

Aus dem  
CharitéCentrum 10 für Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin  
Chirurgische Klinik und Hochschulambulanz I - Campus Benjamin Franklin  
Allgemein-, Gefäß- und Thoraxchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. H. J. Buhr

## **Habilitationsschrift**

### **Die Bedeutung der Mikrozirkulation für Pathogenese und Verlauf der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen - Tierexperimentelle Untersuchungen an Colitis-Modellen der Ratte**

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Chirurgie  
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Martin Kruschewski

eingereicht: 31. August 2007

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. med. J. R. Izbicki

2. Gutachter: Prof. Dr. med. S. Schreiber

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1.	Hintergrund	1
1.1.1.	Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	1
1.1.2.	Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	4
1.1.3.	Die Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	5
1.1.4.	Eigene Vorarbeiten	9
1.1.4.1.	Krankengut und Methode	10
1.1.4.2.	Befunde	11
1.1.4.2.1.	Tela subserosa und Tunica muscularis des Kolons	11
1.1.4.2.2.	Tela subserosa und Tunica muscularis bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	11
1.1.4.2.3.	Tela submucosa des Kolons	12
1.1.4.2.4.	Tela submucosa bei Morbus Crohn	12
1.1.4.2.5.	Tela submucosa bei Colitis ulcerosa	12
1.1.4.2.6.	Tunica mucosa des Kolons	13
1.1.4.2.7.	Tunica mucosa bei Morbus Crohn	13
1.1.4.2.8.	Tunica mucosa bei Colitis ulcerosa	13
1.1.4.3.	Zusammenfassung	13
1.1.4.4.	Diskussion	14
1.2.	Zielsetzung und Fragestellung	18
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODE</b>	<b>23</b>
2.1.	Tierexperimente	23
2.1.1.	Versuchstiere	23
2.1.2.	Colitis-Induktion	23
2.1.2.1.	TNBS-Colitis-Modell	23
2.1.2.2.	Mitomycin C-Colitis-Modell	24
2.1.3.	Präparation	24
2.1.4.	Intravitalmikroskopie	25
2.1.4.1.	Kapillärer Blutfluss	26
2.1.4.2.	Funktionelle Kapillardichte	29
2.1.4.3.	Gefäßpermeabilität	29
2.1.4.4.	Leukozytensticking	29
2.1.5.	Weitere Zielparameter	31
2.1.6.	Versuchsaufbau	31
2.1.6.1.	Pilotstudie (Gruppen Ia-f)	31
2.1.6.2.	Colitis-Induktionsstudien (Gruppen II-V)	32
2.1.6.2.1.	TNBS-Modell (Gruppen IIa-c)	32
2.1.6.2.2.	TNBS-Kontrollgruppe (Gruppen IIIa-c)	33
2.1.6.2.3.	Mitomycin C-Modell (Gruppen IVa-c)	33
2.1.6.2.4.	Mitomycin C-Kontrollgruppe (Gruppen Va-c)	34
2.1.6.3.	Interventionsstudie (Gruppen VIa-e)	35
2.1.6.3.1.	Versuchsaufbau	35
2.1.7.	Histologie	37
2.1.8.	Ausschlusskriterien	38
2.1.9.	Statistik	38
2.2.	Krankengut	40
2.2.1.	Histologischer Colitis-Score	42
2.2.2.	Immunhistologie	42

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
3.1.	Pilotstudie (Gruppen Ia-f)	44
3.1.1.	Kapillärer Blutfluss im Bereich der Serosa (Gruppen Ia-c)	44
3.1.2.	Kapillärer Blutfluss im Bereich der Mukosa (Gruppen Id-f)	44
3.2.	Colitis-Induktionsstudie (Gruppen II-V)	45
3.2.1.	TNBS-Modell (Gruppen IIa-c und IIIa-c)	47
3.2.1.1.	Kapillärer Blutfluss bei TNBS-Colitis (Gruppen IIa-c)	48
3.2.1.2.	Kapillärer Blutfluss bei TNBS-Kontrolltieren (Gruppen IIIa-c)	48
3.2.1.3.	Histologie bei TNBS-Colitis (Gruppen IIa-c)	49
3.2.1.4.	Histologie bei TNBS-Kontrolltieren (Gruppen IIIa-c)	52
3.2.2.	Mitomycin C-Modell (Gruppen IVa-c und Va-c)	53
3.2.2.1.	Kapillärer Blutfluss bei Mitomycin C-Colitis (Gruppen IVa-c)	54
3.2.2.2.	Kapillärer Blutfluss bei Mitomycin C-Kontrolltieren (Gruppen Va-c)	54
3.2.2.3.	Histologie bei Mitomycin C-Colitis (Gruppen IVa-c)	56
3.2.2.4.	Histologie bei Mitomycin C-Kontrolltieren (Gruppen Va-c)	57
3.3.	Interventionsstudie (Gruppen VIa-e)	60
3.3.1.	Kapillärer Blutfluss der Gruppen VIa1-e1	60
3.3.2.	Funktionelle Kapillardichte der Gruppen VIa1-e1	61
3.3.3.	Gefäßpermeabilität der Gruppen VIa1-e1	62
3.3.4.	Leukozytensticking der Gruppen VIa2-e2	64
3.3.5.	Gewichtsverlauf der Gruppen VIa-e	65
3.3.6.	Hämatokrit der Gruppen VIa-e	67
3.3.7.	Urinausscheidung der Gruppen VIa-e	69
3.3.8.	Stuhlqualität der Gruppen VIa-e	69
3.3.9.	Histologie der Gruppen VIa-e	70
3.4.	Krankengut	74
3.4.1.	Auftreten einer Vasculitis im gesunden Kolon	74
3.4.2.	Auftreten einer Vasculitis bei Morbus Crohn	75
3.4.3.	Auftreten einer Vasculitis bei Colitis ulcerosa	75
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>82</b>
4.1.	Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	82
4.2.	Die Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	82
4.2.1.	Morphologische Untersuchungen der Mikrozirkulation	83
4.2.1.1.	Eigene Vorarbeiten	84
4.2.2.	Funktionelle Untersuchungen der Mikrozirkulation	84
4.2.3.	Weitere Hinweise auf die Bedeutung der Mikrozirkulation	85
4.2.4.	Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen über die Mikrozirkulation	87
4.3.	Tierexperimente	88
4.3.1.	Material und Methode	88
4.3.1.1.	Angioarchitektur des Kolons beim Menschen und bei der Ratte	88
4.3.1.2.	Tiermodelle der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	92
4.3.1.2.1.	Auswahl der Tiermodelle	94
4.3.1.2.2.	Charakterisierung des TNBS-Colitis-Modells	96
4.3.1.2.3.	Charakterisierung des Mitomycin C-Colitis-Modells	97
4.3.1.2.4.	Vergleich des TNBS- und des Mitomycin C-Colitis-Modells mit den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	98
4.3.1.3.	Methodik der Intravitalmikroskopie	98
4.3.1.3.1.	Präparation der Tiere	98
4.3.1.3.2.	Parameter der Mikrozirkulation	100
4.3.1.4.	Histologischer Colitis-Score	101

4.3.2.	Ergebnisse	101
4.3.2.1.	Pilotstudie (Gruppen Ia-f)	101
4.3.2.2.	Colitis-Induktionsstudie (Gruppen II-V)	102
4.3.2.2.1.	Evaluation des TNBS-Colitis-Modells (Gruppen IIa-c und IIIa-c)	103
4.3.2.2.2.	Evaluation des Mitomycin C-Colitis-Modells (Gruppen IVa-c und Va-c)	105
4.3.2.2.3.	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen der Colitis-Induktionsstudie	105
4.3.2.2.4.	Hypothese aus der Colitis-Induktionsstudie	106
4.3.2.3.	Interventionsstudie (Gruppen VIa-e)	106
4.3.2.3.1.	Wahl des Colitis-Modells	108
4.3.2.3.2.	Versuchsaufbau	109
4.3.2.3.3.	Zielparameter	109
4.3.2.3.4.	Charakterisierung der Testsubstanzen	111
4.3.2.3.4.1.	Endothelin-1	111
4.3.2.3.4.2.	Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist LU-135252	113
4.3.2.3.4.3.	Selektiver COX-2-Inhibitor NS-398	114
4.3.2.3.5.	Ergebnisse	116
4.3.2.3.5.1.	Kontrollgruppe (VIa)	116
4.3.2.3.5.2.	Colitisgruppe (VIb)	117
4.3.2.3.5.3.	Endothelingrouppe (Gruppe VIc)	117
4.3.2.3.5.4.	Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (VIId)	118
4.3.2.3.5.5.	COX-2-Gruppe (VIe)	119
4.3.2.3.5.6.	Gruppenvergleich (VIa-e)	120
4.3.2.3.6.	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen aus der Interventionsstudie	122
4.3.2.3.7.	Hypothese aus der Interventionsstudie	124
4.4.	Krankengut	125
4.4.1.	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	127
5.	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>128</b>
5.1.	Hintergrund	128
5.2.	Zielsetzung der Pilotstudie (Gruppen Ia-f)	130
5.3.	Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus der Pilotstudie (Gruppen Ia-f)	130
5.4.	Zielsetzung der Colitis-Induktionsstudie (Gruppen II-V)	130
5.5.	Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus der Colitis-Induktionsstudie (Gruppen II-V)	131
5.6.	Zielsetzung der Interventionsstudie (Gruppen VIa-e)	132
5.7.	Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus der Interventionsstudie (Gruppen VIa-e)	132
5.8.	Krankengut	133
5.9.	Ausblick	134
6.	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>136</b>
7.	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>158</b>
8.	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>160</b>
9.	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>161</b>

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1. Hintergrund**

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

Der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa sind chronisch rezidivierend verlaufende entzündliche Darmerkrankungen, deren Ätiologie und Pathogenese trotz intensiver Forschungsbemühungen bislang nicht eindeutig definiert werden konnte. Daher gibt es weiterhin keine kausale Therapie. Zur Verfügung stehen sowohl konservative als auch operative Behandlungsoptionen, die als symptomatisch bzw. palliativ anzusehen sind, da eine eigentliche Heilung i. S. einer restitutio ad integrum nicht möglich ist.

Der Morbus Crohn wurde 1932 von dem Gastroenterologen Burrill B. Crohn und den Pathologen Leon Ginzburg und Gordon D. Oppenheimer, die am Mt. Sinai Hospital in New York City tätig waren, als eigenständige nosologische Entität beschrieben. Einem Vortrag vor der American Gastroenterological Association (AGA) im Mai 1932 folgte im selben Jahr die bahnbrechende Arbeit unter dem Titel "Regional ileitis. A pathologic and clinical entity." [1]. Die "terminale Ileitis" war allerdings schon vorher bekannt, nur war sie in ihrer klinischen Bedeutung nicht erfasst worden. Insbesondere die 1923 erschienene Arbeit von Moschcowitz und Wilensky, vom Mt. Sinai und Beth Israel Hospital, mit dem Titel "Non-specific granulomata of the intestine" sei in diesem Zusammenhang hervorgehoben [2]. Das Konzept eines im gesamten Gastrointestinaltrakt auftretenden Morbus Crohn sowie das Vorkommen einer isolierten granulomatösen Colitis (Colitis Crohn) fanden allerdings erst nach 1960 durch die Arbeiten von Lockhart-Mummery und Morson allgemeine Anerkennung [3, 4].

Die Colitis ulcerosa wurde bereits 1875 von den englischen Pathologen Samuel Wilks und Walter Moxon als "eigenständiges Syndrom" recht gut beschrieben [5]. Die erste grundlegende Symptomatologie lieferte 1885 William Henry Allchin, der neben den klinischen auch die Obduktionsbefunde eines einschlägigen Kasus detailliert darstellte [6]. Im Anschluss formulierte er die auch heute noch außerordentlich aktuelle Sentenz: "The etiology of the case is doubtless most obscure".

Die Differenzierung in zwei nosologische Entitäten ist das Verdienst von Lennard-Jones, der zusammen mit Lockhart-Mummery und Morson 1968 Regeln für die Diagnose nach klinischen, radiologischen, endoskopischen und morphologischen Befunden aufstellte [7].

Neben einer Reihe von Gemeinsamkeiten gibt es zahlreiche Unterschiede zwischen beiden Erkrankungen (Tabelle 1, Seite 2). Dennoch kann die sichere Differenzierung, insbesondere bei alleinigem Befall von Kolon und Rektum, im Einzelfall schwierig sein, worauf die Subsumtion unter dem Begriff "chronisch entzündliche Darmerkrankungen" hinweist. In ca. 10% der Fälle wird daher (zunächst) eine sog. Colitis indeterminata diagnostiziert [8, 9].

	<b>Morbus Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
	<b>Unterschiede</b>	
<b>Lokalisation</b>	gesamter Gastrointestinaltrakt	Rektum (95%) und Kolon (back wash ileitis)
<b>Ausbreitung</b>	diskontinuierlich, disproportional	kontinuierlich (von aboral nach oral), proportional
<b>Befall</b>	transmural	im wesentlichen auf die Schleimhaut beschränkt
<b>Histologische Besonderheiten</b>	Epitheloidzellige Granulome, Fissuren	Kryptenabszesse, Becherzellverlust, Schleimhautumbau, Ulceration
<b>Komplikationen</b>	Fistel, Abszess, Striktur, Karzinom	Blutung, Toxisches Megacolon, Karzinom
	<b>Gemeinsamkeiten</b>	
<b>Verlauf</b>	chronisch rezidivierend	chronisch rezidivierend
<b>Symptome</b>	Abdominelle Schmerzen, Gewichtsverlust, Diarrhoe, Fieber	Diarrhoe, rektale Blutung, Abdominelle Schmerzen, Fieber, Gewichtsverlust
<b>Altersgipfel</b>	III. Dekade	III. Dekade
<b>Extraintestinale Begleit-erkrankungen</b>	Augen: Iridocyclitis, Uveitis Gelenke: Sakroiliitis, Monarthritis, Polyarthritis Haut: Erythema nodosum, (Pyoderma gangraenosum) Leber: Primär sklerosierende Cholangitis	Augen: Iridocyclitis, Uveitis Gelenke: Sakroiliitis, Monarthritis, Polyarthritis Haut: Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum Leber: Primär sklerosierende Cholangitis
<b>Konservative Therapie</b>	Kortikosteroide (lokal, systemisch) 5-Aminosalicylsäure Salazosulfapyridin (Azathioprin, Methotrexat, Cyclosporin)	Kortikosteroide (lokal, systemisch) 5-Aminosalicylsäure Salazosulfapyridin (Azathioprin, Methotrexat, Cyclosporin)

**Tabelle 1:** Nosologischer Vergleich von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (modifiziert nach [7]).

Die sichere Diagnose ist insbesondere für die (elektive) chirurgische Therapie von entscheidender Bedeutung, da hier ganz unterschiedliche Therapiekonzepte bestehen. Während bei der Colitis ulcerosa bei Versagen der konservativen Therapie oder bei Karzinom (-verdacht) die (radikale) restaurative Koloproktomukosektomie mit ileoanaler Pouchrekonstruktion indiziert ist, wird beim Morbus Crohn, außer bei Karzinom, "sparsam" operiert. Hier erfolgen Strikturoplastiken, limitierte Resektionen und Übernähungen von Einschussfisteln. Das Ziel beim Morbus Crohn ist es, anders als bei der Colitis ulcerosa, bei der das Erfolgsorgan komplett entfernt wird und so eine "Heilung" des Patienten im Gastrointestinaltrakt erzielt wird, möglichst viel Dünndarm zu erhalten, um ein sog. Kurz-Darm-Syndrom zu vermeiden. Der Morbus Crohn ist somit chirurgisch nicht "heilbar" [8, 10].

Es war Burrill B. Crohn, der 1925 zusammen mit H. Rosenberg den ersten Fall von Darmkrebs bei Colitis ulcerosa veröffentlichte [11]. Allerdings wurde dieser Beobachtung zunächst nur geringe Aufmerksamkeit geschenkt. Schließlich konnten Morson und Pang 1967 den Zusammenhang zwischen Dysplasie und Karzinom bei Colitis ulcerosa aufzeigen [12]. Das Entartungsrisiko der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist abhängig von der Erkrankungsdauer und der Ausdehnung der Colitis. Bei einer Pancolitis beträgt es nach 10 Jahren bis zu 5%, nach 20 Jahren bis zu 25% und nach 30 Jahren sogar bis zu 40% [13-18]. Weniger eindeutig ist die Datenlage beim Morbus Crohn, doch auch hier scheint ein erhöhtes Risiko verglichen mit der Normalbevölkerung vorzuliegen [19-21].

Die Inzidenz beträgt für beide Erkrankungen 7 bis 15/100.000 Einwohner pro Jahr [22-24]. Da es sich überwiegend um junge Menschen handelt (s. Tabelle 1, Seite 2), kommt es zu einer ansteigenden Prävalenz. Man rechnet heute in Mitteleuropa mit 90-300 Erkrankten/100.000 Einwohner [25-27].

Zusammenfassend stellen die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weiterhin ein drängendes klinisch und wissenschaftlich relevantes Problem dar, zumal die etablierte konservative (Langzeit-)Therapie mit z. T. schwerwiegenden Nebenwirkungen behaftet ist, z.B. Cushing-Syndrom, Osteoporose, Knochenmarkschädigung [28, 29].

### **1.1.2. Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Obwohl die auslösenden ätiologischen Faktoren für die Entstehung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weitgehend unklar sind, weisen die vorliegenden Daten auf die Bedeutung genetischer und immunologischer Mechanismen hin, wobei Umwelteinflüsse ebenfalls eine Rolle spielen dürften.

Familienuntersuchungen beschreiben die gehäufte Prävalenz von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen innerhalb dieses Kreises und deuten zusammen mit Zwillingsuntersuchungen darauf hin, dass eine genetische Prädisposition bestehen muß [30]. Dabei ist interessanterweise sowohl die Inzidenz vom Morbus Crohn in "Colitis ulcerosa-Familien" erhöht als auch umgekehrt. Hinweise für die Bedeutung von Umweltfaktoren wurden durch die Zunahme der Inzidenz der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit zunehmender Industrialisierung und Entwicklung gewonnen [31].

Neben den epidemiologischen Befunden bestehen Hinweise auf eine gestörte Immunregulation bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die wahrscheinlich genetisch determiniert ist. Die frühesten morphologisch fassbaren Veränderungen der akuten Entzündung intestinaler Schleimhäute bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bestehen in einer Infiltration der Mukosa mit Granulozyten und mononukleären Phagozyten, später auch mit Lymphozyten, als Reaktion des intestinalen Immunsystems auf eine noch unklare Noxe. So sind im Bereich der T-Zell-vermittelten Immunreaktion eine erhöhte Frequenz aktivierter T-Zellen sowie eine erhöhte Proliferationsrate mukosaler T-Zellen von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gegenüber bakteriellen Antigenen beschrieben worden [32]. Weiter gibt es Hinweise, dass ein genetisch determinierter Toleranzverlust gegenüber der eigenen Flora zu einer überschießenden immunologischen Reaktion gegen "normale" Bestandteile des Darminhaltes führt [33-37]. Im Jahre 2001 gelang es zwei voneinander unabhängigen Forschergruppen, eine relevante Mutation beim Morbus Crohn nachzuweisen. Die dabei gefundene NOD2-Genmutation ist mit der fibrostenotischen Form des Morbus Crohn assoziiert. NOD2 ist ein putativer intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Peptidoglycane. Die molekularen Mechanismen, die einen Zusammenhang zwischen dem Protein und der Pathogenese des Morbus Crohn herstellen, sind allerdings bislang unklar [38-41]. NOD2 (CARD15), welches zu einer größeren Proteinfamilie gehört, die für die Abwehr einer bakteriellen Invasion in den Organismus verantwortlich ist, triggert möglicherweise die Pathogenese des Morbus Crohn. Allerdings muss nach weiteren Ursachen gefahndet

werden, da entsprechende Mutationen bei weniger als der Hälfte der Patienten am Krankheitsgeschehen beteiligt sind [42, 43]. Eine Infektion durch spezifische Erreger, wobei insbesondere beim Morbus Crohn *Mycobacterium paratuberculosis* [44-46] oder auch eine persistierende Maserninfektion des Gefäßendothels [47-49] diskutiert werden, konnte bisher nicht bewiesen werden.

### **1.1.3. Die Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Nach einer erstmals 1989 in Lancet publizierten Hypothese der Arbeitsgruppe um Wakefield kommt es als Reaktion auf eine im Gefäßendothel persistierende Maserninfektion zu einer chronisch granulomatösen Vasculitis, deren Folge eine Ischämie auf dem Boden eines multifokalen Infarktgeschehens ist, welche die morphologischen Alterationen, z.B. Nekrose des Epithels, bewirkt [49-51]. Bei dieser Theorie bildet somit das Endothel, und nicht das Epithel, den primären Angriffspunkt der Entzündungskaskade.

Allerdings sind die Gefäße und deren Bedeutung im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen schon seit langer Zeit Gegenstand des Forschungsinteresses. Bereits 1933, ein Jahr nach der Publikation über die "regionale Ileitis" [1], beschrieben die damaligen Co-Autoren Ginzburg und Oppenheimer die klinischen und pathomorphologischen Parallelen zwischen dem Morbus Crohn und der ischämischen Colitis [52]. Den Zusammenhang zwischen Ischämie und Entzündung untersuchten 1969 Marston et al. in einer tierexperimentellen Untersuchung. Sie konnten an Hunden zeigen, dass die mechanische Verlegung der Kolondurchblutung zu unterschiedlich schwergradigen Schleimhautulcerationen führt [53]. Aber auch das Vorkommen einer lokalen Vasculitis wurde schon frühzeitig mitgeteilt. In einer von Warren und Sommers 1949 publizierten Studie über Colitis ulcerosa wurden 19 derartige Fälle beobachtet [54].

Ende der 60er Jahre erschienen mehrere angiographische Untersuchungen, deren Hauptanliegen jedoch weniger die morphologische Charakterisierung als vielmehr die Differenzierung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa war [55-58]. Die Ergebnisse waren hinsichtlich der nosologischen Differenzierung, der Stadieneinteilung (Früh- bzw. Spätstadium) und auch der Bedeutung (primäres oder sekundäres Phänomen) kontrovers.

Da histologische Untersuchungen für die Anschauung des Gefäßverlaufs und des Gefäßmusters nicht geeignet sind [59-61], folgten zu deren Darstellung mikroangiographische Studien an Operationspräparaten, um die bei der Angiographie beobachteten Alterationen der Vascularisation morphologisch detaillierter zu beschreiben. Dabei wurde das Konzept einer ischämischen Ursache für die Entstehung der Ulcerationen von Brahma und Lindström 1970 verworfen. Obwohl sie bei ihren Studien eine anatomische Beziehung von Gefäßen und Ulcera feststellten, hielten sie diese für nicht bedeutsam [62]. Johansson und Mitarbeiter beschrieben 1972 bei beiden Erkrankungen stadienabhängige Befunde, fanden jedoch keine signifikanten Unterschiede, die eine Differenzierung zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa erlaubten [63]. Zu einem gegenteiligen Ergebnis kamen 1983 Thiede und Mitarbeiter; sie waren allerdings die einzigen, die anhand mikroangiographischer Untersuchungen eine Unterscheidung für möglich hielten [64]. Die bislang jüngste mikroangiographische Untersuchung erfolgte 1986. Carr et al. beschrieben eine vom Entzündungsgrad abhängige Hypervascularisation sowohl bei der Colitis ulcerosa als auch bei diffusem Befall des Morbus Crohn. Bei segmentalem Befall des Morbus Crohn stellten sie eine Reduktion v.a. submuköser Gefäße fest [65].

Es ist erstaunlich, dass nach all diesen Bemühungen, die Bedeutung der Gefäße für die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einzuordnen, erst 1989 eine Arbeit erschien, die die klassische Methode der Morphologie zur Beschreibung der Angioarchitektur nutzte. Es war die Arbeitsgruppe um Wakefield, die als erste Aufhellungspräparate nach der von Spalteholz etablierten Methode [66], die seit Anfang des letzten Jahrhunderts bekannt ist, anfertigte [50]. Parallel dazu erfolgten auch elektronenmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen. Aus diesen Ergebnissen entwickelten Wakefield und Mitarbeiter die Hypothese einer multifokalen gastrointestinalen Infarzierung in der Pathogenese des Morbus Crohn, da sie auf dem Boden einer fokalen Arteriitis verschlossene Arterien, vorwiegend im Bereich der Tunica muscularis, beobachteten [50]. Bis dato gab es nur eine weitere Studie, die mittels Rasterelektronenmikroskopie die Gefäße untersuchte. Reynolds fertigte 1971 Korrosionspräparate von Colitis ulcerosa-Resektaten an. Er beschrieb die Angioarchitektur des gesunden Kolons und verschiedener "Stadien" der Colitis ulcerosa, ließ ihre Bedeutung aber offen: "This study has in no way clarified the etiology or primary pathologic process

in chronic ulcerative colitis" [67]. Schäfer et al. publizierten 1992 eine weitere Arbeit, in der sie mittels Aufhellungstechnik die Angioarchitektur beim Morbus Crohn untersuchten [68]. Sie beschrieben eine mit fortschreitendem Entzündungsprozess zerstörte Architektur. Die Gefäßveränderungen erachteten sie als sekundär im Rahmen der Entzündungsreaktion. Leider diskutierten sie ihre Ergebnisse nicht mit der interessanten Hypothese von Wakefield et al. [50].

Unabhängig von der verwandten Methode ist allen morphologischen Studien gemeinsam, dass es problematisch ist, von der Angioarchitektur auf die (pathologische) Funktion zu schließen. Deshalb wurden schon frühzeitig funktionelle Untersuchungen durchgeführt, zunächst 1966 von Bacaner [69]. Er führte bei Patienten mit Colitis ulcerosa mittels Radioisotopen Messungen der lokalen Durchblutung des Colon sigmoideum durch und beschrieb zwei unterschiedliche Zirkulationsmuster. Entweder ließ sich eine verminderte Durchblutung, die als vasculäre Insuffizienz interpretiert wurde, oder aber eine gesteigerte Durchblutung nachweisen, die durch arteriovenöse Shunts bedingt sein sollte. Abgesehen davon, dass derartige Shunts bei den eigenen Voruntersuchungen [70, 71] nicht nachgewiesen werden konnten, zeigt sich an dieser Interpretation des Befundes, wie problematisch es auch umgekehrt ist, funktionelle Befunde ohne detaillierte Kenntnisse der Pathomorphologie einzuordnen.

Weitere Untersuchungen der Durchblutung bei den chronischen Darmerkrankungen führte die Arbeitsgruppe um Hultén durch, die 1977 zwei diesbezügliche Artikel publizierte [72, 73]. Sie untersuchte die Durchblutung in vitro an Operationsresektaten und verglich sie mit den histopathologischen Veränderungen. Bei schwerer Colitis fand sich bei beiden Erkrankungen ein deutlich gesteigerter Blutfluss, insbesondere im Bereich der Mukosa und Submukosa, wo hingegen dieser im Bereich der Muskularis normal war. Bei "ruhender" Colitis war der Blutfluss in allen Schichten normal bzw. eher reduziert. Zu einer deutlichen Reduktion kam es im Fibrorestadium des Morbus Crohn. Die Autoren waren der Ansicht, dass eine gute Übereinstimmung zwischen dem Durchblutungstyp und dem histologisch bestimmten Gefäßmuster bestände.

Durch die technische Entwicklung konnten schließlich weitere in vivo Untersuchungen an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erfolgen. Mit Hilfe der

endoskopischen Spektrophotometrie untersuchte die Arbeitsgruppe um Leung 1989 13 Patienten mit aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung; sie sahen einen gesteigerten Blutfluss. Bei 6 nachuntersuchten in Remission befindlichen Patienten war der Blutfluss wieder normal [74]. Auf gleiche Weise gelangten Tsujii et al. 1995 zu einem anderen Ergebnis; sie beschrieben bei aktiver Colitis ulcerosa eine gestörte Mikrozirkulation der Mukosa mit Kongestion und Hypoxie [75]. Ebenfalls 1995 veröffentlichten Guslandi et al. eine Studie, in der sie Colitis ulcerosa-Patienten mittels endoskopischer Laser-Doppler-Flowmetrie untersuchten. Bei der Messung des rektalen Blutflusses von 20 Patienten mit aktiver bzw. inaktiver Colitis fand sich in beiden Phasen der Erkrankung eine signifikante Reduktion der rektalen Perfusion. Die Autoren sahen in der gestörten Mikrozirkulation einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese der Colitis ulcerosa. Da die Ischämie auch bei inaktiver Colitis nachweisbar war, begünstigt diese möglicherweise das Rezidiv [76].

Neben diesen morphologischen und physiologischen Untersuchungen der Mikrozirkulation gibt es noch eine Reihe weiterer Studien und klinischer Beobachtungen, die auf eine pathogenetische Bedeutung der Durchblutung bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hinweisen.

Einer Literaturübersicht zufolge treten 14% aller Morbus Crohn-Erkrankungen erst jenseits des 60sten Lebensjahres auf [77]. Da sich die Durchblutung allgemein mit zunehmendem Alter verschlechtert, wurde schon vor Jahren das Auftreten eines "Alters-Crohn" mit der Mikrozirkulation in Zusammenhang gebracht [77, 78].

Ebenso wird das Rauchen mit einem ungünstigeren Verlauf des Morbus Crohn als Folge einer verminderten Durchblutung in Verbindung gebracht [79-82]. In einer Interventionsstudie konnte gezeigt werden, dass Morbus Crohn-Patienten, die für mehr als 1 Jahr mit dem Rauchen aufhörten, eine günstigere Prognose bezüglich Erkrankungsrezidiv hatten als weiter rauchende Patienten [83]. Interessanterweise verhält es sich bei der Colitis ulcerosa genau umgekehrt; hier bewirkt die Nikotinzufuhr, sei es durch Inhalation oder über ein Pflaster, einen milderen Verlauf der Erkrankung [79, 84-88].

Die Relevanz der Mikrozirkulation wird durch Arbeiten unterstrichen, die über einen positiven Effekt der Heparin-Gabe auf den Verlauf der chronischen entzündlichen Darmerkrankungen berichten [89-91]. In einer zuvor durchgeführten tierexperimentellen

Studie hatte Heparin ebenfalls eine günstige Wirkung auf die Colitis [92]. Eine nachfolgende Untersuchung konnte diese Ergebnisse allerdings nicht nachvollziehen [93]. Eine weitere Bedeutung erfährt die Vascularisation durch eine interessante Beobachtung. Bereits 1970 berichteten Brahme und Lindström bei Morbus Crohn über die anatomische Beziehung zwischen Ulceration und mesenterialer Eintrittsstelle der Arterien in die Tunica muscularis [62]. Dieses Phänomen wurde allerdings lange Zeit ignoriert, bis die Arbeitsgruppe um Wakefield es eingehender untersuchte und diesen Zusammenhang bestätigen konnte [94-96].

Und schließlich noch ein bedeutender Befund, der für die Annahme einer Beteiligung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese bzw. des Verlaufs der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spricht. In homogenisierten Gewebeproben von Patienten mit Morbus Crohn resp. Colitis ulcerosa wurden signifikant erhöhte Spiegel von Endothelin, dem stärksten bekannten Vasokonstriktor, nachgewiesen [97-99]. Die lokale Endothelin-Produktion durch Entzündungszellen könnte nach Ansicht der Autoren zu einer intestinalen Ischämie durch Vasokonstriktion führen.

#### **1.1.4. Eigene Vorarbeiten**

Wie bereits oben aufgeführt, war es die Arbeitsgruppe um Wakefield, die 1989 als erste die Angioarchitektur beim Morbus Crohn mit Hilfe von Aufhellungspräparaten sowie mittels elektronenmikroskopischer und rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen beschrieb [50]. Allerdings stand eine systematische vergleichende Untersuchung der beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weiterhin aus. Zur detaillierten Beschreibung der Gefäßarchitektur sowie der terminalen Strombahn bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa erfolgten daher eigene Untersuchungen an frischen Dickdarmresektaten.

Korrosionspräparate ermöglichen mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie bei großer Tiefenschärfe und hohem Auflösungsvermögen die räumliche Darstellung der terminalen Strombahn. Da das umliegende Gewebe aufgrund der Mazeration nicht mehr existiert, kann die Zuordnung zu den einzelnen Schichten allerdings problematisch sein, so dass eine parallele Analyse eines vergleichbaren mikroskopischen Präparates erforderlich ist. Daher erfolgte die Untersuchung von in Wintergrünöl aufgehellten Präparaten, bei denen das Gewebe im Zusammenhang erhalten bleibt und so eine eindeutige Schichtenzuordnung der Gefäßarchitektur ermöglicht.

#### 1.1.4.1. Krankengut und Methode

Es wurden 12 Morbus Crohn- und 8 Colitis ulcerosa-Resektate präpariert und mit tumorfreien Anteilen von 6 Kolon-Karzinom-Resektaten verglichen. Die Patienten-Charakteristika sind in der Tabelle 2 (Seite 11) aufgeführt.

Die Präparation der in gekühlter Ringer-Lösung aufbewahrten Resektate erfolgte innerhalb von 6 Stunden nach der Entnahme. In eine möglichst großlumige Arterie wurde eine Knopfkanüle eingebracht und mittels Naht fixiert. Es erfolgte die Perfusion mit körperwarmer, heparinisierter Ringer-Lösung so lange, bis an den Schnitträndern nur noch klare Lösung austrat und das Gewebe blass erschien. Zur Vermeidung größerer Leckagen wurden an den Schnitträndern Klemmen gesetzt; größere Gefäße wurden ligiert. Die anschließende Injektion der Lösungen erfolgte manuell mittels einer Rekordspritze. Nach Erstarren der Injektionslösung wurden die Präparate über 48 Stunden in Formalin (4%) fixiert; zur weiteren Präparation wurden sie kontramesenterial eröffnet.

Zur Anfertigung von Aufhellungspräparaten wurde bei 5 Morbus Crohn-, 3 Colitis ulcerosa- und 3 Kolon-Karzinom-Resektaten eine ebenfalls kapillargängige, erwärmte und gefilterte Gelatine-Lösung (bestehend aus: 20g Gelatine, 10g Berliner Blau, 10g Glycerin, 0,5g Chloralhydrat und 200ml Wasser) injiziert. Die Präparate wurden in Anlehnung an die Methode von Spalteholz aufgehellt [66]. Die Lagerung erfolgte in Wintergrünöl (Methysalicylat:Benzybenzoat/2:1). Da diese Lösung denselben Lichtbrechungsindex wie die Präparate besitzt, erscheinen diese durchsichtig. Mit einer handelsüblichen Schneidemaschine (Rösen & Roberts Standard) wurden ca. 1mm dicke Längs- und Querschnitte angefertigt. Die Beurteilung erfolgte mit einem Stereomikroskop (M7A, Wild, Heerbrugg, Schweiz, Okular 10 mal, Objektiv stufenlos 6-31 mal). Zur Bestimmung der Entzündungsaktivität wurden von den Aufhellungspräparaten Paraffin-Histologien (Schnittdicke 3-5 $\mu$ , Färbung HE) angefertigt.

Zur Anfertigung von Korrosionspräparaten wurde bei 7 Morbus Crohn-, 5 Colitis ulcerosa- und 3 Kolon-Karzinom-Resektaten der kapillargängige Kunststoff Mercocox CL-2B (Japan Vilene Hospital Co. Ltd., Tokyo, Japan) injiziert. Die Präparate wurden in 25%iger Kalilauge über 72 Stunden mazeriert. Da zur Analyse des Gefäßverlaufes Längs- und Querschnitte erforderlich sind, wurden die Präparate in Gelatine eingebettet, um ein Auseinanderbrechen zu verhindern. So ließen sich Teilpräparate anfertigen, die

anschließend tiefgefroren wurden. Mittels eines Kryostaten konnten dann saubere Schnitte angefertigt werden. Die Gelatine wurde wiederum mit 25%iger Kalilauge herausgelöst. Nach Goldbeschichtung (Sputter Coater S 150 Firma Edwards, 6 Minuten) erfolgte die Beurteilung mit einem Zeiss Novascan 30 Rasterelektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 10 bis 15 kV.

Erkrankung	Geschlecht	Altersmedian	OP-Indikation	OP-Verfahren
Morbus Crohn (n=12)	m=7 w=5	32	Stenose: 6 Therapierefraktär: 6	Ileozökalresektion: 6 Proktokolektomie: 6
Colitis ulcerosa (n=8)	m=3 w=5	28	High grade Dysplasien: 3 Therapierefraktär: 5	Proktokolektomie: 8
Kolorektales Karzinom (n=6)	m=4 w=2	64	Gegeben	Hemikolektomie links: 6

**Tabelle 2:** Charakterisierung der Patienten.

### 1.1.4.2. Befunde

#### 1.1.4.2.1. Tela subserosa und Tunica muscularis des Kolons

Von der parallel zur Darmlängsachse verlaufenden Randarkade, auch Marginalarterie genannt, zweigen Gefäße ab, die im rechten Winkel zur Darmwand ziehen, die Vasa recta. Nach Eintritt in die Darmwand geben die Vasa recta im Bereich des Stratum longitudinale Äste ab, die parallel zu dessen Faserverlauf ziehen und durch Aufzweigung und Anastomosierung einen Plexus bilden. Dieser versorgt sowohl das Stratum longitudinale als auch das Stratum circulare. Weiter ziehen von ihm aus Gefäße hinauf zur Tunica mucosa (Abbildung 1a, Seite 15).

#### 1.1.4.2.2. Tela subserosa und Tunica muscularis bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Sowohl in der Tela subserosa als auch in der Tela submucosa finden sich neben Gefäßen von normalem Durchmesser regelhaft dilatierte Gefäße. An der jeweiligen Grenze zur Tunica muscularis oder in deren unteren bzw. oberen Drittel verjüngen sich diese mit einem Kalibersprung. Im Bereich der Tunica muscularis ist eine deutliche Rarefizierung

der Gefäße zu beobachten. Diese Befunde erscheinen bei der Colitis ulcerosa insgesamt ausgeprägter (Abbildungen 1b und 1c, Seite 15).

#### **1.1.4.2.3. Tela submucosa des Kolons**

Die durch die Tela submucosa zur Tunica mucosa ziehenden Gefäße sind entweder direkte Ausläufer eines Vas rectum oder entstammen dem muskulären Gefäßplexus (Abbildung 1a, Seite 15). Sie geben nahe dem Stratum circulare rückläufige Äste zu dessen Versorgung ab. Die Tela submucosa besitzt kein dichtes Kapillarnetz wie die Tunica muscularis bzw. die Tunica mucosa. Die Gefäße laufen parallel und geschlängelt auf das intestinale Lumen zu, wobei sie miteinander anastomosieren und so einen submukösen Plexus bilden. Kurz unterhalb der Tunica mucosa zweigen sie sich baumkronenartig auf (Abbildung 1a, Seite 15).

#### **1.1.4.2.4. Tela submucosa bei Morbus Crohn**

Bei allen Präparaten fällt eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Dilatation submuköser Gefäße auf (Abbildung 1b, Seite 15). Nach rasterelektronenmikroskopischer Zuordnung handelt es sich um Venen, die an den rundlich-ovalen Endothelzellkernabdrücken zu identifizieren sind (Abbildung 2b, Seite 16). Die Dilatation der submukösen Venen findet sich nicht nur bei Präparaten, die eine floride Entzündung aufweisen (Abbildung 3a, Seite 17), sondern auch bei solchen, die Zeichen der chronischen Entzündung erkennen lassen (Abbildung 3b, Seite 17). Submuköse arterio-venöse Anastomosen können nicht nachgewiesen werden.

#### **1.1.4.2.5. Tela submucosa bei Colitis ulcerosa**

Regelhaft findet sich eine teilweise extreme Dilatation submuköser Gefäße (Abbildung 1c, Seite 15), bei denen es sich nach rasterelektronenmikroskopischer Zuordnung um Venen handelt. Die Dilatation der subserösen Gefäße ist im Vergleich sehr viel geringer. Im arteriellen Teil des Gefäßsystems kommt es zu einer deutlichen Zunahme von feinen Gefäßen. Eine Regelmäßigkeit in ihrem Verlauf lässt sich nicht erkennen. Submuköse arterio-venöse Anastomosen können nicht nachgewiesen werden.

#### **1.1.4.2.6. Tunica mucosa des Kolons**

Die submukösen Arteriolen zweigen sich an der Kryptenbasis in Kapillaren auf, die entlang der Krypten geschlängelt zu deren Öffnungen aufsteigen. Dort anastomosieren sie und bilden ein wabenförmiges periorifizielles Gefäßnetz, den sog. honeycomb-like plexus (Abbildung 2a, Seite 16). Dieser ausgedehnte subepitheliale Plexus wird vom Darmlumen nur durch die Basalmembran und die Lamina epithelialis mucosae getrennt. Die Drainage erfolgt über Venulen (sog. Sammelvenulae), die sich ebenfalls auf dieser Ebene befinden. Eine Sammelvenule drainiert etwa 6 Krypten (Abbildung 2a, Seite 16).

#### **1.1.4.2.7. Tunica mucosa bei Morbus Crohn**

Bei den Präparaten, deren Schleimhaut histologisch weitgehend unverändert ist, lassen sich neben einer mäßiggradigen Dilatation der submukösen Venen auch Veränderungen der mukösen Gefäße feststellen. Diese imponieren im Aufhellungspräparat deutlich weniger als bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung; es findet sich eine Dilatation der mukösen Sammelvenulae sowie eine Rarefizierung des honeycomb-like plexus. Die aufsteigenden Kapillaren erscheinen unauffällig (Abbildung 2b, Seite 16). Bei starker Dilatation der submukösen Venen ist der muköse Plexus zumindest teilweise zerstört.

#### **1.1.4.2.8. Tunica mucosa bei Colitis ulcerosa**

Die Schleimhautvaskularisation ist bei fast allen Präparaten deutlich verändert. Die Abbildung 2c (Seite 16) zeigt beispielhaft eine veränderte Schleimhautangioarchitektur: im unteren Bereich der Tunica mucosa sind zahlreiche, miteinander vernetzte Kapillaren, die einen Plexus bilden. Die Kapillaren im oberen Bereich sind dagegen stark dilatiert und geschlängelt. Eine Rarefizierung von Kapillaren lässt sich zwischen benachbarten Krypten feststellen; teilweise fehlen diese Kapillaren. In diesen Ringstrukturen können Defekte vorkommen; stellenweise finden sich isolierte Anteile. Die Sammelvenulae und die submukösen Venen sind dilatiert. Dilatierte Gefäße finden sich sowohl im floriden Stadium (Abbildung 3c, Seite 17) als auch im chronischen Stadium der Entzündung (Abbildung 3d, Seite 17).

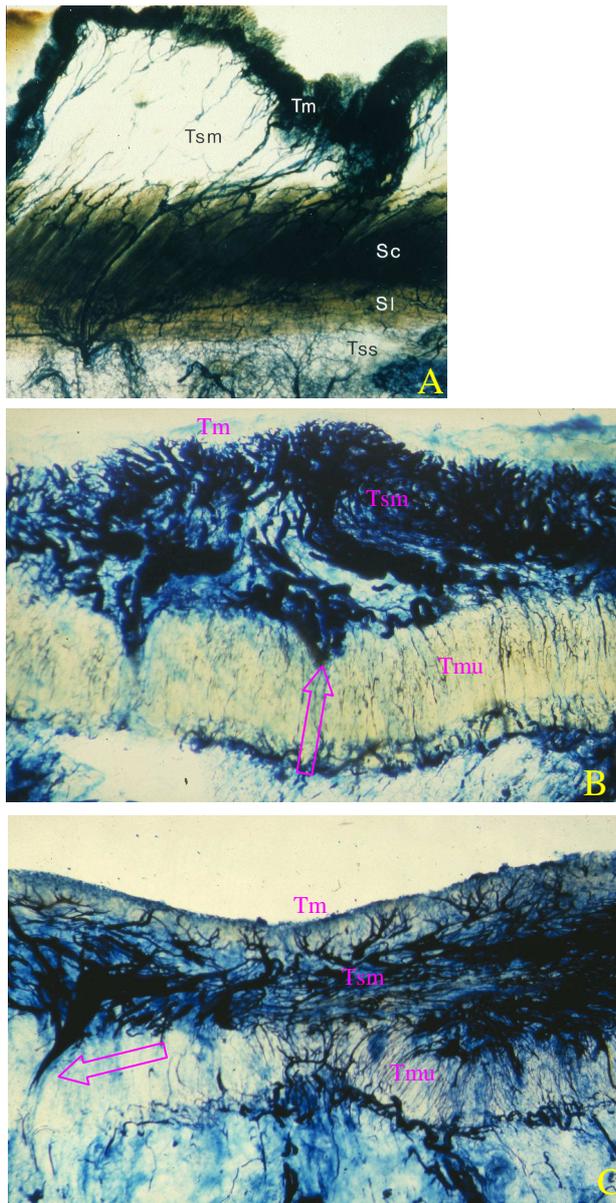
#### **1.1.4.3. Zusammenfassung**

Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen finden sich im floriden Stadium der Entzündung: 1. Eine Zerstörung des mukösen Kapillarplexus, 2. Eine massive Dilatation

submuköser Venen, 3. Kalibersprünge im Grenzbereich der Tunica muscularis und 4. Eine Rarefizierung der durch die Tunica muscularis ziehenden Gefäße (Abbildungen 1b und 1c, Seite 15). Im chronischen Stadium kommt es beim Morbus Crohn zu einer Rarefizierung des periorifizierten Kapillarnetzes (honeycomb-like plexus) und bei der Colitis ulcerosa zu einem deutlichen Umbau der Schleimhautangioarchitektur (Abbildungen 2b und 2c, Seite 16) [70, 71].

#### **1.1.4.4. Diskussion**

Im Bereich der Tunica muscularis ist bei beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine deutliche Rarefizierung der Gefäße zu beobachten. Eine Okklusion, wie von Wakefield et al. beschrieben [50], findet sich indes nicht. Dieser Befund sowie die eigenen Studien am gesunden Kolon, die zeigen, dass aufgrund zahlreicher, in sämtlichen Wandschichten gut ausgebildeter Anastomosen eine geradezu luxuriöse arterielle Versorgung des Dickdarms besteht, widersprechen der Hypothese eines multifokalen Infarktgeschehens in der Pathogenese des Morbus Crohn. Aufgrund der dilatierten submukösen Venen wird vielmehr eine Behinderung des Blutflusses im Bereich der Tunica muscularis postuliert. Durch die resultierende venöse Abflussstauung kommt es zu einer Hypoxie im Schleimhautbereich, die für die pathomorphologischen Alterationen in diesem Areal mitverantwortlich ist [70, 71].



**Abb. 1:** Aufgehellte Gelatine-Injektionspräparate:

(A) Normales Kolon, Längsschnitt (x8).

Schichten der Darmwand:

Tm Tunica mucosa.

Tsm Tela submucosa.

Sc Stratum circulare der Tunica muscularis.

Sl Stratum longitudinale der Tunica muscularis.

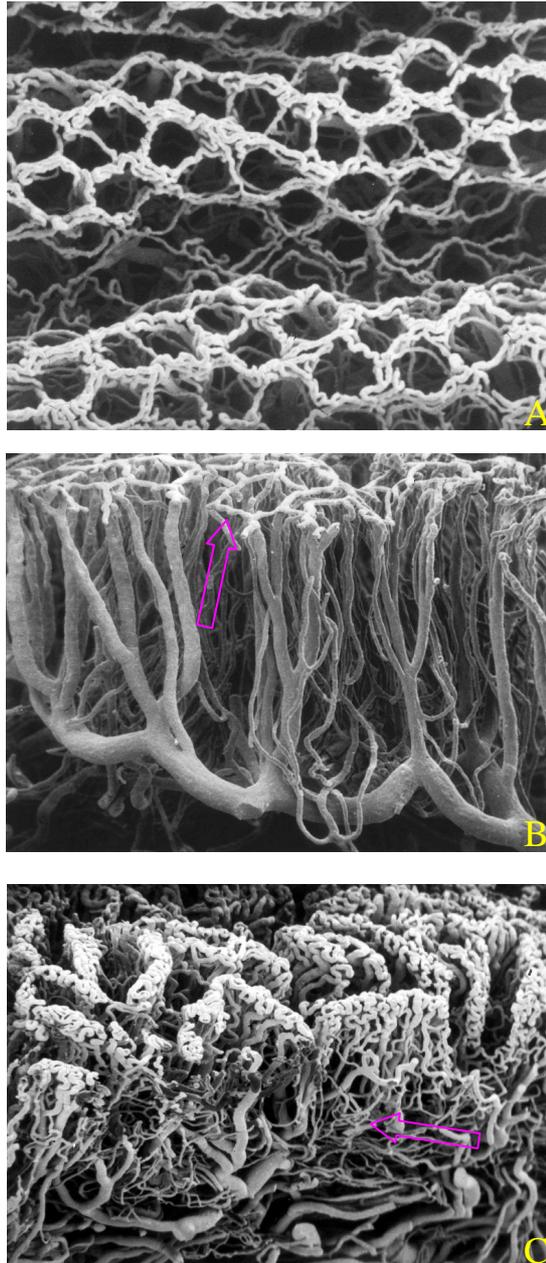
Tss Tela subserosa.

(B) Florider Morbus Crohn, Längsschnitt (x7,5).

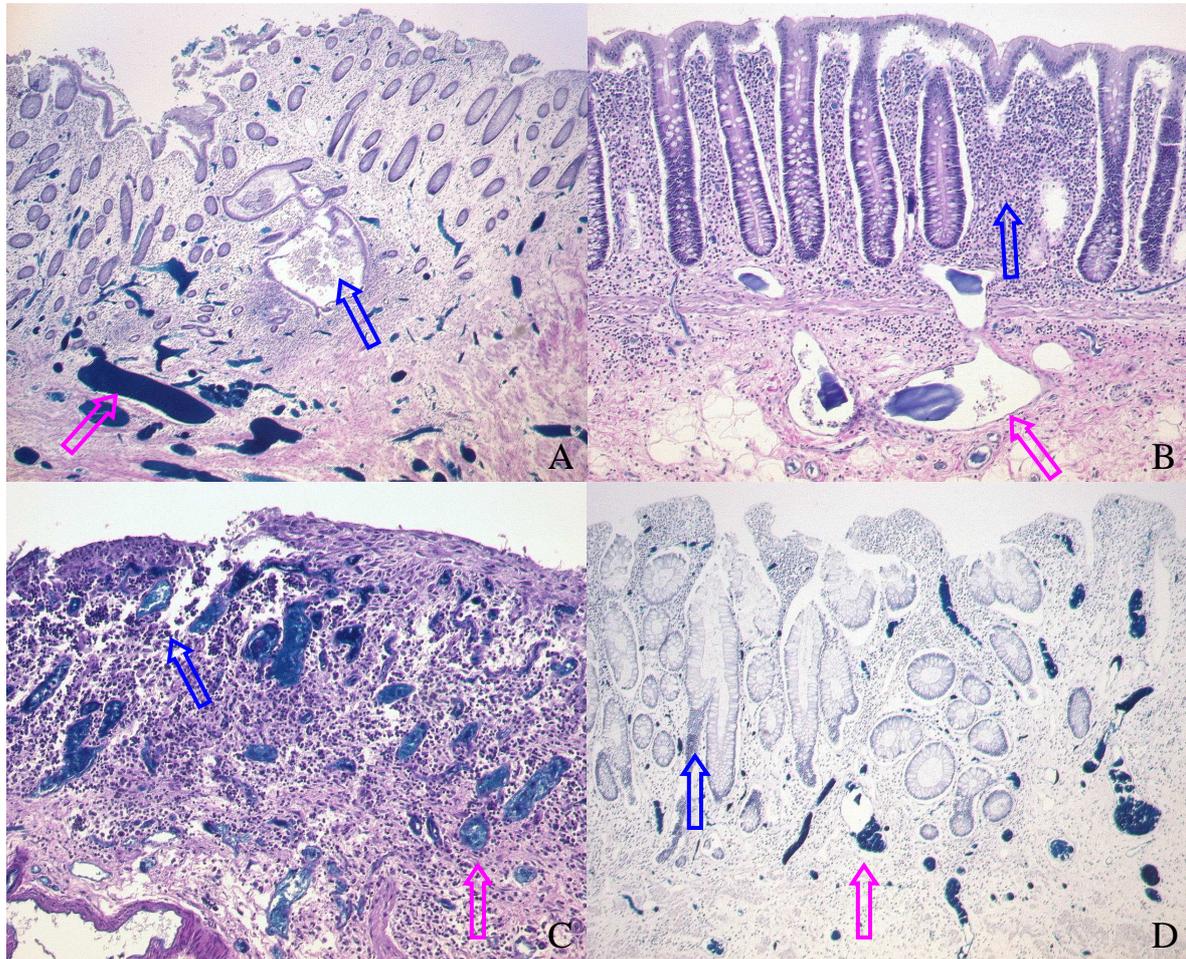
(C) Floride Colitis ulcerosa, Längsschnitt (x13).

