

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. N. Senninger -

**Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen-  
Mikrozirkulatorische Untersuchung zur Blockade  
der intestinalen Zelladhäsion**

- Eine tierexperimentelle Studie -

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae der

Medizinischen Fakultät der

Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Mike Laukötter  
aus Metelen  
2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. C.F. Krieglstein

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. T. Kucharzik

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 08. 2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
-Direktor: Univ. Prof. Dr. med. N. Senninger-  
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. C.F. Krieglstein  
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. T. Kucharzik

## ZUSAMMENFASSUNG

### **PATHOGENESE CHRONISCH ENTZÜNDLICHER DARMERKRANKUNGEN- MIKROZIRKULATORISCHE UNTERSUCHUNG ZUR BLOCKADE DER INTESTINALEN ZELLADHÄSION**

Laukötter, Mike

**Einleitung:** Die transendotheliale Migration von Leukozyten im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) wird durch die Interaktion von Zelladhäsionsmolekülen auf Leukozyten und auf Endothelzellen gesteuert. Ziel der vorliegenden Studie war es, mittels intestinaler Intravitalmikroskopie an einem CED-Rattenmodell (Bezirksregierung-Münster / Az.: 23.0835.1.0 - 20.12.1996) zu untersuchen, ob sich die Darmentzündung durch Antikörperblockade einzelner Zelladhäsionsmoleküle beeinflussen läßt. Zielmoleküle waren das von Leukozyten exprimierte Zelladhäsionsmolekül Mac-1 (CD11b) und sein endothelseitiger Ligand ICAM-1 (CD54). **Methoden:** 35 männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden in 5 Gruppen mit 7 Tieren eingeteilt. In 4 Gruppen wurde durch Indomethacin (s.c. Injektion 48h und 24h vor Untersuchung) eine chronische Darmentzündung induziert. Von diesen erhielten 3 Gruppen Antikörper: **A)** anti-Mac-1, **B)** anti-ICAM-1 und **C)** Kombination von beiden Antikörpern (je 1 mg/kg KG) 24h+12h vor Intravitalmikroskopie. In Narkose wurden pro Ratte 10 subserosale postkapilläre Sammelvenolen des entzündeten Darmabschnitts mikroskopiert und videodokumentiert. Validierte Scores wurden zur makroskopischen und histologischen Beurteilung des Entzündungsschadens herangezogen. Die restlichen Gruppen dienten als Kontrollen: **D)** entzündet und **E)** gesund. **Ergebnisse:** Die Entzündung war durch einen signifikanten Anstieg ( $P < 0,05$ ) der temporär adhärenen Leukozyten (Roller) (von  $5,41 \pm 2,79$  auf  $33,64 \pm 14,56$  /100  $\mu\text{m}/30$  sec) und der permanent adhärenen Leukozyten (Sticker) (von  $0,16 \pm 0,18$  auf  $11,06 \pm 3,63$  /100  $\mu\text{m}/30$  sec) charakterisiert. Nach anti-Mac-1 Gabe kam es, im Gegensatz zur anti-ICAM-1-Gruppe, die eine Verminderung, jedoch keine signifikante Reduzierung der Entzündungszellen erreichte, zu einer signifikanten ( $P < 0,05$ ) Reduzierung der Roller (von  $33,64 \pm 14,56$  auf  $6,60 \pm 2,71$ ) und der Sticker (von  $11,06 \pm 3,63$  auf  $0,07 \pm 0,10$ ). Die kombinierte Antikörpergabe zeigte eine signifikante ( $P < 0,05$ ) Verminderung der Roller (von  $33,64 \pm 14,56$  auf  $7,73 \pm 3,60$ ). Indomethacin führte zu einem Anstieg des Makroskopie-Scores von 0 auf  $4,43 \pm 0,79$  Punkten ( $P < 0,05$ ), anti-CD11b zu einer Verminderung von  $4,43 \pm 0,79$  auf  $1,29 \pm 1,11$  Punkten ( $P < 0,05$ ) und die Kombination zu einer Verminderung von  $4,43 \pm 0,79$  auf  $1,57 \pm 0,98$  ( $P < 0,05$ ). Histologisch führte Indomethacin zu einem Anstieg des Scores von 0 auf  $6,43 \pm 1,27$  Punkten ( $P < 0,05$ ), anti-CD11b zu einer Verminderung von  $6,43 \pm 1,27$  auf  $1,14 \pm 2,04$  ( $P < 0,05$ ) und die Kombination zu einer Verminderung von  $6,43 \pm 1,27$  auf  $0,29 \pm 0,76$  ( $P < 0,05$ ). **Schlußfolgerung:** Die Ergebnisse zeigen, daß die anti-Mac-1-Gabe ein effektiver Weg zur Reduzierung einer intestinalen Entzündung ist. In der Indomethacin induzierten chronischen Ileitis der Ratte besteht ein CD 18 unabhängiger, CD 11b (Mac-1) abhängiger Zelladhäsionsmechanismus im Komplex CD18/CD11b, der vielleicht auch ein vielversprechendes Ziel in der Behandlung von CED-Patienten sein kann.

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 08. 2004

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Allgemeiner Teil</b>	<b>6</b>
2.1 Anatomie und Physiologie des Rattendarmes	6
2.1.1 Darmepithel	6
2.2 Angioarchitektur	8
2.3 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	12
2.3.1 Befallsmuster	13
2.3.2 Epidemiologie	14
2.3.3 Ätiologie	15
2.3.4 Pathophysiologie	18
2.3.5 Klinik und Verlauf	21
2.3.6 Therapie-Übersicht	24
2.4 Adhäsionsmoleküle und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	26
2.4.1 Selektine und ihre Liganden	27
2.4.2 Integrine	32
2.4.3 Immunglobulinsupergenfamilie	35
2.5 Zelladhäsionskaskade	39
2.5.1 Leukozyten-Rolling	41
2.5.2 Stabile Zelladhäsion	42
2.5.3 Leukozyten-Endotheliale-Transmigration	43
<b>3. Material und Methode</b>	<b>44</b>
3.1 Versuchstiere	44
3.2 Narkoseverfahren	44
3.3 Operationstechnik	45
3.4 Indomethacin / Entzündungsinduktion	48
3.5 Versuchsgruppen	50
3.6 Intravitalmikroskopie	53
3.6.1 Technischer Aufbau der Geräte	53

3.6.2	Fluoreszenzfarbstoffe	54
3.6.3	Durchführung der Mikroskopie	59
3.6.4	Mikrozirkulatorische Untersuchungsparameter	62
3.7	Antikörper	63
3.7.1	Antikörper CD11b (Mac-1)	63
3.7.2	Antikörper CD54 (ICAM-1)	64
3.8	Morphologische Graduierung	64
3.8.1	Makroskopie-Score	64
3.8.2	Histologie-Score	65
3.8.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	66
3.9	Statistische Auswertung	67
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>68</b>
4.1	Modelletablierung / Kontrollgruppen	68
4.1.1	In vivo Mikroskopie	68
4.1.2	Morphologie	72
4.1.3	Ergebniszusammenfassung der Modelletablierung	75
4.2	Hauptversuche	76
4.2.1	In vivo Mikroskopie	76
4.2.2	Morphologie	80
4.3	Zusammenfassung	83
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
5.1	In vivo Mikroskopie und Mikrozirkulation	84
5.1.2	Mikroskopie – Lokalisation	86
5.1.3	Intravitalmikroskopische Parameter	87
5.2	Rolle der Leukozyten in CED	89
5.3	Indomethacin induzierte intestinale Entzündung	93
5.4	Antikörperblockade von Mac-1 und ICAM-1	98
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>103</b>

<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	106
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	108
8.1	Ergebnistabellen	
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	111
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	143
<b>11.</b>	<b>Nachwort</b>	152



## 1. Einleitung

Ätiologie und frühe Pathogenese der idiopathischen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind ungeklärt, doch weisen zahlreiche Veränderungen auf eine wichtige Rolle des intestinalen Immunsystems in der Pathogenese beider Krankheiten hin. Hierfür sprechen klinische Daten, wie z.B. die Remission von CED unter immunsuppressiver Therapie (Cortison, Cyclosporin, u.a.). Auch häufen sich experimentelle Daten, die eine Störung der intestinalen Immunregulation generell als zentralen Pathogenesefaktor bei CED vermuten lassen (Strober W '93). Gewebeläsionen bei CED sind charakterisiert durch eine gesteigerte Akkumulation von Entzündungszellen in der Darmwand mit Beteiligung von T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Szintigraphische Untersuchungen mit markierten Leukozyten haben gezeigt, daß das lokale Zellinfiltrat vornehmlich durch Rekrutierung von zirkulierenden Zellen aus dem Blutstrom in die Darmwand entsteht (Saverymuttu SH '85). Dieser Wechsel vom vaskulären in das interstitielle Kompartiment wird über eine sequentielle Expression und Aktivierung von spezifischen Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) auf der Oberfläche von Leukozyten und Endothelzellen gesteuert (Bevilacqua MP '93, Schürmann G '97, Panés J '98). Die Adhäsion zirkulierender Zellen an das Gefäßendothel findet in der frühen Phase der immunologischen Aktivierung statt (Zimmermann GA '92) und scheint eine Voraussetzung dafür zu sein, daß zirkulierende Immunzellen transendothelial in das Gewebe migrieren, wo die Antigen-Erkennung und die Immunantwort stattfinden (Ala A '03). Nur ein kleiner Prozentsatz der immuno-inflammatorischen Zellen proliferiert in den CED-Läsionen lokal (Autschbach F '92). Somit sind Retention und Extravasation zirkulierender Leukozyten in Entzündungsgewebe wichtige Aspekte in der Pathogenese entzündlicher Darmerkrankungen (Schürmann G '97). Die Zelladhäsion verläuft dabei in einer Kaskade, an deren Schritte spezifische Adhäsionsmoleküle (sog. Selektine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulin – Supergen - Familie) beteiligt sind (Bevilacqua MP '93, Raud J '93, Adams DH '94). Zelladhäsionsmoleküle der Selektin-Familie vermitteln die erste lockere Kontaktaufnahme der Leukozyten mit den Endothelzellen, das sogenannte Leukozyten-Rolling (s. Abb. 1-B). Die Integrin-Familie (heterodimere Proteine auf der Leukozytenoberfläche mit  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten) und die Immunglobulin-Familie der CAMs

vermitteln durch ihre Interaktion die feste Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen (s. Abb. 1 - C+D) (Ala A '03).

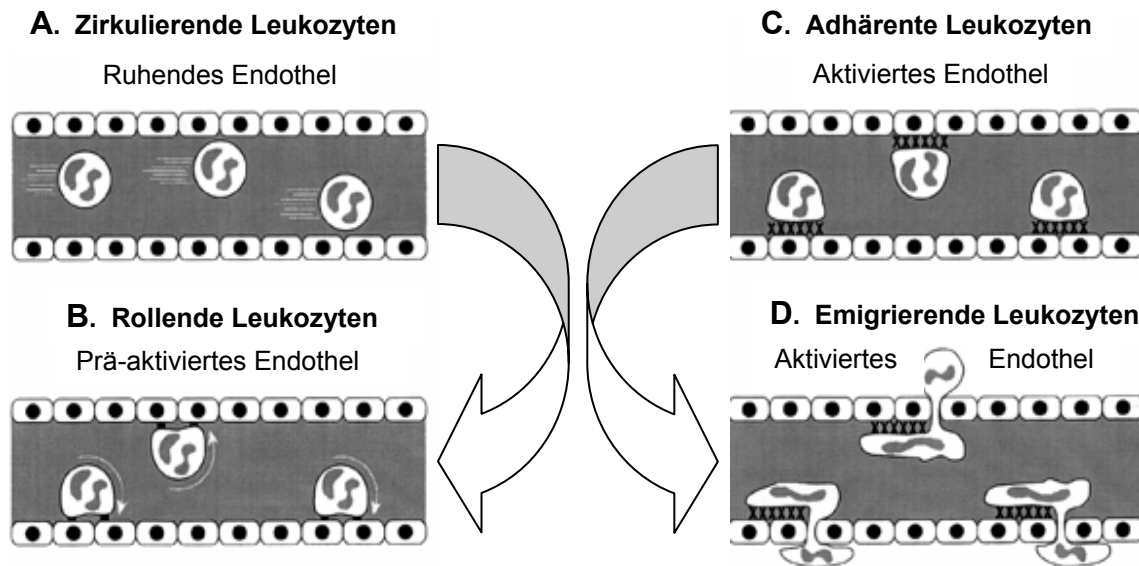


Abb. 1: Vier Blutgefäßquerschnitte als Schema der Leukozyten-Endothel-Interaktion (modifiziert nach Panés J '99).

Viele Daten sprechen nun dafür, daß ein allgemeiner Mechanismus der Zelladhäsion besteht, der im Humansystem ubiquitär gleich abläuft und im Vergleich zu Säugern, sowie innerhalb dieser, große Gemeinsamkeiten aufweist. Zum Beispiel sind bei der Rekrutierung zirkulierender Zellen in transplantierten Organen (Taylor PM '92, Steinhoff G '93) und bei Ischämie-Reperfusionen-Studien (Zimmerman GA '91) gleiche Zelladhäsionsmoleküle beteiligt, wie bei der Entstehung des Zellinfiltrates in entzündlichen Darmläsionen. Diese Veränderungen bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn sind wiederum durch die Entwicklung von ulzerativen Läsionen und prominenten Leukozyteninfiltraten in der Darmwand charakterisiert. Studien, die die molekularen Determinanten der Leukozyten-Rekrutierung in chronisch entzündetes humanes Darmgewebe charakterisierten, zeigten eine erhöhte Expression von  $\beta_2$ -Integrinen, ICAM-1 und E-Selektin in Mukosabiopsaten (Malizia G '91, Koizumi M '92). Immunhistochemische Lokalisationsstudien zeigten eine vermehrte Expression von CD11a/CD18 durch mononukleäre Zellen. CD11b/CD18 war auf Granulozyten vermehrt exprimiert und ICAM-1 fand sich hauptsächlich in postkapillären Venolen. Die Intensität der Adhäsionsmolekül-expression verlief hier parallel zu dem Entzündungsgrad (Nakamura S '93).

Daraus könnte folgen, daß die an diesen Modellen entwickelte Zelladhäsionskaskade und die Ergebnisse therapeutischer Interaktionen mit Zelladhäsionsmolekülen in anderen Organsystemen auch für MC und CU sowie ihre tierexperimentellen Äquivalente gelten. So wurden bereits verschiedene monoklonale Antikörper (MAks) gegen Zelladhäsionsmoleküle in unterschiedlichen experimentellen Modellen entzündlicher Darmerkrankungen hinsichtlich ihrer Eigenschaft, die Leukozytenmigration zu blockieren und somit die Abschwächung oder die Vermeidung einer Entzündungsantwort auf bestimmte Stimuli zu bewirken, getestet (Arndt H '95, Sans M '99).

Wichtige Vertreter dieser Zelladhäsionsmoleküle (weitere s. Kap. 2.4) sind das Integrin der  $\beta_2$ -Familie: CD11b/CD18 – Mac1 (macrophage antigen-1) und das Mitglied der Immunglobulin-Supergen-Familie CD54 – ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1), die primär für die stabile Zelladhäsion (Sticking) verantwortlich sind (Issekutz AC '92). Auf der Leukozytenoberfläche werden drei Formen des CD11/CD18-Komplexes exprimiert: CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1) und CD11c/CD18. Sie alle teilen eine gemeinsame  $\beta$ -Kette (CD18), haben jedoch unterschiedliche  $\alpha$ -Ketten (CD11a, CD11b, CD11c). Zusammen formen sie  $\alpha\beta$ -heterodimere Membranglykoproteine mit einigen spezifischen und einigen gemeinsamen unspezifischen Funktionen (Arnaout MA '90). ICAM-1 ist der endothelseitige Ligand von CD11/CD18 (Mac-1 und LFA-1) (Marlin SD '87, Diamond MS '90). Die stärkste ICAM-1-Expression wurde auf Gefäßendothelzellen gefunden (Panés J '95). Endotheliales ICAM-1 reguliert über die Interaktion mit den Integrinen die Adhäsion von Leukozyten, Monozyten, Lymphozyten und Neutrophilen an aktiviertem Endothel. Somit vermittelten ICAM-1 und das Integrin CD11/CD18 (LFA-1 / Mac-1) unter anderem die Immun- und Entzündungsantwort (Arnaout MA '90, Simth CW '93, Carlos TM '94, Ala A '03).

Durch Applikation monoklonaler Antikörper gegen ICAM-1 und gegen CD11/CD18, konnte tierexperimentell die Adhäsion zirkulierender Entzündungszellen an das Gefäßendothel und die Gewebeschädigung unter Ischämie/Reperfusionbedingungen am Herzen (Yamazaki T '93, Chopp M '94, Clark RS '96), im Darm (Zimmerman GA '92) und in anderen Organen (Vedder NB '88 und '90) signifikant vermindert werden. Im Indomethacin – Entzündungsmodell gelang es Wallace et al. 1991 durch einen monoklonalen Antikörper gegen CD18, Magenulzera im Kaninchen zu verhindern (Wallace JL '91). Dieser Rezeptorantikörper konnte ebenfalls die Entzündungsausprägung in einem TNBS (Trinitrobenzenesulfate)-Colitis-Modell des Kaninchens signifi-

kant vermindern (Wallace JL '92). Darüberhinaus ist gezeigt worden, daß intravenös verabreichte anti-CD11b/CD18 (Mac-1)-Antikörper die Entzündung in einer akuten TNBS-induzierten Rattenkolitis abschwächen können (Palmen MJ '95), daß diese Antikörper ebenfalls eine verminderte Infiltration von Makrophagen in ein transplantiertes Rattenherz bewirken können (Paul LC '96), jedoch bei der intraperitonealen Verabreichung in einem Ratten-Haemophilus-Influenza-Typ-B Sepsis- und Meningitismodell keine protektive Wirkung erzielen konnten (Tan TQ '97). Neuere Studien zeigen bei Antikörperblockade von Mac-1 und ICAM-1 durch intravenös verabreichte monoklonale Antikörper in einem Ratten-Modell für eine Escherichia Coli-induzierte Pneumonie eine Verschlechterung der Überlebensrate am Versuchsende (Zeni F '99), während durch eine intravenöse Antikörperblockade von Mac-1 in einem Ratten-Modell für akutes ischämisches Nierenversagen, einem leichten renalem Ischämieschaden bei Gabe vor Reperfusion, vorgebeugt werden konnte (Tajra LCF '00). Diese heterogenen Ergebnisse finden sich weiterhin, wenn man nur die Blockade von ICAM-1 in verschiedenen Entzündungsmodellen betrachtet. So schützt die intravenöse Applikation eines Antikörpers gegen ICAM-1 oder aber die Gendefizienz für ICAM-1 nicht vor einer pulmonalen Neutrophilen-Einwanderung in einem Tiermodell der Ratte für eine polymikrobielle Sepsis (Que LG '98), wohl aber schützt die Gendefizienz für ICAM-1 vor einer schweren Verlaufsform der DSS-induzierten Kolitis in der Maus (Bendjelloul F '00). Während die Blockade von ICAM-1 und CD11a durch intravenöse Verabreichung von monoklonalen Antikörpern eine tierexperimentelle, allergische Konjunktivitis in der Maus inhibiert und die gleichzeitige Gabe beider Antikörper die Wirkung noch verstärkt (Whitcup SM '99), wird in der tierexperimentellen Studie für eine Melanin-induzierte Uveitis in der Ratte kein Einfluß der intravenösen anti-ICAM-1-Antikörpergabe festgestellt (Smith JR '00). Weitere Beobachtungen aus neueren Studien zeigen, daß durch die rektale Verabreichung von Antikörpern gegen ELAM-1 (endothelial leucocyte adhesion molecule-1) und gegen ICAM-1 eine DSS-induzierte Kolitis in der Maus inhibiert werden kann (Hamamoto N '99), während eine intravenöse Gabe eines anti-ICAM-1-Antikörpers in einer anderen DSS-induzierten Kolitis diese Entzündungsform nicht signifikant abschwächen konnte (Soriano A '00). Letztendlich wurde die Rolle von ICAM-1 in der experimentellen Kolitis durch ein murin-spezifisches Antisense Oligonucleotid untersucht (Bennett CF '97). Das Oligonucleotid verhinderte in der DSS-induzierten Kolitis der Maus die ICAM-1 – Expression, was methodisch durch eine

ICAM-1-Immunfärbung nachgewiesen werden konnte. Darüberhinaus reduzierte dieses Oligonucleotid die Ausprägung des klinischen Entzündungsverlaufes. Diese Beobachtungen einer potenziellen Entzündungshemmung durch anti-ICAM-1-Aks und die Beobachtungen, daß sowohl anti-CD11a als auch anti-CD11b MAks die Adhäsion von aktivierten Neutrophilen an Cytokin-stimulierten Endothelschichten inhibieren konnten und der gleichzeitige Gebrauch beider Antikörper einen größeren inhibitorischen Effekt als die alleinige Verwendung eines einzelnen Antikörpers hatte (Smith CW '89), veranlaßten uns zur Überlegung, ob eine gleichzeitige mAk-Blockade von zwei korrespondierenden Zelladhäsionsmolekülen (Mac-1 – ICAM-1) ein wirksameres Behandlungskonzept für in vivo-Modelle entzündlicher Darmerkrankungen sein könnte, als die alleinige Gabe eines Antikörpers. Diese Fragestellung wurde bislang nicht in einem Tierexperiment für chronisch entzündliche Darmerkrankungen bearbeitet. Das Hauptziel der Studie war es, die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle CD11b (Mac-1) und CD54 (ICAM-1) hinsichtlich der Leukozyten-Endothel-Interaktion im Indomethacin-Rattenmodell entzündlicher Darmerkrankung zu untersuchen, wenn sie einzeln oder in Kombination durch Antikörper blockiert werden.

Als Untersuchungstechnik bedienten wir uns hierzu der Intravitalmikroskopie (in vivo Mikroskopie oder IVM). Während die Untersuchung der Mikrozirkulation (hier Leukozyten-Endothel-Zell-Interaktion) mittels Intravitalmikroskopie inzwischen ein an Haut, Leber und Pankreasgewebe etabliertes Verfahren ist (Intaglietta M '95), bestehen mit dieser Methode am Darmgewebe noch mehrere Schwierigkeiten. Postentzündliche morphologische Veränderungen oder Präparationstraumen können die intravitalmikroskopische Flußmessung an der Mukosa oder am Mesenterium im Tiermodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Yamada T '93, Elson CO '95) erheblich erschweren. Dagegen sind postkapilläre Venolen der Dünndarmserosa auch am entzündeten Darm der Intravitalmikroskopie zugänglich. Sie stellen Sammelgefäße der entzündeten Darmsegmente dar und erlauben Rückschlüsse auf die Entzündungsprozesse in der Darmwand. Da an der Dünndarmserosa bisher noch keine Erfahrungen mit der IVM vorlagen, war es zudem Ziel dieser Studie, zu prüfen, ob sich die Standardparameter der Mikrozirkulation an dieser Lokalisation am normalen und entzündlich veränderten Darmgewebe der Ratte mittels Intravitalmikroskopie bestimmen lassen.

## **2. Allgemeiner Teil**

### **2.1 Anatomie und Physiologie des Rattendarmes**

Sobald der Speisebrei im Vertebratenmagen aufbereitet ist, wird er durch den Pylorusphinkter in den Dünndarm entlassen. Dieser Sphinkter erschlafft, sobald die peristaltische Bewegung des Magens den sauren Inhalt in den Anfangsabschnitt des Dünndarms preßt. Im Dünndarm wird die Verdauung in einem alkalischen Milieu fortgesetzt. Der Dünndarm der Vertebraten ist typischerweise in drei Abschnitte gegliedert. Der erste, sehr kurze Teil, ist das Duodenum, das selbst Verdauungsenzyme sezerniert und Enzyme aus Leber und Pankreas erhält. Darauf folgt das Jejunum, das ebenfalls Verdauungssekrete bildet. Der hintere Abschnitt, das Ileum, dient in erster Linie zur Absorption von verdauten Nährstoffen. Manche Verdauungsprozesse, die im Duodenum und Jejunum beginnen, enden erst im Ileum. Die sekretorische Funktion des Duodenalepithels wird durch die Sekrete aus Leber und Pankreas ergänzt. Das Pankreas, ein wichtiges exokrines Organ, produziert Pankreassekrete, die in den Ductus pancreaticus ausgeschüttet werden. Das Pankreassekret enthält Proteasen, Lipasen und Carbohydrasen, die für die Verdauung der Vertebraten wichtig sind. Das Pankreassekret ist auch für die Neutralisation der Magensäure im Darm wichtig (Eckert R '02). Als Besonderheit ist zu erwähnen, daß die Ratte keine Gallenblase besitzt, ein Merkmal von den Spezies, deren Nahrungsaufnahme nahezu kontinuierlich verläuft (Olds RJ '79).

#### **2.1.1 Darmepithel**

Das Darmepithel ist von longitudinal und zirkulär angeordneter glatter Muskulatur umgeben. Die Serosa (Peritonealepithel) bedeckt alle abdominellen Eingeweideorgane. Das Verdauungsepithel kleidet den Dünndarm aus und bedeckt die fingerähnlichen Villi oder Darmzotten. Deren einschichtiges Epithel besteht aus Becherzellen, die zwischen säulenförmigen Absorptionszellen (Enterozyten) eingelagert sind. Die Darmzotten sind etwa 1 mm hoch. Zwischen den Zotten befinden sich röhrenförmige Einstülpungen, die sogenannten Lieberkühnschen Krypten. In jeder Darmzotte findet sich ein Netzwerk aus Blutgefäßen, Kapillaren, Venolen und Lymphgefäßen, einschließlich des zentralen

Chylusgefäßes. In diese Blut- und Lymphgefäße werden die Nährstoffe aufgenommen (Eckert R `02). Die Zotten sind Ausstülpungen aus großen zirkulären Falten der Mukosa. Jede absorbierende Epithelzelle hat an ihrer apikalen Oberfläche eine gestreifte Struktur. Sie stellt einen Bürstensaum aus engstehenden Mikrovilli dar, die pro Zelle zahlreich (ca.  $2 \cdot 10^5/\text{mm}^2$ ) vorhanden sind. Die Mikrovilli ( $0,1 \mu\text{m}$  dick /  $0,5-1,5 \mu\text{m}$  lang) sind Auffaltungen der Plasmamembran und enthalten Aktinfilamente, die mit den Myosinfilamenten an der Basis eines jeden Mikrovillus interagieren. Diese Interaktion ist für die rhythmische Bewegung der Mikrovilli verantwortlich, die hilft, den Chymus nahe der resorbierenden Oberfläche zu durchmischen. Die Oberfläche der Mikrovilli wird von der Glykokalix, einem  $0,3 \mu\text{m}$  dicken Netzwerk aus sauren Mukopolysacchariden und Glykoproteinen überzogen. In den Zwischenräumen der Glykokalix sind Wasser und Schleim in einer unbeweglichen Schicht eingelagert. Der Schleim wird von Schleim- oder Becherzellen sezerniert, die zwischen den Enterozyten sitzen (Eckert R `02).

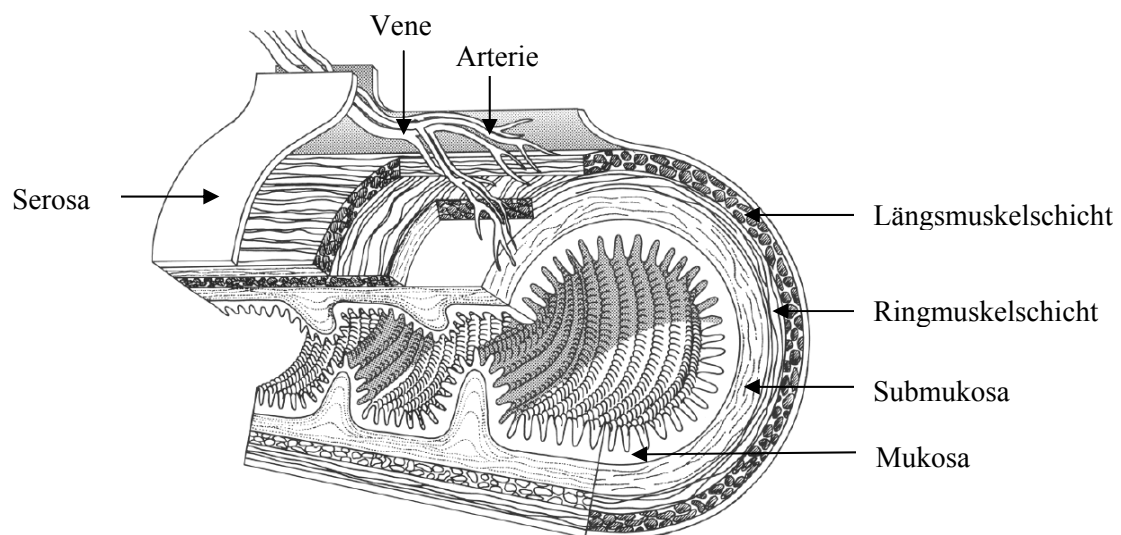


Abb. 2: Makroskopische Anatomie des Rattendünndarmes.

## 2.2 Angioarchitektur

### Extrinsische Gefäßversorgung und venöse Drainage des Intestinums

Die arterielle Gefäßversorgung des Rattendarmes erfolgt über die Arteria mesenterica superior. Der proximale Anteil des Duodenum bleibt hiervon jedoch ausgeschlossen. Es ist die obere Mesenterialarterie, aus der jejunale und ileale Arterien hervorgehen, die auf dem Weg zum Darmrand im Mesenterium mehrmals Abzweigungen und Ausprossungen zeigen. Benachbarte Gefäße anastomosieren im Mesenterium und bilden somit Arkaden. Die finale Arkade bildet ein marginales Vas anastomoticum, welches zusammen mit intramural-anastomosierenden Gefäßen in der Lage ist, einem kurzen Darmsegment, dessen mesenteriale Blutzufuhr unterbunden wurde, eine 55%-ige Kontrollperfusion zu gewährleisten (Bulkley GB '85). Darüberhinaus wird ein weitgehend planes Mikrogefäßbett im Binde- und Fettgewebe des Mesenteriums mittels der Mesenterialarterien und ihren Verzweigungen versorgt. Das Duodenum wird von einer ventralen und einer dorsalen, miteinander anastomosierenden, arteriellen Gefäßschlinge versorgt. Diese verbinden die Arteriae pancreatoduodenalis inferior (Äste der Arteria mesenterica superior) und die Arteriae pancreatoduodenalis superior (Äste der Arteria gastroduodenalis, die aus der Arteria hepatica communis hervorgeht). Die zwei anastomosierenden Schlingen grenzen an die innere Krümmung der Duodenalschlinge, die ventrale verläuft ventral und die dorsale dorsal zum Pankreaskopf. Der extrinsische venöse Abfluß des Intestinums obliegt einem mesenterialen Venennetzwerk, welches weitgehend parallel zur arteriellen Versorgung verläuft. Das venöse Blut gelangt über die Vena mesenterica superior in die Vena portae hepatis, dessen intrahepatischen Äste es in die Lebersinusoiden leiten (Warwick R '73).

### Intramurale Gefäße des Intestinums

Zahlreiche vasa recta entspringen aus der marginalen Arkadenarterie des Mesenteriums und durchdringen die äußeren Muskelschichten der Darmwand, um den submukösen arteriellen Plexus zu erreichen. Die venösen Gefäße zeigen eine ähnliche Anordnung. Jeder dieser inneren Gefäßplexus dehnt sich ringförmig um die Darmwand aus, um anti-mesenterial mit sich selber zu anastomisieren. Darüber hinaus existieren ausgedehnte



longitudinale Anastomosen (oral und aboral) dieser Gefäßplexus mit äquivalenten Gefäßen in benachbarten oralen und aboralen Segmenten des Darmes (Nylander G `61).

### Muscularis

Der mikrovaskuläre Plexus der äußeren longitudinalen und zirkulären Muskelschichten (muscularis propria) wird von arteriolen Ästen des submukösen arteriellen Plexus gebildet und versorgt. Diese Arteriolen gehen in vier bis sechs Nebenäste über, (Bohlen HG `76) um nicht fenestrierte Kapillaren zu bilden, die weitgehend parallel zu den glatten Muskelzellen ihrer jeweiligen Muskelschicht verlaufen. Somit beträgt die Diffusionsdistanz zwischen Kapillare und Muskelzelle nur einen bis einige Mikrometer.

Die Basalmembranen dieser Kapillaren sind vermutlich mit denen der glatten Muskelzellen durch Kollagenfasern (Borg TK `80) verbunden, da das innere Kapillarnetzwerk der Muscularis durch lokale Kontraktion der Muskelschicht distortiert würde.

Obwohl in unmittelbarer Nachbarschaft zum Mesenteriumrand ein geringer venöser Abfluß über die vasa recta erfolgt, wird das Mikrogefäßbett der Muskelzellen weitgehend über den submukösen Venenplexus drainiert (Gannon B `90).

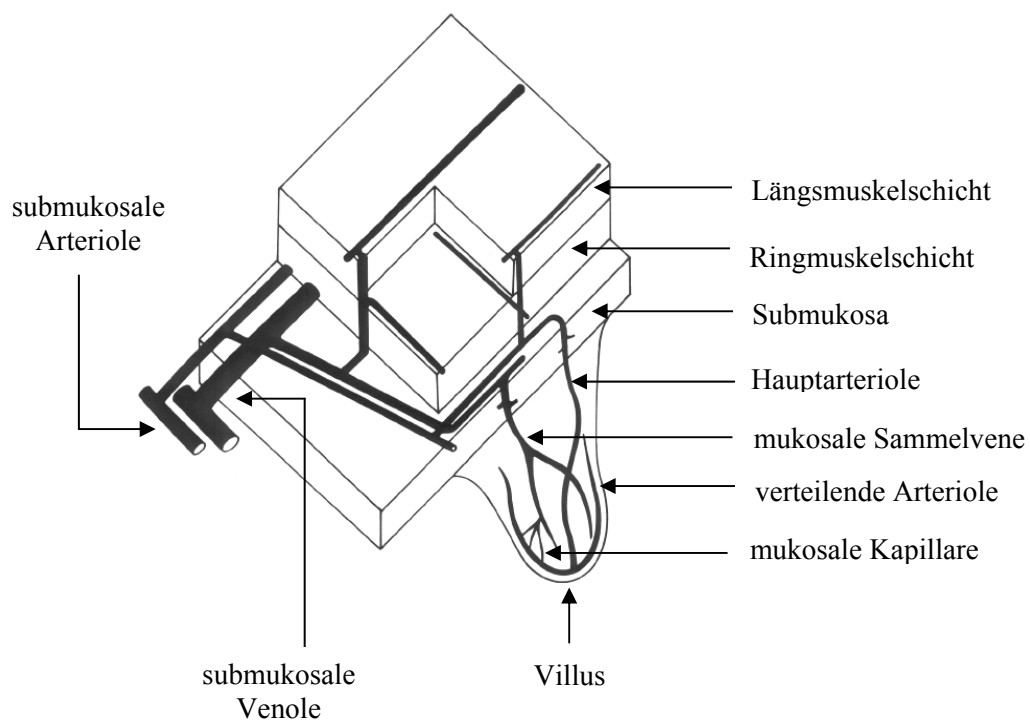


Abb. 3: Gefäßanatomie im Dünndarm der Ratte (modifiziert nach Gannon B `90).

Die den äußeren Muskelschichten aufliegende Serosa und ihr Mikrogefäßplexus werden ebenfalls durch das submuköse Gefäßgeflecht versorgt und drainiert.

Eine einzelne schuppige Mesothelzellschicht dient hierbei dem Geflecht zur Abgrenzung der Peritonealflüssigkeit und wahrscheinlich zum Austausch von Wasser und gelösten Substanzen (Gotloib L `83).

#### Submukosa

In der Submukosa befinden sich neben dem submukösen arteriellen und venösen Gefäßgeflecht einige wenige Mikrogefäße. Die vorhandenen kapillargroßen Gefäße haben vermutlich eine nutritive Funktion für das spärliche zelluläre Bindegewebe der Submukosa (Gannon B `90).

#### Mukosa / Perikryptale Geflechte

Separate Arteriolen ziehen vom submukösen arteriellen Plexus sowohl zu individuellen Villi als auch zu Gruppen benachbarter intestinaler Drüsen (Lieberkühn-Krypten) (Baez S `59, Gannon BJ `80, `81 und `89). Die einzelnen Kapillargeflechte umgeben jede intestinale Drüse mit einem korbähnlichen Netzwerk.

#### Villi / Zotten

Die Darmzotten der Ratten sind flach, von lamellenförmiger Struktur (Baker SJ `63) und um die luminale Achse orientiert. Vorangegangene Studien haben gezeigt, daß mit dem Alter vermehrt Verschmelzungen der lateralen Zottenränder mit dem Ergebnis von breiten Leisten, bzw. Wülsten auftreten (Miller DS `69).

Die Zotten werden von einer einzelnen Arteriole versorgt. Diese verläuft gewöhnlich zentral im Villuskern zum apikalen Rand. Dort teilt sie sich in zwei randständige Arteriolen, die mit der Markgrenze der Lamina propria verlaufen. Diese Arteriolen geben Kapillaräste an die beiden subepithelialen Kapillargeflechte, die der oralen, beziehungsweise aboralen Fläche des Villus zugrundeliegen, ab (Gannon BJ `80, Gore RW `77, Jacobson LF `52, Miller DS `69, Ohashi Y `76, Vogt C `81, Winne D `73). Die Villusvenole beginnt im lateralen untersten Fünftel der Zotte und sorgt für die venöse Drainage der Zottenkapillaren. Die Kapillaren der unteren 20 % des Villus anastomosieren mit den unter ihnen liegenden Kapillarringen der benachbarten 8-12 intestinalen

Drüsen, die jeweils die Basis einer Zotte umgeben. Der Blutfluß in den letzteren Kapillaren erfolgt von den perikryptalen Kapillargeflechten in die Villusvenole (Gannon B '90).

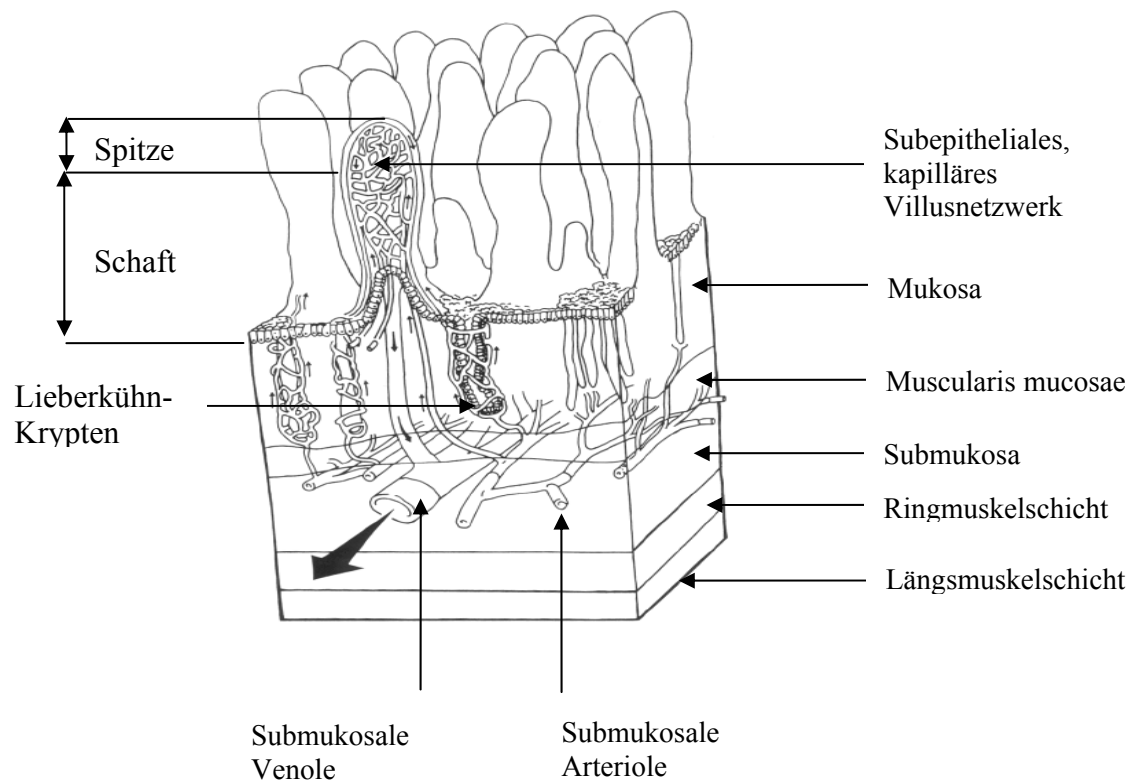


Abb. 4: Schematisches Diagramm der Blutversorgung / -drainage in der Dünndarmmukosa der Ratte (modifiziert nach Gannon B '90).

