erythrozyten pro Nanoliter
nl/cap/min	Nanoliter/Kapillare/Minute
NOD2	Nucleotid-bindende Oligomerisations-Domäne 2
SEM	Standard Error of Mean
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
Std.	Stunde
T61 [®]	Embrutamid und Mebenzoniumjodid
TNBS	Trinitrobenzonsulfonsäure
TNF	tumor necrosis factor
V	Volumetrischer Blutfluss
V.	Vena

8. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Martin Kruschewski für die Überlassung des Themas dieser Promotionsarbeit und die damit verbundene Möglichkeit, Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten zu erlangen. Außerdem möchte ich ihm für die intensive Betreuung, die zahlreichen anregenden Diskussionen sowie für seine vielen aufmunternde Worte in schwierigen Momenten während der Erstellung meiner Arbeit ganz herzlich danken.

Dank gebührt auch den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Birgit Hotz und Frau Annette Panhorst. Durch ihren mehrfachen Rat und ihre Hilfsbereitschaft wurde mir vieles erleichtert. Ferner bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des gesamten chirurgischen Forschungslabors für die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren gebührt Frau Dr. med. Alejandra Perez-Cantó und Herrn Prof. Dr. med. Christoph Loddenkemper aus dem Institut für Pathologie der Charité – Campus Benjamin Franklin Dank für die Hilfe bei der Herstellung der HE-Schnitte und v.a. für die verblindete Bewertung der Präparate nach dem Colitis-Score.

Nicht zuletzt gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, meinem Bruder, meinem Mann, meiner Tochter und meinem Sohn für die grenzenlose Unterstützung, ohne die mein Studium und diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären.

9. ERKLÄRUNG

Ich, Tanja Anderson, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Effekt von Endothelin-1 und Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist auf die Mikrozirkulation bei TNBS-Colitis selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

19.8.2009

Tanja Anderson

10. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. PUBLIKATIONSLISTE**ORIGINALPUBLIKATIONEN**

Kruschewski M, Savic T, Foitzik Th, Loddenkemper C, Buhr HJ
Die selektive COX-2-Inhibition reduziert das Leukozytensticking und verbessert die Mikrozirkulation bei der TNBS-Colitis
Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Forumband 2002, Band 31, S. 153-155

Kruschewski M, Anderson T, Buhr HJ, Loddenkemper C
Selective COX-2 Inhibition Reduces Leukocyte Sticking and Improves the Microcirculation in TNBS Colitis.
Dig Dis Sci. 2006 April; 51(4):662-70

Kruschewski M, Anderson T, Loddenkemper C, Buhr HJ
Endothelin-1 Receptor Antagonist (LU-135252) Improves the Microcirculation and Course of TNBS Colitis in Rats.
Dig Dis Sci. 2006 Jul 26; 51(8):1461-1470

ABSTRACTS

Kruschewski M, Savic T, Foitzik Th, Loddenkemper C, Buhr HJ
Stabilisierung der erhöhten Kapillarpermeabilität bei der TNBS-Colitis durch Endothelin-Rezeptorblockade
UKBF Jahrbuch (2000), S. 365, ISDN 3-9806076-8-2

Kruschewski M, Savic T, Loddenkemper C, Buhr HJ
Die selektive COX-2-Inhibition reduziert das Leukozytensticking und verbessert die Mikrozirkulation bei der TNBS-Colitis
UKBF Jahrbuch (2002), S. 387, ISDN 3-9806076-0-7

VORTRÄGE

Savic T

Einfluß von Endothelin- und COX-2 Antagonisten auf die TNBS-Colitis

4. Workshop Chirurgische Forschung der Chirurgischen Klinik I des
Universitätsklinikums Benjamin Franklin, Berlin 2001

Kruschewski M, Savic T, Foitzik Th, Loddenkemper C, Buhr HJ

Die selektive COX-2-Inhibition reduziert das Leukozytensticking und verbessert
die Mikrozirkulation bei der TNBS-Colitis

Chirurgisches Forum, 119. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie,
Berlin, 7.5.-10.5.2002