Deutliche gemeinsame Veränderungen bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa:

1. Zerstörung des mucösen Kapillarplexus (Tm).
2. Massive Dilatation der submukösen Venen (Tsm).
3. Kalibersprünge im Grenzbereich der Tunica muscularis (Pfeil).
4. Rarefizierung der durch die Tunica muscularis ziehenden Gefäße (Tmu).



**Abb. 2:** Rasterelektronenmikroskopie von Korrosionspräparaten:  
 (A) Normales Kolon, Aufsicht (x40).  
 Regelmäßig angeordnetes Kapillarnetz um die Kryptenöffnungen (honeycomb-like plexus).  
 (B) Morbus Crohn (chronisches Stadium), Querschnitt (x80).  
 Rarefizierung des honeycomb-like plexus (Pfeil).  
 (C) Colitis ulcerosa (chronisches Stadium), Querschnitt (x40).  
 Veränderte Schleimhautangioarchitektur:  
 Neovascularisation im unteren Bereich (Pfeil), Umbau im oberen Bereich der Tunica mucosa. Der honeycomb-like plexus existiert nicht mehr.



**Abb. 3:** Histologische Schnitte von Aufhellungspräparaten (HE-Färbung).

Die Gefäße sind mit blaufärbter Gelatine-Lösung gefüllt (rosa Pfeile). Sie sind bei beiden Erkrankungen sowohl im floriden als auch im chronischen Stadium dilatiert.

- (A) Morbus Crohn (akutes Entzündungsstadium) (x40).  
Im Zentrum Kryptenabszess (blauer Pfeil). Herdförmiges Übergreifen der Entzündung auf tiefere Wandschichten.
- (B) Morbus Crohn (chronisches Entzündungsstadium) (x100).  
Ausgeprägtes chronisches Entzündungsinfiltrat in der Lamina propria mucosae (blauer Pfeil).
- (C) Colitis ulcerosa (akutes Entzündungsstadium) (x100).  
Schwere Ulzeration mit zahlreichen Kryptenabszessen (blauer Pfeil).
- (D) Colitis ulcerosa (chronisches Entzündungsstadium) (x100).  
Schleimhautumbau mit unregelmäßig verzweigten Krypten (blauer Pfeil).

## 1.2. Zielsetzung und Fragestellung

Die Ergebnisse der eigenen Vorarbeiten zeigen, dass es bei beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu Veränderungen der Angioarchitektur kommt. Im floriden Entzündungsstadium wird der mukosale Kapillarplexus (honeycomb-like plexus) weitgehend zerstört und es kommt daher zu teilweise sehr heftigen Blutungen in das Darmlumen. Das chronische Stadium der Entzündung ist hingegen durch einen mehr oder weniger ausgeprägten Umbau der Gefäßarchitektur gekennzeichnet. Inwieweit hier eine gestörte Mikrozirkulation vorliegt, lässt sich nur abschätzen. Im chronischen Stadium der Colitis ulcerosa konnte endoskopisch ein reduzierter Blutfluss nachgewiesen werden [76].

Doch der alleinige Nachweis einer gestörten Mikrozirkulation sagt noch nichts über deren pathogenetische Bedeutung im Rahmen des Entzündungsgeschehens aus. Es lässt sich daher zusammenfassend feststellen, dass der Stellenwert der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen trotz zahlreicher Untersuchungen mittels verschiedener Methoden nach wie vor unklar ist.

Dies hat vor allem zwei Gründe: Zum einen ist die Intravitalmikroskopie, die den Goldstandard für Untersuchungen der Mikrozirkulation darstellt, am menschlichen Darm aus methodischen Gründen nicht verfügbar und abgesehen davon würde es zum anderen kaum gelingen, die Erkrankung in einem so frühen Stadium zu untersuchen, wie es für die Erforschung der Zusammenhänge zwingend notwendig wäre.

Daher sind Tiermodelle zur Beantwortung diesbezüglicher Fragen unverzichtbar. Auch wenn keines der bekannten Modelle die Komplexität der humanen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen widerspiegelt, und es somit kein "ideales" Tiermodell gibt, was bei unbekannter Genese nicht verwundert, so sind sie doch für die Erforschung vieler wichtiger Teilaspekte der Erkrankung und neuer therapeutischer Ansätze sehr hilfreich und unabdingbar [100]. Zur systematischen Charakterisierung der Mikrozirkulation am Kolon gab es zu Beginn der Untersuchungen kein etabliertes Tiermodell. In der Literatur fand sich zum damaligen Zeitpunkt lediglich eine 1991 von Leung und Koo publizierte Arbeit, in der an einem Colitis-Modell intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt wurden [101]. Sie zeigten jedoch eine uniforme Stase und keinen Blutfluss, so dass zunächst fraglich war, ob derartige Studien am Colitis-Darm überhaupt möglich sind.

Daher war das erste Ziel, eine Technik zur intravitalmikroskopischen Untersuchung zu entwickeln und in einer Pilotstudie die Mikrozirkulation an verschiedenen Darmabschnitten sowohl im Bereich der Mukosa als auch der Serosa bei gesunden Tieren zu charakterisieren.

Im nächsten Schritt sollte dann geprüft werden, inwieweit sich diese Technik auch bei Colitis-Tieren anwenden lässt. Dazu wurden aus der Literatur zwei Modelle ausgewählt, die von ihrer Charakterisierung her zum einen mit dem Morbus Crohn (TNBS-Modell), zum anderen mit der Colitis ulcerosa (Mitomycin C-Modell) Gemeinsamkeiten haben.

Das Ziel dieser Colitis-Induktionsstudie war es, die mukosale Mikrozirkulation im Bereich des proximalen und des distalen Kolons im Verlauf zu evaluieren und mit den histopathologischen Veränderungen zu "korrelieren". Zur exakten Beschreibung der pathologischen Veränderungen war die Entwicklung eines histologischen Colitis-Score's erforderlich.

Nach den Ergebnissen der Colitis-Induktionsstudie wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Verlauf der Colitis abhängig von der (gestörten) Mikrozirkulation ist. Stimmt diese Hypothese, so müsste umgekehrt eine Verbesserung der Mikrozirkulation zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf führen. Zur deren Überprüfung wurde daher eine Interventionsstudie durchgeführt mit dem Ziel, die Bedeutung der Mikrozirkulation für Pathogenese und Verlauf der (experimentellen) Colitis näher zu charakterisieren und somit die potentielle Korrelation zwischen Funktion und Morphologie eingehender zu definieren. Dazu wurden in der Frühphase der TNBS-Colitis drei verschiedene Substanzen appliziert. Zwei von diesen haben eine direkte Wirkung auf die Mikrozirkulation, zum einen Endothelin, der stärkste bekannte Vasokonstriktor, zum anderen sein Antagonist. Hierdurch sollte es zu einer Verschlechterung bzw. zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation kommen. Als dritte Substanz wurde ein selektiver COX-2-Inhibitor appliziert, der entzündungshemmend wirkt. Die Reduktion der Inflammation hätte, so die Hypothese, eine verminderte Leukozyten-Endothel-Interaktion zur Folge, so dass es zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation käme. Neben den verschiedenen Parametern der Mikrozirkulation wurden der Entzündungsgrad mittels eines histologischen Colitis-Score's und (para-)klinischer Parameter wie Hämatokrit, Gewichtsverlauf, Diurese und Stuhlqualität erfasst.

Schließlich sollte am eigenen Krankengut evaluiert werden, wie häufig sich bei entsprechendem Screening Alterationen der Gefäße finden. Auf die lokale Vasculitis, die schon vor knapp 60 Jahren von Warren und Sommers beschrieben wurde [54] und die in dem Modell eines multifokalen Infarktgeschehens der Arbeitsgruppe um Wakefield eine zentrale Rolle spielt [49-51], wurde dabei besonders fokussiert.

Folgende Fragen sollten im einzelnen beantwortet werden:

### **I. Pilotstudie:**

1. Ist eine standardisierte Messung der Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie möglich?
  - a) im Bereich der Mukosa?
  - b) im Bereich der Serosa?
  
2. Wie hoch ist der kapilläre Blutfluss in verschiedenen Darmabschnitten (Ileum, proximales und distales Kolon)?
  - a) im Bereich der Mukosa?
  - b) im Bereich der Serosa?

### **II. Colitis-Induktionsstudie:**

1. Wie verhält sich die Schleimhautmikrozirkulation im Verlauf der TNBS-Colitis?
  - a) im proximalen Kolon?
  - b) im distalen Kolon?
  
2. Wie verhält sich die Schleimhautmikrozirkulation im Verlauf der Mitomycin C-Colitis?
  - a) im proximalen Kolon?
  - b) im distalen Kolon?

3. Zu welchen histopathologischen Veränderungen kommt es im Verlauf?
  - a) bei der TNBS-Colitis?
  - b) bei der Mitomycin-Colitis?
  
4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen Mikrozirkulation und histopathologischen Veränderungen?
  - a) bei der TNBS-Colitis?
  - b) bei der Mitomycin C-Colitis?
  
5. Welches Modell ist für welche Fragestellungen geeignet?

### **III. Interventionsstudie:**

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?
  - c) eines selektiven COX-2-Inhibitors?
  
2. Welche Parameter der Mikrozirkulation werden jeweils beeinflusst?
  
3. Sind pathomorphologische Unterschiede nachweisbar?

### **IV. Krankengut:**

1. Wie hoch ist der Anteil der in den Jahren 2002-2005 operierten Patienten, bei denen bei gezieltem Screening eine Vasculitis vorlag?
  - a) beim Morbus Crohn?
  - b) bei der Colitis ulcerosa?

2. In welchen Schichten der Darmwand lässt sich die Vasculitis nachweisen?
  
3. Ist das Auftreten der Vasculitis abhängig vom Grad der Entzündung?
  - a) beim Morbus Crohn?
  - b) bei der Colitis ulcerosa?

## **2. MATERIAL und METHODE**

### **2.1. Tierexperimente**

#### **2.1.1. Versuchstiere**

Die Studien wurden ausnahmslos an männlichen Sprague Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von  $300\text{g} \pm 27\text{g}$  durchgeführt. Die Tiere wurden in einem Raum mit kontrollierter Temperatur ( $23^{\circ}\text{C}$ ) und automatischem Tag-Nacht-Rhythmus (12 Stunden) gehalten. Pro Käfig saßen maximal 4 Tiere zusammen. Ausgenommen davon waren Tiere der Interventionsstudie (s. Kap. 2.1.6.3., Seite 35), sie wurden den gesamten Versuch über einzeln in Stoffwechsellkäfigen gehalten. Die Tiere hatten bis 36 Stunden vor der Colitis-Induktion und anschließend erneut freien Zugang zu fester Nahrung (Altromin 1324; Altromin GmbH; Lage). Die Versorgung mit Trinkwasser war nicht eingeschränkt. Die Versuche wurden durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (G 0021/96, G 0420/96, G 0171/98).

#### **2.1.2. Colitis-Induktion**

Nachdem im Rahmen der Pilotstudie (s. Kap. 2.1.6.1., Seite 31 und Kap. 3.1., Seite 44) gezeigt werden konnte, dass Untersuchungen der Mikrozirkulation am Rattendarm prinzipiell möglich sind, wurden aus der Literatur [34, 102, 103] zwei Colitis-Modelle zur Evaluation ausgewählt, zum einen das TNBS-Colitis-Modell, zum anderen das Mitomycin C-Colitis-Modell.

##### **2.1.2.1. TNBS-Colitis-Modell**

Bei diesem von Morris et al. 1989 beschriebenen Modell wird in reinem Äthanol gelöste Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) intrarektal installiert [104]. Dabei dient der Alkohol als "Barrier-Breaker", der die Schleimhaut zerstört, so dass die Trinitrobenzensulfonsäure als Hapten wirken und eine transmurale Entzündungsreaktion induzieren kann (Hapten-Colitis).

Die Induktion der Colitis erfolgte modifiziert nach dem Protokoll von Morris et al. in Inhalationsanästhesie mittels Äther durch die einmalige intrarektale Instillation von 0,25ml Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS; P-2297; Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim), gelöst in 0,25ml 100%igem Äthanol [104]. Nach der intrarektalen Applikation wurden die Tiere für 15 Minuten nach Trendelenburg gelagert, um eine ausreichende Kontaktzeit zwischen dem verabreichten Agens und der Darmschleimhaut zu erzielen.

### 2.1.2.2. Mitomycin C-Colitis-Modell

Dieses Modell zeichnet sich dadurch aus, dass durch die einmalige intraperitoneale Injektion von Mitomycin C eine auf die Dickdarmschleimhaut beschränkte Entzündung hervorgerufen wird.

Die Induktion erfolgte wiederum in Äther-Narkose nach dem Protokoll der Erstbeschreiber Keshavarzian et al. [105]. Hierbei werden 3,25mg/kg KG Mitomycin C (medac Gesellschaft; Wedel) intraperitoneal injiziert.

### 2.1.3. Präparation

Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen am Rattenkolon wurden die Tiere standardisiert vorbereitet. Die Anästhesie fand mittels Rompun<sup>®</sup> (Xylazinhydrochlorid; 0,5ml/kg KG; intramuskulär) und Ketanest<sup>®</sup> (Ketaminhydrochlorid; 0,5ml/kg KG; intramuskulär) statt. Nach Rasur des Halses sowie des Abdomens wurden Katheter (interner Ø 0,5mm; B. Braun Melsungen AG; Melsungen) in die Halsgefäße implantiert, der eine in die rechte V. jugularis interna für die Gabe der Markersubstanzen (s. Kap. 2.1.4., Seite 25), der andere in die linke A. carotis communis zur direkten Blutdruckmessung und zur Blutgasanalyse (s. Kap. 2.1.5., Seite 31).

Bei den Tieren der Interventionsstudie (s. Kap. 2.1.6.3., Seite 35) wurde zunächst nur ein Venenkatheter in die rechte V. jugularis interna gelegt. Dieser wurde von der ventralen Seite des Halses subcutan zum Nacken durchgezogen und durch die Haut ausgeleitet. Als Beißschutz für den Katheter diente eine flexible Stahlscheide. Die Tiere waren in ihrer Bewegungsfreiheit nur unwesentlich eingeschränkt. Der Katheter diente als intravenöser (i.v.) Zugang zur Applikation der Versuchssubstanzen. Der A. carotis-Katheter wurde bei diesen Versuchstieren unmittelbar vor der Präparation des Kolons implantiert.

Im Bereich des zuvor rasierten Abdomens erfolgte eine Medianlaparotomie. Der zu untersuchende Darmabschnitt wurde atraumatisch im Bereich der jeweiligen avasculären Zone des Mesenteriums mobilisiert und spannungsfrei vor die Bauchdecke auf eine eigens angefertigte Kunststoffschiene ausgelagert. Für Untersuchungen des serosalen Blutflusses, die im Rahmen der Pilotversuche erfolgten (s. Kap. 2.1.6.1., Seite 31 und Kap. 3.1., Seite 44), wurde der Darm so belassen. Zur Intravitalmikroskopie der Mukosa erfolgte die antimesenteriale Lumeneröffnung des Kolons in der nahezu avasculären Zone und die Armierung der Darmwand mittels 4 Prolene-Fäden der Stärke 7/0 zur Fixierung (Abbildung 4, Seite 25).



**Abb. 4:** Präparation zur Untersuchung der mukosalen Mikrozirkulation. Distales Colon vor die Bauchdecke mobilisiert, antimesenterial eröffnet, mit feinen Fäden armiert und locker aufgespannt.

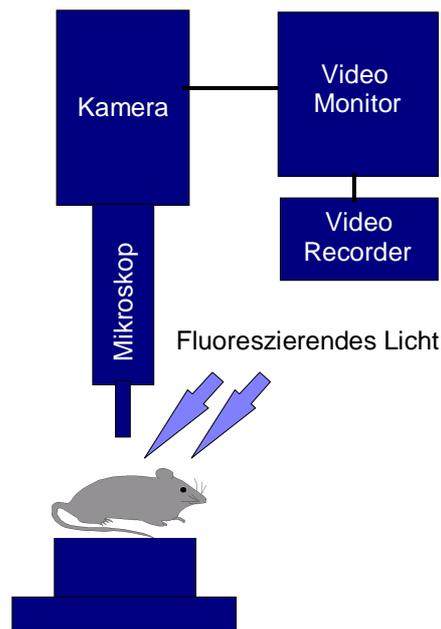
#### **2.1.4. Intravitalmikroskopie**

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie lassen sich neben der Bestimmung des kapillären Blutflusses folgende Parameter der Mikrozirkulation bestimmen: die funktionelle Kapillardichte, die Gefäßpermeabilität und das sog. Leukozytensticking.

Während dieser Untersuchungen, die zeitlich aufwendig sind und wegen der Belastung nicht sämtlich an einem Tier durchgeführt werden können (s. Kap. 2.1.6.3., Seite 35), waren Vorkehrungen notwendig, um die Tiere stabil zu halten und so systematische Fehler zu vermeiden. So wurde zum einen der eröffnete Darmabschnitt zum Schutz vor Austrocknung mit 37°C warmer Ringer-Lactat-Lösung äquilibriert [106], zum anderen wurden die Tiere auf eine thermostatisch geregelte Heizmatte gelegt, um die

Körpertemperatur konstant zu halten; der Soll-Wert betrug 37,5°C (rektale Messung) [106].

Sämtliche intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden zunächst auf Videobändern aufgezeichnet und anschließend offline ausgewertet. Die Abbildung 5 (Seite 26) zeigt schematisch den Aufbau einer derartigen intravitalmikroskopischen Untersuchungseinheit.



**Abb. 5:** Schematischer Aufbau eines intravitalmikroskopischen Messplatzes.

#### 2.1.4.1. Kapillärer Blutfluss

Zur Bestimmung des kapillären Blutflusses (cbf) wurden FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-markierte Erythrozyten (0,05ml/100g KG; FITC; Isomer I; No. F-7250, Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) über den V. jugularis-Katheter injiziert. Mit Hilfe der FITC-Markierung werden die Erythrozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Zur Färbung wurden die Erythrozyten zuvor in einem separaten Arbeitsgang von Ratten, die nicht zu den Versuchsgruppen gehörten, gewonnen. Diese Erythrozyten wurden dreimal in Alsever's-Puffer und einmal in Bicine-Saline-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit gelöstem FITC über 3 Stunden in einem Wasserbad (25°C, 60 Oszillationen/min.). Zum Abschluss wurden sie erneut mit Bicine-Saline-Puffer

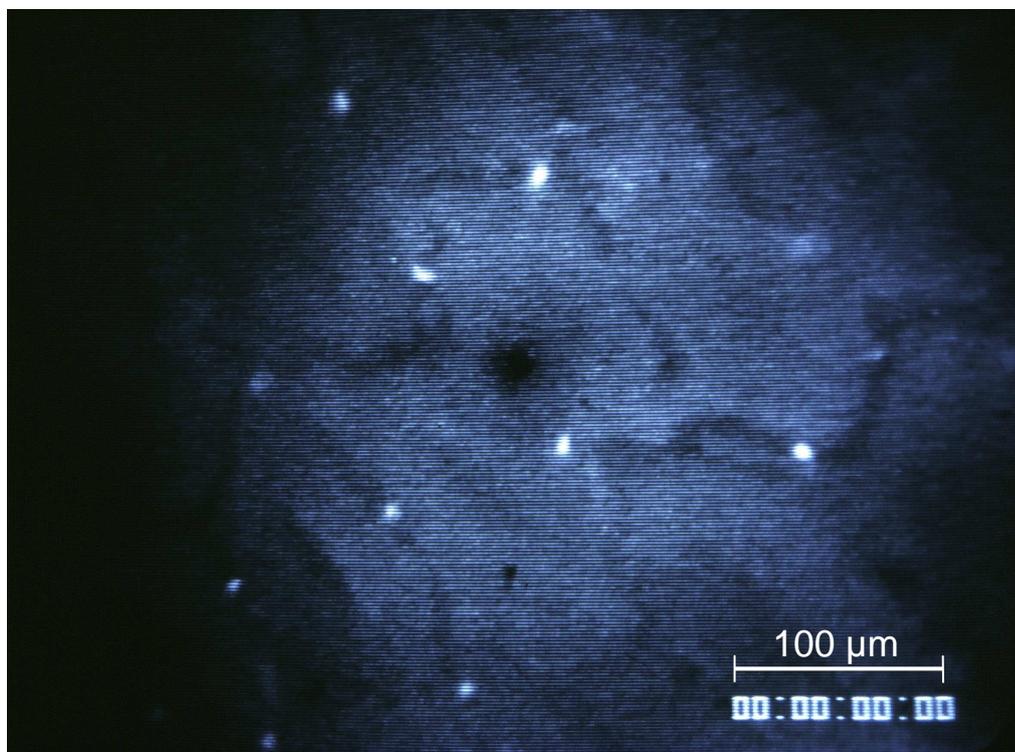
gewaschen bis der Überstand frei von Farbstoff war [106]. Um eine gleichmäßige Verteilung der markierten Erythrozyten im Blut-Pool zu gewährleisten, begannen die intravitalmikroskopischen Messungen des kapillären Blutflusses 25 Minuten nach Injektion der Erythrozyten [106]. Dazu wurden die Versuchstiere mit dem zuvor präparierten Darm (s. Kap. 2.1.3., Seite 24) unter das Fluoreszenzmikroskop (Objektiv: Apo 25/0.65 Fluoreszenz; Leitz; Wetzlar) positioniert (Abbildung 6, Seite 27). Es erfolgte pro Darmsegment (Ileum, proximales bzw. distales Kolon, s. Kap. 2.1.6., Seite 31) die Messung von 10 Feldern der Kolonmukosa bzw. der Serosa, visualisiert über einen mit dem Mikroskop verbundenen Monitor (Abbildung 5, Seite 26). Jedes Feld wurde über 1 Minute für die nachfolgende Offline-Analyse auf Videokassetten (FUJI Super VHS PRO) aufgezeichnet.



**Abb. 6:** Intravitalmikroskopischer Messplatz mit präpariertem Versuchstier.

Am Ende des Versuchs wurde den Tieren Blut abgenommen, um den Anteil der FITC-markierten Erythrozyten bezogen auf das Volumen ( $n_{\text{FITC}}$  (markierte Erythrozyten pro Nanoliter)) zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Kammer (Neubauer IMPROVED Bright-line; Tiefe 0,100 mm; Superior; Marienfeld). Zur Bestimmung des kapillären Blutflusses wurden offline pro Feld (s. Abbildung 7, Seite 28) 10 zufällig ausgewählte Kapillaren ausgewertet. An einem Fixpunkt des Gefäßes wurden die markierten Erythrozyten gezählt, die innerhalb einer Minute die Kapillare

passierten. Bei 10 ausgewerteten Feldern wurden somit insgesamt 100 Kapillaren ausgezählt, deren Mittelwert den Wert  $f_{\text{FITC}}$  (markierte Erythrozyten pro Minute und Kapillare) ergab. Aus diesen beiden Werten wurde der kapilläre Blutfluss eines Tieres nach der von Mithöfer et al. angegebenen Formel ( $V_{\text{nl/min/cap}} = f_{\text{FITC}} / (n_{\text{FITC}} \times 0,76)$ ) berechnet. Er entspricht dem volumetrischen Blutfluss (V), angegeben in Nanoliter (nl), in einer Minute (min) pro Kapillare (cap). Über Mittelwertbildung erhält man den kapillären Flow der jeweiligen Gruppe [106].



**Abb. 7:** Intravitalmikroskopische Aufnahme der Kolonmukosa der Ratte zur Bestimmung des kapillären Blutflusses (x320) (entsprechend einem Feld): Die schwarzen, geschlängelten Linien entsprechen den Kapillaren, die ein wabenförmiges Muster bilden, den sog. honeycomb-like plexus. In den Kapillaren sind als weiße Punkte die fluoreszierenden FITC-markierten Erythrozyten zu erkennen.

#### **2.1.4.2. Funktionelle Kapillardichte**

Die funktionelle Kapillardichte (fKD) dient als Maß der mikrovaskulären Durchblutung. Sie gibt die Länge aller durchbluteten Kapillaren innerhalb eines Beobachtungsfeldes in cm/cm<sup>2</sup> an [107].

Zur Analyse der funktionellen Kapillardichte wurden ebenfalls die bereits für die Bestimmung des kapillären Blutflusses aufgezeichneten 10 Felder pro Versuchstier verwendet. Mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (CAP-IMAGE Version 6.01; Dr. Zeintl; Heidelberg) zur Berechnung der funktionellen Kapillardichte erfolgte die Auswertung der Videoaufnahmen [108].

#### **2.1.4.3. Gefäßpermeabilität**

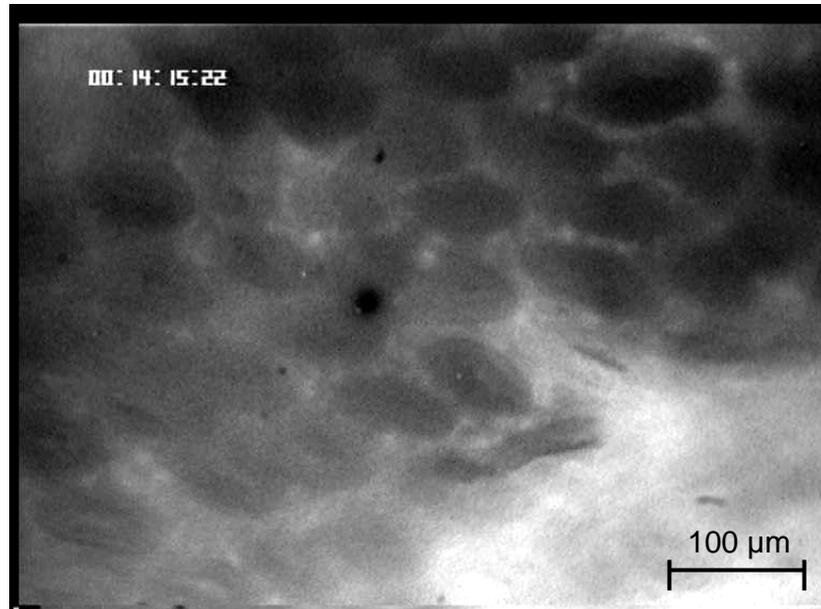
Die Gefäßpermeabilität wurde durch die Gabe eines Plasmamarkers bestimmt. Sie entspricht der relativen Änderung des perivaskulären Grauwertes (Helligkeit) vom Ausgangswert (Angabe in Prozent). Dabei erfolgte zunächst die Referenzmessung eines zufällig ausgewählten Feldes der Darmmukosa für 1 Minute. Anschließend wurde 0,2ml 5% FITC-Dextran (Fluorescein-Isothiocyanate-Dextran; FD-150S, Molekulargewicht 70.000 Da; Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim) i.v. injiziert. Nach 30 Minuten begann die Videoaufzeichnung von 5 wiederum zufällig gewählten Feldern für jeweils 1 Minute (Objektiv: ACHROPLAN 20x/0,50w Ph2; Zeiss, Deutschland) (Abbildung 8, Seite 30) [109, 110]. Zur Offline-Auswertung kam erneut das Computervideoanalysesystem CAP-IMAGE zum Einsatz.

#### **2.1.4.4. Leukozytensticking**

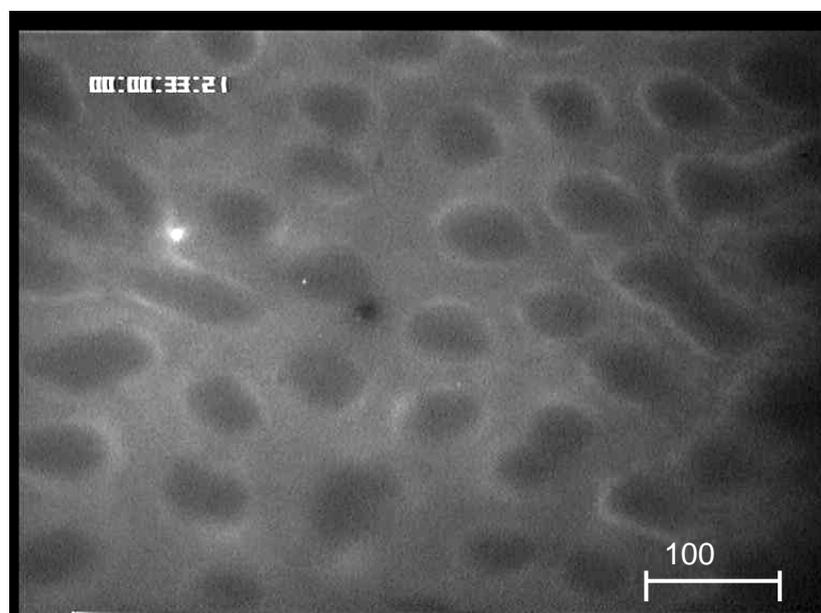
Als Leukozyten-Sticker wurden Leukozyten definiert, die mindestens 30 Sekunden an einer Stelle der Gefäßwand haften und sich nicht fortbewegen [109, 111, 112].

Die Färbung der Leukozyten erfolgte mittels i.v.-Injektion von 1ml/kg KG 0,02% Rhodamine 6G (C.I. 45160; Basic Red 1; Sigma Chemical Co.; St. Louis; USA). Nach einer Latenzzeit von 10 min. begann die Untersuchung am intravitalmikroskopischen Messplatz (Abbildungen 5 und 6, Seite 26 und 27). Es wurden 5 Felder zufällig ausgewählt und jeweils einminütige Videoaufnahmen unter Verwendung des bereits bei der Bestimmung der Gefäßpermeabilität benutzten Objektivs (ACHROPLAN 20x/0,50w Ph2; Zeiss, Deutschland) aufgezeichnet (Abbildung 9, Seite 30). Die Anzahl der Leukozyten-

Sticker eines Tieres, angegeben als Zellen/mm<sup>2</sup>, ergab sich aus dem Mittelwert der 5 Gesichtsfelder, wobei die Größe eines Gesichtsfeldes 480µm x 650µm betrug.



**Abb. 8:** Intravitalmikroskopische Aufnahme der Kolonmukosa der Ratte zur Bestimmung der Gefäßpermeabilität (x290) (entsprechend einem Feld): Das die Kapillaren umgebene Gewebe hat sich aufgrund der Diffusion des FITC-Dextran hellgrau bis weiß verfärbt.



**Abb. 9:** Intravitalmikroskopische Aufnahme der Kolonmukosa der Ratte zur Bestimmung des Leukozytenstickings (x290) (entsprechend einem Feld): Erkennbar sind die dunklen Kryptenöffnungen und das sie umgebene periorifizielle Gewebe (hellgrau). Die Kapillaren erscheinen ein wenig heller. Bei dem einzelnen hellen Punkt handelt es sich um einen rhodamin-gefärbten Leukozyten (Leukozytensticker).

### **2.1.5. Weitere Zielparameter**

Zur Vermeidung sowohl systematischer als auch zufälliger Fehler wurde die kardiorespiratorische Stabilität der Tiere während der intravitalmikroskopischen Messungen kontrolliert und überwacht (s. Ausschlusskriterien, Kap. 2.1.8., Seite 38).

Während der Untersuchung erfolgte die kontinuierliche direkte Messung des arteriellen Blutdrucks über den in die A. carotis eingebrachten Katheter (s. Kap. 2.1.3, Seite 24), an dem ein Druckwandlermodul konnektiert war (Fa. Hellige GmbH; Freiburg im Breisgau). Zu Beginn und am Ende des Versuchs wurde zudem eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt (BGA; ABL-System 625; Radiometer A/S Copenhagen; Kopenhagen; Dänemark).

Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität wurden weitere Parameter protokolliert. Sowohl zu Beginn des Versuchs (vor der Induktion der Colitis) als auch an dessen Ende (vor der Präparation für die Intravitalmikroskopie) wurden die Tiere gewogen, um Aussagen über deren Gewichtsverlauf machen zu können. Weiter erfolgte vor Beginn der mikroskopischen Untersuchung die Bestimmung des Hämatokrits (HTK). Tiere der Interventionsstudie (s. Kap. 2.1.6.3., Seite 35) wurden den gesamten Versuch über einzeln in Stoffwechselfäßen gehalten, um die Urinausscheidung protokollieren zu können. Änderungen der Stuhlqualität wurden ebenfalls erfasst.

### **2.1.6. Versuchsaufbau**

Zunächst wurde in einer Pilotstudie die Technik der Intravitalmikroskopie sowohl der Serosa als auch der Mukosa an verschiedenen Darmabschnitten etabliert. Nach Standardisierung der Methode erfolgte im nächsten Schritt die Charakterisierung zweier rezenter Colitis-Modelle. Schließlich wurde gemäß der Fragestellung (s. Kap. 1.2., Seite 18) überprüft, welche Auswirkung die Applikation von vasoaktiven bzw. antiinflammatorischen Substanzen auf die Parameter der Mikrozirkulation und auf die Erkrankungsschwere der Tiere hat.

#### **2.1.6.1. Pilotstudie (Gruppen Ia-f)**

Nach Standardisierung der Präparationstechnik (s. Kap. 2.1.3., Seite 24) erfolgte an insgesamt 32 männlichen Sprague Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von  $297\text{g} \pm 24\text{g}$  die intravitalmikroskopische Untersuchung verschiedener Darmabschnitte, um

die Technik der Intravitalmikroskopie am Kolon der Ratte zu etablieren und um Ausgangswerte zu erhalten. Dazu wurden insgesamt 6 Subgruppen (a-f) gebildet. Die Bestimmung des kapillären Blutflusses erfolgte zunächst im Bereich der Serosa und anschließend im Bereich der Mukosa. Neben dem terminalen Ileum wurden Messungen am proximalen und distalen Kolon (s. Abbildung 39, Seite 90) in randomisierter Reihenfolge durchgeführt. Aufgrund unterschiedlicher kardiorespiratorischer Stabilität konnten in der Regel nur 2 Darmabschnitte an einem Tier untersucht werden (Tabelle 3, Seite 32).

Gruppe	Abschnitt	n
Ia	Serosa terminales Ileum	10
Ib	Serosa proximales Kolon	9
Ic	Serosa distales Kolon	13
Id	Mukosa terminales Ileum	11
Ie	Mukosa proximales Kolon	13
If	Mukosa distales Kolon	14

**Tabelle 3:** Subgruppenbildung (Ia-f) innerhalb der Pilotstudie.

### 2.1.6.2. Colitis-Induktionsstudien (Gruppen II-V)

Die Evaluation der Colitis-Modelle (s. Kap. 2.1.2., Seite 23) erfolgte an insgesamt vier Versuchsgruppen: zwei Colitisgruppen (Gruppe II: TNBS-Modell und Gruppe IV: Mitomycin C-Modell) mit jeweils einer Kontrollgruppe (Gruppe III: TNBS-Kontrollgruppe und Gruppe V: Mitomycin C-Kontrollgruppe). Die Gruppengröße betrug jeweils 24 Tiere, so dass insgesamt 96 männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von  $311\text{g} \pm 25\text{g}$  untersucht wurden.

#### 2.1.6.2.1. TNBS-Modell (Gruppen IIa-c)

Beim TNBS-Colitis-Modell (Gruppen IIa-c) erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung der Mukosa sowohl des proximalen als auch des distalen Kolons in randomisierter Reihenfolge. Dazu wurden für die 8 Tiere jeder Subgruppe (IIa-c) jeweils 4 Lose mit der Aufschrift „proximal“ und jeweils 4 Lose mit der Aufschrift „distal“ angefertigt. Somit war es dem Zufall überlassen, welcher Darmabschnitt zuerst untersucht

wurde. Andererseits wurde so sichergestellt, dass mit beiden Darmabschnitten gleich häufig begonnen wurde. Die Messungen fanden 24 Stunden, 3 Tage sowie 15 Tage nach Colitis-Induktion bei jeweils 8 Tieren pro Gruppe statt (Tabelle 4, Seite 33).

Gruppe	Zeitpunkt	Abschnitt	n
IIa	24 Stunden	Mukosa proximales und distales Kolon	8
IIb	3 Tage	Mukosa proximales und distales Kolon	8
IIc	15 Tage	Mukosa proximales und distales Kolon	8

**Tabelle 4:** Subgruppenbildung (IIa-c) innerhalb der TNBS-Induktionsstudie.

#### 2.1.6.2.2. TNBS-Kontrollgruppe (Gruppen IIIa-c)

Die Kontrollgruppen zur TNBS-Induktionsstudie (Gruppen IIa-c) wurden entsprechend in 3 Subgruppen aufgeteilt (Gruppen IIIa-c). Bei den Kontrolltieren erfolgte eine Scheininduktion der Colitis durch intrarektale Applikation physiologischer Kochsalzlösung (0,5ml 0,9% NaCl-Lösung; B. Braun Melsungen AG; Melsungen). Auch hier wurde nach 24 Stunden, 3 Tagen sowie 15 Tagen sowohl das proximale als auch das distale Kolon in randomisierter Reihenfolge untersucht. Die Gruppengröße betrug abermals 8 Tiere (Tabelle 5, Seite 34).

#### 2.1.6.2.3. Mitomycin C-Modell (Gruppen IVa-c)

Entsprechend erfolgte auch bei der Mitomycin C-Colitis (Gruppen IVa-c) die Intravitalmikroskopie des proximalen und des distalen Kolons in randomisierter Reihenfolge. Die Untersuchungszeitpunkte waren 3 Tage, 7 Tage sowie 6 Wochen nach der Colitis-Induktion, wiederum bei jeweils 8 Tieren pro Subgruppe (IVa-c) (Tabelle 6, Seite 34).

Gruppe	Zeitpunkt	Abschnitt	n
IIIa	24 Stunden	Mukosa proximales und distales Kolon	8
IIIb	3 Tage	Mukosa proximales und distales Kolon	8
IIIc	15 Tage	Mukosa proximales und distales Kolon	8

**Tabelle 5:** Subgruppenbildung (IIIa-c) innerhalb der TNBS-Kontrollgruppe.

Gruppe	Zeitpunkt	Abschnitt	n
IVa	3 Tage	Mukosa proximales und distales Kolon	8
IVb	7 Tage	Mukosa proximales und distales Kolon	8
IVc	42 Tage	Mukosa proximales und distales Kolon	8

**Tabelle 6:** Subgruppenbildung (IVa-c) innerhalb der Mitomycin C-Induktionsstudie.

#### 2.1.6.2.4. Mitomycin C-Kontrollgruppe (Gruppen Va-c)

Bei den Kontrollgruppen zur Mitomycin C-Induktionsstudie (Gruppen IVa-c) wurden entsprechend 3 Subgruppen gebildet (Gruppen Va-c). Es erfolgte eine Scheininduktion der Colitis durch intraperitoneale Applikation physiologischer Kochsalzlösung (3,25mg/kg KG 0,9% NaCl-Lösung; B. Braun Melsungen AG; Melsungen). Auch hier wurde an den entsprechenden Tagen (3 Tage, 7 Tage sowie 6 Wochen) sowohl das proximale als auch das distale Kolon in randomisierter Reihenfolge untersucht. Die Gruppengröße betrug abermals 8 Tiere (Tabelle 7, Seite 35).

Gruppe	Zeitpunkt	Abschnitt	n
Va	3 Tage	Mukosa proximales und distales Kolon	8
Vb	7 Tage	Mukosa proximales und distales Kolon	8
Vc	42 Tage	Mukosa proximales und distales Kolon	8

**Tabelle 7:** Subgruppenbildung (Va-c) innerhalb der Mitomycin C-Kontrollgruppe.

### 2.1.6.3. Interventionsstudie (Gruppen VIa-e)

Gemäß der Fragestellung (s. Kap. 1.2., Seite 18) wurden drei verschiedene Substanzen 12 Stunden nach der Colitis-Induktion intravenös appliziert. Dies waren zum einen Endothelin-1 (E 7764; Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim), zum anderen ein Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist (LU-135252; Knoll AG; Ludwigshafen) und schließlich ein selektiver COX (Cyclooxygenase)-2-Inhibitor (NS-398; Alexis Deutschland GmbH; Grünberg).

#### 2.1.6.3.1. Versuchsaufbau

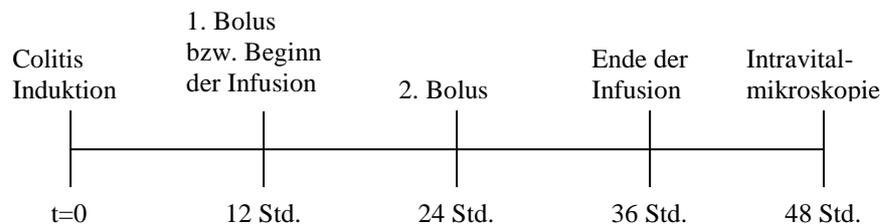
Die Versuche wurden an 80 männlichen Sprague Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von  $308\text{g} \pm 19\text{g}$  durchgeführt. Vor Beginn der Induktion einer TNBS-Colitis erfolgte die Randomisierung in 5 Versuchsgruppen (Gruppen VIa-e) mit jeweils 16 Tieren (Tabelle 8, Seite 35). In dieser Studie wurden ausnahmslos intravitalmikroskopische Untersuchungen der distalen Kolonmukosa vorgenommen.

Gruppe	Bezeichnung	Beschreibung	n
VIa	Kontrollgruppe	Gesunde Tiere + Ringer-Lösung i.v.	16
VIb	Colitisgruppe	TNBS-Colitis + Ringer-Lösung i.v.	16
VIc	Endothelingruppe	TNBS-Colitis + Endothelin-1 i.v.	16
VIId	ET-RA-Gruppe	TNBS-Colitis + Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist i.v.	16
VIe	COX-2-Gruppe	TNBS-Colitis + COX-2-Inhibitor i.v.	16

**Tabelle 8:** Subgruppenbildung (VIa-e) innerhalb der Interventionsstudie.

Als Kontrollen (Gruppe VIa) dienten gesunde Tiere, die anstelle einer Colitis-Induktion eine Scheininduktion mittels intrarektaler Kochsalzinjektion (0,5ml 0,9% NaCl-Lösung; Braun Melsungen AG; Melsungen) erhielten. Ihnen wurde, ebenso wie der Colitisgruppe (Gruppe VIb), die nicht behandelt wurde, über die gesamte Versuchsdauer (48 Stunden) Ringer-Lactat-Lösung (2ml/kg KG/Std.; Braun Melsungen AG; Melsungen) infundiert, zum einen zum Offenhalten des Katheters, zum anderen um die Bedingungen gegenüber den Gruppen VIc-VIe konstant zu halten.

Auch die Gruppen VIc-VIe erhielten die ersten zwölf Stunden über dieselbe Menge Ringer-Lactat-Lösung infundiert, anschließend erfolgte die Applikation der Testsubstanzen über 24 Stunden. 48 Stunden nach der Induktion erfolgten die Untersuchungen. Die Endothelgruppe (Gruppe VIc) erhielt kontinuierlich Endothelin-1 (1,25µg/kg KG/Std.) intravenös über den zentralen Venenkatheter [110]. Die Therapiegruppen (Gruppen VIId und VIe) erhielten entweder den Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 (50mg/kg KG) [110, 113-115] oder den selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 (10mg/kg KG) [116-119] in Form eines i.v. Bolus. Die Gabe wurde nach 12 Stunden wiederholt. In der Zwischenzeit erhielten auch diese beiden Gruppen (Gruppen VIId und VIe) zur Standardisierung Ringer-Lactat-Lösung i.v. (Abbildung 10, Seite 36).



**Abb. 10:** Schema des Versuchsablaufs der Interventionsstudie (Gruppen VIa-e).

Die Messung sämtlicher Zielparameter (s. Kap. 2.1.4., Seite 25) ist aus methodischen Gründen wegen der damit verbundenen Belastung der Tiere an einem einzelnen Individuum nicht durchführbar. Daher erfolgte nach Gabe der Testsubstanzen eine weitere Randomisierung der 5 Versuchsgruppen (VIa-e) in 2 weitere Subgruppen (VIa1-e1 und VIa2-e2) mit jeweils 8 Tieren (Tabelle 9, Seite 37). Bei den Untergruppen VIa1-e1 erfolgte die Messung des kapillären Blutflusses (cbf), der funktionellen Kapillardichte (fKD) und

der Gefäßpermeabilität (GPM). Die Untergruppen VIa2-e2 dienten hingegen allein der Messung des Leukozytenstickings (LS).

Zielparameter	Gruppen				
	VIa	VIb	VIc	VIId	VIe
cbf + fKD + GPM	VIa1	VIb1	VIc1	VIId1	VIe1
LS	VIa2	VIb2	VIc2	VIId2	VIe2

**Tabelle 9:** Randomisierung der Gruppen VIa-e (16 Tiere) in Subgruppen mit jeweils 8 Tieren (cbf = kapillärer Blutfluss, fKD = funktionelle Kapillardichte, GPM = Gefäßpermeabilität, LS = Leukozytensticking).

### 2.1.7. Histologie

Nach Beendigung der Versuche am intravitalmikroskopischen Messplatz wurden sämtliche Tiere durch i.v.-Injektion von T61<sup>®</sup> (Embrutamid und Mebenzoniumjodid) (0,3 ml; Hoechst Roussel Vet. Vertrieb GmbH; Unterschleißheim) getötet. Anschließend erfolgte die Entnahme des untersuchten Darmsegments und Fixierung in Formalin (4%) zur weiteren histologischen Untersuchung.

Um einerseits die Expression der Colitis nach Induktion beurteilen und um andererseits auch Aussagen über den Verlauf der Entzündung treffen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Charité – Campus Benjamin Franklin (Direktor: Prof. Dr. med. H. Stein) ein histologischer Colitis-Score entwickelt. Hierbei wird zwischen akuten und chronischen Zeichen der Entzündung differenziert, je nach Ausprägung dieser Zeichen variiert der Entzündungsgrad zwischen leichtgradiger (1-4 Punkte), mittelgradiger (5-8 Punkte) und hochgradiger (9-12 Punkte) akuter bzw. chronischer Colitis (Abbildung 11, Seite 39). Die Anfertigung von Paraffin-Schnitten (4 bis 5µm), deren HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) sowie die Beurteilung durch zwei erfahrende Pathologen, denen das Versuchsprotokoll unbekannt war, erfolgte ebenfalls im Pathologischen Institut der Charité – Campus Benjamin Franklin.

### **2.1.8. Ausschlusskriterien**

In die Auswertung gelangten nur Tiere, die während der intravitalmikroskopischen Untersuchungen kardiorespiratorisch und hämodynamisch stabil waren.

Ausschlusskriterien waren ein systolischer Blutdruck von  $<80$  mm Hg sowie eine schlechte BGA mit 1. pH  $<7,3$  bzw.  $>7,5$  und/oder 2.  $pO_2 <10,6$  kPa (=80 mm Hg) und/oder 3.  $pCO_2 >6,6$  kPa (=50 mm Hg) [110, 115].

Weiter wurden Tiere aus der Wertung herausgenommen, bei denen es zu keiner entsprechenden Colitis-Expression kam (Histologischer Colitis-Score  $<5$ ), obwohl dies dem Modell nach zu erwarten gewesen wäre. Dieses Ausschlusskriterium bezog sich somit auf sämtliche Tiere der Interventionsstudie (s. Kap. 2.1.6.3., Seite 35) sowie auf Tiere mit TNBS-Colitis, bei denen die Induktion 24 bzw. 72 Stunden zuvor erfolgte (s. Kap. 2.1.6.2.1., Seite 33).

### **2.1.9. Statistik**

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS for windows. Der Gruppenvergleich wurde mittels T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Überprüfung innerhalb einer Gruppe erfolgte mittels T-Test für verbundene Stichproben. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $<5\%$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Sämtliche Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standard Error of Mean) angegeben.

**Abb. 11:** Histologischer Colitis-Score.

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	
<b>Summe</b>			
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	
<b>Summe</b>			

**Schweregradeinteilung**

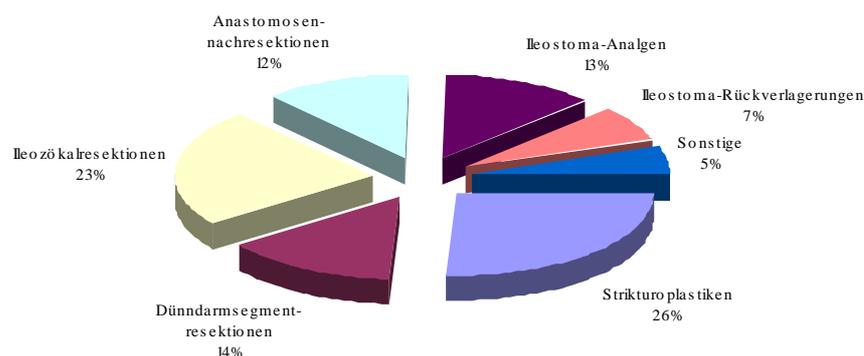
- akut:** keine Entzündung (0)  
 leichtgradige Entzündung (1-4)  
 mittelgradige Entzündung (5-8)  
 hochgradige Entzündung (9-12)

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

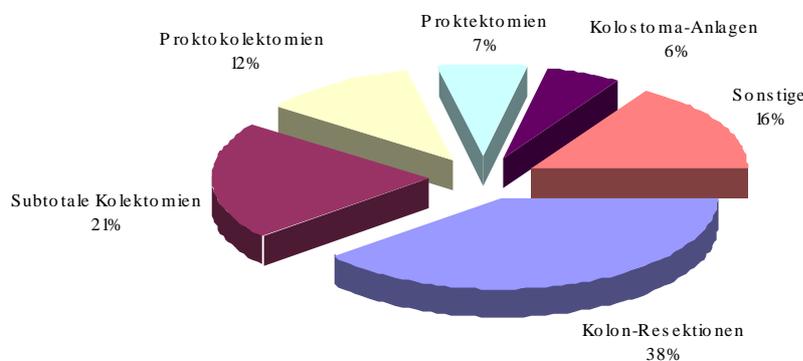
Bei der Auswertung hat zunächst die Sichtung sämtlicher Schnitte zu erfolgen, um wesentliche Befunde nicht zu übersehen. Scheinen die Veränderungen regelmäßig zu sein, so werden 5 Regionen zufällig ausgewählt und ausgezählt. Dazu wird ein Netzmikrometer (10x10/5, 10, d=19mm; Fa. Carl Zeiss Jena GmbH, 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.