### 2.3 Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Nicht-infektiöse entzündliche Erkrankungen des Dün- und Dickdarmes sind seit längerer Zeit bekannt. Der Begriff „ulzerative Kolitis“ wurde 1859 erstmals von Wilks und Moxon benutzt. Diese zunächst deskriptive Bezeichnung hat sich allgemein durchgesetzt. Bereits im letzten Jahrhundert (1806) gibt es Berichte über Krankheiten des Dünndarmes, die man retrospektiv als „Ileitis terminalis“ einordnen kann und 1885 wurden Fallbeschreibungen der Colitis ulcerosa in Großbritannien veröffentlicht (Allchin P `85). 1909 waren bereits 317 Fälle von Colitis ulcerosa beschrieben (Hawkins HP `09). 1913 wurden neun Patienten mit einer „chronisch intestinalen Enteritis ohne Tuberkulose“ dargestellt (Dalziel TK `13). 1932 erfolgte die Beschreibung der „regionalen Ileitis“, die später nach dem Erstautor dieser Arbeit als „Morbus Crohn“ bezeichnet wurde (Crohn BB `32). In den 60er Jahren wurde erkannt, daß die regionäre Enteritis auch im Dickdarm auftritt. Die Bezeichnung „Morbus Crohn“ wird heute für Manifestationen in allen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes benutzt.

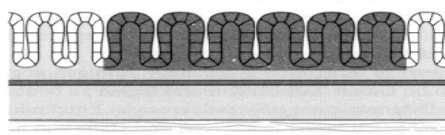
#### Definition

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) lassen sich einteilen in Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sowie in eine nicht klassifizierbare Kolitis (Colitis indeterminata). Beide Erkrankungen teilen eine Reihe von Gemeinsamkeiten, unterscheiden sich jedoch in charakteristischen Eigenschaften. Zur Unterscheidung werden vor allem Befallsmuster, makroskopischer Befund und Histologie herangezogen. Der Manifestationsgipfel dieser Erkrankungen liegt zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr. Beide Erkrankungen weisen lebenslangen Charakter auf (Malchow H `86). Der Morbus Crohn ist durch einen diskontinuierlichen Charakter gekennzeichnet, da häufig gleichzeitig weit voneinander entfernt liegende Abschnitte des Intestinaltraktes befallen sind (Malchow H `86). Es handelt sich beim MC um eine ungleichmäßig granulomatöse Entzündung. Das Entzündungsinfiltrat besteht aus T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen (Panés J `01). Die CU ist eine auf die Mukosa des Dickdarms beschränkte Erkrankung (s. Abb. 5, Malchow H `86). Im Gegensatz zum Morbus Crohn ist die Colitis ulcerosa nicht mit Granulommanifestationen assoziiert. Kryptenabszesse,

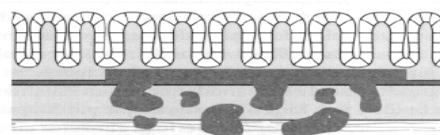
die aus Anhäufungen von polymorphnukleären neutrophilen Zellen bestehen, Epithelnekrosen, Ödeme, Einblutungen sowie chronisch inflammatorische Entzündungszellen sind typisch für Colitis ulcerosa (Panés J `01).

### 2.3.1 Befallsmuster

Das anatomische Korrelat der auf molekularer Ebene stattfindenden immunologischen Prozesse ist beim Morbus Crohn die transmurale Entzündung des Verdauungstraktes, d.h. eine Entzündung, die sich von der Mukosa bis zur Serosa ausdehnen und sogar bis zur Mesenterialwurzel reichen kann (Riddell RH `00). Die Manifestationen des Morbus Crohn können bereits an den Lippen beginnen und Mund, Ösophagus, Dünndarm und Dickdarm befallen. Die häufigsten Manifestationsorte sind der ileozökale Übergang mit Befall von Zökum und Ileum. Zwei Drittel der Patienten haben einen Dünndarmbefall und ebenfalls zwei Drittel einen Dickdarmbefall (Podolsky DK `02). Der Befall des oberen Verdauungstraktes, d.h. proximal des terminalen Ileums, ist insgesamt eher selten, scheint aber doch bei Patienten mit unklaren abdominellen Schmerzen in über 40 % der Fälle aufzutreten (Ochsenkühn T `01). Bei der Colitis ulcerosa ist immer eine rektale Beteiligung vorhanden, der Befall ist kontinuierlich vom Rektum aus nach proximal (s. Abb. 6). Das Fehlen einer Rektumbeteiligung wird meist sogar als Ausschlußkriterium für eine Colitis ulcerosa, d.h. als hinweisend auf einen Morbus Crohn angesehen (Podolsky DK `02). Der Befall des gesamten Kolons tritt je nach Autor in ca. 12-37 % der Fälle auf (Miner PB `00), d.h. meistens sind nur das Rektosigmoid oder das linksseitige Kolon befallen. Der zusätzliche Befall des terminalen Ileums im Sinne einer „Backwash-Ileitis“ bei der Colitis ulcerosa ist interessanterweise mit einem gehäuften Auftreten von Kolonkarzinomen verbunden (Heuschen UA `01).



Colitis ulcerosa - mukosale Entzündung



Morbus Crohn - transmurale Entzündung

Abb. 5: Mukosale Entzündung bei Colitis ulcerosa und transmurale Entzündung bei Morbus Crohn (modifiziert nach Schölmerich J `96).

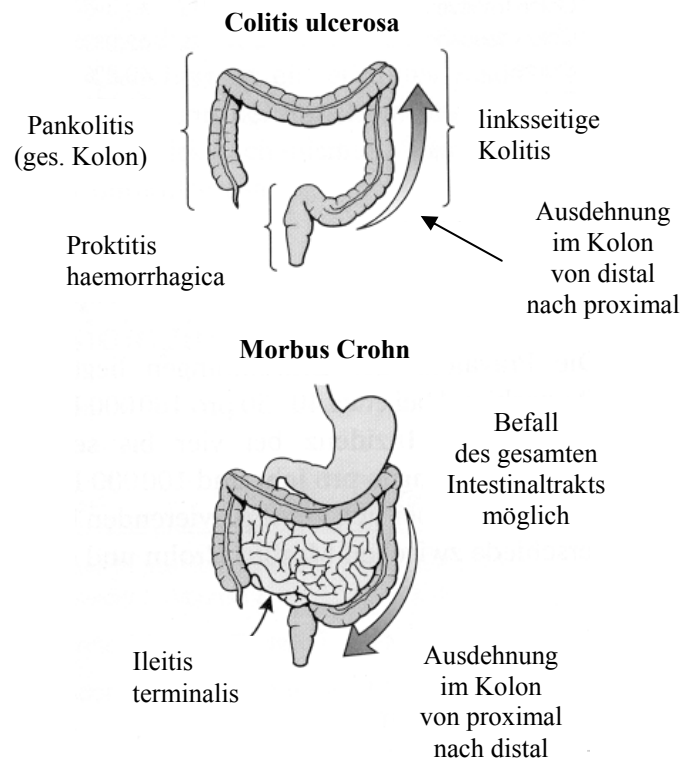


Abb. 6: Befallsmuster und -typen bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (modifiziert nach Schölmerich J '96).

### 2.3.2 Epidemiologie

Die Inzidenz der Colitis ulcerosa schwankt sehr stark in Abhängigkeit vom untersuchten Patientenkollektiv zwischen 3 und 14 erstdiagnostizierten Erkrankungen pro 100 000 Einwohner und Jahr. Die Inzidenz des Morbus Crohn stieg bis in die 70er Jahre kontinuierlich an und liegt seither ebenfalls bei 4 bis 15 jährlichen Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner. Die Zahlen zur Prävalenz sind bei beiden Erkrankungen ähnlich und liegen in Deutschland bei etwa 40-50 pro 100 000 Einwohnern. Die Erkrankungsrate liegt bei Männern etwas höher als bei Frauen (Goebell H '94). Für beide Erkrankungen besteht eine geographische und ethnische Häufung mit Bevorzugung von Nordeuropäern und Nordamerikanern sowie bestimmten jüdischen Volksgruppen (Aschkenasim)(Shivananda S '96, von Tirpitz C '03).

### 2.3.3 Ätiologie

Die Ätiologie der Erkrankungen ist nach wie vor unbekannt. Ebenso wenig ist klar, ob beide Erkrankungen eine gemeinsame Ätiologie haben und sich nur durch ihre klinische Expression unterscheiden. Noch vor wenigen Jahren wurden Patienten durch die in den 70er Jahren weit verbreitete Meinung, daß es sich bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen um den Inbegriff einer psychosomatischen Erkrankung handle, stigmatisiert (Sheffield BF '76). Die letzten Jahre haben jedoch deutlich gemacht, daß die Voraussetzungen für die Entwicklung eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa in Veränderungen der menschlichen Keimbahnen zu suchen sind (Podolsky DK '02). Es ist unstrittig, daß den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine genetische Disposition zugrunde liegt. Wie bei anderen genetisch determinierten Erkrankungen, z.B. der familiären Polyposis oder familiären Hypercholesterinämie, konnten Familien mit überzufällig häufigem Auftreten von CED gefunden werden. Innerhalb dieser Familien scheint das Befallsmuster der CED, also Ort und Ausmaß der Erkrankung, ähnlich zu sein (Orholm M '91). Das Risiko, an einer CED zu erkranken, ist überzufällig hoch in Familien mit anderen seltenen genetischen Erkrankungen, wie z.B. dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (Podolsky DK '02). Verwandte ersten Grades eines CED-Patienten erkranken ebenfalls häufiger an einer CED. So haben etwa 20 bis 30 % der Patienten eine positive Familienanamnese, monozygote Zwillinge erkranken häufiger als heterozygote (Tysk C '88), die Erkrankungsrate ist bei jüdischen Kaukasiern drei- bis achtfach höher als bei nicht-jüdischen Kaukasiern. Im Rahmen von Erbgutanalysen an CED-Familien sind zahlreiche Kandidatengene identifiziert worden, die in Beziehung zu Allelen stehen, die wiederum mit der Entstehung und Steuerung von entzündlichen Prozessen in Zusammenhang gebracht werden (Podolsky DK '02). Es wurden verschiedene Assoziationen mit Antigenen des HLA (human leukocyte antigen) -Komplexes beschrieben, die entsprechenden Befunde sind jedoch nicht konsistent und möglicherweise regional sehr unterschiedlich (Satsangi J '94, Yang H '93). Schon vor mehreren Jahren wurde berichtet, daß Veränderungen auf bestimmten Chromosomen mit dem Entstehen von Morbus Crohn (Rutgeerts P '91), andere eher mit dem Entstehen von Colitis ulcerosa (Orholm M '91, Hugot JP '96, Ogura Y '01, Cosnes J '01), verbunden sind. Die intensiviertere Untersuchung von Chromosom 16 bei CED-Familien hat dann zur

Abgrenzung eines Genlokus, genannt IBD<sub>1</sub>, geführt, der mit dem gehäuften Auftreten von Morbus Crohn verknüpft war (Hugot JP '96). Eine detaillierte Analyse von Chromosom 16 führte schließlich zur Identifizierung eines der an der Krankheit mitbeteiligten Gene (Hugot JP '01, Ogura Y '01). Dieses Gen ist verantwortlich für die Kodierung eines zytoplasmatischen Proteins, das ursprünglich als NOD 2 und inzwischen als CARD 15 (caspase activation and recruitment domain) bezeichnet wurde. CARD 15 wird hauptsächlich in Makrophagen exprimiert und agiert in der Erkennung bakterieller Antigenstrukturen, die der Darmmukosa vom Darmlumen aus angeboten werden. Bakterielle Antigenstrukturen scheinen aufgrund einer bei CED-Patienten beobachtbaren Barrierestörung der Mukosa leichter aus dem Lumen in die Mukosa zu gelangen (Schmitz H '99). Grundlage der genetischen Prädisposition könnten somit Permeabilitätsstörungen des Darmes (Hollander D '93), Veränderungen der intestinalen Barriere durch Störungen der komplexen Mucinmatrix (Podolsky DK '88), Störungen des Stoffwechsels von Oxidanzien oder Fettsäuren (Roediger W '91) und schließlich immunologische Primärdefekte sein. Die Tatsache, daß verschiedene experimentelle Defekte des Immunsystems, wie eine Defizienz von Interleukin-10 oder Interleukin-2 und das Vorliegen von T-Zell-Rezeptormutationen mit dem Bild einer Enterokolitis einhergehen, weist in diese Richtung. Eine Assoziation zwischen Colitis ulcerosa und dem Auftreten eines bestimmten antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörpers, der bei Betroffenen familär vermehrt vorkommen soll und gleichzeitig mit HLA-DR2 assoziiert ist, wurde ebenfalls in diese Richtung gedeutet (Yang H '93). Schließlich wurde eine gestörte Balance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen als Primärdefekt diskutiert (Isaacs KL '92), ebenso wie eine gestörte Downregulation von Makrophagen beispielsweise durch IL-4 (Schreiber S '95). Diese zahlreichen Veränderungen weisen auf eine wichtige Rolle des intestinalen Immunsystems in der Pathogenese beider Krankheiten hin. Ein besseres Verständnis der Entstehung des Zellinfiltrates, der Adhäsion zirkulierender Entzündungszellen und der lokalen immunologischen Aktivierung war deshalb das Ziel zahlreicher Untersuchungen. Das Vorkommen einiger Zelladhäsionsmoleküle wurde im gesunden menschlichen Darm beschrieben (Malizia G '91, Koizumi M '92, Ohtani H '93, Nakamura S '93), ihre Bedeutung für MC und CU ist aber noch nicht endgültig geklärt. Insbesondere ist der Anteil



ICAM-1 und LFA-1 positiver mononukleärer Zellen bei CU in Kolonbiopsaten erhöht sowie der Anteil ICAM-1 positiver mononukleärer Zellen in Biopsaten bei MC (Malizia G '91). Einige Zelladhäsionsmoleküle kommen auch in sogenannten Frühläsionen von CED im Vergleich zu Normalgeweben vermehrt vor und tragen somit zur Entstehung des zellulären Entzündungsinfiltrates bei (Schürmann G '93). Im Gegensatz hierzu liefern epidemiologische Daten klare Hinweise für eine Beteiligung von Umweltfaktoren. Neben einer Häufung in Ländern der sogenannten industrialisierten westlichen Welt, findet sich eine Häufung in städtischen Gebieten gegenüber ländlichen Gegenden. Zu den in Frage kommenden Umweltfaktoren zählen Mikroben, Ernährungsfaktoren, Medikamente und toxische Substanzen (Podolsky DK '02). Auch ein erhöhter Hygienestandard in der Kindheit scheint mit einem Morbus Crohn assoziiert zu sein, ebenso wie Geburten während Masernepidemien (Ekbohm A '94, Gent AE '94). Gesichert ist ein erhöhtes Risiko von Morbus Crohn bei Rauchern und ein „protektiver Wirkmechanismus“ des Rauchens bei Colitis ulcerosa (Bridger S '02). Darüberhinaus scheint eine frühe Appendektomie das Risiko zu vermindern, an einer Colitis ulcerosa zu erkranken (Andersson RE '01). Auf der Grundlage der beschriebenen genetischen Veränderungen, die wohl zu einer fehlgeleiteten Erkennung bakterieller Antigene führen, ist der Einfluß der Darmflora in der Entstehung der CED erforderlich und mitentscheidend. Im Tiermodell entwickeln Mäuse und Ratten nur dann spontane Kolitiden, wenn gleichzeitig eine luminale Flora vorhanden ist. Tiere, deren Anfälligkeit für intestinale Entzündungen durch genetische Manipulation verstärkt wird, entwickeln keine Kolitis, solange sie in einer keimfreien Umgebung aufgezogen werden. Erst wenn diese Mäuse mit einer normalen Darmflora inkubiert wurden, kam es zu einer Entzündung des Kolons (Rath HC '01, Seibold F '00). Beim Menschen ist dieses Phänomen ebenfalls zu beobachten. Die Ruhigstellung des Darmes, die z.B. durch Nulldiät mit parenteraler Ernährung oder durch die Anlage eines Ileostomas proximal der Läsion erreicht werden kann, führt bei CED-Patienten im Schub zu einer deutlichen Besserung der Symptomatik und z.T. auch zur Einleitung einer Remission (Ostro MJ '85). Umgekehrt führt die Rückverlagerung eines Ileostomas gehäuft zum Wiederaufflammen der Schleimhautentzündung (Rutgeerts P '91).

### 2.3.4 Pathophysiologie

Das pathogenetische Korrelat der CED, das als Resultat des Einflusses genetischer und umweltbedingter Faktoren schließlich den Phänotyp der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ausmacht, ist eine anhaltende Aktivierung der Immunantwort der Darmschleimhaut (Podolsky DK `02). Ob das Immunsystem durch die Unfähigkeit, den Entzündungsprozess wieder zu begrenzen, oder durch eine kontinuierliche Überaktivierung überreagiert, ist noch unklar (Mashimo H `96). Obwohl ein Progress bei der Aufklärung zur Pathogenese beider Erkrankungen beobachtet werden kann, bleiben die Ursachen bislang unbekannt. Die zur Zeit vertretende und meist umfassende Hypothese besagt, daß es sich bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen um eine heterogene Gruppe von Krankheiten handelt, die eine gemeinsame Manifestation als mukosale Entzündung haben und bei denen mehrere genetische und verschiedene Umweltfaktoren pathologisch eine Rolle spielen (Sartor RB `97, Fiocchi C `98). Die mukosale Entzündung ist das Ende einer Prozesskaskade, welche durch Antigene unterschiedlicher Art initiiert wurde (Panés J `01). Hierzu weisen, wie oben beschrieben, verschiedene CED-Tiermodelle auf die nicht-pathogene Darmflora als einen essentiellen Faktor im Entzündungsprozess hin (Sadlack B `93, Taurog JD `94). Das Konzept, daß die Normalflora gewissermaßen als Modulator für eine „physiologische Entzündung“ fungiert, ist durch Beobachtungen von Duchmann R et al. (1995) gestärkt worden. Hier konnte gezeigt werden, daß mukosale, nicht aber periphere mononukleäre Blutzellen eines CED-Patienten proliferierten, wenn sie autologen intestinalen Bakterien exponiert wurden. Zellen des gleichen Patienten aus einem Mukosabezirk, der nicht in die Entzündung involviert war sowie Zellen von Patienten in Remission, zeigten bei gleicher Exponierung keine Proliferation (Duchmann R `95). Mononukleäre Zellen aus Blut und Mukosa normaler gesunder Individuen proliferierten nicht aufgrund autologer Bakterien. Jedoch zeigte sich eine Proliferation in Antwort auf Kontakt mit Bakterien einer heterologen Darmflora. Diese Ergebnisse zeigen, daß im Gesunden eine Toleranz gegenüber autologer nicht aber allogener intestinaler Flora besteht und daß diese Toleranz während einer Entzündung verloren geht (Duchmann R `95).

Beim zweiten Schritt in der Entzündungskaskade (Abb. 7) vermutet man mindestens drei Mechanismen, durch die intestinales Epithel bei der Initiation der mukosalen

Immunantwort beteiligt ist: 1) Gesteigerte Permeabilität und intensivierete Antigenabsorption, was wiederum zu einer gesteigerten Immunstimulation führt (Wyatt J '93), 2) Transduktion der Entzündung durch Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und anderen proinflammatorischen Substanzen (Kagnoff MF '97), 3) Funktion als Antigen-Präsentations-Zellen (APC's). Im Normalfall wird das Antigen durch eine APC aufgenommen und transportiert, um dann im Zusammenhang mit dem Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) präsentiert zu werden (Abb. 7). T-Zellen erkennen ein spezifisches antigenes Epitop durch Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an ein passendes MHC-Molekül. In CED wird eine T-Zell-Aktivierung begünstigt, wenn die Enterozyten die Antigen-Präsentation übernehmen (s. APC's) (Mayer L '91).

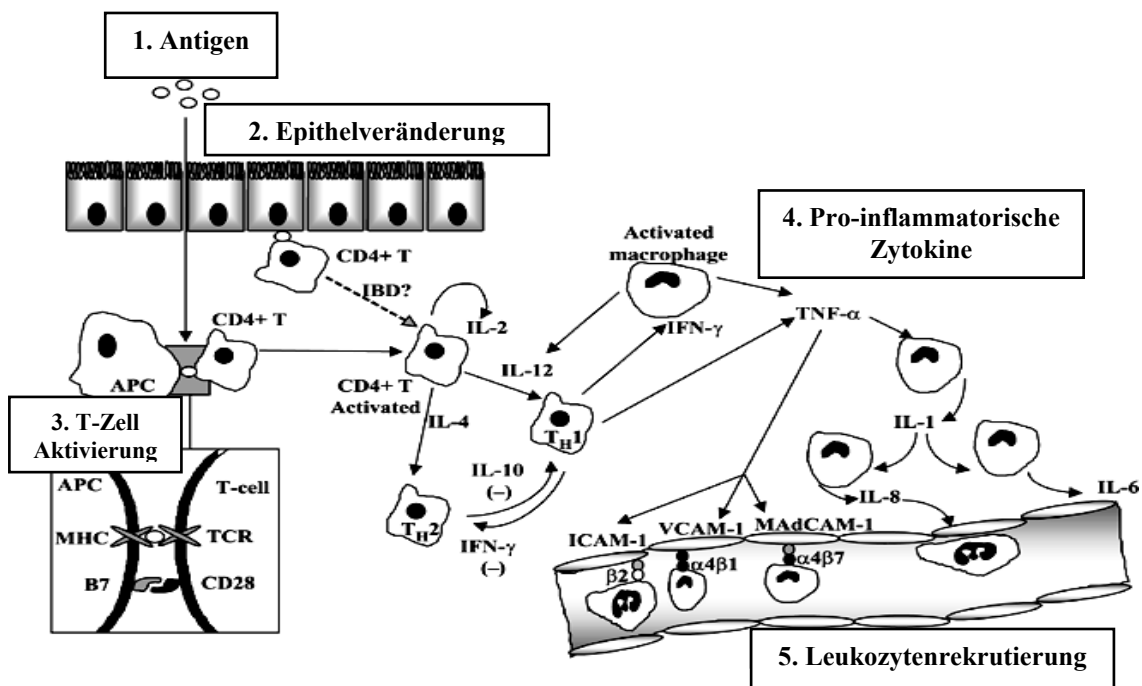


Abb. 7: Pathophysiologische Mechanismen in CED (modifiziert nach Panés J '01).

(1) Die mukosale Entzündung wird durch Antigene, wie z.B. Bakterien der Darmflora getriggert. Das intestinale Epithel (2) kann durch eine gesteigerte Permeabilität, eine Intensivierung der Antigenabsorption, einer Transduktion der Entzündung und durch Funktion als Antigen-Präsentierende-Zelle (APC) bei der Initiierung der mukosalen Entzündungsantwort beteiligt sein. Makrophagen nehmen das Antigen auf (3) und präsentieren es in Zusammenhang mit dem Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) den CD4+ Zellen. Nach Aktivierung der Makrophagen setzen diese die proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor - alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin (IL)-12 frei (4) und induzieren damit eine T<sub>H</sub>1-vermittelte Immunantwort. Alternativ hierzu führt eine IL-4 Produktion zu einer vermehrten T<sub>H</sub>2-vermittelten Immunantwort und zu einer Expression von IL-10. Zirkulierende Entzündungszellen werden über eine koordinierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen (Selektine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie) aus dem Blutstrom rekrutiert (5).

Im weiteren Verlauf folgt die Lymphozytenaktivierung (s. Abb. 7). Hauptfunktion der T- und B-Lymphozyten ist die Immunantwort auf die Antigenstimulation. Eine Antigen-Rezeptor-Bindung führt unmittelbar zur Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren, die eine neue Genexpression antreiben und spezifische Gensequenzen in ruhenden, nicht aktivierten Zellen ausschalten. Die Bindung zwischen MHC Klasse-II Antigen auf der APC und dem T-Zell-Rezeptor (TCR)-CD4-Komplex verleiht der T-Zell-Aktivierung Antigen-Spezifität, ist jedoch nicht ausreichend, um eine adäquate Immunantwort zu initiieren (Lenschow DJ '93). Ein zweites co-stimulatorisches Signal ist nicht antigenspezifisch, jedoch essentiell für die T-Zell-Aktivierung. Bindet ein B7-Molekül der Oberfläche der APC an CD28 auf der T-Zell-Oberfläche, startet die Aktivierung (Abb. 7). Ohne dieses Signal würde eine T-Zell-Toleranz oder Apoptose eintreten. Innerhalb einiger Tage nach Aktivierung exprimieren die T-Zellen einen zweiten B7-Liganden, das zytotoxische T-Lymphozyten Antigen (CTLA)-4, welches die Interleukin (IL)-2 Expression inhibiert und somit durch Verminderung einer weiteren T-Zell-Proliferation, einer überschießenden Immunantwort entgegenwirkt (Janeway CA '94). CD4 T-Zellen können sich nach Aktivierung entweder in  $T_H1$  oder  $T_H2$ -Zellen differenzieren, die sich dann in der Zytokinproduktion und somit in ihrer Funktion unterscheiden. Welche Differenzierungsrichtung eine CD4-Zelle einnimmt, entscheidet sich unmittelbar nach Antigenkontakt. Spezifische Charakteristika des Antigens und das zweite co-stimulatorische Antigen (s.o.) entscheiden darüber, ob eine Zell-vermittelte Immunität ( $T_H1$ ) oder eine humorale Immunität ( $T_H2$ ) vorherrschen wird.  $T_H1$ -Zellen produzieren IL-2 und Interferon (IFN)-gamma.  $T_H2$ -Zellen produzieren das für sie charakteristische IL-4, IL-5 und IL-10 (Sartor RB '97). Studien mit MC-Patienten legen nahe, daß bei diesen Patienten primär eine  $T_H1$ -vermittelte Immunantwort dominiert (Plevy SE '97), während bei CU eine vermehrte humorale Immunantwort beobachtet worden ist (Desreumaux P '97). Darüberhinaus spielen die Makrophagen eine wichtige Rolle in der mukosalen Immunantwort. Interferon- $\gamma$ , welches durch aktivierte T-Zellen produziert wird, führt zur Aktivierung der Makrophagen. Diese produzieren dann IL-12 und IL-18 (s.Abb. 7) und steuern somit zur Differenzierung der  $T_H1$ -Zellen bei (Pizarro TT '99). Das Interferon- $\gamma$ , welches wiederum durch die  $T_H1$ -Zellen sezerniert wird, inhibiert die Differenzierung der  $T_H2$ -Zellen. Auf der anderen Seite ist es die Produktion von IL-10 durch die  $T_H2$ -Zellen, welches eine  $T_H1$ -gestützte Antwort vermindert. Aktivierte

Makrophagen produzieren darüberhinaus eine große Menge proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-1, Tumornekrosefaktor und das Chemokin IL-8. Der TNF ist in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von großer Bedeutung für proinflammatorische Effekte (Neurath MF '97). Die TNF-Produktion führt über einen Rückkopplungsmechanismus zur Makrophagenaktivierung und als co-stimulatorisches Signal führt TNF zu einer zunehmenden T-Zell-Antwort (Fiocchi C '98). Der Tumornekrosefaktor induziert die Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf vaskulärem Endothel (s.Abb. 7) und steuert somit zur Rekrutierung von neuen inflammatorischen Zellen aus dem Blutstrom in die Mukosa bei (Salas A '00). Diese Rekrutierung von Entzündungszellen aus der systemischen Blutzirkulation ist ein bedeutender Schritt in Bildung und Ausdehnung der Entzündung (Panés J '01).

Zusammenfassend findet sich bei beiden Erkrankungen eine überschießende Aktivierung des intestinalen Immunsystems, die in einer Kaskade über die Bildung von Zytokinen und Immunglobulinen sowie weiterer chemotaktischer Faktoren zur Immigration von polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen / Monozyten führt, die wiederum eine Vielzahl von Mediatoren, wie Leukotriene, plättchenaktivierenden Faktor und Sauerstoffradikale freisetzen, die schließlich zur Destruktion der Zielzelle führen.

Effekt	Mediatoren
Akute Phase (Temperatur ↑, Gewicht ↓, Albumin ↓)	IL-1, IL-6, TNF α
Permeabilität des Epithels ↑	IFN, LTB <sub>4</sub> , PAF, OH-
Endothelschaden (Ischämie)	IL-1, TNF α, IL-2, LTB <sub>4</sub> , PAF, OH-
Kollagen ↑ (Fibrose)	IL-1, IL-6, TNF α
Zellproliferation der Epithelzellen (Villushöhe ↑)	GMCSG, TGF β

Tab. 1: Konsequenzen der Immunaktivierung bei Morbus Crohn (Schölmerich J '96).

### 2.3.5 Klinik und Verlauf

Morbus Crohn ist eine chronische Erkrankung, die auf alle vitalen, psychischen und sozialen Funktionen und Kontakte Einfluß nimmt. Die Krankheit verläuft schubweise, ohne daß man Zeitpunkt und Häufigkeit der Schübe vorhersagen kann. Es gibt jedoch auch

sehr milde Verläufe mit nur geringen Beschwerden. Eine Prognose über den weiteren Verlauf ist nicht möglich (von Tirpitz C '03). Führende Symptome des Morbus Crohn sind chronische Durchfälle mit und ohne Blutbeimengungen, gelegentlich Opstipation, perianale Fisteln und besonders bei ileozökalem Befall rezidivierende Schmerzen im rechten Unterbauch (Tab. 2, Rath H '98). Es werden intestinale und extraintestinale Komplikationen sowie indirekte Folgeerkrankungen unterschieden. Die wichtigsten intestinalen Komplikationen sind Stenosen, Strikturen und Abszesse, während Leber-Galle-Manifestationen und Arthralgien zu den häufigsten extraintestinalen Manifestationen zählen (von Tirpitz H '03). Der Morbus Crohn ist durch einen stark fluktuierenden natürlichen Krankheitsverlauf gekennzeichnet, die Rezidivrate ist nicht vorhersehbar und schwankt in Abhängigkeit von der Patientengruppe und den Risikofaktoren stark. Chronisch aktive Verläufe kommen vor. Das Risiko von Dünndarmkarzinomen ist deutlich erhöht, diese sind aber dennoch selten. Das Überleben ist gegenüber der gesunden Population geringfügig vermindert (Munkholm P '93).

	Morbus Crohn (n=279)	Colitis ulcerosa (n=113)
Durchfälle	89.5 %	96.4 %
Blutbeimengungen	27.3 %	89.3 %
Schmerzen	86.9 %	81.3 %
Allgemeines Unwohlsein	81.7 %	40.2 %
Gewichtsverlust	59.6 %	38.4 %
Arthralgien	29.2 %	27.7 %
Fieber	24.7 %	20.5 %
Hautveränderungen	14.2 %	15.2 %
Appetitlosigkeit	18.7 %	11.6 %
Ophthalmopathien	3.8 %	7.1 %
Übelkeit	28.1 %	6.3 %
Erbrechen	20.2 %	4.5 %
Abszesse	25.8 %	3.6 %
Fisteln	39.3 %	3.6 %
Lymphknotenschwellungen	2.6 %	1.8 %

Tab. 2: Initialsymptome von CED (Rath H '98).

Das Hauptsymptom der Colitis ulcerosa sind blutig-schleimige Durchfälle, die nicht immer mit Schmerzen verbunden sind (s. Tab. 2) (Rath H '98). Bei einem aus-

schließlich im Rektum lokalisiertem Befall findet sich das Blut überwiegend an der Oberfläche eines häufig normal geformten Stuhls. Das Blut ist bei ausgedehntem Befall des Kolons mit dem Stuhl durchmischt. Die Beteiligung des Rektums bewirkt bei der CU einen ständigen Stuhldrang und eine schmerzhafte Stuhlentleerung. Bauchschmerzen treten je nach Ausbreitung der Entzündung meist im linken Unterbauch auf. Eine aktive Sekretion von Flüssigkeit in das Darmlumen bewirkt nächtliche Stuhlentleerungen und eine Gewichtsabnahme, die zusammen mit der chronischen Entzündungsaktivität zu Müdigkeit und einer verminderten Leistungsfähigkeit führen kann. Insgesamt können die Symptome der Colitis ulcerosa sehr variabel sein, wobei die Symptomatik häufig nicht mit objektivierbaren Befunden (Endoskopie, Labor) korreliert (von Tirpitz H `03). 80 % der CU-Patienten weisen lediglich eine Proktitis oder Proktosigmoiditis auf, nur bei 20 % sind ausgedehntere Dickdarmanteile oder der gesamte Dickdarm befallen. Neuere Daten zeigen, daß etwa bei der Hälfte der Patienten mit initialer Proktosigmoiditis im Verlauf eine Ausdehnung nach proximal erfolgt. Umgekehrt kommt es auch bei der Hälfte der Patienten mit ausgedehnter Kolitis unter therapeutisch-medikamentöser Kontrolle zu einer Regression (Tab. 3) (Langholz E `95). Veränderungen der Ausdehnung sind insbesondere dann zu erwarten, wenn bisher nicht beobachtete Symptome neu auftreten.

Ausgangszustand		Entwicklung	Häufigkeit (%)
Proktosigmoiditis	→	Ausdehnung proximal	53
ausgedehnte Colitis	→	Regression	77
Pankolitis	→	Regression	76
Auftreten neuer Symptome prädiktiv für Ausdehnung			

Tab. 3: Verlauf (Ausdehnung) der Colitis ulcerosa über 25 Jahre (Langholz E `95).

Eine spontane Besserung bei aktiver Colitis ulcerosa findet sich bei etwa der Hälfte der Patienten unter einer Plazebothherapie. Patienten, die sich in Remission befinden, verbleiben unter einer solchen Therapie ebenfalls zu etwa 50 % in Remission (Meyers S `89). 20 % der Patienten haben jedes Jahr ein Rezidiv (Langholz E `94). Die Zehn-

Jahres-Überlebensrate liegt bei 96 % der Normalpopulation, wobei diese bei Vorliegen einer Proktitis bei 98% und bei Vorliegen einer Pankolitis bei 93% liegt (Ekblom A '92). Die wichtigsten krankheitsassoziierten Komplikationen sind das toxische Megakolon, das kolitisassoziierte Karzinom und die primär sklerosierende Cholangitis. Das toxische Megakolon ist Folge einer schweren transmuralen Entzündung. Hieraus ergibt sich eine Paralyse der glatten Muskelzellen und eine Einschwemmung nicht - intestinaler Bakterien und Toxine in den Kreislauf. Die Malignominzidenz hängt von der Erkrankungsdauer und dem Befallsmuster ab. Das Karzinomrisiko steigt nach einer Krankheitsdauer von zehn Jahren an, wobei Karzinome auch schon nach kürzerer Krankheitsdauer auftreten können. Patienten mit einer totalen Kolitis haben ein höheres Risiko als solche mit einer Proktitis. Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) manifestiert sich mit Einengungen und Stenosen der extra- und intrahepatischen Gallenwege und kann zu Ikterus und Pruritus beim Patienten führen.

### **2.3.6 Therapieübersicht**

Eine kausale, medikamentöse Therapie steht derzeit nicht zur Verfügung. Das Behandlungsziel ist eine mukosale Entzündungshemmung. Dabei ist die Lokalisation der Entzündung, die Schwere des Krankheitsschubes sowie insbesondere der bisherige Krankheitsverlauf von großer Bedeutung für die Therapieentscheidungen. Zum Einsatz kommen je nach Befallsmuster topische und / oder systemische Wirkstoffe wie Mesalazin (5-Aminosalicylsäure) oder Kortikosteroide. Beim intermittierenden Krankheitsverlauf wird in der Regel eine Schubtherapie durchgeführt, während der chronisch aktive Krankheitsverlauf eine dauerhafte Immunsuppression mit Azathioprin, Methotrexat oder bei Therapieversagen Infliximab erfordert.

Im akuten Schub beim MC kommen systemische Glukokortikosteroide und Antibiotika zum Einsatz. Bei einer mäßigen Entzündungsaktivität ist meist eine Therapie mit 5-ASA ausreichend. Einzelne Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf und Fisteln profitieren von dem TNF- $\alpha$ -Antikörper (Infliximab). Operative Interventionen, wie z.B. Darmresektionen, sind bei narbigen Stenosen oder enteralen Abszessen, bzw. Fisteln indiziert.



Morbus Crohn	Aktive Erkrankung			Remissionserhaltung	
	Fisteln	geringe Aktivität	hohe Aktivität	Medikamentöse Remission	Chirurgische Remission
5-ASA: Klysmen Oral	- -	+ +	- -	- ±	- +
Antibiotika Glukokortikosteroide (system. / topisch)	+ -	+ +	+ -	? -	± -
Klysmen Oral Intravenös	- - -	+ + -	- + +	- - -	- - -
Azathioprin / 6-Mercaptopurin	+	-	+	+	+
Methotrexat	?	-	+	?	?
Cyclosporin	+	-	+	-	-
Infliximab	+	-	+	-	-

Tab. 4: Therapie des Morbus Crohn in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität und dem Befallsmuster (von Tripitz C '03).

Grundsätzlich sollten bei der CU topisch wirksame Medikamente eingesetzt werden, wenn es die Entzündungskolalisation erlaubt. Im akuten Schub kommen meist systemische Glukokortikoide zum Einsatz. Bei einer fulminanten Kolitis wird zusätzlich mit Cyclosporin therapiert. Bei therapierefraktären schweren Verläufen oder ggf. histologisch nachgewiesenen Dysplasien sollte eine Proktokolektomie durchgeführt werden.

Colitis ulcerosa	Aktive Erkrankung			Remissionserhaltung
	Distale Kolitis	geringe Aktivität	hohe Aktivität	
5-ASA: Klysmen Oral	+ +	+ +	- -	+ +
Antibiotika Glukokortikosteroide (system. / topisch)	- -	- -	- -	- -
Klysmen Oral Intravenös	+ + +	+ - -	- + +	- - -
Azathioprin / 6-Mercaptopurin	+	-	+	+
Methotrexat	-	-	-	-
Cyclosporin	+	-	+	-

Tab. 5: Therapie der Colitis ulcerosa in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität und dem Befallsmuster (von Tripitz '03).