## 2.2. Krankengut

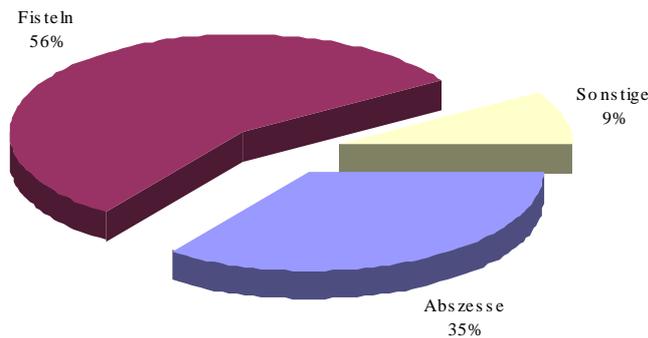
Seit Anfang 1995 werden alle wegen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung behandelten Patienten in einer Datenbank online dokumentiert. Neben der Erfassung sämtlicher Patientencharakteristika werden alle operativen Eingriffe und postoperativen Verläufe protokolliert. In der Chirurgischen Klinik I des Campus Benjamin Franklin wurden bis Ende 2005 insgesamt 804 Patienten mit einem Morbus Crohn (mittleres Alter: 36 Jahre, range: 16-81, Geschlechtsverhältnis: m:w = 1:1,3) und 431 Patienten mit einer Colitis ulcerosa (mittleres Alter: 42 Jahre, range: 17-73, Geschlechtsverhältnis: m:w = 1,2:1) stationär behandelt. Bei Patienten mit Morbus Crohn wurden insgesamt 1034 operative Prozeduren durchgeführt (Mehrfachnennungen möglich): 519 im Bereich des Dünndarms, 180 im Bereich des Dickdarms sowie 335 proktologische Eingriffe. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa erfolgten in diesem Zeitraum 462 Operationen (Mehrfachnennungen möglich). Die Operationen sind in den Abbildungen 12a-c, Seite 40/41 und 13, Seite 41 aufgeschlüsselt.



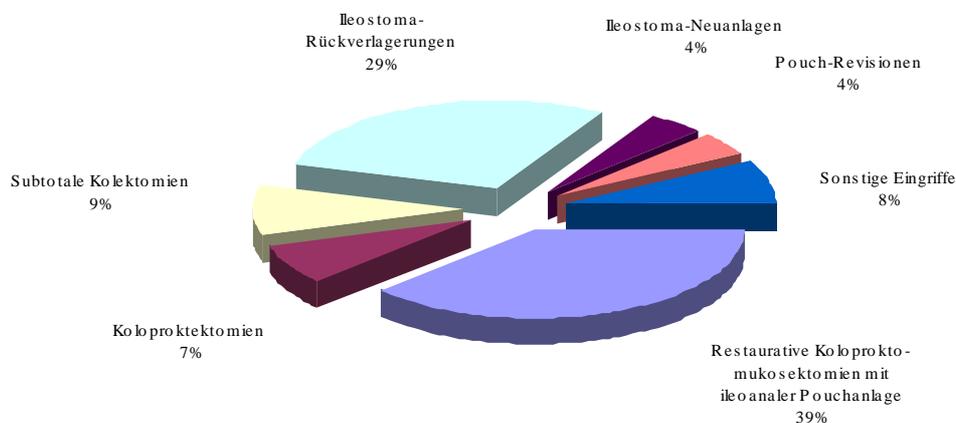
**Abb. 12a:** Verteilung der Eingriffe am Dünndarm bei Morbus Crohn.



**Abb. 12b:** Verteilung der Eingriffe am Dickdarm bei Morbus Crohn.



**Abb. 12c:** Verteilung der proktologischen Eingriffe bei Morbus Crohn.



**Abb. 13:** Verteilung der Eingriffe bei Colitis ulcerosa.

Die Frage, wie häufig bei gezielter Suche eine Vasculitis nachzuweisen ist, wurde an Kolonresektaten untersucht. Dabei erfolgten die Studien an Präparaten von Morbus Crohn- bzw. Colitis ulcerosa-Patienten, die sich in den Jahren 2002-2005 einer Operation unterziehen mussten. Durch immunhistologische Färbungen mit dem Endothelzellmarker CD31 und dem Pan-T-Zellmarker CD3 wurde die Prävalenz der Vasculitis bestimmt. Weiter wurde analysiert, in welchen Schichten der Darmwand die Vasculitis in welcher Häufigkeit vorkommt. Diese Ergebnisse wurden mit dem Entzündungsgrad verglichen, der mittels eines im Rahmen des SFB 633 Z1 (Sonderforschungsbereich: Induktion und Modulation T-zellvermittelter Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt, Sprecher: Prof. Dr. med. Martin Zeitz) etablierten histologischen Colitis-Score's (s. Kap. 2.2.1., Seite 42) quantifiziert wurde. Zur Kontrolle diente tumorfreies Gewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Es wurden 56 Morbus Crohn-Kolon-Resektate, 43 Colitis

ulcerosa-Resektate und 5 Kolonkarzinom-Resektate immunhistologisch untersucht und ausgewertet. Nähere Angaben zu diesem Kollektiv sind in der Tabelle 10 (Seite 42) zusammengefasst.

Erkrankung	Geschlecht	Alters- median	Mittlere Erkrankungs- dauer (Jahre)	OP-Indikationen (n) (Mehrfachnennungen möglich)	OP-Verfahren (n)
Morbus Crohn (n=56)	m=21 w=35	28	9,97 ± 10,14	Stenose: 39 Fistel: 25 Therapierefraktär: 3	Ileozökalresektion: 29 Kolonsegment- resektion: 14 Subtotale Kolektomie: 13
Colitis ulcerosa (n=43)	m=18 w=25	43	12,63 ± 12,19	Therapierefraktär: 40 High grade Dysplasien: 5 Karzinom: 1 Stenose: 1	Koloproktomuko- sektomie+Pouch: 25 Koloproktomuko- sektomie+Stoma: 10 Restkolektomie: 8
Kolorektales Karzinom (n=5)	m=3 w=2	63	-	Gegeben	Hemikolektomie links: 5

**Tabelle 10:** Charakterisierung der Patienten, die immunhistologisch auf das Vorliegen einer Vasculitis untersucht worden sind.

### 2.2.1. Histologischer Colitis-Score

Der hier für die humanen Präparate angewandte histologische Colitis-Score ist im Rahmen des hiesigen SFB 633 Z1 etabliert, so dass die Auswertung durch zwei verblindete Pathologen erfolgen konnte. Sowohl für den Morbus Crohn als auch für die Colitis ulcerosa wurde ein modifizierter Score [120, 121] mit einer Gradeinteilung von 0 bis 4 verwendet (Tabelle 11, Seite 43).

### 2.2.2. Immunhistologie

Die Färbungen mit dem Endothelzellmarker CD31 und dem Pan-T-Zellmarker CD3 erfolgten nach der APAAP-Methode. Dabei ist der Primärantikörper spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen (CD3, CD31) gerichtet. Der Sekundärantikörper

<b>Grad</b>	<b>Morbus Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
0	Keine Entzündung	Keine Entzündung
1	Mildes Ödem und Inflammation in der Lamina propria	Milde chronisch inaktive Entzündung (Chronische Entzündungsinfiltrate, veränderte Architektur)
2	Kryptenabszesse und mäßige Entzündung der Lamina propria	Milde aktive Entzündung (Neutrophile Leukozyteninfiltrate in der Lamina propria)
3	Stärkere Entzündungsreaktion mit destruierenden Kryptenabszessen mit und ohne Granulomen	Mittelgradig aktive Entzündung (Kryptendestruktion)
4	Schwere Entzündung mit Ulcerationen oder Fissuren	Schwere aktive Entzündung (Erosionen oder Ulcerationen)

**Tabelle 11:** Histologischer Colitis-Score zur Beurteilung humaner Colitis-Präparate.

(Brückenantikörper) verbindet den primären Antikörper mit einem gegen ein Markerenzym (Alkalische Phosphatase) gerichteten Antikörper, so dass der Alkalische Phosphatase / Anti-Alkalische Phosphatase-Komplex (APAAP-Komplex) entsteht. Die histochemische Reaktion der alkalischen Phosphatase (Markerenzym) mit Neufuchsinhaltiger Entwicklungslösung führt zu einem roten Reaktionsprodukt, welches den Antigen-Antikörper-Komplex und damit die lokale Immunreaktion sichtbar macht. Die Auswertung der Immunfärbungen mit den Antikörpern anti-CD3 und anti-CD31 wurde semiquantitativ vorgenommen.

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1. Pilotstudie (Gruppen Ia-f)**

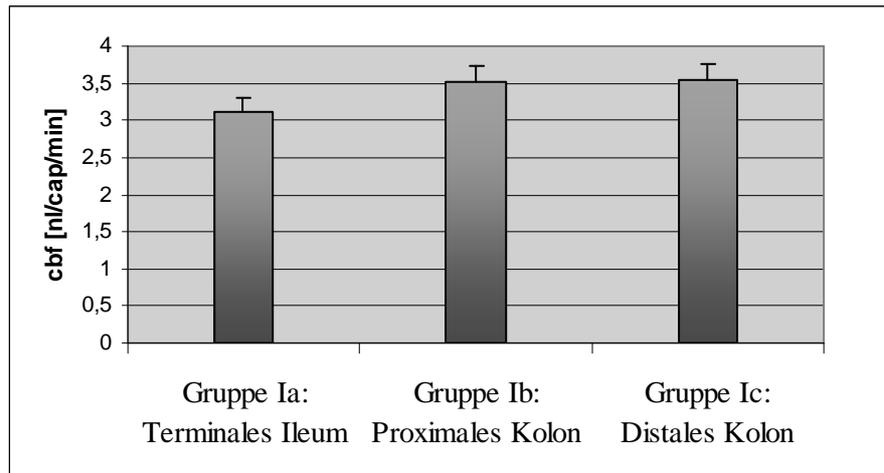
In der ersten Studie wurde an insgesamt 32 gesunden Tieren mit einem Körpergewicht von  $297\text{g} \pm 24\text{g}$  die Mikrozirkulation intravitalmikroskopisch charakterisiert. Dazu erfolgte die Untersuchung dreier Darmabschnitte: des terminalen Ileums (Gruppe Ia und Id) sowie des proximalen (Gruppe Ib und Ie) und distalen Kolons (Gruppe Ic und If). Bei allen drei Abschnitten wurde sowohl der kapilläre Blutfluss im Bereich der Serosa als auch der im Bereich der Mukosa gemessen. Dabei wurde zuerst die serosale und anschließend die mukosale Durchblutung bestimmt. Eine umgekehrte Reihenfolge ist aus präparatorischen Gründen wegen der damit verbundenen Durchtrennung der Gefäße und konsekutiver Blutung unmöglich. Angesichts der Belastung der Tiere war in der Regel nur die Messung zweier Darmabschnitte an einem Tier möglich (s. Ausschlusskriterien Kap. 2.1.8., Seite 38). Um einen systematischen Fehler zu vermeiden, erfolgten die Untersuchungen der verschiedenen Darmabschnitte in randomisierter Reihenfolge.

##### **3.1.1. Kapillärer Blutfluss im Bereich der Serosa (Gruppen Ia-c)**

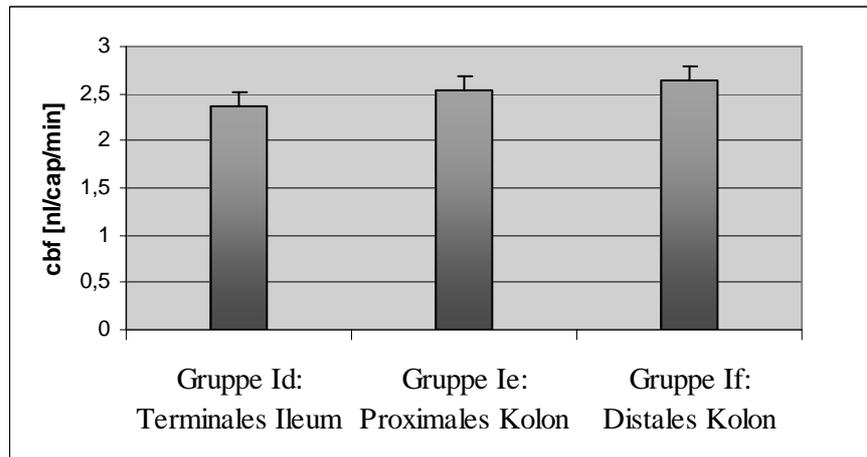
Die Messung des kapillären Blutflusses ist im Bereich der Serosa technisch bedingt erschwert, da es durch den Faeces zur störenden Reflexen kommt, was die Auswertung stark behindert. Der kapilläre Blutfluss (cbf) weist im Bereich der Serosa zwischen den verschiedenen Darmabschnitten keine wesentlichen Unterschiede auf, er liegt zwischen  $3.11 \pm 0.04$  und  $3.54 \pm 0.06$  nl/cap/min (Abbildung 14, Seite 45). Die Tabelle 12 (Seite 46) beinhaltet die Einzelergebnisse der untersuchten Tiere in den jeweiligen Gruppen. An den 32 untersuchten Darmabschnitten wurden insgesamt 1131 Kapillaren ausgezählt.

##### **3.1.2. Kapillärer Blutfluss im Bereich der Mukosa (Gruppen Id-f)**

Ein vergleichbares Bild zeigt der kapilläre Blutfluss im Bereich der Schleimhaut. Er ist zwar mit Werten zwischen  $2.37 \pm 0.04$  und  $2.64 \pm 0.04$  nl/cap/min insgesamt deutlich geringer, doch auch hier bestehen zwischen den einzelnen Darmabschnitten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15, Seite 45). In Tabelle 13 (Seite 47) sind wiederum die Einzelwerte der untersuchten Tiere der jeweiligen Gruppen wiedergegeben. Bei 38 untersuchten Darmabschnitten konnten hier zusammen 2091 Kapillaren ausgewertet werden.



**Abb. 14:** Kapillärer Blutfluss (cbf) der Serosa in verschiedenen Darmabschnitten (Gruppen Ia-c).



**Abb. 15:** Kapillärer Blutfluss (cbf) der Mukosa in verschiedenen Darmabschnitten (Gruppen Id-f).

### 3.2. Colitis-Induktionsstudie (Gruppen II-V)

Nachdem die Technik der Intravitalmikroskopie am gesunden Rattendarm erfolgreich etabliert werden konnte, erfolgte die Evaluation zweier Colitis-Modelle, des TNBS-Modells sowie des Mitomycin C-Modells. Unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen Charakterisierung der Modelle wurden nach Colitis-Induktion Messungen des kapillären Blutflusses zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen. Dabei wurde jeweils das proximale und das distale Kolon in randomisierter Reihenfolge untersucht. Aufgrund des paralytischen Ileus war aus technischen Gründen die Untersuchung des kapillären Blutflusses im Bereich der Serosa nur in Einzelfällen möglich, so dass eine

systematische Analyse allein im Bereich der Schleimhautmikrozirkulation durchgeführt werden konnte. Zur Bestimmung des Entzündungsgrades erfolgte im Anschluss an die Intravitalmikroskopie die histologische Aufarbeitung des untersuchten Darmsegments und die Bewertung nach dem eigens entwickelten histologischen Colitis-Score (s. Kap. 2.1.7., Seite 37).

<b>cbf (nl/cap/min)</b> <b>Gruppe Ia:</b> <b>Serosa terminales Ileum</b> <b>n=422 Kapillaren / 10 Tiere</b>	<b>cbf (nl/cap/min)</b> <b>Gruppe Ib:</b> <b>Serosa proximales Kolon</b> <b>n=277 Kapillaren / 9 Tiere</b>	<b>cbf (nl/cap/min)</b> <b>Gruppe Ic:</b> <b>Serosa distales Kolon</b> <b>n=432 Kapillaren / 13 Tiere</b>
2.71 ± 0.03	3.81 ± 0.07	3.98 ± 0.08
3.96 ± 0.06	3.05 ± 0.05	4.04 ± 0.07
2.94 ± 0.04	3.72 ± 0.08	3.89 ± 0.04
3.17 ± 0.03	3.75 ± 0.04	2.98 ± 0.08
3.15 ± 0.05	3.38 ± 0.03	3.02 ± 0.07
3.21 ± 0.04	3.66 ± 0.05	3.41 ± 0.04
2.39 ± 0.06	3.46 ± 0.06	3.42 ± 0.04
2.64 ± 0.05	3.74 ± 0.09	3.86 ± 0.07
3.76 ± 0.04	3.11 ± 0.06	3.68 ± 0.05
3.21 ± 0.04		3.34 ± 0.06
		3.21 ± 0.07
		3.42 ± 0.05
		3.80 ± 0.06
3.11 ± 0.04	3.52 ± 0.07	3.54 ± 0.06

**Tabelle 12:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des kapillären Blutflusses (cbf) im Bereich der Serosa verschiedener Darmabschnitte (Gruppen Ia-Ic).

<b>cbf (nl/cap/min)</b> <b>Gruppe Id:</b> Mukosa terminales Ileum n=508 Kapillaren / 11 Tiere	<b>cbf (nl/cap/min)</b> <b>Gruppe Ie:</b> Mukosa proximales Kolon n=725 Kapillaren / 13 Tiere	<b>cbf (nl/cap/min)</b> <b>Gruppe If:</b> Mukosa distales Kolon n=858 Kapillaren / 14 Tiere
2.88 ± 0.05	3.00 ± 0.06	3.07 ± 0.05
1.97 ± 0.06	2.85 ± 0.05	3.74 ± 0.08
2.75 ± 0.07	2.21 ± 0.06	2.23 ± 0.03
2.10 ± 0.05	1.41 ± 0.07	1.69 ± 0.06
2.04 ± 0.04	2.29 ± 0.06	1.79 ± 0.05
2.33 ± 0.05	2.88 ± 0.06	2.11 ± 0.04
2.33 ± 0.03	2.54 ± 0.03	1.67 ± 0.07
2.65 ± 0.04	2.12 ± 0.05	2.46 ± 0.04
1.98 ± 0.07	2.53 ± 0.03	2.54 ± 0.05
2.69 ± 0.06	3.09 ± 0.06	2.73 ± 0.06
2.34 ± 0.04	2.69 ± 0.04	3.68 ± 0.05
	1.74 ± 0.07	3.07 ± 0.06
	3.50 ± 0.08	2.23 ± 0.04
		3.91 ± 0.06
2.37 ± 0.04	2.53 ± 0.04	2.64 ± 0.04

**Tabelle 13:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des kapillären Blutflusses (cbf) im Bereich der Mukosa verschiedener Darmabschnitte (Gruppen Id-If).

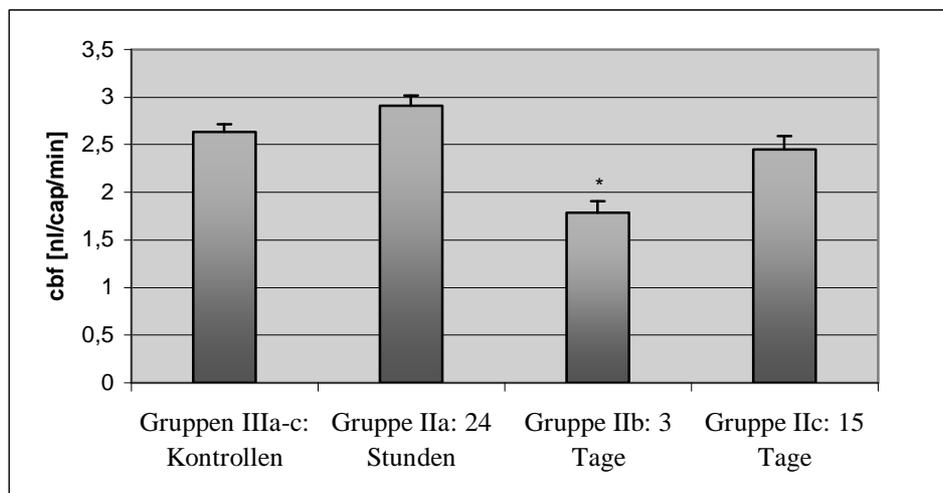
### 3.2.1. TNBS-Modell (Gruppen IIa-c und IIIa-c)

Bei der TNBS-Colitis kommt es nach einmaliger intrarektaler Induktion rasch zu einer hoch floriden transmuralen Entzündung des distalen Kolons, die nach etwa zwei Wochen in eine chronische Entzündung übergeht. Makroskopisch findet sich regelhaft ein massiv dilatiertes, stuhlgefülltes distales Kolon. Die Serosa ist deutlich im Sinne einer Peritonitis gerötet. Der aufgeschnittene Darm zeigt eine floride ulceröse, partiell nekrotische Schleimhaut. Das proximale Kolon sowie das übrige Abdomen erscheinen unauffällig. Um die Mikrozirkulation im akuten Entzündungsstadium des Dickdarms zu beschreiben,

erfolgten die Messungen 24 Stunden, 3 Tage und 15 Tage nach Induktion bei jeweils 8 Tieren pro Gruppe. Ein Tier verstarb am 13. Tag nach Induktion, zwei weitere mussten gemäß den Ausschlusskriterien (s. Kap. 2.1.8., Seite 38) aufgrund kardiorespiratorischer Instabilität ausgeschlossen werden.

### 3.2.1.1. Kapillärer Blutfluss bei TNBS-Colitis (Gruppen IIa-c)

24 Stunden nach der Colitis-Induktion ist der kapilläre Blutfluss der distalen Dickdarmschleimhaut im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren ( $2.60 \pm 0.06$  nl/cap/min) mit  $2.91 \pm 0.05$  nl/cap/min tendenziell erhöht. Nach 3 Tagen kommt es zu einer signifikanten Verminderung ( $1.79 \pm 0.05$  vs.  $2.63 \pm 0.05$  nl/cap/min,  $p < 0.01$ ). Am 15. Tag hat die Mikrozirkulation mit  $2.45 \pm 0.06$  nl/cap/min nahezu wieder den Wert der Kontrolltiere ( $2.59 \pm 0.05$  nl/cap/min) erreicht (Abbildung 16, Seite 48). Im Bereich des proximalen Kolons lassen sich keine wesentlichen Änderungen nachweisen (Abbildung 17, Seite 49). Die Tabelle 14 (Seite 50) fasst die Einzelergebnisse der untersuchten Tiere der jeweiligen Gruppen zusammen. Insgesamt wurden 2986 Kapillaren ausgezählt.

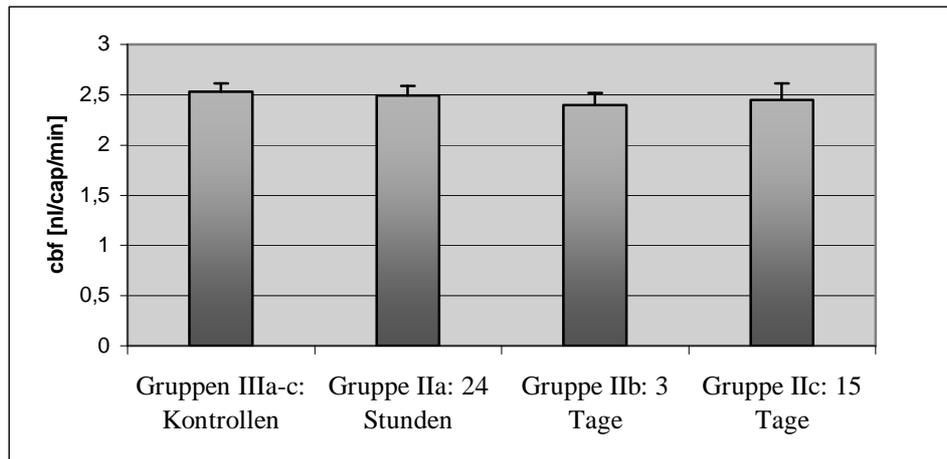


**Abb. 16:** Kapillärer Blutfluss (cbf) der Mukosa im Bereich des distalen Kolons zu verschiedenen Zeitpunkten nach TNBS-Colitis-Induktion (Gruppen IIa-c).  
\*  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrollgruppe.

### 3.2.1.2. Kapillärer Blutfluss bei TNBS-Kontrolltieren (Gruppen IIIa-c)

Die Kontrolltiere, bei denen eine Scheininduktion der Colitis durch intrarektale Applikation physiologischer Kochsalzlösung erfolgte, zeigen im Vergleich zu den Tieren der Pilotstudie (Gruppen Ie-f) keine Änderung des kapillären Blutflusses. Er liegt im

proximalen Abschnitt zwischen  $2.49 \pm 0.06$  und  $2.54 \pm 0.05$  nl/cap/min und in distalen Bereich zwischen  $2.59 \pm 0.05$  und  $2.63 \pm 0.05$  nl/cap/min. Die einzelnen Ergebnisse sind wiederum in Tabelle 15 (Seite 51) zusammengefasst. Bei intakter Schleimhaut war die Untersuchung des gesamten eröffneten Darmabschnitts möglich, so dass 3710 Kapillaren ausgewertet werden konnten.



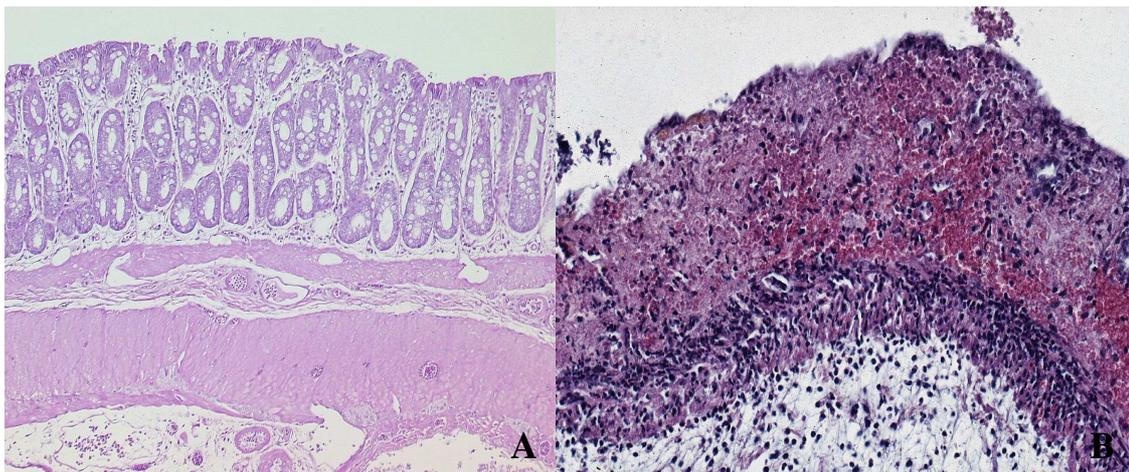
**Abb. 17:** Kapillärer Blutfluss (cbf) der Mukosa im Bereich des proximalen Kolons zu verschiedenen Zeitpunkten nach TNBS-Colitis-Induktion (Gruppen IIa-c).  
\*  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrollgruppe.

### 3.2.1.3. Histologie bei TNBS-Colitis (Gruppen IIa-c)

Bereits einen Tag nach der Induktion findet sich im Bereich des distalen Kolons eine schwere floride Entzündung (Score:  $8.9 \pm 2.0$ ). Sie ist durch schwere Erosionen bzw. Ulcerationen der Schleimhaut und durch eine ausgeprägte Infiltration von Granulozyten in der Lamina propria mucosae gekennzeichnet. Die Submukosa ist ödematös aufgetrieben. Ein vergleichbares Bild besteht auch noch am dritten Tag nach Induktion (Score:  $8.5 \pm 1.4$ ) (Abbildung 18, Seite 50). 15 Tage nach Colitis-Induktion findet sich eine signifikante Besserung ( $p < 0.05$ ), neben akuten lassen sich nunmehr auch chronische Entzündungszeichen nachweisen (Score:  $5.4 \pm 1.2$ ) (Tabelle 16, Seite 52 und Abbildung 19, Seite 51). Das makroskopisch unauffällige proximale Kolon zeigt auch histologisch die gesamte Zeit über keine Zeichen der Entzündung (Score:  $0.3 \pm 0.5$  /  $0.4 \pm 0.5$  /  $0.3 \pm 0.5$ ). Die Tabelle 17 (Seite 52) beinhaltet die Einzelwerte der histologischen Untersuchungen.

cbf (nl/cap/min)		cbf (nl/cap/min)		cbf (nl/cap/min)	
Gruppe IIa (n=8 Tiere): TNBS-Colitis: 24 Stunden		Gruppe IIb (n=7 Tiere): TNBS-Colitis: 3 Tage		Gruppe IIc (n=6 Tiere): TNBS-Colitis: 15 Tage	
Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon
n=538 Kapillaren	n=660 Kapillaren	n=513 Kapillaren	n=510 Kapillaren	n=371 Kapillaren	n=394 Kapillaren
2.38 ± 0.14	3.12 ± 0.08	1.51 ± 0.08	1.12 ± 0.06	1.92 ± 0.06	3.27 ± 0.06
2.07 ± 0.12	2.96 ± 0.04	Ausschluss	Ausschluss	2.98 ± 0.09	2.41 ± 0.04
2.55 ± 0.07	3.65 ± 0.12	3.09 ± 0.07	2.59 ± 0.08	3.23 ± 0.07	1.57 ± 0.05
2.85 ± 0.15	2.28 ± 0.05	2.26 ± 0.03	1.14 ± 0.07	Ausschluss	Ausschluss
2.68 ± 0.12	2.39 ± 0.08	2.94 ± 0.08	2.01 ± 0.04	2.17 ± 0.05	1.42 ± 0.08
2.07 ± 0.16	3.64 ± 0.04	3.47 ± 0.04	2.04 ± 0.04	Exitus	Exitus
3.10 ± 0.08	1.28 ± 0.10	1.79 ± 0.06	1.88 ± 0.05	2.10 ± 0.06	3.91 ± 0.07
2.24 ± 0.14	3.93 ± 0.05	1.77 ± 0.08	1.72 ± 0.04	2.32 ± 0.08	2.12 ± 0.05
2.49 ± 0.12	2.91 ± 0.05	2.40 ± 0.06	1.79 ± 0.05	2.45 ± 0.08	2.45 ± 0.06

**Tabelle 14:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des kapillären Blutflusses (cbf) im Bereich der Mukosa verschiedener Darmabschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten bei TNBS-Colitis (Gruppen IIa-c).

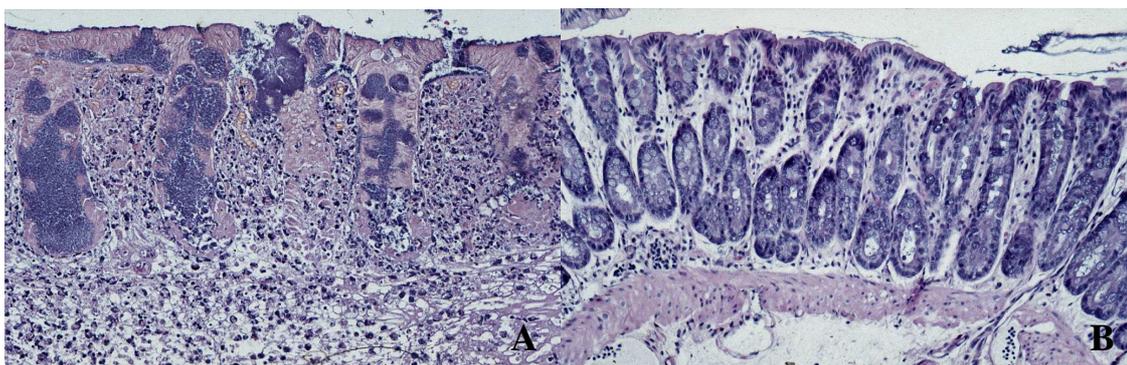


**Abb. 18:** (A) Regelrecht aufgebaute Dickdarmwand mit intakter Schleimhaut (Kontrolltier, HE-Färbung, x100).

(B) Darmwand des distalen Kolons 3 Tage nach TNBS-Colitis-Induktion: Schwere ulceröse Entzündung der Mukosa mit Granulozyteninfiltration und Hämorrhagie, Zerstörung der Lamina muscularis mucosae, Ödem im Bereich der Submukosa (HE-Färbung, x60).

cbf (nl/cap/min)		cbf (nl/cap/min)		cbf (nl/cap/min)	
Gruppe IIIa (n=8 Tiere): TNBS-Kontrolle: 24 Stunden		Gruppe IIIb (n=8 Tiere): TNBS-Kontrolle: 3 Tage		Gruppe IIIc (n=8 Tiere): TNBS-Kontrolle: 15 Tage	
Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon
n=611 Kapillaren	n=634 Kapillaren	n=589 Kapillaren	n=677 Kapillaren	n=601 Kapillaren	n=598 Kapillaren
2.45 ± 0.04	3.02 ± 0.08	2.65 ± 0.06	1.99 ± 0.06	2.55 ± 0.07	3.09 ± 0.04
1.90 ± 0.06	2.86 ± 0.06	2.43 ± 0.04	2.59 ± 0.04	2.98 ± 0.06	2.41 ± 0.05
2.55 ± 0.05	2.34 ± 0.07	2.26 ± 0.06	2.93 ± 0.07	2.77 ± 0.06	1.99 ± 0.05
2.87 ± 0.04	2.28 ± 0.05	2.94 ± 0.07	2.76 ± 0.03	2.17 ± 0.04	2.56 ± 0.05
2.68 ± 0.05	2.39 ± 0.06	2.76 ± 0.05	2.45 ± 0.05	2.36 ± 0.05	2.88 ± 0.07
2.32 ± 0.07	2.72 ± 0.04	2.13 ± 0.06	2.48 ± 0.04	2.32 ± 0.05	2.55 ± 0.06
2.89 ± 0.06	2.32 ± 0.06	2.37 ± 0.04	2.86 ± 0.05	2.76 ± 0.06	2.45 ± 0.04
2.59 ± 0.05	2.87 ± 0.06	2.41 ± 0.06	3.01 ± 0.06	2.15 ± 0.07	2.81 ± 0.05
2.54 ± 0.05	2.60 ± 0.06	2.49 ± 0.06	2.63 ± 0.05	2.51 ± 0.06	2.59 ± 0.05

**Tabelle 15:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des kapillären Blutflusses (cbf) im Bereich der Mukosa verschiedener Darmabschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten bei TNBS-Kontrolltieren (Gruppen IIIa-c).



**Abb. 19:** Distales Kolon 15 Tage nach TNBS-Colitis-Induktion. Unterschiedliche Stadien der Regeneration des Epithels.

- (A) Noch deutlich veränderte Schleimhaut mit Erosionen und Rundzellinfiltraten (HE-Färbung, x70).
- (B) Regeneriertes Epithel mit intakter Lamina muscularis mucosae. Noch deutliche Infiltration von Rundzellen in der Lamina propria mucosae als Ausdruck weiterhin bestehender Entzündung (HE-Färbung, x50).

Zeitpunkt nach Induktion	Kontrollgruppe (Gruppen IIIa-c)		TNBS-Colitis (Gruppen IIa-c)	
	Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon
24 Stunden	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5	8.9 ± 2.0
3 Tage	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	8.5 ± 1.4
15 Tage	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5	5.4 ± 1.2*

**Tabelle 16:** Aktivität der akuten Entzündung nach histologischem Score im Bereich des proximalen und distalen Kolons bei TNBS-Colitis (Gruppen IIa-c) und Kontrolltieren (Gruppen IIIa-c) zu verschiedenen Zeitpunkten.

\*  $p < 0.05$  gegenüber 24 Stunden und 3 Tagen.

Histologie (Score) Gruppe IIa (n=8 Tiere): TNBS-Colitis: 24 Stunden		Histologie (Score) Gruppe IIb (n=7 Tiere): TNBS-Colitis: 3 Tage		Histologie (Score) Gruppe IIc (n=6 Tiere): TNBS-Colitis: 15 Tage	
Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon
0	11	0	10	0	4
0	7	Ausschluss	Ausschluss	1	5
1	11	1	9	1	6
0	9	1	9	Ausschluss	Ausschluss
0	5	0	8	0	7
0	9	1	6	Exitus	Exitus
1	9	0	10	0	4
0	10	0	8	0	6
0.3 ± 0.5	8.9 ± 2.0	0.4 ± 0.5	8.5 ± 1.4	0.3 ± 0.5	5.4 ± 1.2

**Tabelle 17:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des histologischen Entzündungsgrades (Score) verschiedener Darmabschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten bei TNBS-Colitis (Gruppen IIa-c).

#### 3.2.1.4. Histologie bei TNBS-Kontrolltieren (Gruppen IIIa-c)

Die Kontrolltiere zeigen weder makroskopisch noch mikroskopisch Zeichen der akuten bzw. chronischen Entzündung, so dass die Werte nach dem Score sowohl für das proximale als auch das distale Kolon zwischen  $0.3 \pm 0.5$  und  $0.4 \pm 0.5$  liegen (Tabelle 18, Seite 53).

Histologie (Score)		Histologie (Score)		Histologie (Score)	
Gruppe IIIa (n=8 Tiere): TNBS-Kontrolle: 24 Stunden		Gruppe IIIb (n=8 Tiere): TNBS-Kontrolle: 3 Tage		Gruppe IIIc (n=8 Tiere): TNBS-Kontrolle: 15 Tage	
Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon
0	0	1	0	1	0
0	1	0	0	0	0
0	0	0	1	0	1
1	1	1	1	0	1
0	0	1	0	1	1
0	1	0	0	0	0
1	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0
0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.5

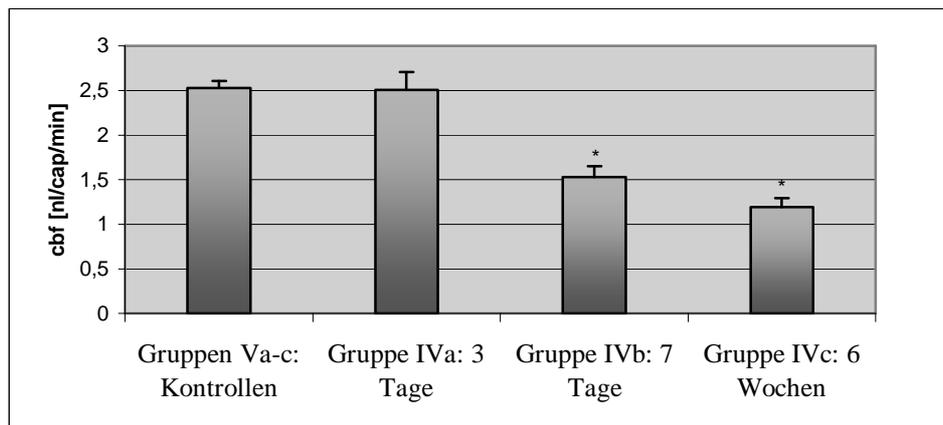
**Tabelle 18:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des histologischen Entzündungsgrades (Score) verschiedener Darmabschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten bei TNBS-Kontrolltieren (Gruppen IIIa-c).

### 3.2.2. Mitomycin C-Modell (Gruppen IVa-c und Va-c)

Bei diesem Modell kommt es nach einmaliger intraperitonealer Injektion von Mitomycin C zur allmählichen Entwicklung einer auf die Schleimhaut begrenzten chronischen Colitis. Diese über Wochen persistierende Colitis findet sich betont im proximalen Kolon, wobei die Schleimhaut des gesamten Kolons makroskopisch unauffällig ist. Intraabdominell imponiert eine diffuse Peritonitis mit entsprechenden Adhäsionen und teilweise ausgeprägter Ascitesbildung, so dass die atraumatische Präparation erheblich erschwert ist. Zur Charakterisierung der Mikrozirkulation im chronischen Entzündungsstadium erfolgten intravitalmikroskopische Messungen der proximalen und distalen Kolonmukosa. Die Untersuchungen wurden 3 Tage, 7 Tage sowie 6 Wochen nach der Colitis-Induktion bei jeweils 8 Tieren pro Gruppe vorgenommen. Sämtliche Tiere erkrankten, ohne dass eines an den Folgen verstarb. Allerdings mussten zwei Tiere gemäß den Ausschlusskriterien (s. Kap. 2.1.8., Seite 38) aufgrund kardiorespiratorischer Instabilität von der Auswertung ausgeschlossen werden.

### 3.2.2.1. Kapillärer Blutfluss bei Mitomycin C-Colitis (Gruppen IVa-c)

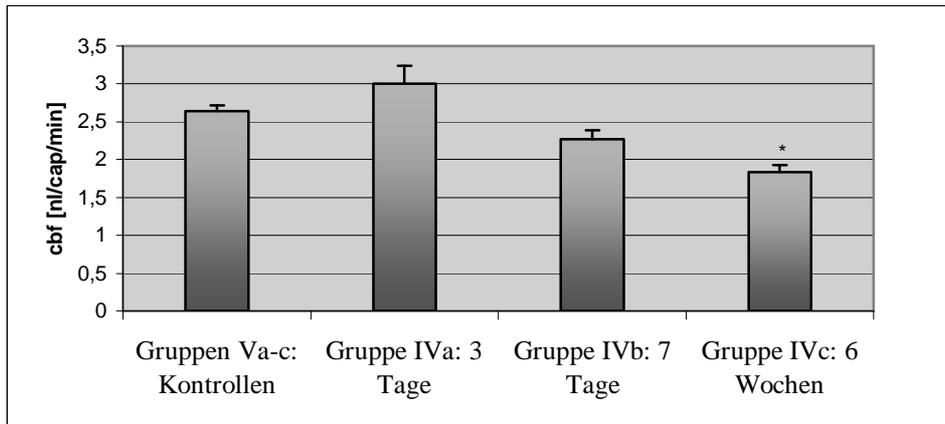
Im proximalen Kolon ist der kapilläre Blutfluss der Dickdarmschleimhaut 3 Tage nach Induktion unverändert ( $2.51 \pm 0.10$  vs.  $2.51 \pm 0.05$  (Kontrollen) nl/cap/min). Bereits nach 7 Tagen findet sich allerdings im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine signifikante Reduktion ( $1.53 \pm 0.06$  vs.  $2.54 \pm 0.05$  nl/cap/min,  $p < 0.01$ ), die im weiteren Verlauf nach 6 Wochen mit  $1.19 \pm 0.05$  vs.  $2.53 \pm 0.06$  (Kontrollen) nl/cap/min noch stärker ausgeprägt ist (Abbildung 20, Seite 54). Nicht ganz so markant sind die Veränderungen im distalen Kolon. Hier kommt es nach 3 Tagen zunächst zu einer leichten Steigerung der Mikrozirkulation ( $3.00 \pm 0.12$  vs.  $2.61 \pm 0.04$  (Kontrollen) nl/cap/min), nach 7 Tagen ist diese jedoch deutlich ( $2.27 \pm 0.06$  vs.  $2.62 \pm 0.04$  (Kontrollen) nl/cap/min) und nach 6 Wochen mit  $1.83 \pm 0.05$  vs.  $2.64 \pm 0.04$  (Kontrollen) nl/cap/min signifikant ( $p < 0.01$ ) reduziert (Abbildung 21, Seite 55). Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 19 (Seite 55) zusammengefasst. Insgesamt wurden 1539 Kapillaren ausgezählt.



**Abb. 20:** Kapillärer Blutfluss (cbf) der Mukosa im Bereich des proximalen Kolons zu verschiedenen Zeitpunkten nach Mitomycin C-Colitis-Induktion (Gruppen IVa-c).  
\*  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrollgruppe.

### 3.2.2.2. Kapillärer Blutfluss bei Mitomycin C-Kontrolltieren (Gruppen Va-c)

Bei den Kontrollgruppen zur Mitomycin C-Induktionsstudie erfolgte eine Scheininduktion durch intraperitoneale Applikation physiologischer Kochsalzlösung. An den entsprechenden Tagen (3 Tage, 7 Tage sowie 6 Wochen) wurde sowohl das proximale als auch das distale Kolon intravitalmikroskopisch untersucht. Im Vergleich zu den Tieren der Pilotstudie (Gruppen Ie-f) besteht kein wesentlicher Unterschied des kapillären Blutflusses.



**Abb. 21:** Kapillärer Blutfluss (cbf) der Mukosa im Bereich des distalen Kolons zu verschiedenen Zeitpunkten nach Mitomycin C-Colitis-Induktion (Gruppen IVa-c).  
\* p<0.01 verglichen mit der Kontrollgruppe.

cbf (nl/cap/min)		cbf (nl/cap/min)		cbf (nl/cap/min)	
Gruppe IVa (n=8 Tiere): Mitomycin C-Colitis: 3 Tage		Gruppe IVb (n=7 Tiere): Mitomycin C-Colitis: 7 Tage		Gruppe IVc (n=7 Tiere): Mitomycin C-Colitis: 42 Tage	
Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon
n=178 Kapillaren	n=200 Kapillaren	n=226 Kapillaren	n=319 Kapillaren	n=239 Kapillaren	n=377 Kapillaren
3.67 ± 0.12	3.61 ± 0.12	1.19 ± 0.06	2.73 ± 0.04	1.45 ± 0.06	1.88 ± 0.05
2.74 ± 0.11	3.71 ± 0.14	Ausschluss	Ausschluss	1.15 ± 0.05	1.52 ± 0.04
1.62 ± 0.13	2.51 ± 0.11	1.04 ± 0.07	2.42 ± 0.06	0.91 ± 0.04	1.48 ± 0.05
1.78 ± 0.10	2.41 ± 0.13	1.47 ± 0.05	2.72 ± 0.05	1.14 ± 0.06	1.25 ± 0.05
2.68 ± 0.08	2.39 ± 0.11	1.92 ± 0.07	1.67 ± 0.05	1.59 ± 0.05	2.12 ± 0.06
2.23 ± 0.09	3.64 ± 0.16	1.87 ± 0.06	1.23 ± 0.06	Ausschluss	Ausschluss
3.12 ± 0.10	2.62 ± 0.09	1.34 ± 0.04	2.71 ± 0.04	1.03 ± 0.06	2.27 ± 0.04
2.24 ± 0.09	3.12 ± 0.11	1.88 ± 0.05	2.40 ± 0.06	1.06 ± 0.04	2.32 ± 0.05
2.51 ± 0.10	3.00 ± 0.12	1.53 ± 0.06	2.27 ± 0.06	1.19 ± 0.05	1.83 ± 0.05

**Tabelle 19:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des kapillären Blutflusses (cbf) im Bereich der Mukosa verschiedener Darmabschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten bei Mitomycin C-Colitis (Gruppen IVa-c).

Er liegt im proximalen Abschnitt zwischen  $2.51 \pm 0.05$  und  $2.54 \pm 0.05$  nl/cap/min und im distalen Bereich zwischen  $2.61 \pm 0.04$  und  $2.64 \pm 0.04$  nl/cap/min. Die einzelnen Ergebnisse sind noch einmal in Tabelle 20 (Seite 56) zusammengefasst. Bei intakter Schleimhaut war wiederum die Untersuchung des gesamten eröffneten Darmabschnitts möglich, so dass 3271 Kapillaren ausgewertet werden konnten.

cbf (nl/cap/min)		cbf (nl/cap/min)		cbf (nl/cap/min)	
Gruppe Va (n=8 Tiere): Mitomycin C-Kontrolle: 3 Tage		Gruppe Vb (n=8 Tiere): Mitomycin C-Kontrolle: 7 Tage		Gruppe Vc (n=8 Tiere): Mitomycin C-Kontrolle: 42 Tage	
Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon
n=456 Kapillaren	n=613 Kapillaren	n=544 Kapillaren	n=510 Kapillaren	n=561 Kapillaren	n=587 Kapillaren
$2.98 \pm 0.05$	$2.87 \pm 0.04$	$2.11 \pm 0.04$	$2.73 \pm 0.04$	$2.44 \pm 0.06$	$2.33 \pm 0.05$
$2.74 \pm 0.04$	$2.57 \pm 0.04$	$2.31 \pm 0.05$	$2.91 \pm 0.05$	$2.39 \pm 0.07$	$2.77 \pm 0.05$
$2.35 \pm 0.05$	$2.31 \pm 0.05$	$2.51 \pm 0.05$	$2.72 \pm 0.05$	$2.79 \pm 0.05$	$2.87 \pm 0.04$
$2.44 \pm 0.06$	$2.41 \pm 0.04$	$2.80 \pm 0.06$	$2.21 \pm 0.04$	$2.92 \pm 0.05$	$2.98 \pm 0.04$
$2.68 \pm 0.04$	$2.39 \pm 0.05$	$2.33 \pm 0.03$	$2.45 \pm 0.06$	$2.31 \pm 0.07$	$2.32 \pm 0.04$
$2.54 \pm 0.05$	$2.66 \pm 0.04$	$2.35 \pm 0.04$	$2.71 \pm 0.04$	$2.23 \pm 0.04$	$2.27 \pm 0.05$
$2.23 \pm 0.05$	$2.76 \pm 0.03$	$2.78 \pm 0.05$	$2.75 \pm 0.05$	$2.51 \pm 0.06$	$2.76 \pm 0.04$
$2.15 \pm 0.07$	$2.88 \pm 0.04$	$3.11 \pm 0.06$	$2.49 \pm 0.04$	$2.65 \pm 0.06$	$2.81 \pm 0.05$
$2.51 \pm 0.05$	$2.61 \pm 0.04$	$2.54 \pm 0.05$	$2.62 \pm 0.04$	$2.53 \pm 0.06$	$2.64 \pm 0.04$

**Tabelle 20:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des kapillären Blutflusses (cbf) im Bereich der Mukosa verschiedener Darmabschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten bei Mitomycin C-Kontrolltieren (Gruppen Va-c).

### 3.2.2.3. Histologie bei Mitomycin C-Colitis (Gruppen IVa-c)

Im Bereich der Mukosa kommt es zur Entwicklung einer chronischen Entzündung mit Umbau der Schleimhaut und deutlicher Infiltration von Rundzellen im Bereich der Lamina propria mucosae. Die Veränderungen nehmen im Bereich des proximalen Kolons im Laufe der Zeit zu (Score:  $2.8 \pm 1.2$  (3 Tage),  $4.8 \pm 1.1$  (7 Tage),  $5.3 \pm 1.0$  (6 Wochen)), so dass 6 Wochen nach Induktion eine ausgeprägte chronische Entzündung vorliegt. Der

Unterschied zwischen den Veränderungen nach 3 Tagen und den nach 6 Wochen ist signifikant ( $p < 0.05$ ) (Tabelle 22, Seite 58 und Abbildung 22, Seite 59). Deutlich geringer sind die Alterationen im distalen Kolon (Score:  $2.6 \pm 0.7$  (3 Tage),  $3.0 \pm 0.8$  (7 Tage),  $2.9 \pm 0.7$  (6 Wochen)), wenngleich auch hier eine persistierende chronische Colitis nachweisbar ist. In Tabelle 21 (Seite 57) sind die Einzelwerte der histologischen Untersuchungen zusammengefasst.

Histologie (Score)		Histologie (Score)		Histologie (Score)	
Gruppe IVa (n=8 Tiere): Mitomycin C-Colitis: 3 Tage		Gruppe IVb (n=7 Tiere): Mitomycin C-Colitis: 7 Tage		Gruppe IVc (n=7 Tiere): Mitomycin C-Colitis: 42 Tage	
Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon
2	3	6	2	5	3
3	3	Ausschluss	Ausschluss	5	2
4	2	6	3	7	3
4	3	5	4	5	2
3	4	5	3	4	3
3	2	4	2	Ausschluss	Ausschluss
1	2	5	3	5	4
2	2	3	4	6	3
$2.8 \pm 1.2$	$2.6 \pm 0.7$	$4.8 \pm 1.1$	$3.0 \pm 0.8$	$5.3 \pm 1.0$	$2.9 \pm 0.7$

**Tabelle 21:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des histologischen Entzündungsgrades (Score) verschiedener Darmabschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten bei Mitomycin C-Colitis (Gruppen IVa-c).