## 2.4 Adhäsionsmoleküle und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Wanderung zirkulierender Zellen durch den Körper, ihre Anheftung an Gefäßendothelien und ihre Invasion in Gewebe sind physiologische und pathophysiologische Prozesse, die bisher nur wenig verstanden werden. Zahlreiche biologische Funktionen hängen von einer gerichteten Wanderung mobiler Zellen ab. Eine Schlüsselrolle hat dabei die Interaktion zwischen zirkulierenden Leukozyten und Gefäßendothelzellen. Die hieraus resultierende Rekrutierung von Entzündungszellen aus dem systemischen Blutfluß ist ein kritischer Schritt bei der Ausbildung der Entzündungsantwort. Die Erkenntnis, daß die Leukozyten fest an den Gefäßendothelzellen gebunden werden müssen, um eine Organdysfunktion und einen Gewebeschaden, wie man sie z.B. bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen findet, vermitteln zu können, hat zu vielfältigen Untersuchungen geführt, um die Faktoren der Zell-Zell-Interaktionen zu definieren (Panés J '01). Sowohl die Leukozyten selber als auch die Endothelzellen sind beteiligt, den Leukozyt beim Übertritt von der Kapillare in die postkapilläre Venole zu verlangsamen, damit er in das umliegende Gewebe migrieren kann.

Diese Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Rahmen von Zelladhäsions- und Zellmigrationsprozessen muß reversibel, schnell und möglichst spezifisch sein. Dazu dient eine komplexe Zelladhäsionskaskade, die durch zahlreiche Zelladhäsionsrezeptoren, allgemeiner als Zelladhäsionsmoleküle bezeichnet, reguliert wird. Adhäsionsmolekül ist hierbei ein allgemeiner Ausdruck für die verschiedenen Moleküle, die zum Rekrutierungsprozess von Entzündungszellen beitragen. Diese sind oberflächengebundene Glykoproteine, welche sowohl auf Leukozyten als auch auf Endothelzellen zu finden sind. Diese Moleküle funktionieren als molekulare Bindungsstelle zwischen ex- und internem Zellmilieu. Bei allen Molekülen handelt es sich um transmembranöse Proteine mit verschiedenen Domänen. Hierbei befindet sich die größere Domäne extrazellulär. Diese ist mit einem intra-membranösen Segment verbunden, welches als zytoplasmatische Funktionsdomäne Zellfunktionen, wie z.B. die Modulation des Zytoskeletts oder die Aktivierung sekundärer Botensysteme (Durum SK '93) beeinflussen, bzw. steuern kann (Ala A '03). Das Rezirkulations- und Adhäsionschema wurde durch Reinjektion von fluoreszenz- und radiomarkierten isolierten Zellen „in vivo“ etabliert. Gereinigte Proben von Adhäsionsmolekülen hingegen konnten lange Zeit aufgrund des

Fehlens einer geeigneten *in vitro*-Methode nicht gewonnen werden. Stamper und Woodruff gelang 1976 ein entscheidender Durchbruch auf diesem Feld. Ihre Technik beinhaltete die *in vitro*-Bindung von verschiedenen Leukozyten an HEVs (high endothelial venules) in Gefäßschnitten von Zielorganen (Stamper HB '76). Gewonnene Antikörper von Tieren, die entweder gegen Leukozyten oder Endothelzellen immunisiert waren, wurden nach ihrer Fähigkeit selektiert, die Bindung von Leukozyten an HEVs in Gewebeschnitten zu inkubieren. Die erfolgreichen Antikörper wurden dann benutzt, um Adhäsionsmoleküle zu charakterisieren und zu reinigen und später dann das korrespondierende Gen zu klonen. Obwohl es sich um eine rudimentäre Probe handelte, lieferte sie einen großen Ertrag von Adhäsionsmolekülen. Diese wurden als Selektine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie identifiziert.

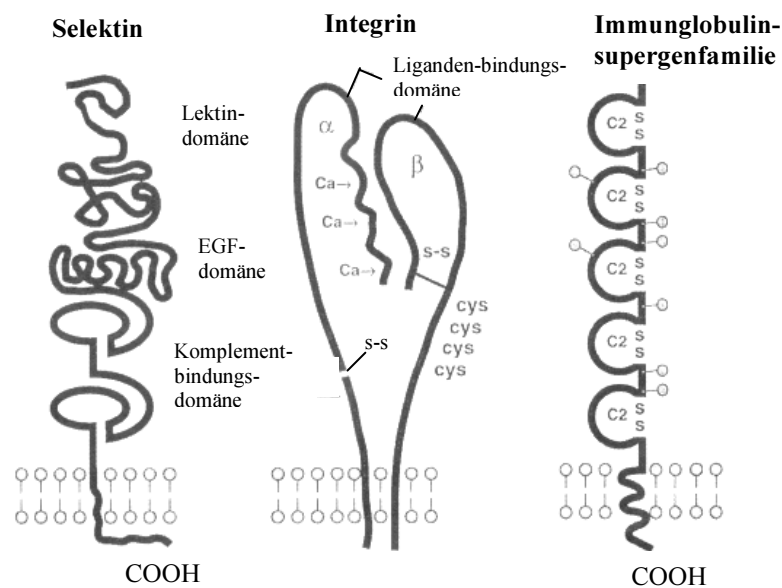


Abb.8: Schematische Molekularstruktur der Adhäsionsmolekülklassen - C2=konstante Ig-Domäne2, A1=IgA-Domäne, S-S =Disulfidbrücken (modifiziert nach Imhof BA '97).

#### 2.4.1 Selektine und ihre Liganden

L-Selektin war das erste Molekül, welches durch diese Methode 1983 an der Stanford University in Kalifornien entdeckt wurde (Gallatin WM '83). Die Selektine, unterteilt in L-, P-, und E-Selektin, sind Adhäsionsmoleküle, die auf Leukozyten (L), Thrombozyten

(P = Platelets) und Endothelzellen (E) oder allein auf Endothelzellen (E) gefunden werden. Diese Rezeptoren gehören einer Familie an, weil sie eine gemeinsame Mosaikstruktur teilen. Diese Struktur besteht aus einem N-terminalen Lektin, einer einzelnen epidermalen growth factor (EGF)-ähnlichen Domäne, mehreren kurzen übereinstimmenden Wiederholungen (SCR) - ähnlich zu jenen, die in Komplement-regulierenden Proteinen gefunden werden, einer transmembranösen Domäne und einer kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne. Die Lektin-Domäne ist die zentrale Struktur des Moleküls, um Liganden zu binden. Diese Funktion beschränkt sich fast ausschließlich auf das Gefäßsystem. Jedes Selektin erkennt spezifische Karbohydratase-sequenzen, wie z.B. sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) (Varki A '97) und vermittelt hierdurch einen lockeren, reversiblen Kontakt zwischen den Zellen (Lasky LA '95).

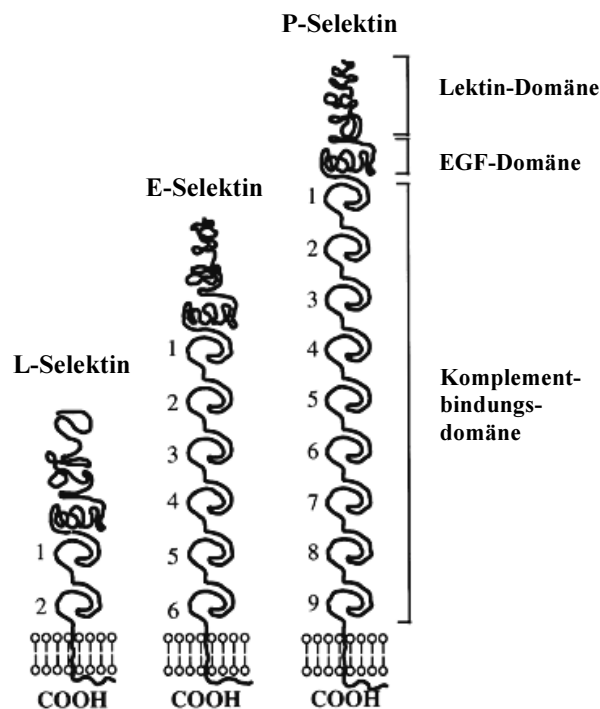


Abb. 9: Molekularstruktur von L-, E-, und P-Selektin (modifiziert nach Panés J '98).

L-Selektin (Synonyme: LECAM-1, LAM-1, leucocyte adhesion molecule 1, CD62L, Leu-8/TQ-1-antigen, MEL-14-antigen und gp90<sup>mel</sup>) ist das kleinste der vaskulären Selektine und wird von den meisten Leukozyten konstitutionell exprimiert. Es ist beschrieben als ein Lymphozyten „homing receptor“, der am initialen Kontakt der Lymphozyten an den HEVs peripherer Lymphknoten beteiligt ist (Collett C '99). Die ausgedehnte Verteilung auf allen Leukozytenklassen hat jedoch eine einzelne spezifische Funktion dieses Rezeptors verworfen. Tatsächlich trägt L-Selektin sowohl zum Lymphozyten- als auch zum Neutrophileneinzug in Entzündungsgewebe bei. Auch wurde festgestellt, daß Lymphknoten von L-Selektin-defizienten Mäusen eine verminderte Anzahl von Leukozyten enthalten (Arbones ML '94). Nachdem die Leukozyten am Endothel gebunden wurden und eine chemotaktische Aktivierung erfolgte, trennt sich das L-Selektin von der Leukozytenoberfläche, was wiederum eine weitere Bewegung dieser Zellen auf dem Endothel limitiert. Das L-Selektin ist durch die Bindung an mehreren, vornehmlich vaskulären Liganden, am ersten lockeren Endothelkontakt der Neutrophilen beteiligt (s. Tab. 6) (Sitrin RG '01). Bislang wurden vier L-Selektin-Liganden auf den HEVs von Lymphknoten identifiziert: GlyCAM-1, MAdCAM-1, CD34 und Sgp200. Das glykosilierungsabhängige Zell-Adhäsions-Molekül-1 (GlyCAM-1) wird als physiologisch relevanter L-Selektin-Ligand betrachtet, da durch diesen Liganden periphere Blutleukozyten in vitro mit dem Gefäßendothel einen ersten lockeren Kontakt aufnehmen (Tangemann K '99). Hauptaufgabe der Ligandenbindung an L-Selektin ist die Freisetzung von Mediatoren zur weiteren Differenzierung der Entzündungsantwort (Giblin PA '97). MAdCAM-1 (Mucosal addressin cell adhesion molecule-1) ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches sowohl mit L-Selektin als auch dem  $\alpha_4\beta_7$  Integrin (s.u.) interagiert, um einen ersten Kontakt mit dem Gefäßendothel zu ermöglichen. In vivo konnte eine entscheidende Rolle für MAdCAM-1 bei der Kontaktaufnahme von Lymphozyten mit dem L-Selektin auf den HEVs der Peyerschen Plaques festgestellt werden (Bargatze RF '95). CD34 aus peripheren Mauslymphknoten bindet L-Selektin (Baumhater S '93) und CD34 aus humanen Tonsillen unterstützt die L-Selektin-abhängige Lymphozytenkontaktaufnahme mit dem Gefäßendothel (Puri KD '95). Das mit allen Selektinen interagierende PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) ist durch die Bindung an L-Selektin dafür verantwortlich, daß die Neutrophilen untereinander Kontakt aufnehmen, um so weitere Entzündungszellen zum Ort der Entzün-

derung zu rekrutieren (Walcheck B '96). Von den Mediatoren ist Interferon  $\alpha$  bislang das einzige bekannte Zytokin, welches korrelierend mit erhöhten m-RNA Spiegeln, eine gesteigerte Expression von L-Selektin bewirkt (Martin-Henao GA '00).

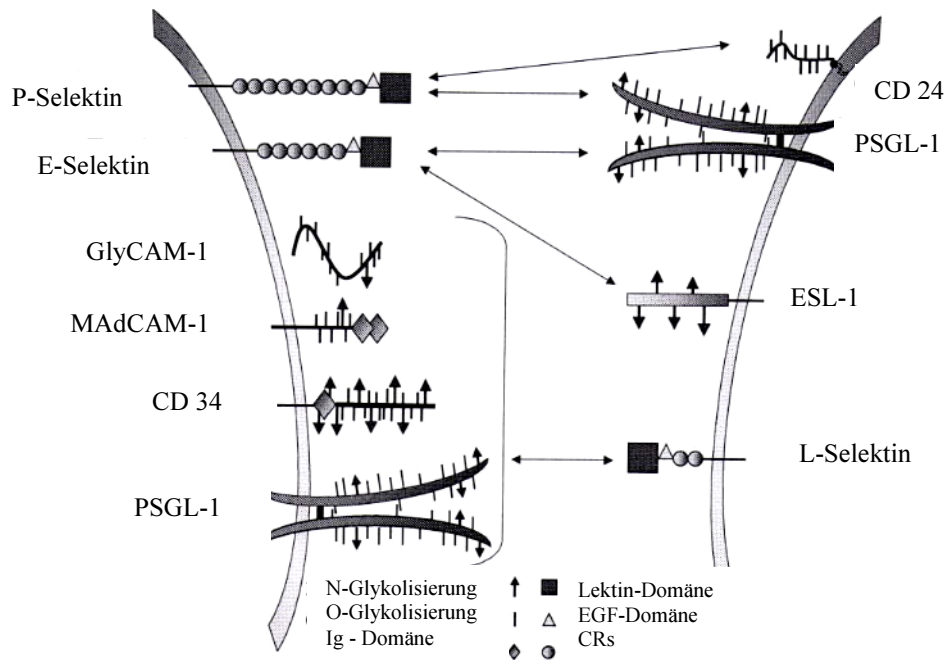


Abb. 10: Generische Expression von Selektinen (li.-Endothel) und deren Liganden auf der Zielzelle (re.). Anmerkung: Die Bindung von L-Selektin an PSGL-1 findet zumeist zwischen Leukozyten statt (modifiziert nach Patel KD '02).

P-Selektin (CD62P) ist in den Weibel-Palade-Granula der Endothelzellen gespeichert und wird in den alpha-Granula der Thrombozyten produziert (Diacovo TG '96). P-Selektin wurde 1990 als wandlungsfähiger Rezeptor auf Endothelzellen und Thrombozyten präsentiert. Er ist spezifisch für Leukozyten, wie z.B. Neutrophile, Makrophagen und T-Gedächtniszellen. Die Expression von P-Selektin auf aktivierten Thrombozyten ist wichtig für die Induktion von Fibrin während der Hämostase. Die schnelle Präsentation von P-Selektin auf der Zelloberfläche von Endothelzellen durch Stimuli wie Histamin und Thrombin weist darauf hin, daß dieser Rezeptor in der frühen Phase der Neutrophilen-Rekrutierung in Entzündungsgewebe eine Rolle spielt. In der Entzündung rekrutiert das endotheliale P-Selektin die Leukozyten in die postkapillären Venolen während das thrombozyten-assoziierte P-Selektin die Aggregation von Leukozyten mit

Thrombozyten zu Thromben fördert. Endothelzellen können darüberhinaus P-Selektin als Antwort auf einwirkende Endotoxine oder Zytokine synthetisieren und exprimieren. Leukozyten interagieren mit P-Selektin über den P-Selektin-Glykoprotein-Liganden (PSGL) - 1. Die hohe Affinität ist von einem Sulfat - Tyrosin abhängig, welches am Amino-Ende von PSGL-1 lokalisiert ist (Pouyani T '95, Sako D '95). Die Interaktion beider Zellrezeptoren ist für den ersten lockeren Kontakt (Rolling) der Leukozyten mit den Gefäßendothelzellen verantwortlich (Patel KD '02). CD24 ist ein weiteres Molekül, das als Ligand von P-Selektin bekannt ist. Hierbei handelt es sich um ein kleines Glykoprotein, das bei Abwesenheit von PSGL-1 auf der Zelloberfläche, das P-Selektin-abhängige Rolling der Leukozyten vermitteln kann (Aigner S '98).

E-Selektin (Synonyme: endothelium leukocyte adhesion molecule, ELAM-1 und CD62E) ist ein induzierbares Endothelzelloberflächenmolekül, das an der Adhäsion von Neutrophilen und T-Zellen in akut entzündetem Gewebe beteiligt ist. E-Selektin ist bei inaktiviertem Endothel gering exprimiert. Die Expression wird während eines Entzündungsgeschehens jedoch hochreguliert, wenn das vaskuläre Endothel durch proinflammatorische Zytokine oder Lipopolysaccharide aktiviert wird (Ala A '03).

E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1) war ursprünglich als ein E-Selektin-bindendes Protein in einer neutrophilen Maus-Zelllinie (32DC13) identifiziert worden (Levinovitz A '93). Durch Antikörperblockade von ESL konnte die Adhäsion von 32Dc13-Zellen an gereinigtes E-Selektin partiell unterbunden werden. Dieses weist auf die mögliche biologische Funktion des Liganden hin (Steegmaier M '95). Zwei weitere Liganden von E-Selektin sind das PSGL-1 und das L-Selektin. Antikörper gegen PSGL-1 und gegen L-Selektin konnten das Neutrophilen-Rolling am E-Selektin-Rezeptor abschwächen (Patel KD '97). Eine weitere Ligandenfamilie für E-Selektin ist als CLA (cutaneous leukocyte antigens) bekannt. Diese werden in einer Population von Gedächtnis-Lymphozyten in entzündeten Hautläsionen gefunden (Picker LJ '90). Es wird vermutet, daß E-Selektin eine Rolle bei der Rekrutierung von „skin homing“-Lymphozyten spielt, weil dieses Selektin auf venösem Endothel in diesen Entzündungsbezirken exprimiert wird (Picker LJ '91). Während ein großer Teil des E-Selektins auf der Endothelzelloberfläche nach Abklingen der Aktivierung wieder durch Internalisierung in die Zelle aufgenommen wird, verbleibt ein löslicher Anteil im Blutvolumen (Patel RT '95). Die Expression in

Form dieser löslichen zirkulierenden Adhäsionsmoleküle wird durch TNF- $\alpha$ , IL-1 und LPS in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hochreguliert (Ala A '03).

Tab. 6: Systematik der Selektine (modifiziert nach Ala A '03 und Schürmann G '97).

Molekül (CD-Nomenklatur)	Vorkommen	Ligand (CD-Nomenklatur)	Funktion
L-Selektin (CD 62L)	Leukozyten	Sialyl-Lewis <sup>x</sup> (CD15s) Sialyl- Lewis <sup>a</sup> GlyCAM-1 CD34 MAdCAM-1 PSGL-1	Akute durch Neutrophile vermittelte Entzündung, peripheres Lymphknoten-„Homing“
P-Selektin (CD62P)	Leukozyten Plättchen	Sialyl-Lewis <sup>x</sup> (CD15s) Sialyl- Lewis <sup>a</sup> L-Selektin (CD62L) PSGL-1	Eosinophilen-, Neutrophilen, Monozyten-Adhäsion während akuter Entzündung und Thrombose
E-Selektin (CD62E)	Endothelzellen	Sialyl-Lewis <sup>x</sup> (CD15s) Sialyl- Lewis <sup>a</sup> L-Selektin (CD62L) CD66, CD11/18 PSGL-1	Eosinophilen-, Neutrophilen, Monozyten-Adhäsion während akuter Entzündung und „skin-homig“

## 2.4.2 Integrine

Integrine sind Adhäsionsmoleküle auf Leukozyten, die in viele biologische Prozesse, einschließlich Embryonalentwicklung, Erhaltung von Gewebeintegrität und Leukozytenadhäsion, involviert sind. Es handelt sich um heterodimere Proteine, die aus nicht kovalent verbundenen 150 bzw. 100 KD schweren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestehen (Hynes R '92, Berman AE '00). Die Membranglykoproteine werden nach ihren  $\beta$ -Untereinheiten in z.B.  $\beta_1$ -Integrine (VLA-1, 2, 3 u.a.) und  $\beta_2$ -Integrine (LFA-1, Mac-1 u.a.) unterteilt. Zur Zeit sind ca. 15  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Ketten beschrieben und mindestens 21 verschiedene Heterodimere gefunden worden. Leukozyten können 13 verschiedene Integrine aus diesem Repertoire exprimieren. Fünf dieser Glykoproteine gehören zu den  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_7$  -Subfamilien, die als bedeutende Modulatoren bei der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligt sind (Panés J '98). Die Spezifität der  $\beta_1$ -und  $\beta_2$ -



Integrine für einen Liganden hängt meistens von der assoziierten  $\alpha$ -Kette ab. Zellen, die Integrine exprimieren, sind jedoch nicht immer in der Lage, entsprechende Liganden zu binden (Van de Wiel-van Kemenade E '92, Stewart MP '96). Die Entdeckung, daß einige Antikörper Oberflächenintegrine nur nach Aktivierung der Zellen erkannten und andere Antikörper diese auch in nicht aktivem Zustand fanden, führte zu der Schlußfolgerung, daß Integrine ihre Konformation ändern können. Als Konsequenz hieraus fand man einen der wichtigsten Mechanismen der Integrinfunktion. Integrine können sehr schnell von einem nicht-adhäsiven Zustand über ein geringes Affinitätsstadium zu einem vorübergehenden hohen Affinitätszustand wechseln. Unterschiedliche Arten von Zell-Zell-Interaktionen können einen Wechsel zu höherer Affinität induzieren. So vermitteln z.B. T-Lymphozyten durch die Interaktionen mit dem Gefäßendothel über das Adhäsionsmolekül PECAM-1 / CD31 Aktivierungssignale in T-Zellen, was wiederum Integrine aktiviert (Piali L '93). Ähnliche Signale beobachtet man auch bei der Interaktion mit Chemokinen. Darüberhinaus involvieren Integrine das aktivierte Zytoskelett in die extrazelluläre Matrix, indem sie über klassische Signalketten Botenstoffe transduzieren. Sie sind für zelluläre Mechanismen, wie z.B. die Zellproliferation, die Apoptose und Zelldifferenzierung von besonderer Bedeutung (Arao S '00). Die Integrine der  $\beta_2$ -Subfamilie bestehen aus einer gemeinsamen  $\beta$ -Untereinheit (CD18), die wiederum mit einer von drei immunologisch unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten verbunden ist. Hieraus entsteht CD11a, CD11b und CD11c (s.Tab.7). Obwohl die Expression von  $\beta_2$ -Integrinen auf Leukozyten beschränkt ist, unterscheidet sich die Verteilung der  $\beta_2$ -Integrin-Subklassen innerhalb verschiedener Leukozyten-populationen. CD11a/CD18 ist auf der Oberfläche der meisten Leukozyten basal ex-primiert, um durch die Interaktion mit ICAM-1 und ICAM-2 auf Endothelzellen die Leukozytenadhäsion am Endothel zu fördern (Marlin SD '87). Die Expression von CD11a/CD18 kann nach Aktivierung der Neutrophilen nicht über den basalen Level hinaus gesteigert werden. Große Anteile von den CD11b/CD18- und den CD11c/CD18-Glykoproteinen werden in Granula gespeichert, die bei Bedarf innerhalb von Minuten an die Oberfläche von aktivierten Neutrophilen und Monozyten mobilisiert werden können, um dort mit der Zellmembran zu verschmelzen (Carlos TM '94). Die Aktivierung von Neutrophilen oder Monozyten durch inflammatorische Mediatoren (z.B. Leukotrien B<sub>4</sub>, PAF oder Zytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) führen zu einem 3-10-fachen Anstieg der Expression von

CD11b/CD18 und CD11c/CD18 auf der Zelloberfläche. CD11b/CD18 interagiert mit ICAM-1 auf den Endothelzellen. Der Ligand für CD11c/CD18 ist bislang unbekannt. Zusammenfassend wird die stabile, feste Zelladhäsion von nicht stimulierten Leukozyten auf Endothelzellen durch die Interaktion zwischen CD11a/CD18 und ICAM-1 vermittelt. Aktivierte Leukozyten interagieren sowohl über CD11a/CD18 als auch über CD11b/CD18 mit ICAM-1 (Panés J '98).

Eine zweite Subfamilie der Integrine kombiniert die  $\beta_1$  (CD29) – Kette mit variablen  $\alpha$ -Ketten. Diese Integrine werden als VLAs (very late antigens) bezeichnet, da die ersten identifizierten Glykoproteine (VLA-1 und VLA-2) erst in einem späten Stadium nach T-Zell-Aktivierung exprimiert wurden. Das  $\alpha_4\beta_1$  – Integrin (VLA-4) ist bei der Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten, Eosinophilen und Natürlichen Killerzellen an Zytokin-aktivierte Endothelzellen beteiligt (Panés J '98). VLA-4 ist als  $\beta_1$ -Integrin auf T- und B-Lymphozyten exprimiert. Die Liganden für VLA-1 sind VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Fibronectin und Thrombospondin (Berlin C '95, Ala A '03). Die Interaktion zwischen VLA-4 und VCAM bewirkt sowohl eine Lymphozytenadhäsion am Endothel in entzündetem Gewebe als auch eine Differenzierung der Lymphozyten (Ala A '03).

Tab.7: Übersicht der Integrin-Familie mit Hinblick auf die Beteiligung an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (modifiziert nach Panés J '98).

Adhäsionsmolekül	Synonym	Vorkommen	Expression		Ligand	Funktion
			konstitutionell	induzierbar		
CD11a/CD18	LFA-1 $\alpha_L\beta_2$	alle Leukozyten	ja	nein	ICAM-1 ICAM-2	Adhäsion / Emigration
CD11b/CD18	Mac-1 $\alpha_M\beta_2$	Granulozyten Monozyten	ja	ja	ICAM-1 iC3b; Fb	Adhäsion / Emigration
CD11c/CD18	p150,95	Granulozyten Monozyten	ja	ja	Fb; iC3b	?
CD49d/CD29	VLA-4 $\alpha_4\beta_1$	Lymphozyten Monozyten Eosinophile Basophile	ja	nein	VCAM-1 extrazell. Matrix- moleküle	Adhäsion
CD49d/ $\beta_7$	$\alpha_4\beta_7$	Lymphozyten	ja	nein	MAdCAM-1, VCAM-1, Fibronectin	Adhäsion

Der dritte Integrinsatz ist durch die  $\beta_7$ -Kette charakterisiert. Dieser ist exprimiert auf der Zelloberfläche einer Lymphozytengruppe, die sich im Intestinum und im Intestinum-assoziierten Lymphgewebe ansiedelt.  $\alpha_4\beta_7$  und sein Endothelligand MAdCAM-1 vermitteln die Lymphozytenadhäsion in den Peyer Plaques (Tsuzuki Y '96, Ala A '03). Darüberhinaus bindet das  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin sehr effektiv an VCAM-1 und Fibronectin (Strauch UG '94). Im Gegensatz zur Interaktion zwischen  $\beta_7$  und MAdCAM-1, die unter physiologischen Bedingungen die Rezirkulation der Lymphozyten vermittelt, scheint die  $\beta_7$  / VCAM-1 - Interaktion der Lymphozyten-Rekrutierung unter Entzündungsbedingungen vorbehalten zu sein (Panés J '98).

### 2.4.3 Immunglobulin-Supergen-Familie

Die Immunglobulinsupergenfamilie besteht aus einer großen Anzahl von Glykoproteinen mit multiplen immunglobulinähnlichen Domänen. Fünf Mitglieder dieser Familie sind an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligt. Hierbei handelt es sich um ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 (CD106), PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) und MAdCAM-1 (Ala A '03).

Tab.8: Übersicht der Immunglobulin-Supergen-Familie mit Hinblick auf die Beteiligung an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (modifiziert nach Ala A '03).

Adhäsionsmolekül	Synonym	Vorkommen	Expression		Ligand	Funktion
			konstitutionell	induzierbar		
ICAM-1	CD54	Endothel	ja	ja	LFA-1, Mac-1 CD43	Adhäsion / Emigration
ICAM-2	CD102	Endothel	ja	nein	LFA-1	Adhäsion / Emigration
VCAM-1	CD106	Endothel	nein	ja	VLA-4	Adhäsion
PECAM-1	CD31	Endothel Leukozyten Thrombozyten	ja	nein	PECAM-1	Adhäsion / Emigration
MAdCAM-1		Endothel (intestinal)	ja	ja	L-Selektin CD49d/ $\beta_7$	Adhäsion / Emigration

ICAM-1 besteht aus fünf immunglobulinähnlichen extrazellulären Domänen (s. Abb. 11). Die erste hiervon (NH<sub>2</sub>-terminal) erkennt CD11a/CD18 (Diamond MS '93) und die dritte Domäne erkennt CD11b/CD18 (van de Stolpe A '96). ICAM-1 wird von Leukozyten, Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen basal exprimiert. Eine durch Zytokine (TNF $\alpha$ , Il-1, IFN- $\gamma$ ) oder LPSs induzierte Aktivierung des Endothels resultiert in einem Anstieg der ICAM-1-Expression (Cordell JL '94, Ala A '03). Im Gastrointestinaltrakt findet sich fünf Stunden nach Stimulation die größte Expression von ICAM-1. Diese befindet sich auch 24 Stunden nach Aktivierung noch deutlich über den basalen Expressionswerten (Henninger DD '97). Die vermehrte Expression von ICAM-1 auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten ist bei diesen Zellen für eine Adhäsion der interagierenden Lymphozyten und für die Adhäsion der Lymphozyten mit den antigenpräsentierenden Zellen verantwortlich (Ala A '03). Generell ist eine vermehrte ICAM-1 – Expression mit einer vermehrten Leukozytenadhärenz assoziiert. Bei Immunreaktionen scheint ICAM-1 lokal hochreguliert zu werden und so im Bereich der Entzündung die Einwanderung von Lymphozyten zu kontrollieren (Ala A '03). Auch in Serumproben von Patienten, die unter Morbus Crohn leiden, konnten erhöhte CD54-Level festgestellt werden (Jones SC '95). ICAM-1 bindet an das  $\beta_2$ -Integrin LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) und hat zudem weitere Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Viren (z.B. Rinovirus) (Elices M '90, Gahmberg CG '97).

ICAM-2 besitzt nur zwei immunglobulinähnliche extrazelluläre Domänen (s. Abb. 11). Es bindet CD11a/CD18 und ist somit ein zweiter endothelialer Ligand für dieses Integrin. Im Gegensatz zu ICAM-1 ist ICAM-2 konstitutionell auf nicht aktiviertem Endothel stark exprimiert. Die ICAM-2 Expression wird nicht durch Aktivierung geregelt, und auch die Affinität von ICAM-2 für LFA-1 scheint kleiner als die von ICAM-1 zu sein (de Fougerolles AR '94). Dieses betont, daß ICAM-2 für den konstitutionell niedrigen transendothelialen Leukozytenverkehr verantwortlich ist, während der Neuproduktion von ICAM-1 die Hauptrolle in der Regulierung des Entzündungszellverkehrs zukommt (Imhof BA '97).

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) ist ein wichtiger Modulator bei der Lymphozyten- und Monozyten-Migration (Ala A '03). VCAM-1 ist ein Ligand des  $\alpha_4\beta_1$ -Integrins VLA-4 und bindet zudem an  $\alpha_4\beta_7$  (Strauch UG '94). Es besitzt sieben immunglobulinähnliche extrazelluläre Domänen, (s. Abb. 11) von denen die erste und vierte

Domäne das Integrin VLA-4 binden (Panés J '98). VCAM-1 ist auf dendritischen Zellen des Keimzentrums, auf Zellen des retikulo-endothelialen Systems, Kupffer-Zellen und synovialen Zellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, daß auf nicht stimulierten Endothelzellen humaner Umbilikalvenen (HUVECs) fast kein VCAM-1 exprimiert wird (Swerlick RA '92), dieses jedoch nach Stimulation mit Zytokinen und LPS hochreguliert wird (Neish AS '95). Insgesamt besitzt VCAM-1 nach Induktion eine ähnliche Biokinetik wie das ICAM-1, zeigt einen deutlichen Anstieg seiner endothelialen Oberflächendichte innerhalb von 5-9 Stunden nach Zytokinstimulation, ist jedoch weniger weit verbreitet als ICAM-1 (Ala A '03).

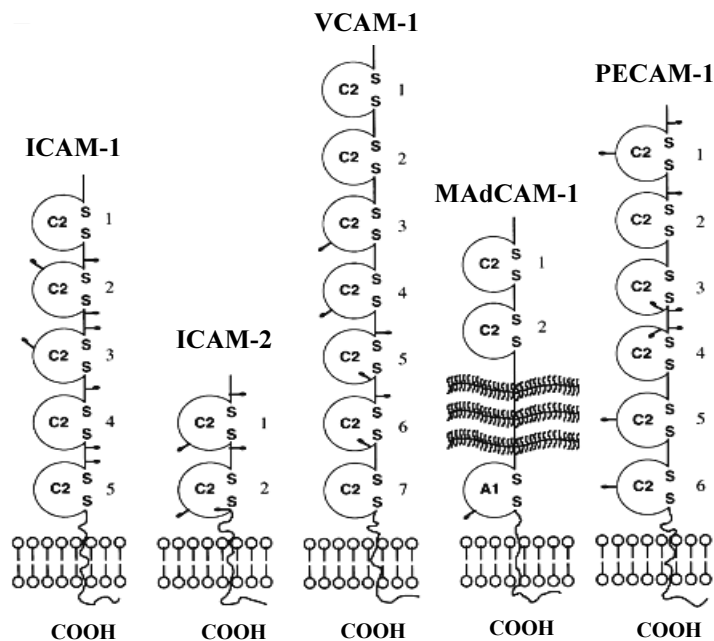


Abb. 11: Molekularstruktur von Adhäsionsglykoproteinen, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören. Die zyttoplasmatische Domäne wird hier als COOH angezeigt. Die Bindungsketten der Proteine werden hier als Kreise präsentiert. (C2=konstante Ig-Domäne2, A1=IgA-Domäne, S-S =Disulfidbrücken) (modifiziert nach Panés J '98).

Ein weiteres Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie ist das PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 oder auch CD31). Dieses ist ein 6-Domänen-Molekül (s. Abb. 11), welches sowohl die Leukozyten, als auch die Thrombozyten-

Endothelzell-Adhäsion und die transendotheliale Migration vermittelt (Wakelin MW '96). PECAM-1 ist neben der Expression auf Leukozyten und Thrombozyten permanent auf Endothelzellen exprimiert und interagiert mit sich selber und verschiedenen anderen Liganden von Endothel- oder Leukozyten-Untereinheiten. Die PECAM-1-Expression auf kultivierten Endothelzellen wird durch Zytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1 und IFN- $\gamma$  (Bujan J '99) nicht gesteigert. Es zeigte sich jedoch als Antwort auf diese Stimuli eine Umverteilung des Glykoproteins an die Zellgrenzen (Romer LH '95). Aktivierte Endothelzellen exprimieren somit PECAM-1 hauptsächlich auf ihren lateralen Zellmembranen. Dieses Verteilungsmuster weist auf drei Hauptfunktionen hin: Mitgestaltung und Modifizierung von Endothelzellverbindungsstellen, Vermittlung der Leukozytenbewegung durch die Verbindungsstellen und Thrombozytenadhäsion an geschädigtem Endothel (Ala A '03). Die Fähigkeit,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Leukozyten-Integrine zu aktivieren, verleiht dem CD31 eine kritische Rolle in der Regulation der Leukozytenadhäsion an Endothelzellen (Piali L '95, Berman ME '96).

MAdCAM-1 ist ein transmembranöses Protein, welches eine komplexe Struktur aufweist (s. Abb. 11). Es kombiniert drei immunoglobulinähnliche extrazelluläre Domänen mit einer mukoidähnlichen Region zwischen den Domänen 2 und 3 (Panés J '98). Dieses Molekül ist hauptsächlich auf den HEVs der Peyer-Plaques, auf Venolen der Lamina propria des Dünndarms, auf HEVs embryonaler Lymphknoten (Streeter PR '88) und auf follikulären dendritischen Zellen in neonatalen Nager-Peyer-Plaques (Iizuka T '00) exprimiert. Die Funktion von MAdCAM-1 als endotheliales Zelladhäsionsmolekül besteht in der Bindung von Lymphozyten und deren Zelllinien. MAdCAM-1 übernimmt eine wichtige Rolle bei der Lymphozytenmigration in normales und entzündetes mukosales Gewebe. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß eine Antikörperblockade von MAdCAM-1 die Leukozytenrekrutierung verhindern und die Darmentzündung in SCID-Mäusen (severe combined immuno-deficiency-mice) reduzieren konnte (Picarella D '97). MAdCAM-1 ist spezifisch an der Aufrechterhaltung der mukosalen Immunität und der Entzündungsregulation im Gastrointestinaltrakt beteiligt (Briskin M '97). Neuere Studien weisen zudem darauf hin, daß die Migration von immunkompetenten Zellen im Uterus und während der frühen Entstehung menschlichen Lebens entscheidend durch die zelluläre Interaktion mit MAdCAM-1 dominiert wird (Salmi M '01).

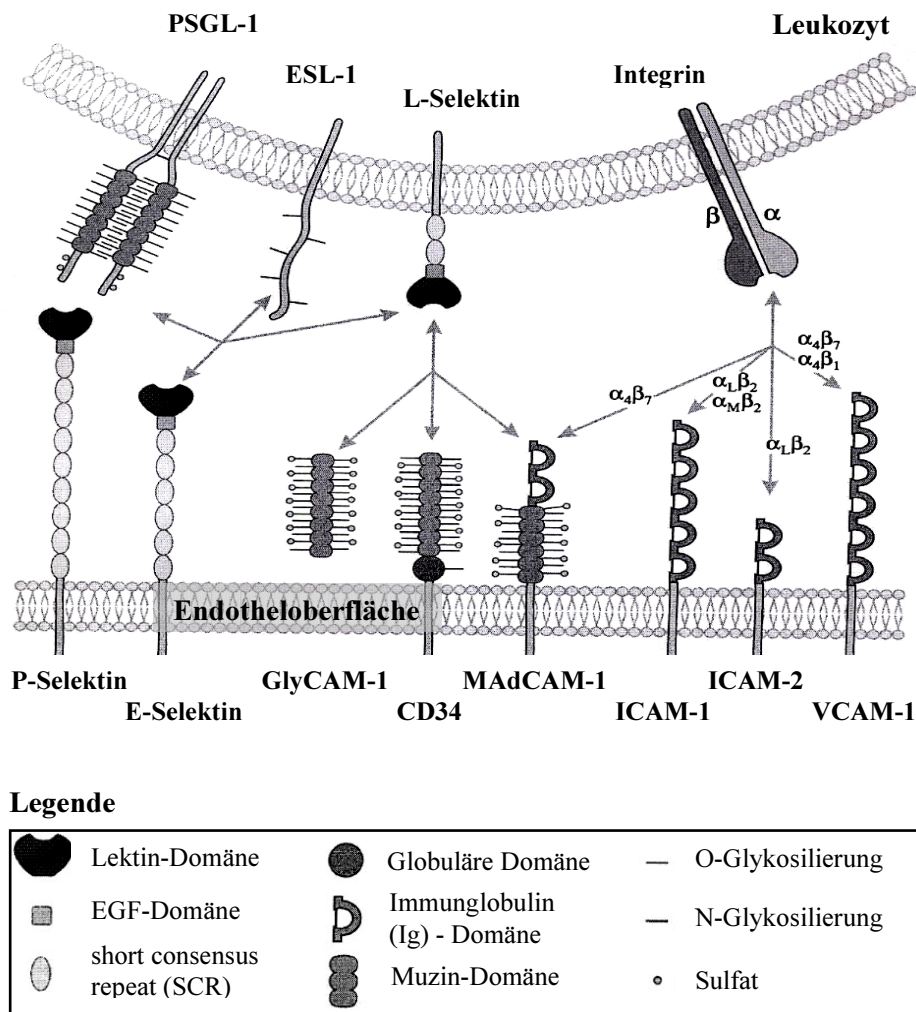


Abb. 12: Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmoleküle im Überblick (modifiziert nach Ebnet K '99).