#### 3.2.2.4. Histologie bei Mitomycin C-Kontrolltieren (Gruppen Va-c)

Die Kontrolltiere zeigen weder makroskopisch noch mikroskopisch Zeichen der akuten bzw. chronischen Entzündung, so dass die Werte nach dem Score sowohl für das proximale als auch das distale Kolon zwischen  $0.3 \pm 0.5$  und  $0.4 \pm 0.5$  liegen (Tabelle 23, Seite 58).

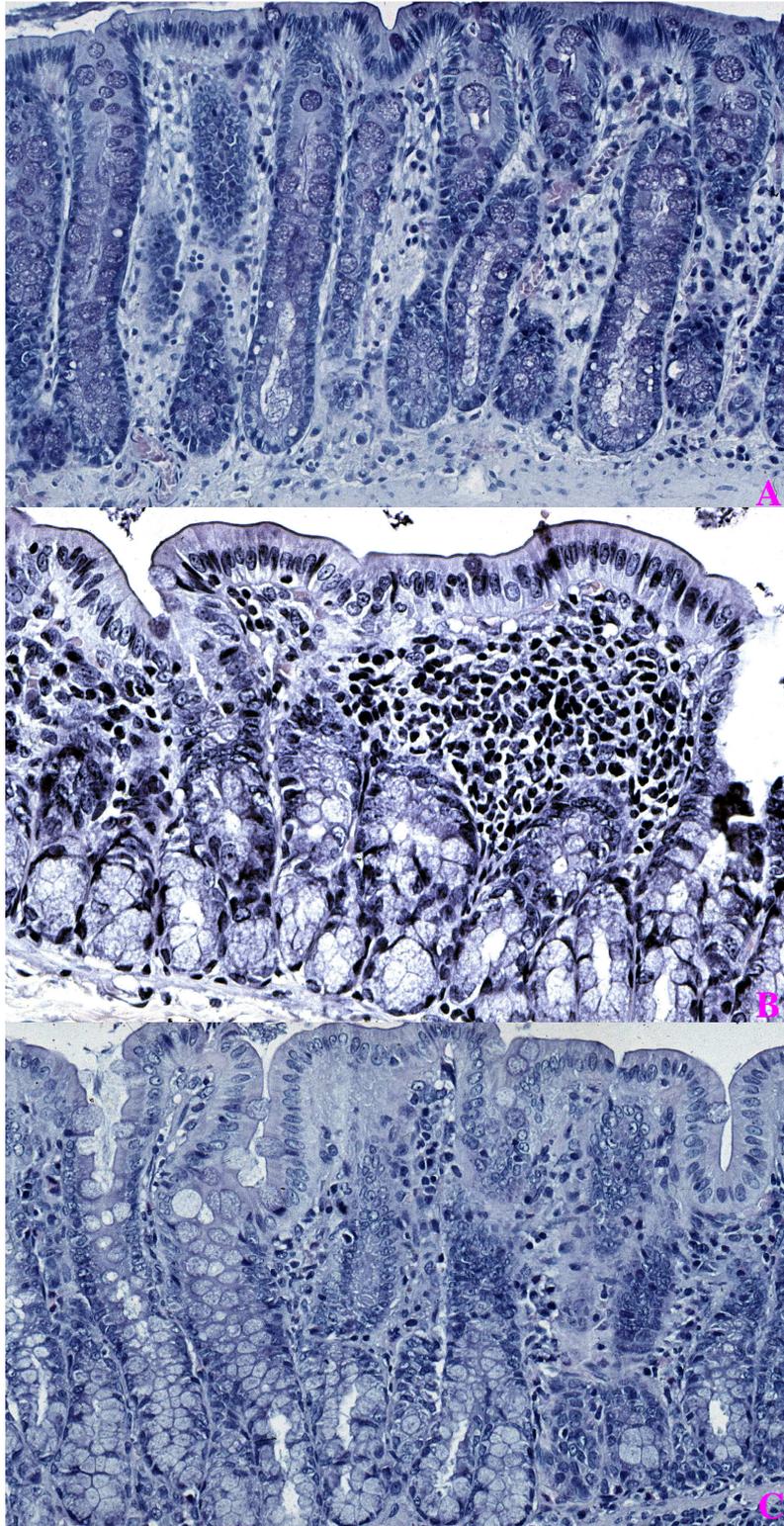
Zeitpunkt nach Induktion	Kontrollgruppe (Gruppen Va-c)		Mitomycin C-Colitis (Gruppen IVa-c)	
	Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon
3 Tage	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	2.8 ± 1.2	2.6 ± 0.7
7 Tage	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.5	4.8 ± 1.1	3.0 ± 0.8
6 Wochen	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5	5.3 ± 1.0*	2.9 ± 0.7

**Tabelle 22:** Aktivität der chronischen Entzündung nach histologischem Score im Bereich des proximalen und distalen Kolons bei Mitomycin C-Colitis (Gruppen IVa-c) und Kontrolltieren (Gruppen Va-c) zu verschiedenen Zeitpunkten.

\* p<0.05 gegenüber 3 Tagen.

Histologie (Score) Gruppe Va (n=8 Tiere): Mitomycin C-Kontrolle: 3 Tage		Histologie (Score) Gruppe Vb (n=8 Tiere): Mitomycin C-Kontrolle: 7 Tage		Histologie (Score) Gruppe Vc (n=8 Tiere): Mitomycin C-Kontrolle: 42 Tage	
Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon	Proximales Kolon	Distales Kolon
1	0	1	0	0	0
0	0	0	1	1	0
0	1	0	0	0	0
0	0	1	1	1	1
1	0	1	0	0	1
0	0	0	0	1	0
0	1	0	1	0	0
0	1	0	0	0	0
0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.3 ± 0.5

**Tabelle 23:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des histologischen Entzündungsgrades (Score) verschiedener Darmabschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten bei Mitomycin C-Kontrolltieren (Gruppen Va-c).



**Abb. 22:** Mitomycin C-Colitis des proximalen Kolons mit chronischer Entzündungsreaktion der Schleimhaut.

- (A) 3 Tage nach Induktion: Rundzellinfiltrate in der Lamina propria mucosae bei intaktem Epithel (HE-Färbung, x60).
- (B) 7 Tage nach Induktion: Deutliche Zunahme der Rundzellen (HE-Färbung, x80).
- (C) 6 Wochen nach Induktion: Merklich veränderte Schleimhautarchitektur mit verzweigten Krypten bei persistierender Infiltration von Rundzellen (HE-Färbung, x70).

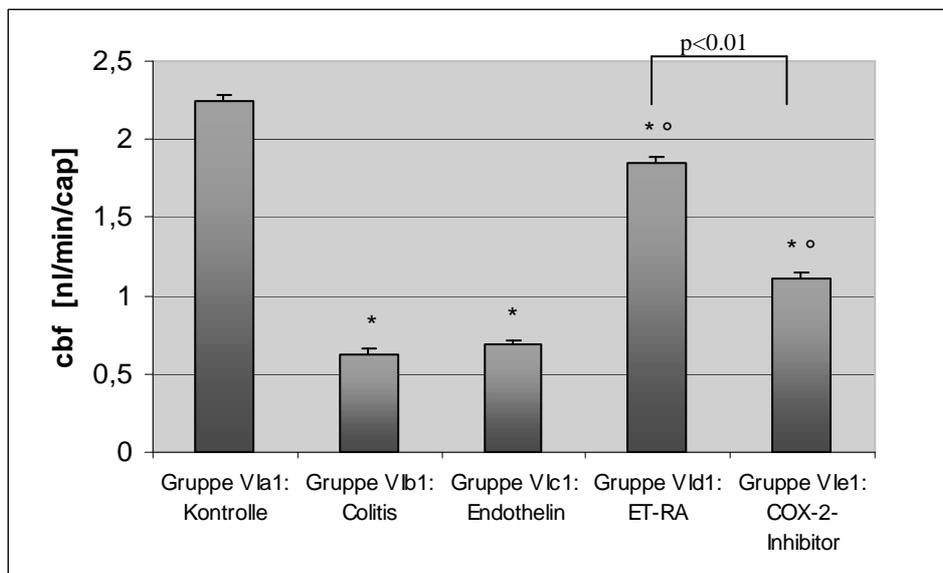
### 3.3. Interventionsstudie (Gruppen VIa-e)

Nach Evaluation des TNBS- und des Mitomycin C-Colitis-Modells fiel für die weiteren Untersuchungen die Wahl auf das TNBS-Modell. Dieses Modell schien für Studien mit vasoaktiven bzw. antiinflammatorisch wirksamen Substanzen besonders geeignet zu sein, da es hier rasch zu einer hochakuten Entzündung kommt, die mit signifikanten Veränderungen der Mikrozirkulation einhergeht. Bei der Festlegung des zeitlichen Versuchsablaufs (s. Kap. 2.1.6.3.1., Seite 35) wurden zwei Faktoren berücksichtigt, zum einen die Kenntnisse über die gestörte Mikrozirkulation beim TNBS-Modell, zum anderen die Ergebnisse aus früheren Untersuchungen mit den geplanten Testsubstanzen (Endothelin-1, Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252, COX-2-Inhibitor NS-398) [110, 113, 115, 122]. Da Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten die Gefäßpermeabilität positiv beeinflussen [123] und COX-2-Inhibitoren auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion wirken [122, 124], erfolgte in dieser Studie die Untersuchung weiterer Parameter der Mikrozirkulation. Neben dem kapillären Blutfluss waren dies die funktionelle Kapillardichte, die Gefäßpermeabilität und das Leukozytensticking. Sämtliche Messungen wurden an der Mukosa des distalen Kolons gemäß dem Versuchsplan durchgeführt. Kein Tier verstarb im Rahmen der Induktion bzw. während der Applikation der Testsubstanzen. Ein Ausschluss aufgrund kardiorespiratorischer oder hämodynamischer Insuffizienz entsprechend den Kriterien (s. Kap. 2.1.8., Seite 38) war nicht erforderlich. Lediglich 3 Tiere konnten wegen mangelnder Colitis-Expression (Score <5) bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

#### 3.3.1. Kapillärer Blutfluss der Gruppen VIa1-e1

Die gesunden Kontrolltiere (Gruppe VIa1), bei denen eine Scheininduktion der Colitis durch intrarektale Applikation physiologischer Kochsalzlösung erfolgte, haben einen kapillären Blutfluss von  $2.25 \pm 0.02$  nl/min/cap. Demgegenüber ist der Flow sämtlicher Colitis-Tiere (Gruppen VIb1-e1) signifikant vermindert ( $p < 0.01$ ). Besonders stark ist er bei der Colitisgruppe (VIb1:  $0.62 \pm 0.02$  nl/min/cap) und bei der Endothelingruppe (VIc1:  $0.68 \pm 0.01$  nl/min/cap) reduziert. Die Gabe des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten (Gruppe VI d1) führt im Vergleich zur Colitisgruppe (VIb1) zu einer signifikanten Verbesserung des kapillären Blutflusses (VI d1:  $1.85 \pm 0.02$  nl/min/cap,  $p < 0.01$ ). Ebenso führt die Applikation des COX-2-Inhibitors (Gruppe VI e1) gegenüber der Colitisgruppe (VIb1) zu einer signifikanten Steigerung des Flow's

(VIe1:  $1.11 \pm 0.02$  nl/min/cap,  $p < 0.01$ ). Trotz der deutlichen Verbesserung des kapillären Blutflusses in den Gruppen VI d1 und VI e1 ist der Unterschied zur Kontrollgruppe (VI a1) bei beiden signifikant ( $p < 0.01$ ), wobei die Steigerung durch den Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten (Gruppe VI d1) signifikant günstiger ist als die durch den COX-2-Inhibitor (Gruppe VI e1) ( $p < 0.01$ ) (Abbildung 23, Seite 61). Sämtliche Einzelwerte sind in Tabelle 24 (Seite 62) zusammengefasst. Den Ergebnissen liegt die Auswertung von insgesamt 2463 Kapillaren zu Grunde.



**Abb. 23:** Kapillärer Blutfluss (cbf) der Gruppen VI a1-e1.

\* =  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrollgruppe (VI a1).

° =  $p < 0.01$  verglichen mit der Colitisgruppe (VI b1).

### 3.3.2. Funktionelle Kapillardichte der Gruppen VI a1-e1

Die Ergebnisse der funktionellen Kapillardichte sind vergleichbar mit denen des kapillären Blutflusses. Gesunde Kontrolltiere (Gruppe VI a1) haben eine hohe funktionelle Kapillardichte ( $390 \pm 3$  cm/cm<sup>2</sup>). Demgegenüber ist die Dichte der funktionellen Kapillaren bei sämtlichen anderen Gruppen (VI b1-e1) signifikant ( $p < 0.01$ ) reduziert. Dabei besteht zwischen der Colitisgruppe (VI b1) und der Endothelingupe (VI c1) kein wesentlicher Unterschied (VI b1:  $106 \pm 8$  cm/cm<sup>2</sup> vs. VI c1:  $90 \pm 4$  cm/cm<sup>2</sup>). Sowohl durch die Gabe des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten (Gruppe VI d1) als auch durch die

cbf (nl/cap/min)	cbf (nl/cap/min)	cbf (nl/cap/min)	cbf (nl/cap/min)	cbf (nl/cap/min)
Gruppe VIa1: Kontrollgruppe n=679 Kapillaren / 8 Tiere	Gruppe VIb1: Colitisgruppe n=470 Kapillaren / 7 Tiere	Gruppe VIc1: Endothelingruppe n=454 Kapillaren / 8 Tiere	Gruppe VIId1: ET-RA-Gruppe n=422 Kapillaren / 7 Tiere	Gruppe VIe1: COX-2-Gruppe n=438 Kapillaren / 8 Tiere
1.79 ± 0.02	0.73 ± 0.02	0.57 ± 0.01	1.42 ± 0.02	1.43 ± 0.02
2.00 ± 0.01	0.98 ± 0.01	0.80 ± 0.02	2.16 ± 0.02	0.96 ± 0.02
2.17 ± 0.02	Ausschluss	0.61 ± 0.01	2.00 ± 0.01	1.32 ± 0.02
2.07 ± 0.01	0.75 ± 0.03	0.81 ± 0.01	1.75 ± 0.01	0.78 ± 0.02
2.53 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.64 ± 0.02	Ausschluss	1.14 ± 0.01
2.38 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.68 ± 0.01	1.84 ± 0.02	1.23 ± 0.02
2.40 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.82 ± 0.01	1.92 ± 0.02	1.09 ± 0.02
2.63 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.48 ± 0.02	1.85 ± 0.02	0.92 ± 0.02
2.25 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.68 ± 0.01	1.85 ± 0.02	1.11 ± 0.02

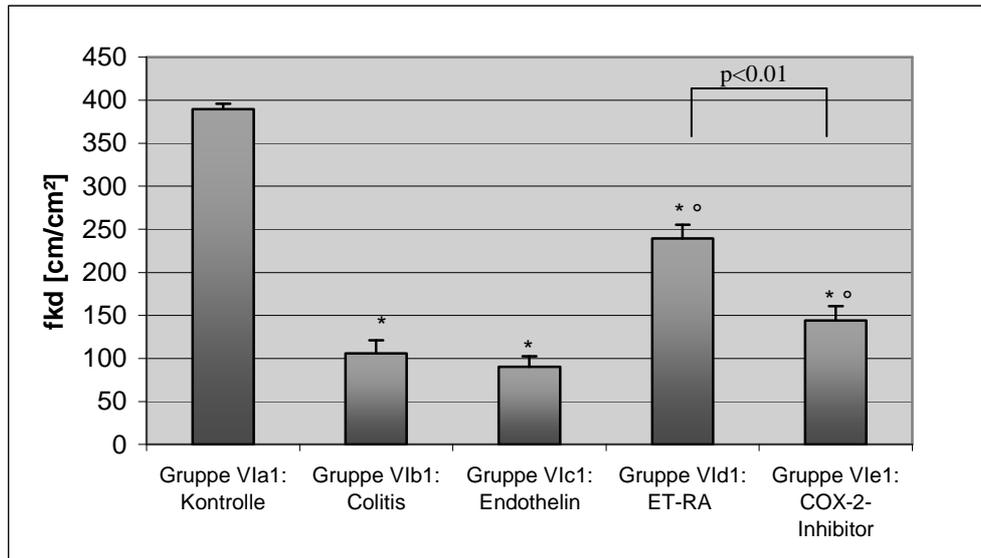
**Tabelle 24:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des kapillären Blutflusses (cbf) im Bereich der Mukosa des distalen Kolons nach 48 Stunden (Gruppen VIa1-e1).

Applikation des COX-2-Inhibitors (Gruppe VIe1) kommt es gegenüber der Colitisgruppe (VIc1) zu einer signifikanten Steigerung ( $p < 0.01$ ) der funktionellen Kapillardichte (VIId1:  $240 \pm 8 \text{ cm/cm}^2$ , VIe1:  $144 \pm 8 \text{ cm/cm}^2$ ). Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen (VIId1 vs. VIe1) ist wiederum signifikant ( $p < 0.01$ ) (Abbildung 24, Seite 63). Die Einzelwerte sind in Tabelle 25 (Seite 64) aufgeführt, es wurden 380 Felder ausgewertet.

### 3.3.3. Gefäßpermeabilität der Gruppen VIa1-e1

Bei den gesunden Tieren (Gruppe VIa1) besteht keine Permeabilität für Dextrane der verwendeten Größenordnung (Molekularmasse 70.000 Da), da der perivaskuläre Grauwert vielmehr von 100% (Ausgangswert) auf  $79 \pm 5 \%$  absinkt. Sämtliche Colitisgruppen (VIb1-VIe2) zeigen indessen eine signifikante Erhöhung der Gefäßpermeabilität ( $p < 0.01$ ). Bei der Colitisgruppe (VIb1) kommt es zu einer Steigerung auf  $329 \pm 8 \%$ , die mit der Endothelingruppe (VIc1:  $315 \pm 6 \%$ ) vergleichbar ist. Die Gabe des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten (Gruppe VIId1) führt gegenüber der Colitisgruppe (VIb1) zu einer signifikanten Besserung (VIId1:  $125 \pm 6 \%$ ,  $p < 0.01$ ). Eine vergleichbare Wirkung erzielt der COX-2-Inhibitor (Gruppe VIe1:  $189 \pm 6 \%$ ), die Abweichung zur Colitisgruppe (VIb1)

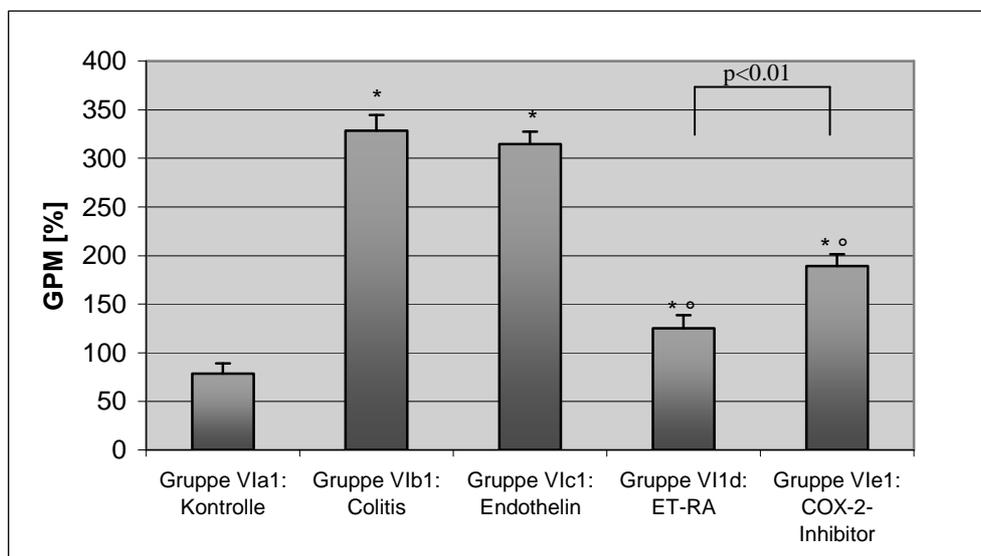
ist wiederum signifikant ( $p < 0.01$ ). Abermals ist die Differenz zwischen der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (VI1d) und der COX-2-Inhibitor-Gruppe (VI1e) signifikant ( $p < 0.01$ ) (Abbildung 25, Seite 63). Die Werte basieren auf der Analyse von 190 Feldern, sämtliche Einzelwerte fasst Tabelle 26 (Seite 65) zusammen.



**Abb. 24:** Funktionelle Kapillardichte (fKD) der Gruppen VIa1-e1.

\* =  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrollgruppe (VIa1).

° =  $p < 0.01$  verglichen mit der Colitisgruppe (VIb1).



**Abb. 25:** Gefäßpermeabilität (GPM) der Gruppen VIa1-e1.

\* =  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrollgruppe (VIa1).

° =  $p < 0.01$  verglichen mit der Colitisgruppe (VIb1).

fKD (cm/cm <sup>2</sup> )	fKD (cm/cm <sup>2</sup> )	fKD (cm/cm <sup>2</sup> )	fKD (cm/cm <sup>2</sup> )	fKD (cm/cm <sup>2</sup> )
Gruppe VIa1: Kontrollgruppe	Gruppe VIb1: Colitisgruppe	Gruppe VIc1: Endothelgruppe	Gruppe VIId1: ET-RA-Gruppe	Gruppe VIe1: COX-2-Gruppe
n=80 Felder / 8 Tiere	n=70 Felder / 7 Tiere	n=80 Felder / 8 Tiere	n=70 Felder / 7 Tiere	n=80 Felder / 8 Tiere
399 ± 2	84 ± 9	71 ± 4	208 ± 8	179 ± 8
382 ± 3	97 ± 7	86 ± 4	305 ± 9	94 ± 9
388 ± 3	Ausschluss	74 ± 3	273 ± 7	134 ± 8
397 ± 3	80 ± 9	88 ± 5	111 ± 9	198 ± 9
381 ± 4	120 ± 8	92 ± 6	Ausschluss	131 ± 8
394 ± 3	132 ± 8	102 ± 3	250 ± 7	102 ± 8
396 ± 2	70 ± 6	123 ± 4	308 ± 8	152 ± 7
382 ± 3	162 ± 9	87 ± 4	228 ± 8	164 ± 7
390 ± 3	106 ± 8	90 ± 4	240 ± 8	144 ± 8

**Tabelle 25:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung der funktionellen Kapillardichte (fKD) im Bereich der Mukosa des distalen Kolons nach 48 Stunden (Gruppen VIa1-e1).

### 3.3.4. Leukozytensticking der Gruppen VIa2-e2

Die Ergebnisse des Leukozytenstickings sind mit denen der Gefäßpermeabilität vergleichbar. Bei gesunden Kontrolltieren (Gruppe VIa2) kommt dieses Phänomen normalerweise kaum vor ( $0.4 \pm 0.2$  Zellen/mm<sup>2</sup>). Anders sieht es bei sämtlichen Colitis-Tieren aus (Gruppen VIb2-e2). Hier kommt es in allen Gruppen zu einer signifikanten Steigerung ( $p < 0.01$ ) des Leukozytenstickings gegenüber der Kontrollgruppe (VIa2). Wiederum besteht zwischen der Colitisgruppe (VIb2) und der Endothelgruppe (VIc2) kein wesentlicher Unterschied (VIb2:  $52.2 \pm 4.9$  Zellen/mm<sup>2</sup> vs. VIc2:  $48.7 \pm 5.0$  Zellen/mm<sup>2</sup>). Durch die Gabe des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten (Gruppe VIId2) nimmt das Leukozytensticking im Vergleich zur Colitisgruppe (VIb2) signifikant ab (VIId2:  $17.2 \pm 1.4$  Zellen/mm<sup>2</sup> vs. VIb2:  $52.2 \pm 4.9$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.01$ ). Der COX-2-Inhibitor (Gruppe VIe2) hat einen ähnlichen Effekt, auch er reduziert das Leukozytensticking im Vergleich zur Colitisgruppen (VIb2) signifikant (VIe2:  $21.3 \pm 1.7$  Zellen/mm<sup>2</sup> vs. VIb2:  $52.2 \pm 4.9$  Zellen/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.01$ ). Der Unterschied zwischen der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (VIId2) und der COX-2-Inhibitor-Gruppe (VIe2) ist nicht signifikant ( $p = 0.061$ ) (Abbildung 26, Seite 66).

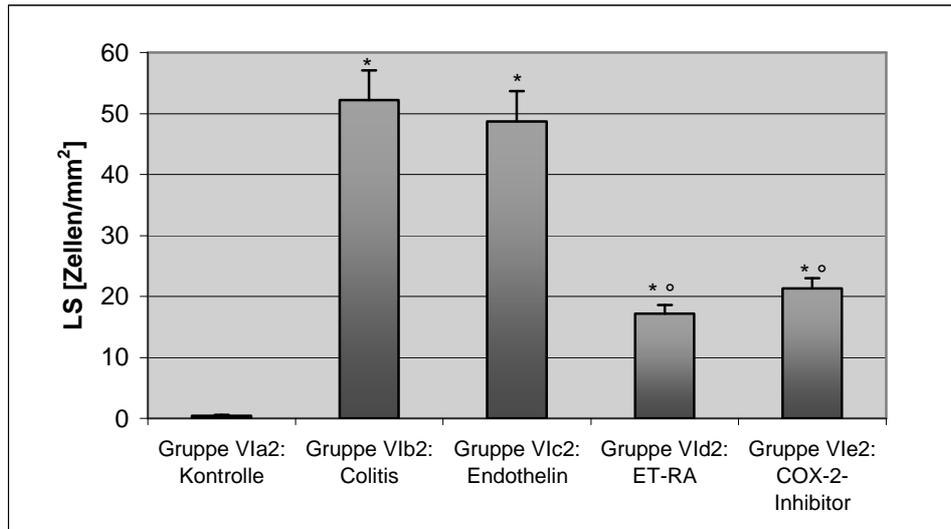
Insgesamt wurden 195 Felder ausgezählt, die jeweiligen Einzelwerte sind in Tabelle 27 (Seite 66) aufgeführt.

<b>GPM (%)</b> <b>Gruppe VIa1:</b> <b>Kontrollgruppe</b> <b>n=40 Felder /</b> <b>8 Tiere</b>	<b>GPM (%)</b> <b>Gruppe VIb1:</b> <b>Colitisgruppe</b> <b>n=35 Felder /</b> <b>7 Tiere</b>	<b>GPM (%)</b> <b>Gruppe VIc1:</b> <b>Endothelgruppe</b> <b>n=40 Felder /</b> <b>8 Tiere</b>	<b>GPM (%)</b> <b>Gruppe VIId1:</b> <b>ET-RA-Gruppe</b> <b>n=35 Felder /</b> <b>7 Tiere</b>	<b>GPM (%)</b> <b>Gruppe VIe1:</b> <b>COX-2-Gruppe</b> <b>n=40 Felder /</b> <b>8 Tiere</b>
54 ± 5	287 ± 9	290 ± 7	96 ± 7	223 ± 5
74 ± 4	280 ± 9	325 ± 6	121 ± 6	153 ± 8
98 ± 5	Ausschluss	357 ± 6	113 ± 5	176 ± 6
78 ± 4	293 ± 7	317 ± 6	138 ± 5	241 ± 7
66 ± 5	310 ± 7	397 ± 8	Ausschluss	121 ± 6
101 ± 5	422 ± 8	248 ± 6	142 ± 6	134 ± 6
109 ± 6	467 ± 8	330 ± 6	154 ± 7	213 ± 5
55 ± 6	256 ± 8	255 ± 6	112 ± 6	254 ± 5
79 ± 5	329 ± 8	315 ± 6	125 ± 6	189 ± 6

**Tabelle 26:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung der Gefäßpermeabilität (GPM) im Bereich der Mukosa des distalen Kolons nach 48 Stunden (Gruppen VIa1-e1).

### 3.3.5. Gewichtsverlauf der Gruppen VIa-e

Die gesunden Tiere (Kontrollgruppe VIa) nehmen etwas an Gewicht zu ( $1.6 \pm 0.4$  %), im Gegensatz dazu nehmen sämtliche Colitis-Tiere (Gruppen VIb-e) signifikant ab ( $p < 0.01$ ). Bei den Tieren der Colitisgruppe (VIb) und der Endothelgruppe (VIc) ist diese Gewichtsabnahme am stärksten (VIb:  $-12.8 \pm 1.1$  % vs. VIc:  $-10.8 \pm 1.2$  %). Eine deutlich geringere Gewichtsabnahme ist in der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe zu verzeichnen (VIId:  $-8.2 \pm 0.8$  %). Der Unterschied zur Colitisgruppe (VIb) ist signifikant ( $p < 0.01$ ). Auch die Gabe eines COX-2-Inhibitors (Gruppe VIe) bewirkt gegenüber der Colitisgruppe (VIb) eine signifikant geringere Gewichtsreduktion (VIe:  $-9.1 \pm 0.7$  % vs. VIb:  $-12.8 \pm 1.1$  %). Die Differenz zwischen dem Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten (Gruppe VIId) und dem COX-2-Inhibitor (Gruppe VIe) ist nicht signifikant ( $p = 0.1$ ) (Abbildung 27, Seite 67). In Tabelle 28 (Seite 68) werden die Einzelwerte zusammengefasst.



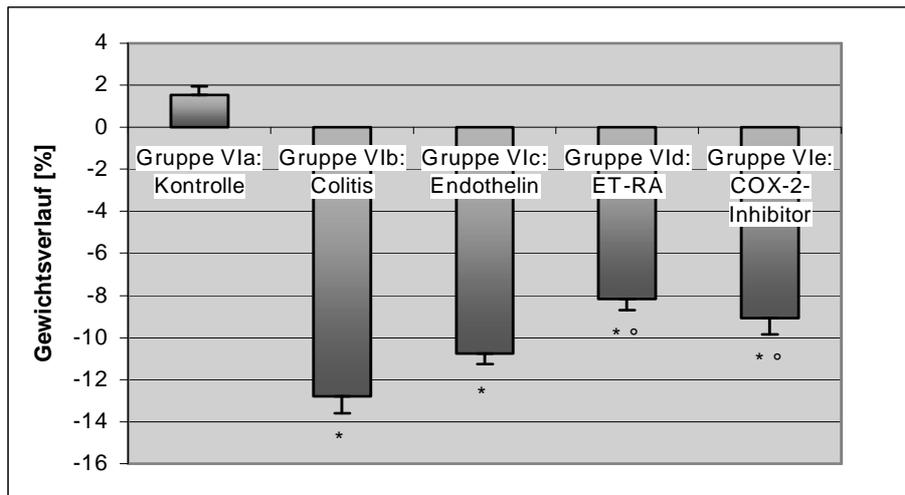
**Abb. 26:** Leukozytenstickung (LS) der Gruppen VIa2-e2.

\* = p<0.01 verglichen mit der Kontrollgruppe (VIa2).

° = p<0.01 verglichen mit der Colitisgruppe (VIb2).

LS (Zellen/mm <sup>2</sup> )	LS (Zellen/mm <sup>2</sup> )	LS (Zellen/mm <sup>2</sup> )	LS (Zellen/mm <sup>2</sup> )	LS (Zellen/mm <sup>2</sup> )
Gruppe VIa2: Kontrollgruppe	Gruppe VIb2: Colitisgruppe	Gruppe VIc2: Endothelingrouppe	Gruppe VI d2: ET-RA-Gruppe	Gruppe VIe2: COX-2-Gruppe
n=40 Felder / 8 Tiere	n=40 Felder / 8 Tiere	n=40 Felder / 8 Tiere	n=35 Felder / 7 Tiere	n=40 Felder / 8 Tiere
0.4 ± 0.1	50.6 ± 5.3	69.8 ± 5.3	15.4 ± 1.9	27.5 ± 1.3
0.6 ± 0.2	80.6 ± 4.5	51.8 ± 4.7	12.8 ± 1.8	24.4 ± 1.9
0.7 ± 0.3	58.9 ± 6.4	16.6 ± 5.9	Ausschluss	18.6 ± 2.2
0.6 ± 0.2	62.7 ± 4.6	26.9 ± 4.5	17.9 ± 1.0	16.7 ± 1.8
0.2 ± 0.2	13.9 ± 3.9	33.3 ± 4.6	14.1 ± 1.6	21.5 ± 1.5
0.5 ± 0.2	61.4 ± 4.7	59.5 ± 5.0	23.2 ± 1.3	19.2 ± 1.7
0.2 ± 0.2	46.1 ± 5.7	48.6 ± 5.4	19.8 ± 1.1	18.7 ± 1.6
0.3 ± 0.2	43.5 ± 4.3	81.9 ± 4.6	17.2 ± 1.1	23.8 ± 1.6
0.4 ± 0.2	52.2 ± 4.9	48.7 ± 5.0	17.2 ± 1.4	21.3 ± 1.7

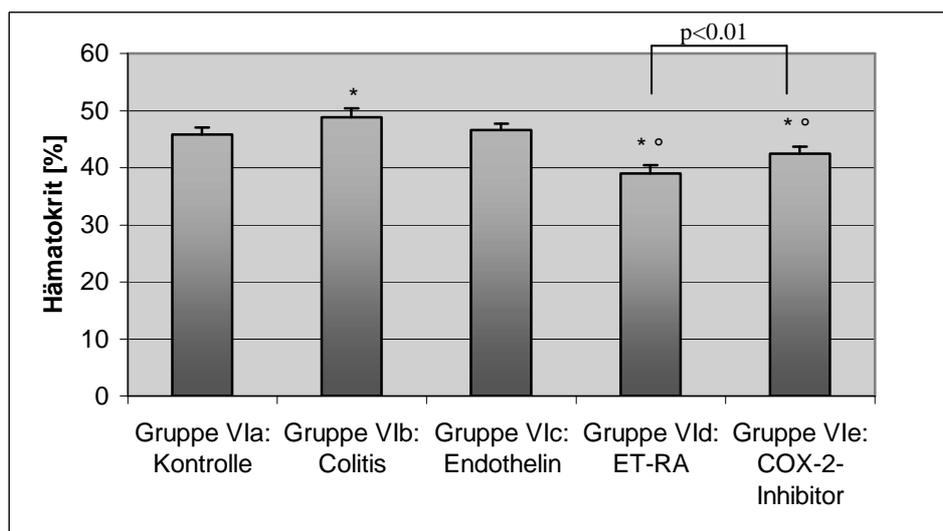
**Tabelle 27:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des Leukozytenstickings (LS) im Bereich der Mukosa des distalen Kolons nach 48 Stunden (Gruppen VIa2-e2).



**Abb. 27:** Prozentualer Gewichtsverlauf der Gruppen VIa-e.

\* =  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrollgruppe (VIa).

° =  $p < 0.01$  verglichen mit der Colitisgruppe (VIb).



**Abb. 28:** Hämatokrit der Gruppen VIa-e.

\* =  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrollgruppe (VIa).

° =  $p < 0.01$  verglichen mit der Colitisgruppe (VIb).

### 3.3.6. Hämatokrit der Gruppen VIa-e

Die gesunden Kontrolltiere (Gruppe VIa) haben einen Hämatokrit von  $45.8 \pm 2.0$  %. Im Vergleich dazu ist dieser bei den Tieren der Colitisgruppe (VIb) mit  $48.8 \pm 2.0$  % signifikant erhöht ( $p < 0.01$ ). Bei den Tieren der Endothelingupe (VIc) liegt der Hämatokrit mit  $46.6 \pm 2.5$  % zwischen diesen Werten und weist zu beiden Gruppen (VIa bzw. VIb) keinen wesentlichen Unterschied auf. Demgegenüber ist der Hämatokrit der

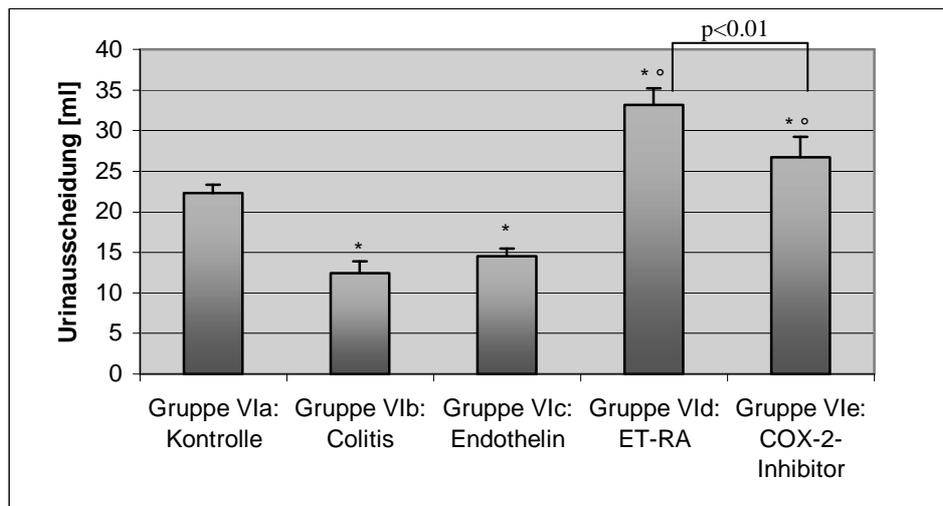
Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (VIId) mit  $39.0 \pm 2.8$  % sowohl gegenüber der Kontrollgruppe (VIa) als auch gegenüber der Colitisgruppe (VIb) signifikant erniedrigt ( $p < 0.01$ ). Dasselbe trifft für die COX-2-Inhibitor-Gruppe (VIe) mit einem Hämatokrit von  $42.5 \pm 3.0$  % zu ( $p < 0.01$ ). Die Abweichung zwischen der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (VIId) und der COX-2-Inhibitor-Gruppe (VIe) ist ebenfalls signifikant ( $p < 0.01$ ) (Abbildung 28, Seite 67). Die jeweiligen Einzelwerte führt die Tabelle 29 (Seite 70) auf.

Gewichtsverlauf (%)	Gewichtsverlauf (%)	Gewichtsverlauf (%)	Gewichtsverlauf (%)	Gewichtsverlauf (%)
Gruppe VIa: Kontrollgruppe n=16 Tiere	Gruppe VIb: Colitisgruppe n=15 Tiere	Gruppe VIc: Endothelingrouppe n=16 Tiere	Gruppe VIId: ET-RA-Gruppe n=14 Tiere	Gruppe VIe: COX-2-Gruppe n=16 Tiere
2.4	-14.3	-9.3	-9.1	-9.9
1.1	-11.3	-11.3	-8.8	-10.3
0.9	Ausschluss	-9.8	-7.9	-7.9
1.8	-12.1	-10.1	-8.1	-8.2
2.0	-11.7	-10.4	Ausschluss	-9.3
1.5	-11.6	-11.2	-6.9	-8.9
1.4	-13.4	-12.1	-8.7	-9.7
1.9	-12.3	-13.4	-9.2	-10.2
1.1	-14.0	-10.2	-8.8	-8.6
0.9	-13.8	-9.2	-7.3	-9.4
1.7	-12.7	-11.9	Ausschluss	-9.0
1.5	-13.6	-10.3	-7.5	-8.3
1.6	-11.5	-10.6	-6.9	-8.4
1.7	-12.5	-11.4	-8.9	-9.3
1.8	-11.9	-9.9	-9.2	-9.6
1.7	-14.6	-12.4	-7.8	-8.9
$1.6 \pm 0.4$	$-12.8 \pm 1.1$	$-10.8 \pm 1.2$	$-8.2 \pm 0.8$	$-9.1 \pm 0.7$

**Tabelle 28:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des Gewichtsverlaufs innerhalb von 48 Stunden (Gruppen VIa-e).

### 3.3.7. Urinausscheidung der Gruppen VIa-e

Die Kontrolltiere (Gruppe VIa) scheiden in dem Untersuchungszeitraum von 48 Stunden  $22.3 \pm 1.0$  ml Urin aus. Die Diurese der Colitisgruppe (VIb) ist mit derjenigen der Endothelgruppe vergleichbar (VIb:  $12.4 \pm 1.3$  ml vs. VIc:  $14.5 \pm 1.0$  ml). Gegenüber der Kontrollgruppe (VIa) besteht ein signifikanter Unterschied ( $p < 0.01$ ). Nach Gabe des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten (Gruppe VIId) kommt es sowohl gegenüber der Kontrollgruppe (VIa) als auch gegenüber der Colitisgruppe (VIb) zu einer signifikanten Steigerung der Urinmenge (VIId:  $33.2 \pm 1.8$  ml,  $p < 0.01$ ). Auch die Applikation des COX-2-Inhibitors (Gruppe VIe) führt gegenüber der Kontrollgruppe (VIa) und gegenüber der Colitisgruppe (VIb) zu einer signifikant gesteigerten Diurese (VIe:  $26.8 \pm 2.4$  ml,  $p < 0.01$ ). Zwischen der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (VIId) und der COX-2-Inhibitor-Gruppe (VIe) besteht wiederum ein signifikanter Unterschied ( $p < 0.01$ ) (Abbildung 29, Seite 69). Die Tabelle 30 (Seite 71) fasst die Einzelwerte zusammen.



**Abb. 29:** Urinausscheidung der Gruppen VIa-e.

\* =  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrollgruppe (VIa).

° =  $p < 0.01$  verglichen mit der Colitisgruppe (VIb).

### 3.3.8. Stuhlqualität der Gruppen VIa-e

Deutliche Unterschiede bestehen in der Qualität des Stuhls. Bei gesunden Tieren (Gruppe VIa) ist dieser fest und geformt. Tiere der Colitisgruppe (VIb) und der Endothelgruppe (VIc) leiden hingegen unter Diarrhoe. Bei den Tieren der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (VIId) sowie der COX-2-Inhibitor-Gruppe (VIe) ist der Stuhl weicher als bei den Kontrolltieren (VIa), teilweise ist er geformt.

Hämatokrit (%)	Hämatokrit (%)	Hämatokrit (%)	Hämatokrit (%)	Hämatokrit (%)
Gruppe VIa: Kontrollgruppe n=16 Tiere	Gruppe VIb: Colitisgruppe n=15 Tiere	Gruppe VIc: Endothelgruppe n=16 Tiere	Gruppe VIId: ET-RA-Gruppe n=14 Tiere	Gruppe VIe: COX-2-Gruppe n=16 Tiere
44	49	45	35	44
47	53	44	38	46
42	Ausschluss	46	39	42
47	50	47	40	39
44	51	49	Ausschluss	42
42	48	46	38	39
45	48	47	40	45
48	50	50	45	38
47	46	45	42	46
47	47	50	37	38
45	47	44	Ausschluss	43
49	49	51	42	39
45	47	43	36	44
47	52	44	40	44
47	48	46	36	46
47	47	48	38	45
45.8 ± 2.0	48.8 ± 2.0	46.6 ± 2.5	39.0 ± 2.8	42.5 ± 3.0

**Tabelle 29:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des Hämatokrits nach 48 Stunden (Gruppen VIa-e).

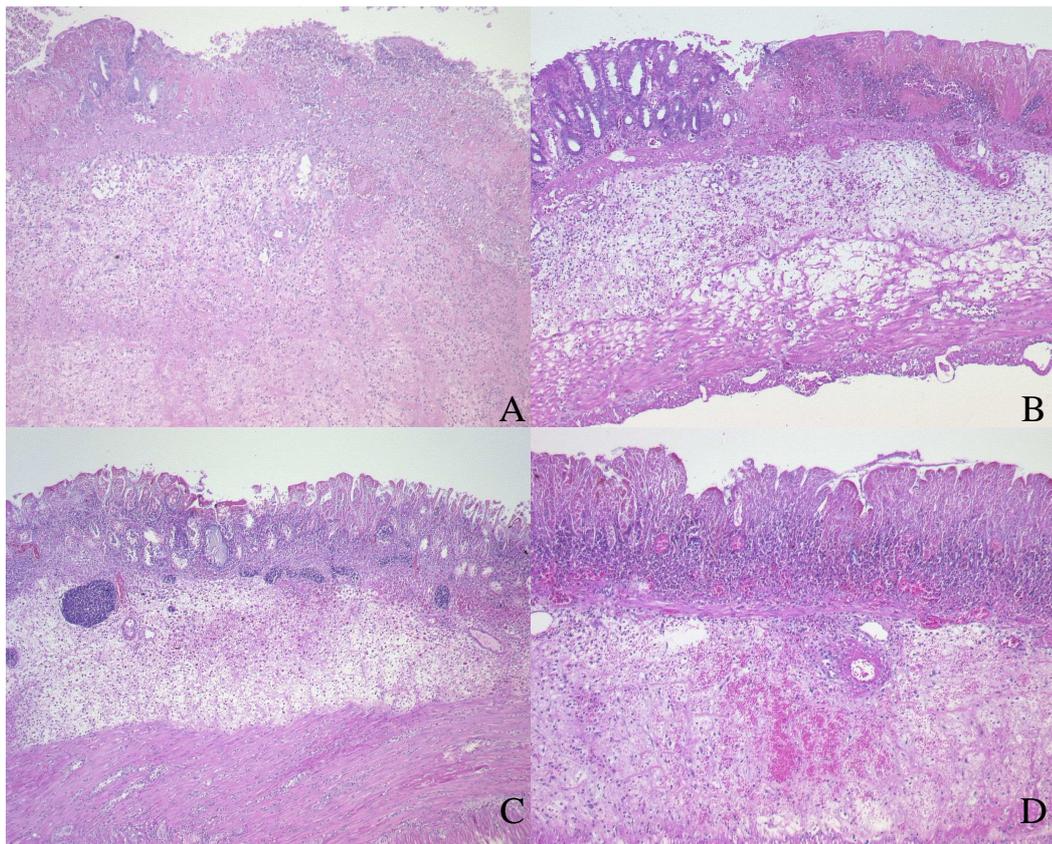
### 3.3.9. Histologie der Gruppen VIa-e

Zum Untersuchungszeitpunkt, 48 Stunden nach der Colitis-Induktion, zeigt sich das Bild einer hochgradigen akuten Entzündungsreaktion mit florider Ulceration der Schleimhaut, massenhafter Infiltration von neutrophilen Granulozyten in der Lamina propria mucosae, Kryptenabszessen und einem ausgeprägten Ödem der Submukosa (Abbildung 30, Seite 72). Eine derartig schwere Entzündungsreaktion zeigen generell alle Colitis-Tiere

(Gruppen VIb-e), bei denen es zur Expression der Colitis gekommen ist. Der Score weist für jede dieser Gruppen (VIb-e) einen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren (Gruppe VIa) aus (Score: VIa:  $0.1 \pm 0.3$  vs. VIb:  $9.8 \pm 0.9$  vs. VIc:  $10.3 \pm 0.9$  vs. VId:  $9.3 \pm 0.8$  vs. VIe:  $10.1 \pm 0.9$ ,  $p < 0.01$ ). Zwischen den Gruppen, bei denen eine Colitis induziert wurde (Gruppen VIb-e), finden sich keine Unterschiede (Abbildung 31, Seite 72). Sämtliche Einzelergebnisse werden in Tabelle 31 (Seite 73) zusammengefasst.

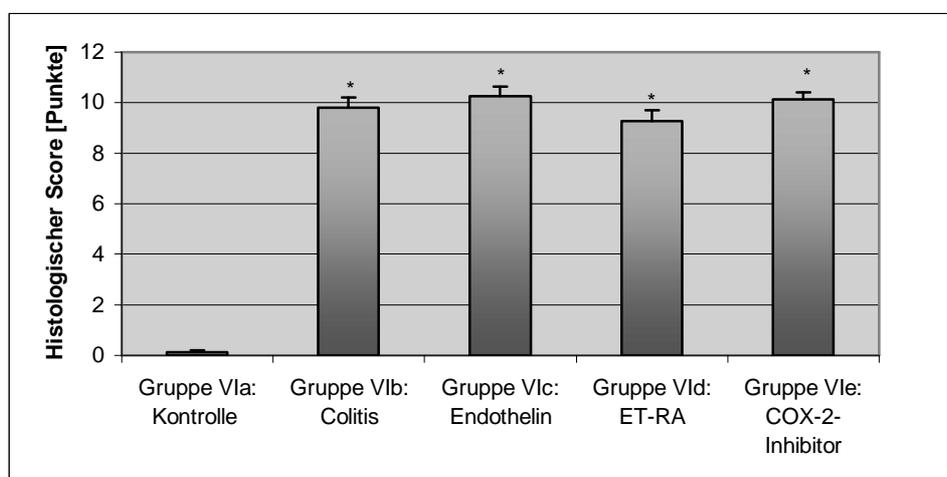
<b>Diurese (ml)</b> <b>Gruppe VIa:</b> <b>Kontrollgruppe</b> <b>n=16 Tiere</b>	<b>Diurese (ml)</b> <b>Gruppe VIb:</b> <b>Colitisgruppe</b> <b>n=15 Tiere</b>	<b>Diurese (ml)</b> <b>Gruppe VIc:</b> <b>Endothelgruppe</b> <b>n=16 Tiere</b>	<b>Diurese (ml)</b> <b>Gruppe VId:</b> <b>ET-RA-Gruppe</b> <b>n=14 Tiere</b>	<b>Diurese (ml)</b> <b>Gruppe VIe:</b> <b>COX-2-Gruppe</b> <b>n=16 Tiere</b>
22.4	12.4	14.3	35.0	25.2
21.9	13.1	16.2	32.2	23.5
23.2	Ausschluss	13.5	36.4	28.6
21.6	10.2	11.9	34.2	28.4
21.7	11.4	15.4	Ausschluss	23.9
23.1	13.5	14.6	32.6	24.6
21.4	14.0	13.9	32.9	25.4
23.6	14.2	14.1	31.9	22.9
21.7	12.7	15.1	32.5	26.1
22.4	11.4	15.5	31.7	25.4
22.6	10.8	14.4	Ausschluss	27.6
24.3	11.2	14.7	35.2	28.4
21.4	13.2	15.1	31.2	29.6
21.0	14.3	14.3	30.9	30.3
23.3	12.7	14.1	35.9	28.9
21.1	11.3	14.9	31.8	29.6
<b>22.3 ± 1.0</b>	<b>12.4 ± 1.3</b>	<b>14.5 ± 1.0</b>	<b>33.2 ± 1.8</b>	<b>26.8 ± 2.4</b>

**Tabelle 30:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung der Urinausscheidung innerhalb von 48 Stunden (Gruppen VIa-e).



**Abb. 30:** TNBS-Colitis des distalen Kolons 48 Stunden nach Induktion. Hochgradige akute Entzündung mit uniformem Bild: floride Ulceration bzw. Erosion der Schleimhaut, Granulozyteninfiltration, Zerstörung der Lamina muscularis mucosae, aktivierte Lymphfollikel (C), Hämorrhagie (D) und massives Ödem der Submukosa.

- (A) Colitisgruppe (HE-Färbung, x100).
- (B) Endothelgruppe (HE-Färbung, x40).
- (C) ET-RA-Gruppe (HE-Färbung, x40).
- (D) COX-2-Gruppe (HE-Färbung, x40).