## 2.5 Zelladhäsionskaskade

Die Leukozyten zirkulieren zwischen dem Kompartiment Blut und dem Kompartiment Gewebe kontinuierlich. Einige von diesen Entzündungszellen sind programmiert, Antigene zu erkennen und mit dem Endothel der Gefäße zur interagieren, um letztendlich an den Ort der Antigenexposition zu gelangen. Die Leukozytenadhäsion an Gefäßendothelzellen ist weit komplexer als die alleinige Anlagerung von zwei stationären Zellen. Die durch den Blutstrom einwirkenden Scherkräfte und der schnelle Wechsel eines Leukozyten von einer nicht-adhäsiven Blutzelle zu einer immunkompetenten adhäsiven

Zelle im extravaskulärem Kompartiment, erfordern eine komplexe Kaskade, in der sukzessive, aber voneinander getrennte Phasen der Zell-Zell-Interaktion ablaufen (Salmi M '99). Der Übergang vom Blut in das umliegende Gewebe findet hauptsächlich in einzelnen postkapillären Venolen (HEVs – high endothelial venules) statt (Girard JP '95). Zu Beginn der Zelladhäsionskaskade verlassen die zirkulierenden Leukozyten die zentrale Position in der Blutstrombahn und nähern sich der Gefäßwand an (Margination) (Warnock RA '98). Sie rollen an dieser langsam vorbei. Die Geschwindigkeit rollender Leukozyten beträgt etwa 10-50  $\mu\text{m/s}$  bei einer Blutflußgeschwindigkeit von 1-5 mm/s (Ley K '91, Salmi M '99). Diese erhebliche Geschwindigkeitsreduktion während des Rollens kann nicht alleine durch die Position der Leukozyten im mikrovaskulärem Blutstrom erklärt werden, sondern erfordert zusätzliche adhäsive Kräfte zwischen Leukozyt und Endothel (Ley K '91). Die Selektine (s.o.) initiieren diesen ersten Leukozytenkontakt mit dem Endothel. Dieses führt zum Leukozyten-„Rolling“ (Alon R '95). Dieser Endothelkontakt und die daraus entstehende Verlangsamung der Leukozyten ermöglichen den Kontakt mit Signalstoffen (z.B. Chemokinen) auf der Endotheloberfläche. Diese Mediatoren des beteiligten Gewebes stimulieren die Aktivierung von Integrinen auf der Leukozytenoberfläche (s.o.), die dann die weitere effiziente Bindung dieser Zellen an die Endotheloberfläche vermitteln. Diese induzierte Adhäsion durch aktivierte Integrine ist fest und stoppt das „Rolling“. Die nun stabil adhärenente Zelle kann sich gezielt fortbewegen, um schließlich durch die interendothelialen Verbindungsstellen und die darunterliegende Basalmembran in das Gewebe zu transmigrieren (Salmi M '99). Dort bekommt die Zelle weitere direktionale Signale, welche den Leukozyt durch das Gewebestroma leiten. Diese Mechanismen lassen sich in einem Stufenmodell zur Zelladhäsion beschreiben.

- Erste Kollision mit flüchtiger Adhäsion oder Ankopplung („rolling“)
- Signalinduktion zur Aktivierung der Leukozytenintegrine
- Feste, permanente Adhäsion am Endothel („sticking“)
- Transmigration in umgebendes Gewebe



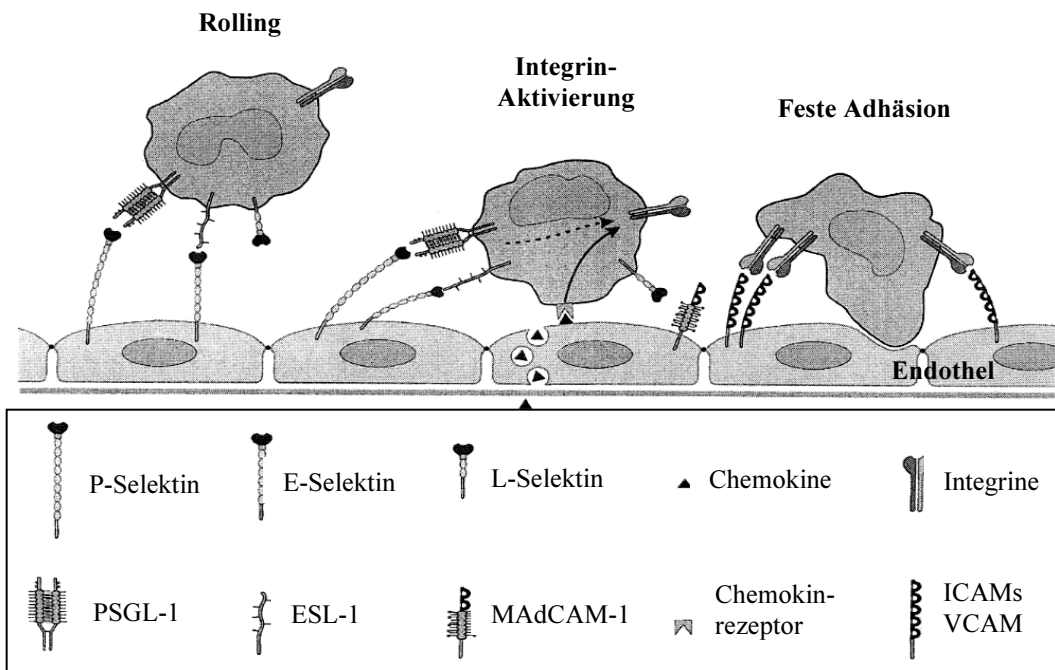


Abb. 13: Die Schritte der Zelladhäsionskaskade. Zirkulierende Leukozyten verlassen den zentralen Blutstrom, lagern sich dem Gefäßendothel an und setzen ihre Migration transendothelial und ggf. subendothelial fort (modifiziert nach Fabbri M '99).

### 2.5.1 Leukozyten-Rolling

Unter Normalbedingungen erscheinen die niedrigsten Flowraten des Gefäßbettes in den postkapillären Venolen. Aus diesem Grund erwartet man hier auch die Lokalisation für die Leukozyteninteraktion mit den Endothelzellen. In Entzündungsbezirken ist der Blutfluß aufgrund von Gefäßdilataion vermindert. Dieses ermöglicht passierenden Leukozyten mit dem Endothel zu kollidieren. Diese laterale Abwanderung der Leukozyten aus dem Blutstrom zur Venenwand wird hämodynamisch durch die Erythrozyten begünstigt. Die schnelleren roten Blutzellen displazieren die Leukozyten vom zentralen Blutstrom in der Gefäßmitte zum venösen Endothel (Schmid-Schönbein GW '80). Das Leukozyten-Rolling scheint darüberhinaus das Ergebnis von gering adhäsiven Interaktionen zu sein, die wiederum stark genug sind, um den Scherkräften entlang des Endothels, suffizient entgegenzutreten. Obwohl die Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten direkt proportional zur Scherkraft ist, ist die Aktivierung der Leukozyten bei jeder gegebenen Scherkraft mit einer deutlichen Geschwindigkeitsreduktion ver-

bunden (Smith CW '89). Durch die Scherkräfte des Blutstromes führt dieses bei den oben genannten gering adhäsiven Kontakten nicht zur festen Adhäsion, sondern zu einer Rollbewegung der Leukozyten entlang des Endothels. „Rolling“ ist eine lockere und temporäre Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothel. Sowohl die Selektine (s.o.) und ihre Liganden als auch  $\alpha$ 4-Integrine sind für die transienten Endothelkontakte der Leukozyten mitverantwortlich (Alon R '95). Die langen extrazellulären Domänen der Selektine erlauben diesen Molekülen in idealer Weise, vorbeikommende Leukozyten, die entsprechende Rezeptoren exprimieren, einzufangen (Lasky LA '95). Das Leukozyten- „Rolling“ ist wichtig, weil es einen kurzzeitigen Zell-Zell-Kontakt ermöglicht, der lang genug ist, um den folgenden Schritt der Adhäsionskaskade einzuleiten.

### 2.5.2 Stabile Zelladhäsion

Formal kann zwischen lockerer Bindung und fester Leukozytenadhäsion ein Zwischenschritt beschrieben werden, bei dem Triggersubstanzen die Expression von Integrinen induzieren (Adams DH '94). Diese Integrinaktivierung wird durch die Bindung von Zytokinen und Chemokinen aus dem Endothel an transmembranöse Rezeptoren vermittelt (Gunn MD '98). Hierdurch ist der Leukozyt aktiviert und die Voraussetzung für eine permanente Endothelbindung mit der damit verbundenen ausreichenden Widerstandskraft gegen die großen Scherkräfte gegeben (Ala A '03). Beispiel für solche proadhäsiven Chemokine ist das Interleukin-8, welches von Endothelzellen oder den darunterliegenden Zellen in Antwort auf Endotoxin, Interleukin-1 und den Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) produziert wird. Es induziert die Expression von Integrinen (CD11b/CD18) auf Neutrophilen (Bevilacqua MP '93). Ein weiteres Beispiel proadhäsiver Zytokine ist der plättchenaktivierende Faktor (PAF), dessen Produktion in Endothelzellen von Histamin, Thrombin oder Leukotrienen stimuliert wird (Rot A '92). Die Lipidmediatoren Leukotrien B<sub>4</sub> und PAF (Platelet-activation factor) sind als potente Stimuli für die Leukozytenadhäsion in postkapillären Venolen bekannt (Galbourn JP '95). Beide Mediatoren induzieren eine Leukozytenadhäsion unter Stimulation des Integrins CD11b/CD18. Nach Aktivierung der Integrine auf den Leukozyten spielen diese Moleküle unter Mitwirkung der Mitglieder der Immunglobulin-Supergen-Familie auf der Seite des Gefäßendothels eine Schlüsselrolle bei der eigentlichen, stabilen

Zelladhäsion (Bevilacqua MP '94). Diese starke adhäsive Interaktion verursacht ein schnelles und direktes Anhaften der noch beweglichen Leukozyten (Panés J '98). Die vorherrschenden Wege zur stabilen Zelladhäsion werden durch die Integrin-Adhäsionsmolekül-Paare (s.Tab. 8) LFA-1/ICAM-1, LFA-1/ICAM-2, Mac-1/ICAM-1 und VLA-4/VCAM-1 vermittelt (Granger DN '94). Integrine, die durch einen Liganden besetzt sind, konnektieren zum zellulären Zytoskelett, was dazu führt, daß sich die ehemals runde Zellform in eine längliche Form wandelt (Imhof BA '97). Somit wird die interendotheliale Transmigration begünstigt.

### 2.5.3 Leukozyten-Endotheliale-Transmigration

Die Transmigration beginnt sehr häufig mit der Bewegung der adhärenenten Leukozyten zu den jeweiligen Rändern der Endothelzellen. Während dieser gerichteten Bewegung werden kontinuierlich neue Adhäsionskontakte auf der Endotheloberfläche geschlossen und gleichzeitig am hinteren Ende der Bewegungskette die bereits bestehenden Adhäsionen reduziert. Diese Bewegung erfordert eine Zelladhäsion, die nicht zu stark sein darf, da ansonsten die Bewegung in Immobilisation enden würde. Die adhäsiven Leukozyten besitzen einige Charakteristika, die es den Zellen erlauben, gerade so viel Kraft zu generieren, daß eine Bewegung entlang des Endothels möglich ist. Ein Charakteristikum ist die transiente gesteigerte Integrinaktivierung. Diese nimmt nach initialer Stimulaltung durch Chemokine (s.o.) ebenso schnell wieder ab und erlaubt so eine gerichtete Bewegung (Panés J '98).

Eines der wenigen bekannten, für die transendotheliale Passage relevanten Zelladhäsionsmoleküle ist (neben ICAM-1, LFA-1 und Mac-1 (Panés J '98)) PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), das, wie oben beschrieben, bevorzugt an Kontaktstellen zwischen Gefäßendothelien exprimiert wird (Schürmann G '93) und die transendotheliale Migration von Neutrophilen und Monozyten vermittelt.

Für die letzten Schritte der Zelladhäsionskaskade und die weitere Zellwanderung im Gewebe werden chemotaktische Substanzen als Mediatoren postuliert (Roth SJ '95). Die Wanderung der penetrierenden Zelle durch die Gefäßinnenschicht kann auch durch die Mitte der schmalen Endothelzellen erfolgen. An beiden Wegen sind wahrscheinlich von der penetrierenden Zelle freigesetzte lysierende Enzyme beteiligt (Taub DD '94).

### **3. Material und Methode**

#### **3.1 Versuchstiere**

Alle Untersuchungen wurden in der Abteilung Chirurgische Forschung der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie des Universitätsklinikums Münster (UKM) durchgeführt (Versuchstiergenehmigung G 73/96 vom 20.12. 1996). Wir verwendeten männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River, Deutschland) mit einem Gewicht von 160-200 g. Nach dem Eintreffen in der tierexperimentellen Einrichtung wurden die Tiere zunächst für mindestens 7 Tage in Käfigen (Edelstahl-Drahtkäfige; Fa. EBECO) unter konventionellen Bedingungen gehalten. Hierzu zählten eine Haltungsdiät für Mäuse und Ratten (1324-Pellets, Altromin GmbH, Lage / Deutschland), zu der die Tiere jederzeit freien Zugang hatten, ein automatischer 12-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus und eine klimatisierte Raumtemperatur, die zwischen 22-24° Celsius lag. Zwölf Stunden vor Beginn des Versuches, wurden die Ratten in Einzelkäfige (Maluonkäfig, Typ 3 DST) gesetzt. Sie erhielten weiterhin freien Nahrungs- und Wasserzugang. Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn auf ihren Gesundheitszustand hin untersucht. Hierbei kam dem Ausschluß von Bronchopneumonien große Bedeutung zu. Diese häufigen Infektionen in der Rattenzucht können die Widerstandsfähigkeit gegenüber dem atemdepressorisch wirkenden und atemwegsreizenden Ether soweit herabsetzen, daß es schon bei niedrigen Dosierungen zu unverhältnismäßig tiefen Narkosen oder sogar zum Atemstillstand kommen kann (Ben M `69, Green CJ `82). Symptome dieser Pneumonien, die zum Versuchsausschluß führen, sind deutlich hörbare Rasselgeräusche. Bei der Sektion erkrankter Tiere fand man in früheren Studien ausgedehnte Lungenabszesse und Atelektasen (Van der Gulden WJI `75). Generell wurden Tiere in schlechtem Allgemeinzustand von den Versuchen ausgeschlossen.

#### **3.2 Narkoseverfahren**

Für die Anästhesie wurde eine Ether-Inhalationsnarkose (Ether zur Narkose, Hoechst) bei Spontanatmung der Tiere gewählt. Wie für Narkosezwecke üblich (Ben M `69),

wurde Ether nur in gereinigter Form verwendet, der in dunklen Flaschen kühl und lichtgeschützt gelagert wurde. Licht, Luft und Wärme führen durch Zersetzungsprodukte (Säuren, Peroxide, Aldehyde) zu Verunreinigungen des inerten Ethers (Benand G `89). Vorteile der Ether-Inhalationsnarkose sind die große therapeutische Breite sowie die Anwendungsmöglichkeit als Mononarkose, da Diethylether analgetische, narkotische und muskelrelaxierende Wirkung vereint. Die Herzfrequenz und die Mikrozirkulation werden durch diese Narkoseart nur minimal beeinflusst (Frank A `95). Nachteilig sind ein relativ stark ausgeprägtes Exzitationsstadium und eine verstärkte Bronchialdrüsensekretion, die jedoch nur zu Beginn der Narkose auftritt und bei gesunden Tieren nicht zu einer Beeinträchtigung der Spontanatmung führt, da Ether durch eine Erhöhung der sympathischen Aktivität auch eine bronchodilatorische Wirkung zeigt (Benand G `89). Auf eine Prämedikation konnte verzichtet werden, da diese bei der Ethernarkose der Ratte überflüssig ist. Die Narkose wurde in einem Glasgefäß, welches mit einem Verschlussdeckel verriegelt wurde, eingeleitet. Auf den Boden des Gefäßes wurden mit Ether getränkte Zellstoffeinlagen plaziert. Nach Verlust des Stellreflexes wurde noch höchstens 3-5 Sekunden gewartet, um die Wirkung des Ethers zu vertiefen (Tober-Meyer B `77). Die Narkose wurde anschließend in einem offenem System mit einer Nasenmaske aufrechterhalten. Hierzu diente eine 50 ml - Perfusorspritze, aus der der Kolben entfernt wurde. Die ersten zwei Drittel der Spritze wurden mit Mulltupfern gefüllt und diese nach Bedarf mit Ether getränkt. Durch Veränderung des Abstandes der Spritze von der Nase des Tieres konnte die Narkosetiefe reguliert werden. Die Betäubung wurde über die ganze Beobachtungszeit hinweg konstant gehalten. Die Narkose-tiefe unterlag durch Beobachtung des narkotisierten Tieres und regelmäßiger Auslösung der typischen Reflexe einer stetigen Überprüfung (Ben M `69, Green CJ `82).

### **3.3 Operationstechnik**

Jugulariskatheter: (V. jugularis externa dextra)

Es muß ein gesicherter zentralvenöser Zugang existieren, um vor, bzw. während der Mikroskopie Antikörperlösung und Fluoreszenzfarbstoffe verabreichen zu können.

Im vorliegenden Versuchsaufbau diente hierzu ein ca. 15 cm langer Polyethylenschlauch mit einem Innendurchmesser von 0,58 mm und einem Außendurchmesser von 0,96 mm, der mit dem Führungsstück einer Flexüle (Insyte-W<sup>®</sup>, 20GA, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) verbunden wurde. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde nach Hautdesinfektion mit dem queren Hautschnitt im rechten lateralen Halsdreieck ca. 0,5 cm oberhalb der Clavicula begonnen.

Unter optischer Hilfe (OP-Mikroskop: Mentor, Fa. Zeiss, Okulare: CM 15x ) wurde das subkutane Fettgewebe mit einer kleinen OP-Schere durchtrennt und danach stumpf bis auf die V. jugularis ext. präpariert. Die Vene wurde nun vom Zusammenfluß mit der Vena jugularis interna für ca. 0,5 cm nach distal freigelegt und mobilisiert. Unregelmäßig vorhandene Zuflüsse in diesem Gebiet mußten ligiert, bzw. koaguliert werden. Eine Mikroklemme (4 x 0,75mm, Fa. Fischer, Deutschland) diente kurz oberhalb der Clavicula zum reversiblen Verschuß der Vene. Danach konnte die V. jugularis mit zwei Haltefäden (Perma Handseide 4-0, resorbierbar ) angeschlungen werden. Der proximale Faden verschloß das Gefäß durch eine Ligatur. Dicht unterhalb dieser Ligatur wurde die Vene mittels einer Mikroschere eingeschnitten. Eine Pinzette, die den Einschnitt aufhielt, erleichterte das Vorschieben des zentralen Venenkatheters (ZVK) bis zur Klemme. Nach Entfernung der Gefäßklemme und Vorschub des Katheters in den rechten Vorhof konnte der ZVK mit dem zweiten Haltefaden fixiert werden.

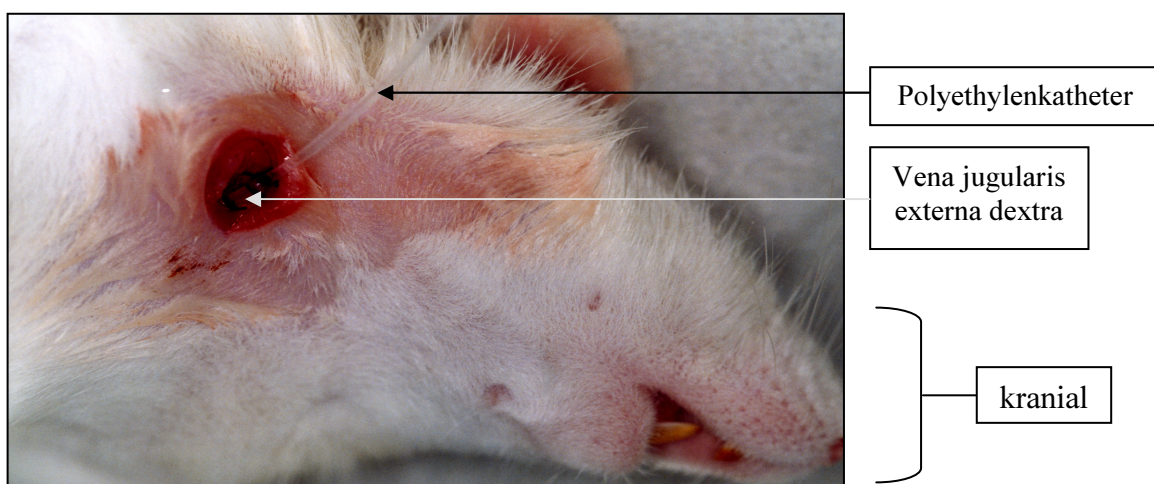


Abb. 14: Narkotisierte Ratte mit queren Hautschnitt im lateralen Halsdreieck und fixiertem Polyethylenschlauch als Jugularvenenkatheter

## Präparation der Arteria femoralis dextra / arterielle Blutdruckmessung

Um die Kreislaufstabilität während der Mikroskopie zu überwachen, wurde die Arteria femoralis dextra kanüliert. Der Katheter bestand aus einer Venenverweilkanüle (Insyte-W<sup>®</sup>, 24GA, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg), die auf ca. 1 cm Länge abgeschnitten wurde. Nach Palpation der Femoralarterie und Hautdesinfektion der Leiste wurde eine 1,5 cm lange, quer verlaufende Hautinzision ca. 0,5 cm distal des Leistenbandes durchgeführt. Danach erfolgte die Präparation bis auf die Arteria femoralis. Die Arterie, die medial von Vena- und Nervus femoralis zu finden ist, wurde nun auf einer Länge von ca. 0,5 cm unter dem Operationsmikroskop mobilisiert. Einzelne Seitenäste wurden unterbunden und die Arterie schließlich in der Nähe des Leistenbandes mit einer Mikrogefäßklemme (4 x 0,75 mm, Fa. Fischer, Deutschland) abgeklemmt. Es folgte die Anschlingung der Arterie mit einem Haltefaden (Perma-Handseide 4-0, resorbierbar) in direkter Nachbarschaft zur Klemme und die Ligatur des Gefäßes durch einen distalen Faden (Perma-Handseide 4-0, resorbierbar). Nach Einschnitt des Gefäßes mit einer Mikroschere wurde der Katheter ca. 5 mm weit in die Arteria femoralis bis vor die Gefäßklemme eingeführt und mit dem Haltefaden distal der Klemme fixiert. Anschließend entfernte man die Gefäßklemme. Der Katheter wurde über einen Druckwandler mit einem Meßgerät (Servomed, Fa. Hellige, Freiburg, Deutschland) zur Blutdruckkontrolle verbunden. Das Operationsfeld wurde für den Verlauf des Versuches mit einer feuchten Kompresse abgedeckt.

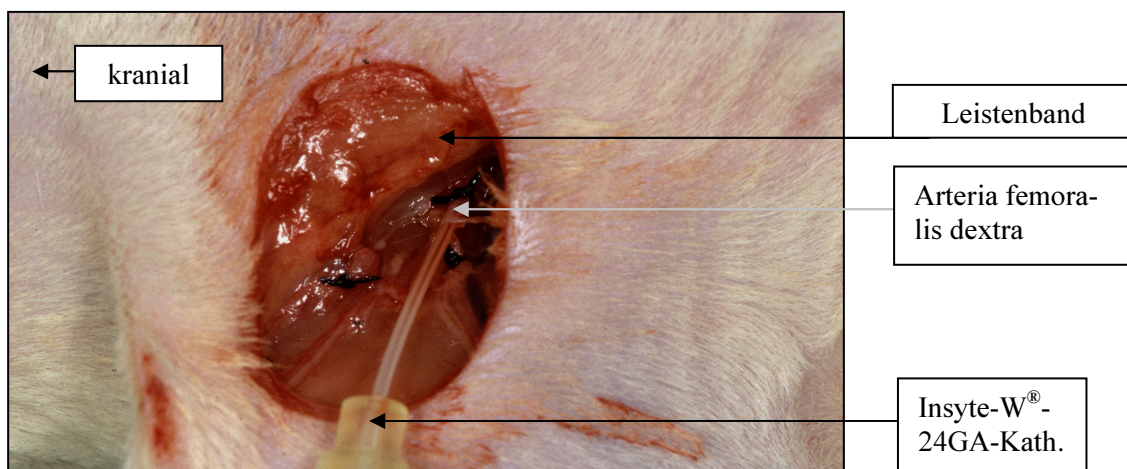


Abb. 15 Quer verlaufende Hautinzision unterhalb des rechten Leistenbandes mit Blick auf die kanülierte Arteria femoralis dextra.

### 3.4 Indomethacin / Entzündungsinduktion

#### Eigenschaften

Es handelte sich bei dem in dieser Studie verwandten Indomethacin um 1-p-Chlorbenzoyl-5-Methoxy-2-Methylindole-3-Acetic Acid (I-7378, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland). Die Substanz liegt als weißes Pulver mit einer leichten gelben Schattierung vor. Sie kommt hauptsächlich in zwei kristallinen Modifikationen vor, deren Schmelzpunkte 155°C, bzw. 162°C betragen. Indomethacin ist in neutralem oder schwach saurem Medium ( $pK_s=4,5$ ) stabil. Der optimale pH-Wert liegt bei 4,93. Der p-Chlorbenzoyl-Rest wird in alkalischem Medium hydrolytisch abgespalten. Ein Teil Substanz löst sich in 50 Teilen Ethanol, 40-45 Teilen Ether oder 30 Teilen  $\text{CHCl}_3$ . Durch geeignete Zusätze können die Löslichkeit in Wasser und die Stabilität der Lösung gegen alkalische Hydrolyse erhöht werden (Curry SH '82). Das Molekulargewicht beträgt 357,8 und die Summenformel lautet  $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{ClNO}_4$ .

Strukturformel:

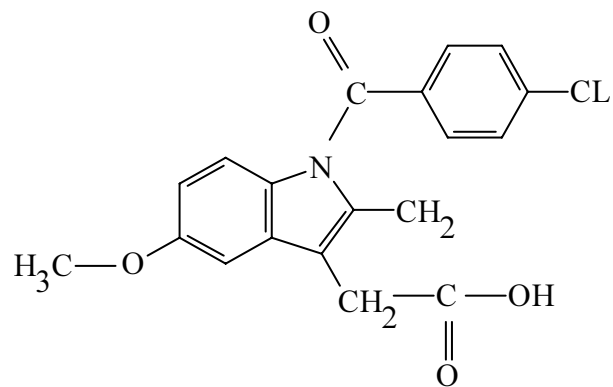


Abb. 16: Strukturformel von Indomethacin.

#### Pharmakodynamik

Indomethacin gehört zur Gruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika. Es wirkt analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch. Es hemmt durch Inhibierung der Cyclooxygenase die Prostaglandin-Biosynthese. Seine Wirkstärke ist etwa 10-40 mal größer als die der Salicylate. Die gleichfalls erhöhte Toxizität limitiert jedoch den therapeutischen Einsatz (Jang M '97).



### Pharmakokinetik

Die Applikation erfolgt meist oral oder rektal. Oral wird Indomethacin rasch und vollständig resorbiert, rektal ist die Bioverfügbarkeit nur wenig geringer. Maximale Plasmaspiegel treten nach 0,5-2 Stunden auf. Die therapeutische Plasmakonzentration liegt bei etwa 0,5-1 µg/ml. Indomethacin wird zu 90 % an Plasmaeiweiße und auch in größerem Ausmaß an Gewebe gebunden. Die Elimination aus dem Plasma verläuft biphasisch, die  $t_{1/2}$  der  $\beta$ -Phase kann von 2,6 bis 11,2 h schwanken. Die Metabolisierung erfolgt überwiegend in der Leber, wobei vorrangig die O-Methylgruppe oder die N-Acylgruppe abgespalten und Glukuronsäurekonjugate gebildet werden. Indomethacin unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf. Die Ausscheidung erfolgt hauptsächlich renal. Es werden jedoch 20-40 % auch über den Stuhl ausgeschieden. Indomethacin ist plazentagängig und erscheint auch in der Muttermilch (Rücker W '82).

### **Indomethacinzubereitung und subkutane Applikation zur Entzündungsinduktion**

Indomethacin wurde in folgender Zubereitung verwendet: Einer 5 %-igen NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (5 g NaHCO<sub>3</sub> in 100 ml Aqua ad inj.) wurden 10 mg/ml pulverförmiges Indomethacin (I-7378, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deutschland) zugesetzt. Durch Rührung bei Raumtemperatur (ca. 30 min.) erreichte man eine vollständige Auflösung des Wirkstoffes. Die Ratte wurde nach Greifen in der Nackenfalte und Fixierung der hinteren Gliedmaße in Rückenlage gebracht. Durch eine zweite Versuchsperson wurde nun das Fell des Versuchstieres zwischen zwei Fingern fixiert und soweit angehoben, bis eine deutlich sichtbare Hautfalte vorhanden war. Anschließend folgte eine subkutane Punktion des mittleren Unterbauches parallel zur Linea alba. Nach Ausschluß einer Blutgefäßpunktion wurde die Indomethacinapplikation vorgenommen. Das Indomethacin mußte so injiziert werden, daß ein geringer Widerstand zu spüren war und eine Haut-Quaddel hervorgerufen wurde - andernfalls befand sich die Kanülenspitze nicht subkutan, sondern im freien intraperitonealen Raum. Bei der richtigen Injektionstechnik und bei sachgemäßem und behutsamem Umgang mit dem Versuchstier ließen sich Fehlapplikationen vermeiden.

Die einmalige subkutane Gabe von Indomethacin (7,5 mg/kg KG) führt bei Nagern zu einer akuten Entzündung des Dünn- und Dickdarmes mit einer maximalen Ausprägung nach 24 Stunden. Diese heilt nach ca. 7 Tagen vollständig aus. Die zweimalige Gabe derselben Dosis im Abstand von einem Tag führt zu einer chronischen ulzerierenden Entzündung des Darmes. Der pathologisch-anatomische Befund am Darm zeigt segmentale Ulzerationen und aphtöse Läsionen der Darmmukosa im Bereich des distalen Jejunums bis zum proximalen Ileum mit einer transmuralen Entzündung, Fibrosierung, Adhäsionen und partiellen Obstruktionen (Yamada T '93).

### **3.5 Versuchsgruppen**

Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in fünf Versuchsgruppen mit je 7 Tieren eingeteilt.

Zunächst wurde das Modell etabliert. Hierzu mußten Versuchsaufbau (s. Kap. 3.6) und reproduzierbare Ergebnisse der Intravitalmikroskopie (IVM) standardisiert werden. Darüberhinaus galt es, eine ebenfalls standardisiert induzierte Entzündung zu etablieren und die damit einhergehenden pathophysiologischen intravitalmikroskopischen Parameter zu erheben. Dieses Bestreben wird in der gesunden Kontrollgruppe und der Entzündungsgruppe reflektiert.

Alle Experimente wurden als Akutversuche durchgeführt. Nach der in vivo Mikroskopie wurden die Tiere durch eine Überdosis Ether getötet.

#### **Einteilung der verschiedenen Versuchstiergruppen**

##### **1. Gesunde Kontrollgruppe**

Die Tiere dieser Gruppe erhielten nach gleichem Applikationsschema, wie die Tiere der Entzündungsgruppe und der Antikörpergruppen, ebenfalls zwei subkutane Injektionen. Diese unterschieden sich im Volumen nicht zur Indomethacin-applikation. Es handelte sich hierbei um 5% NaHCO<sub>3</sub>.

## 2. Entzündungsgruppe / Indomethacin

Die intestinale Entzündung in dieser Gruppe wurde durch die zweimalige subkutane Injektion von Indomethacin induziert (vgl. Kap. 3.4). Die Ergebnisse der Gruppe 2 zeigen die Schädigung und die Veränderung des Darmes, die durch Indomethacinapplikation entstehen.

## 3. Antikörpergruppe Mac-1 (CD11b)

Die Tiere dieser Gruppe erhielten 24 und 12 Stunden vor Versuchsbeginn den Antikörper Maus-anti-Ratte CD 11b (Klon: MRC OX-42; Isotyp IgG2, Katalog-Nr.: MCA275XZ; Serotec<sup>®</sup> / UK). Die Konzentration betrug 1mg/kg Körpergewicht. Die Applikation erfolgte über einen zentralen Venenkatheter, der unmittelbar vor der ersten Antikörpergabe bei dem jeweiligen Versuchstier im Nacken fixiert wurde und bis zur Untersuchung dort verblieb.

## 4. Antikörpergruppe ICAM-1 (CD54)

Den Tieren der Versuchsgruppe 4 wurde 24 und 12 Stunden vor Versuchsbeginn der Antikörper Maus-anti-Ratte CD54 (ICAM-1) (Klon: 1A29; Isotyp IgG1, Katalog-Nr.: MCA773CZ; Serotec<sup>®</sup> / UK) appliziert. Die Konzentration betrug 1mg/kg Körpergewicht. Die Applikation erfolgte wie zuvor in Gruppe 3 beschrieben.

## 5. Antikörpergruppe Mac-1 / ICAM-1 (CD11b / CD54)

Diese Tiere erhielten 24 und 12 Stunden vor Versuchsbeginn eine Antikörperkombination. Bei der Kombination handelte es sich um die gleichen Antikörper wie zuvor in Gruppe 3 und 4. Diese wurden nacheinander in gleicher Konzentration und nach gleichem Applikationschema den Tieren verabreicht.

**Tab. 9: Experimentelles Protokoll**

Versuchsgruppe	Tiere	Experimentelles Protokoll
Kontrollgruppe	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trägersubstanz (5 % NaHCO<sub>3</sub>) s.c.</li> <li>• Erhebung der IVM-Parameter (s.u.)</li> <li>• Makroskop.- und histologische Aufarbeitung des Darmes</li> </ul>
Indomethacin	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indomethacin 7,5 mg/kg KG, s.c.: 48 h und 24 h vor IVM</li> <li>• IVM-Parameter (s.u.)</li> <li>• Makroskop.- und histologische Aufarbeitung des Darmes</li> </ul>
anti-Mac-1	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indomethacin 7,5 mg/kg KG, s.c.: 48 h und 24 h vor IVM + anti-Mac-1 (1 mg/kg KG, i.v.): 24 h und 12 h vor IVM</li> <li>• Erhebung der IVM-Parameter (s.u.)</li> <li>• Makroskop.- und histologische Aufarbeitung des Darmes</li> </ul>
anti-ICAM-1	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indomethacin 7,5 mg/kg KG, s.c.: 48 h und 24 h vor IVM + anti-ICAM-1 (1mg/kg KG, i.v.): 24 h und 12 h vor IVM</li> <li>• Erhebung der IVM-Parameter (s.u.)</li> <li>• Makroskop.- und histologische Aufarbeitung des Darmes</li> </ul>
anti-Mac1 / anti-CD54	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indomethacin 7,5 mg/kg KG, s.c.: 48 h und 24 h vor IVM +anti-Mac-1 (1 mg/kg KG, i.v.) und anti-ICAM-1 (1mg/kg KG, i.v.): 24 h und 12 h vor IVM</li> <li>• Erhebung der IVM-Parameter (s.u.)</li> <li>• Makroskop.- und histologische Aufarbeitung des Darmes</li> </ul>
Summe	35	

### 3.6 Intravitalmikroskopie

Die Mikrozirkulation stellt die direkte Verbindung zwischen Blut und Gewebe, zwischen Gesamtorganismus und Einzelzelle dar. Durch die Anwendung moderner Analysemethoden ist es möglich, diskrete Phänomene in den einzelnen Segmenten des mikrovaskulären Netzwerks zu beschreiben und physiologische und pathogenetische Mechanismen auf zellulärer Ebene aufzuklären.

Als Instrument zur Visualisierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nutzten wir die Intravitalmikroskopie. Diese Methode erlaubt bei Anwendung von fluoreszierenden Markern (s.u. Kap. 3.6.2) dynamische Vorgänge, wie z.B. verschiedene Zellinteraktionen in entzündeten Gewebeabschnitten in hoher Auflösung bildlich dargestellt zu registrieren und quantitativ zu analysieren (Harris AG '97). Als Mikroskopietechnik wählten wir für diese Versuche die Epiillumination. Hierbei wird der auf einem Objektträger ausgelagerte Darm von oben betrachtet. Lichtquelle und Optik befinden sich also oberhalb des zu untersuchenden Objektes.

#### 3.6.1 Technischer Aufbau der Geräte

##### Mikroskop

- Zeiss Germany
- Okulare: PL 10x/20
- Objektiv: Zeiss Plan-NEOFLUAR 16x/0,5 mm Wasserimmersion
- Quecksilberlampe –Osram-HBO-12V – 100W
- Filter: 450-490, FT 510 (10) blau 515-565 für Fluoreszein-Natrium
- Filter: 510-560, FT 580 (14) grün LP 590 für Rhodamin 6 G

##### Bildaufnahme und Verarbeitung

- Videokamera (Pieper FK 6990-IQ)
- Videorekorder (Panasonic AG - 7350)

- Timer (FOR-A VTG 33)
- Videobildschirm (Pieper IQM 538)
- Rechner mit Bildverarbeitungssoftware und Grafiktablett

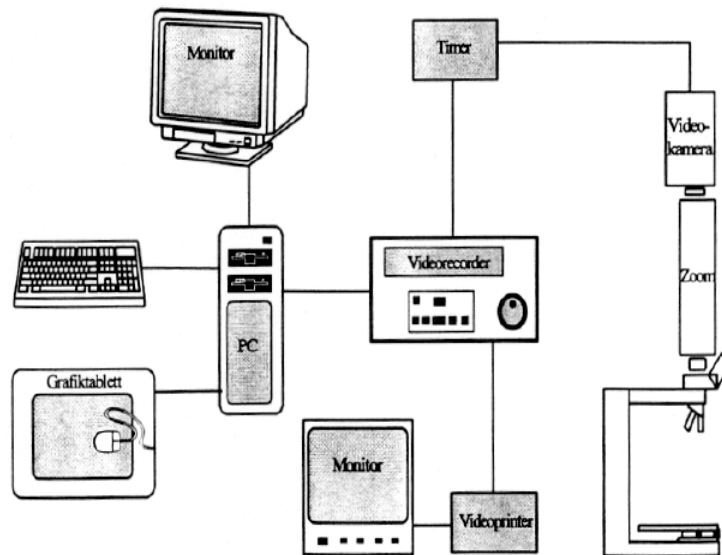


Abb. 17: Schematische Anordnung der Geräte für die Intravitalmikroskopie.

### 3.6.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluorescein (Syn.: Fluoreszein, Resorcinphthalein)

Strukturformel:

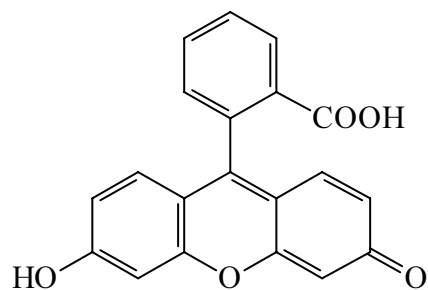


Abb. 18: Strukturformel von Fluorescein.

Fluorescein (2-(6-Hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-benzoesäure) ist ein Xanthenfarbstoff in Form von gelben oder roten Kristallen, die in heißem Alkohol, in Aceton

oder Alkalilaugen löslich sind und dann eine intensiv gelbgrüne Fluoreszenz geben. Trotz seiner ungeheuren Färbekraft wird Fluorescein wegen seiner geringen Beständigkeit in der Färberei nicht verwendet, wohl aber als Indikator, medizinisch zur Diagnose von Hornhautschäden, Durchblutungsstörungen und bei Gallenblasen- und Darmoperationen, zum Färben von Seifen, Badesalzen und technisch zur Beobachtung von Verunreinigungen durch Abwässer. Fluorescein wird hauptsächlich als wasserlösliches Kalium- oder Natriumsalz (s.u.) verwendet.