**Abb. 31:** Histologischer Entzündungsgrad nach Colitis-Score der Gruppen VIa-e.  
\* =  $p < 0.01$  verglichen mit der Kontrollgruppe (VIa).

| <b>Histologie<br/>(Punkte nach<br/>Score)</b> |
|---|---|---|---|---|
| <b>Gruppe VIa:<br/>Kontrollgruppe</b>         | <b>Gruppe VIb:<br/>Colitisgruppe</b>          | <b>Gruppe VIc:<br/>Endothelgruppe</b>         | <b>Gruppe VIId:<br/>ET-RA-Gruppe</b>          | <b>Gruppe VIe:<br/>COX-2-Gruppe</b>           |
| <b>n=16 Tiere</b>                             | <b>n=15 Tiere</b>                             | <b>n=16 Tiere</b>                             | <b>n=14 Tiere</b>                             | <b>n=16 Tiere</b>                             |
| 0   | 10  | 10  | 10  | 11  |
| 0   | 10  | 9   | 9   | 10  |
| 0   | Ausschluss                                    | 9   | 9   | 9   |
| 1   | 11  | 11  | 10  | 9   |
| 0   | 9   | 10  | Ausschluss                                    | 12  |
| 0   | 9   | 10  | 11  | 9   |
| 0   | 11  | 11  | 8   | 10  |
| 0   | 11  | 11  | 9   | 11  |
| 0   | 9   | 9   | 10  | 11  |
| 0   | 10  | 11  | 9   | 10  |
| 0   | 9   | 11  | Ausschluss                                    | 9   |
| 1   | 11  | 10  | 8   | 10  |
| 0   | 10  | 11  | 9   | 9   |
| 0   | 9   | 12  | 9   | 10  |
| 0   | 9   | 10  | 9   | 11  |
| 0   | 9   | 10  | 10  | 10  |
| <b>0.1 ± 0.3</b>                              | <b>9.8 ± 0.9</b>                              | <b>10.3 ± 0.9</b>                             | <b>9.3 ± 0.8</b>                              | <b>10.1 ± 0.9</b>                             |

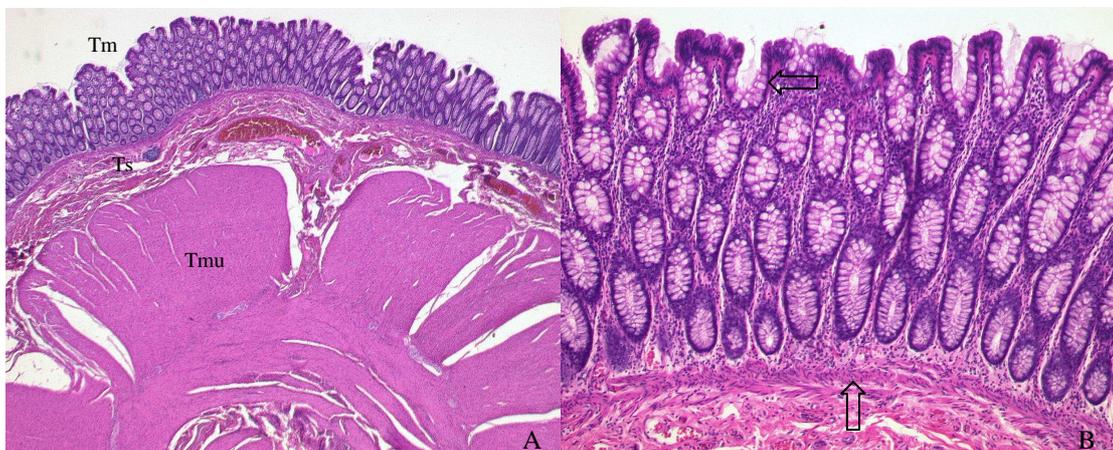
**Tabelle 31:** Einzelwerte und Mittelwerte mit Standardabweichung des histologischen Entzündungsgrades (Score) nach 48 Stunden (Gruppen VIa-e).

### 3.4. Krankengut

Die Frage, wie häufig am eigenen Krankengut eine Vasculitis nachzuweisen ist, wurde an 56 Morbus Crohn- und 43 Colitis ulcerosa-Kolon-Resektaten aus den Jahren 2002-2005 mit Hilfe immunhistologischer Färbungen mit dem Endothelzellmarker CD31 und dem Pan-T-Zellmarker CD3 untersucht. Zur Kontrolle wurde tumorfreies Gewebe von 5 Patienten mit kolorektalem Karzinom aufgearbeitet (Tabelle 10, Seite 42). Daneben wurde die Verteilung der Vasculitis in Bezug auf die einzelnen Schichten der Darmwand analysiert. Schließlich erfolgte die Bestimmung des Entzündungsgrades mittels eines Colitis-Score's (Tabelle 11, Seite 43) und der Vergleich mit dem semiquantitativ bestimmten Ausmaß der Vasculitis.

#### 3.4.1. Auftreten einer Vasculitis im gesunden Kolon

Im gesunden Dickdarm kommt eine Vasculitis in keiner der Wandschichten vor (Tabelle 32, Seite 76). Die Abbildung 32 (Seite 74) zeigt zum Vergleich histologische Schnitte von normalem Kolon.



**Abb. 32:** Histologische Schnitte von normalem Kolon (HE-Färbung).

**(A)** Übersichtsaufnahme (x20):

Deutlich sind die einzelnen Darmwandschichten zu erkennen: Tunica mucosa (Tm), Tela submucosa (Ts) und die kräftige Tunica muscularis (Tmu).

**(B)** Detailaufnahme der Tunica mucosa (x100):

Typische Kryptenarchitektur mit Becherzellen (oberer Pfeil) und Lamina muscularis mucosae (unterer Pfeil).

### 3.4.2. Auftreten einer Vasculitis bei Morbus Crohn

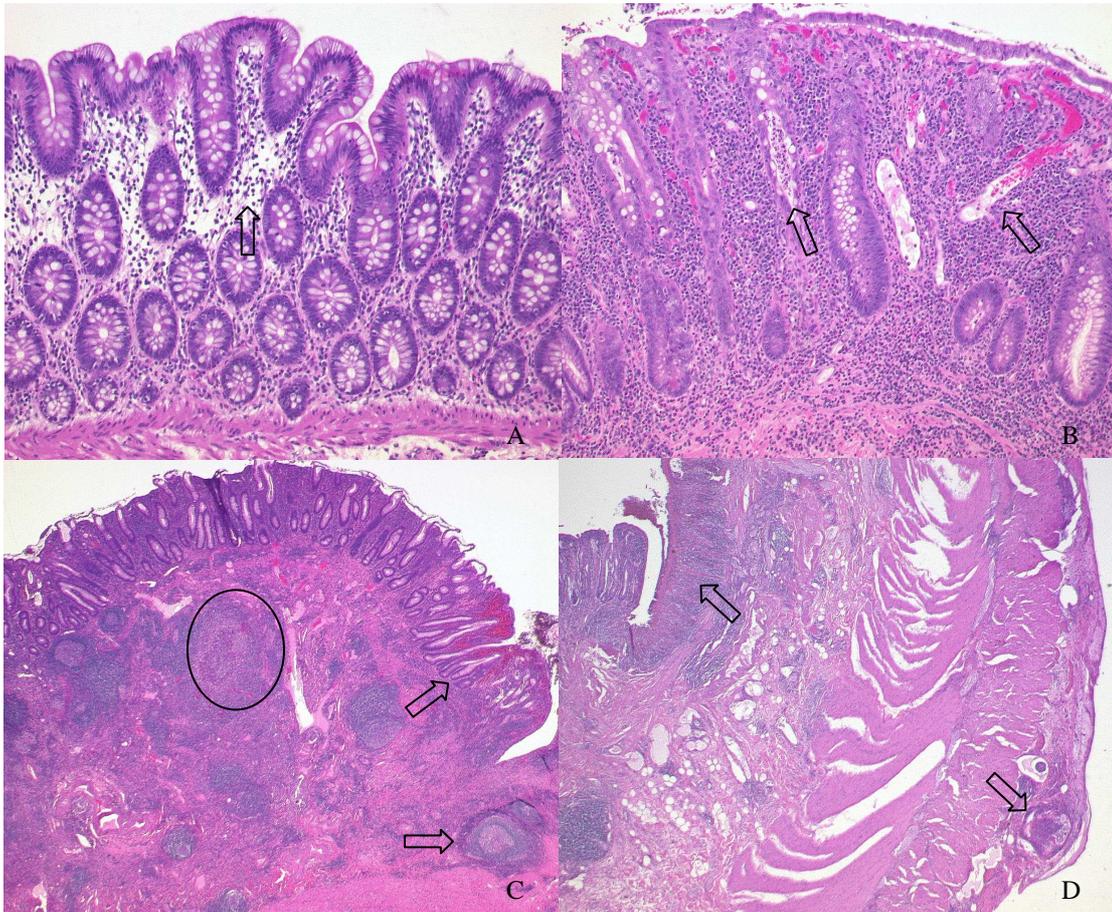
Beim Morbus Crohn zeigen zahlreiche Präparate (n=36) nur eine geringe Entzündungsaktivität mit einem Entzündungsgrad von „0-2“ (Abbildung 33a+b, Seite 77). Eine Vasculitis tritt in diesen Präparaten nicht auf. Liegt ein Entzündungsgrad „3“ (Abbildung 33c, Seite 77) vor, so lässt sich eine Vasculitis in 82% (9 von 11 Fällen) und bei einem Entzündungsgrad „4“ (Abbildung 33d, Seite 77) in 100% (9 von 9 Fällen) nachweisen. Die Vasculitis mit vermehrter Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und zum Teil auch CD3 positive T-Zellen am Endothel betrifft dabei nicht nur die Kapillaren der Mukosa, sondern kommt in allen entzündlich veränderten Wandschichten vor. Bei fissuraler Entzündung sind auch größere Gefäße in tieferen Wandschichten betroffen (Abbildung 34, Seite 78). Eine unmittelbare Beziehung der Vasculitis zu Granulomen fand sich nur in 3 Fällen, so dass eine „granulomatöse Vasculitis“ in 5.4% auftrat, sämtliche dieser Präparate hatten einen Entzündungsgrad „4“ (Abbildung 35, Seite 79). Bei den 56 untersuchten Resektaten beträgt der mittlere Entzündungsgrad  $2.3 \pm 1.0$  Punkte (Score), in 32% gelingt der Nachweis einer Vasculitis (Tabelle 32, Seite 76).

### 3.4.3. Auftreten einer Vasculitis bei Colitis ulcerosa

Der Entzündungsgrad sämtlicher Colitis ulcerosa-Resektate liegt zwischen „2“ und „4“ (Abbildung 36, Seite 80). Eine Vasculitis tritt bei den 16 Resektaten mit einem Entzündungsgrad „2“ nicht auf, bei einem Entzündungsgrad „3“ findet sich diese in 57% (8 von 14 Fällen) und bei einem Entzündungsgrad „4“ in 100% (13 von 13 Fällen). Die Vasculitis, die durch gesteigerte Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und zum Teil auch CD3 positive T-Zellen am Endothel charakterisiert ist, ist nur in der entzündlich veränderten Tunica mucosa nachweisbar (Abbildung 37, Seite 81). Der mittlere Entzündungsgrad der 43 untersuchten Resektate beträgt  $3.0 \pm 0.8$  Punkte (Score), wobei der Nachweis einer Vasculitis in 49% gelingt (Tabelle 32, Seite 76).

Entzündungsgrad (Score)	Nachweis einer Vasculitis	Nachweis einer Vasculitis	Nachweis einer Vasculitis
	Kontrollen (n=5)	Morbus Crohn (n=56)	Colitis ulcerosa (n=43)
0	-	n=0/1	-
1	-	n=0/11	-
2	-	n=0/24	n=0/16
3	-	n=9/11 (82%)	n=8/14 (57%)
4	-	n=9/9 (100%)	n=13/13 (100%)
Mittlerer Entzündungsgrad (Score)	-	2.3 ± 1.0	3.0 ± 0.8
Nachweis einer Vasculitis	-	32%	49%

**Tabelle 32:** Nachweis einer Vasculitis in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad bei Kolonresektaten von Patienten mit Kolonkarzinom (Kontrollen), Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa.



**Abb. 33:** Morbus Crohn, verschiedene Grade der Entzündung entsprechend Tabelle 11 (Seite 43) klassifiziert, HE-Färbung.

**(A)** Grad 1 (x100):

Mildes Ödem und Rundzellularinfiltrate in der Lamina propria mucosae (Pfeil).

**(B)** Grad 2 (x100):

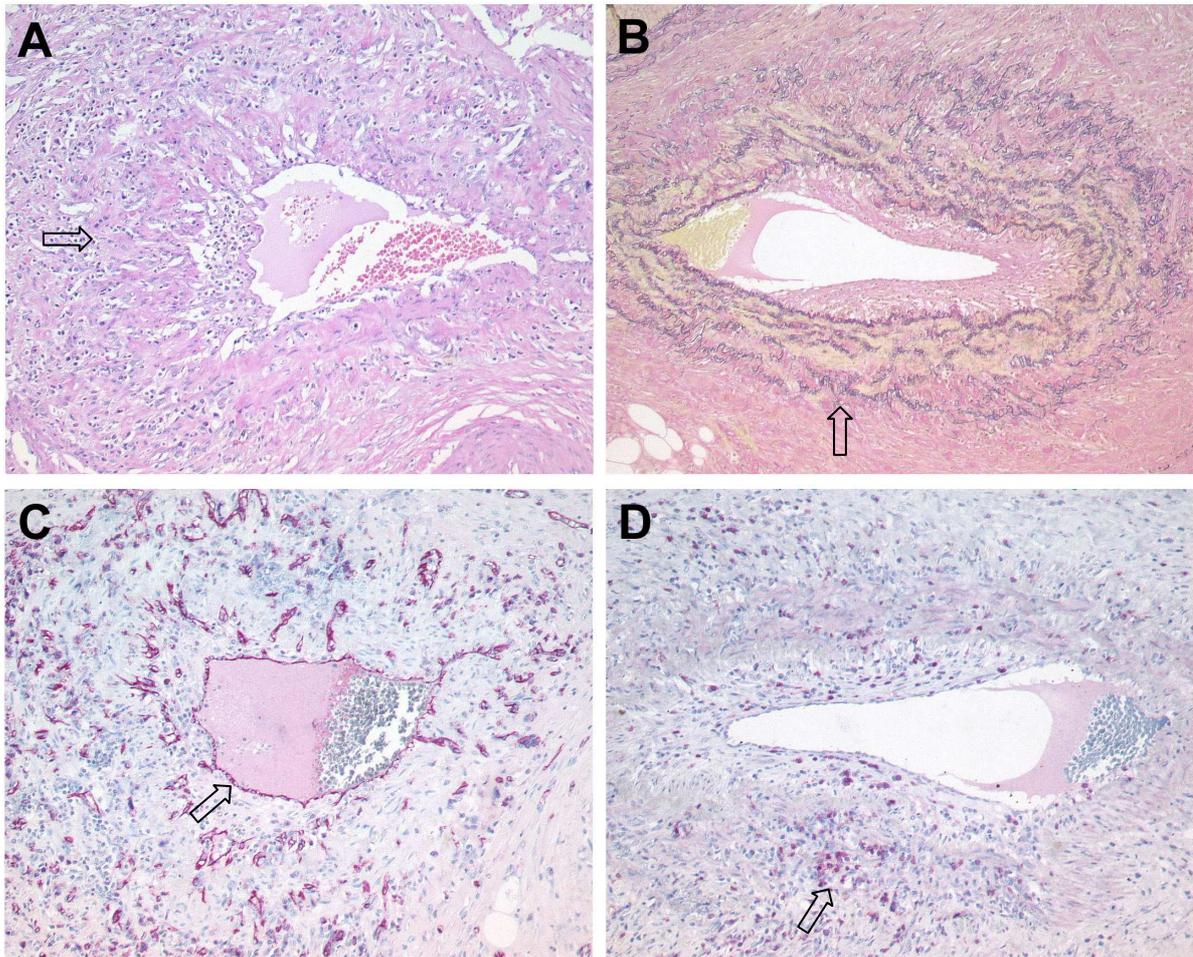
Zunehmende Infiltration von Rundzellen in der Lamina propria mucosae verbunden mit Kryptenabszessen (linker Pfeil) und dilatierten Gefäßen (rechter Pfeil).

**(C)** Grad 3 (x20):

Transmurale Entzündung mit gestörter Kryptenarchitektur (oberer Pfeil), eitrig abszedierender Entzündung (Kreis) sowie aktiviertem lymphatischem Gewebe mit Ausbildung von Sekundärfollikeln (unterer Pfeil).

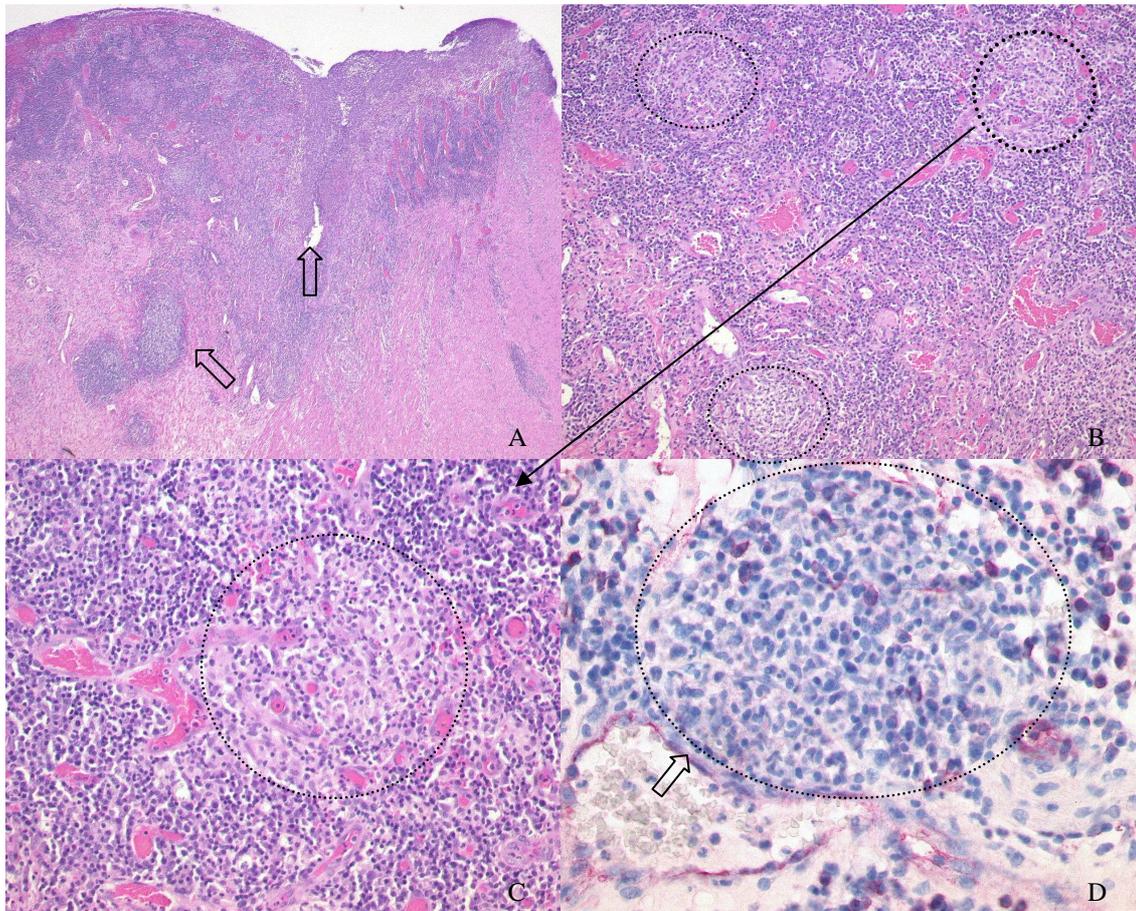
**(D)** Grad 4 (x20):

Schwere transmurale Entzündung mit Ulceration (oberer Pfeil) und entzündlich verdickter Tunica serosa i. S. einer Peritonitis (unterer Pfeil).



**Abb. 34:** Morbus Crohn, Entzündungsgrad 4 entsprechend Tabelle 11 (Seite 43).

- (A) Entzündliche Infiltration der Wand eines mittelkalibrigen Gefäßes mit Verdickung der Intima (Pfeil) (HE-Färbung, x200).
- (B) Charakteristischer Gefäßaufbau einer Vene mit ödematös verbreiteter Intima (Pfeil) (Elastika van Gieson, x200).
- (C) Darstellung der Endothelien (Pfeil) mittels des Endothelzellmarkers anti-CD31 (APAAP-Methode, x200).
- (D) Darstellung von T-Zellen mittels des Pan-T-Zellmarkers anti-CD3. Transmurale Infiltration der Gefäßwand durch T-Zellen (Pfeil) entsprechend einer Vasculitis (APAAP-Methode, x200).



**Abb. 35:** Morbus Crohn, granulomatöse Vasculitis, Entzündungsgrad 4 entsprechend Tabelle 11 (Seite 43).

**(A)** HE-Färbung (x20):

Schwere chronisch floride, ulcerierende, granulierende sowie fissurale (rechter Pfeil) Entzündung mit aktiviertem lymphatischem Gewebe und Ausbildung von Sekundärfollikeln (linker Pfeil).

**(B)** HE-Färbung (x100):

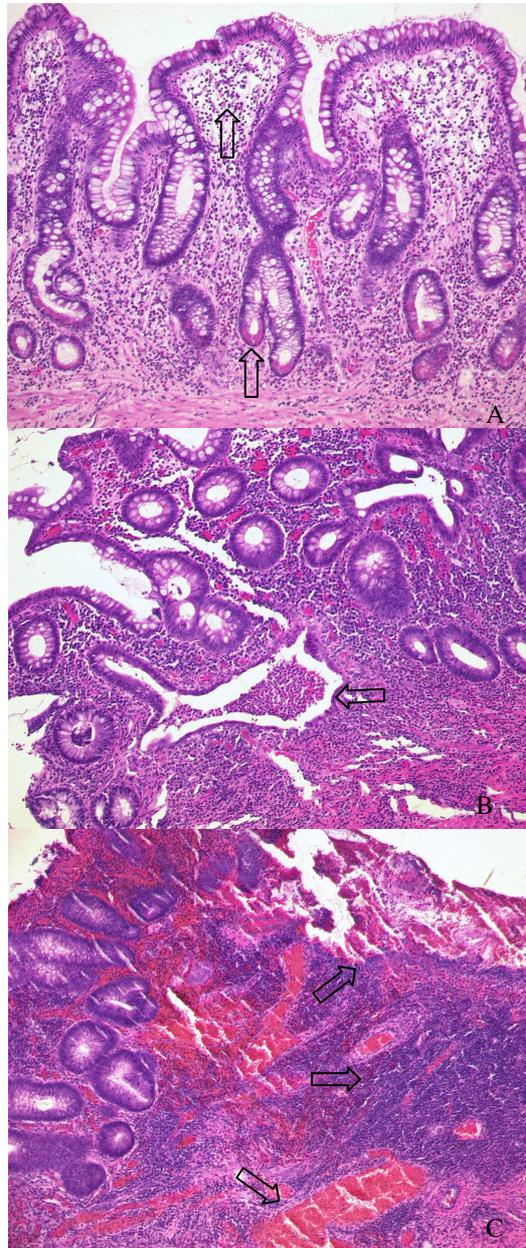
Nachweis von epitheloidzelligen Granulomen (Kreise).

**(C)** HE-Färbung (x200):

Vergößerung eines epitheloidzelligen Granuloms aus Abb. 35 (B) (s. Pfeil), welches sich in unmittelbarer Beziehung zu Gefäßen befindet (Kreis).

**(D)** Immunhistologie anti-CD31 (x200):

Darstellung der Endothelien mittels CD31 (Pfeil). Das Gefäß liegt unmittelbar an dem Granulom (Kreis).



**Abb. 36:** Colitis ulcerosa, verschiedene Grade der Entzündung entsprechend Tabelle 11 (Seite 43) klassifiziert, HE-Färbung.

**(A)** Grad 2 (x100):

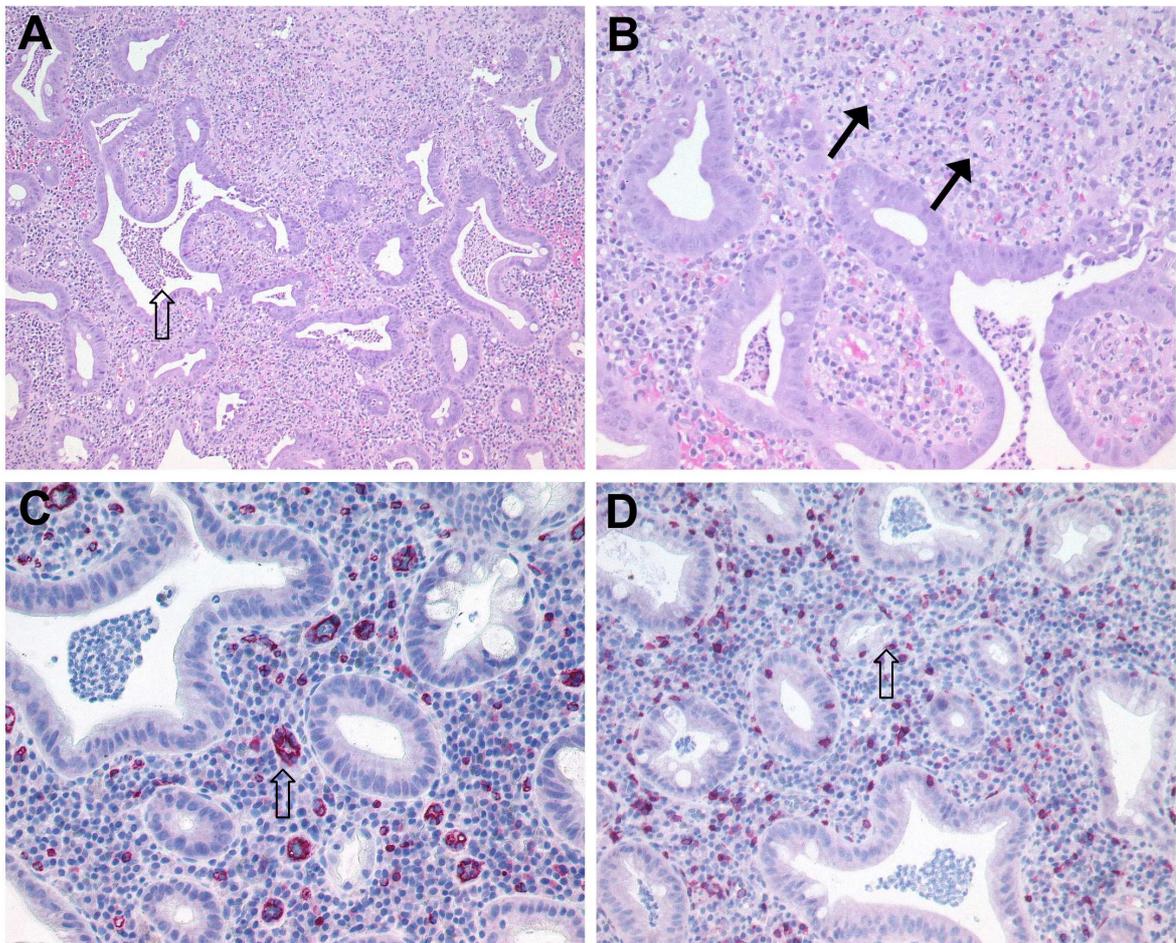
Dickdarmschleimhaut mit geringer chronischer Entzündung (Rundzellinfiltrate) in der Lamina propria mucosae (oberer Pfeil) und partiellem Schleimhautumbau (unterer Pfeil).

**(B)** Grad 3 (x100):

Deutlich Zunahme der Entzündung mit Kryptenabszessen und Kryptendestruktion (Pfeil).

**(C)** Grad 4 (x100):

Schwere floride Entzündung mit Granulozyteninfiltraten (mittlerer Pfeil), dilatierten Gefäßen (unterer Pfeil) und Ulceration (oberer Pfeil).



**Abb. 37:** Colitis ulcerosa, Entzündungsgrad 4 entsprechend Tabelle 11 (Seite 43).

(A) Eitrige Kryptitis und zahlreiche Kryptenabszesse (Pfeil) (HE-Färbung, x100).

(B) Entzündliche Beteiligung von kapillären Gefäßen (Pfeile) (HE-Färbung, x250).

(C) Immunhistologische Darstellung der Kapillaren (Pfeil) mit einem Antikörper gegen das von Endothelzellen exprimierte CD31 Antigen bei dichtem Entzündungsinfiltrat der Schleimhaut (APAAP-Methode, x400).

(D) Zahlreiche CD3 positive T-Zellen, die teilweise subendothelial liegen (Pfeil) entsprechend einer Vasculitis (APAAP-Methode, x400).

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, sind trotz zahlreicher neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse der letzten Jahre weiterhin ungeklärt. Einigkeit besteht lediglich darüber, dass eine komplexe Interaktion von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen die Erkrankungen charakterisieren. Möglicherweise triggern exogene oder infektiöse Agenzien den Beginn der Erkrankung bzw. beeinflussen den Verlauf der Pathogenese, wobei die Schädigung des Gewebes durch die ablaufenden immunologischen Reaktionen vermittelt wird. Weiter bestehen kaum Zweifel, dass zur Manifestation der Erkrankung genetische Faktoren prädisponieren [125]. Die zunehmende immunologische Kenntnis, welche Mediatoren die Entzündungsprozesse triggern, welche Zytokine pro- und welche antiinflammatorisch wirken und wie die Immunantwort im Bereich der Darmschleimhaut induziert und moduliert wird, hat zwar inzwischen zu neuen Therapieoptionen (z.B. anti-TNF $\alpha$  (Infliximab)) geführt, doch haben auch diese ein nicht zu vernachlässigendes Nebenwirkungsrisiko [126-129]. Das mangelnde Verständnis von Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen führt zu einer unzureichend spezifischen Therapie, wobei sowohl etablierte als auch neuere Therapieansätze mit teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen behaftet sind [28, 29, 128]. Vor diesem Hintergrund wird intensiv nach verbesserten und neuen Therapieoptionen als Alternative gesucht.

In diesem Zusammenhang wird immer wieder die Mikrozirkulation und deren Einfluss auf Pathogenese und Verlauf der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert. Ließe sich ein derartiger Einfluss nachweisen, so bestände die Möglichkeit für einen anderen therapeutischen Ansatz.

### **4.2. Die Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Schon frühzeitig, im Jahre 1933, berichteten Ginzburg und Oppenheimer über die klinischen und pathomorphologischen Parallelen zwischen dem Morbus Crohn und der ischämischen Colitis [52]. Marston et al. konnten 1969 in einer tierexperimentellen Untersuchung an Hunden zeigen, dass die mechanische Verlegung der Kolondurchblutung

zu unterschiedlich schwergradigen Schleimhautulcerationen führt [53]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass es eine Vielzahl an Studien gibt, die die Bedeutung der Mikrozirkulation bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersuchen.

#### **4.2.1. Morphologische Untersuchungen der Mikrozirkulation**

Die Angioarchitektur wurde zunächst Ende der 60er Jahre in mehreren angiographischen Studien beschrieben, die allerdings insgesamt widersprüchlich waren [55-58]. Diverse histologische Untersuchungen beschrieben zwar Veränderungen der Gefäße, doch waren diese zur Anschauung des Gefäßmusters ungeeignet [59-61]. So folgten zunächst mikroangiographische Studien an Operationspräparaten mit unterschiedlichen Fragestellungen, letztlich ließ sich auch durch diese weder die Angioarchitektur, noch deren Abhängigkeit von zu Grunde liegender Erkrankung bzw. vom Krankheitsstadium eindeutig charakterisieren [62-65].

Unter Berücksichtigung des Aufwands, die Gefäßmorphologie bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu charakterisieren, erstaunt es schon, dass erst 1989 eine Studie erschien, die mittels klassischer Methoden der Morphologie dieser Fragestellung nachging. Die Arbeitsgruppe um Wakefield fertigte erstmals Aufhellungspräparate nach der von Spalteholz Anfang des letzten Jahrhunderts etablierten Methode an [50, 66]. Parallel dazu führten sie auch elektronenmikroskopische und raster-elektronenmikroskopische Untersuchungen durch. Da sie auf dem Boden einer fokalen Arteriitis verschlossene Arterien, vorwiegend im Bereich der Tunica muscularis, beobachteten, entwickelten Wakefield und Mitarbeiter die Hypothese einer multifokalen gastrointestinalen Infarzierung in der Pathogenese des Morbus Crohn [50]. Später postulierten sie, dass diese chronische granulomatöse Vasculitis die Reaktion auf eine im Gefäßendothel persistierende Maserninfektion sei [49-51]. Über das Vorkommen einer lokalen Vasculitis wurde bereits 1949, allerdings bei Colitis ulcerosa, von Warren und Sommers berichtet [54]. Bis 1993 gab es lediglich zwei weitere gefäßmorphologische Studien, die die Angioarchitektur untersuchten. Eine rasterelektronenmikroskopische Studie bei Colitis ulcerosa aus dem Jahre 1971 [67] und eine Studie an Aufhellungspräparaten bei Morbus Crohn aus dem Jahre 1992 [68]. In dieser Arbeit wurde aber in der Diskussion nicht auf die interessante Hypothese von Wakefield et al. aus dem Jahre 1989 eingegangen [50].

#### **4.2.1.1. Eigene Vorarbeiten**

Die Hypothese von Wakefield et al., nach der es in der Pathogenese des Morbus Crohn zu einer multifokalen gastrointestinalen Infarzierung kommt [50], sollte daher durch eigene Untersuchungen überprüft werden. Dazu erfolgte erstmals eine systematische vergleichende Untersuchung der beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Zur detaillierten Beschreibung der Gefäßarchitektur sowie der terminalen Strombahn bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wurden insgesamt 26 frische Dickdarmresektate sowohl für die Rasterelektronenmikroskopie als auch für die Lichtmikroskopie präpariert und analysiert. Im floriden Stadium der Erkrankung findet sich bei beiden Erkrankungen: 1. Eine Zerstörung des mukösen Kapillarplexus, 2. Eine massive Dilatation submuköser Venen, 3. Kalibersprünge im Grenzbereich der Tunica muscularis und 4. Eine Rarefizierung der durch die Tunica muscularis ziehenden Gefäße. Im chronischen Stadium kommt es beim Morbus Crohn zu einer Rarefizierung des periorifizierten Kapillarnetzes (honeycomb-like plexus) und bei der Colitis ulcerosa zu einem deutlichen Umbau der Schleimhautangioarchitektur [70, 71]. Eine arterielle Okklusion im Bereich der Tunica muscularis, wie von Wakefield et al. beschrieben [50], konnte nicht nachgewiesen werden, so dass die Hypothese einer multifokalen gastrointestinalen Infarzierung aufgrund der eigenen morphologischen Befunde nicht nachvollzogen werden kann.

#### **4.2.2. Funktionelle Untersuchungen der Mikrozirkulation**

Die Vorversuche machten aber auch deutlich, dass es unabhängig von der Methodik ein generelles Problem aller morphologischen Studien ist, von der Morphologie auf die Funktion zu schließen. Daher sind für die Frage nach der Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese und des Verlaufs der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen derartige funktionelle Untersuchungen unerlässlich.

Schon vor über 40 Jahren wurde daher versucht, dieser Frage mittels Radioisotopen bei Patienten mit Colitis ulcerosa nachzugehen. Bacaner beschrieb zwei unterschiedliche Zirkulationsmuster; entweder ließ sich eine verminderte Durchblutung, die als vasculäre Insuffizienz interpretiert wurde, oder aber eine gesteigerte Durchblutung nachweisen, die durch arteriovenöse Shunts bedingt sein sollte [69]. Abgesehen davon, dass derartige Shunts bei den eigenen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnten, zeigt sich an dieser Interpretation der Befunde, wie problematisch es auch umgekehrt ist, funktionelle

Befunde ohne detaillierte Kenntnisse der Pathomorphologie einzuordnen [70, 71]. Weitere funktionelle Untersuchungen erfolgten *in vitro* an Operationsresektaten durch die Arbeitsgruppe um Hultén. Sie beschrieben eine Abhängigkeit der Durchblutung vom Entzündungsgrad. Bei schwerer Colitis fand sich bei beiden Erkrankungen ein deutlich gesteigerter Blutfluss, insbesondere im Bereich der Mukosa und Submukosa, wo hingegen dieser im Bereich der Muskularis normal war. Bei "ruhender" Colitis war der Blutfluss in allen Schichten normal bzw. eher reduziert. Zu einer deutlichen Reduktion kam es im Fibrorestadium des Morbus Crohn [72, 73].

Durch die technische Entwicklung konnten schließlich weitere Untersuchungen an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen *in vivo* erfolgen. Mit Hilfe der endoskopischen Spektrophotometrie untersuchte die Arbeitsgruppe um Leung 1989 13 Patienten mit aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung; sie sahen einen gesteigerten Blutfluss. Bei 6 in Remission befindlichen Patienten war der Blutfluss in der Nachuntersuchung wieder normal [74]. Ebenfalls spektrophotometrisch gelangten Tsujii et al. 1995 zu einem anderen Ergebnis; sie beschrieben bei aktiver Colitis ulcerosa eine gestörte Mikrozirkulation der Mukosa mit Kongestion und Hypoxie [75]. Ebenfalls 1995 veröffentlichten Guslandi et al. eine Studie, in der sie Colitis ulcerosa-Patienten mittels endoskopischer Laser-Doppler-Flowmetrie untersuchten. Bei der Messung des rektalen Blutflusses von 20 Patienten mit aktiver bzw. inaktiver Colitis fand sich in beiden Phasen der Erkrankung eine signifikante Reduktion der mukosalen Perfusion. Die Autoren schlussfolgerten, dass die gestörte Mikrozirkulation möglicherweise bei der Colitis ulcerosa pathogenetisch bedeutsam sei und dass diese eventuell das Rezidiv begünstige, da sie auch bei inaktiver Colitis nachweisbar war [76].

#### **4.2.3. Weitere Hinweise auf die Bedeutung der Mikrozirkulation**

Neben diesen morphologischen und physiologischen Untersuchungen der Mikrozirkulation gibt es noch eine Reihe weiterer Studien und klinischer Beobachtungen, die auf eine pathogenetische Bedeutung der Durchblutung bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hinweisen.

Schon vor Jahren wurde das Auftreten eines "Alters-Crohn", d.h. der zweite Erkrankungsgipfel jenseits des 60sten Lebensjahrs, mit der Mikrozirkulation in Zusammenhang gebracht [77, 78]. Fürst et al. untersuchten Resektate von Morbus Crohn-

Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation 65 Jahre oder älter waren. Sie fanden bei 80% Veränderungen der Wandstruktur kleiner Gefäße sowie eine Neigung zur Thrombose oder Einblutung. Sie schlussfolgerten, dass die Ergebnisse für die Hypothese sprechen, nach der die Ischämie in der Pathogenese des „Alters-Crohn“ eine Rolle spielt [77].

Dass rauchende Morbus Crohn-Patienten einen ungünstigeren Krankheitsverlauf haben, konnte wiederholt gezeigt werden. Dabei führt die Nikotinzufuhr möglicherweise zu einer verminderten Durchblutung des Darms mit der Folge der Exazerbation [79-83]. Vice versa sind die Verhältnisse interessanterweise bei der Colitis ulcerosa; hier bewirkt die Nikotinzufuhr, sei es durch Inhalation oder über ein Pflaster, einen milderen Verlauf der Erkrankung [79, 84, 86-88].

Weitere Hinweise auf die Relevanz der Mikrozirkulation geben Arbeiten, die über einen positiven Effekt der Heparin-Gabe auf den Verlauf der chronischen entzündlichen Darmerkrankungen berichten [89-92].

Des Weiteren scheint eine anatomische Beziehung zwischen Ulceration und mesenterialer Eintrittsstelle der Arterien in die Tunica muscularis zu bestehen [62, 94-96]. Anthony et al. vermuten, dass es sich bei den Vasa recta breves des terminalen Ileums, die das mesenteriale Schleimhautareal versorgen, um funktionelle Endarterien handelt. Bei einer Ischämie wäre diese Region somit besonders betroffen mit der Folge eines bevorzugten Auftretens der Ulcera im Bereich des Mesenterialansatzes [94].

Und schließlich noch ein bedeutender Befund, der auf die Relevanz der Mikrozirkulation hinweisen könnte. In homogenisierten Gewebeproben von Patienten mit Morbus Crohn resp. Colitis ulcerosa konnten signifikant erhöhte Spiegel des Vasokonstriktors Endothelin nachgewiesen werden. Möglicherweise führt die durch das Endothelin verursachte Vasokonstriktion zu einer Ischämie, die für die Pathogenese und den Progress der Erkrankung relevant ist [97-99].

#### **4.2.4. Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen über die Mikrozirkulation**

Obwohl es somit seit über 70 Jahren zahlreiche Hinweise auf die pathogenetische Bedeutung der Mikrozirkulation bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in der Literatur gibt, stehen systematische Untersuchungen dieses Teilaspektes der Pathogenese bislang aus. Dabei wird deutlich, dass nur die detaillierte Kenntnis von Pathomorphologie und Pathophysiologie und deren gegenseitige Abhängigkeit voneinander die Voraussetzung schafft, um die Bedeutung der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beurteilen zu können.

Für systematische Untersuchungen der pathogenetischen Relevanz der Mikrozirkulation sind Untersuchungen an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sei es in vivo oder in vitro als problematisch anzusehen, da es nicht gelingen kann, den Verlauf und hier insbesondere das Frühstadium der Erkrankung methodisch zu analysieren. Ein weiteres Hindernis ist, dass die Intravitalmikroskopie, die als Goldstandard für Studien der Mikrozirkulation gilt, am humanen Darm technisch nicht möglich ist. Somit ist der Weg zur Charakterisierung der Mikrozirkulation über ein geeignetes Tiermodell unumgänglich.

Ein solches Tiermodell stand zu Beginn der Studien nicht zur Verfügung, da frühere Versuche der intravitalmikroskopischen Untersuchung am Kolon der Ratte nicht erfolgreich waren [101]. Die erfolgreiche Etablierung eines derartigen Tiermodells würde allerdings nicht nur die systematische Charakterisierung der Mikrozirkulation ermöglichen, sondern wäre auch die Voraussetzung für die Evaluierung alternativer Therapieoptionen, nach denen intensiv gesucht wird.

Bei der Auswahl eines geeigneten Tiermodells spielen sowohl allgemeine als auch spezielle Überlegungen eine Rolle. Man muss sich bewusst sein, dass unter sämtlichen rezenten Tiermodellen keines existiert, welches die Komplexität und den natürlichen Verlauf der humanen Colitis repräsentieren könnte. Dennoch haben tierexperimentelle Studien unser Verständnis von den komplexen Abläufen bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erheblich beeinflusst [100]. Die Auswahl der Modelle richtet sich somit nach der Fragestellung und dem jeweiligen Teilaspekt der untersucht werden soll.

Bei der Wahl eines Modells zu Studien der Mikrozirkulation spielten folgende Überlegungen und Anforderungen eine Rolle. Das Modell sollte einerseits etabliert, gut charakterisiert, leicht verfügbar und reproduzierbar sein sowie wesentliche pathomorphologische Merkmale des Morbus Crohn bzw. der Colitis ulcerosa widerspiegeln. Andererseits sollte die Gefäßanatomie des gesunden Tieres der des Menschen weitgehend entsprechen, um eine gewisse Vergleichbarkeit mit z.B. endoskopisch erhobenen Befunden der Durchblutung grundsätzlich zu ermöglichen.

Die Wahl fiel daher auf Colitis-Modelle der Ratte. Zum einen weil die Angioarchitektur bei dieser Spezies bereits charakterisiert worden ist und so der Vergleich mit eigenen Voruntersuchungen am menschlichen Kolon möglich war. Zum anderen weil es unter den bekannten Colitis-Modellen der Ratte eine große Auswahl gibt, die den oben aufgeführten Anforderungen genügen.

### **4.3. Tierexperimente**

#### **4.3.1. Material und Methode**

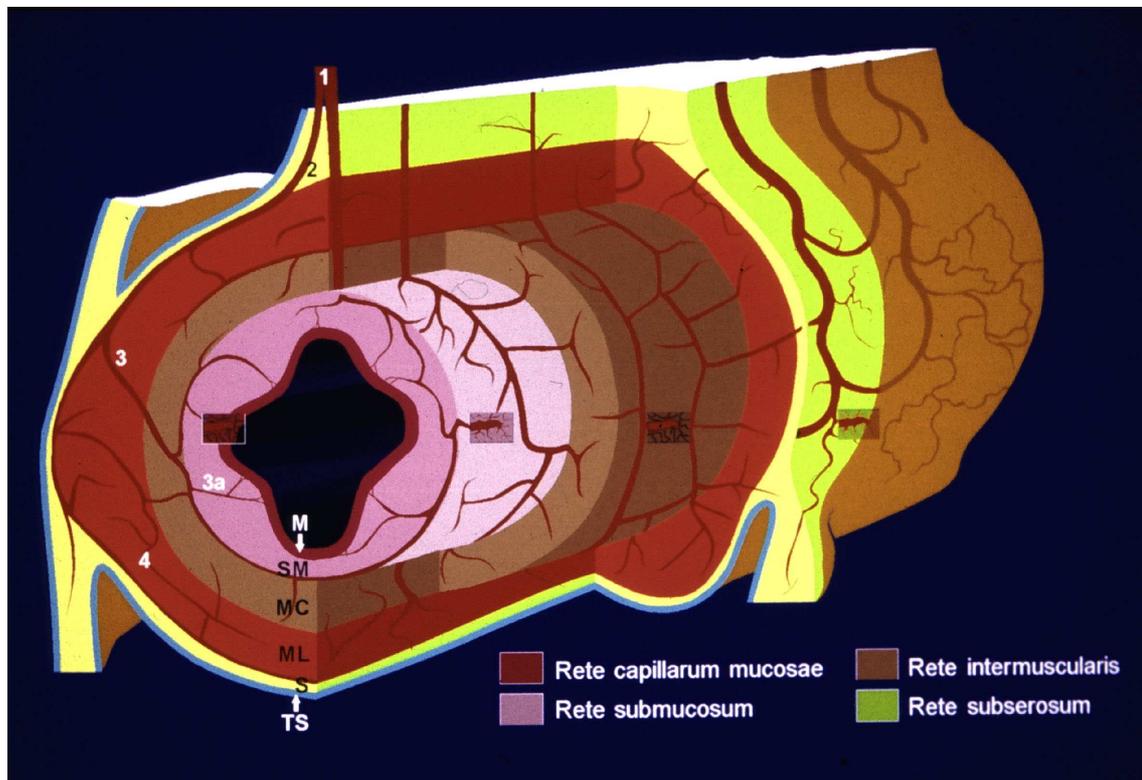
##### **4.3.1.1. Angioarchitektur des Kolons beim Menschen und bei der Ratte**

Sowohl für intravitalmikroskopische Studien der Mikrozirkulation als auch für die Vergleichbarkeit mit der humanen Colitis sind detaillierte Kenntnisse der Angioarchitektur sowie der Endstrombahn der Ratte bzw. des Menschen eine wichtige Voraussetzung. Wie oben dargelegt sind funktionelle Untersuchungen ohne Berücksichtigung der Morphologie letztlich nicht sinnvoll.

Von der parallel zur Darmlängsachse verlaufenden Randarkade – auch Marginalarterie genannt – zweigen beim Menschen und bei der Ratte Gefäße ab, die im rechten Winkel zur Darmwand ziehen und als Vasa recta bezeichnet werden. Sie werden in Vasa recta longa und Vasa recta breves unterteilt (Abbildungen 38 und 39, Seite 89 und 90) [70, 71, 130-133].

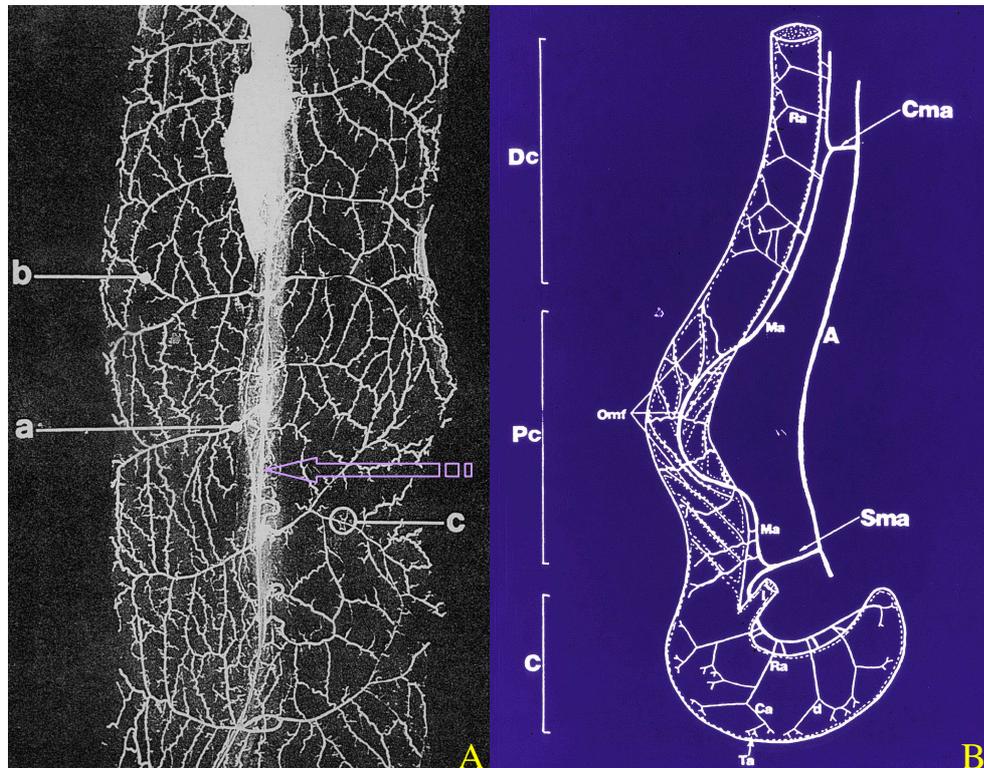
Die Vasa recta longa verlaufen subserös und umgreifen den Darm zangenförmig, wobei sie antimesenterial nicht regelhaft miteinander anastomosieren. Die Vasa recta breves dringen in großer Zahl beidseitig der Taenia mesocolica in die Darmwand ein. Unter Aufzweigung

und Bildung eines muskulären Plexus zur Versorgung der Tunica muscularis ziehen sie weiter zur Tela submucosa.



**Abb. 38:** Schematische Darstellung der Gefäßversorgung des menschlichen Kolons (modifiziert nach [130]): Die Vasa recta der Randarkade teilen sich in der Tela subserosa (S) in Vasa recta brevia (1) und Vasa recta longa (2) auf. Sie durchdringen das Stratum longitudinale (ML) und das Stratum musculare circulare (MC) der Tunica muscularis (3) und bilden den muskulären Plexus (4) (s. Abb. 1a, Seite 15). In der Tela submucosa (SM) bilden sich submuköse Arkaden (3a) (s. Abb. 41, Seite 91), die das Kapillarnetz der Tunica mucosa (M) speisen. TS = Tunica serosa.