#### Natriumfluorescein

Natriumfluorescein ( $C_{20}H_{10}Na_2O_5$ ;  $M=376,28$ ; Absorptionsmaximum: 490-492 nm, Sigma-Nr.: F-6377) verstärkt den Kontrast zwischen den zu mikroskopierenden Gefäßen und deren Umgebung. Zudem hat sich bei der Markierung von Leukozyten und deren Beobachtung eine Doppelfärbung mit Natriumfluorescein und Rhodamin 6G (s.u.) bewährt (Post S '92).

Es handelt sich um ein orangerotes Pulver, welches in Wasser leicht löslich ist. Das Reagenz zeigt eine außerordentlich starke Farbtintensität, seine Fluoreszenz läßt sich im UV-Bereich noch bis 0,02 ppm nachweisen. Wäßrige Lösungen zeigen eine intensive gelb-grüne Fluoreszenz. Die Aufbewahrung hat in gut schließenden Gefäßen zu erfolgen, da die Substanz hygroskopisch ist. Natriumfluorescein wird bevorzugt in den peripheren Gebieten aufgenommen und ist zur Beurteilung der mikrovaskulären Perfusion hervorragend geeignet (Post-S '92).

Strukturformel:

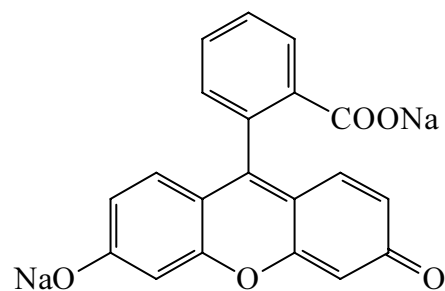


Abb. 19: Strukturformel von Natriumfluorescein.

## Rhodamin 6 G

Rhodamin 6 G ( $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ ;  $M=479,02$ ; Sigma-Nr.: R-4127) ist ein Farbstoff (Xanthen-Typ) zur intravitalem Anfärbung von Zellmitochondrien. Es findet in der Intravitalmikroskopie Verwendung, um Leukozyten durch Kontrastverstärkung sichtbar zu machen. Bei Konzentrationen bis zu  $10^{-7}$  mol/l werden ausschließlich nur Mitochondrien gefärbt, während bei Verwendung höherer Konzentrationen ebenso die Zytoplasmen des Endoplasmatischen Retikulums angefärbt werden (Batz H '95). Diese Spezifität geht auf die physikochemischen Eigenschaften und den lipophilen Charakter in Verbindung mit der positiven Ladung der Substanz zurück. Die Anhäufung von Rhodamin in den Mitochondrien kann zum einen durch die negative Ladung der Mitochondrienmatrix bedingt sein oder aber Ergebnis eines unlöslichen Salzes zwischen Farbstoffkationen und dem negativ geladenen Cardiolipin (Phospholipid), einer integralen Komponente der inneren Mitochondrienmembran, sein (Batz H '95).

Hohe Farbstoffkonzentrationen können die oxydative Phosphorylierung inhibieren und eine längerdauernde Lichtexposition kann zu photodynamischen intrazellulären Nebenwirkungen von Rhodamin und auch Natriumfluoreszein führen (Post S '92). In der Industrie dienen Rhodamine als Farbstoffe für Laser, zur Herstellung von Mikroskopie-Farbstoffen, Leuchtpigmenten, Pigmente für Druckfarben und Schreibtinten, zur Färbung von Papier, Seide, Wolle, Jute und Sisal (Batz H '95).

Strukturformel:

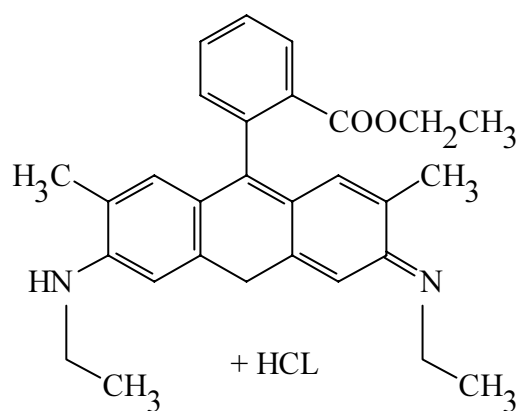


Abb. 20: Strukturformel von Rhodamin 6 G.



Fluorescein-Isothiocyanat Isomer I ( FITC Isomer I )

Fluorescein-Isothiocyanat Isomer I (  $C_{21}H_{11}NO_5S$ ;  $M=389,39$ ; Sigma Nr.: F-1628 ) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der es ermöglicht, Erythrozyten ex vivo zu markieren.

Das Sichtbarmachen einzelner Erythrozyten bietet die Möglichkeit zur Geschwindigkeitsbestimmung (Marzi I '94) und ermöglicht Aussagen zur Gefäßmorphologie. Aus den Geschwindigkeitswerten und dem Gefäßdurchmesser läßt sich der mittlere Blutfluß ermitteln (s.u.).

Strukturformel:

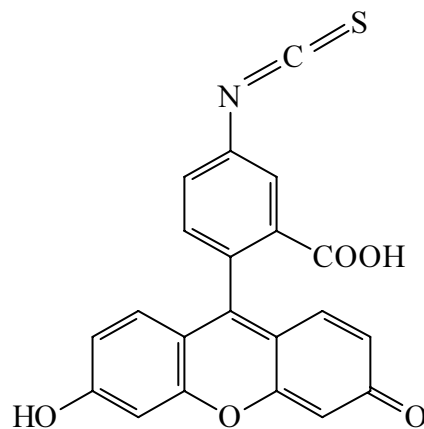


Abb. 21: Strukturformel von Fluorescein-Isothiocyanat Isomer I (FITC Isomer I).

### FITC-Markierung autologer Erythrozyten

Die folgenden Arbeitsschritte wurden zur Markierung autologer Erythrozyten durchgeführt:

1. Benötigte Blutmenge in heparinisierte Insulinspritze aufziehen (ca. 1 ml)
2. In Zentrifugenröhrchen umfüllen und mit Alseyer Puffer (s.u.) überschichten und zentrifugieren (10 min bei 2000 U/min)
3. Überstand abpipettieren und Vorgang 3x wiederholen
4. Überstand abpipettieren und mit Bicine-Saline-Puffer (s.u.) waschen

5. Überstand abpipettieren und Probe 1:2 (s. Punkt 8) mit Bicine-Saline Puffer verdünnen
6. FITC (Fluorescein-Isothiocyanat, Isomer I, Sigma Nr.:F-1628) abmessen, 9 mg / ml Erythrozyten
7. FITC mit 100 µl (ca. 2-3 Tropfen) DMF (N,N-Dimethylformamid, Sigma Nr.: D-4254) auf einem Uhrglas lösen
8. Gelöstes FITC mittels einiger ml Bicine-Saline Puffer vom Uhrglas spülen und zu den Erythrozyten geben
9. Probe für ca. 3 h bei konstanter Temperatur von 25°C inkubieren
10. Probe zentrifugieren und Überstand abpipettieren
11. Probe 5x mit Bicine-Saline Puffer waschen (bzw. bis Überstand frei von Farbstoff)
12. Erythrozyten 1:1 mit physiologischer NaCl-Lösung mischen
13. Erythrozyten mit CPD (Citrat-Phosphat-Dextrose-Lsg., Sigma Nr.: C-7165) zur Konservierung 10:1,4 mischen
14. Bei 1-6°C unter Lichtabschluß aufbewahren

### **Herstellung von Alseyer Puffer**

- 1 l Aqua dest.
- 20,5 g Dextrose oder Glukose
- 8,0 g Zitronensäure (Citric acid, Trisodium Salt Dihydrate, Sigma Nr.: C-7254)
- 0,55 g Zitronensäure (Citric acid, Free acid , Anhydrous, Sigma Nr.: C-0759)  
mischen und mit NaOH / HCL auf pH 6,2 und NaCl (0,31688 g NaCl / l = 10 mosmol) auf 290 mosmol einstellen

### **Herstellung von Bicine-Saline Puffer**

- 1 l Aqua dest.
- 3,264 g Bicine ((N,N-bis(2-Hydroxyethyl)glycin, SigmaNr.: B-3876)

- 7,815 g NaCl
  - 10,0 ml 1N NaOH
- mischen und mit NaOH auf pH 8,3 einstellen und NaCl auf 290 mosmol einstellen

#### Kontrastmittelkonzentrationen

Rhodamin wurde in einer Endkonzentration von 0,096 mg/ml (0,2 µmol/ml) und Fluorescein-Natrium in einer Konzentration von 0,75 mg/ml (2 µmol/ml) eingesetzt (Post S '92). Dabei wurde Rhodamin 15 min vor Mikroskopiebeginn in einer Dosierung von 0,1 µmol/kg KG i.v. verabreicht. Fluorescein-Natrium (1 µmol/kg KG i.v.) wurde unter mikroskopischer Beobachtung sowie zusätzlich bei Kontrastabschwächung i.v. injiziert. FITC-1 wurde in einer Dosierung von 0,05 ml/100 g Ratte i.v. verabreicht.

### 3.6.3 Durchführung der Mikroskopie

Die Tiere lagen nach Einleitung der Narkose auf einem kleinen mobilen Operationstisch. Dieser konnte auch als Mikroskopiertisch verwendet werden. In der Mitte des Tisches befand sich ein Heizelement, welches über ein angeschlossenes Wasserbad reguliert werden konnte. Die Platte war mit einer saugfähigen Einmalunterlage abgedeckt. Die vorgenommenen invasiven Eingriffe fanden alle unter semisterilen Bedingungen statt. Das Operationsfeld wurde mit Neo-Kodan<sup>®</sup> (Fa. Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert. Alle Tiere erhielten vor Versuchsbeginn sowohl einen Vena jugularis - Katheter als auch einen Arteria femoralis - Katheter (s. Kap. 3.3). Im Anschluß daran wurde ebenfalls bei allen Tieren das Abdomen mit einer mittleren Oberbauchinzision eröffnet. Zunächst wurde hierbei die Haut durchtrennt und von der Muskelfaszie mobilisiert. Die muskuläre Bauchdecke und das Peritoneum wurden mit einer kleinen OP-Schere zusammen in der Linea alba eröffnet. Den Dünndarm lagerte man nach Mobilisation auf einer speziell konstruierten Haltevorrichtung (s. u.), um ihn dann unter dem Objektiv des Intravitalmikroskops flach auszubreiten. Eine Folie deckte die freie Oberfläche des Darmes ab. Für die in vivo mikroskopische Beurteilung ist eine

plane Oberfläche notwendig, um bei Aufsetzen des Objektivs ein gleichmäßig scharfes Bild zu erhalten, ohne dabei bestimmte Darmabschnitte durch erhöhten Druck zu schädigen oder sogar die Perfusion zu unterbinden. Auswahlkriterium hierbei ist ein möglichst faecesleerer, mit Entzündungszeichen (Rötung, Schwellung, Fibrinauflagerungen, Ulzera) versehener Dünndarmabschnitt. Der exakten und vor allem schonenden Auslagerung des Darmes kam hierbei sehr große Bedeutung zu. Grobe Manipulationen sowohl bei der Präparation als auch bei der Auslagerung bedingen eine verstärkte Leukozytenadhärenz und Mikroblutungen, die keine objektive Aussage der Mikroskopie mehr erlauben. Bei der eigentlichen Auslagerung balancierte man den ausgewählten Darmabschnitt auf zwei feuchte Stieltupfer, die diesen nur im Randbereich des zu untersuchenden Gebietes leicht berühren durften. Danach wurde der Darm auf ein modelliertes Bett aus Knetmasse gelegt. Diese Haltevorrichtung ist an einem Mikromanipulator befestigt. Mit Hilfe des in alle Richtungen verstellbaren Manipulators kann das ausgewählte Darmsegment etwas aus dem Abdomen heraus angehoben werden, um die Atembewegungen des Zwerchfells zu minimieren und die Zugänglichkeit zu erleichtern. In der gesunden Kontrollgruppe wurde ein Teil des mittleren Ileums zur Auslagerung ausgewählt. Bei den Indomethacin-behandelten Tieren wurde immer das Dünndarmsegment mikroskopiert, welches die stärksten Entzündungszeichen (s.o.) aufwies. Lag der Darm gleichmäßig und gut eingebettet auf der Knetmasse, wurde dieser mit einer durchsichtigen Folie abgedeckt. Die Folie schützt vor Austrocknung und dient als Kontaktfläche zum Objektiv. Bei der Positionierung des Darmes muß darauf geachtet werden, daß der Löffel des Mikromanipulators keine Mesenterialgefäße komprimiert. Vor und während der Untersuchung wurde der ausgelagerte Darm kontinuierlich mit körperwarmer (37<sup>0</sup>C) 0,9 %-iger NaCl-Lösung überspült, um eine gute Wasserimmersion und stabile Wärme- sowie Feuchtigkeitsbedingungen zu garantieren. Während des Versuches erfolgte ein permanentes Temperatur- und Blutdruckmonitoring. Um stabile arterielle Blutdruckwerte und eine stabile Herzfrequenz zu gewährleisten, startete die eigentliche Mikroskopie mit der intravenösen Verabreichung der Fluoreszenzfarbstoffe (s.u.) nach einer Equilibrierungszeit von 30 Minuten. Es wurden insgesamt 10 postkapilläre, subserosale Sammelvenolen über jeweils 2 Minuten (1. Minute = FITC-gefärbte Erythrozyten, 2. Minute = Rhodamin 6G – gefärbte Leukozyten in Interaktion mit dem Endothel)

(s. auch Kap. 3.6.3 und 3.64) pro Tier mikroskopiert. Diese Sammelvenolen ( $\varnothing$  80 -120  $\mu$ m) befanden sich am Übergang vom Mesenterium zur Darmwand (s. Abb. 23 unten).

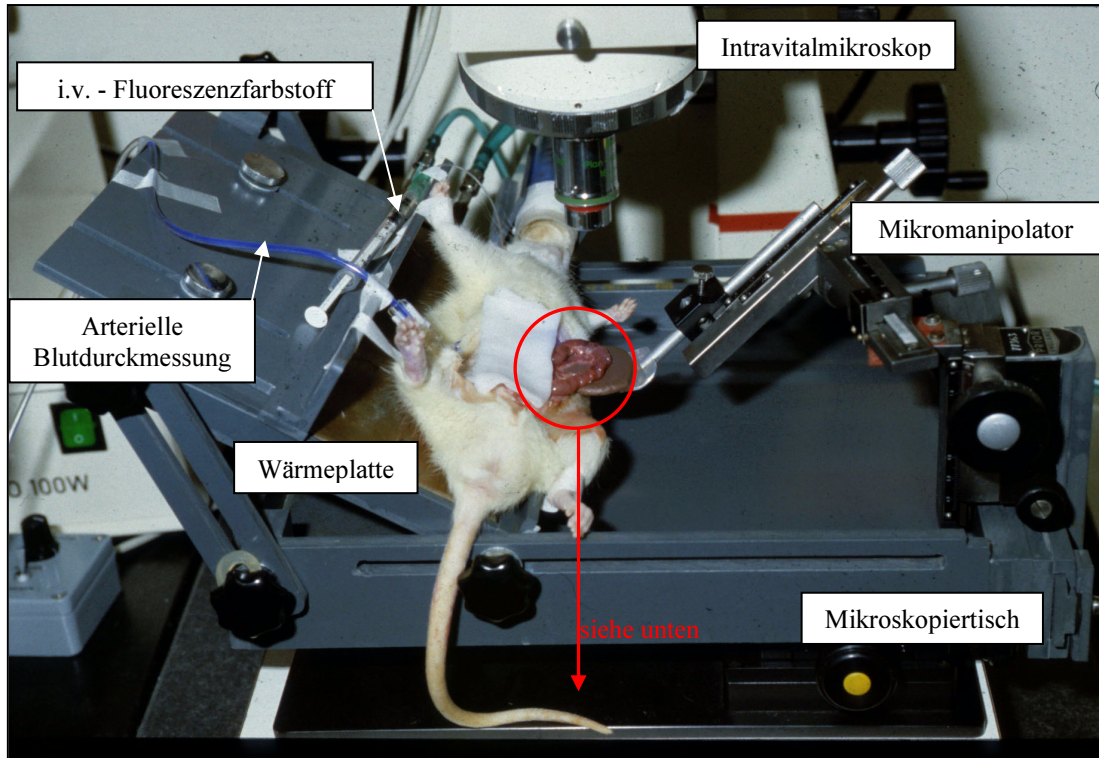


Abb. 22: Versuchsaufbau – Ratte mit ausgelagertem Darm auf dem Mikroskopiertisch.

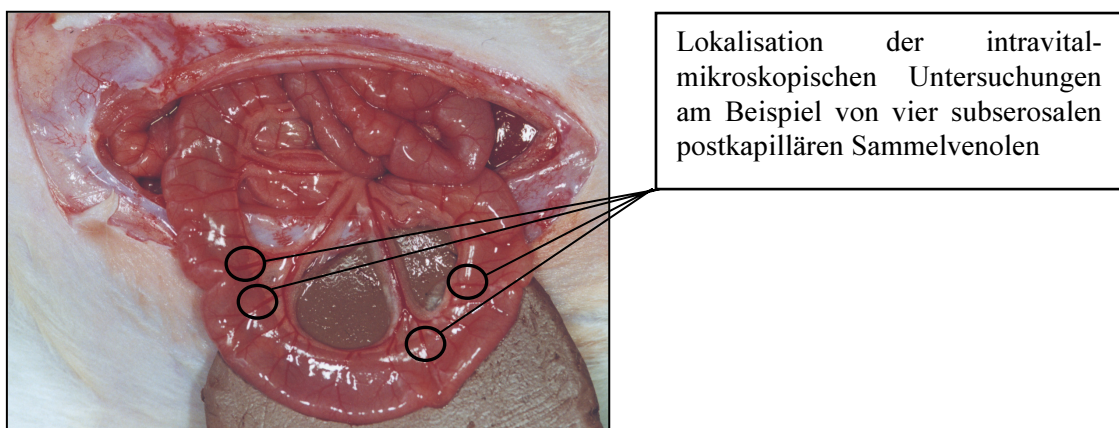


Abb. 23: Makroskopisches Bild einer ausgelagerten, gesunden mittleren Ileumschlinge (s.auch Kap. 4.1.2) Die markierten Sammelvenolen befinden sich am Übergang vom Mesenterium zur Darmwand, im Hintergrund unten erkennt man die braune Knetmasse, die auf dem Löffel des Mikromanipulators liegt.

### 3.6.4 Mikrozirkulatorische Untersuchungsparameter

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie wurden in dieser Studie folgende Parameter der Mikrozirkulation in den postkapillären Venolen gemessen:

- **Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen**

Temporär adhärenente Leukozyten (Roller)

In den Untersuchungen wurden sie als Anteil gefärbter, zirkulierender Leukozyten über 100 µm/30 s angegeben, die langsam am Gefäßendothel entlangwandern (Arndt H '95, Gonzales AP '94). Die Auswertung erfolgte am laufenden Videofilm in 10 Gefäßen pro Tier.

Permanent adhärenente Leukozyten (Sticker)

Leukozyten, die im Beobachtungszeitraum länger als 30 s am Endothel einer Venole über eine Strecke von 100 µm hafteten, wurden als Sticker ausgewertet (Arndt H '95, Gonzales AP '94).

Die Auswertung erfolgte am laufenden Videofilm in 10 Gefäßen pro Tier.

- **Erythrozytengeschwindigkeit**

Quotient aus zurückgelegtem Weg und der dafür benötigten Zeit (µm/s). Die Geschwindigkeitsbestimmung wurde für jeweils fünf Erythrozyten pro Gefäß bei 10 Gefäßen pro Tier durchgeführt.

- **Volumetrischer Blutfluß**

Aus Erythrozytengeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser wurde der Blutfluß mit folgender Formel berechnet:  $F(t) = \pi \cdot (D^2/4) \cdot v \cdot t / 10^9$  (F: Blutfluß in µl/min, D: Durchmesser der Venole in µm, v: Geschwindigkeit in µm/s, t: Zeit in Sekunden) (Zimmerhackl B '83).

- **Gefäßmorphologie**

Länge

Gut sichtbarer Bereich der Venole, dessen Strecke (100µm) in die Berechnung der Erythrozytengeschwindigkeit einging.

Durchmesser

Abstand der Gefäßwand (80-120 µm) im Meßbereich.

(Anmerkung: Die computergestützte Analyse der aufgezeichneten Videobänder wurde mit Soft Imaging Systems<sup>®</sup> – Software (Münster / Deutschland) durchgeführt.)

### 3.7 Antikörper

#### 3.7.1 Antikörper: Maus anti Ratte CD11b (anti-Mac-1)

Der in dieser Studie verwandte Maus anti Ratte CD11b-Antikörper (Klon: MRC OX-42, Isotyp IgG2, Katalog-Nr.: MCA 275 XZ, Serotec<sup>®</sup> / UK) blockiert Oberflächenproteine auf Leukozyten. Hierbei handelt es sich um die  $\alpha$ -Kette CD11b, die sich nicht-kovalent mit einer gewöhnlichen  $\beta$ -Kette (CD18) verbinden kann, um ein Integrin zu bilden (s. Kap. 2.4). Die spezifischen Eigenschaften des Antikörpers (MRC OX-42) liegen in der Erkennung der meisten Makrophagen (einschließlich der peritonealen und aktivierten Makrophagen) sowie der Kupffer-Zellen. Es werden jedoch nur ca. 35 % der Alveolar-makrophagen erkannt (Robinson AP '86). Darüberhinaus bindet der Antikörper umfassend an Dendritenzellen und findet Granulozyten sowie Zellen mit der Morphologie von Mikroglia als Bindungspartner. Der MRC OX-42-Antikörper immunpräzipitiert drei Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 160000, 103000 und 95000. Das gereinigte, flüssig-klare IgG (0,2 ml  $\cong$  0,2 mg) wurde 24 und 12 Stunden vor Versuchsbeginn über einen zentralen Venenkatheter appliziert. Als Trägersubstanz diente PBS-Puffer (Phosphate buffered saline, ph 7,2).

### 3.7.2 Antikörper: Maus anti Ratte CD54 (anti-ICAM-1)

Der in dieser Studie verwandte Maus anti Ratte CD54-Antikörper (Clone: 1A29, Isotyp IgG1, Katalog-Nr.: MCA 773 XZ, Serotec<sup>®</sup> / UK) interagiert mit dem Homolog der Ratte von ICAM-1 (Tamatani T `90). Die Schlußfolgerung, daß der Antikörper 1A29 spezifisch das ICAM-1 der Ratte erkennt, basiert auf seiner Fähigkeit zur Hemmung homotypischer Aggregation von Phytohämagglutininblasten, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese Analyse des erkannten Antigens, die zeigte, daß das 1A29 Antigen vergleichbare Merkmale des humanen ICAM-1 besitzt, der Antigenverteilung in Immunperoxidase-Färbung von Gefrierschnitten und auf der Zytokin-induzierten Hochregulation des Antigens (Tamatani T `90). Der anti-ICAM-1-Antikörper blockiert signifikant die Bindung von aktivierten, nicht aber von ruhenden Lymphozyten an kultivierte hohe Endothelzellen (Tamatani T `90).

## 3.8 Morphologische Graduierung

Die Versuchstiere wurden nach Beendigung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen durch eine Überdosis Ether getötet. Es folgte die Entnahme sowie die makroskopische und histologische Untersuchung des Dünndarmes. Der Schweregrad der Entzündung wurde durch die Vergabe von Punkten anhand spezieller Kriterien (s.u.) ermittelt. Hierzu wurde der gesamte Dünndarm längs eröffnet und danach für die spätere histologische Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff konserviert. Die histologischen Schnitte fertigte man aus dem Bereich des Darmes an, an dem zuvor die Intravitalmikroskopie durchgeführt wurde. Die einzelnen Schnitte wurden einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Kap. 3.8.3) zugeführt.

### 3.8.1 Makroskopie-Score

(modifiziert nach Arndt H `96)

- |           |   |
|-----------|---|
| 0 Punkte: | keine Veränderung der Serosa oder Mukosa                    |
| 1 Punkt:  | hyperämische Läsionen oder petechiale Blutungen oder beides |



2 Punkte:	vereinzelte mukosale Erosion oder Ulzeration
3 Punkte:	multiple Erosionen oder Ulzerationen mit hyperämischen, hämorrhagischen oder adhäsiven Läsionen in der Serosa
4 Punkte:	multiple Erosionen oder Ulzerationen (< 10 cm in der Gesamtlänge des Dünndarms beteiligt) mit hyperämischen, hämorrhagischen oder adhäsiven Läsionen in der Serosa
5 Punkte:	multiple Erosionen oder Ulzerationen (> 10 cm in der Gesamtlänge des Dünndarms) mit hyperämischen, hämorrhagischen oder adhäsiven Läsionen in der Serosa

### 3.8.2 Histologie-Score

(modifiziert nach Vilaseca J '90)

Ulzeration:	kein Ulkus, Epithelialisierung	0 Punkte
	kleine Ulzera < 3mm	1 Punkt
	große Ulzera > 3mm	2 Punkte
Entzündung:	keine	0 Punkte
	mild	1 Punkt
	mäßig	2 Punkte
	schwer	3 Punkte
Tiefe der Läsion:	keine	0 Punkte
	Submukosa	1 Punkt
	Muscularis propria	2 Punkte
	Serosa	3 Punkte
	Maximal-Score	8 Punkte

(Anmerkung: Die Modifizierung bestand hier in der Nicht-Berücksichtigung von Granulomen (nicht existent in der Indomethacin-Enteritis) und keiner Berücksichtigung von Fibrosen (nicht mehr vorhanden nach zwei Tagen Entzündung)).

### 3.8.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) ist die Übersichtsfärbung in der Histologie. In dieser Studie wurde die Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer durchgeführt. Der Kernfarbstoff wird durch Extraktionsprozesse aus Blauholz gewonnen. Durch Reifungsvorgänge (Oxidationsprozesse) werden die negativen Ladungen des Extraktes verstärkt. Durch Bindungen an Alaune oder Metalle wird eine „Umladung“ vorgenommen. Die jetzt positiven Ladungen des Hämalauns lagern sich an die negativ geladenen Phosphorgruppen der Nucleinsäuren des Kerns an. Die elektropolaren Bindungen (physikal. / chem. Färbvorgang) sind relativ fest. Zusätzlich zu diesem physikal. / chem. – Färbvorgang läuft ein rein physikalischer Vorgang ab. Durch Diffusionsprozesse werden auch die übrigen Gewebsanteile mit angefärbt. Da hierbei nur eine Auffüllung der Zwischenräume erfolgt, lässt sich diese „Anfärbung“ problemlos durch Differenzierung mit Salzsäure-Alkohol (1 %) wieder entfernen. Als Cytoplasmafarbstoff wurde Eosin (0,3 %), das zu den Fluorescein-Farbstoffen (s. Kap. 3.6.2) gehört und schwach sauer ist, verwendet.

#### Herstellung von Mayers Hämalaun aus Hämatoxylin

1. 1g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest. lösen
2. 200 mg Natriumjodat ( $\text{NaJO}_3$ ) und
3. 50 g Kalialaun in der Hämtoxylinlösung unter Schütteln lösen
4. 50 g Chloralhydrat und
5. 1 g Zitronensäure wird zugegeben; nun schlägt der Farbton von blauviolett (3) nach rotviolett um

Die Färbelösung ist sofort gebrauchsfertig, sie ist in verschlossener Flasche über lange Zeit stabil. Vor Gebrauch filtrieren. Die Färbung erfolgte nach üblicher Methode über ca. 10 Minuten / Schnitt. Die Kerne werden hierbei blau, alle anderen Strukturen rötlich mit unterschiedlicher Intensität angefärbt (Romeis B `89)

### 3.9 Statistische Auswertung

#### Deskriptive Statistik

In den einzelnen Gruppen und Untergruppen wurde der arithmetische Mittelwert  $\mu$  errechnet, indem die Summe der Einzelwerte  $a_1, a_2, \dots, a_n$  durch die Anzahl  $N$  der Meßwerte dividiert wurde:

$$\mu = \frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N a_i$$

Zur Beurteilung der Streubreite der Einzelwerte vom Mittelwert errechneten wir die Standardabweichung  $\sigma$ . Man erhält sie, indem man die Summe der Abweichungsquadrate vom arithmetischen Mittelwert  $\mu$  bildet, diese durch die Anzahl der  $N$  Meßwerte dividiert und anschließend aus dem Quotienten die Quadratwurzel zieht:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N (a_i - \mu)^2}$$

#### Analytische Statistik

Zum Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

Die makroskopischen und histologischen Ergebnisse wurden mit Hilfe des exakten Tests nach Fischer auf Signifikanz geprüft.

Werte von  $P < 0,05$  wurden als signifikant betrachtet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Modelletablierung / Kontrollgruppen

Die Ergebnisse aus den Kontrollgruppen und somit zugleich die Etablierung des Modells zeigen die mikrozirkulatorischen Untersuchungsparameter am gesunden Rattendarm und deren Veränderung am entzündeten Rattendarm. Die den Diagrammen zugrundeliegenden Daten sind im Anhang in Tabellenform aufgezeigt.

#### 4.1.1 In Vivo Mikroskopie

Gefäßparameter – dynamische Untersuchungen:  
Erythrozytengeschwindigkeit und Gefäßbreite

	Kontrollgruppe (gesund)		Indomethacingruppe (entzündet)	
Tier	v	Ø	v	Ø
1	1877,00	84,24	2280,67	93,61
2	2517,89	89,65	1864,18	100,38
3	2097,33	105,68	1829,38	99,86
4	2432,80	106,15	1650,99	110,15
5	1735,33	111,02	2157,48	105,42
6	2088,44	116,35	2445,77	97,02
7	1593,53	108,10	1959,40	105,53
$\bar{x}$	<b>2048,90</b>	<b>103,03</b>	<b>2026,84</b>	<b>101,71</b>
$S_{\bar{x}}$	343,14	11,66	279,36	5,66

Tab. 10: Erythrozytengeschwindigkeit (  $v = s/t$  ) in  $\mu\text{m/s}$  und Gefäßbreite (  $\varnothing$  ) in  $\mu\text{m}$  der gesunden Kontrollgruppe und der entzündeten Indomethacingruppe.

Die Erythrozytengeschwindigkeit und die Gefäßdurchmesser der Kontrolltiere als auch der Indomethacintiere lagen in gleichen Größenbereichen und unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

### Morphologische Darstellung eines gesunden und eines kranken Gefäßes

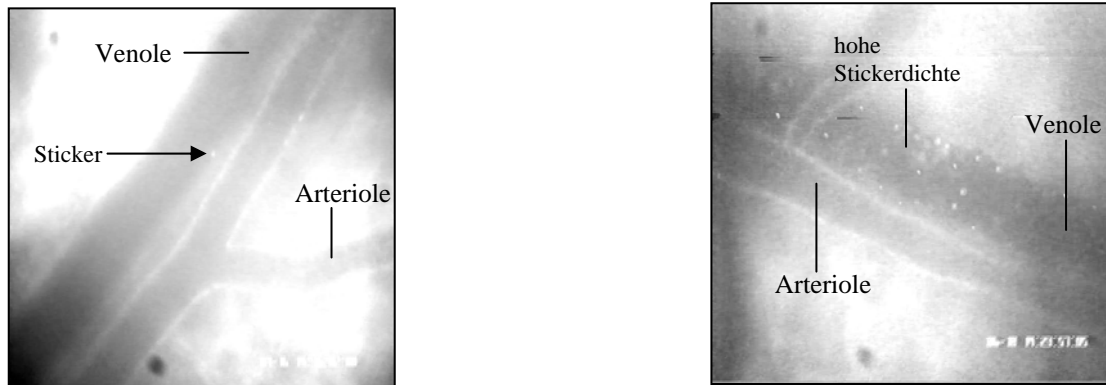


Abb. 24: In vivo mikroskopisches Bild eines gesunden Darmgefäßes mit Darstellung eines Stickers und eines kranken Darmgefäßes mit Darstellung vieler Sticker und Roller.

### Rollende Leukozyten in den Darmgefäßen

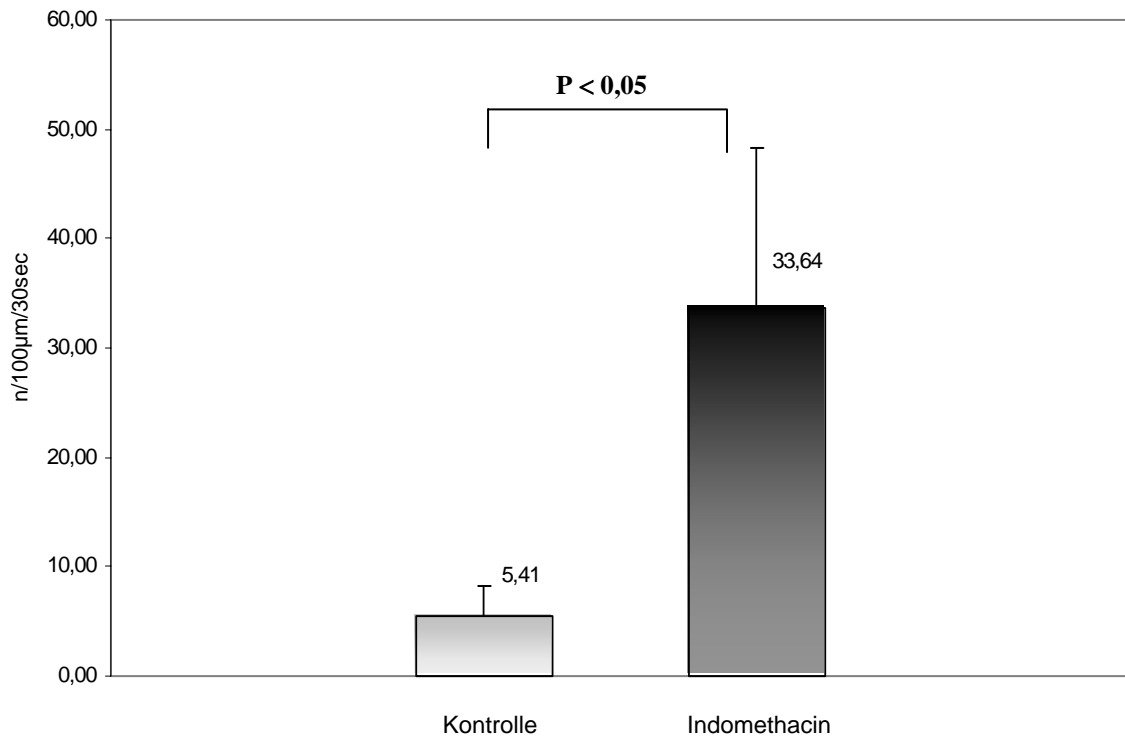


Abb. 25: Rollende Leukozyten (n/100 µm/30 sec) in den subserosalen postkapillären Darmvenolen in der gesunden Kontrollgruppe und in der Entzündungsgruppe.

Den Indomethacininjektionen folgte ein signifikanter Anstieg der rollenden Leukozyten in den untersuchten Gefäßen. Der Anteil rollender Leukozyten ( $n/100 \mu\text{m}/30 \text{ sec}$ ) lag mit  $33,64 \pm 14,56$  in der Indomethacingruppe signifikant über dem Anteil der rollenden Leukozyten in der Kontrollgruppe ( $5,41 \pm 2,79$ ).

### Permanent adhärenente Leukozyten in den Darmgefäßen

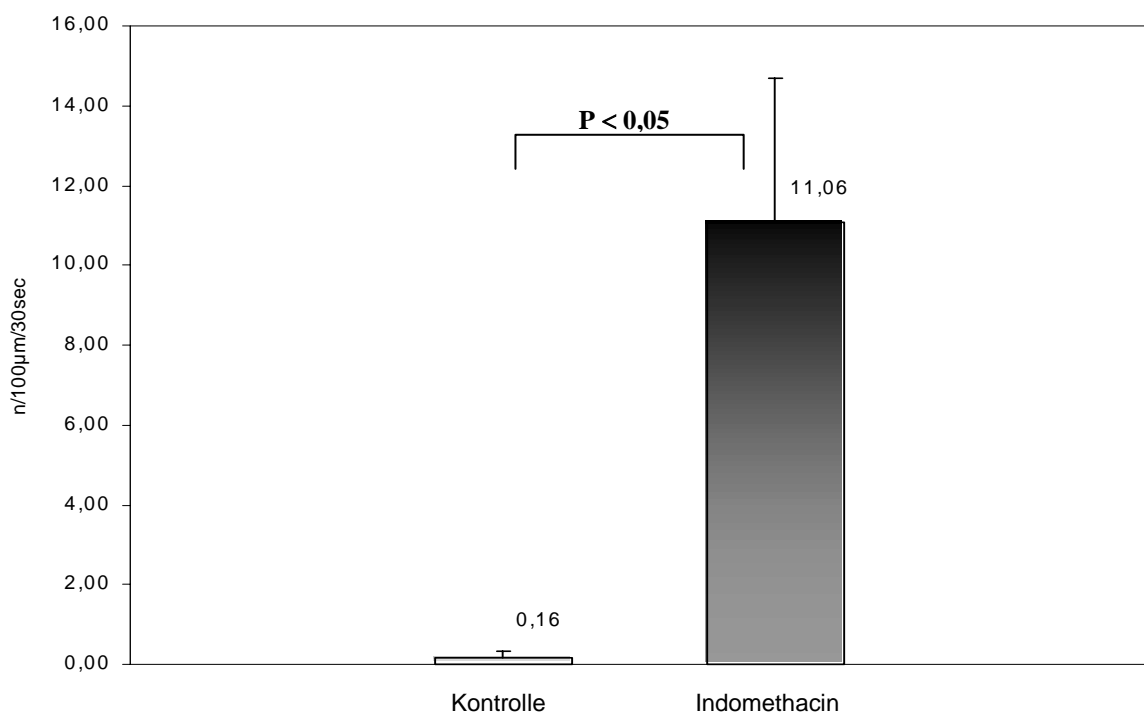


Abb. 26: Permanent adhärenente Leukozyten ( $n/100 \mu\text{m}/30 \text{ sec}$ ) in den Darmgefäßen in Abhängigkeit von der Indomethacinapplikation in der Entzündungsgruppe.

Die permanent adhärenente Leukozyten lagen mit  $11,06 \pm 3,63$  bei den entzündeten Tieren signifikant über der Anzahl permanent adhärenente Leukozyten der gesunden Tiere in der Kontrollgruppe ( $0,16 \pm 0,18$ ).