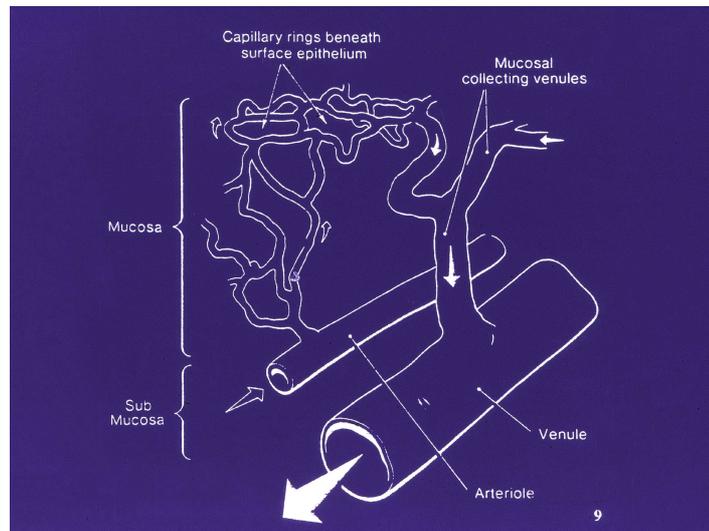
Bei beiden Spezies, Mensch und Ratte, zweigen sich die submukösen Arteriolen an der Kryptenbasis in Kapillaren auf, die entlang der Krypten geschlängelt zu deren Öffnungen aufsteigen. Dort anastomosieren sie miteinander und bilden ein wabenförmiges periorifizielles Gefäßnetz (sog. honeycomb-like plexus), welches die Kryptenöffnungen umgibt. Dieser ausgedehnte subepitheliale Plexus wird vom Darmlumen nur noch durch die Basalmembran und die Lamina epithelialis mucosae getrennt. Die Drainage erfolgt über Venulen (sog. Sammelvenulen), die sich ebenfalls auf dieser Ebene befinden. Eine Sammelvenule drainiert etwa 6 Krypten (Abbildungen 40 und 41, Seite 91) [70, 71, 133].



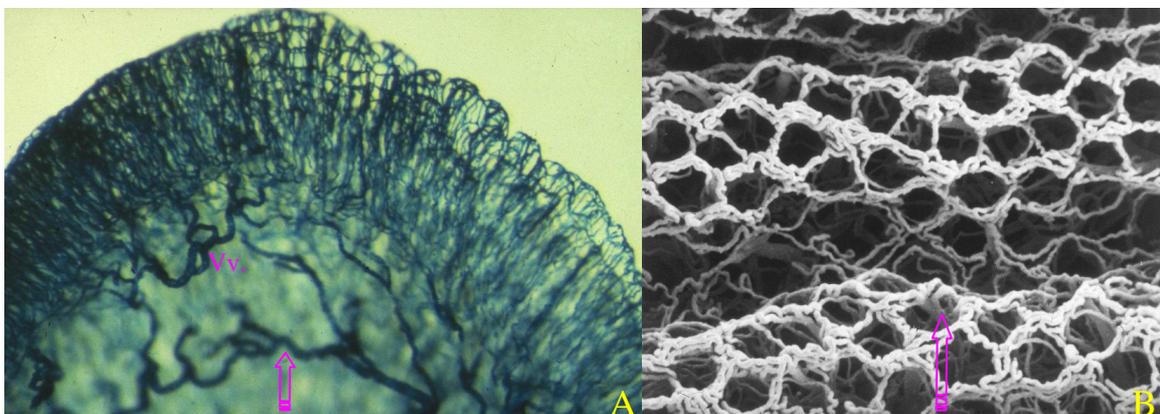
**Abb. 39:** Mikroradiographie (A) und schematische Darstellung (B) der Gefäßversorgung des Rattenkolons (entnommen aus [131]):

- (A) Zur Darstellung kommen Vasa recta (a) der Randarkade ( $\Leftarrow$ ), der muskuläre Plexus (b) sowie terminale Arteriolen (c).
- (B) Makroskopische Gefäßanatomie des Rattenkolons in seinen drei Abschnitten: Zoekum (C), proximales Kolon (PC) und distales Kolon (DC). Aus der Aorta (A) entspringen die A. mesenterica superior (Sma) und die A. mesenterica inferior (Cma), die die Randarkade (MA) speisen. Von hier aus ziehen die Vasa recta (Ra) in die Darmwand und bilden den muskulären Plexus (Ca), von dem terminale Arteriolen (Ta) ausgehen. Das überlappende Versorgungsgebiet der Sma und der Cma ist mit „Omf“ bezeichnet.

Zum Vergleich sei noch einmal die intravitalmikroskopische Aufnahme (s. Abbildung 7, Seite 28) gegenübergestellt. Die Erythrozyten, die unter dem Fluoreszenzmikroskop deutlich erkennbar sind, bewegen sich in dem honeycomb-like plexus, der unmittelbar unterhalb der Basalmembran und der Lamina epithelialis mucosae verläuft (Abbildung 42, Seite 92).

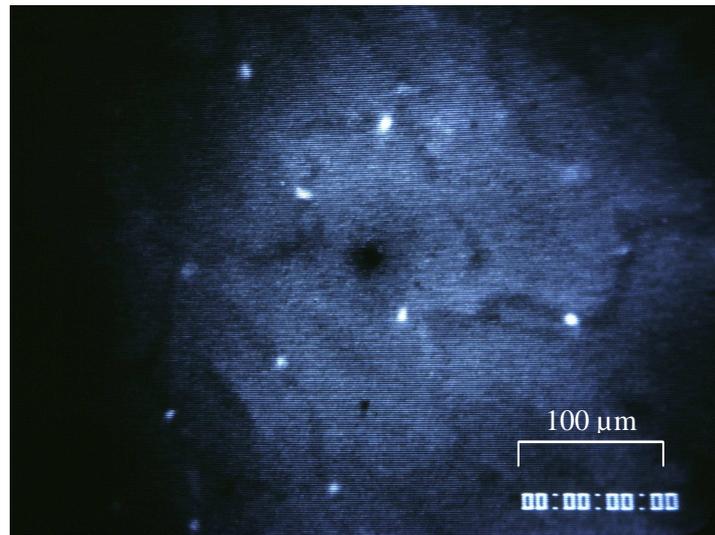


**Abb. 40:** Schematische Darstellung der terminalen Strombahn des Rattenkolons (entnommen aus [133]): Die aufsteigenden mukosalen Kapillaren bilden ein periorifizielles Gefäßnetz, welches über Sammelvenulen (mucosal collecting venules) drainiert wird.



**Abb. 41:** Ultrastrukturelle Darstellung der terminalen Strombahn des menschlichen Kolons (nach Kruschewski [70, 71]):

- (A) Aufgehelltes Gelatine-Injektionspräparat, Längsschnitt (x31): Submuköse arterielle Arkade (↑) und submuköse Venen (Vv.). Oberhalb davon Kapillarnetz der Tunica mucosa mit honeycomb-like plexus.
- (B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Korrosionspräparates, Ansicht von luminal (x40): Um die Kryptenöffnungen regelmäßig angeordnetes Kapillarnetz (honeycomb-like plexus). Die Drainage erfolgt über Sammelvenulen (↑).



**Abb. 42:** Intravitalmikroskopische Aufnahme der Kolonmukosa der Ratte (x320): Im honeycomb-like plexus fluoreszierende Erythrozyten.

Zusammengefasst findet sich bei Mensch und Ratte sowohl im makroskopischen als auch insbesondere im ultrastrukturellen Bereich der terminalen Strombahn eine vergleichbare Angioarchitektur. Somit erfüllt die Spezies Ratte eine wichtige Voraussetzung für Untersuchungen der Mikrozirkulation, zumal auch im histologischen Vergleich viele Gemeinsamkeiten bestehen [134].

#### **4.3.1.2. Tiermodelle der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Das ideale Tiermodell für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wäre ein Modell, das in allen Aspekten der Erkrankung mit der humanen Colitis identisch ist. Dies beinhaltet neben einer gemeinsamen Ätiologie und Pathogenese auch einen gemeinsamen chronisch rezidivierenden Verlauf, der sich durch dieselben Faktoren positiv oder negativ beeinflussen ließe. Dieses ideale Tiermodell kann jedoch nicht existieren, wenn man sich vergegenwärtigt, dass es kein (ideales) Modell einer Krankheitsentität geben kann, die selber unzureichend definiert ist. Somit weisen alle verfügbaren Modelle eine mehr oder minder ausgeprägte Übereinstimmung hinsichtlich Ätiologie, Erkrankungsschwere, Verlauf der Erkrankung und Histologie auf [103]. Keines der Modelle hat allerdings einen wirklich chronisch rezidivierenden Verlauf mit Remission und erneutem Schub oder zeigt

extraintestinale Manifestationen, wie sie bei den chronisch entzündlichen Erkrankungen vorkommen [100].

Ein Argument, welches häufig gegen Colitis-Modelle angeführt wird, ist die Tatsache, dass das Kolon unabhängig von der eigentlichen Erkrankungsursache bzw. von verschiedenen toxischen Agenzien nur eine limitierte stereotype Reaktionsmöglichkeit besitzt und dass daher eher Phänotypen als komplexe Störungen reflektiert werden [135]. So wird z.B. die durch unterschiedliche immunvermittelte Modelle induzierte Colitis nicht als spezifische Antwort auf eine Reaktion vom verzögerten Typ oder als Immunkomplex-vermittelte Reaktion interpretiert, sondern als uniforme Reaktion des Kolons [103].

Obwohl Tiermodelle somit nicht die Komplexität und den natürlichen Verlauf der humanen Colitis repräsentieren können, sind sie dennoch, nicht zuletzt weil sich viele Studien aus ethischen Gründen am Menschen verbieten oder sich Fragen z.B. bzgl. der Pathogenese nur schwer beantworten lassen, in der Grundlagenforschung ein wichtiges Element zur Klärung von Teilaspekten dieses Krankheitsbildes. Wenn man daher berücksichtigt, dass Tiermodelle häufig nur gewisse Gesichtspunkte der Pathophysiologie reflektieren, so hängt die Qualität der Antworten entschieden von der experimentellen Fragestellung ab. So wurden viele wichtige Erkenntnisse über die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, insbesondere über die inflammatorischen Abläufe auf molekularbiologischer Ebene, durch eben diese Tiermodelle gewonnen. Die zunehmende Zahl an Studien, die Tiermodelle zur Erforschung pathophysiologischer Mechanismen und neuer Therapien einsetzt, unterstreicht eindrucksvoll deren Bedeutung [100, 103].

Grundsätzlich gibt es zwei Arten von Tiermodellen der Colitis. Zum einen Modelle, bei denen die Colitis „natürlich“ vorkommt und spontan ohne exogene Faktoren abläuft, zum anderen die große Gruppe, bei der die Colitis entweder durch Applikation eines Agens oder durch Manipulation normaler physiologischer Prozesse experimentell induziert wird [102]. Eine Übersicht über die spontanen Modelle der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gibt die Tabelle 33 (Seite 94), von diesen ist allerdings maßgeblich das Affen-Modell (*Saguinus oedipus*) als Modell der Colitis ulcerosa in Erwägung zu ziehen [35]. Experimentelle Colitiden lassen sich leicht durch verschiedene chemische oder natürliche Substanzen induzieren. Am häufigsten werden die in Tabelle 34 (Seite 95)

aufgeführten Modelle verwendet (Übersicht bei [34, 35, 100, 103]). Daneben gibt es noch Modelle, bei denen es durch Ausschaltung (Knockout-Modelle) oder durch Expression (Transgene-Modelle) von bestimmten Genen zur Manifestation der Colitis kommt [34, 35, 100].

SPEZIES	AGENS	CHARAKTERISIERUNG
Hamster [136]	Bakterien (Stäbchen)	Hyperplasie, Mikroabszesse, Nekrosen.
C3H/HeJBir Maus [137]	T-Zell vermittelte Reaktion auf bakterielle Antigene	Akute und chronische transmurale Entzündung im rechten Hemikolon.
Hund (Boxer) [138, 139]	Trichuris? (chlamydienartig)	Colitis, Enteritis.
Pferd [140]	unbekannt	Granulomatöse Enterocolitis.
Schwein [141]	Campylobacter sputorum	Adenomatöse Proliferation, Ulcerationen.
Affe: <i>Saguinus oedipus</i> (cotton top tamarin) [142]	T-Zell vermittelte Reaktion auf Umweltfaktoren?	Akute und chronische Entzündung der Mukosa im gesamten Kolon, Entwicklung von Kolonkarzinomen.

**Tabelle 33:** Spontane Colitis-Modelle (modifiziert nach [100, 102, 135]).

#### 4.3.1.2.1. Auswahl der Tiermodelle

Unter der großen Vielzahl an Colitis-Modellen fiel die Wahl aus folgenden Gründen auf die Spezies „Ratte“. Wie oben aufgezeigt, ist die Angioarchitektur des Rattenkolons bekannt und entspricht im wesentlichen der des menschlichen Dickdarms. Dies ermöglicht den Vergleich mit Befunden, die mittels anderer Untersuchungsmethoden beim Menschen erhoben werden, da hier die Intravitalmikroskopie methodisch bedingt nicht zur Verfügung steht. Ein weiterer Grund für die Verwendung von Ratten war die Auswahl unterschiedlicher Modelle, die sich in ihrer Charakterisierung teilweise deutlich unterscheiden und so eher mit dem Morbus Crohn bzw. mit der Colitis ulcerosa Gemeinsamkeiten haben. Nicht zuletzt fiel die Wahl auf diese Spezies, weil innerhalb der Arbeitsgruppe umfangreiche

Erfahrungen durch die Untersuchungen der Mikrozirkulation bei der akuten Pankreatitis mit Sprague Dawley Ratten gesammelt wurden [143-146]. Ernüchternd waren in diesem Zusammenhang allerdings die erfolglosen Bemühungen der Arbeitsgruppe um Leung, die Mikrozirkulation intravitalmikroskopisch am Essigsäure-Modell der Ratte zu untersuchen [101].

AGENS	SPEZIES	CHARAKTERISIERUNG
Essigsäure [147]	Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen	Akute Colitis durch intrarektale Applikation.
TNBS / DNBS [104]	Maus, Ratte, Kaninchen	Akute und chronische transmurale Entzündung mit aboraler Betonung durch intrarektale Applikation. Aktivierung des Immunsystems als Hapten.
Indomethacin [148, 149]	Ratte, Kaninchen, Hund	Akute und chronische transmurale Entzündung des mittleren und aboralen Dünndarms sowie des Zoekums durch subkutane oder orale Applikation. Inhibition der protektiven mukosalen Prostaglandine PGE <sub>2</sub> und PGI <sub>2</sub> .
Carrageenan [150, 151]	Maus, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen, Rhesusaffe	Akute Colitis durch orale Zufuhr des Polysaccharides über das Trinkwasser. Schädigung der mukosalen Barriere. Bedeutung anaerober Keime bei der Entwicklung der Ulcerationen.
DSS [152, 153]	Maus, Hamster	Akute und chronische Colitis mit Betonung der Mukosa des linken Hemikolons durch orale Zufuhr des Polysaccharides über das Trinkwasser. Toxische Schädigung, Änderung der Mikroflora und Aktivierung des mukosalen Immunsystems.
PG-PS [154]	Ratte	Akute und chronische transmurale Enterocolitis durch intramurale Injektion von Komponenten der Bakterienzellwand (PG-PS) in das distale Kolon. Aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten.

**Tabelle 34:** Häufig verwendete induzierbare Colitis-Modelle (modifiziert nach [34, 100, 103]).

TNBS = Trinitrobenzensulfonsäure

DNBS = Dinitrobenzensulfonsäure

DSS = Dextran sulfate sodium (Dextran-Natriumsulfat)

PG-PS = Peptidoglycan-Polysaccharide

Die Anforderungen, die an die Modelle gestellt wurden, lauteten: einfache Induktion mit gut reproduzierbarer Colitis, charakteristische Unterschiede mit deutlichen Parallelen zu einer der beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und schließlich vertretbarer Kostenaufwand zur Durchführung größerer Serien.

Unter diesen Gesichtspunkten fiel die Wahl zum einen auf das TNBS-(Trinitrobenzensulfonsäure)-Modell [104], das bei Untersuchungsbeginn bereits gut charakterisiert und weit verbreitet war [103]. Zum anderen wurde als Kontrast zu diesem Modell, das sehr viele Gemeinsamkeiten mit dem Morbus Crohn besitzt, das Mitomycin C-Modell ausgewählt. Dieses Colitis-Modell war zum damaligen Zeitpunkt relativ neu und sollte mit einer auf die Schleimhaut beschränkten Entzündung der Colitis ulcerosa ähnlich sein [105].

#### **4.3.1.2.2. Charakterisierung des TNBS-Colitis-Modells**

Bei diesem von Morris et al. 1989 beschriebenen Modell erfolgt die Induktion der Colitis durch eine einmalige intrarektale Applikation von Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS), die in reinem Äthanol gelöst wird [104]. Dieser Alkohol wirkt als „Barrier-Breaker“, der die intakte Schleimhaut des Dickdarms zerstört, so dass die Trinitrobenzensulfonsäure in die Darmwand eindringen kann. Es kommt innerhalb von Stunden zu einer akuten transmuralen Entzündung, die nach 3 Tagen rückläufig ist und in eine chronische Entzündung übergeht, die bei Ratten bis 8 Wochen anhalten kann. Bei Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die chronische Entzündung Folge einer T-Lymphozyten ( $T_H1$ ) vermittelten Immunreaktion ist. Dabei wirkt TNBS als Hapten, das durch Bindung an die E-Aminogruppe der Aminosäure Lysin die Struktur der Oberflächenantigene verändert und so eine Immunreaktion vom verzögerten Typ hervorruft (Hapten-Colitis) [103, 104, 155-159]. Bei Ratten ist der exakte Pathomechanismus bislang unbekannt, diskutiert werden auch toxische Effekte [34].

Die Entzündungsreaktion ist betont am Ort der Induktion, also im Rektum bzw. im aboralen Kolon, und breitet sich kontinuierlich mit fokalen Ulcerationen aus. Makroskopisch imponiert neben einer teils nekrotischen, teils ulcerösen Schleimhaut eine verdickte Darmwand sowie ein dilatierter Darm i. S. eines paralytischen Ileus. Histologisch ist die akute Phase durch eine transmurale ödematöse granulozytenreiche Entzündung mit

Nekrosen und Ulcerationen der Mukosa, die bis in die Submukosa reichen, gekennzeichnet (s. Abbildung 18b, Seite 50). Im chronischen Stadium kommt es zu einer insbesondere mukosalen Lymphozyteninfiltration, wobei  $CD4^+$  T Zellen bei der Maus überwiegen [157], in bis zu 80% zur Bildung von Granulomen [156], zum Auftreten von Riesenzellen vom Langhans Typ, zum Umbau der Schleimhaut sowie zur Fibrose der Darmwand. Klinisch fallen die Tiere durch Diarrhoe, Appetitmangel, Gewichtsverlust und Antriebsarmut auf. Sie sprechen gut auf Medikamente an, die auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erfolgreich eingesetzt werden [160, 161]. Nach Ausheilung der Erkrankung kommt es zu keinem spontanen Rezidiv.

Die Colitis-Induktion ist zwar zu etwa 90% erfolgreich, doch in ihrer Ausprägung sehr schwankend. Aus Studien ist bekannt, dass der Entzündungsgrad abhängig ist von der Spezies, von der Rasse, von der individuellen Mikroflora der Tiere sowie von der TNBS-Konzentration. In der Literatur werden daher jeweils Pilotversuche zur Dosisfindung gefordert [100, 162]. Darüber hinaus ist allerdings ein histologischer Score zur Schweregradeinteilung der Colitis für den Vergleich der Befunde absolut erforderlich (s. Kap. 4.3.1.4., Seite 101).

#### **4.3.1.2.3. Charakterisierung des Mitomycin C-Colitis-Modells**

1992 beschrieben Keshavarzian et al. ein Colitis-Modell, bei dem es durch eine einmalige intraperitoneale Injektion von Mitomycin C zur Induktion einer kontinuierlichen Pancolitis kommt. Besonders an diesem Modell ist, dass die Entzündung im wesentlichen auf die Dickdarmschleimhaut beschränkt ist [105]. Der Höhepunkt der akuten Entzündung wird nach 3 Tagen erreicht und dauert etwa bis zum siebten Tag an. 4 Wochen nach Induktion ist die akute Entzündung ausgeheilt. Der genaue Pathomechanismus ist unbekannt, zu einem spontanen Rezidiv kommt es nicht.

Makroskopisch fällt neben vorkommenden Ascites eine schwere diffuse Peritonitis auf, die die Mobilisation des verdickten Kolons erheblich beeinträchtigt. Die Schleimhaut ist ödematös geschwollen. Histologisch kommt es in der akuten Entzündungsphase zu einer Granulozyten-Infiltration der Mukosa, zu Kryptenabszessen, zur Dilatation von Gefäßen sowie zum Ödem [105]. Im chronischen Stadium fallen insbesondere mukosale Lymphozyteninfiltrate, der Schleimhautumbau sowie eine Fibrose der Darmwand auf.

Klinisch ist der schwere Krankheitsverlauf der Tiere durch Diarrhoe, Appetitmangel, Gewichtsverlust und Antriebsarmut gekennzeichnet.

Dieses Modell ist in der Literatur nicht sehr verbreitet und von daher längst nicht so detailliert charakterisiert wie das TNBS-Modell.

#### **4.3.1.2.4. Vergleich des TNBS- und des Mitomycin C-Colitis-Modells mit den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Die Wahl fiel unter anderem auf das TNBS-Colitis-Modell und auf das Mitomycin C-Colitis-Modell, weil jedes von ihnen hinsichtlich seiner Charakterisierung deutliche Parallelen zu einer der beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen aufweist. Dabei ist das TNBS-Colitis-Modell eher mit dem Morbus Crohn und das Mitomycin C-Colitis-Modell eher mit der Colitis ulcerosa vergleichbar. Eine Übersicht über die Charakteristika der Modelle und der Erkrankungen gibt die Tabelle 35 (Seite 99).

#### **4.3.1.3. Methodik der Intravitalmikroskopie**

Die Intravitalmikroskopie stellt zweifellos den Goldstandard für Studien der Mikrozirkulation dar [106, 163]. Neben der Bestimmung des kapillären Blutflusses und des Leukozytenstickings sind heutzutage mit Hilfe computerunterstützter Auswertungsmöglichkeiten auch Messungen der Gefäßpermeabilität und der funktionellen Kapillardichte möglich [108], so dass die Mikrozirkulation umfassend charakterisiert werden kann.

##### **4.3.1.3.1. Präparation der Tiere**

Die Mikrozirkulation ist von einer Reihe von Faktoren abhängig, die es zu beachten gilt, um ein möglichst konstantes Modell und so objektive Messergebnisse zu erhalten. Bei der Präparation der Tiere handelt es sich um einen invasiven Eingriff, der zwangsläufig mit einem gewissen Blutverlust verbunden ist. Hier muss es das Ziel sein, diesen Blutverlust möglichst gering zu halten, um nicht durch Hypovolämie die Mikrozirkulation negativ zu beeinflussen. Hierzu wurde sowohl bei der Katheteranlage im Bereich des Halses als auch bei der Laparotomie auf eine atraumatische Operationstechnik geachtet. Das Kolon wurde im Bereich der avasculären Zone des Mesenteriums mobilisiert, um eine Störung der Durchblutung zu vermeiden. Daher war auch eine absolut spannungsfreie Verlagerung des

Kolons vor die Bauchdecke erforderlich. In Kenntnis der Angioarchitektur erfolgte die notwendige Eröffnung des Lumens streng antimesenterial, da hier eine nahezu avasculäre Zone existiert, bedingt durch eine fehlende regelhafte Anastomosierung der hier zusammentreffenden Vasa recta longa, die an beiden Seiten der Darmwand lang ziehen (s. Abbildungen 38 und 39, Seite 89 und 90). Die eigens für diese Untersuchungen angefertigte Kunststoffschiene wurde mit Einbuchtungen versehen, damit die Auflagefläche und somit die Spannung des Darms möglichst gering blieb. Das eröffnete Kolon wurde mit sehr feinen atraumatischen Fäden (Prolene 7/0) armiert und locker aufgespannt (s. Abbildung 4, Seite 25). Somit wurde hier eine standardisierte Technik entwickelt und etabliert, die zum einen den obligaten Blutverlust minimiert und zum anderen die Durchblutung nicht kompromittiert.

	<b>TNBS-Modell</b>	<b>Mitomycin C-Modell</b>	<b>Morbus Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
<b>Lokalisation</b>	Betonung Rektum und linkes Hemikolon	Rektum und Kolon	Gesamter Gastrointestinaltrakt	Rektum und Kolon
<b>Ausbreitung</b>	kontinuierlich	kontinuierlich	diskontinuierlich	kontinuierlich
<b>Befall</b>	transmural	Schleimhaut	transmural	Schleimhaut
<b>Histologische Besonderheiten</b>	Granulome, Riesenzellen vom Langhans Typ	Kryptenabszesse, Schleimhautumbau	Epitheloidzellige Granulome, Fissuren,	Kryptenabszesse, Becherzellverlust, Schleimhautumbau, Ulceration
<b>Verlauf</b>	Spontane Ausheilung, kein Rezidiv	Spontane Ausheilung, kein Rezidiv	chronisch rezidivierend	chronisch rezidivierend
<b>Symptome</b>	Diarrhoe, Gewichtsverlust, Appetitmangel, Antriebsarmut	Diarrhoe, Gewichtsverlust, Appetitmangel, Antriebsarmut	Diarrhoe, Gewichtsverlust, Schmerzen, Fieber	Diarrhoe Gewichtsverlust Schmerzen, Fieber
<b>Extra-intestinale Begleiterkrankungen</b>	keine	keine	Iridocyclitis, Uveitis; Sakroiliitis, Monarthritis, Polyarthritis, Erythema nodosum, Primär sklerosierende Cholangitis	Iridocyclitis, Uveitis; Sakroiliitis, Monarthritis, Polyarthritis, Erythema nodosum, Primär sklerosierende Cholangitis

**Tabelle 35:** Charakteristika der verwendeten Colitis-Modelle und der chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen.

Weitere die Mikrozirkulation beeinflussende Faktoren wurden konstant gehalten bzw. kontrolliert, um systematische Fehler zu vermeiden. Die Lagerung der Tiere auf einer thermostatisch geregelten Heizmatte sowie das Äquilibrieren mit 37°C warmer Ringer-Lactat-Lösung dienten zum Erhalt der Körpertemperatur über einen langen Untersuchungszeitraum. Um kardiorespiratorisch insuffiziente Tiere von den Versuchen auszuschließen, erfolgten neben der kontinuierlichen direkten Blutdruckmessung Blutgasanalysen vor Beginn und am Ende der Versuche.

Die Messung des kapillären Blutflusses der Serosa erwies sich als problematisch, da es durch den insbesondere im proximalen Kolon immer vorhandenen Kot zu deutlichen Artefakten kam. Bei den Colitis-Tieren war der gesamte Dickdarm wegen des paralytischen Ileus massiv stuhlgefüllt. Alle Bemühungen, den Darm mit verschiedenen oralen Abführmaßnahmen zu säubern, schlugen fehl, so dass diese Messungen nur in der Pilotstudie durchgeführt wurden.

Bei den Untersuchungen im Bereich der Mukosa erwies sich die ständige Schleimbildung als hinderlich, so dass intermittierende schonende Säuberungen mit Wattestäbchen erforderlich waren. Auch der von oral nachfolgende Kot musste auf diese Weise entfernt werden, wenngleich diese Darmmotilität als erfreuliches Zeichen für die Vitalität des Tieres im allgemeinen und des Darms im besonderen interpretiert wurde.

#### **4.3.1.3.2. Parameter der Mikrozirkulation**

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie lassen sich neben der Bestimmung des kapillären Blutflusses folgende Parameter der Mikrozirkulation bestimmen: die funktionelle Kapillardichte, die Gefäßpermeabilität und das Leukozytensticking. Die Analyse erfolgte offline, so dass sämtliche Untersuchungen zunächst auf Videobändern aufgezeichnet wurden. Die Auswertung des kapillären Blutflusses erfolgte nach der von Mithöfer et al. angegebenen Methode [106]. Die Messung von jeweils 10 Feldern der Kolonmukosa pro Tier erklärt die hohe Zahl an ausgewerteten Kapillaren und somit den relativ geringen SEM (Standard Error of Mean). Zur Analyse der funktionellen Kapillardichte und der Gefäßpermeabilität wurde ein spezielles Computerprogramm (CAP-IMAGE Version 6.01; Dr. Zeintl; Heidelberg) verwendet [108]. In Übereinstimmung mit der in der Literatur üblichen Definition wurde von Leukozytensticking gesprochen, wenn die Leukozyten

mindestens 30 sec. an einer Stelle der Gefäßwand hafteten und sich nicht fortbewegten [109, 111, 112].

#### **4.3.1.4. Histologischer Colitis-Score**

Die exakte histologische Bestimmung des Entzündungsgrades der Colitis ist aus mehreren Gründen von entscheidender Bedeutung. Wiederholt konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung der TNBS-Colitis sehr variabel sein kann (s. Kap. 4.3.1.2.2., Seite 96) [100, 156, 162]. Dieses Phänomen ist aber nicht nur auf die TNBS-Colitis beschränkt, sondern kommt auch bei anderen experimentellen Colitiden vor [164]. Unabhängig vom verwendeten Modell ist die histologische Gradeinteilung aber auch eine Voraussetzung für Verlaufsstudien bzw. vergleichende Untersuchungen. Es ist daher überraschend, dass der Literatur kein etablierter histologischer Colitis-Score zu entnehmen ist. Vielmehr verwenden die Autoren meist einen eigenen oder modifizierten Score, um den Schweregrad der Colitis zu quantifizieren [165-170]. Allen gemeinsam ist eine subjektive Bewertung der jeweiligen Veränderungen, so wird z.B. die „inflammatorische Infiltration“ als „gering“, „mäßig“ oder „schwer“ beschrieben [167]. Dadurch sind sämtliche Scores untersucherabhängig und somit wenig objektiv. Im Verlauf der Colitis kann es zu einem Wandel kommen, wobei die akute Entzündung in eine chronische übergeht. Die verfügbaren Scores unterscheiden hier nicht konsequent zwischen Zeichen der akuten und der chronischen Inflammation, so dass die Erfassung derartiger Veränderungen problematisch sein kann.

Daher wurde für dieses Projekt in enger Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Charité – Campus Benjamin Franklin (Direktor: Prof. Dr. med. H. Stein) ein histologischer Colitis-Score entwickelt, der weitestgehend unabhängig vom jeweiligen Untersucher ist und der strikt zwischen akuten und chronischen Entzündungszeichen differenziert (s. Kap. 2.1.7., Seite 37 und Abbildung 11, Seite 39).

### **4.3.2. Ergebnisse**

#### **4.3.2.1. Pilotstudie (Gruppen Ia-f)**

Nach Standardisierung der Präparationstechnik (s. Kap. 2.1.3., Seite 24, Kap. 2.1.4., Seite 25 und Kap. 4.3.1.3.1., Seite 98) erfolgten zunächst im Rahmen einer Pilotstudie Untersuchungen an 32 gesunden Ratten. Entsprechend anderen intravitalmikroskopischen Studien wurden Ausschlusskriterien definiert (s. Kap. 2.1.8., Seite 38), so dass nur Tiere,

die während der intravitalmikroskopischen Messungen kardiorespiratorisch und hämodynamisch stabil waren, ausgewertet wurden [110, 115].

Es wurden 3 verschiedene Darmabschnitte in randomisierter Reihenfolge untersucht; dies waren neben dem terminalen Ileum das proximale und das distale Kolon. Bedingt durch die Dauer der Versuche und des damit verbundenen Blutverlustes wurden in der Regel bei einem Tier nur 2 Segmente untersucht. Grundsätzlich wurde zunächst der kapilläre Blutfluss der Serosa gemessen bevor die Lumeneröffnung des Darms zur Messung im Bereich der Mukosa erfolgte.

Im Bereich der Serosa findet sich in allen 3 Darmabschnitten ein vergleichbarer kapillärer Blutfluss. Dieser ist gegenüber dem mukosalen Fluss deutlich erhöht. Abgesehen von den Schwierigkeiten, die durch stuhlbedingte Artefakte (s. Kap. 4.3.1.3.1., Seite 98) auftraten, ist im Bereich der Serosa das Kapillarnetz längst nicht so dicht ausgebildet wie im Bereich der Mukosa (honeycomb-like plexus) (s. Abbildung 1a, Seite 15). Eine sichere Abgrenzung der serosalen Kapillaren von darunterliegenden Arteriolen ist nicht möglich. Dies erklärt möglicherweise den höheren kapillären Blutfluss im Bereich der Serosa gegenüber der Mukosa. Auch im Bereich der Schleimhaut ist die Mikrozirkulation in allen 3 Darmsegmenten ähnlich. Im Vergleich zu anderen Endstrombahnen, wie z.B. der des Pankreas, wo der Fluss 2,1 nl/cap/min beträgt [171], ist der kapilläre Blutfluss der Kolonmukosa mit Werten zwischen 2.37 und 2.64 nl/cap/min relativ hoch.

Nach erfolglosen Bemühungen am Essigsäure-Colitis-Modell [101] gelang somit in dieser Pilotstudie erstmals die intravitalmikroskopische Untersuchung der Mikrozirkulation im Bereich der Serosa und der Mukosa verschiedener Darmabschnitte [172].

#### **4.3.2.2. Colitis-Induktionsstudie (Gruppen II-V)**

Nachdem die Präparationstechnik der Ratten, die Induktionstechnik der beiden Colitis-Modelle, der histologische Colitis-Score sowie die Technik der Intravitalmikroskopie am Darm der Ratte erfolgreich etabliert waren, wurden im Rahmen einer Colitis-Induktionsstudie die beiden Colitis-Modelle (TNBS-Colitis-Modell und Mitomycin C-Colitis-Modell) charakterisiert.

Da es beim TNBS-Modell innerhalb von 24 Stunden zu einer schweren floriden transmuralen Entzündung kommt, die nach 3 Tagen wieder rückläufig ist und dann in eine

chronische Entzündung übergeht, die bei Ratten bis zu 8 Wochen anhalten kann, wurden als Untersuchungszeitpunkte 24 Stunden, 3 Tage und 15 Tage nach Induktion der Colitis gewählt (s. Kap. 4.3.1.2.2., Seite 96). Beim Mitomycin C-Modell bildet sich die Pancolitis hingegen langsamer aus. Der Höhepunkt der akuten Schleimhautentzündung wird erst nach 3 Tagen erreicht und soll bis etwa zum siebten Tag andauern. Mit einer Ausheilung der Entzündung ist nach gut 4 Wochen zu rechnen. Daher wurden als Untersuchungszeitpunkte 3 Tage, 7 Tage und 6 Wochen nach Colitis-Induktion gewählt, damit mit „Sicherheit“ eine *restitutio ad integrum* vorlag (s. Kap. 4.3.1.2.3., Seite 97).

Auch bei der Colitis-Induktionsstudie sollte analog der Pilotstudie die Intravitalmikroskopie zunächst im Bereich der Serosa durchgeführt werden. Dies war jedoch wegen starker Artefakte, die durch den insbesondere im proximalen Kolon immer vorhandenen Kot auftraten, unmöglich. Durch die entzündungsbedingte Paralyse war das Kolon dilatiert und massiv stuhlgefüllt. Trotz intensiver Bemühungen mittels verschiedener oraler Abführmaßnahmen gelang es nicht, den Darm entsprechend zu säubern, so dass auf diese Messungen bei den Colitis-Tieren verzichtet werden musste (s. Kap. 4.3.1.3.1., Seite 98).

Die Untersuchungen erfolgten somit bei beiden Colitis-Modellen ausschließlich im Bereich der Schleimhaut des proximalen und des distalen Kolons in randomisierter Reihenfolge. Zu jeder Colitisgruppe wurde jeweils eine Kontrollgruppe gebildet, bei denen eine Scheininduktion mittels physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt wurde (s. Kap. 2.1.6.2., Seite 32). Insgesamt gab es 5 drop-outs, ein Tier verstarb am 13. Tag nach TNBS-Colitis-Induktion (Gruppe IIc), die weiteren 4 Tiere, jedes aus einer anderen Subgruppe (Gruppen: IIb, IIc, IVb und IVc), waren kardiorespiratorisch insuffizient und wurden gemäß den Ausschlusskriterien aus der Wertung genommen (s. Kap. 2.1.8., Seite 38).

#### **4.3.2.2.1. Evaluation des TNBS-Colitis-Modells (Gruppen IIa-c und IIIa-c)**

Bei 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. Ein erhöhter Blutfluss ist im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion üblich und führt zu der bekannten Hyperämie

(rubor et calor), die sich auch in der hochroten Darmschleimhaut manifestiert. 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, z.B. Granulome, nachweisen. Interessanterweise hat der kapilläre Blutfluss zu diesem Zeitpunkt den Ausgangswert annähernd wieder erreicht. Im proximalen Kolon kommt es im Verlauf weder histologisch noch mikrozirkulatorisch zu signifikanten Änderungen.

Zusammengefasst kommt es bei diesem Modell zu einer fulminanten akuten transmuralen Colitis im Bereich des distalen Kolons, die am 15. Tag nach Induktion bereits deutlich rückläufig ist und Zeichen der chronischen Reaktion erkennen lässt. Die anfangs signifikant verminderte Mikrozirkulation ist zu diesem Zeitpunkt bereits wieder normal.

Die von Leung und Koo am Essigsäure-Colitis-Modell der Ratte beschriebene Stase des kapillären Blutflusses [101] ließ sich auch bei der TNBS-Colitis gelegentlich nachweisen und zwar im Übergangsbereich Nekrose/Inflammation. Die Untersuchungen von Leung und Koo erfolgten allerdings innerhalb der ersten Stunde nach Colitis-Induktion. Bei spektrophotometrischen Studien am 2. Tag nach Induktion konnten die Autoren allerdings sowohl am Essigsäure-Colitis-Modell als auch am DNBS-Colitis-Modell der Ratte eine Minderperfusion im Bereich der ulcerierten Schleimhaut nachweisen [173]. Diese Befunde stehen im Einklang mit der hier festgestellten Minderung des kapillären Blutflusses am 3. Tag nach Induktion.

Auch im Vergleich mit den in vivo Befunden von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigt das TNBS-Colitis-Modell im zeitlichen Verlauf die Veränderungen der Mikrozirkulation, die mittels endoskopischer Spektrophotometrie oder endoskopischer Laser-Doppler-Flowmetrie beschrieben wurden: Gesteigerter Blutfluss bei aktiver Colitis, Normalisierung in der Remission [74-76].

#### **4.3.2.2.2. Evaluation des Mitomycin C-Colitis-Modells (Gruppen IVa-c und Va-c)**

Bei der Mitomycin C-Colitis kommt es, anders als von Keshavarzian et al. mitgeteilt [105], nach 3 Tagen weder makroskopisch noch mikroskopisch zu einer akuten Entzündung. Es zeigen sich allerdings Rundzellinfiltrate bei ansonsten intakter Schleimhaut als Zeichen einer leichten chronischen Entzündungsreaktion (s. Abbildung 22a, Seite 59). Der kapilläre Blutfluss der Mukosa ist zu diesem Zeitpunkt noch normal. Auch 7 Tage nach Induktion liegt keine akute Inflammation, wie von Keshavarzian et al. beschrieben, vor. Vielmehr hat die Infiltration von Rundzellen im proximalen Kolon deutlich zugenommen (s. Abbildung 22b, Seite 59), der kapilläre Blutfluss in diesem Darmabschnitt ist signifikant vermindert. Indessen ist die Inflammation des distalen Kolons unverändert und auch die Mikrozirkulation ist annähernd gleich geblieben. Nach 6 Wochen hat die chronische Entzündungsreaktion im Bereich des proximalen Kolons weiter zugenommen, sie unterscheidet sich signifikant von der am 3. Tag nach Induktion (s. Abbildung 22c, Seite 59). Von Seiten des kapillären Blutflusses ist es nochmals zu einer Abnahme von 1.53 auf 1.19 nl/cap/min gegenüber dem 7. Tag gekommen. Ganz anders ist die Situation im distalen Kolon. Hier bleibt es unverändert bei einer geringgradigen Entzündung. Interessanterweise ist allerdings die Mikrozirkulation mittlerweile gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert.

Zusammengefasst kommt es bei diesem Modell zur allmählichen Entwicklung einer auf die Schleimhaut begrenzten chronischen Pancolitis mit deutlicher Betonung des proximalen Abschnitts. Dabei lässt sich eine signifikante Minderung des kapillären Blutflusses feststellen.

Mittels endoskopischer Laser-Doppler-Flowmetrie fanden Guslandi et al. eine signifikante Minderperfusion des rektalen Blutflusses bei Patienten mit inaktiver Colitis [76]. Histologisch entspricht dieses Stadium der Colitis einer chronischen Inflammation, so dass die klinischen Befunde mit den experimentell erhobenen Befunden des Mitomycin C-Colitis-Modells vergleichbar sind.

#### **4.3.2.2.3. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen der Colitis-Induktionsstudie**

In dieser Studie wurde an zwei Colitis-Modellen systematisch die Mikrozirkulation der Kolonschleimhaut zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Colitis mittels Intravitalmikroskopie untersucht. Die im Verlauf auftretenden histopathologischen

Veränderungen wurden unter Verwendung eines neuen Colitis-Score's quantifiziert. Somit war es möglich, den potentiellen Zusammenhang zwischen Mikrozirkulation (Funktion) und Histopathologie (Morphologie) zu evaluieren.

Es fanden sich folgende Befunde: (1) Bei beiden Colitis-Modellen kommt es zu signifikanten Störungen der mukosalen Mikrozirkulation. (2) Diese Störungen treten sowohl im akuten als auch im chronischen Stadium der Entzündung auf. (3) Die Mikrozirkulation ist wieder normal während die Inflammation rückläufig ist (TNBS-Modell). (4) Die Mikrozirkulation verschlechtert sich während die Inflammation konstant bleibt bzw. zunimmt (Mitomycin C-Modell).

Aus dieser Studie lassen sich folgende Schlüsse ziehen: (1) Die Intravitalmikroskopie ist auch am entzündeten Kolon möglich. (2) Das TNBS-Modell entspricht eher dem aktiven und (3) das Mitomycin C-Modell eher dem inaktiven Stadium der Colitis. (4) Bei beiden Modellen gibt es entsprechende klinische Befunde bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. (5) Der neu entwickelte histologische Colitis-Score ist für die Qualifizierung und Quantifizierung experimenteller Colitiden geeignet.

#### **4.3.2.2.4. Hypothese aus der Colitis-Induktionsstudie**

Diese Ergebnisse weisen somit auf die Bedeutung der Mikrozirkulation für den Verlauf sowohl der akuten als auch der chronischen Colitis hin. Es wird daher vermutet, dass die funktionellen Veränderungen (Mikrozirkulation) den pathomorphologischen (Entzündung) vorangehen. Durch die gestörte Mikrozirkulation kommt es zu funktionellen Störungen, die für die Erkrankungsschwere verantwortlich sind.

Stimmte die Hypothese, dass die gestörte Mikrozirkulation von pathogenetischer Bedeutung ist, so müsste umgekehrt eine Verbesserung der Mikrozirkulation in der frühen Phase der Colitis zu einem mildereren Krankheitsverlauf führen. Daher erfolgte die Überprüfung dieser Hypothese in einem weiteren Versuchsansatz.

#### **4.3.2.2.3. Interventionsstudie (Gruppen VIa-e)**

Zur Überprüfung der Hypothese wurde eine Substanz gewählt, die einen direkten Einfluss auf die Mikrozirkulation hat, das Endothelin. Endothelin ist nicht nur der stärkste bekannte Vasokonstriktor, sondern scheint zudem sowohl bei der experimentellen Colitis als auch

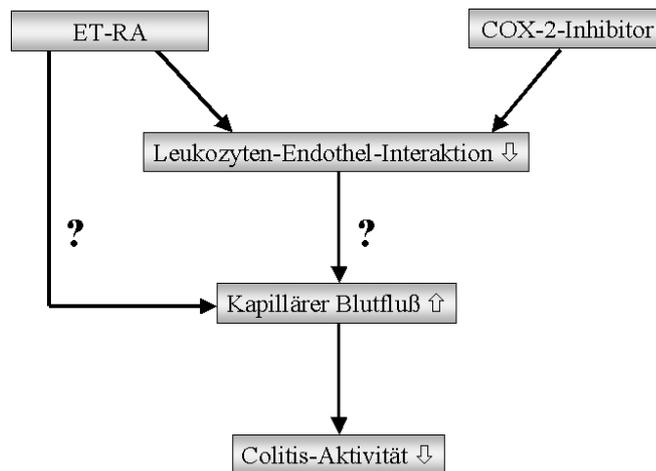
bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle zu spielen. So wurden sowohl in homogenisierten Gewebeproben als auch im Serum von Patienten mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa signifikant erhöhte Spiegel von Endothelin nachgewiesen [97, 98, 174]. Kanazawa et al. konnten zeigen, dass die Gewebe- und Serumspiegel insbesondere bei aktiver Erkrankung erhöht waren [99]. Daneben kommt es zu einer vermehrten Expression von Endothelin-Rezeptoren am Gefäßendothel des Darms [174]. Die Gabe eines Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ET-RA) führte in tierexperimentellen Studien zu einem günstigeren Verlauf der Colitis [175, 176].

Nach der Hypothese müsste somit die Gabe von Endothelin in der frühen Phase der Colitis über eine weitere Reduzierung des kapillären Blutflusses zu einer Verschlechterung der Erkrankung führen. Umgekehrt würde die Verbesserung der Mikrozirkulation durch Blockade des Endothelin-Rezeptors zu einer mildereren Colitis führen.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte geprüft werden, auf welche Weise es durch Gabe eines Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ET-RA) zur vermuteten Verbesserung der Mikrozirkulation kommt.

Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird eine gesteigerte Leukozyten–Endothel–Interaktion beobachtet. Es wird vermutet, dass sie ein entscheidender Schritt im Entzündungsprozess ist und die Entzündungsschwere widerspiegelt [177-180]. Interessanterweise führt Endothelin über Aktivierung der Endothelzellen ebenfalls zu einer gesteigerten Leukozyten–Endothel–Interaktion und begünstigt die Migration der Leukozyten aus dem Gefäßlumen in das Gewebe [174, 181, 182]. Diese gesteigerte Leukozyten–Endothel–Interaktion stellt ihrerseits ein mechanisches Hindernis dar, das zur Beeinträchtigung der Mikrozirkulation führt [183]. Bei potentiell positiver Wirkung eines Endothelin-Rezeptor-Antagonisten auf den Verlauf der Colitis stellt sich somit die Frage, ob dieser Effekt (Besserung der Mikrozirkulation) durch direkte Wirkung auf die Gefäße oder aber indirekt durch eine verminderte Leukozyten–Endothel–Interaktion vermittelt wird. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein selektiver Cyclooxygenase-2-Inhibitor eingesetzt, da einerseits aufgrund der COX-abhängigen Expression der Adhäsionsmoleküle ein Zusammenhang zwischen COX-Aktivierung und Leukozyten–Endothel–Interaktion besteht [122, 124, 184] und andererseits Studien über den erfolgreichen Einsatz bei experimenteller Colitis und bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen berichten [122, 185]. Die Abbildung 43 (Seite 108) fasst

den Versuchsansatz zur Klärung der Frage, wie es durch Gabe eines Endothelin-Rezeptor-Antagonisten zur postulierten Verbesserung der Mikrozirkulation kommt, nochmals graphisch zusammen.



**Abb. 43:** Versuchsansatz zur Überprüfung des Wirkmechanismus eines Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (ET-RA) auf die Mikrozirkulation.

#### 4.3.2.3.1. Wahl des Colitis-Modells

Für die geplante Interventionsstudie fiel die Wahl auf das TNBS-Colitis-Modell, da es hier in der frühen Phase der Colitis zu einer hochakuten Entzündung kommt, die mit einer signifikanten Veränderung der Mikrozirkulation einhergeht. Zur Überprüfung der pathogenetischen Bedeutung der Mikrozirkulation und somit der Hypothese erschien dieses Modell daher besonders geeignet zu sein.

Ein weiterer und mitentscheidender Vorteil ist, dass das TNBS-Modell weitaus besser charakterisiert ist (s. Kap. 4.3.1.2.2., Seite 96), was die Beurteilung der Ergebnisse bedeutend erleichtert. Zudem werden zahlreiche neuen Therapieansätze an diesem Modell überprüft (Übersicht bei [100]), da dieses Modell gut auf Medikamente anspricht, die auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erfolgreich eingesetzt werden [160, 161].

#### 4.3.2.3.2. Versuchsaufbau

Die Colitis-Induktionsstudie konnte zeigen, dass es bereits nach 24 Stunden zu einer hochgradigen akuten Entzündung kommt, die auch noch nach 72 Stunden unverändert vorliegt. Da die Untersuchung der frühen Phase der Colitis das zentrale Anliegen war, wurde als Untersuchungszeitpunkt für die Intravitalmikroskopie 48 Stunden nach Induktion gewählt, so dass die Substanzen, die nach 12 Stunden appliziert wurden, 36 Stunden wirken konnten (s. Abbildung 10, Seite 36). Im proximalen Kolon kam es weder histologisch noch von Seiten der Mikrozirkulation zu Änderungen, so dass hier nur das distale Kolon im Bereich der Schleimhaut intravitalmikroskopisch untersucht wurde.

Neben einer Kontrollgruppe (VIa) und einer unbehandelten Colitisgruppe (VIb) gab es 3 Verum-Gruppen (VIc-e), die die Testsubstanzen (Endothelin-1 (VIc), Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist (VIId) und COX-2-Inhibitor (VIe)) erhielten. Da die Untersuchung sämtlicher Zielparameter an einem Tier methodisch nicht möglich ist, wurde jede dieser Gruppen in zwei Subgruppen (VIa1-e1 und VIa2-e2, n=8) aufgeteilt.

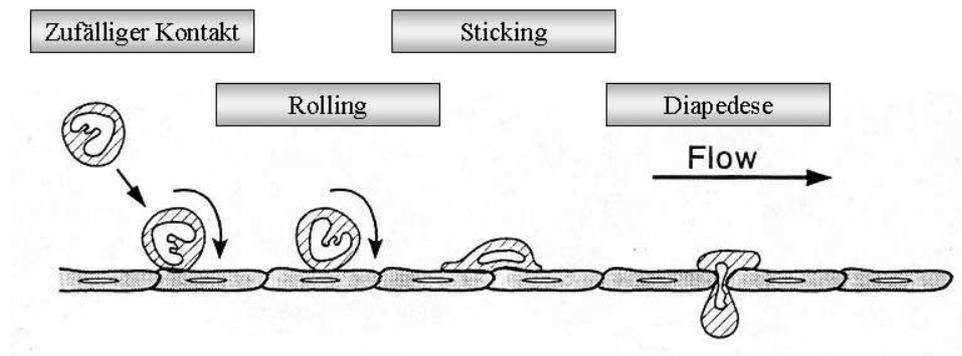
#### 4.3.2.3.3. Zielparameter

Auch wenn es durch Gabe des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten oder des COX-2-Inhibitors zur Besserung der Mikrozirkulation kommen sollte, so ist nach den Ergebnissen der Colitis-Induktionsstudie nicht zu erwarten, dass sich 48 Stunden nach Induktion histologische Veränderungen zeigen. Selbst bei Zutreffen der Hypothese, dass die funktionellen Veränderungen den morphologischen vorangehen, wäre ein Zeitraum von 36 Stunden hierfür nicht ausreichend.

Da es bei diesem Modell üblicherweise zu keiner Letalität kommt, mussten daher andere (funktionelle) Parameter definiert werden, die geeignet sind, die Schwere der Erkrankung zu beurteilen. Dabei ist die Unzuverlässigkeit von Entzündungsparametern im peripheren Blut aus dem klinischen Alltag hinreichend bekannt, so dass Alternativen zur Definition der Erkrankungsschwere herangezogen wurden, die als objektiver gelten dürfen.

Im Rahmen einer Entzündung ist die Affinität der zirkulierenden Leukozyten zum Gefäßendothel gesteigert. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Migration der Leukozyten in das entzündete Gewebe. Dabei kommt es über zufällige Kontakte mit der Gefäßwand zum sog. Rolling und schließlich zum festen Anhaften (Sticking) der

Leukozyten, welches die Voraussetzung für deren Diapedese ins Gewebe ist (Abbildung 44, Seite 110) [111, 178, 181, 186-189]. Dieses Phänomen (homing) wird durch Adhäsionsmoleküle sowohl auf Leukozyten als auch auf Endothelzellen vermittelt [190-193]. Dabei korreliert die Leukozyten–Endothel–Interaktion mit der Entzündungsschwere, so dass die Anzahl der Leukozyten–Sticker als Maß für die Erkrankungsschwere angesehen werden kann [177-180, 194].



**Abb. 44:** Schema des Ablaufs der Leukozytenmigration (homing).

Eng verbunden mit einer gesteigerten Leukozyten–Endothel–Interaktion ist die Erhöhung der Gefäßpermeabilität [178, 195, 196], so kommt es in entzündeten Geweben zu einer gesteigerten Permeabilität für Wasser aber auch für Plasmaproteine [197]. Dieses „Capillary Leakage“ führt zur Flüssigkeitsverschiebung von intravasal in das Interstitium (dritter Raum) und so zur klinisch eindrucksvollen Flüssigkeitsfehlverteilung bei Patienten mit SIRS bzw. Sepsis [198]. Somit ist auch die erhöhte Gefäßpermeabilität ein Ausdruck der Entzündungsaktivität und damit der Erkrankungsschwere. Dies belegen auch tierexperimentelle Studien bei akuter Pankreatitis [110, 113, 123].

Durch das „Capillary Leakage“ und der damit verbundenen Flüssigkeitsansammlung im dritten Raum kommt es zu einem Anstieg des Perfusionsdrucks und so zu einer Reduktion der perfundierten Kapillaren [110]. Somit ist die funktionelle Kapillardichte in entzündeten Geweben reduziert [199]; auch sie ist daher ein Ausdruck der Krankheitsaktivität. Eine Dezimierung perfundierter Kapillaren bei Sepsis wurde von Lush und Kvietyts beschrieben [200].

Neben diesen Parametern der Mikrozirkulation wurden noch weitere Labor- und klinische Parameter bestimmt, um die Krankheitsaktivität näher zu definieren. Durch den im entzündeten Gewebe bestehenden Flüssigkeitsshift in den dritten Raum kommt es zu einer Erhöhung des Hämatokrits (HTK). Auch bei anderen Erkrankungen, z.B. der akuten Pankreatitis, wird er daher zur Einschätzung der Schwere und des Verlaufs der Entzündung herangezogen [143-146]. Eng verbunden mit dem intravasalen Volumen ist die Nierenfunktion, die beim SIRS häufig schon frühzeitig eingeschränkt ist. Die quantitative Diurese ist daher ein wichtiger klinischer Parameter [201]. Zur Beurteilung der Colitis-Aktivität gibt es verschiedene Indices, wobei der Crohn's disease activity index (CDAI) am gebräuchlichsten ist [202]. Neben dem HTK gehen hier u. a. auch der Gewichtsverlauf und die Stuhlqualität mitein, so dass diese Parameter zur Bestimmung der Erkrankungsschwere miterfasst wurden. Bei allen Parametern ist zu berücksichtigen, dass die Reaktionen bei der Ratte mindestens viermal schneller als beim Menschen ablaufen [123, 203].

#### **4.3.2.3.4. Charakterisierung der Testsubstanzen**

##### **4.3.2.3.4.1. Endothelin-1**

Endothelin ist ein relativ kleines aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, das 1988 erstmals beschrieben wurde und als stärkster endogener Vasokonstriktor gilt [204, 205]. Drei Isoformen des Endothelins, die in unterschiedlichen Geweben vorkommen, sind bekannt: ET-1 (in allen Endothel- und Gefäßmuskelzellen), ET-2 (in verschiedenen Geweben, außer in Gefäßen) und ET-3 (Nervengewebe) (Abbildung 45, Seite 112).

Endothelin-1 wird nicht in Sekretgranula der Endothelzellen gespeichert, sondern die Produktion und Sekretion wird durch Stimuli wie Hypoxie oder Ischämie innerhalb weniger Minuten induziert, wobei die Halbwertszeit von ET-1 4-7 Minuten beträgt [206-208], so dass die Regulation des vasomotorischen Tonus und somit des Blutflusses rasch erfolgen kann [209, 210].

Auf die potentielle Bedeutung von ET-1 im Rahmen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wiesen erstmals Murch et al. 1992 hin [97]. Sie konnten in Operationspräparaten sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa immunhistologisch und mittels Radioimmunassay erhöhte ET-1-Konzentrationen nachweisen. Die Autoren vermuteten, dass die lokale ET-Produktion (durch Entzündungs-

zellen) via Vasokonstriktion zur Ischämie führe und somit ein „link“ zwischen den beiden Hypothesen der Pathogenese (immunologische Hypersensitivität und Gefäßalterationen) darstelle. Erhöhte ET-1-Spiegel bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. So untersuchten Letizia et al. die ET-1-Spiegel bei 29 Patienten mit Morbus Crohn sowie bei 13 mit Colitis ulcerosa und verglichen diese mit denen von 26 Gesunden. Bei beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen fanden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte ET-1-Spiegel (Morbus Crohn:  $22.3 \pm 8.2$  pg/ml, Colitis ulcerosa:  $11.2 \pm 2.7$  pg/ml, Kontrollen:  $6.2 \pm 1.5$  pg/ml) [98], wobei die ET-1-Konzentration mit der Aktivität der Erkrankung korreliert [99].

Sowohl die Dosierung ( $1,25 \mu\text{g/kg KG/Std.}$ ) als auch die Applikationsform (kontinuierlich intravenös) von Endothelin-1 erfolgten nach den Angaben der Literatur [110].

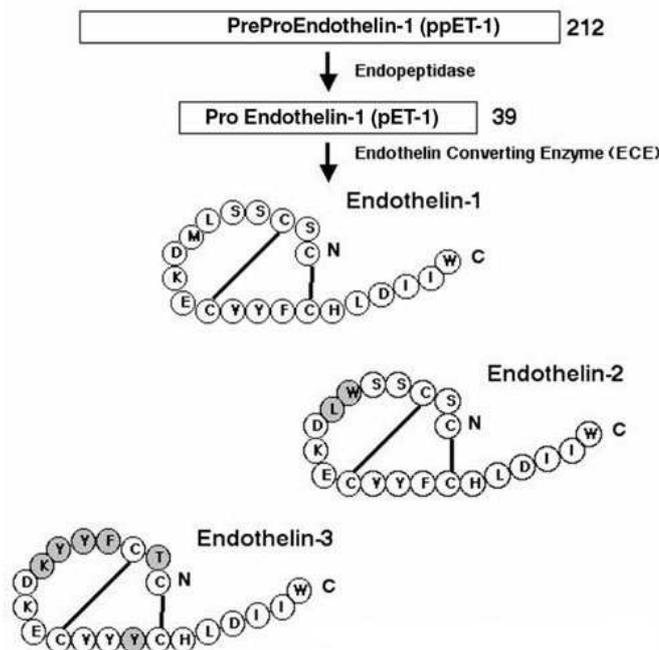
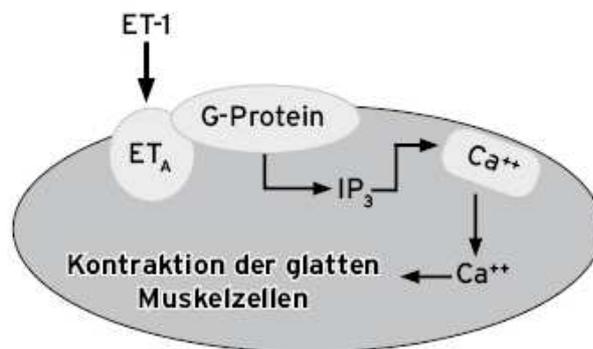


Abb. 45: Mitglieder der Endothelin-Familie.

#### 4.3.2.3.4.2. Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist LU-135252

Entsprechend den 3 Isoformen des Endothelins (ET-1, ET-2 und ET-3) existieren auch 3 verschiedene Endothelin-Rezeptor-Subtypen, Endothelin-A-, Endothelin-B- und Endothelin-C-Rezeptoren, wobei die jeweilige Affinität höchst unterschiedlich ist. So ist die Bindungsaffinität von ET-1 an den Endothelin-A-Rezeptor zehnmal höher als die von ET-3 [211] und relativ spezifisch [212]. Der Rezeptor vermittelt durch eine Phosphokinase-C stimulierende Reaktion mit konsekutiver Erhöhung des intrazellulären Calciums die Vasokonstriktion (Abbildung 46, Seite 113) [213]. Im Gegensatz zu den Endothelin-A-Rezeptoren, die in hoher Anzahl auf glatten Gefäßmuskelzellen vorkommen, sind Endothelin-B-Rezeptoren auf Endothelzellen dominant [214]. Es besteht eine geringe und vergleichbare Bindungsaffinität zu ET-1, ET-2 und ET-3 [215]. Der Endothelin-C-Rezeptor bindet überwiegend ET-3 [216].



**Abb. 46:** Schema der ET-1 vermittelten Kontraktion der glatten Muskelzellen.

Aufgrund des Vorkommens von ET-1 (Endothelien und glatte Gefäßmuskelzellen) und der Erhöhung von ET-1 bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [97-99] wurde zur Überprüfung der Hypothese einer Subgruppe (Gruppe VIc) der Interventionsstudie ET-1 appliziert. Eine weitere Subgruppe (Gruppe VIId) erhielt entsprechend den selektiven Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 (s. Kap. 2.1.6.3., Seite 35). Die bisherigen Studien an Colitis-Modellen wurden hingegen ausschließlich mit einem nicht-selektiven ET-Rezeptor-Antagonisten (Ro 47-0203 (Bosentan) bzw. Ro 48-5695) durchgeführt [174-176, 217, 218]. Erfahrungen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen liegen nicht vor.

Gemäß den Mitteilungen in der Literatur erfolgte die Dosierung (50 mg/kg KG) und die Applikation (in Form eines i.v. Bolus) des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 [110, 113, 114, 123].

#### 4.3.2.3.4.3. Selektiver COX-2-Inhibitor NS-398

Die membranständige Cyclooxygenase (COX) ist das Schlüsselenzym in der Synthese von Prostaglandinen, so dass die Inhibierung dieses Enzyms der entscheidende Wirkmechanismus von Aspirin (Acetylsalicylsäure) und anderen nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR) ist. Es gibt 2 Isoformen der Cyclooxygenase, COX-1 und COX-2, die beide die Konvertierung der Arachidonsäure in  $\text{PGH}_2$ , einem Vorläufer der unter dem Begriff Eicosanoide subsumierten proinflammatorischen Prostaglandine ( $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$  (Prostacyclin) und Thromboxan  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ )), katalysieren (Abbildung 47, Seite 114) [219, 220]. Die Prostaglandine haben vielfältige Funktionen, so wirken sie am Magen zytoprotektiv [221], sie sind an der Aufrechterhaltung der renalen Integrität sowie an der Hämostase beteiligt [222-224] und schließlich sind sie wesentlich in das Entzündungsgeschehen involviert [225-227].

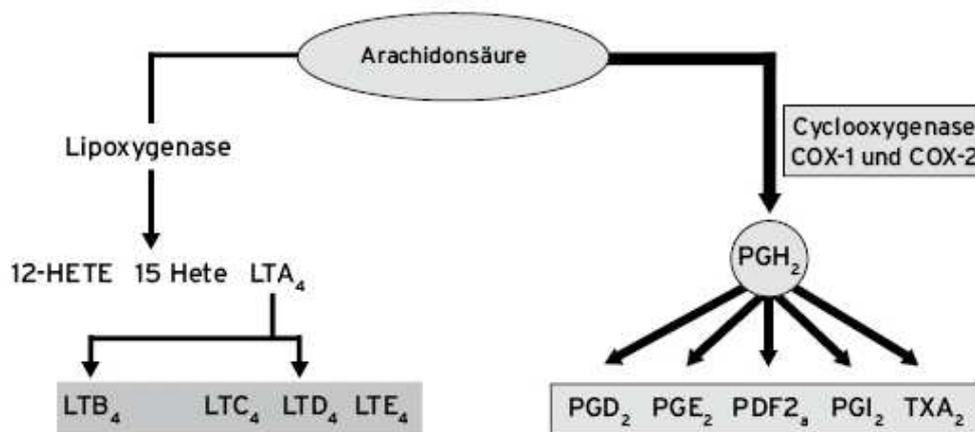


Abb. 47: Biosynthese der Eicosanoide.

Das Vorkommen beider Isoformen der Cyclooxygenase ist sehr verschieden, so wird die COX-1 in fast allen Zellen exprimiert, wohingegen es sich bei der COX-2 um ein hochgradig reguliertes, d.h. unter physiologischen Bedingungen (meist) fehlendes, bei Stress und Entzündung jedoch innerhalb von Stunden exprimiertes Enzym handelt [228-231].

Sowohl Aspirin als auch NSAR wirken nicht selektiv auf eine der Isoformen (COX-1 bzw. COX-2), allerdings gibt es unter den verschiedenen NSAR bezüglich Potenz und Spezifität der COX-2-Inhibition große Unterschiede [232]. Daher wurden spezifische COX-2-Inhibitoren entwickelt, um einerseits die unerwünschten Nebenwirkungen der NSAR, z.B. auf die Magenschleimhaut, zu verringern und um andererseits deren antiinflammatorische Wirkung zu nutzen. Needleman und Mitarbeiter synthetisierten die Verbindung SC-58125, den Prototyp des Celecoxib, die COX-2 im Vergleich zu COX-1 1000-fach stärker inhibiert [231]. Eine ebenfalls 1000-fach höhere Selektivität für COX-2 gegenüber COX-1 wurde für die Verbindung L-745,337 nachgewiesen [233]. Möglicherweise ist eine differierende COX-2/COX-1-Inhibierungs-Ratio der einzelnen NSAR und „selektiven“ COX-2-Inhibitoren für die unterschiedlichen Nebenwirkungen verantwortlich und erklärt teilweise die in der Literatur mitgeteilten widersprüchlichen Ergebnisse (s. u.) [230]. Der hier verwendete COX-2-Inhibitor NS-398 wurde erstmals von Futaki et al. 1994 beschrieben [234].

Sowohl bei Colitis-Modellen als auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte eine Erhöhung von Prostaglandinen (PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>) und anderen Eicosanoiden nachgewiesen werden, die gut mit der Krankheitsaktivität korreliert [103, 235-242], so dass die Manipulation des Arachidonsäure-Stoffwechsels eine therapeutische Implikation darstellt [35]. Zudem wurde bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine erhöhte Expression von COX-2 festgestellt [243, 244]. Allerdings ist die Rolle der NSAR und der selektiven COX-2-Inhibitoren auf die Modulation nach dem heutigen Stand der Forschung nicht eindeutig und wird kontrovers diskutiert [122]. So gibt es sowohl tierexperimentelle Arbeiten als auch klinische Studien, die über einen positiven Effekt der COX-2-Inhibierung auf die Colitis-Aktivität berichten [122, 185, 245, 246] und andere, die diesen nicht nachweisen konnten [242, 247-250].

Auch hier (Gruppe VIe) (s. Kap. 2.1.6.3., Seite 35) erfolgte die Dosierung (10 mg/kg KG) und die Applikationsform (i.v. Bolus) des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 in Anlehnung an die Literatur [116-119].

#### **4.3.2.3.5. Ergebnisse**

Sämtliche Experimente der Interventionsstudie konnten, wie im Versuchsplan vorgesehen, durchgeführt werden. Kein Tier verstarb im Rahmen der Induktion bzw. während der Applikation der Testsubstanzen. Wie bereits bei der Colitis-Induktionsstudie wurden auch hier die kardiorespiratorischen Parameter erfasst, um systemische Ursachen für etwaige Veränderungen der Mikrozirkulation auszuschließen. Neben der kontinuierlichen Erfassung des Blutdrucks erfolgte vor Beginn und unmittelbar nach Abschluss der Intravitalmikroskopie eine arterielle Blutgasanalyse. Sämtliche Tiere der 5 Gruppen (VIa-e) waren gemäß den Ausschlusskriterien (s. Kap. 2.1.8., Seite 38) im Verlauf des Versuchs kardiorespiratorisch stabil. Allerdings mussten 3 Tiere von der Auswertung ausgeschlossen werden, da es bei ihnen nicht zur erwünschten Expression der Colitis (Score <5) kam.

##### **4.3.2.3.5.1. Kontrollgruppe (VIa)**

Der kapilläre Blutfluss der (gesunden) Kontrolltiere ist mit 2.25 nl/cap/min im Vergleich zu dem der Tiere der Pilotstudie bzw. der Colitis-Induktionsstudie (2.64 nl/cap/min) deutlich geringer. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bei den vorangegangenen Versuchen immer mehrere Darmabschnitte in randomisierter Reihenfolge untersucht wurden, so dass es hier zu einem größeren Blutverlust im Vergleich zu den Tieren der Interventionsstudie kam. Die damit verbundene Absenkung des HTK kann mit einem gesteigerten kapillären Blutfluss einhergehen [251]. Ebenso wurden die weiteren Parameter der Mikrozirkulation (funktionelle Kapillardichte, Gefäßpermeabilität und Leukozytensticking) erstmals im Bereich der Endstrombahn des Rattenkolons charakterisiert, so dass hier keine Vergleichswerte aus der Literatur vorliegen. Es fällt allerdings auf, dass der perivaskuläre Grauwert nur noch 79% des Ausgangswertes beträgt. Dies lässt sich durch den onkotischen Druck erklären, den das FITC-Dextran (Molekularmasse 70.000 Da) ausübt und der dazu führt, dass Wasser aus dem Interstitium (dritter Raum) ins Gefäß diffundiert. Die sich daraus ergebene Steigerung der Konzentration im dritten Raum erklärt die Abnahme des Grauwertes (abnehmende Helligkeit). Das gesunde Endothel besitzt somit keine (wesentliche) Permeabilität für Dextrane dieser Größenordnung, wohl aber kommt es zu einem Flüssigkeitsshift aus dem Interstitium ins Gefäßsystem. Dies begründet nebenbei bemerkt den Einsatz kolloidaler Lösungen in der Behandlung des (hämorrhagischen) Schocks. Ein Leukozytensticking ist bei gesunden Tieren quasi nicht nachweisbar. Die

Tiere nehmen erwartungsgemäß an Gewicht zu, der Stuhl ist fest und geformt, der HTK beträgt knapp 46%.

#### **4.3.2.3.5.2. Colitisgruppe (VIb)**

Entsprechend den Ergebnissen der Colitis-Induktionsstudie kommt es auch 48 Stunden nach Colitis-Induktion makroskopisch und histologisch zu einer schweren akuten Colitis, die mit einer gegenüber der Kontrollgruppe (VIa) signifikanten Reduktion des kapillären Blutflusses einhergeht. Signifikante Änderungen finden sich auch bei den übrigen Parametern der Mikrozirkulation, wobei die funktionelle Kapillardichte reduziert ist und die Gefäßpermeabilität sowie das Leukozytensticking gesteigert sind. Insgesamt wird so die Schwere der Erkrankung durch die Mikrozirkulationsparameter eindrucksvoll repräsentiert (s. Kap. 4.3.2.3.3., Seite 109). Diese spiegelt sich auch in den signifikanten Abweichungen der klinischen Parameter wider. Durch den Flüssigkeitsshift in den dritten Raum kommt es zu einer Steigerung des Hämatokrits und zu einer Abnahme der Diurese. Weiter nehmen die Tiere stark an Gewicht ab und fallen durch das Auftreten von Diarrhoe auf.

#### **4.3.2.3.5.3. Endothelgruppe (Gruppe VIc)**

Auch in dieser Gruppe (VIc) kommt es zur Expression einer schweren akuten Colitis, die sich histologisch nicht von der Colitisgruppe (VIb) unterscheidet. Die Gabe von Endothelin-1 (ET-1) führt nach der oben aufgestellten Hypothese zu einer Verschlechterung der Erkrankung (s. Kap. 4.3.2.3., Seite 106), wie dies bei experimenteller Pankreatitis gezeigt werden konnte [252, 253]. In dieser Studie bewirkte die Applikation von ET-1 allerdings weder bei den Parametern der Mikrozirkulation noch bei den klinischen Parametern eine signifikante Zunahme der Erkrankungsschwere. Zwischen der Colitisgruppe (VIb) und der Endothelgruppe (VIc) bestehen bei keinem Zielparameter signifikante Unterschiede. Möglicherweise sind bereits alle Rezeptoren durch endogenes ET-1, welches im Verlauf der schweren Colitis freigesetzt wird [97-99], besetzt, so dass die zusätzliche Gabe von ET-1 keinen weiteren Effekt auf die Erkrankungsschwere hat [110].

#### 4.3.2.3.5.4. Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (VId)

Eine schwere akute Colitis findet sich auch in dieser Gruppe (VId), histologisch zeigt sich kein Unterschied zur Colitisgruppe (VIb). Durch die Gabe des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 kommt es jedoch im Vergleich zur Colitisgruppe (VIb) zu einer signifikanten Verbesserung des kapillären Blutflusses, wenn auch nicht das Ausgangsniveau der Kontrollgruppe (VIa) erreicht wird. Daneben lässt sich eine signifikante Verbesserung der weiteren Mikrozirkulationsparameter (funktionelle Kapillardichte, Gefäßpermeabilität und Leukozytensticking) nachweisen, was auf eine deutliche Reduktion der Erkrankungsschwere hinweist (s. Kap. 4.3.2.3.3., Seite 109). Eine Verbesserung des kapillären Blutflusses sowie eine Erhöhung der funktionellen Kapillardichte nach Gabe von LU-135252 wurde bereits am Modell der akuten Pankreatitis beschrieben [110, 113, 123]. Parallel dazu findet sich eine signifikante Besserung der klinischen Parameter. Insbesondere fällt hier der selbst gegenüber der Kontrollgruppe (VIa) signifikant erniedrigte HTK auf, wobei zudem noch eine gesteigerte Diurese nachweisbar ist. Dies dürfte zum einen auf die deutliche Normalisierung der Gefäßpermeabilität, Reduktion des „Capillary Leakage“, zurückzuführen sein, so dass der Flüssigkeitsverlust von intravasal in den dritten Raum vermindert wird, wobei der eigentliche Wirkmechanismus von ET-1 bzw. seines Antagonisten auf die Gefäßpermeabilität unklar ist [110, 113, 123, 197]. Zum anderen aber auch auf die direkte Wirkung von ET-1 auf die Nierenfunktion. So konnte gezeigt werden, dass ET-1 die Wasserausscheidung reduziert [254]. Somit führt die Gabe des Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 zu einer gesteigerten Diurese. In der Literatur wird daher auch ein therapeutischer Einsatz von ET-Rezeptor-Antagonisten bei Nierenversagen diskutiert [255]. Alle Studien, die den Einsatz der nicht-selektiven ET-Rezeptor-Antagonisten Ro 47-0203 (Bosentan) bzw. Ro 48-5695 untersucht haben, berichten über eine Besserung der TNBS-Colitis [174-176, 217, 218]. In einer dieser Arbeiten wurde neben Bosentan auch der ET-A-Rezeptor-Antagonist BQ-485 sowie der ET-B-Rezeptor-Antagonist BQ-788 eingesetzt. In der Studie wurde der Blutfluss im Bereich der A. mesenterica inferior sonographisch bestimmt. Dieser war an den Tagen 1, 3 und 5 nach der Induktion signifikant reduziert ( $p < 0.05$  bzw.  $p < 0.01$ ). Eine signifikante Verbesserung des Blutflusses konnte bei den Gruppen erzielt werden, die Bosentan oder den ET-A-Rezeptor-Antagonisten erhielten ( $p < 0.05$  bzw.  $p < 0.01$ ). Bei diesen Gruppen war auch das Ausmaß der Entzündung, welches mittels eines makroskopischen und eines mikroskopischen

Scores bestimmt wurde, signifikant geringer ( $p < 0.05$  bzw.  $p < 0.01$ ) und somit der Verlauf der TNBS-Colitis günstiger. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass ET-A-Rezeptoren, nicht jedoch ET-B-Rezeptoren, eine bedeutende Rolle im Entzündungsprozess der TNBS-Colitis spielen und dass die gestörte Mikrozirkulation für die Ausprägung des Gewebeschadens bedeutsam ist [217]. Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den hier beschriebenen.

#### **4.3.2.3.5.5. COX-2-Gruppe (VIe)**

Histologisch findet sich auch hier (Gruppe VIe) das Bild einer schweren akuten Colitis, die sich von der Colitisgruppe (VIb) nicht unterscheidet. Die Applikation des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 führt zu einer signifikanten Steigerung des kapillären Blutflusses im Vergleich zur Colitisgruppe (VIb). Allerdings bestehen nicht nur zur Kontrollgruppe (VIa), sondern auch zur ET-RA-Gruppe (VIId), die einen deutlich besseren Fluss aufweist, signifikante Unterschiede. Das gleiche gilt entsprechend für die funktionelle Kapillardichte und für die Gefäßpermeabilität. Interessanterweise findet sich beim Leukozytensticking zwar eine signifikante Abnahme gegenüber der Colitisgruppe (VIb) bzw. eine signifikante Zunahme gegenüber der Kontrollgruppe (VIa), allerdings gibt es hier keinen Unterschied zur ET-RA-Gruppe (VIId). Dass COX-Inhibitoren einen Effekt auf die Leukozytenfunktion haben, konnte bei in vitro Versuchen an Hirngewebe nachgewiesen werden. So kommt es nach Gabe von Indomethacin zu einer signifikanten Reduktion der Neutrophilen-Adhäsion [124]. Wenngleich direkte intravitalmikroskopische Untersuchungen der Mikrozirkulation nach Zufuhr eines COX-Inhibitors bislang ausstehen, so werden die hier erhobenen Befunde dennoch durch eine weitere Studie unterstützt, die an einem in vitro Modell der Blut-Hirn-Schranke zeigen konnte, dass NS-398 die Permeabilität signifikant reduziert [256]. Daneben ist bei sämtlichen klinischen Zielparametern eine signifikante Besserung gegenüber der Colitisgruppe (VIb) zu verzeichnen. Verglichen mit der ET-RA-Gruppe (VIId) bestehen allerdings beim HTK und bei der Diurese signifikante Unterschiede. Dies dürfte zumindest teilweise auf die signifikant geringere Wirkung von NS-398 im Vergleich zu LU-135252 auf die Gefäßpermeabilität zurückzuführen sein, so dass hier ein ausgeprägteres „Capillary Leakage“ mit entsprechendem Flüssigkeitsshift in den dritten Raum besteht. Zusammengefasst kommt es jedoch auch nach Gabe des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 zu einer deutlichen Besserung der Colitis. Über den Effekt von COX-2-Inhibitoren

auf die Aktivität der experimentellen Colitis gibt es in der Literatur sehr widersprüchliche Angaben. So wird neben positiven Wirkungen [122, 245, 246, 257] und fehlender Bedeutung [248] auch über eine Progression der Colitis berichtet [247].

#### **4.3.2.3.5.6. Gruppenvergleich (VIa-e)**

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (VIa) kommt es bei allen Gruppen (VIb-e) zur Ausbildung einer schweren floriden Colitis. Obwohl sich die Gruppen in den Zielparametern teilweise signifikant unterscheiden, besteht hinsichtlich des histologischen Bildes Uniformität (s. Abbildung 30, Seite 72). Dies überrascht nach den Erkenntnissen der Colitis-Induktionsstudie nicht, sondern unterstützt vielmehr die Hypothese, dass die funktionellen den morphologischen Veränderungen vorausgehen (s. Kap. 4.3.2.2.4., Seite 106). Die Bestimmung der Colitis-Aktivität mittels Score's diente somit vorwiegend der „Qualitätssicherung“, um einen Gruppenvergleich zu ermöglichen (s. Kap. 3.3.9., Seite 70 und Kap. 4.3.1.2.2., Seite 96).

In der Colitisgruppe (VIb) kommt es 48 Stunden nach Induktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (VIa) zu einer signifikanten Abnahme des kapillären Blutflusses, der sich auch durch die Gabe von Endothelin-1 (Gruppe VIc) nicht weiter reduzieren lässt. Da Endothelin-1 sowohl die Pankreas- als auch die Kolonperfusion potent herabsetzen kann [258, 259] und da bei TNBS-Colitis erhöhte Endothelin-Spiegel nachweisbar sind [260], ist anzunehmen, dass sämtliche Endothelin-Rezeptoren bereits besetzt sind, so dass exogenes Endothelin keinen verstärkenden Einfluss mehr ausüben vermag. Dafür spricht ebenfalls, dass es bei den übrigen Zielparametern keine Unterschiede zwischen den Gruppen (VIb) und (VIc) gibt.

Im Vergleich zur Colitisgruppe (VIb) kommt es bei der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (VIId) und bei der COX-2-Inhibitor-Gruppe (VIe) zu einer signifikanten Besserung des kapillären Blutflusses, der weiteren Mikrozirkulationsparameter (funktionelle Kapillardichte, Gefäßpermeabilität und Leukozytensticking) sowie der klinischen Parameter (HTK, Gewichtsverlauf, Urinausscheidung und Stuhlqualität). Das Ausgangsniveau der Kontrollgruppe (VIa) wird allerdings nicht erreicht.

Zwischen der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten-Gruppe (VI<sub>d</sub>) und der COX-2-Inhibitor-Gruppe (VI<sub>e</sub>) besteht bei nahezu allen Parametern der Mikrozirkulation sowie beim HTK und bei der Diurese ein signifikanter Unterschied zugunsten der Gruppe VI<sub>d</sub>. Ausgenommen davon ist allerdings das Leukozytensticking.

Die Interaktion zwischen dem Endothel und den zirkulierenden Leukozyten wird als bedeutender Schritt im pathogenetischen Ablauf der chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen angesehen, wobei diese mit der Entzündungsschwere korreliert [174, 177-180, 190-193]. Eine gesteigerte Leukozyten-Endothel-Interaktion konnte ebenfalls an Colitis-Modellen beobachtet werden [261, 262]. Es wird angenommen, dass es hierdurch zu einer Behinderung des kapillären Blutflusses kommt [183, 194].

Entsprechend dieser Hypothese erfolgte die Auswahl der hier verwendeten Substanzen. So wird Endothelin eine Steigerung und den COX-2-Inhibitoren eine Reduktion der Leukozyten-Endothel-Interaktion zugeschrieben [122, 124, 174, 181, 182]. Eine Steigerung des Leukozytenstickings konnte hier nach Gabe von Endothelin (Gruppe VI<sub>c</sub>) wegen der postulierten (endogenen) Rezeptorblockade zwar nicht nachgewiesen werden, die Applikation des selektiven Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 (Gruppe VI<sub>d</sub>) führte jedoch zu einer signifikanten Abnahme. Einen entsprechenden Befund fanden auch Anthoni et al. bei ihren Studien am DSS-Colitis-Modell der Maus (s. Tabelle 34, Seite 95). Hier führte die Applikation des ET-RA Bosentan (Ro 47-0203) zu einer reduzierten Adhäsion von Leukozyten an submukösen Venen des Kolons und zu einer Reduktion der Inflammation [218]. Im Einklang mit der Literatur steht ebenso das Ergebnis nach Gabe des selektiven COX-2-Inhibitors NS-398 (Gruppe VI<sub>e</sub>), auch hier kommt es zur signifikanten Reduktion des Leukozytenstickings [122, 124]. Die signifikante Verbesserung des kapillären Blutflusses in dieser Gruppe (VI<sub>e</sub>) bestätigt zudem die oben genannte Hypothese der Kompromittierung des kapillären Blutflusses durch die gesteigerte Leukozyten-Endothel-Interaktion [183, 194].

In beiden Gruppen (VI<sub>d</sub> und VI<sub>e</sub>) kommt es zu einer signifikanten Besserung der Gefäßpermeabilität im Vergleich zur Colitisgruppe (VI<sub>b</sub>). Somit wird der Zusammenhang zwischen Leukozyten-Endothel-Interaktion und Gefäßpermeabilität bestätigt (s. Kap. 4.3.2.3.3., Seite 109), wonach die adhärenen Leukozyten zu Alterationen des

Endothels führen, die schließlich für das „Capillary Leakage“ mitverantwortlich sind [49, 178, 195-197, 263]. Die Verbesserung des „Capillary Leakage“ durch LU-135252 bzw. NS-398 führt zur Erhöhung des intravasalen Volumens und manifestiert sich in einem erniedrigten HTK.

Da der Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist LU-135252 (Gruppe VI<sub>d</sub>) dem COX-2-Inhibitor NS-398 (Gruppe VI<sub>e</sub>) in der Besserung der Colitis in allen Mikrozirkulationsparametern, mit Ausnahme des Leukozytenstickings, signifikant überlegen ist, kann somit nicht nur eine über eine verbesserte Leukozyten–Endothel–Interaktion vermittelte Reaktion zu Grunde liegen – vielmehr muss es einen weiteren Pathway geben. Es ist daher von einer direkten Wirkung des vasoaktiven Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten auf den kapillären Blutfluss auszugehen. Die nachgewiesene signifikante Verbesserung der funktionellen Kapillardichte und der Gefäßpermeabilität sowohl gegenüber der Colitisgruppe (VI<sub>b</sub>) als auch gegenüber der COX-2-Gruppe (VI<sub>e</sub>) bedeutet letztlich eine geringere Entzündungsaktivität, die sich auch in den klinischen Parametern widerspiegelt (s. Kap. 4.3.2.3.3., Seite 109).

Die Verbesserung des kapillären Blutflusses in der frühen Phase der Colitis führt somit zu einem milderem Krankheitsverlauf und unterstreicht damit die pathogenetische Bedeutung der Mikrozirkulation für die Progression der Colitis.

#### **4.3.2.3.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen aus der Interventionsstudie**

In dieser Studie wurde am TNBS-Colitis-Modell der Ratte die Hypothese der pathogenetischen Bedeutung einer gestörten Mikrozirkulation für die Colitis-Aktivität überprüft. Dazu wurden die Substanzen Endothelin-1, der selektive Endothelin-A-Rezeptor-Antagonist LU-135252 sowie der selektive COX-2-Inhibitor NS-398 appliziert. Neben diesen 3 Gruppen (VI<sub>c-e</sub>) gab es eine Kontrollgruppe (VI<sub>a</sub>, gesunde Tiere) und eine Colitisgruppe (VI<sub>b</sub>, unbehandelte Tiere). Zielparameter in dieser Studie waren neben dem kapillären Blutfluss auch die funktionelle Kapillardichte, die Gefäßpermeabilität und das Leukozytensticking. Neben diesen Parametern der Mikrozirkulation wurden überdies klinische Parameter zur Beurteilung der Krankheitsaktivität erfasst. Dazu gehörten der Hämatokrit, der Gewichtsverlauf, die Urinausscheidung und die Qualität des Faeces. Um systemische Ursachen für eine Störung der Mikrozirkulation auszuschließen, erfolgten eine kontinuierliche Blutdruckmessung sowie arterielle Blutgasanalysen. Zur Dokumentation

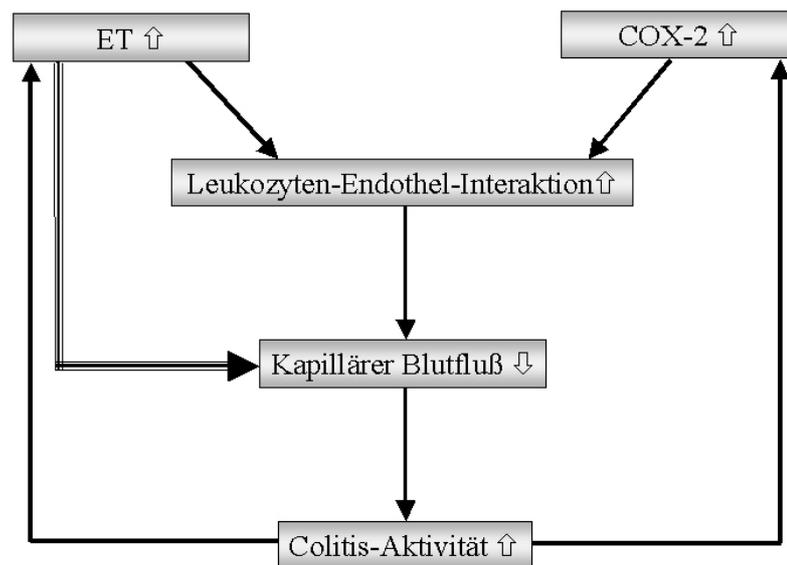
der Colitis-Expression wurden die histopathologischen Veränderungen mittels eines Colitis-Score's quantifiziert.

Es finden sich folgende Befunde: (1) Neben einer signifikanten Reduktion des kapillären Blutflusses ist die Akutphase der TNBS-Colitis durch eine verminderte funktionelle Kapillardichte sowie durch eine signifikante Steigerung der Kapillarpermeabilität und des Leukozytenstickings in der Mukosa gekennzeichnet. Daneben kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des Hämatokrits und zur signifikanten Abnahme der Diurese und des Gewichts. (2) Die exogene Zufuhr von Endothelin-1 bewirkt keine Änderung dieser Befunde. (3) Die Applikation des selektiven Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 führt zu einer signifikanten Besserung sämtlicher Mikrozirkulationsparameter sowie auch der klinischen Befunde gegenüber der Colitisgruppe. (4) Die Gabe des selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 hat denselben Effekt, wenn auch nicht so ausgeprägt. (5) Beide Gruppen unterscheiden sich, abgesehen vom Leukozytensticking und vom Gewichtsverlauf, signifikant voneinander.

Aus dieser Studie lassen sich folgende Schlüsse ziehen: (1) Die akute TNBS-Colitis ist durch eine umfassende Störung der Mikrozirkulation verbunden mit Zeichen des SIRS gekennzeichnet. (2) Die exogene Zufuhr von Endothelin-1 führt nicht zur erwarteten Aggravation dieser Störungen, da in dieser floriden Entzündungsphase vermutlich eine Blockierung der Endothelin-A-Rezeptoren durch endogenes Endothelin-1 vorliegt. (3) Durch Blockade der Endothelin-A-Rezeptoren mit einem Antagonisten lassen sich diese Alterationen signifikant verbessern. (4) Ebenso bewirkt die Inhibierung der Cyclooxygenase-2 eine signifikante Besserung dieser Störungen. (5) Der hemmende Einfluss beider Substanzen auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion scheint hierbei eine Rolle zu spielen. (6) Da die Endothelin-A-Rezeptoren-Blockade allerdings signifikant effektiver ist, muss ein weiterer Mechanismus im Sinne einer direkten Wirkung auf den kapillären Blutfluss vorliegen. (7) Folglich unterstreichen diese Ergebnisse die pathogenetische Bedeutung der Mikrozirkulation für die Progression der Colitis.

#### 4.3.2.3.7. Hypothese aus der Interventionsstudie

Die Ergebnisse weisen auf 2 unterschiedliche Wege der Beeinflussung des kapillären Blutflusses hin. Dabei scheint dieser zum einen von der Leukozyten–Endothel–Interaktion, zum anderen direkt vom Endothelinsystem abhängig zu sein. Der gestörte kapilläre Blutfluss wiederum führt zu einer gesteigerten Colitis-Aktivität, die ihrerseits mit einer erhöhten Endothelin-1 und Cyclooxygenase-2-Produktion einhergeht. Beide Substanzen haben eine gesteigerte Leukozyten–Endothel–Interaktion zur Folge, wobei Endothelin den kapillären Blutfluss noch zusätzlich direkt kompromittiert. Dies ist nach den Ergebnissen der entscheidende Reaktionsweg. Alles in allem kommt es zu einem Circulus vitiosus (Abbildung 48, Seite 124).



**Abb. 48:** Circulus vitiosus entsprechend der Hypothese aus den Ergebnissen der Interventionsstudie.

#### 4.4. Krankengut

Die Ergebnisse der Interventionsstudie führten zu der Hypothese, dass Endothelin über die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation eine wesentliche Rolle bei der Progression der Colitis spielt.

Von verschiedenen Autoren wurde ein Zusammenhang zwischen Endothelin und dem Auftreten einer Vasculitis beschrieben. So sei Endothelin-1 bei verschiedenen (inflammatorischen) Gefäßveränderungen, z.B. der pulmonalen Hypertension, bei der Restenosierung nach Angioplastie, im Rahmen der koronaren Herzkrankheit, bei der Glomerulonephritis und eben auch bei der Vasculitis involviert [264, 265]. Es wird angenommen, dass verschiedene pro-inflammatorische Zytokine (z.B. TNF $\alpha$ , Interleukin I $\beta$ ) die Produktion von Endothelin-1 induzieren. Endothelin-1 wiederum triggert schließlich die Ausbildung einer Vasculitis [266-271].

Nach der oben genannten Hypothese führt Endothelin-1 zu einer erhöhten Colitis-Aktivität, die ihrerseits mit einer Erhöhung des Endothelins einhergeht [99]. Da Endothelin zu einer Vasculitis führt, müsste diese somit bei Patienten mit aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung nachweisbar sein.

Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgten daher immunhistologische Untersuchungen am eigenen Krankengut des Zeitraums 2002-2005. Da die Colitis-Aktivität in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle spielt, wurde der Entzündungsgrad mit Hilfe eines etablierten Score's determiniert. Daher wurde neben der Frage, wie häufig eine Vasculitis bei gezieltem Screening bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachweisbar ist, insbesondere die Frage untersucht, ob dieses Auftreten im Zusammenhang mit dem Entzündungsgrad steht und wo die Vasculitis nachweisbar ist.

Um die Vasculitis nachzuweisen, wurden immunhistologische Färbungen mit dem Endothelzellmarker CD31 und dem Pan-T-Zellmarker CD3 durchgeführt. Beim Morbus Crohn (n=56) ist bei einem mittleren Entzündungsgrad von  $2.3 \pm 1.0$  (Score) in 32% eine Vasculitis nachweisbar. Bei der Colitis ulcerosa (n=43) ist dies bei einem mittleren Entzündungsgrad von  $3.0 \pm 0.8$  (Score) in 49% der Fall. Dabei fällt auf, dass die Vasculitis nur in den entzündlich alterierten Darmwandschichten auftritt. Sowohl beim Morbus Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa besteht eine eindeutige Beziehung zum Entzündungsgrad. Eine Vasculitis kommt in den milden Entzündungsstadien (Grad „0-2“) bei beiden Erkrankungen nicht vor. Erst ab Grad „3“ des verwendeten Score's ist eine

Vasculitis beim Morbus Crohn in 82% und bei der Colitis ulcerosa in 57% nachweisbar. Bei schwerer Entzündung, entsprechend Grad „4“, ist dies bei beiden Erkrankungen zu 100% der Fall.

Obwohl Warren und Sommers schon vor knapp 60 Jahren die lokale Vasculitis bei Colitis ulcerosa beschrieben haben [54], gibt es bislang nur wenige Studien, die auf das Vorkommen einer Vasculitis fokussieren. Auffallend ist, dass mit einer Ausnahme sämtliche Arbeiten ausschließlich den Morbus Crohn betreffen. Die erste Arbeit in dieser Reihe stammt von Knutson et al. aus dem Jahre 1968. Sie beschrieben bei 5 von 11 Patienten mit Morbus Crohn eine granulomatöse Vasculitis [61]. 1983 untersuchten Geller und Cohen bei 70 Morbus Crohn-Patienten das Vorkommen von Entzündungszellen in der Wand von Arterien und Arteriolen. Sie fanden bei mehr als 20% der Fälle entsprechende Veränderungen, allerdings schlossen sie in ihrer Arbeit Gefäße in deutlich veränderten Regionen aus [272]. Die Arbeitsgruppe um Wakefield publizierte 1991 eine Studie mit dem Titel „granulomatous vasculitis in Crohn’s disease“. Die Arbeit untersuchte an 24 Morbus Crohn-Resektaten, ob die Granulome vasculärer Herkunft seien. Bei 15 Patienten (62.5%) fanden sich insgesamt 485 Granulome, von denen 85% direkt mit Gefäßveränderungen assoziiert waren. Derartige Veränderungen wurden im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen auch in Arealen gefunden, wo keine Ulceration der Mukosa vorlag. Die Autoren schlossen aus der Beziehung zwischen Gefäßen und der granulomatösen Entzündung, dass die intestinale Mikrovaskularisation ein früher Schritt in der Pathogenese des Morbus Crohn ist [51]. Matson et al. überprüften 1995 diese Hypothese an 30 Gewebeblöcken von 11 Patienten mit Morbus Crohn. Sie analysierten 232 Granulome, nur bei 3 Patienten fanden sie eine signifikante Beziehung, so dass sie der Ansicht waren, dass die Granulome gewöhnlich nicht mit den Blutgefäßen assoziiert sind [273]. Auch bei den eigenen Untersuchungen trat die Vasculitis nur vereinzelt (5.4%) in Zusammenhang mit Granulomen beim Morbus Crohn auf. Die einzige Studie, die in diesem Zusammenhang neben dem Morbus Crohn auch die Colitis ulcerosa untersucht, ist die von Yokoyama et al. aus dem Jahre 2001. Sie untersuchten an 23 Morbus Crohn- und an 20 Colitis ulcerosa-Resektaten, ob der entzündliche Gefäßschaden beim Morbus Crohn eine pathogenetische Rolle spielt. Beim Morbus Crohn fanden sie im Vergleich zur Colitis ulcerosa signifikant häufiger entzündlich veränderte Arterien verbunden mit einer durch Intimaverdickung bedingten Obliteration. Eine granulomatöse Vasculitis lag bei 43,5% der

Morbus Crohn-Resektate vor. Wie auch in den eigenen Untersuchungen korrelierte der Grad der Arteriitis mit der Crohn-Aktivität [274].

#### **4.4.1. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen**

Beide beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen findet sich eine Gefäßbeteiligung in Form einer Vasculitis, deren Ausprägung abhängig vom Entzündungsgrad ist.

Da die Konzentration des für die Vasculitis als ursächlich postulierten Endothelins ebenso mit der Colitis-Aktivität korreliert [99], sind diese Befunde konkludent. Unter Berücksichtigung der tierexperimentellen Ergebnisse, die zeigen, dass Endothelin über die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation eine wesentliche Rolle bei der Progression der Colitis spielt, wird somit die Hypothese von Wakefield et al., dass die Vasculitis zu einer Störung der Mikrozirkulation bei Morbus Crohn führt, gestützt, wenngleich in den eigenen Vorarbeiten multifokale Infarkte nicht nachgewiesen werden konnten [50, 51].

## **5. ZUSAMMENFASSUNG und AUSBLICK**

### **5.1. Hintergrund**

Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, sind trotz zahlreicher neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse ungeklärt, so dass trotz intensiver Forschungsbemühungen ein Durchbruch in der Behandlung weiterhin aussteht. Die Immunologie dieser Erkrankungen wird zwar besser als noch vor Jahren verstanden, so ist bekannt, welche Mediatoren die Entzündungsprozesse triggern und welche Zytokine pro- und welche antiinflammatorisch wirken, zu einer Heilung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hat dies jedoch nicht geführt. Therapieansätze, die auf derartigen Erkenntnissen beruhen, haben ein erhebliches Nebenwirkungsprofil. Da häufig junge Menschen betroffen sind und da der Verlauf beider Erkrankungen chronisch rezidivierend ist, kommt es zu einer steigenden Prävalenz, was die gesamte Situation noch verschärft.

Vor diesem Hintergrund wird intensiv nach Alternativen gesucht, um erweiterte, verbesserte oder neue Therapieoptionen bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu etablieren. Letztlich steht aber eine kausale Therapie bislang aus, da die Ätio-Pathogenese dieser Erkrankungen noch immer nicht in allen Einzelheiten geklärt ist.

Einen interessanten Ansatzpunkt stellt in diesem Zusammenhang die Mikrozirkulation und deren Einfluss auf den Verlauf der Erkrankungen dar. Aus der Literatur gibt es diesbezüglich zahlreiche Hinweise, die mittels verschiedener Methoden an Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung erhoben wurden. So fielen schon frühzeitig histopathomorphologischen Parallelen zur ischämischen Colitis auf [52]. In den 60er Jahren folgten mehrere angiographische Untersuchungen, die bei beiden Erkrankungen Gefäßalterationen beschrieben [55-58]. Zur detaillierteren Charakterisierung folgten mikroangiographische Studien an Operationspräparaten, die zu kontroversen Ergebnissen führten [62-65]. Daneben wurden lichtmikroskopische Untersuchungen an Aufhellungspräparaten und rasterelektronenmikroskopische Studien an Korrosionspräparaten durchgeführt, aber auch hier wurden unterschiedliche Hypothesen zur Bedeutung der Mikrozirkulation aufgestellt, so dass in eigenen Vorarbeiten eine systematische Deskription der Angioarchitektur erfolgte [50, 67, 68, 70, 71].

Die eigenen Vorarbeiten machten erneut deutlich, dass es grundsätzlich schwierig ist, von der Morphologie auf die Funktion zu schließen. Aufgrund dieser bekannten Problematik wurde schon frühzeitig mit funktionellen *in vitro* Untersuchungen begonnen [69, 72, 73]. Durch den technischen Fortschritt waren schließlich auch *in vivo* Studien an Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen möglich [74-76]. Zusammengefasst beschrieben diese Arbeiten verschiedene Mikrozirkulationsmuster, ohne deren Bedeutung im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eindeutig definieren zu können.

Weitere klinische Beobachtungen wie das Auftreten eines "Alters-Crohn" [77, 78], eine Abhängigkeit des Verlaufs vom Rauchen [79-88], der positive Effekt der Heparin-Gabe [89-91] sowie der Nachweis signifikant erhöhter Endothelin-Spiegel [97-99] wurden mit einer pathogenetischen Bedeutung der Mikrozirkulation in Zusammenhang gebracht.

Diese Übersicht zeigt, dass der Stellenwert der Mikrozirkulation im Rahmen der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nach wie vor unklar ist. Dies hat vor allem zwei Gründe. Zum einen ist die Intravitalmikroskopie, die den Goldstandard für Untersuchungen der Mikrozirkulation darstellt, am menschlichen Darm aus methodischen Gründen nicht verfügbar und abgesehen davon würde es zum anderen kaum gelingen, die Erkrankung in einem so frühen Stadium zu untersuchen, wie es für die Erforschung zwingend notwendig wäre. Daher sind Tiermodelle zur Beantwortung diesbezüglicher Fragen und zur Evaluation neuer entsprechender Therapieansätze unverzichtbar.

Zur systematischen Charakterisierung der Mikrozirkulation am Kolon gab es zu Studienbeginn kein etabliertes Tiermodell. Nach den diesbezüglichen Mitteilungen in der Literatur war zunächst vielmehr fraglich, ob derartige Studien am Colitis-Darm überhaupt möglich sind [101], so dass zunächst in einer Pilotstudie die Technik der Intravitalmikroskopie am Kolon der Ratte etabliert werden musste.