## Blutfluß

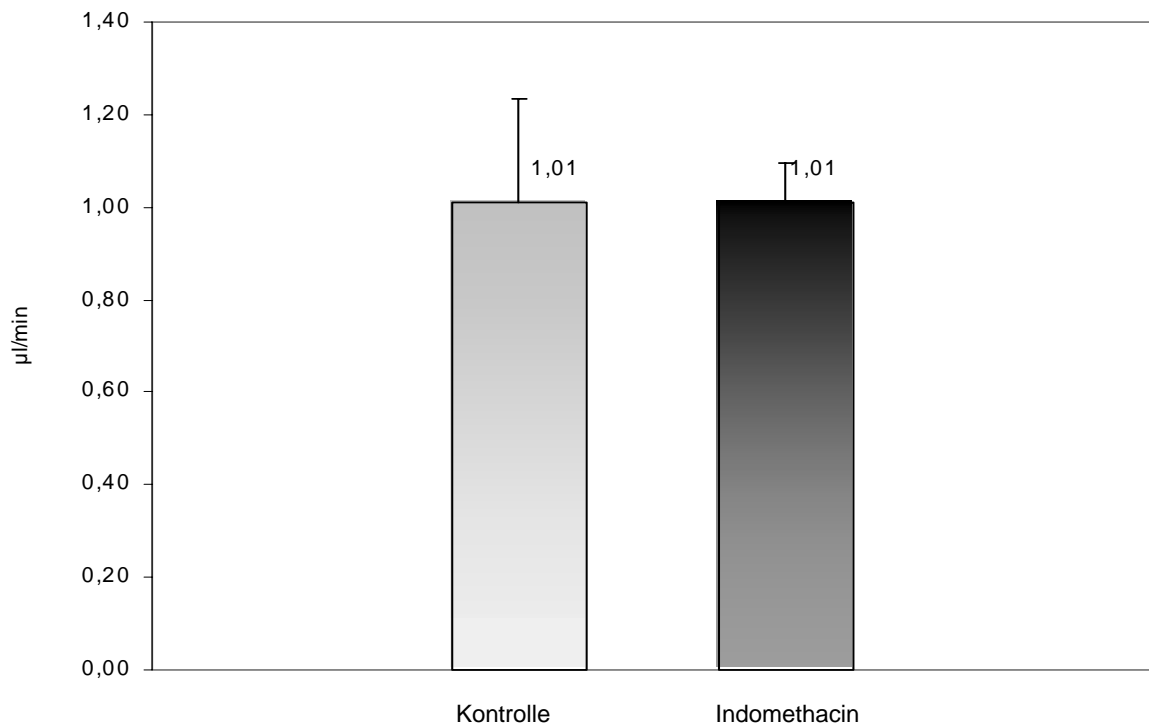


Abb. 27: Volumetrischer Blutfluß (µl/min) in Kontroll- und Indomethacin-Gruppe

$F(t) = \pi \cdot (D^2/4) \cdot v \cdot t / 10^9$  (F: Blutfluß in µl/min, D: Durchmesser der Venole in µm, v: Geschwindigkeit in µm/s, t: Zeit in Sekunden) (Zimmerhackl B `83).

Der volumetrische Blutfluß war im untersuchten gesunden und entzündeten Darm nicht signifikant verschieden. Wir fanden in beiden Gruppen identische Flußwerte. Der durchschnittliche Blutfluß lag in beiden Gruppen bei 1,01µl/min (0,65-1,29 µl/min).

## 4.1.2 Morphologie

### Makroskopie

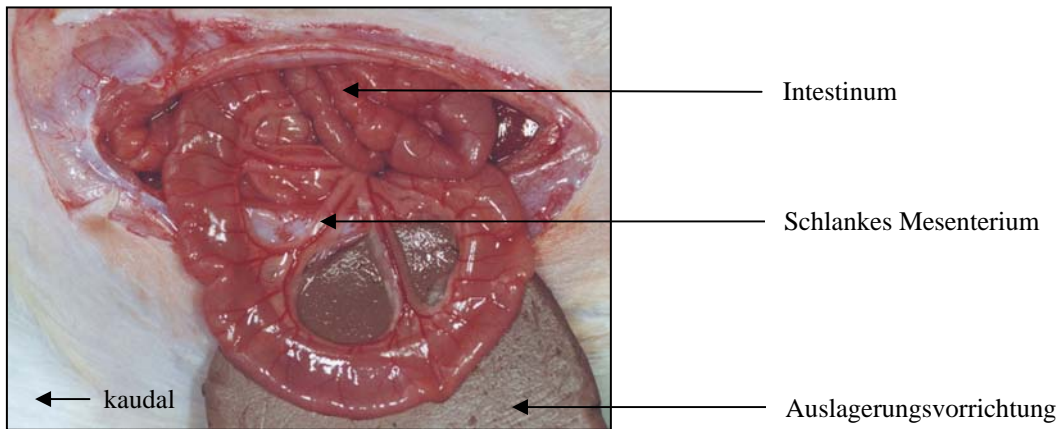


Abb. 28: Makroskopisches Bild einer gesunden mittleren Ileumschlinge.

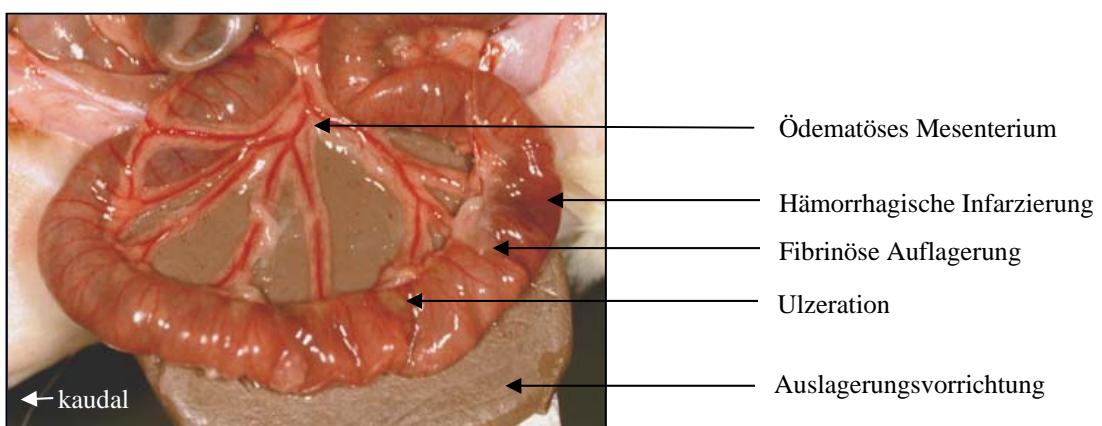


Abb. 29: Makroskopisches Bild einer durch Indomethacin entzündeten mittleren Ileumschlinge.



## **Macroscore**

(modifiziert nach Arndt H`96)

Der gesamte Dünndarm wurde entfernt und längs eröffnet:

Die durch Indomethacin induzierte intestinale Entzündung war charakterisiert durch mukosale Ulzerationen. Diese Läsionen hatten eine segmentale Ausdehnung von mehreren Zentimetern in der Länge entlang der mesenterialen und antimesenterialen Grenze des mittleren Ileums. Auch fanden wir transmurale Entzündung, Adhäsionen, partielle Obstruktionen und gelegentlich Perforationen. Der verdickte Dünndarm war zudem durch Fibrosen und vereinzelte Abszesse gekennzeichnet. Das Mesenterium war ödematös, hämorrhagische Infarzierungen prägten zum Teil ganze Darmabschnitte und fibrinöse Auflagerungen kamen gehäuft vor.

Der Darm der Kontrolltiere wies keine Besonderheiten auf. Er war durch ein schlankes Mesenterium gekennzeichnet und besaß eine gute Durchblutung.

Der durchschnittliche makroskopische Score in der Indomethacin-Gruppe war  $4,43 \pm 0,79$  während alle Tiere der Kontrollgruppe einen Score von 0 hatten.

## Histologie

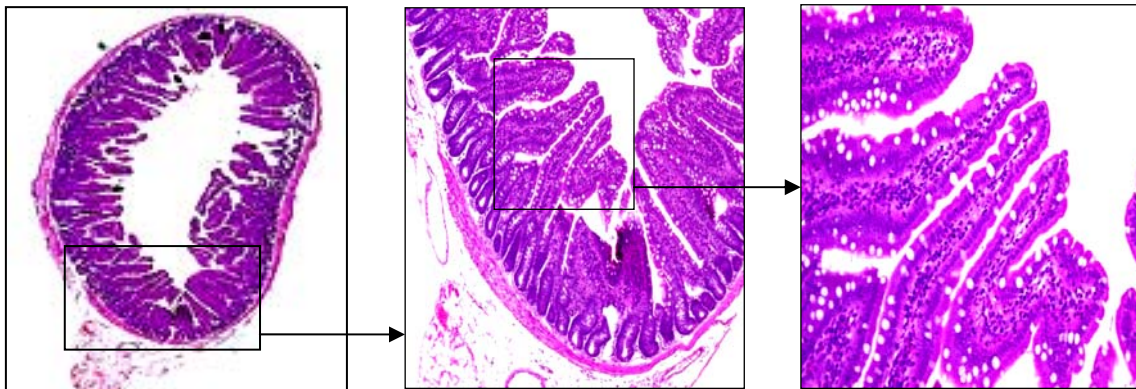


Abb. 30: Histologie (H.E.-Färbung) einer gesunden mittleren Ileumschlinge (Vergrößerung von li. nach re.: 2x, 10x, 20x).

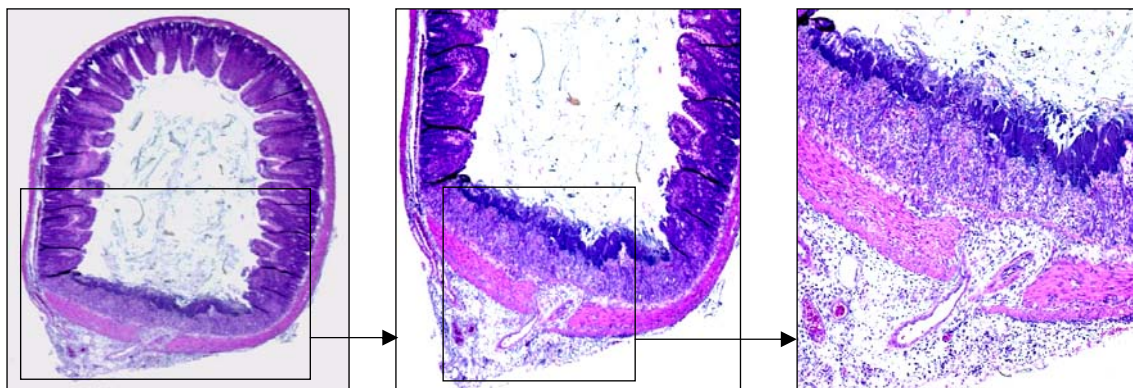


Abb. 31: Histologie (H.E.-Färbung) einer durch Indomethacin entzündeten mittleren Ileumschlinge (Vergrößerung von li. nach re.: 2x, 10x, 20x).

Zur histologischen Beurteilung des zuvor mikroskopierten Dünndarmareals diente ein modifizierter Score nach Vilaseca (Vilaseca J '90). Der maximal mögliche Score war 8 Punkte und berücksichtigte Ulzerationen, Entzündungsgrad und Läsionstiefe.

Die typischen Histologiebilder eines entzündeten Darmes zeigen deutlich die unterbrochene Schleimhautkontinuität, die sich makroskopisch dann als Ulzeration darstellt. Auch kann man auf diesen Bildern eine transmurale Entzündung verifizieren.

Die histologischen Schnitte aus der Indomethacingruppe wurden mit  $6,29 \pm 1,25$  bewertet. In der Kontrollgruppe waren keine histologischen Entzündungszeichen vorhanden.

Die Modifizierung (s. Kap. 3.8.2) bestand in der Nicht-Berücksichtigung von Granulomen (nicht existent in der Indomethacin-Enteritis) und keiner Berücksichtigung von Fibrosen (nicht mehr vorhanden nach zwei Tagen Entzündung).

#### **4.1.3 Ergebniszusammenfassung der Modelletablierung**

Bei diesen Versuchen wurde zunächst am gesunden und am entzündeten Rattendarm an Darmgefäßen Erfahrungen mit mikrozirkulatorischen Messungen im Auflicht mit FITC-markierten Erythrozyten und Rhodamin-markierten Leukozyten gewonnen. Uns gelang die Etablierung einer standardisierten und reproduzierbaren intestinalen Entzündung in der Ratte durch die zweimalige subkutane Gabe von Indomethacin (7,5 mg/kg KG) im Abstand von 24 Stunden. Darüberhinaus stellten wir fest, daß die postkapillären Venolen der Dünndarmserosa auch am entzündeten Darm der Intravitalmikroskopie zugänglich sind. Wir konnten zeigen, daß hier Rückschlüsse auf die Entzündungsprozesse in der Darmwand gezogen werden können und etablierten somit eine neue Lokalisation zur Mikroskopie am entzündeten Rattendarm. Wir legten hier die Standardparameter für intravitalmikroskopische Messungen am Rattendarm fest.

Die festgestellte signifikante Zunahme der Leukozyten, sowohl der Roller als auch der Sticker in der Indomethacingruppe, war wegweisend für das weitere Versuchsvorhaben. Die Ergebnisse der Versuche zeigen, daß es gelungen ist, mittels moderner intravitalmikroskopischer in situ Analytik und begleitenden ex vivo Untersuchungen, Funktionsparameter der zellulären Mikrozirkulation und zellulären Aktivierung bei gesunden und chronisch entzündeten Rattendärmen zu untersuchen.

Wir konnten ein Tiermodell etablieren, dessen intravitalmikroskopischen Untersuchungsmethoden der Mikrozirkulation mit on- und offline Videodokumentation als Methode zur Analyse der Zellwanderung in einem dynamischen experimentellen System angesehen werden kann.

## 4.2 Hauptversuche

Untersucht wurden Gruppe I: anti-Mac-1 (CD11b) , Gruppe II: anti-ICAM 1 (CD54),  
Gruppe III: anti-Mac-1 / anti-ICAM 1 (Kombination)

### 4.2.1 In vivo Mikroskopie

Gefäßparameter – dynamische Untersuchungen:

Erythrozytengeschwindigkeit und Gefäßbreite:

	Anti-Mac-1		Anti-ICAM 1		Anti-Mac-1/-ICAM 1	
	v	Ø	v	Ø	v	Ø
<b>1</b>	2688,42	105,20	1899,50	94,57	1989,08	101,35
<b>2</b>	2511,07	105,20	1813,14	98,78	2038,69	101,18
<b>3</b>	2488,00	111,73	2441,58	98,05	1306,67	102,57
<b>4</b>	2097,02	98,49	2447,12	93,18	1773,98	93,26
<b>5</b>	1396,42	112,68	2259,34	98,96	2219,18	89,30
<b>6</b>	1749,53	103,88	1662,80	78,37	1634,24	91,57
<b>7</b>	2214,36	123,29	3026,09	116,19	2210,18	104,41
$\bar{x}$	<b>2160,69</b>	<b>108,64</b>	<b>2221,37</b>	<b>96,87</b>	<b>1881,72</b>	<b>97,66</b>
$S_{\bar{x}}$	456,03	8,06	470,94	11,14	332,03	6,09

Tab. 11: Erythrozytengeschwindigkeit ( $v = s/t$ ) in  $\mu\text{m}/\text{sec}$  und Gefäßbreite ( $\varnothing$ ) in  $\mu\text{m}$  der Antikörper (AK) –Therapiegruppen.

Die Erythrozytengeschwindigkeiten und die Gefäßdurchmesser der AK – Gruppen lagen in gleichen Größenbereichen und unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

### Rollende Leukozyten in den Darmgefäßen

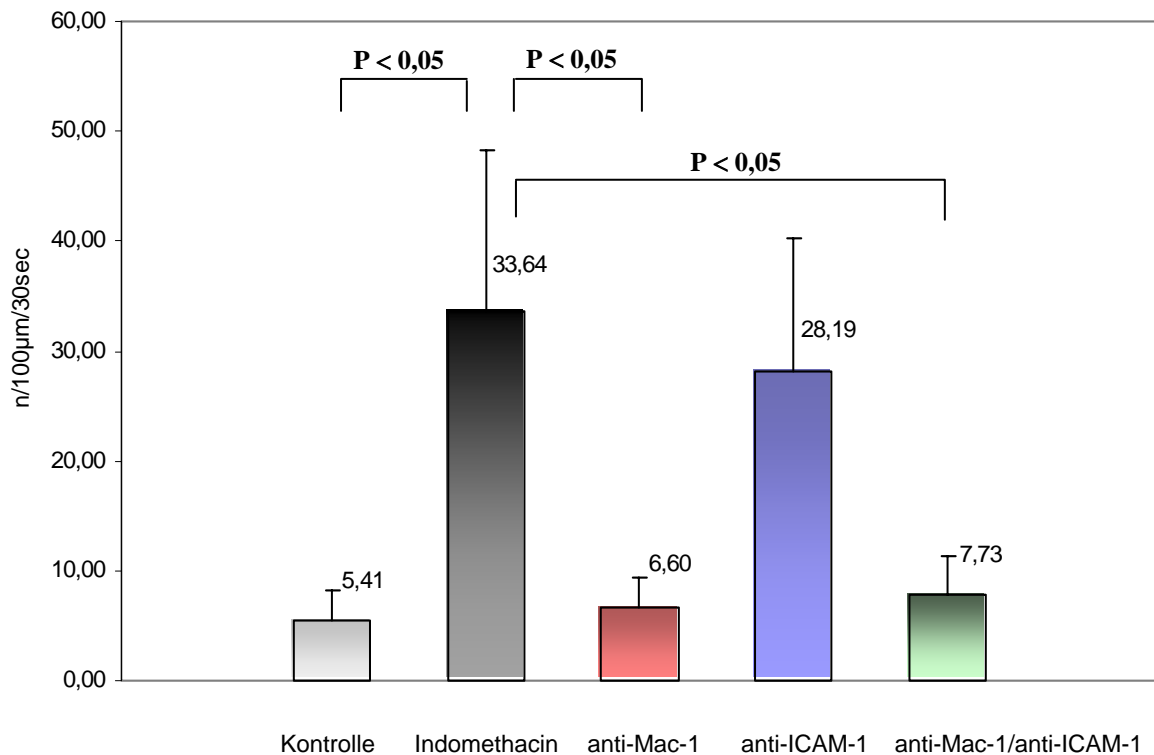


Abb. 32: Wirkung der monoklonalen Antikörper (MAks) gegen Mac-1 und ICAM-1 auf den durch Indomethacin induzierten Anstieg rollender Leukozyten (n/100 µm/30 sec) in subserosalen, postkapillären Darmvenolen.

Die Abbildung 32 zeigt die Effekte der verschiedenen monoklonalen Antikörper auf den durch Indomethacin induzierten Anstieg der temporär adhärenenten Leukozyten in den subserosalen postkapillären Darmvenolen verglichen mit den nicht behandelten Ratten.

Der anti-Mac-1-Antikörper hatte die größte Wirkung. Er reduzierte signifikant ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu der Indomethacingruppe die Anzahl rollender Leukozyten auf  $6,60 \pm 2,71$ . Der anti-ICAM-1-Antikörper reduzierte zur Indomethacingruppe unwesentlich und nicht signifikant die Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten in den Darmgefäßen ( $28,19 \pm 12,09$  vs.  $33,64 \pm 14,56$ ).

Eine deutliche Verminderung der Anzahl rollender Leukozyten, verglichen mit der Indomethacingruppe, erreichten wir durch die Kombination beider Antikörper ( $7,73 \pm 3,60$ ). Diese Verminderung war zur Indomethacingruppe statistisch signifikant.

### Permanent adhärenente Leukozyten in den Darmgefäßen

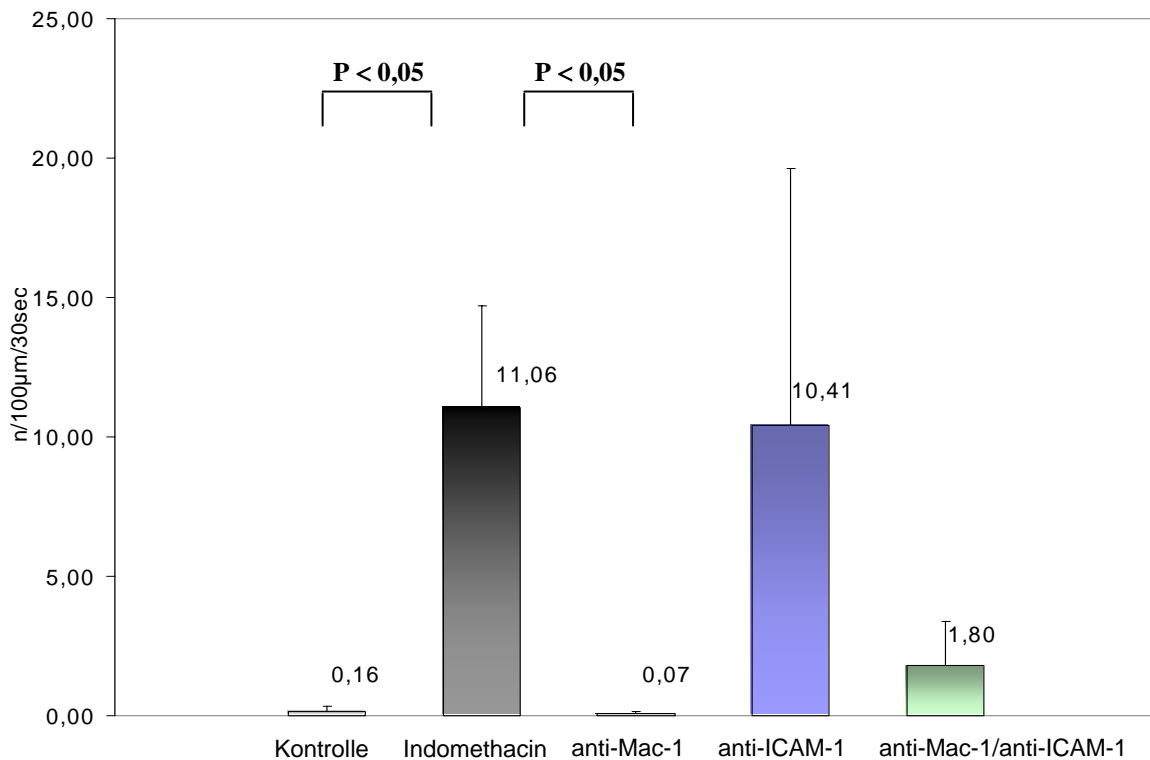


Abb. 33: Wirkung der monoklonalen Antikörper gegen Mac-1 und ICAM 1 auf den durch Indomethacin induzierten Anstieg permanent adhärenente Leukozyten in subserosalen postkapillären Darmvenolen.

Die Abbildung 33 zeigt die Wirkung der monoklonalen Antikörper auf den durch Indomethacin induzierten Anstieg permanent adhärenente Leukozyten verglichen mit den nicht behandelten Ratten.

Die Anzahl der Sticker wurde im Vergleich zur Indomethacingruppe ( $11,06 \pm 3,63$ ) durch den anti-Mac-1-Antikörper signifikant ( $p < 0,05$ ) auf  $0,07 \pm 0,10$  vermindert.

Nicht signifikant dagegen war die leichte Verminderung der permanent adhärenente Leukozyten durch den anti-ICAM 1-Antikörper ( $10,41 \pm 9,20$ ).

Die Kombination beider Antikörper erzielte zwar eine deutlich kleinere Anzahl von Stickern ( $1,80 \pm 1,58$ ), jedoch war die Verminderung im Vergleich zur Indomethacingruppe nicht signifikant.

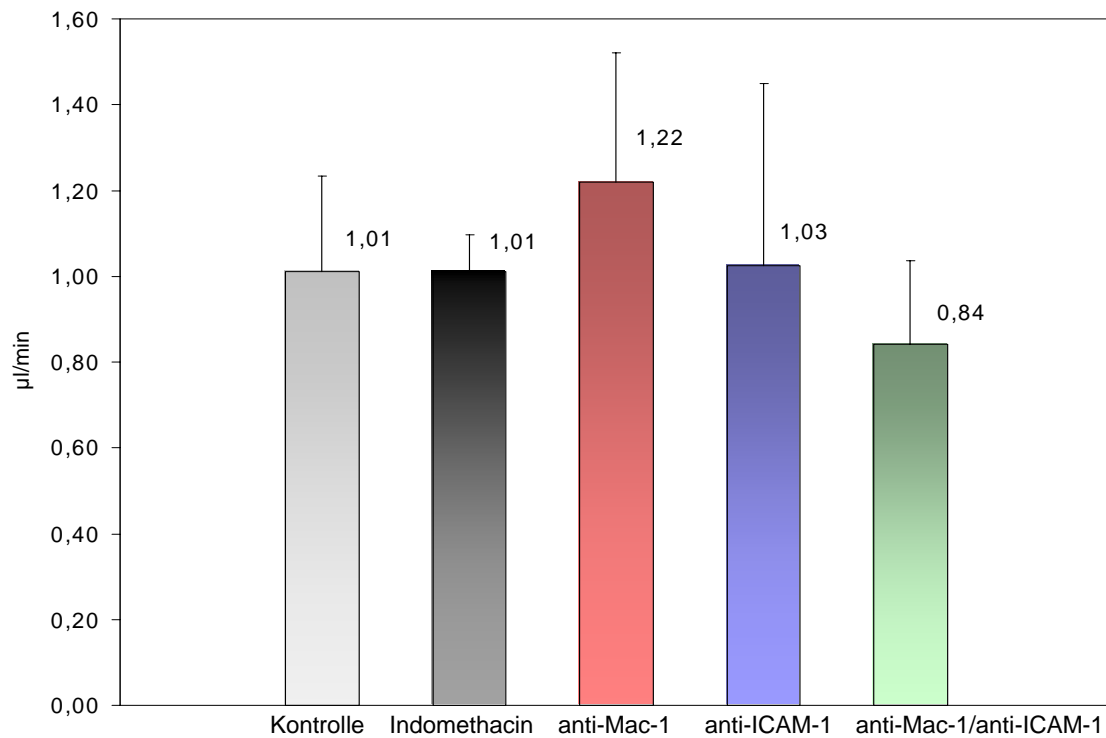
**Blutfluß**

Abb. 34: Blutfluß in µl/min der drei Therapiegruppen einschließlich der Kontrollgruppe als auch der Indomethacingruppe.

Der Blutfluß (µl/min) war zwischen den fünf Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Der durchschnittliche Blutfluß aller Gruppen war 1,02 µl/min (0,84 µl/min – 1,21 µl/min).

## 4.2.2 Morphologie

### Makroscore

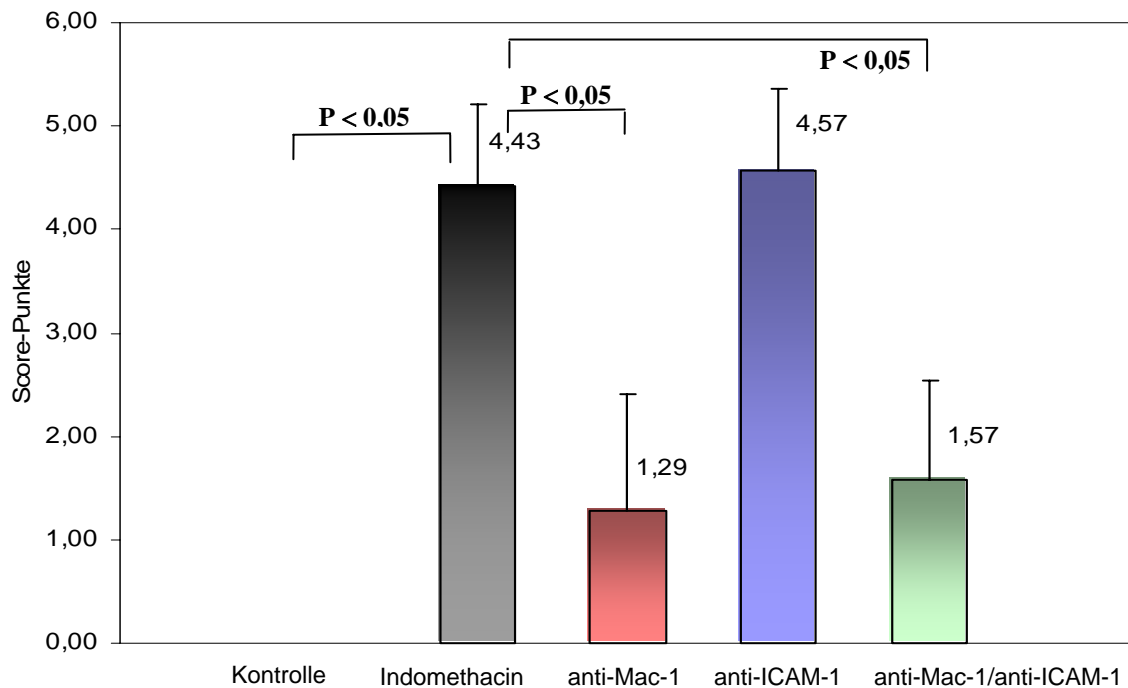


Abb. 35: Wirkung von anti-Mac-1, anti-ICAM-1 und deren Kombination auf die makroskopischen Veränderungen des entzündeten Darmes.

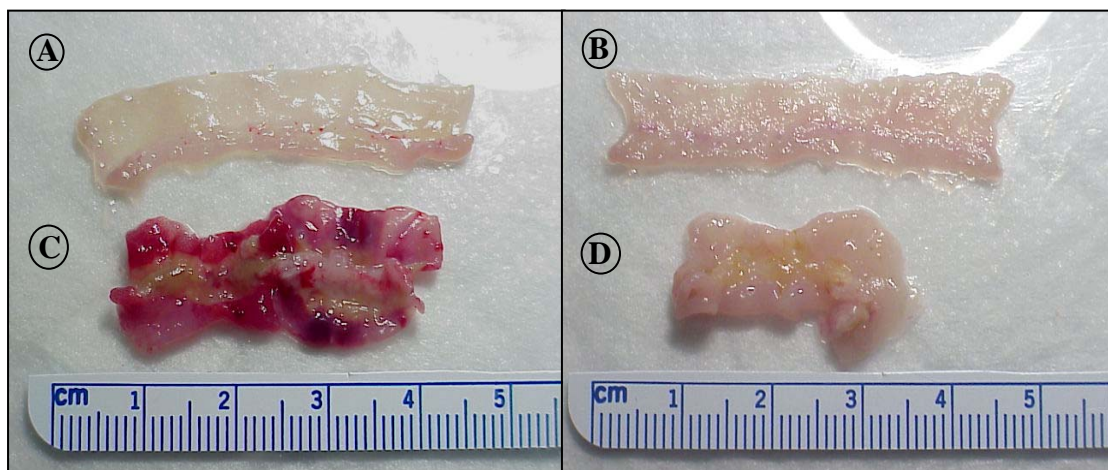


Abb. 36: Makroskopisches Erscheinungsbild einer durch Indomethacin hervorgerufenen intestinalen Entzündung mit und ohne anti-Mac-1 Behandlung vs. Kontrolldarm. Der Darm in der Kontrollgruppe zeigte keine Anzeichen einer Entzündung (A und B). Indomethacin alleine (C) verursachte extensive hämorrhagische Läsionen mit multiplen mukosalen Ulzerationen (Score: 4,43). Indomethacin und anti-Mac-1 Behandlung (D) zeigte eine deutliche Reduzierung der makroskopischen Schädigung mit diskreten Erythemen und vereinzelt superfiziellen Ulzerationen (Score:  $1,29 \pm 1,11$ ).



Die durch Indomethacin induzierte intestinale Entzündung wurde in ihrer makroskopischen Erscheinung durch den Mac-1-Antikörper (Score:  $1,29 \pm 1,11$ ) und durch die Kombination beider Antikörper (anti-Mac-1 und anti-ICAM-1; Score:  $1,57 \pm 0,98$ ) signifikant im Vergleich zur Indomethacin-Entzündungsgruppe (Score:  $4,43 \pm 0,79$ ) abgeschwächt. Der Score von  $4,57 \pm 0,79$  in der anti-ICAM-1-Gruppe ist im Vergleich zur Indomethacingruppe (Score  $4,43 \pm 0,79$ ) nicht signifikant unterschiedlich.

### Histoscore

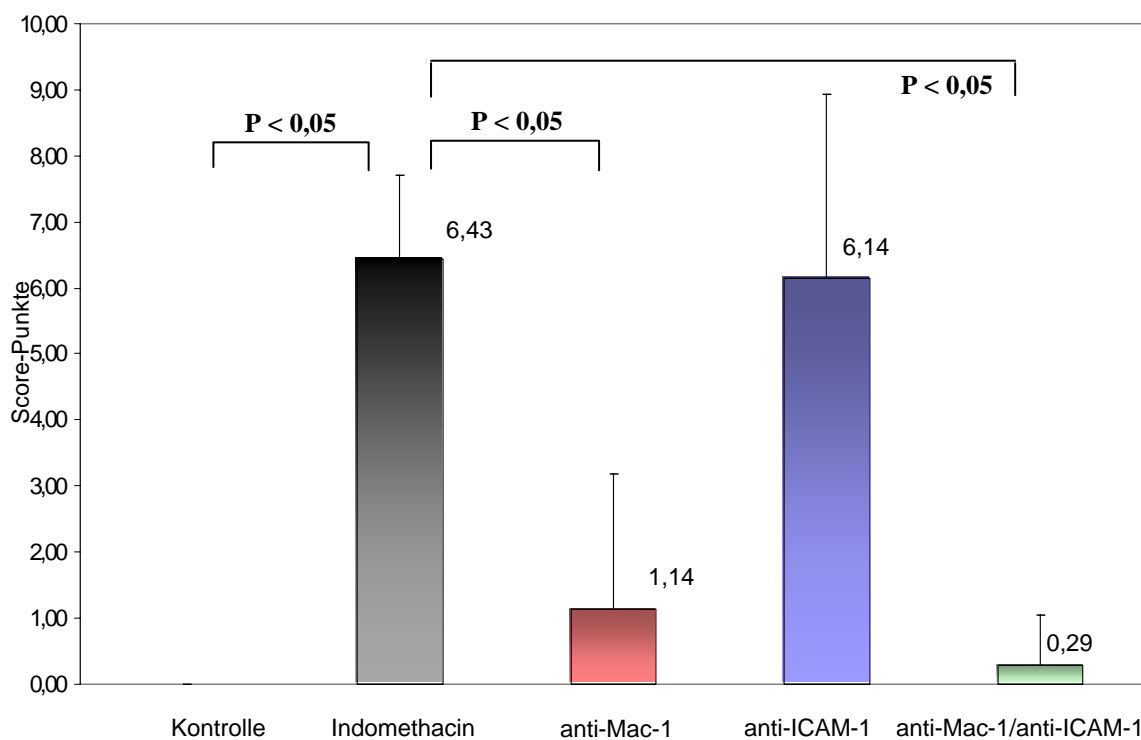


Abb. 37.: Wirkung von anti-Mac-1, anti-ICAM-1 und deren Kombination auf die mikroskopischen Veränderungen des entzündeten Darmes (modifizierter Score nach Vilaseca J`90).

Die Indomethacin-Gruppe als Referenz für eine induzierte Entzündung erhielt  $6,43 \pm 1,27$  Punkte. Die anti-Mac-1-Gruppe erzielte einen Score von  $1,41 \pm 2,04$  und die Kombinationsgruppe aus beiden Antikörpern erhielt einen Score von  $0,29 \pm 0,76$ . Sowohl die anti-Mac-1 Behandlung als auch die Kombinationsbehandlung mit anti-Mac-1 und anti-ICAM-1 zeigten eine signifikante Abschwächung des histologischen Scores im Vergleich zur Indomethacin-Entzündungsgruppe. Die histologischen Bilder als morphologisches Korrelat zu diesen Daten veranschaulichen die Unterschiede in den einzelnen Gruppen sehr deutlich.

## Darmhistologie in Abhängigkeit der Antikörpergaben

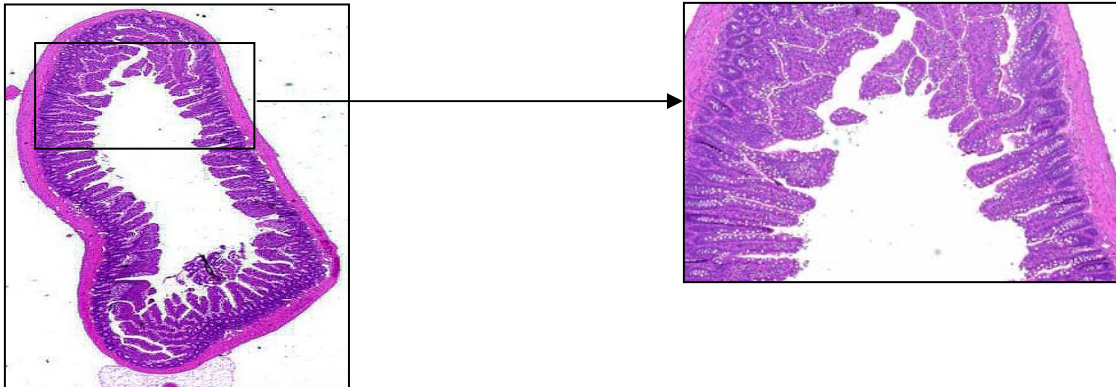


Abb. 38: Histologie (H.E.-Färbung) einer durch Indomethacin entzündeten mittleren Ileumschlinge. Das zugehörige Versuchstier ist mit anti-Mac-1 behandelt. Vergrößerung von li. nach re.: 2x und 10x. Es zeigt sich hier ein nahezu entzündungsfreier Darmquerschnitt.

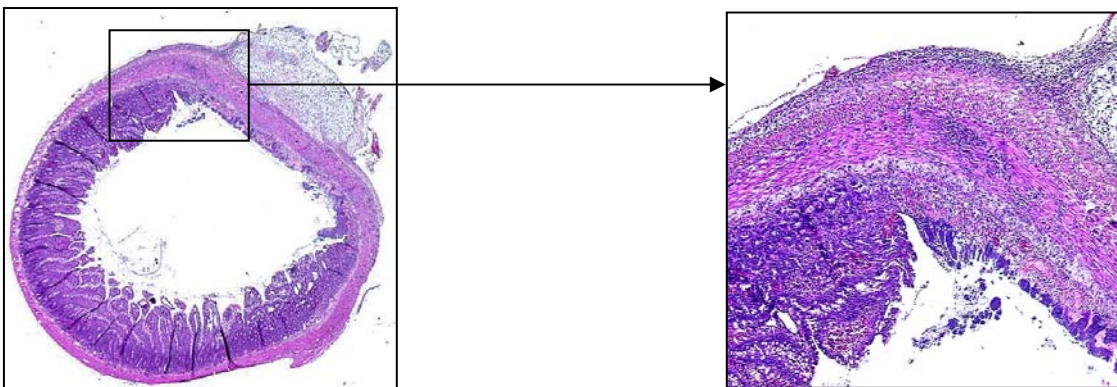


Abb. 39: Histologie (H.E.-Färbung) einer durch Indomethacin entzündeten mittleren Ileumschlinge. Das zugehörige Versuchstier ist mit anti-ICAM-1 behandelt. Hier findet sich in allen Wandschichten eine dichtes Infiltrat von Entzündungszellen. Vergrößerung von li. nach re.: 2x und 10x.

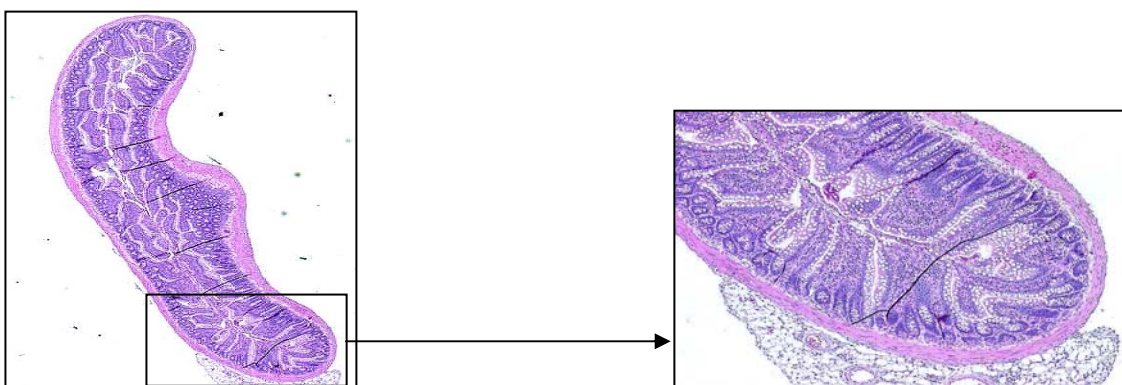


Abb. 40: Histologie einer durch Indomethacin entzündeten mittleren Ileumschlinge. Das Tier wurde mit der Kombination aus anti-Mac-1 und anti-ICAM-1 behandelt. Vergrößerung von li. nach re.: 2x und 10x. Hier beobachtet man einen deutlichen Rückgang des zellulären Entzündungsinfiltrates.