## **5.2. Zielsetzung der Pilotstudie (Gruppen Ia-f)**

Ziel der Pilotstudie war die Entwicklung einer Technik zur intravitalmikroskopischen Untersuchung am gesunden Darm der Ratte und die Charakterisierung der Mikrozirkulation verschiedener Darmabschnitte sowohl im Bereich der Mukosa als auch der Serosa.

## **5.3. Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus der Pilotstudie (Gruppen Ia-f)**

Eine standardisierte Messung der Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie ist serosal und mukosal sowohl am terminalen Ileum als auch am proximalen und distalen Kolon der Ratte möglich.

Zwischen den einzelnen Darmabschnitten bestehen keine signifikanten Unterschiede. Der kapilläre Blutfluss der Mukosa liegt zwischen 2.37 und 2.64 nl/cap/min. Deutlich höher ist dieser dagegen im Bereich der Serosa, hier liegt er zwischen 3.11 und 3.54 nl/cap/min. Aufgrund von Verunreinigungen durch Faeces ist die Messung des serosalen kapillären Blutflusses allerdings technisch wesentlich schwieriger.

Nach erfolglosen Bemühungen am Essigsäure-Colitis-Modell [101] gelang somit in dieser Pilotstudie erstmals die Etablierung der intravitalmikroskopischen Technik für Untersuchungen der Mikrozirkulation im Bereich der Serosa und der Mukosa verschiedener Darmabschnitte der Ratte.

Im nächsten Schritt wurde in einer Colitis-Induktionsstudie überprüft, ob diese Technik auch auf Ratten mit experimenteller Colitis übertragbar ist.

## **5.4. Zielsetzung der Colitis-Induktionsstudie (Gruppen II-V)**

Ziel der Colitis-Induktionsstudie war die Charakterisierung der mukosalen Mikrozirkulation im Bereich des proximalen und des distalen Kolons beim TNBS- und beim Mitomycin C-Colitis-Modell der Ratte im zeitlichen Verlauf. Zur Korrelation mit den histopathologischen Veränderungen war die Entwicklung eines histologischen Colitis-Score's erforderlich.

### **5.5. Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus der Colitis-Induktionsstudie (Gruppen II-V)**

Bei beiden Colitis-Modellen kommt es zu signifikanten Störungen der mukosalen Mikrozirkulation, sowohl im akuten (TNBS-Colitis) als auch im chronischen Stadium (Mitomycin C-Colitis) der Entzündung.

Der kapilläre Blutfluss ist bei der TNBS-Colitis im distalen Kolon nach 24 Stunden mit 2.91 nl/cap/min tendenziell erhöht, nach 3 Tagen mit 1.79 nl/cap/min signifikant erniedrigt und nach 15 Tagen mit 2.45 nl/cap/min nahezu wieder normal. Im Bereich des proximalen Kolons finden sich keine Veränderungen. Histologisch findet sich nach 24 Stunden und auch noch nach 3 Tagen im distalen Kolon eine schwere floride Entzündung. 15 Tage nach Colitis-Induktion findet sich hier eine signifikante Besserung. Das proximale Kolon zeigt nur eine sehr geringe Entzündungsaktivität. Insgesamt ist die Mikrozirkulation wieder normal während die akute Inflammation rückläufig ist.

Bei der Mitomycin C-Colitis ist der kapilläre Blutfluss im proximalen Kolon nach 3 Tagen mit 2.51 nl/cap/min unverändert, nach 7 Tagen kommt es mit 1.53 nl/cap/min zu einer signifikanten Reduktion, die mit 1.19 nl/cap/min nach 6 Wochen noch stärker ausgeprägt ist. Nicht ganz so markant sind die Veränderungen im distalen Abschnitt (3.0, 2.27, 1.83 nl/cap/min). Histologisch entwickelt sich in beiden Darmabschnitten eine chronische Entzündung, wobei die Veränderungen im Bereich des proximalen Kolons im Laufe der Zeit signifikant zunehmen. Somit verschlechtert sich die Mikrozirkulation während die chronische Inflammation konstant bleibt bzw. zunimmt.

Aus dieser Studie lassen sich folgende Schlüsse ziehen: (1) Die Intravitalmikroskopie ist auch am entzündeten Kolon möglich. (2) Das TNBS-Modell entspricht eher dem aktiven und (3) das Mitomycin C-Modell eher dem inaktiven Stadium der Colitis. (4) Der neu entwickelte histologische Colitis-Score ist für die Qualifizierung und Quantifizierung experimenteller Colitiden geeignet.

Die Ergebnisse weisen somit auf die Bedeutung der Mikrozirkulation für den Verlauf der Colitis hin. Die resultierende Hypothese, dass die funktionellen Veränderungen (Mikrozirkulation) den pathomorphologischen (Entzündung) vorangehen, wurde als nächstes in einer Interventionsstudie überprüft.

### **5.6. Zielsetzung der Interventionsstudie (Gruppen VIa-e)**

Ziel der Interventionsstudie war es, die Bedeutung der Mikrozirkulation für Pathogenese und Verlauf der experimentellen Colitis zu evaluieren. Sollte die Hypothese zutreffen, dass die gestörte Mikrozirkulation von pathogenetischer Bedeutung ist, so müsste umgekehrt eine Verbesserung der Mikrozirkulation in der frühen Phase der Colitis einen milderen Krankheitsverlauf zur Folge haben.

### **5.7. Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus der Interventionsstudie (Gruppen VIa-e)**

Die Studie erfolgte am TNBS-Modell 48 Stunden nach der Induktion, also in der frühen akuten Phase der Colitis. Untersucht wurde die Schleimhaut des distalen Kolons. Neben einer Kontrollgruppe (gesunde Tiere) und einer unbehandelten Colitisgruppe gab es 3 weitere Colitisgruppen, denen Prüfsubstanzen appliziert wurden. Zur Überprüfung der Hypothese wurde zum einen Endothelin-1 gewählt, das einen direkten (negativen) Einfluss auf die Mikrozirkulation besitzt, zum anderen (zur Verbesserung der Mikrozirkulation) der entsprechende Antagonist LU-135252, der den Endothelin-A-Rezeptor selektiv zu blockieren vermag. Daneben wurde der selektive COX-2-Inhibitor NS-398 gewählt, da er potentiell auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion einwirkt und somit ebenfalls die Mikrozirkulation (positiv) beeinflusst.

Zielparameter der Mikrozirkulation waren neben dem kapillären Blutfluss die funktionelle Kapillardichte, die Gefäßpermeabilität und das Leukozytensticking. Daneben wurden noch weitere Parameter (Hämatokrit, Gewichtsverlauf, Urinausscheidung und Qualität des Faeces) in Anlehnung an den Crohn's disease activity index [202] zur Beurteilung der Colitis-Aktivität erfasst. Schließlich wurde der Entzündungsgrad unter Verwendung des histologischen Colitis-Score's quantifiziert.

Es fanden sich folgende Befunde: (1) Neben einer signifikanten Reduktion des kapillären Blutflusses ist die Akutphase der TNBS-Colitis durch eine verminderte funktionelle Kapillardichte sowie durch eine signifikante Steigerung der Kapillarpermeabilität und des Leukozytenstickings in der Mukosa gekennzeichnet. Daneben kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des Hämatokrits und zur signifikanten Abnahme der Diurese und des Gewichts. (2) Die exogene Zufuhr von Endothelin-1 bewirkt keine Änderung dieser Befunde. (3) Die Applikation des selektiven Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten

LU-135252 führt zu einer signifikanten Besserung sämtlicher Mikrozirkulationsparameter sowie auch der klinischen Befunde gegenüber der Colitisgruppe. (4) Die Gabe des selektiven COX-2-Inhibitor NS-398 hat denselben Effekt, wenn auch nicht so ausgeprägt. (5) Beide Gruppen unterscheiden sich, abgesehen vom Leukozytensticking und vom Gewichtsverlauf, signifikant voneinander. (6) Histopathologische Unterschiede zwischen den einzelnen Colitisgruppen bestehen nicht.

Aus dieser Studie lassen sich folgende Schlüsse ziehen: (1) Die akute TNBS-Colitis ist durch eine umfassende Störung der Mikrozirkulation verbunden mit Zeichen des SIRS gekennzeichnet. (2) Die exogene Zufuhr von Endothelin-1 führt nicht zur erwarteten Aggravation dieser Störungen, da in dieser floriden Entzündungsphase vermutlich eine Blockierung der Endothelin-A-Rezeptoren durch endogenes Endothelin-1 vorliegt. (3) Durch Blockade der Endothelin-A-Rezeptoren mit einem Antagonisten lassen sich diese Alterationen signifikant verbessern. (4) Ebenso bewirkt die Inhibierung der Cyclooxygenase-2 eine signifikante Besserung dieser Störungen. (5) Der hemmende Einfluss beider Substanzen auf die Leukozyten–Endothel–Interaktion scheint hierbei eine Rolle zu spielen. (6) Da die Endothelin-A-Rezeptoren-Blockade allerdings signifikant effektiver ist, muss ein weiterer Mechanismus im Sinne einer direkten Wirkung auf den kapillären Blutfluss vorliegen. (7) Die direkte Verbesserung des kapillären Blutflusses in der frühen Phase der Colitis führt zu einer geringeren Colitis-Aktivität und unterstreicht damit die pathogenetische Bedeutung der Mikrozirkulation für die Progression der Colitis.

## **5.8. Krankengut**

Nach den Ergebnissen der Interventionsstudie ist Endothelin durch Beeinträchtigung der Mikrozirkulation für die Progression der Colitis bedeutsam. Aus der Literatur ist bekannt, dass Endothelin ebenso die Ausbildung einer Vasculitis triggert [266-271]. Daher erfolgten am eigenen Krankengut immunhistologische Untersuchungen mit der Frage, wie häufig eine Vasculitis bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachweisbar ist und ob diese im Zusammenhang mit dem Entzündungsgrad steht. Sowohl beim Morbus Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa lässt sich eine Vasculitis in entzündlich alterierten Darmwandschichten nachweisen, deren Ausprägung vom Entzündungsgrad abhängig ist. Eine Beziehung zu Granulomen beim Morbus Crohn besteht in 5.4%. Da die Konzentration des für die Vasculitis als ursächlich postulierten Endothelins ebenso mit der

Colitis-Aktivität korreliert [99], sind diese Befunde somit konkludent. Unter Berücksichtigung der tierexperimentellen Ergebnisse, die zeigen, dass Endothelin über die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation eine wesentliche Rolle bei der Progression der Colitis spielt, wird somit die Hypothese von Wakefield et al., dass die Vasculitis zu einer Störung der Mikrozirkulation bei Morbus Crohn führt, gestützt, wenngleich in den eigenen Vorarbeiten multifokale Infarkte nicht nachgewiesen werden konnten [50, 51].

## 5.9. Ausblick

Die tierexperimentellen Untersuchungen an Colitis-Modellen der Ratte sowie die Studien an den Operationsresektaten von Patienten mit Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa weisen auf die Bedeutung der Mikrozirkulation für Pathogenese und Verlauf der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hin. Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass durch den Einsatz eines Endothelin-A-Rezeptor-Antagonisten die Mikrozirkulation und der Verlauf der akuten Colitis signifikant verbessert werden. Damit eröffnet sich die Option für einen innovativen therapeutischen Ansatz. Über den therapeutischen Einsatz von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten bei humaner Colitis gibt es in der Literatur bislang keine Mitteilungen. Allerdings gibt es bereits Studien, die über den erfolgreichen Einsatz bei arteriellem Hypertonus [275], bei koronarer Herzkrankheit [276], bei dekompensierter Herzinsuffizienz [277], bei primärem pulmonalen Hypertonus [278, 279] und bei Vasculitis berichten [264]. Dabei wird die oral wirksame Substanz gut vertragen [280, 281]. Diese viel versprechenden klinischen Studien, die Bedeutung von Endothelin in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie die eigenen experimentellen Ergebnisse sprechen für weiterführende Untersuchungen zum Einsatz von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung. Der nächste Schritt wäre somit die klinische Überprüfung in einer Phase I/II-Studie (Verträglichkeit und Dosisfindung) bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Auch andere Autoren sehen mittlerweile im Endothelin-Rezeptor-Antagonisten einen neuen Ansatz in der „supportiven“ Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [218, 282].

Die Etablierung eines Colitis-Modells für intravitalmikroskopische Untersuchungen ermöglicht, neben der Entwicklung und Erprobung neuer Therapieoptionen in der

Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, auch weitergehende Forschungen zur Pathogenese.

Da die Darmschleimhaut besonders sensibel auf eine Beeinträchtigung der Sauerstoffzufuhr reagiert, können somit Störungen der Mikrozirkulation eine Erklärung für die nachgewiesenen Veränderungen der Barrierefunktion sein, die zu einer gesteigerten intestinalen Permeabilität führen. Elektrophysiologische Untersuchungen an Operationspräparaten von Patienten mit Colitis ulcerosa zeigen eine erhöhte Ionenpermeabilität und einen verminderten elektrischen Widerstand [283]. Vergleichbare Ergebnisse fanden sich bei entsprechenden Studien am TNBS-Colitis-Modell [284]. Klinisch entspricht dies den ausgeprägten Diarrhoen der Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung, die teilweise mit erheblichen Elektrolytverlusten einhergehen und zur Exsikkose führen können. Daneben führt die gesteigerte intestinale Permeabilität zur Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen in mesenteriale Lymphknoten und zu dortigen immunologischen Prozessen bzw. sie führt zu systemischen Reaktionen [285-287].

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD (1932) Regional ileitis. A pathologic and clinical entity. *J Am Med Assoc* 99:1323-1329.
2. Moschcowitz E, Wilensky AO (1923) Non-specific granulomata of the intestine. *Am J Med Sci* 166:48-66.
3. Lockhart-Mummery HE, Morson BC (1964) Crohn's Disease of the Large Intestine. *Gut* 5:493-509.
4. 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.
5. Wilks S, Moxon W (1875) *Lectures on pathological anatomy*. 2nd edn., Lindsay & Blakiston, Philadelphia.
6. Allchin WH (1885) Case of acute extensive ulceration of the colon. *Trans Pathol Soc London* 36:199-202.
7. Lennard-Jones JE, Lockhart-Mummery HE, Morson BC (1968) Clinical and pathological differentiation of Crohn's disease and proctocolitis. *Gastroenterology* 54:1162-1170.
8. Geboes K (2001) Crohn's disease, ulcerative colitis or indeterminate colitis--how important is it to differentiate? *Acta Gastroenterol Belg* 64:197-200.
9. Chutkan RK (2001) Inflammatory bowel disease. *Prim Care* 28:539-556, vi.
10. Wexner SD, Rosen L, Lowry A, Roberts PL, Burnstein M, Hicks T, Kerner B, Oliver GC, Robertson HD, Robertson WG, Ross TM, Senatore PJ, Jr., Simmang C, Smith C, Vernava AM, 3rd, Wong WD (1997) Practice parameters for the treatment of mucosal ulcerative colitis--supporting documentation. The Standards Practice Task Force. The American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Dis Colon Rectum* 40:1277-1285.
11. Crohn BB, Rosenberg H (1925) The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). *Am J Med Sci* 170:220.
12. Morson BC, Pang LS (1967) Rectal biopsy as an aid to cancer control in ulcerative colitis. *Gut* 8:423-434.
13. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO (1990) Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323:1228-1233.
14. de Dombal FT, Watts JM, Watkinson G, Goligher JC (1967) Local complications of ulcerative colitis. Stricture, pseudopolyps and cancer of the colon and rectum. *Am J Proctol* 18:198-201.

15. Kewenter J, Ahlman H, Hulten L (1978) Cancer risk in extensive ulcerative colitis. *Ann Surg* 188:824-828.
16. Lennard-Jones JE, Melville DM, Morson BC, Ritchie JK, Williams CB (1990) Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut* 31:800-806.
17. Brostrom O, Lofberg R, Nordenvall B, Ost A, Hellers G (1987) The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. An epidemiologic study. *Scand J Gastroenterol* 22:1193-1199.
18. Prior P, Gyde SN, Macartney JC, Thompson H, Waterhouse JA, Allan RN (1982) Cancer morbidity in ulcerative colitis. *Gut* 23:490-497.
19. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO (1990) Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 336:357-359.
20. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN (1994) Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut* 35:1590-1592.
21. von Roon AC, Reese G, Teare J, Constantinides V, Darzi AW, Tekkis PP (2007) The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 50:839-855.
22. Trallori G, Palli D, Saieva C, Bardazzi G, Bonanomi AG, d'Albasio G, Galli M, Vannozzi G, Milla M, Tarantino O, Renai F, Messori A, Amorosi A, Pacini F, Morettini A (1996) A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92). *Scand J Gastroenterol* 31:892-899.
23. 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.
24. 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.
25. Casati J, Toner BB (2000) Psychosocial aspects of inflammatory bowel disease. *Biomed Pharmacother* 54:388-393.
26. 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.
27. 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.
28. Buchman AL (2001) Side effects of corticosteroid therapy. *J Clin Gastroenterol* 33:289-294.

29. 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.
30. 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.
31. Ekblom 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.
32. 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.
33. 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.
34. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH (1995) Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109:1344-1367.
35. Fiocchi C (1998) Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115:182-205.
36. Strauch UG, Obermeier F, Grunwald N, Gurster S, Dunger N, Schultz M, Griese DP, Mahler M, Scholmerich J, Rath HC (2005) Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. *Gut* 54:1546-1552.
37. Schultz M, Scholmerich J, Rath HC (2003) Rationale for probiotic and antibiotic treatment strategies in inflammatory bowel diseases. *Dig Dis* 21:105-128.
38. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG (2001) Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357:1925-1928.
39. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:599-603.
40. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ (2003) NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 17:1465-1470.

41. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schroder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF (2004) NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53:1658-1664.
42. Mascheretti S, Schreiber S (2005) Genetic testing in Crohn disease: utility in individualizing patient management. *Am J Pharmacogenomics* 5:213-222.
43. Rosenstiel P, Sina C, End C, Renner M, Lyer S, Till A, Hellmig S, Nikolaus S, Folsch UR, Helmke B, Autschbach F, Schirmacher P, Kioschis P, Hafner M, Poustka A, Mollenhauer J, Schreiber S (2007) Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J Immunol* 178:8203-8211.
44. 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.
45. Thayer WR, Jr., Chitnavis V (1994) Inflammatory bowel disease. The case for an infectious etiology. *Med Clin North Am* 78:1233-1247.
46. Dell'Isola B, Poyart C, Goulet O, Mougnot JF, Sadoun-Journo E, Brousse N, Schmitz J, Ricour C, Berche P (1994) Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. *J Infect Dis* 169:449-451.
47. 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.
48. Thompson NP, Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ (1995) Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet* 345:1071-1074.
49. Wakefield AJ, Ekbom A, Dhillon AP, Pittilo RM, Pounder RE (1995) Crohn's disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* 108:911-916.
50. Wakefield AJ, Sawyerr AM, Dhillon AP, Pittilo RM, Rowles PM, Lewis AA, Pounder RE (1989) Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction. *Lancet* 2:1057-1062.
51. Wakefield AJ, Sankey EA, Dhillon AP, Sawyerr AM, More L, Sim R, Pittilo RM, Rowles PM, Hudson M, Lewis AA, et al. (1991) Granulomatous vasculitis in Crohn's disease. *Gastroenterology* 100:1279-1287.
52. Ginzburg L, Oppenheimer GD (1933) Non-specific granulomata of the intestines. *Ann Surg* 98:1046-1062.
53. Marston A, Marcuson RW, Chapman M, Arthur JF (1969) Experimental study of devascularization of the colon. *Gut* 10:121-130.

54. Warren S, Sommers SC (1949) Pathogenesis of ulcerative colitis. *Am J Path* 25:657-674.
55. Dombrowski H, Korb G (1970) [Angiographic findings in regional enteritis (Crohn's disease) and their diagnostic significance]. *Radiologe* 10:17-24.
56. 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.
57. Lunderquist A (1967) Angiography in ulcerative colitis. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 99:18-23.
58. 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.
59. Allen AC (1971) The vascular pathogenesis of enterocolitis of varied etiology. In: Boley SC, Schwartz SS, Williams LF (eds) *Vascular disorders of the intestine*. Butterworths, London, 57-102.
60. Donnellan WL (1966) Early histological changes in ulcerative colitis. A light and electron microscopic study. *Gastroenterology* 50:519-540.
61. Knutson H, Lunderquist A (1968) Vascular changes in Crohn's disease. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 103:380-385.
62. 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.
63. Johansson H, Krause U, Olding L (1972) Microangiographic studies in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Acta Chir Scand* 138:409-414.
64. 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 Dünn- und Dickdarmes*. 2. Aufl., Perimed-Verlag, Erlangen, 93-98.
65. Carr ND, Pullan BR, Schofield PF (1986) Microvascular studies in non-specific inflammatory bowel disease. *Gut* 27:542-549.
66. Spalteholz W (1968) Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten. In: Romeis B (ed) *Mikroskopische Technik*. R. Oldenbourg, München, Wien, 210.
67. Reynolds DG (1971) Injections techniques in the study of intestinal vasculature under normal conditions and in ulcerative colitis. In: Boley SC, Schwartz SS, Williams LF (eds) *Vascular disorders of the intestine*. Butterworths, London, 383-395.

68. Schafer K, Tiedjen KU, Bohm E, Ernst R (1992) [Angioarchitecture of the ileum and colon in Crohn disease]. *Zentralbl Chir* 117:417-422.
69. Bacaner MB (1966) Quantitative measurement of regional colon blood flow in the normal and pathological human bowel. *Gastroenterology* 51:764-777.
70. Kruschewski M (1993) Die Dickdarmgefäße bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa -Lichtmikroskopische und Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen-. Dissertation, Universität Hamburg.
71. 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.
72. 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.
73. Åhrén CL, Hultén L, Lindhagen J (1977) Pathological aspects. In: *Gastrointestinal emergencies*. Pergamon Press, Oxford, 81-88.
74. 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.
75. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Kobayashi I, Takei Y, Nagano K, Fusamoto H, Kamada T, Ogihara T, Sato N (1995) Colonic mucosal hemodynamics and tissue oxygenation in patients with ulcerative colitis: investigation by organ reflectance spectrophotometry. *J Gastroenterol* 30:183-188.
76. Guslandi M, Polli D, Sorghi M, Tittobello A (1995) Rectal blood flow in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 90:579-580.
77. Furst H, Storck M, Jauch KW, Scheurlen C, Kaltenecker A, Wiebecke B (1992) [Crohn disease in advanced age]. *Chirurg* 63:26-30.
78. Marston A, Pheils MT, Thomas ML, Morson BC (1966) Ischaemic colitis. *Gut* 7:1-15.
79. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G (1988) Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 29:352-357.
80. Rhodes J, Thomas GA (1994) Smoking: good or bad for inflammatory bowel disease? *Gastroenterology* 106:807-810.
81. Somerville KW, Logan RF, Edmond M, Langman MJ (1984) Smoking and Crohn's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 289:954-956.
82. 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.

83. 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.
84. Benoni C, Nilsson A (1984) Smoking habits in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 19:824-830.
85. 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.
86. Holdstock G, Savage D, Harman M, Wright R (1984) Should patients with inflammatory bowel disease smoke? *Br Med J (Clin Res Ed)* 288:362.
87. Harries AD, Baird A, Rhodes J (1982) Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 284:706.
88. Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT, Newcombe RG, Russell MA, Feyerabend C, Thomas GA, et al. (1994) Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 330:811-815.
89. Ang YS, Mahmud N, White B, Byrne M, Kelly A, Lawler M, McDonald GS, Smith OP, Keeling PW (2000) Randomized comparison of unfractionated heparin with corticosteroids in severe active inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 14:1015-1022.
90. Torkvist L, Thorlacius H, Sjoqvist U, Bohman L, Lapidus A, Flood L, Agren B, Raud J, Lofberg R (1999) Low molecular weight heparin as adjuvant therapy in active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 13:1323-1328.
91. 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.
92. Fries W, Pagiaro E, Canova E, Carraro P, Gasparini G, Pomerri F, Martin A, Carlotto C, Mazzon E, Sturniolo GC, Longo G (1998) The effect of heparin on trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 12:229-236.
93. Panes J, Esteve M, Cabre E, Hinojosa J, Andreu M, Sans M, Fernandez-Banares F, Feu F, Gassull MA, Pique JM (2000) Comparison of heparin and steroids in the treatment of moderate and severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 119:903-908.
94. 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.
95. 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.

96. 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.
97. Murch SH, Braegger CP, Sessa WC, MacDonald TT (1992) High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Lancet* 339:381-385.
98. Letizia C, Boirivant M, De Toma G, Cerci S, Subioli S, Scuro L, Ferrari P, Pallone F (1998) Plasma levels of endothelin-1 in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 30:266-269.
99. 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.
100. 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.
101. Leung FW, Koo A (1991) Mucosal vascular stasis precedes loss of viability of endothelial cells in rat acetic acid colitis. *Dig Dis Sci* 36:727-732.
102. Strober W (1985) Animal models of inflammatory bowel disease--an overview. *Dig Dis Sci* 30:3S-10S.
103. Kim HS, Berstad A (1992) Experimental colitis in animal models. *Scand J Gastroenterol* 27:529-537.
104. 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.
105. Keshavarzian A, Doria MI, Sedghi S, Kanofsky JR, Hecht D, Holmes EW, Ibrahim C, List T, Urban G, Gaginella T, et al. (1992) Mitomycin C-induced colitis in rats: a new animal model of acute colonic inflammation implicating reactive oxygen species. *J Lab Clin Med* 120:778-791.
106. 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.
107. 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.
108. Klyscz 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.

109. 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.
110. 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.
111. Granger DN, Kubes P (1994) The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 55:662-675.
112. Granger DN, Kvietys PR, Perry MA (1993) Leukocyte-endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 71:67-75.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KM, Smith WG, Isakson PC, Seibert K (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3228-3232.
117. Masferrer JL, Koki A, Seibert K (1999) COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. *Ann N Y Acad Sci* 889:84-86.
118. Tegeder I, Neupert W, Guhring H, Geisslinger G (2000) Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther* 292:1161-1168.
119. Ghosh AK, Hirasawa N, Niki H, Ohuchi K (2000) Cyclooxygenase-2-mediated angiogenesis in carrageenin-induced granulation tissue in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 295:802-809.
120. Truelove SC, Richards WC (1956) Biopsy studies in ulcerative colitis. *Br Med J* 1:1315-1318.
121. Gomes P, du Boulay C, Smith CL, Holdstock G (1986) Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Gut* 27:92-95.

122. Cuzzocrea S, Mazzon E, Serraino I, Dugo L, Centorrino T, Ciccolo A, Sautebin L, Caputi AP (2001) Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor reduces the severity of experimental colitis induced by dinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Eur J Pharmacol* 431:91-102.
123. 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.
124. Stanimirovic D, Shapiro A, Wong J, Hutchison J, Durkin J (1997) The induction of ICAM-1 in human cerebromicrovascular endothelial cells (HCEC) by ischemia-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC adhesion. *J Neuroimmunol* 76:193-205.
125. Yang H, Taylor KD, Rotter JI (2001) Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology. *Mol Genet Metab* 74:1-21.
126. Schreiber S, Campieri M, Colombel JF, van Deventer SJ, Feagan B, Fedorak R, Forbes A, Gassull M, Gendre JP, van Hogezaand RA, Lofberg R, Modigliani R, Pallone F, Petritsch W, Prantera C, Rampton D, Seibold F, Vatn M, Zeitz M, Rutgeerts P (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.
127. Keating GM, Perry CM (2002) Infliximab: an updated review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *BioDrugs* 16:111-148.
128. 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.
129. 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.
130. Wolfram-Gabel R, Maillot C, Koritke JG (1986) [Systematization of the angioarchitectonics of the colon in adult man]. *Acta Anat (Basel)* 125:65-72.
131. Pomerri F, Gasparini G, Martin A, Fries W, Pagiario E, Merigliano S (1995) Microradiographic anatomy of the explanted rat colon. *Acta Radiol* 36:210-214.
132. Hansen HH, Stelzner F (1975) [Surgical anatomy of the blood supply of the colon (author's transl)]. *Langenbecks Arch Chir* 340:63-74.
133. Browning J, Gannon B (1986) Mucosal microvascular organization of the rat colon. *Acta Anat (Basel)* 126:73-77.
134. Lindstrom CG, Rosengren JE, Fork FT (1979) Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* 20:523-536.

135. Onderdonk AB (1985) Experimental models for ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 30:40S-44S.
136. Boothe AD, Cheville NF (1967) The pathology of proliferative ileitis of the golden syrian hamster. *Pathol Vet* 4:31-44.
137. Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH (1994) Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 107:1726-1735.
138. Van Kruiningen HJ (1967) Granulomatous colitis of boxer dogs: comparative aspects. *Gastroenterology* 53:114-122.
139. Van Kruiningen HJ (1972) Canine colitis comparable to regional enteritis and mucosal colitis of man. *Gastroenterology* 62:1128-1142.
140. Rooney JR, Bryans JT, Doll ER (1963) Colitis "X" of horses. *J Am Vet Med Assoc* 142:510-511.
141. Emsbo P (1981) Terminal or regional ileitis in swine. *Nord Vet Med* 3:1-28.
142. Stout C, Snyder RL (1969) Ulcerative colitis-like lesion in Siamang gibbons. *Gastroenterology* 57:256-261.
143. Hotz HG, Foitzik T, Rohweder J, Schulzke JD, Fromm M, Runkel NS, Buhr HJ (1998) Intestinal microcirculation and gut permeability in acute pancreatitis: early changes and therapeutic implications. *J Gastrointest Surg* 2:518-525.
144. Foitzik T, Hotz HG, Kinzig M, Sorgel F, Klar E, Warshaw AL, Buhr HJ (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.
145. Foitzik T, Stufler M, Hotz HG, Klinnert J, Wagner J, Warshaw AL, Schulzke JD, Fromm M, Buhr HJ (1997) Glutamine stabilizes intestinal permeability and reduces pancreatic infection in acute experimental pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 1:40-46; discussion 46-47.
146. 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.
147. MacPherson BR, Pfeiffer CJ (1978) Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion* 17:135-150.
148. Banerjee AK, Peters TJ (1990) Experimental non-steroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy in the rat: similarities to inflammatory bowel disease and effect of thromboxane synthetase inhibitors. *Gut* 31:1358-1364.

149. Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB (1993) Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 17:641-662.
150. Benitz KF, Golberg L, Coulston F (1973) Intestinal effects of carrageenans in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Food Cosmet Toxicol* 11:565-575.
151. Marcus R, Watt J (1969) Seaweeds and ulcerative colitis in laboratory animals. *Lancet* 2:489-490.
152. Ohkusa T (1985) [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 82:1327-1336.
153. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98:694-702.
154. Sartor RB, Bond TM, Schwab JH (1988) Systemic uptake and intestinal inflammatory effects of luminal bacterial cell wall polymers in rats with acute colonic injury. *Infect Immun* 56:2101-2108.
155. Yamada Y, Marshall S, Specian RD, Grisham MB (1992) A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* 102:1524-1534.
156. 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.
157. 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.
158. Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, Cong Y, Black CA, Ridwan BW, McGhee JR (1996) Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol* 157:2174-2185.
159. 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.
160. 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.
161. Higa A, McKnight GW, Wallace JL (1993) Attenuation of epithelial injury in acute experimental colitis by immunomodulators. *Eur J Pharmacol* 239:171-176.
162. Beagley KW, Black CA, Elson CO (1991) Strain differences in susceptibility to TNBS-induced colitis. *Gastroenterology* 100:A560.

163. Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14:519-522.
164. Fabia R, Willen R, Ar'Rajab A, Andersson R, Ahren B, Bengmark S (1992) Acetic acid-induced colitis in the rat: a reproducible experimental model for acute ulcerative colitis. *Eur Surg Res* 24:211-225.
165. Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Martinez M, Malagelada JR (1990) Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. *Gut* 31:539-544.
166. Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, Gordon JH, Doria M (1990) Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut* 31:786-790.
167. Winter TA, Dalton HR, Merrett MN, Campbell A, Jewell DP (1993) Cyclosporin A retention enemas in refractory distal ulcerative colitis and 'pouchitis'. *Scand J Gastroenterol* 28:701-704.
168. Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willen R, Jeppsson B, Molin G, Bengmark S (1993) Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 54:248-255.
169. Horai T, Kusunoki M, Shoji Y, Yamamura T, Utsunomiya J (1994) Clinicopathological study of anorectal mucosa in total colectomy with mucosal proctectomy and ileoanal anastomosis. *Eur J Surg* 160:233-238.
170. Bortoluzzi F, Valentini M, Cernigoi C, Toffoli G, Boiocchi M, Poletti M, Sozzi M, Fornasarig M, Cannizzaro R, Bertolissi E (1995) DNA flow cytometric evaluation of cell cycle distribution in ulcerative colitis: a proposed method for assessing severity of disease. *Gut* 36:50-54.
171. Schmidt J, Hotz HG, Foitzik T, Ryschich E, Buhr HJ, Warshaw AL, Herfarth C, Klar E (1995) Intravenous contrast medium aggravates the impairment of pancreatic microcirculation in necrotizing pancreatitis in the rat. *Ann Surg* 221:257-264.
172. 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.
173. Leung FW, Su KC, Yonei Y, Passaro E, Jr., Guth PH (1993) Regional differences in mucosal hemodynamics in experimental colonic injury in rats. *Dig Dis Sci* 38:1220-1223.
174. 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.
175. Gulluoglu BM, Kurtel H, Gulluoglu MG, Yegen C, Aktan AO, Dizdaroglu F, Yalin R, Yegen BC (1999) Role of endothelins in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Digestion* 60:484-492.

176. 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.
177. Nakamura S, Ohtani H, Watanabe Y, Fukushima K, Matsumoto T, Kitano A, Kobayashi K, Nagura H (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.
178. Panes J, Granger DN (1998) Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 114:1066-1090.
179. Binion DG, West GA, Volk EE, Drazba JA, Ziats NP, Petras RE, Fiocchi C (1998) Acquired increase in leucocyte binding by intestinal microvascular endothelium in inflammatory bowel disease. *Lancet* 352:1742-1746.
180. 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.
181. 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.
182. Tani K, Ogushi F, Shimizu T, Sone S (2001) Protease-induced leukocyte chemotaxis and activation: roles in host defense and inflammation. *J Med Invest* 48:133-141.
183. House SD, Lipowsky HH (1987) Leukocyte-endothelium adhesion: microhemodynamics in mesentery of the cat. *Microvasc Res* 34:363-379.
184. Fiorucci S, Distrutti E, Mencarelli A, Morelli A, Lafor SA, Cirino G, Wallace JL (2003) Evidence that 5-lipoxygenase and acetylated cyclooxygenase 2-derived eicosanoids regulate leukocyte-endothelial adherence in response to aspirin. *Br J Pharmacol* 139:1351-1359.
185. Mahadevan U, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, Sandborn WJ (2002) Safety of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 97:910-914.
186. Arndt H, Palitzsch KD, Anderson DC, Rusche J, Grisham MB, Granger DN (1995) Leukocyte-endothelial cell adhesion in a model of intestinal inflammation. *Gut* 37:374-379.
187. Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068-2101.
188. del Zoppo GJ (1997) Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 823:132-147.

189. Vapaatalo H, Mervaala E (2001) Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit* 7:1075-1085.
190. Albelda SM, Smith CW, Ward PA (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J* 8:504-512.
191. Jones SC, Banks RE, Haidar A, Gearing AJ, Hemingway IK, Ibbotson SH, Dixon MF, Axon AT (1995) Adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gut* 36:724-730.
192. Koizumi M, King N, Lobb R, Benjamin C, Podolsky DK (1992) Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 103:840-847.
193. Malizia G, Calabrese A, Cottone M, Raimondo M, Trejdosiewicz LK, Smart CJ, Oliva L, Pagliaro L (1991) Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100:150-159.
194. Oda M, Han JY, Nakamura M (2000) Endothelial cell dysfunction in microvasculature: relevance to disease processes. *Clin Hemorheol Microcirc* 23:199-211.
195. 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.
196. He P, Wang J, Zeng M (2000) Leukocyte adhesion and microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1686-1694.
197. Michel CC, Curry FE (1999) Microvascular permeability. *Physiol Rev* 79:703-761.
198. 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.
199. 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.
200. Lush CW, Kviety PR (2000) Microvascular dysfunction in sepsis. *Microcirculation* 7:83-101.
201. Karnik AM, Bashir R, Khan FA, Carvounis CP (1998) Renal involvement in the systemic inflammatory reaction syndrome. *Ren Fail* 20:103-116.
202. 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.

203. 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.
204. Leppaluoto J, Ruskoaho H (1992) Endothelin peptides: biological activities, cellular signalling and clinical significance. *Ann Med* 24:153-161.
205. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332:411-415.
206. Inoue A, Yanagisawa M, Takawa 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.
207. Nakamura S, Naruse M, Naruse K, Demura H, Uemura H (1990) Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry* 94:475-477.
208. Rubanyi GM, Polokoff MA (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 46:325-415.
209. McMillen MA, Sumpio BE (1995) Endothelins: polyfunctional cytokines. *J Am Coll Surg* 180:621-637.
210. Levin ER (1995) Endothelins. *N Engl J Med* 333:356-363.
211. 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.
212. Traish AM, Moran E, Saenz de Tejada I (1991) Physicochemical characterization and solubilization of endothelin receptors. *Receptor* 1:229-242.
213. Simonson MS, Dunn MJ (1990) Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *Faseb J* 4:2989-3000.
214. Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348:732-735.
215. Urade Y, Fujitani Y, Oda K, Watakabe T, Umemura I, Takai M, Okada T, Sakata K, Karaki H (1992) An endothelin B receptor-selective antagonist: IRL 1038, [Cys11-Cys15]-endothelin-1(11-21). *FEBS Lett* 311:12-16.
216. 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.
217. Deniz M, Cetinel S, Kurtel H (2004) Blood flow alterations in TNBS-induced colitis: role of endothelin receptors. *Inflamm Res* 53:329-336.

218. Anthoni C, Mennigen RB, Rijcken EJ, Laukotter MG, Spiegel HU, Senninger N, Schurmann G, Krieglstein CF (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.
219. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665.
220. Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB (1986) Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 55:69-102.
221. Whittle BJ, Higgs GA, Eakins KE, Moncada S, Vane JR (1980) Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature* 284:271-273.
222. Weksler BB, Eldor A, Falcone D, Levin RI, Jaffe EA, Minick CR (1982) Prostaglandins and vascular endothelium. In: Herman AG, Vanhoutte PM, Denolin H, Goossens A (eds) *Cardiovascular pharmacology of the prostaglandins*. Raven Press, New York, 137-148.
223. Quilley J, McGriff JC (1988) Renal arachidonic acid metabolism. In: Hushka PV, Mais DE (eds) *Eicosanoids in the cardiovascular and renal systems*. MTP Press, Norwell, Massachusetts, 16-33.
224. Moore PK (1985) Prostanoids and the kidney. In: Moore PK (ed) *Prostanoids: pharmacological, physiological, and clinical relevance*. Cambridge University Press, New York, 173-199.
225. Cromwell O (1988) Contribution of eicosanoids to the immediate and late inflammatory responses. In: Church M, Robinson C (eds) *Eicosanoids in inflammatory conditions of the lung, skin and joints*. MTP Press, Norwell, Massachusetts, 21-42.
226. DeWitt DL, Meade EA, Smith WL (1993) PGH synthase isoenzyme selectivity: the potential for safer nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Med* 95:40S-44S.
227. Zurier RB (1988) Prostaglandins and inflammation. In: Curtis-Prior PB (ed) *Prostaglandins: biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids*. Churchill Livingstone, New York, 595-607.
228. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P (1990) The induction and suppression of prostaglandin H<sub>2</sub> synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 265:16737-16740.
229. Gierse JK, McDonald JJ, Hauser SD, Rangwala SH, Koboldt CM, Seibert K (1996) A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem* 271:15810-15814.
230. Bolten WW (1998) Scientific rationale for specific inhibition of COX-2. *J Rheumatol Suppl* 51:2-7.

231. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12013-12017.
232. Meade EA, Smith WL, DeWitt DL (1993) Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 268:6610-6614.
233. Boyce S, Chan CC, Gordon R, Li CS, Rodger IW, Webb JK, Rupniak NM, Hill RG (1994) L-745,337: a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 elicits antinociception but not gastric ulceration in rats. *Neuropharmacology* 33:1609-1611.
234. Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S (1994) NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* 47:55-59.
235. Sharon P, Ligumsky M, Rachmilewitz D, Zor U (1978) Role of prostaglandins in ulcerative colitis. Enhanced production during active disease and inhibition by sulfasalazine. *Gastroenterology* 75:638-640.
236. Rampton DS, Sladen GE, Youlten LJ (1980) Rectal mucosal prostaglandin E2 release and its relation to disease activity, electrical potential difference, and treatment in ulcerative colitis. *Gut* 21:591-596.
237. Ligumsky M, Karmeli F, Sharon P, Zor U, Cohen F, Rachmilewitz D (1981) Enhanced thromboxane A2 and prostacyclin production by cultured rectal mucosa in ulcerative colitis and its inhibition by steroids and sulfasalazine. *Gastroenterology* 81:444-449.
238. Boughton-Smith NK, Hawkey CJ, Whittle BJ (1983) Biosynthesis of lipoxygenase and cyclo-oxygenase products from [14C]-arachidonic acid by human colonic mucosa. *Gut* 24:1176-1182.
239. Sharon P, Stenson WF (1985) Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats. Similarity to human inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 88:55-63.
240. Zipser RD, Patterson JB, Kao HW, Hauser CJ, Locke R (1985) Hypersensitive prostaglandin and thromboxane response to hormones in rabbit colitis. *Am J Physiol* 249:G457-463.
241. Rachmilewitz D, Simon PL, Schwartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA (1989) Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 97:326-337.
242. McCartney SA, Mitchell JA, Fairclough PD, Farthing MJ, Warner TD (1999) Selective COX-2 inhibitors and human inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 13:1115-1117.
243. Hendel J, Nielsen OH (1997) Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 92:1170-1173.

244. Singer, II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF (1998) Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 115:297-306.
245. Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D (2000) Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12:223-231.
246. Khan I, Al-Awadi FM, Thomas N, Haridas S, Anim JT (2002) Cyclooxygenase-2 inhibition and experimental colitis: beneficial effects of phosphorothioated antisense oligonucleotide and meloxicam. *Scand J Gastroenterol* 37:1428-1436.
247. Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL (1996) Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 98:2076-2085.
248. Lesch CA, Kraus ER, Sanchez B, Gilbertsen R, Guglietta A (1999) Lack of beneficial effect of COX-2 inhibitors in an experimental model of colitis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21:99-104.
249. Matuk R, Crawford J, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA, Papadakis KA (2004) The spectrum of gastrointestinal toxicity and effect on disease activity of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 10:352-356.
250. Biancone L, Tosti C, Geremia A, Fina D, Petruzzello C, Emerenziani S, Pallone F (2004) Rofecoxib and early relapse of inflammatory bowel disease: an open-label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 19:755-764.
251. Sakai H, Sato T, Maekawa Y, Tsuchida E (2002) Capillary blood flow during severe hemodilution observed by a noninvasive transcutaneous technique using flash epi-illumination. *Microvasc Res* 64:120-126.
252. 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.
253. 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.
254. Naicker S, Bhoola KD (2001) Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol Ther* 90:61-88.
255. Pollock DM (2001) Endothelin antagonists in the treatment of renal failure. *Curr Opin Investig Drugs* 2:513-520.
256. Mark KS, Trickler WJ, Miller DW (2001) Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 297:1051-1058.

257. Martin AR, Villegas I, La Casa C, Alarcon de la Lastra C (2003) The cyclooxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, attenuates mucosal damage due to colitis induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Eur J Pharmacol* 481:281-291.
258. Miura S, Kurose I, Fukumura D, Suematsu M, Sekizuka E, Tashiro H, Serizawa H, Asako H, Tsuchiya M (1991) Ischemic bowel necrosis induced by endothelin-1: an experimental model in rats. *Digestion* 48:163-172.
259. 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.
260. 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.
261. 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.
262. 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.
263. Souto JC, Martinez E, Roca M, Mateo J, Pujol J, Gonzalez D, Fontcuberta J (1995) Prothrombotic state and signs of endothelial lesion in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 40:1883-1889.
264. Kramer BK, Ittner KP, Beyer ME, Hoffmeister HM, Riegger GA (1997) Circulatory and myocardial effects of endothelin. *J Mol Med* 75:886-890.
265. Schiffrin EL (2001) Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* 14:83S-89S.
266. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Walker-Smith JA, MacDonald TT (1994) Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 106:1455-1466.
267. Klemm P, Warner TD, Hohlfeld T, Corder R, Vane JR (1995) Endothelin 1 mediates ex vivo coronary vasoconstriction caused by exogenous and endogenous cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2691-2695.
268. Corder R, Carrier M, Khan N, Klemm P, Vane JR (1995) Cytokine regulation of endothelin-1 release from bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 26 Suppl 3:S56-58.
269. Nielsen OH, Vainer B, Madsen SM, Seidelin JB, Heegaard NH (2000) Established and emerging biological activity markers of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 95:359-367.

270. Warner TD, Klemm P (1996) What turns on the endothelins? *Inflamm Res* 45:51-53.
271. Piro M, Giubilato G, Pinnelli M, Giordano Sciacca P, Biasucci LM (2005) Endothelium and inflammation. *Panminerva Med* 47:75-80.
272. Geller SA, Cohen A (1983) Arterial inflammatory-cell infiltration in Crohn's disease. *Arch Pathol Lab Med* 107:473-475.
273. Matson AP, Van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Colombel JF, Cortot A (1995) The relationship of granulomas to blood vessels in intestinal Crohn's disease. *Mod Pathol* 8:680-685.
274. Yokoyama K, Mitomi H, Kobayashi K, Katsumata T, Saigenji K, Okayasu I (2001) Obliterative arteritis with nitric oxide synthase and HLA-DR expression in Crohn's colitis. *Hepatogastroenterology* 48:401-407.
275. 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.
276. Wenzel RR, Fleisch M, Shaw S, Noll G, Kaufmann U, Schmitt R, Jones CR, Clozel M, Meier B, Luscher TF (1998) Hemodynamic and coronary effects of the endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease. *Circulation* 98:2235-2240.
277. Sutsch G, Kiowski W, Yan XW, Hunziker P, Christen S, Strobel W, Kim JH, Rickenbacher P, Bertel O (1998) Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 98:2262-2268.
278. Williamson DJ, Wallman LL, Jones R, Keogh AM, Scroope F, Penny R, Weber C, Macdonald PS (2000) Hemodynamic effects of Bosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with pulmonary hypertension. *Circulation* 102:411-418.
279. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ (2001) Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358:1119-1123.
280. Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, Hopfgartner G, van Marle SP, Peeters PA, Jonkman JH, Jones CR (1996) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects. *Clin Pharmacol Ther* 60:124-137.
281. Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, Hopfgartner G, Eggers H, Meyer J, van Marle S, Viischer HW, Jonkman JH (1999) Multiple-dose pharmacokinetics, safety, and tolerability of bosentan, an endothelin receptor antagonist, in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 39:703-714.
282. 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.

283. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Riecken EO, Schulzke JD (1996) Diarrheal mechanism in ulcerative colitis: epithelial barrier defect and impaired ion transport. *Gastroenterology* 110
284. Rohweder J, Foitzik T, Runkel N, Fromm M, Schulzke JD, Buhr HJ (1997) In vitro-Charakterisierung der intestinalen Barrierefunktion an zwei experimentellen Colitis-Modellen der Ratte. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1:439-443.
285. Laffineur G, Lescut D, Vincent P, Quandalle P, Wurtz A, Colombel JF (1992) [Bacterial translocation in Crohn disease]. *Gastroenterol Clin Biol* 16:777-781.
286. Gardiner KR, Anderson NH, Rowlands BJ, Barbul A (1995) Colitis and colonic mucosal barrier dysfunction. *Gut* 37:530-535.
287. Gardiner KR, Erwin PJ, Anderson NH, Barr JG, Halliday MI, Rowlands BJ (1993) Colonic bacteria and bacterial translocation in experimental colitis. *Br J Surg* 80:512-516.

**7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

BGA	Blutgasanalyse
cbf	Kapillärer Blutfluß
CDAI	Crohn's disease activity index
COX	Cyclooxygenase
Da	Dalton
DNBS	Dinitrobenzensulfonsäure
DSS	Dextran sulfate sodium (Dextran-Natriumsulfat)
ET	Endothelin
ET-RA	Endothelin-Rezeptor-Antagonist
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FITC-Dextran	Fluorescein-Isothiocyanate-Dextran
fKD	Funktionelle Kapillardichte
GPM	Gefäßpermeabilität
HE	Hämatoxylin-Eosin
HTK	Hämatokrit
Kg KG	Kilogramm-Körpergewicht
LS	Leukozytensticking
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
nl/cap/min	Nanoliter/Kapillare/Minute
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PG-PS	Peptidoglycan-Polysaccharide
SEM	Standard Error of Mean
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome

TNBS Trinitrobenzensulfonsäure

TNF tumor necrosis factor

## 8. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gebührt meinem Chef Herrn Prof. Dr. med. Heinz J. Buhr. Er hat mich 1995 als „Quereinsteiger“ in seine Klinik aufgenommen – zum damaligen Zeitpunkt alles andere als selbstverständlich. Dadurch gab er mir die Chance zur wissenschaftlichen Tätigkeit und somit zu dieser Arbeit. Für die kritische und akribische Durchsicht des Manuskriptes danke ich ihm sehr. Weiter bin ich überaus dankbar für die breite und umfassende klinische Weiterbildung, die ich unter seiner Ägide erfahren durfte. Sein unermüdlicher Einsatz für die Klinik und für die Patienten verdienen höchsten Respekt.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Foitzik danke ich für die freundliche Integration in seine AG. Zusammen mit Frau Birgit Hotz, der ich an dieser Stelle ebenfalls danken möchte, hat er mich in die im Labor etablierte Methodik der Intravitalmikroskopie eingearbeitet. So wurde die methodische Voraussetzung für die Evaluation und Etablierung eines neues Modells für Untersuchungen der Mikrozirkulation am Darm geschaffen. Weiter unterstützte er mich bei der Versuchsplanung und Analyse der Ergebnisse.

Frau Dr. med. Alexandra Perez-Cantó und Herrn Prof. Dr. med. Christoph Loddenkemper aus dem Institut für Pathologie der Charité – Campus Benjamin Franklin (Direktor: Prof. Dr. med. H. Stein) sei für die stets gute und fruchtbare Kooperation, die u.a. zur Entwicklung eines histologischen Colitis-Score's führte und sich in der Befundung der histologischen Präparate fortsetzte, besonders gedankt.

Danken möchte ich weiter Frau Tanja Anderson, die im Rahmen ihrer Dissertation mit Fleiß und äußerster Sorgfalt Versuche der Interventionsstudie durchgeführt hat.

Darüber hinaus bin ich den Mitarbeiterinnen des Chirurgischen Forschungslabors, insbesondere Frau Sonja Dullat, für ihre Assistenz zu Dank verpflichtet.

Schließlich möchte ich von Herzen meiner Frau Julia sowie meinen Kindern Marie, Anna und Paul für ihre unermüdliche Unterstützung danken. Auch meinen Eltern, die mir seit jeher uneingeschränkt geholfen haben, sei diese Arbeit ein Dank.

## 9. ERKLÄRUNG

Erklärung nach §4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

31.08.2007

Martin Kruschewski