Die Bildkorrelate zu den histologischen Scores zeigen die für jede Gruppe typischen Morphologien und ggf. Behandlungseffekte.

Die Tiere in der anti-Mac-1-Gruppe zeigten keine signifikanten histologischen Veränderungen zu den Tieren in der Kontrollgruppe. Gelegentlich fanden sich milde Ausprägungen einer Entzündung oder Ulzera, die kleiner als 3 mm waren.

Im Gegensatz hierzu zeigen die Histologien der anti-ICAM-1-Gruppe schwere Entzündungsmerkmale. Diese sind große Ulzera > 3 mm, mäßige bis schwere Entzündungsausprägung und Läsionen, die teilweise bis in die Serosa reichen.

Die Histologie in der Kombinationsgruppe beider Antikörper war durch keine, bzw. mäßige Entzündungszeichen gekennzeichnet.

### 4.3 Zusammenfassung

Die in vivo-mikroskopischen Untersuchungsmethoden und die anschließende makroskopische sowie histologische Aufarbeitung der Proben zeigten, daß im Gegensatz zur alleinigen Gabe von anti-ICAM-1, die anti-Mac-1-Gabe die etablierte Entzündung signifikant abschwächen konnte. Durch die Kombinationstherapie mit beiden Aks wurde ebenfalls die Entzündung signifikant vermindert. Ausgenommen hiervon war jedoch die Anzahl der permanent adhärenenten Leukozyten.

Versuchsgruppe	Roller	Sticker	Makroscore	Histoscore
Kontrolle	n	n	n	n
Indomethacin	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Anti-Mac-1	↑*	n*	↑*	↑*
Anti-ICAM-1	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
Anti-Mac-1/ Anti-ICAM-1	↑*	↑	↑*	n*

Tab. 12: Übersicht über die ermittelten Parameter. Die Parameter Erythrozytengeschwindigkeit, Fluß, und Gefäßbreite waren in allen Versuchsgruppen annähernd gleich und sind nicht in die Tabelle aufgenommen.

Die Pfeile (↑↑, ↓↓: stark erhöht bzw. erniedrigt und ↑, ↓: mäßig erhöht bzw. erniedrigt) beziehen sich auf die Werte der Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wird hier zwischen den AK-Gruppen (AK = Antikörper) und der Indomethacin-Gruppe dargestellt (\* P < 0,05).

## 5. Diskussion

### 5.1 In vivo Mikroskopie und Mikrozirkulation

Die Rolle der intestinalen Mikrozirkulation sowie die Interaktion verschiedenster Entzündungszellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kann bislang nicht in klinischen Studien am Patienten in vivo untersucht werden. Es gibt jedoch zahlreiche indirekte Hinweise auf endotheliale Läsionen, kapilläre Perfusionstörungen und die Interaktion von entzündungsspezifischen Zellen, die aus dem Blutstrom in das umliegende Gewebe wandern, um dort eine akute oder chronische Entzündung hervorzurufen. So zeigten elektronenmikroskopische Untersuchungen bei diesen Erkrankungen Gefäßveränderungen, die auch bei generellen Gefäßentzündungen zu finden sind. Darüberhinaus fand man thrombotische Gefäßverschlüsse in der Subserosa und der Submukosa (Wakefield AJ '89). Auch konnte durch lasergestützte Doppler Flowzytometrie eine signifikante Reduktion der mukosalen Rektumperfusion bei Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen werden (Guslandi M '95). Zudem zeigen spektroskopische Untersuchungen eine reduzierte Perfusion in Arealen frischer Ulzera in experimentellen Colitis-Modellen (Leung FW '93). Die Anzeichen vermehrter Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, welche sowohl in histologischen als auch in intravitalmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden konnten (Wakefield AJ '89 / Leung FW '93), korrelieren mit der vermehrten Expression von Zelladhäsionsmolekülen in CED-Patienten (Panés J '98). Es sind diese Veränderungen, denen bei der hier angewandten Untersuchungsmethode eine große Bedeutung zugeschrieben wird.

Die in vivo Mikroskopie ist eine anerkannte und valide Methode zur Beurteilung der Mikrozirkulation. Die Videomikroskopie erlaubt bei Anwendung von fluoreszierenden Markern, dynamische Vorgänge in hoher Auflösung bildlich dargestellt zu registrieren und quantitativ zu analysieren (Harris AG '97, Messmer K '84). Die Mikrozirkulation ist netzwerkartig in die Gewebe eingebettet und besitzt die Aufgabe, das chemische und physikalische Gleichgewicht als Voraussetzung für das Überleben von individuellen Zellen und Zellverbänden aufrecht zu erhalten. Im Sinne eines Kontrollsystems, welches den Gesetzen der Flüssigkeitsmechanik und der Diffusion unterliegt, garantiert die

Mikrozirkulation die einzige direkte Verbindung zwischen jeder Einzelzelle und dem Gesamtorganismus. Durch Anwendung moderner Analysemethoden ist es möglich, diskrete Phänomene in den einzelnen Segmenten des mikrovaskulären Netzwerks zu beschreiben und physiologische und pathogenetische Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene aufzuklären (Messmer K '98).

Die Mikrozirkulation der inneren Organe kann in der Regel in Akut- und in chronischen Modellen untersucht werden. Dabei müssen die Effekte der Anästhesie sowie des chirurgischen Traumas zur Exposition des Gewebes und Manipulationen zu dessen Positionierung unter dem Mikroskop in Kauf genommen werden. Um valide Ergebnisse erhalten zu können, ist eine Standardisierung der Versuchstechnik erforderlich. Dies beginnt mit der Haltung und Ernährung der Tiere, um möglichst vergleichbare Ausgangsbedingungen garantieren zu können. Auch Anästhesie und chirurgischer Eingriff müssen standardisiert und kontrolliert werden. Während der Untersuchung muß die Homöostase des Versuchstieres durch Kontrolle der Kreislaufparameter, der Blutgase und der Körper- bzw. der Organtemperatur überwachbar sein. Bei adäquater Technik und unter Einhaltung strikter Kriterien für die Qualität der Präparation kann die Mikrozirkulation nahezu aller Gewebe quantitativ analysiert werden. Schwierigkeiten treten vor allem dann auf, wenn z.B. wie beim Darm das untersuchte Organ großen Eigen- oder Passivbewegungen durch Atemexkursion und Zwerchfellaktion unterworfen ist. Aus diesen Gründen ist die standardisierte Versuchsdurchführung die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Untersuchung. Eine richtige Interpretation der Ergebnisse kann nur erfolgen, wenn die Mikrozirkulation des Darmes nicht durch größere Manipulationen während des Versuches, bzw. der Auslagerung beeinträchtigt wird. Da mit der Epifluoreszenzmethode die oberflächlichen Areale beurteilt werden und diese mechanischen Schäden zuerst ausgesetzt sind, müssen Einflüsse durch Manipulationen am Darm unbedingt vermieden werden, da jede Beeinträchtigung auf dem Bild zu sehen ist und die Ergebnisse verfälscht. Mit der Epifluoreszenzmethode, die hier angewendet wurde, wird -im Gegensatz zur Transillumination- die oberflächliche intestinale Mikrozirkulation beurteilt. Mit der Epifluoreszenz kann die gesamte jejunale Mikrozirkulation beobachtet werden, währenddessen sich die Transillumination auf einen dünnen Bereich beschränkt. Da es aber nur geringe Unterschiede in der Morphologie der oberflächlichen und tiefen

Mikrozirkulation gibt, geht man davon aus, daß die beobachtete Mikrozirkulation repräsentativ für das gesamte Organ ist (Menger MD '91).

Nachdem die Bilder auf Videoband festgehalten wurden, erfolgte die offline Auswertung der Filme. In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Auswertung und Quantifizierung der Bilder beschrieben, die durch unterschiedlichen Arbeitsaufwand, aber auch durch unterschiedliche Objektivität gekennzeichnet sind. Die Darmauslagerung sowie die Durchführung der Intravitalmikroskopie wurden von einer Person vorgenommen, so daß intraindividuelle Störfaktoren minimiert werden konnten. Die Auswertung der offline Ergebnisse wurde durch einen zweiten Untersucher wiederholt, um einen größeren Grad an Objektivität zu erzielen. Hierbei zeigte sich, daß es keine Schwankungsbreiten bei den Ergebnissen gab.

### **5.1.2 Mikroskopie - Lokalisation**

Während die Untersuchung der Mikrozirkulation mittels Intravitalmikroskopie inzwischen ein an Haut, Leber und Pankreasgewebe etabliertes Verfahren ist (Intaglietta M '95), bestehen mit dieser Methode am Darmgewebe noch mehrere Schwierigkeiten. So können z.B. postentzündliche morphologische Veränderungen oder Präparationstraumen die intravitalmikroskopische Messung an der Mukosa im Tiermodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Yamada T '93, Elson Co '95) erheblich erschweren. Aus diesem Grund wurden in vielen bislang durchgeführten Studien die relativ gut zugänglichen Mesenterialgefäße für Untersuchungen gewählt. Man nimmt an, daß sie mit den Gefäßen des Darmes vergleichbar sind. Wir haben hingegen festgestellt, daß die postkapillären Venolen der Submukosa auch am entzündeten Darm der Intravitalmikroskopie gut zugänglich sind. Sie stellen Sammelgefäße der entzündeten Darmsegmente dar und erlauben Rückschlüsse auf die Entzündungsprozesse in der Darmwand. Pro Tier wurden 10 postkapilläre Venolen ausgewertet. Der Durchmesser jeder einzelnen Venole wurde an fünf Stellen gemessen und daraus der Mittelwert gebildet. Da die Gefäßdurchmesser antimesenterial kleiner sind als am Übergang zum Mesenterium, ist es wichtig, die Messungen immer an der gleichen Stelle durchzuführen. Der definierte Meßpunkt lag in dieser Studie an der mesenterialen Grenze des Darmes. Ursachen für unterschiedliche Durchmesser ergeben sich aus verschiedenen Meßpunkten innerhalb

der Gefäße, aus möglicherweise abweichenden Kalibrierungen und subjektiven Meßfehlern. Signifikante Unterschiede der Durchmesser innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen konnten nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß an der Lokalisation des Überganges zum Mesenterium eine intravitalmikroskopische Analyse der Mikrozirkulation an normalem und entzündetem Gewebe reproduzierbar möglich ist. Den entscheidenden Vorteil dieser Methode im Vergleich zur Messung am Mesenterium (Schmidt H '96, Kurose I '96, Gonzales AP '94) oder der Mukosa sehen wir darin, daß eine Mesenteriumpräparation, bzw. Darmöffnung mit nicht kalkulierbaren Auswirkungen auf die Mikrozirkulation unterbleiben kann. Die untersuchten Gefäße sind einfach aufzufinden und einfach zu identifizieren, da sie direkt auf der peritonealen Oberfläche des Darmes liegen. Hier wird die Intravitalmikroskopie nicht durch überliegende Gewebeschichten erschwert, da die Gefäße bereits die zirkuläre als auch die longitudinale Muskelschicht des Darmes durchbrochen haben und eine kurze Strecke in der Subserosa verlaufen.

Die Suche nach einer vorteilhaften, gut zugänglichen Lokalisation für unsere intravitalmikroskopischen Untersuchungen war die Kombination aus theoretischen und anatomischen Überlegungen und der Berücksichtigung von empirischen Daten, die an verschiedenen Stellen des Darmes erhoben wurden. Ziel war es, einen Kompromiß zwischen minimaler Distanz zur Entzündung und bester Bildqualität zu finden.

### **5.1.3 Intravitalmikroskopische Parameter**

#### **Erythrozytengeschwindigkeit**

In diesen Untersuchungen stellten wir nur geringe Abweichungen der Erythrozytengeschwindigkeit in den Versuchsgruppen fest. Diese blieben jedoch ohne jede Konsequenz. Eine mögliche Erklärung für Schwankungen bei der Erythrozytengeschwindigkeitsmessung kann mit der Kontinuitätsgleichung ( $d_1/d_2 = v_1/v_2$ ) gegeben werden. Hierbei erhöht sich die Geschwindigkeit bei kleineren Querschnitten. Dies trifft jedoch in vivo nur auf geringe Durchmesserverkleinerungen zu. Bei einer stärkeren Konstriktion, wo zusätzlich noch adhärente Leukozyten gefunden werden, kann die Perfusion voll-

ständig sistieren, obwohl das Gefäß nicht komplett verschlossen ist. In diesen nicht immer vermeidbaren Fällen bedurfte es einiger Geduld bis die mögliche Konstriktion vorüber war. Die Ermittlung der Erythrozytengeschwindigkeit ist selbst mit Computerunterstützung und entsprechender Software noch sehr zeitaufwendig und läßt sich nur dadurch rechtfertigen, daß die Geschwindigkeit für die Berechnung des volumetrischen Blutflusses genutzt wurde und hier Unterschiede vor allem in den entzündeten Tieren erwartet wurden. Auch bleibt bei der computergestützten Auswertung der Erythrozytengeschwindigkeit zu bedenken, daß primär gerade Gefäßabschnitte zur Messung herangezogen werden mußten, da ein digitales Nachzeichnen einzelner geschlängelter Strombahnen nicht möglich war.

### **Volumetrischer Blutfluß**

Für die Berechnung des Blutflusses nach der Gleichung:  $F(t) = \pi \cdot (D^2/4) \cdot v \cdot t / 10^9$  (F: Blutfluß in  $\mu\text{l}/\text{min}$ , D: Durchmesser der Venole in  $\mu\text{m}$ , v: Geschwindigkeit in  $\mu\text{m}/\text{s}$ , t: Zeit in Sekunden) (Zimmerhackl B '83) wurden als Geschwindigkeit die Werte der freifließenden Erythrozyten in den postkapillären Venolen verwendet. Da der Blutfluß in den Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich war, kann man davon ausgehen, daß die Entzündungsausprägung in der Indomethacingruppe und auch die Behandlung in den Antikörpergruppen keinen Einfluß auf den Blutfluß haben.

### **Rollende Leukozyten**

Der Begriff „Roller“ hat sich etabliert und wird auch in der Literatur häufig verwendet. Richtiger wäre es von temporär adhärenenten Leukozyten zu sprechen (temporär adhärenente Leukozyten haften zwischen 0,2 und 20 s am Endothel) (Anthuber M '94, Bauer M '93), worauf aber in der hier vorliegenden Studie wegen der weiten Verbreitung des Begriffs „Roller“ häufig verzichtet wurde. Wir haben die Anzahl der rollenden Leukozyten pro 100  $\mu\text{m}$  Gefäßlänge über einen Zeitraum von jeweils 30 Sekunden pro Gefäß ausgezählt. Hierbei ist zu beachten, daß mehrere Zellverbände (Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen) in den schichtweisen angelegten mikrovaskulären Gefäßnetzen der Darmwand interagieren. Bei nicht optimaler Fokussierung kann es zu fehler-



haften Einstellungen kommen, indem die eigentliche Gefäßebene verlassen wird. Wir haben dieses durch den Einsatz eines einzigen Untersuchers, der die Mikroskopie durchführte, weitestgehend vermeiden können.

### **Permanent adhärente Leukozyten in den Venolen**

Die Anzahl der permanent adhärennten Leukozyten in den Venolen wurden pro 100 µm Gefäßlänge über einen Zeitraum von jeweils 30 Sekunden pro Gefäß ausgezählt. Hierbei mußten definitionsgemäß die Sticker länger als 20 Sekunden am Gefäßendothel anhaften. Prinzipiell fanden sich bei dieser Auswertung die gleichen Störfaktoren wie bei der Roller-Zählung (s.o.). Komplikationen im Sinne thrombembolischer Verschlüsse der Strombahn und damit eine unphysiologisch höhere Akkumulation von fest haftenden Leukozyten traten bei den Untersuchungen nicht auf. Lagerungsbedingte vereinzelte Blutflußverminderungen ließen sich, vor allem bedingt durch den oben beschriebenen Versuchsaufbau, in den Randgebieten des untersuchten Darmabschnittes nicht immer vermeiden. Diese Gefäße sind von den intravitalmikroskopischen Untersuchungen ausgeschlossen worden.

## **5.2 Rolle der Leukozyten in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Hauptaugenmerk wurde bei dieser Studie auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Ausprägung der Entzündung gelegt. Wir gehen davon aus, daß dieser Mechanismus einen entscheidenden Pathogenesefaktor in der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen darstellt.

Die Adhäsion und Emigration von Leukozyten stellt einen wichtigen Bestandteil von Abwehrprozessen, der Phagozytose und von Entzündungsreaktionen im Körper dar. In bestimmten Situationen können Leukozyten, bzw. deren Wirkungen auch gegen den Organismus gerichtet sein und zu Gewebsschädigung und Organdysfunktion beitragen. Es sind zahlreiche pathophysiologische Zustände bekannt, bei denen Gewebeschädigungen durch Leukozyten eine Rolle spielen, z.B. entzündliche Darmerkrankungen, Endotoxinämie, lokale Ischämie, Schock, akute und chronische Abstoßung, Glo-

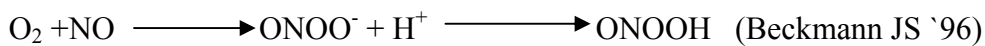
merulonephritis, Zystische Fibrose und Rheumatoide Arthritis. Der Mechanismus der Gewebsschädigung basiert auf einem komplexen Netzwerk zwischen Zellen, Mediatoren und toxischen Substanzen (Lehr HA `94).

Extravasatierte polymorphkernige Neutrophile (PMNs) und auch andere phagozytotische Leukozyten migrieren durch das Interstitium als Antwort auf bestimmte chemotaktische Stimuli, wie z. B. Bakterienprodukte und proinflammatorische Mediatoren. Diese Stimuli werden sowohl von entzündetem und/oder geschädigtem Gewebe als auch durch Bakterienprodukte, die vom Lumen in das Gewebe gelangt sind, freigesetzt. Es ist wahrscheinlich diese gerichtete Migration durch das Interstitium, die den PMNs letztendlich erlaubt, aus dem Gewebe in das Kryptenlumen zu migrieren, um Kryptenabszesse zu formen. Bislang existiert relativ wenig Information, wie PMNs sich durch das Interstitium bewegen. Die interstitielle Matrix besteht primär aus einem fibrinösen Netzwerk aus Kollagen, Elastin und Glykosaminoglykanen. Abhängig vom Hydrationsgrad wird geschätzt, daß diese Matrix Poren in einer Größenordnung von 250 bis 1000 Å enthält. Diese Schätzungen lassen vermuten, daß PMNs mit ihrer Fähigkeit zur Deformation und Elongation den Widerstand gegen eine Bewegung durch die interstitielle Matrix schwächen. Bienvenu K et al. (1994) haben mittels intravital-mikroskopischen Untersuchungen am Mesenterium der Ratte gezeigt, daß das chemotaktische bakterielle Peptid N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), Leukotrien B<sub>4</sub> (LTb<sub>4</sub>) oder der PAF (platelet activating factor) die Rate von interstitieller Neutrophilenmigration von 3,0 µm/min im nicht stimulierten Zustand auf 6-8 µm/min erhöhten. Die Mechanismen, durch die die PMNs ihren Weg durch das interstitielle Maschenwerk überwinden, verbleiben jedoch noch zu klären.

Die Bildung der Kryptenabszesse repräsentiert den terminalen Schritt der Leukozytenmigration aus der Zirkulation. Die inflammatorischen Zellen müssen nicht nur aus der Zirkulation extravasatieren und sich durch die interstitielle Matrix bewegen, sondern auch mit der Basalmembran und der basolateralen Oberfläche der Kryptenepithelien interagieren, um im Lumen präsent zu sein. Die Kraft für die gerichtete Migration aus dem Gewebe in das Lumen wird durch den Bakteriengradient im distalen Darm gestützt. Die transendotheliale als auch die transepitheliale Migration der Leukozyten könnte für Ödeme und verstärkte mukosale Permeabilität, die in Tiermodellen (Indomethacin) und Patienten mit aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung beobach-

tet wird, verantwortlich sein. Auch in unserem Indomethacin-Modell konnte eine verstärkte Ödembildung im Mesenterium als auch im Darm selber beobachtet werden.

Interstitielle phagozytäre Leukozyten interagieren mit verschiedenen proinflammatorischen Stoffen, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , LTB<sub>4</sub>, PAF, Immunkomplexen, Komplementfaktoren oder Bakterienprodukten (FMLP, Lipopolysaccharide, etc.), um ihre membranständige „nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase“ zu aktivieren (Grisham MB '94). Die Aktivierung dieses Flavoproteins resultiert in der Produktion und Freisetzung von großen Mengen reaktiver Sauerstoff-Metaboliten, wie z.B. Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Hydrogenoxid-Peroxidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) als auch von den Myeloperoxidase (MPO)-abstammenden Oxidantien Hypochlorazid (HOCL) und N-Chloraminen (RNHCl). Reaktive Oxidantien könnten auch durch eine Interaktion von Phagozytengeneriertem-O<sub>2</sub> und dem freien radikalischen Nitritoxid zu Peroxynitrit (ONNO-) und Peroxynitritazid (ONNOOH) in Entzündungsbezirken entstehen.



Verschiedene Studien haben gezeigt, daß aktive Episoden einer Kolitis bei Menschen als auch in CED-Tiermodellen mit einer verstärkten Nitritoxid-Produktion einhergehen (Grisham MB '99). Tatsächlich könnten Nitritoxid oder Nitritoxid-abstammende Metabolite vieles der Pathophysiologie in einigen CED-Tiermodellen vermitteln (Grisham MB '94, Grisham MB '99).

Viele dieser reaktiven Sauerstoff- und Nitrogen- Spezies sind kompetent genug, um umgebendes Gewebe durch ihre potente Oxidations-Aktivität zu schädigen. Jedoch bleibt zu berücksichtigen, daß die meisten Gewebe und extrazellulären Flüssigkeiten viele Antioxidantien, wie z.B. Ascorbat,  $\alpha$ -Tocopherol, reduziertes Gluthation, und protein-gebundene Thiole enthalten. Diese könnten effektiv eine mögliche Gewebeschädigung, verursacht durch eine normale Entzündungsantwort, reduzieren. Doch trotz dieser protektiven Mechanismen ist es denkbar, daß die protektiven Agentien durch eine anhaltende Entzündung mehr und mehr konsumiert werden. Dadurch wäre es dem reaktiven Sauerstoff und den Nitrogenspezies möglich, das Epithel und das mukosale Interstitium zu schädigen. Dieses könnte auf direktem Wege passieren oder aber durch eine Veränderung des empfindlichen Gleichgewichts zwischen Proteinase und Anti-

Proteinasen, wie es normalerweise im intestinalen Interstitium zu finden ist. So inaktiviert z.B. HOCl Proteinase-Inhibitoren ( $\alpha$ -1-Proteinase-Inhibitor,  $\alpha$ -2-Makroglobulin) und erlaubt so indirekt eine unkontrollierte Proteolyse durch Elastase, Kollagenase und/oder Gelatinase (Weiss SJ '89). Zusätzlich bekräftigen „in vitro“-Studien, daß das extrazelluläre MPO-System (HOCL) latente Kollagenasen und Gelatinasen, die durch Neutrophile sezerniert werden, aktiviert (Weiss SJ '89). Diese Daten lassen vermuten, daß die oxidative Inaktivierung von wichtigen Proteinase-Inhibitoren und die gleichzeitige oxidativ vermittelte Aktivierung von latenten Proteasen zu einem guten Umfeld für Elastase, Kollagenase und Gelatinase vermittelte Degradation der mukosalen interstitiellen Matrix sowie der Epithelzellen führt. Die Ergebnisse von Varani et al. bestätigen, daß die zytotoxische Wirkung der polymorphkernigen Neutrophilen auf die Verknüpfung der Wirkung von Sauerstoffradikalen und Proteasen zurückzuführen ist (Varani J '89). Dabei konnte gezeigt werden, daß sich die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -vermittelte Zellzerstörung in den ersten 4 h manifestiert. Eine nachträgliche Zugabe von Katalase (z.B. nach einer Stunde) schützte nicht mehr vor den zytotoxischen Wirkungen. Zum Zelltod durch Proteasen kam es erst nach verlängerter Inkubation (frühestens nach 8 h). Die Zugabe eines Proteaseninhibitors lieferte einen Schutz auch dann, wenn der Inhibitor erst 4 h nach der Protease verabreicht wurde (Varani J '89). Neben den schädlichen Effekten der reaktiven Sauerstoff- und Nitrogenmetaboliten können nicht-toxische Konzentrationen dieser Oxidantien darüberhinaus zu einer gesteigerten intestinalen Chloridkonzentration führen, die mukosale Permeabilität verbessern und die Kontraktilität der glatten Muskelzellen ändern (Grisham MB '94).

In der Vergangenheit sind viele Untersuchungen zur Rolle der Neutrophilen gemacht worden. Ein Grund dafür sind sicher die zur Zeit besseren und einfacheren Darstellungsmöglichkeiten der Endstrombahn mit den Leukozyten. Es muß darauf geachtet werden, daß bei in vivo mikroskopischen Befunden von Leukozyten und nicht von Neutrophilen gesprochen wird, da die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff (Rhodamin) keine Unterscheidung der kernhaltigen Zellen im Blutstrom zuläßt (Ferguson D '93). Die zirkulierenden Leukozyten umfassen so Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Lymphozyten und Monozyten, die durch die Markierung mit Rhodamin 6G auch in dieser Studie nicht unterschieden werden konnten und möglicherweise ganz unterschiedliche Einflüsse auf die Mikrozirkulation haben.

### 5.3 Indomethacin induzierte intestinale Entzündung

Das in dieser Studie verwendete Entzündungsmodell basiert auf der zweimaligen subkutanen Gabe von Indomethacin (7,5 mg/kg) im Abstand von 24 Stunden (Yamada T '93). Es ist bislang nicht geklärt, auf welchem Mechanismus die Entwicklung der intestinalen Entzündung letztendlich beruht. Auch stellt sich die Frage, ob es sich bei diesem Modell um ein valides Entzündungsmodell für unseren Versuchsansatz handelt.

Indomethacin ist ein kompetitiver Inhibitor der Cyclooxygenase (COX). Dieses Enzym ist in die Degradation von Arachidonsäure zu Prostaglandinen über die Prostaglandinsynthase und Leukotrienen über die Lipoxygenasen involviert (Stryer L '95).

Die chronische Verabreichung von bestimmten nicht-steroidalen antiinflammatorischen Medikamenten (NSAIDs), wie z.B. Indomethacin (Indo), führt bei Patienten zu einer gastrointestinalen Entzündung. Im experimentellen Tiermodell reicht hingegen die akute Gabe aus, um eine vergleichbare Entzündung zu erreichen. Schätzungsweise 70% der Patienten, die therapeutische Dosen von NSAIDs einnehmen, zeigen eine vergrößerte intestinale mukosale Permeabilität sowie Blutverlust über den Stuhl (Bjarnason I '87). Die Indomethacin induzierte Enterokolitis in Ratten ist mittlerweile als Tiermodell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen akzeptiert (Fedorak R '95). Subletale Dosen von Indo verursachen in Ratten (z.B. Sprague-Dawley – Wildstamm) eine chronische Entzündung des distalen Jejunums und proximalen Ileums, die bis zu sechs Wochen persistiert (Banarjee AK '90). In genetisch empfindlichen Ratten (Lewis) ist diese Entzündung mehr als 11 Wochen ausgeprägt (Sartor RB '92). Diese Indomethacin-induzierte Enteritis ist in empfindlichen Rattenstämmen charakterisiert durch lineare Ulzerationen, ödematöse Verdickung des Dünndarms und des Mesenteriums, Adhäsionen, partielle Obstruktionen, akute und chronische transmurale, granulomatöse Entzündung, Kryptenabszesse und Fibrosen (Sartor RB '91). Die Läsionen teilen klinische, histologische und pathophysiologische Charakteristika mit einer Crohn-Enteritis (Banarjee A '90, Sartor RB '91, Beck WS '90, Brodie DA '70). Die Mechanismen der Indomethacin induzierten gastrointestinalen Läsionen bleiben trotz extensiver Untersuchungen kontrovers. Ein Faktor in der Pathogenese der durch Indomethacin induzierten Darmentzündung könnte die Inhibierung der Cyclooxygenase (COX) sein. Dieses führt zu einer Abnahme der endogenen, protektiven Prostaglandine (PG) und

man weiß, daß exogene PGs gastrointestinale Läsionen, die mit Indomethacin assoziiert sind, vorbeugen (Robert A '77, Fang WF '77). Aus diesen Beobachtungen heraus hat man festgestellt, daß eine aktive oder passive Immunisierung gegen PGE<sub>2</sub> oder Prostaglandin gastrointestinale Ulzerationen verursacht (Redfern JS '87). Obwohl Prostaglandine (PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>) durch ihre vasodilatorischen Eigenschaften (Förderung der Ödembildung) und durch ihre Effekte auf die sensorischen afferenten Nerven (Schmerzförderung) zu Entzündungsreaktionen beitragen können, ist deutlich, daß diese PGs und andere Mitglieder aus der Familie der Lipidmediatoren viele antiinflammatorische Vorgänge stärken können. So können z.B. Prostaglandine die Leukozytenadhäsion inhibieren (Asako H '92) und die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten durch Neutrophile abschwächen (Wong K '81). Darüberhinaus wurde beobachtet, daß sie sowohl einer Mastzelldegranulation vorbeugen (Hogaboam CM '93) als auch die Bildung von anderen inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen supprimieren (Hogaboam CM '93). Eine weitere Studie über eine experimentelle Pleuritis hebt die antiinflammatorischen Eigenschaften von PGD<sub>2</sub> hervor (Gilroy D '99). Die Bildung von PGD<sub>2</sub> war hier während der Entzündungsrückbildung deutlich erhöht und exogenes PGD<sub>2</sub> sorgte in der Studie für eine signifikante Abnahme der Neutrophilenanzahl im inflammatorischen Exudat. Außerdem wurde auch in einer durch TNBS-induzierten Kolitis in der Ratte gezeigt, daß exogenes PGD<sub>2</sub> die Granulozyteninfiltration in das Kolon signifikant reduzieren konnte (Ajuebor M '00).

Es bleibt jedoch offen, daß die Entstehung von intestinalen Ulzerationen zeitweilig sowohl nicht mit den entsprechenden mukosalen PG-Leveln einhergehen (Whittle BJR '81) als auch das Schädigungsausmaß nicht mit dem Grad der Abnahme der PG-Biosynthese korreliert (Ligumsky M '83, Langenbach R '95). Aus diesen Gründen ist es unwahrscheinlich, daß eine PG-Defizienz alleine ausreichend ist, um den Prozess zu erklären, der letztendlich zu den intestinalen Läsionen führt.

Whittle et al. (Whittle BJR '95) berichteten über die Beteiligung von Stickoxid (NO) an mikrovaskulären Schäden im Jejunum der Ratte, hervorgerufen durch Indomethacin. Es wird allgemein angenommen, daß durch cNOS (c-Stickoxid-Synthase) produziertes Stickoxid (NO) für die Haushaltsfunktion in der gastrointestinalen Mukosa wichtig ist (Lopez-Belmonte J '93, Pique JM '89). Laszlo et al. (Laszlo F '98) konnten zeigen, daß die gleichzeitige Verabreichung von L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine-methyl-ester, ein

NO-Synthase-Hemmer) und Indomethacin, verglichen mit der alleinigen Gabe von Indomethacin, den akuten intestinalen mikrozirkulatorischen Schaden steigerte, obgleich eine spätere Behandlung mit L-NAME die Entzündungsausprägung reduzierte. Dennoch wurde über eine schädliche Rolle von iNOS (induzierte Stickoxid-Synthase) produziertem Stickoxid (NO) in entzündlichen Funktionsstörungen, wie z.B. bei Colitis ulcerosa oder Serotonin-induzierten gastralen Läsionen, berichtet. Dieses würde für eine duale Rolle (protektiv und proulzerativ) von NO im Gastrointestinaltrakt sprechen. Konaka et al. (Konaka A `99) stellten fest, daß die iNOS-Aktivität sechs Stunden nach Indomethacin-Applikation, in der intestinalen Mukosa anstieg und daß durch eine spätere Gabe von L-NAME (6 h nach Indo-Gabe) das Auftreten von intestinalen Läsionen durch eine Inhibierung der NO Produktion vermieden werden konnte. Dieses läßt vermuten, daß iNOS / NO in die intestinale ulzerogene Antwort auf Indomethacin involviert ist.

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die intestinale Bakterienkonzentration nach Indomethacin-Gabe anstieg (Yamada T `93). Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind bislang jedoch noch nicht geklärt. Die lokale Toxizität von Indo könnte einen wichtigen Faktor in der enterobakteriellen Invasion darstellen, da dieses Agens in die Galle sezerniert wird, die physiochemische Barriere schädigt und zu einer Anfälligkeit für Mukosaschäden beiträgt (Lugea A `97). Tatsächlich ist es durch Antibiotika (z.B. Metronidazol oder Ampicillin) möglich, einer durch Indo hervorgerufenen intestinalen Entzündung vorzubeugen (Yamada T `93, Whittle BJR `95). Eine weiterführende Studie (Konaka A `99) konnte zeigen, daß Ampicillin nicht nur durch Inhibierung der mukosalen Invasion von Enterobakterien die Bildung von intestinalen Läsionen gänzlich unterbinden konnte, sondern auch die Induktion der iNOS in Antwort auf Indomethacin unterband. Man beobachtete, daß ein Anstieg der Enterobakterien, dem Anstieg der iNOS-Aktivität in Antwort auf das Indomethacin in der intestinalen Mukosa voranging. Diese Ergebnisse von Konaka et al. lassen vermuten, daß die enterobakterielle Invasion in die Mukosa und die damit verbundene Freisetzung von bakteriellem Endotoxin sowie die nachfolgende Überproduktion von NO durch die Induktion von iNOS-Expression, den ersten Pathomechanismus in der Entstehung von Indomethacin-induzierten intestinalen Läsionen darstellt.

Demgegenüber stehen die Neutrophilen, von denen man annimmt, daß sie eine wichtige pathogenetische Rolle in der NSAID - induzierten Gastroenteropathie übernehmen (Miura S '91, Santucci L '95, Bertrand V '98). Eine weitere Studie (Konaka A '99) zeigte, daß ANS (anti-neutrophil-serum) sehr deutlich Indomethacin-induzierte intestinale Läsionen, ohne Einfluß auf die Translokation der Enterobakterien gehabt zu haben, vermeiden konnte. Darüberhinaus (Konaka A '99) wird betont, daß intestinale Schäden, die durch Indomethacin hervorgerufen wurden, mit einem gleichzeitigen Anstieg der Fett-Peroxidations-Aktivität sowie der Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität einhergehen. Dieser Index für eine Neutrophilen-Aktivierung impliziert, daß Neutrophile und Superoxid-Radikale an der Pathogenese dieses Entzündungsmodells beteiligt sind (Konaka A '99). NO reagiert mit Superoxid-Radikalen zu zytotoxischem Peroxinitrit, welches einen schädlichen Einfluß auf die gastrointestinale mukosale Integrität ausübt (Santucci L '95, Yasuhiro T '97, Laszlo F '98, Bertrand V '98). Es ist vorstellbar, daß die schädigende Wirkung von NO in den Indomethacin induzierten intestinalen Läsionen durch einen zytotoxischen Effekt von Peroxinitrit erklärt werden könnte. Peroxinitrit wird in der Anwesenheit von Superoxid-Radikalen, die eng mit der Aktivierung von Neutrophilen korrelieren, von NO gebildet.

Das Ausbleiben einer intestinalen Entzündung und des nachfolgenden Todes nach Ligatur des Gallenganges weist zudem auf die Wichtigkeit der enterohepatischen Zirkulation von Galle und Indomethacin in diesem tierexperimentellen CED-Modell hin (Yamada T '93, Arndt H '95). Bis zu 50 % des Indomethacins werden über die Galle ausgeschieden (Hucker HB '66). Eine direkte Einwirkung von luminaler Galle und Indomethacin ist nötig, um Mukosaschäden zu verursachen, da ein NSAID, welches metabolisch aktiviert wird und nicht dem enterohepatischen Kreislauf unterliegt, diese Läsionen nicht verursacht (Bjarnason I '91). Hierfür spräche auch, daß eine Unterbindung des Gallenabflusses eine durch Indomethacin verursachte mukosale Permeabilitätssteigerung signifikant abschwächt und vor intestinalen mukosalen Ulzerationen schützt (Yamada T '93). Festzuhalten bleibt, daß das Indomethacin-Entzündungsmodell auch von der biliären Sekretion und der enterohepatischen Zirkulation abhängig ist. Störungen des Gallenflusses durch Nahrungskarenz in Indomethacin behandelten Ratten oder die Ligatur des Gallenganges schützen vor makroskopischen und mikrozirkulatorischen Schäden (Brodie DA '70, Arndt H '95, Arndt H '97).



Eine andere umstrittene Theorie beinhaltet den Gedanken der mikrozirkulatorischen Perfusionsstörung in der intestinalen Mukosa und die damit verbundene vaskuläre Komponente in der Pathogenese der Indo induzierten gastrointestinalen Entzündung. Miura et al. (Miura S '91) berichten in ihrer Studie über charakteristische Veränderungen der Mikrozirkulation, die für eine mögliche Beteiligung an der Entwicklung mukosaler Ulzerationen sprechen könnten. Dieses waren vor allem der Aufstau von fluoreszenz-markiertem Albumin, Geldrollenbildung und Stase in Gefäßarkaden der intestinalen Villusmikrozirkulation von Indomethacin behandelten Tieren. Feigen (Feigen LP '81) postulierte, daß Indomethacin möglicherweise für eine lokale Freisetzung eines  $\alpha$ -Agonisten (Norepinephrine) verantwortlich sei und so vasokonstriktorisch in die Mikrozirkulation eingreifen könne. Auch wird vermutet, daß ein ansteigender Sympathikotonus durch Vasokonstriktion eine Rolle bei der Verminderung von schützenden Faktoren der intestinalen Mukosa in Indomethacin induzierter Entzündung übernimmt (Miura S '91). Eine andere Theorie, die den Bogen zwischen der Rolle der Neutrophilen und der möglichen vaskulären Schädigung und somit der Störung der Mikrozirkulation spannt, beinhaltet den prinzipiellen Mechanismus, durch den Neutrophile möglicherweise Gewebeschäden verursachen (s. auch Kap. 5.2). Man vermutet, daß die extrazelluläre Sekretion von lysosomalen Enzymen entscheidend für die Gewebeschädigung in Verbindung mit entzündlichen Reaktionen verantwortlich ist. Somit wird mehr und mehr Aufmerksamkeit auf die Sauerstoff vermittelten freien Radikale von Neutrophilen gerichtet. Hierbei handelt es sich z.B. um das Peroxidation, das Hydroxyl-Radikal oder das Hypochlorite Anion (Del Soldato P '85, Fantone JC '85). Die signifikante Überproduktion von Sauerstoff-Radikalen durch Neutrophile aus mesenterialen Venen in Indo behandelten Tieren ist vereinbar mit dem Konzept, daß Indomethacin neutrophil-vermittelten oxidativen Stress auf die mikrovaskulären Endothelzellen im Entzündungsgebiet ausübt und somit vasokonstriktorische Ereignisse begünstigt (Miura S '91). Zusammenfassend lassen diese Studien und Fakten vermuten, daß mehrere Einflüsse für die Ausbildung einer Entzündung und der intestinalen Läsionen nach Indomethacin-applikation verantwortlich sind. Wichtig sind vor allem iNOS / NO, Neutrophile, Enterobakterien und die mikrozirkulatorische Perfusion. Man kann annehmen, daß die Translokation der Enterobakterien in die Mukosa den ersten Schritt für Aktivierung der anderen Faktoren darstellt. Die Betonung der Neutrophilenrolle in dieser komplexen

und multifaktoriellen Entzündung zeigt, wie wichtig es ist, die Mechanismen und beteiligten Strukturen sowie die Mediatoren im Hinblick auf die Zelladhäsion von Entzündungszellen zu untersuchen, um Einblick in die Pathogenese von chronischen Entzündungen zu bekommen.

Fazit ist, daß das Indomethacin-Entzündungsmodell vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen und unter Berücksichtigung der Komplexität der einwirkenden Faktoren sehr wohl als valides Modell herangezogen werden kann, um die pathophysiologischen Mechanismen sowie deren Bedeutung für die Entstehung des entzündlichen Zellinfiltrates und dessen Beeinflussung, wie z.B. durch Antikörper gegen Zelladhäsionsmoleküle für Neutrophile, zu untersuchen.

#### **5.4 Antikörperblockade von Mac-1 (CD11b/CD18) und ICAM-1 (CD54)**

Durch anti-Mac-1 (CD11b/CD18) konnte in der Indomethacin induzierten chronischen Ileitis der Ratte die Anzahl der rollenden sowie die Anzahl der adhärenenten Leukozyten effektiv reduziert werden. Makromorphologische Veränderungen einer chronischen Ileitis waren praktisch in der anti-CD11b-behandelten Gruppe nicht vorhanden. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, daß neben anderen mikrozirkulatorischen Störungen (Foitzik T `99), das Leukozytenrolling, das Leukozytensticking und die Transmigration zentrale pathophysiologische Mechanismen für die Entstehung des entzündlichen Zellinfiltrates sind und auch chronische makromorphologische Veränderungen bewirken können. Monoklonale Antikörper (MAks), die gegen den ganzen CD11/CD18 - Komplex gerichtet waren, hatten bereits in vorangegangenen Studien die Fähigkeit, eine Entzündung in einer akuten Colitis bei Ratten (Palmen MJ `95) und eine chronische Indomethacin induzierte Ileitis in Mesenterialvenolen der Ratte (Arndt H `95) reduzieren zu können. Unsere Studie zeigt nun, daß zusätzlich zu dem in vivo beschriebenen CD18-abhängigen Mechanismus (Wallace JL `91), ein CD18-unabhängiger, CD11b-vermittelter Mechanismus für die Zelladhäsion existiert. Somit bringt diese Studie eine Erweiterung der Kenntnisse über die in vivo Rolle der CD18-Untereinheit CD11b bezüglich der Leukozytenbewegung in die intestinale Entzündung der Ratte.

Auf der anderen Seite steht die Gabe des anti-ICAM-1 (CD54) - Antikörpers. Dieser zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und korrespondierend konnten wir in dieser Studie auch keine Besserung der chronischen Ileitis durch diesen Antikörper erreichen. Da ICAM-1 ein primärer Ligand für das CD18-Integrin auf Leukozyten ist, hätten wir eigentlich erwartet, daß die Blockade von endothelialelem ICAM-1 zu einer eindeutigen Inhibierung der Entzündungsantwort in der Indomethacin induzierten Ileitis führt. Tatsächlich ist es so, daß in vivo-Untersuchungen, in denen mit dem anti-ICAM-1-Antikörper in Tiermodellen experimenteller Entzündung gearbeitet wurde, unterschiedlichste Ergebnisse aufweisen. Anti-inflammatorische Eigenschaften des anti-ICAM-1-Antikörpers wurden zum Beispiel in experimentellen Modellen für rheumatische Arthritis (Kavanaugh AF '94), chronische Dextran-Natrium-Sulfat-induzierte Colitis in Mäusen (Taniguchi T '98) und Trinitrobenzenesulfate (TNBS) induzierte Colitis in Ratten (Sans M '99) beschrieben. Darüberhinaus unterstützen Ergebnisse, die bei der Verwendung von ICAM-1 Antisense Oligonucleotiden gewonnen wurden, die Hypothese, daß ICAM-1 eine zentrale Rolle in der Entzündung spielt (Rijcken E '02). ICAM-1 Antisense Oligonucleotide reduzierten die Entzündungsausprägung in Dextran-Natrium-Sulfat induzierter Colitis in Mäusen (Bennett CF '97) und führten zu einer Reduktion der Kortikosteroid-Gabe in einer klinischen Studie mit Morbus Crohn - Patienten (Yacyshyn BR '98). Vielversprechende klinische Ergebnisse einer reduzierten Transplantatabstoßung bei renalen Allotransplantaten (Haug CE '93) konnten in einer großen Multicenter-Studie (Salmela K '99) jedoch nicht reproduziert werden.

Die Tatsache, daß der anti-ICAM-1-Antikörper keinen anti-inflammatorischen Effekt in der Indomethacin induzierten Ileitis zeigte, läßt vermuten, daß der CD11b/CD18-Komplex auf den Leukozyten, effektiv mit einem anderen endothelialen Ligand interagieren kann. Dieses wiederum impliziert nicht, daß ICAM-1 überhaupt keine Rolle in der Indomethacin induzierten Ileitis spielt. Es könnte jedoch wahrscheinlich sein, daß bezüglich der Zelladhäsion in verschiedenen Typen experimenteller Entzündungsmodelle Unterschiede bestehen. Darüberhinaus scheint die Expression von endothelialelem ICAM-1 innerhalb verschiedener experimenteller Bedingungen, Tierspecies und normalen sowie entzündeten Stadien zu variieren. So haben z.B. inflammatorische Mediatoren, wie die Zytokine, Arachidonsäure-Derivate und reaktive Sauerstoff-Metabolite,

welche in entzündlichen Darmerkrankungen erhöht sind, zeigen können, daß durch sie die ICAM-1-Expression auf Endothelzellen hochreguliert wird und die Sensitivität von CD11/CD18 für CD54 ansteigt (Dustin ML '86). Aus diesem Grund könnten Strategien zur Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen durch monoklonale Antikörper auch Überlegungen zur Blockade der Zytokinlevel, wie z.B. durch Anti-Tumor-Nekrosefaktor (Baert FJ '99) beinhalten. Auf der anderen Seite ist die ICAM-1-Expression in humanen Kolonbiopsien von Patienten mit Colitis ulcerosa als auch von Patienten mit Morbus Crohn nicht höher als in gesunden Kontrollen (Schürmann G '93). Auch gibt es keinen, durch eine dual-radiomarkierte Antikörpertechnik, gemessenen Unterschied in der intestinalen CD-54-Expression zwischen gesunden Ratten und Ratten mit Trinitrobenzenesulfate (TNBS) induzierter Colitis (Sans M '99). Neuere Ergebnisse (Krieglstein CF '01) haben zeigen können, daß eine Aktivierung der Endothelzellen und die dadurch gesteigerte vaskuläre ICAM-1-Expression in einem zu unserem Entzündungsmodell gleichem Tiermodell durch Indomethacin hervorgerufen wird. Man bediente sich zur Feststellung dieses Sachverhaltes ebenfalls der dual-radiomarkierten Antikörpertechnik. Jedoch wurde in der Studie von Krieglstein et al. festgestellt, daß die anfangs durch Indomethacin hervorgerufene verstärkte Expression von ICAM-1 sowohl in der mukosalen Schicht als auch in der muskulären Schicht des betroffenen entzündeten Dünndarmes einer Ratte, 48 Stunden nach der ersten, bzw. 24 Stunden nach der zweiten Indomethacin-Gabe unter basale Level abfiel. Im Gegensatz hierzu stand der signifikante Anstieg der CD11b/CD18-Expression auf den Leukozyten, der 48 Stunden nach Indomethacin-Applikation in der oben genannten Studie festgestellt werden konnte. Da unser Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie 48 Stunden nach der ersten, bzw. 24 Stunden nach der zweiten Indomethacinapplikation lag, kann man anhand dieser Daten vermuten, warum die Blockade des endothelialen ICAM-1 nicht den gewünschten Erfolg bringen konnte. ICAM-1 könnte z.B durch bislang noch nicht geklärte Mechanismen von der endothelialen Oberfläche in den Blutstrom verlorengehen, was zu einem Anstieg der ICAM-1 Konzentration im Serum führen würde. Jedoch gibt es für diese Theorie noch keine geeignete Meßmethode, die dieses im Plasma der Ratte nachweisen könnte. Eine andere mögliche Erklärung für das Versagen des monoklonalen Antikörpers gegen ICAM-1 in unserer Studie steht ebenfalls mit den Ergebnissen von Krieglstein et al. in Verbindung. Eine reduzierte ICAM-1-Expression 48

Stunden nach Indomethacin-Gabe, bzw. 24 Stunden nach der zweiten Indomethacin-Gabe könnte durch das Phänomen der Präkonditionierung begründet sein. Hierbei schützt ein vorangegangener schädlicher Einfluß (z.B. durch Indomethacin) das Gefäßsystem vor einem nachfolgenden Insult (2. Indomethacingabe). Studien mit einschichtigen kultivierten Endothelzellen haben zeigen können, daß eine kurze Periode oxidativen Stresses eine Hypoxie / Reoxigenierung- oder TNF- $\alpha$  induzierte Expression von ICAM-1 vermeiden kann (Beauchamp P '99, Zahler S '00). In einem ähnlichen Modell (Ginis I '99) konnte ebenfalls durch die Präkonditionierung mit TNF- $\alpha$  eine Hochregulation der ICAM-1-Expression verhindert werden. Somit ist denkbar, daß auch in unserer Studie die initiale Indomethacin-Injektion das Dünndarm-Gefäßsystem gegen die zweite Indomethacindosis präkonditioniert hat und somit der gewünschte Effekt des anti-ICAM-1-Antikörpers ausblieb. Trotz dieser Ergebnisse und Beobachtungen, die darauf hindeuten, daß die ICAM-1-Expression im Indomethacin-Entzündungsmodell 48 Stunden nach der ersten, bzw. 24 Stunden nach der zweiten Indomethacin-Applikation abfällt, muß betont werden, daß eine niedrigere ICAM-1-Dichte die voranschreitende Akkumulation von Granulozyten im Indomethacin behandeltem Darm zum Zeitpunkt der Mikroskopie nicht vermeiden konnte. Dieses bestätigte sich sowohl in der Histologie als auch in der makroskopischen Beurteilung des Darms. Somit impliziert diese Beobachtung, daß ein anderer zusätzlicher molekularer Mechanismus zur Leukozytenrekrutierung existiert, der zur Entzündungsausprägung, bzw. Entzündungsantwort nach 48 Stunden beiträgt.

Die gleichzeitige Gabe beider Antikörper in Kombination zeigte eine signifikante Reduzierung der rollenden Leukozyten in den Darmgefäßen. Dieses Ergebnis lag nur wenig oberhalb (7,73/100  $\mu\text{m}/30$  sec) des Ergebnisses nach alleiniger anti-Mac-1-Gabe (6,60/100  $\mu\text{m}/30$  sec). Die Morphologische Aufarbeitung des Darmes ergab ebenfalls im Makro- und im Histoscore eine signifikante Abschwächung der Entzündung. Die Anzahl der permanent adhärenen Leukozyten konnte durch die Kombination deutlich abgeschwächt werden (1,80/100  $\mu\text{m}/30$  sec). Jedoch war diese starke Reduktion der Sticker letztendlich nicht signifikant vermindert zur Indomethacin-Gruppe (11,06/100 $\mu\text{m}/30$  sec). Wir hätten erwartet, daß in Anbetracht der anderen Ergebnisse allein schon durch die Blockade von Mac-1 in dieser Kombination eine signifikante Stickerreduktion hätte eintreten müssen. Dieses war nicht der Fall. Auch konnten wir,

wie ursprünglich vermutet, einen möglichen synergistischen Effekt beider Antikörper nicht feststellen. Dieses kann an den oben aufgeführten Gründen liegen. Zudem muß bei dieser Ergebniskonstellation eventuell auch von einer negativen Beeinflussung im Sinne einer möglichen chemischen Interaktion beider Antikörper ausgegangen werden, da durch die Präsenz des ICAM-1-Aks in der AK-Kombinationsgruppe die gemessenen Parameter rückläufig sind, jedoch nicht die starke Aussagekraft besitzen, wie wir sie in der anti-Mac-1-Gruppe vorfinden.

Der in unserer Studie verwandte Antikörper zur Blockierung der Mac-1 (CD11b/CD18)-Domäne auf Leukozyten erzielte eine signifikante Abschwächung der Entzündung bezüglich der intravitalmikroskopischen Daten, wie z.B. Leukozyten-Rolling und -Sticking, als auch bezüglich der morphologischen Auswertung der gewonnenen Präparate, wie histologischer und makroskopischer Score des entzündeten Darmes. Diese Beobachtungen und auch die nachfolgenden neueren Ergebnisse von Krieglstein et al. (s.o.) stärken die Vermutung, daß das  $\beta_2$ -Integrin CD11b/CD18 wesentlich zur Indomethacin induzierten Leukozytenrekrutierung beiträgt. Die Gruppe um Krieglstein et al. stellte ebenfalls fest, daß zirkulierende Leukozyten, die im Indomethacin-Entzündungsmodell der Ratte mittels Flowzytometrie untersucht wurden, 48 Stunden nach der ersten Indomethacin-Gabe signifikant vermehrt CD11b/CD18 exprimierten (s.o.). Obwohl ICAM-1 ein bekannter Ligand für CD11b/CD18 ist, benötigt dieses stark promiskuitive  $\beta_2$ -Integrin das ICAM-1 nicht, um die Leukozyten-Endothelzell-Adhäsion zu fördern. Wir vermuten anhand unserer Ergebnisse, daß sowohl die Bindung von CD11b/CD18 an subkonstitutionelle Formen von ICAM-1, als auch die nicht-spezifische Bindung dieses  $\beta_2$ -Integrins an andere Strukturen der endothelialen Oberfläche, für den größten Teil der Leukozytenrekrutierung in unserem Modell der Indomethacin induzierten Ileitis verantwortlich ist.

## 6. Zusammenfassung

Neue biologische Therapien bei der Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spiegeln den exponentiellen Wissenszuwachs über das menschliche Immunsystem und insbesondere über die Mechanismen von intestinalen Entzündungen in der letzten Dekade wieder (Delves PJ '00, Parkin J '01). Das bessere Verständnis der (Entzündungs-) Mechanismen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist das Ergebnis klinischer Forschung und der Untersuchungen an geeigneten Tiermodellen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl neuer attraktiver Tiermodelle entwickelt. Obwohl keines dieser Modelle ein vollständiges Korrelat zum Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa darstellt, imitieren diese Tiermodelle einige wichtige klinische, histopathologische und immunologische Aspekte dieser Erkrankungen. Zudem haben es diese Modelle auch ermöglicht, neue therapeutische Ansätze zur Behandlung dieser Erkrankungen zu erproben (Baumgart DC '03). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die Migration zirkulierender Leukozyten in lokale Entzündungsbereiche einen wesentlichen Aspekt in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen darstellt (Schürmann G '95). Diese transendotheliale Migration der Leukozyten wird durch die Interaktion von Zelladhäsionsmolekülen, die sowohl auf Leukozyten als auch auf Endothelzellen lokalisiert sind, gesteuert. Schon früh konnte eine vermehrte Expression von solchen Zelladhäsionsmolekülen im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen gezeigt werden (Schürmann G '93).

Ziel dieser Studie war es, mittels intestinaler Intravitalmikroskopie an einem Rattenmodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu überprüfen, wie sich eine einzelne und eine kombinierte Antikörperblockade gegen das von Leukozyten exprimierte Zelladhäsionsmolekül Mac-1 und seinen endothelseitigen Liganden ICAM-1 auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und somit auf das Entzündungsmuster auswirkt. Hierzu erfolgte die lokale Etablierung eines geeigneten tierexperimentellen, intestinalen Entzündungsmodells. Eine Darmentzündung konnte durch die zweimalige subkutane Indomethacingabe (7,5 mg/kg KG in 5 % NaHCO<sub>3</sub>) 48 und 24 Stunden vor Versuchsbeginn standardisiert in der Ratte ausgelöst werden. Insgesamt wurden 35 männliche Sprague-Dawley-Ratten (160-200 g) in 5 Gruppen mit je 7 Tieren eingeteilt. Bei 4 Gruppen wurde durch die zweimalige subkutane Indomethacin-Injektion (48 h

und 24 h vor Mikroskopie) eine chronische Darmentzündung induziert. Über einen zentralen Venenkatheter erhielt jeweils eine der Entzündungsgruppen den anti-Mac-1, eine den anti-ICAM-1 und eine weitere die Kombination beider Antikörper (je 1mg/kg KG) 24 h und 12 h vor der Mikroskopie. Der letzten Entzündungsgruppe wurde nur die Trägersubstanz der AK-Suspension verabreicht. Die fünfte Versuchsgruppe diente als entzündungsfreie Kontrolle. Narkose und Schmerzausschaltung erfolgten durch Etherinhalation. In Auflichttechnik wurden pro Ratte erstmalig 10 subserosale, postkapilläre Sammelvenolen am Übergang vom Darm zum Mesenterium mikroskopiert und online videodokumentiert. Die Makroskopie und die Histologie des Darmes wurden anhand spezieller Scores ausgewertet.

Die Entzündung war durch einen signifikanten Anstieg ( $P < 0,05$ ) der temporär adhärenen Leukozyten (von  $5,41 \pm 2,79$  auf  $33,64 \pm 14,56$  /100  $\mu\text{m}/30$  sec) und der permanent adhärenen Leukozyten (von  $0,16 \pm 0,18$  auf  $11,06 \pm 3,63$  /100  $\mu\text{m}/30$  sec) charakterisiert. Nach Antikörpergabe zeigte die anti-CD11b-Gruppe, im Gegensatz zur anti-CD 54-Gruppe, die eine Verminderung, jedoch keine signifikante Reduzierung der Entzündungszellen erreichte, eine signifikante ( $P < 0,05$ ) Verminderung der Roller (von  $33,64 \pm 14,56$  auf  $6,60 \pm 2,71$ ) und der Sticker (von  $11,06 \pm 3,63$  auf  $0,07 \pm 0,10$ ). Die Kombination beider Aks zeigte hingegen nur eine signifikante Verminderung der Roller (von  $33,64 \pm 14,56$  auf  $7,73 \pm 3,60$ ). Indomethacin führte zu einem Anstieg des Makroskopie-Scores von 0 auf  $4,43 \pm 0,79$  Punkten ( $P < 0,05$ ), anti-CD11b zu einer Verminderung von  $4,43 \pm 0,79$  auf  $1,29 \pm 1,11$  Punkten ( $P < 0,05$ ) und die Kombination zu einer Verminderung von  $4,43 \pm 0,79$  auf  $1,57 \pm 0,98$  ( $p < 0,05$ ). Histologisch führte Indomethacin zu einem Anstieg des Scores von 0 auf  $6,43 \pm 1,27$  Punkten ( $P < 0,05$ ), anti-CD11b zu einer Verminderung von  $6,43 \pm 1,27$  auf  $1,14 \pm 2,04$  ( $P < 0,05$ ) und die Kombination zu einer Verminderung von  $6,43 \pm 1,27$  auf  $0,29 \pm 0,76$  ( $P < 0,05$ ).

Wir haben durch diese Ergebnisse erstmalig zeigen können, daß sich die postkapillären Sammelvenolen der Dünndarmserosa eignen, um intravitalmikroskopische Untersuchungen im Indomethacin-Entzündungsmodell der Ratte durchzuführen (Kriegelstein CF '98). Sie stellen Sammelgefäße der entzündeten Darmsegmente dar und erlauben Rückschlüsse auf die Entzündungsprozesse in der Darmwand. Die Blockade des endothelseitigen Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 hatte in unserem Modell keinen signifikanten Einfluß auf das Leukozytenverhalten. Die anti-Mac-1 - Gabe hemmte die



Leukozyten-Endothelzellinteraktion erfolgreich und blockierte signifikant die makroskopische Darmentzündung. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass dem leukozytenständigen Zelladhäsionsmolekül Mac-1 eine Schlüsselrolle in der Entzündungskaskade des Indomethacin-Modells einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zukommt (Kriegelstein CF '99).

Die gewonnenen Daten lassen erwarten, dass in Zukunft Biologika eine wichtige Rolle bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spielen werden.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	Antigen presenting cell
CAM	Cell Adhesion Molecule
CARD	Caspase Activation And Recruitment Domain
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CLA	Cutaneous leukocyte antigen
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
CU	Colitis ulcerosa
COX	Cyclooxygenase
DSS	Dextran-Sodium-Sulfate
EDRF	Endothelium-derived-relaxing factor
EGF	Epidermal growth factor
ELAM	Endothelial leukocyte adhesion molecule
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
GlyCAM-1	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
HEVs	High endothelial venules
HLA	Human leukocyte antigen
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
IBD	Inflammatory bowel disease
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Indo	Indomethacin
IVM	Intravitalmikroskopie
KD	Kilodalton
LAD-I	Leukozytenadhäsionsdefizienz
LADS	Leukocyte adhesion deficiency syndrome

---

LAM-1	Leukocyte adhesion molecule 1
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine methyl ester
LPS	Lipo-Poly-Saccharid
MAbs	Monoclonal antibodies
MAks	Monoklonale Antikörper
MAC-1	Macrophage antigen-1
MAdCAM-1	Mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MAks	Monoklonale Antikörper
MHC	Major histocompatibility complex
MC	Morbus Crohn
NO	Stickoxid
NOS	Stickoxid-Synthase
NSAIDs	nicht steroidale antiinflammatorische Medikamente
PAF	Platelet-activation factor
P <sub>art</sub>	Arterieller Blutdruck
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PG	Prostaglandin
PMNs	Polymorphkernige Neutrophile
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
SCID	Severe combined immuno deficiency
sLe <sup>x</sup>	sialyl Lewis <sup>x</sup>
SEM	Standardabweichung des mittleren Fehlers
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TCR	T-cell-receptor
TNBS	Trinitrobenzenesulfate
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

## 8. Anhang

### 8.1 Ergebnistabellen

Versuch	Roller (n/100µm/30sec)	Sticker (n/100µm/30sec)	Ery-V (µm/s)	Fluß (µl/min)	Gefäß-Ø (µm)	Makroscore (0-5 Punkte)	Histoscore (0-8 Punkte)
K1	6,40	0,40	1877,00	0,65	84,24	0,00	0,00
K2	4,10	0,40	2517,89	1,07	89,65	0,00	0,00
K3	6,60	0,00	2097,33	1,02	105,68	0,00	0,00
K4	2,70	0,10	2432,80	1,27	106,15	0,00	0,00
K5	4,50	0,20	1735,33	0,88	111,02	0,00	0,00
K6	2,90	0,00	2088,44	1,29	116,35	0,00	0,00
K7	10,70	0,00	1593,53	0,93	108,10	0,00	0,00
$\bar{x}$	<b>5,41</b>	<b>0,16</b>	<b>2048,90</b>	<b>1,01</b>	<b>103,03</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
$S_{\bar{x}}$	2,79	0,18	343,14	0,22	11,66	0,00	0,00

Tab. 1: Ergebnisse der Kontrollgruppe.

Versuch	Roller (n/100µm/30sec)	Sticker (n/100µm/30sec)	Ery-V (µm/s)	Fluß (µl/min)	Gefäß-Ø (µm)	Makroscore (0-5 Punkte)	Histoscore (0-8 Punkte)
I1	32,50	10,70	2280,67	0,94	93,61	5,00	7,00
I2	51,20	8,80	1864,18	1,00	100,38	5,00	6,00
I3	26,10	9,70	1829,38	0,89	99,86	4,00	8,00
I4	25,60	6,50	1650,99	1,00	110,15	3,00	4,00
I5	56,80	18,10	2157,48	1,15	105,42	5,00	7,00
I6	18,70	12,40	2445,77	1,09	97,02	4,00	6,00
I7	24,60	11,20	1959,40	1,02	105,53	5,00	7,00
$\bar{x}$	<b>33,64</b>	<b>11,06</b>	<b>2026,84</b>	<b>1,01</b>	<b>101,71</b>	<b>4,43</b>	<b>6,43</b>
$S_{\bar{x}}$	14,56	3,63	279,36	0,09	5,66	0,79	1,27

Tab. 2: Ergebnisse der Indomethacin-Entzündungsgruppe.

Versuch	Roller (n/100µm/30sec)	Sticker (n/100µm/30sec)	Ery-V (µm/s)	Fluß (µl/min)	Gefäß-Ø (µm)	Makroscore (0-5 Punkte)	Histoscore (0-8 Punkte)
Mac-1	9,20	0,10	2668,42	1,41	105,20	2,00	0,00
Mac-2	5,50	0,00	2511,07	1,39	105,20	3,00	3,00
Mac-3	9,30	0,20	2488,00	1,42	111,73	1,00	0,00
Mac-4	3,30	0,20	2097,02	0,99	98,49	0,00	0,00
Mac-5	4,20	0,00	1396,42	0,85	112,68	2,00	5,00
Mac-6	5,00	0,00	1749,53	0,88	103,88	0,00	0,00
Mac-7	9,70	0,00	2214,36	1,59	123,29	1,00	0,00
$\bar{x}$	<b>6,60</b>	<b>0,07</b>	<b>2160,69</b>	<b>1,22</b>	<b>108,64</b>	<b>1,29</b>	<b>1,14</b>
$S_{\bar{x}}$	2,71	0,10	456,03	0,30	8,06	1,11	2,04

Tab. 3: Ergebnisse der Anti-Mac-1 Versuchsgruppe.

Versuch	Roller (n/100µm/30sec)	Sticker (n/100µm/30sec)	Ery-V (µm/s)	Fluß (µl/min)	Gefäß-Ø (µm)	Makroscore (0-5 Punkte)	Histoscore (0-8 Punkte)
ICAM-1	29,00	8,00	1899,50	0,82	94,57	5,00	7,00
ICAM-2	21,70	2,60	1813,14	0,82	98,78	5,00	7,00
ICAM-3	43,10	12,70	2441,58	1,18	98,05	5,00	8,00
ICAM-4	33,00	9,00	2447,12	1,00	93,18	5,00	8,00
ICAM-5	22,80	6,60	2259,34	1,07	98,96	4,00	7,00
ICAM-6	40,01	29,90	1662,80	0,47	78,37	5,00	6,00
ICAM-7	7,70	4,10	3026,09	1,83	116,19	3,00	0,00
$\bar{x}$	<b>28,19</b>	<b>10,41</b>	<b>2221,37</b>	<b>1,03</b>	<b>96,87</b>	<b>4,57</b>	<b>6,14</b>
$S_{\bar{x}}$	12,09	9,20	470,94	0,42	11,14	0,79	2,79

Tab. 4: Ergebnisse der Anti-ICAM-1 Versuchsgruppe.

<b>Versuch</b>	<b>Roller</b> (n/100µm/30sec)	<b>Sticker</b> (n/100µm/30sec)	<b>Ery-V</b> (µm/s)	<b>Fluß</b> (µl/min)	<b>Gefäß-Ø</b> (µm)	<b>Makroscore</b> (0-5 Punkte)	<b>Histoscore</b> (0-8 Punkte)
M/I-1	7,10	1,30	1989,08	0,95	101,35	1,00	0,00
M/I-2	12,90	5,20	2038,69	0,98	101,18	2,00	0,00
M/I-3	2,40	0,20	1306,67	0,65	102,57	1,00	0,00
M/I-4	9,80	1,70	1773,98	0,68	93,26	0,00	0,00
M/I-5	6,30	1,20	2219,18	0,84	89,30	2,00	2,00
M/I-6	10,60	1,70	1634,24	0,65	91,57	2,00	0,00
M/I-7	5,00	1,30	2210,18	1,15	104,41	3,00	0,00
$\bar{x}$	<b>7,73</b>	<b>1,80</b>	<b>1881,72</b>	<b>0,84</b>	<b>97,66</b>	<b>1,57</b>	<b>0,29</b>
$S_{\bar{x}}$	3,6	1,58	332,03	0,19	6,09	0,98	0,76

Tab. 5: Ergebnisse der Anti-Mac-1/Anti-ICAM-1-Kombination – Versuchsgruppe.

## 9. Literaturverzeichnis

Adams DH, Shaw S

Leucocyte- endothelial interactions and regulation of leucocyte migration  
Lancet 343, 831-836 (1994)

Adams DH, Harvath L, Bottaro DP, Interrante R, Catalano G, Tanaka Strain A,  
Hubscher SG, Shaw S

Hepatocyte growth factor and macrophage inflammatory protein beta:  
structurally distinct cytokines that induce rapid cytoskeleton changes and subset-  
preferential migration in T cells  
Proc Natl Acad Sci USA 91 (15), 7144-7148 (1994)

Ager A

Lymphocyte-vascular endothelial cell interactions in the immune response  
Clin Exp Immunol Suppl 1, 5-6 (1993)

Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J,  
Altevogt P, Ley K

CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin  
Faseb J 12, 1241-1251 (1998)

Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL

Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D<sub>2</sub> is an early anti-inflammatory signal  
in experimental colitis  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279(1), 238-44 (2000)

Ala A, Dhillon AP, Hodgson HJ

Role of cell adhesion molecules in leucocyte recruitment in the liver and gut  
International Journal of Experimental Pathology 84, 1-16 (2003)

Allchin P

Case of acute extensive ulceration of the colon  
Trans Pathol Soc London 37, 199-202 (1885)

Alon R, Feizi T, Yuen CT, Fuhlbrigge RC, Springer TA

Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under  
physiologic flow conditions  
J Immunol 154 (10), 5356-5366 (1995)

Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A

Appendectomy and protection against ulcerative colitis  
N Engl J Med 344, 808-814 (2001)

Anthuber M, Rihl M, Farkas S, Schildberg FW, Messmer K  
Intravitalmikroskopische Untersuchungen zum Einfluß von Epoprostenol auf den Ischämie/Reperfusionsschaden nach orthotoper Lebertransplantation im Rattenmodell  
*Acta Chir Austriaca* 111, 21-22 (1994)

Arao S, Masumoto A, Otsuki M  
Beta 1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells  
*Pancreas* 20, 129-137 (2000)

Arbones ML, Ord DC, Ley K, Ramech H, Maynard-Curry C, Otten G, Capon DJ, Tedder TF  
Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice  
*Immunity* 1, 247-260 (1994)

Arnaout MA  
Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18  
*Blood* 75, 1037 (1990)

Arndt H, Palitzsch KD, Schölmerich J, Granger DN  
Bile duct ligation and fasting reduce microcirculatory disturbances in indomethacin-induced intestinal inflammation in the rat  
*Gastroenterology* 108, A773 (1995)

Arndt H, Palitzsch KD, Anderson DC, Rusche J, Grisham MB, Granger DN  
Leucocyte-endothelial cell adhesion in a model of intestinal inflammation  
*Gut* 37, 374-379 (1995)

Arndt H, Bolanowski MA, Granger DN  
Role of interleukin-8 on leucocyte-endothelial cell adhesion in intestinal inflammation  
*Gut* 38, 911-915 (1996)

Arndt H, Kullmann F, Schölmerich J, Palitzsch KD  
Acute and chronic effects of different bile acids on indomethacin-induced intestinal inflammation  
*Inflammation* 21, 553-567 (1997)

Asako H, Kubes P, Wallace JL, Gaginella T, Wolf RE, Granger DN  
Indomethacin-induced leukocyte adhesion in postcapillary venules: role of lipoxygenase products  
*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 262, 903-908 (1992)

Autschbach F, Qiao L, Schürmann G, Dienes HP, Wallich R, Meuer SC  
In situ proliferation status of intestinal mononuclear cells in Crohn's disease  
*Immunobiology* 186, 156-157 (1992)



- Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F  
Kinetics of white blood cell staining by administration of Rhodamine 6G  
*Int J Microcirc* 15, 85-91 (1995)
- Baert FJ, Rutgeerts PR  
Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications  
*Int J Colorectal Dis* 14, 47-51 (1999)
- Baez S  
Microcirculation in the intramural vessels of the small intestine in the rat  
In: Reynolds, Zweifach  
The microcirculation  
University of Illinois Press, Urbana 114-128 (1959)
- Baker SJ, Mathan VL, Cherian V  
The nature of the villi in the small intestine of the rat  
*Lancet*, 860 (1963)
- Banarjee AK, Peters TJ  
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 (1990)
- Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC  
Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined  
*Immunity* 3, 99-108 (1995)
- Bauer M, Marzi I, Ziegenfuß T, Seeck G, Bühren V, Larsen R  
Comperative effect of crystalloid and small volume hypertonic fluid resuscitation on hepatic microcirculation after hemorrhagic shock  
*Circ Shock* 40, 187-193 (1993)
- Baumgart DC, Wiedenmann B, Dignass AU  
Biologische Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen  
*Z Gastroenterol* 41 (10), 1017-1032 (2003)
- Baumheter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Lasky LA  
Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34  
*Science* 262, 436-438 (1993)
- Beauchamp P, Richard V, Tamion F, Lallemand F, Lebreton JP, Vaudry H, Daveau M, Thuillez C  
Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation  
*Circulation* 100 (5), 541-546 (1999)

- Beck WS, Schneider HT, Dietzel K, Nuernberg B, Brune K  
Gastrointestinal ulcerations induced by anti-inflammatory drugs in rats  
Arch Toxicol 64, 210-217 (1990)
- Beckmann JS, Koppenol WH  
Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly  
Am J Physiol 271 1424-1437 (1996)
- Ben M, Dixon RL, Adamson RH  
Anesthesia in the rat  
Fed Proc 28(4), 1552-1527 (1969)
- Benand G, Schädlich M  
Grundriß der Anästhesiologie  
Verlag Volk und Gesundheit, 4. Auflage, Berlin (1989)
- Bendjelloul F, Maly P, Mandys V, Jirkovska M, Prokesova L, Tuckova L, Tlaskalova-Hogenova H  
Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) deficiency protects mice against severe forms of experimentally induced colitis  
Clin Exp Immunol 119, 57-63 (2000)
- Bennett CF, Kornburst D, Henry S, Stecker K, Howard R, Cooper S, Dutson C, Hall W, Jacoby HI  
An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sodium sulfate-induced colitis in mice.  
J Pharmacol Exp Ther 280 (2), 988-1000 (1997)
- Berlin C, Bargatze RF, Campbell UH, von Adrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC  
 $\alpha 4$  integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow  
Cell 80, 413-422 (1995)
- Berman ME, Xie Y, Muller WA  
Roles of platelet / endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and  $\beta 2$  integrin activation  
J Immunol 156, 1515-1524 (1996)
- Berman AE, Kozlova NI  
Integrins: structure and functions  
Membr Cell Biol 13, 207-244 (2000)
- Bertrand V, Guimbaud R, Tulliez M, Mauprivez C, Sogni P, Coutruiet D, Groud JP, Chaussade S, Chauvelot-Moachon L  
Increase in tumor necrosis factor- $\alpha$  production linked to the toxicity of indomethacin for the rat small intestine  
Br J Pharmacol 124, 1385-1394 (1998)

- Bevilacqua MP  
Endothelial-leukocyte adhesion molecules  
Annu Rev Immunol 11, 767-804 (1993)
- Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G, Cesconi O  
Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human diseases  
Ann Rev Med 45, 361 (1994)
- Bienvendu K, Harris N, Granger DN  
Modulation of leukocyte migration in mesenteric interstitium  
Am J Physiol 267, 1573-1577 (1994)
- Bjarnason I, Zanelli G, Smith T, Prouse P, Williams P, Smethurst P, Delacey G, Gumpel MJ, Levi AJ  
Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans  
Gastroenterology 93, 480-489 (1987)
- Bjarnason I, Fehilly B, Smethurst P, Levi AJ  
Importance of local versus systemic effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs in increasing small intestinal permeability in man  
Gut 32, 275-277 (1991)
- Bohlen HG, Gore RW  
Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies  
Microvasc Res 11, 103-110 (1976)
- Borg TK, Caulfield JB  
Morphology of connective tissue in skeletal muscle  
Tiss Cell 12, 197-207 (1980)
- Bridger S, Lee JCW, Bjarnason I, Lennard Jones JE, Macpherson AJ  
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 (2002)
- Briskin M, Winsor-Hines D, Shyjan A, Cochran N, Bloom S, Wilson J, McEvoy LM, Butcher EC, Kassam N, Mackay CR, Newman W, Ringler DJ  
Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue  
Am J Pathol 151, 97-110 (1997)
- Brodie DA, Cook PG, Bauer BJ, Dagle GE  
Indomethacin-induced intestinal lesions in the rat  
Toxicol Appl Pharmacol 17, 615-624 (1970)

Bujan J, Gimeno MJ, Prieto A, Pascual G, Bellon JM, Alvarez-Mon M  
Modulation of PECAM-1 (CD31) expression in human endothelial cells effect  
of IFN gamma and IL-1  
J Vasc Res 36, 106-113 (1999)

Bulkley GB, Womack WA, Downey JM, Kvietys PR, Granger DN  
Characterisation of segmental collateral blood flow in the small intestine  
Am J Physiol 249, G228-G235 (1985)

Carlos TM, Harlan JM  
Leukocyte-endothelial adhesion molecules  
Blood 84, 2068-2101 (1994)

Chopp M, Zhang RL, Chen H, Li Y, Jiang N, Rusche JR  
Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell  
damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats  
Stroke 25, 869-875 (1994)

Clark RS, Carlos TM, Schiding JK, Bree M, Fireman LA, DeKosky ST,  
Kochanek PM  
Antibodies against Mac-1 attenuate neutrophil accumulation after traumatic  
brain injury in rats  
J Neurotrauma 13, 333-341 (1996)

Collett C, Munro JM  
Functional distribution and further characterization of human endothelial ligand  
for cellular 1-selectin  
Tissue Cell 31, 39-44 (1999)

Cordell JL, Pulford K, Turley H, Jones M, Micklem K, Doussis IA, Tyler X,  
Mayne K, Gatter KC, Mason DY  
Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3  
J Clin Pathol 47, 143-147 (1994)

Cosnes J, Beaugerie L, Carbornnel F, Gendre JP  
Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study  
Gastroenterology 120, 1093-1099 (2001)

Crohn BB, Ginzburg GD, Oppenheimer JR  
Regional ileitis - A pathological and clinical entity  
J Amer med Ass 99, 1323-1329 (1932)

Curry SH, Brown EA, Kuk H, Cassin S  
Preparation and stability of indomethacin solutions  
Can J Physiol Pharmacol 60, 988-992 (1982)

- Dalziel TK  
Chronic intestinal enteritis  
Brit med J 2, 1068-1070 (1913)
- De Fougerolles AR, Quin X, Springer TA  
Characterization of the function of intercellular adhesion molecules (ICAM)-3  
and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses  
J Exp Med 179, 619-629 (1994)
- Del Soldato P, Foschi D, Varin L, Daniotti S  
Indomethacin-induced intestinal ulcers in rats: effects of salicylazosulfapyridine  
and dexamethasone  
Agents Actions 16, 393-396 (1985)
- Delves PJ, Roitt IM  
The immune system – First of two parts  
N Engl J Med 343, 37-49 (2000)
- Delves PJ, Roitt IM  
The immune system – Second of two parts  
N Engl J Med 343, 108-117 (2000)
- Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L  
Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease  
Gastroenterology 113, 118-126 (1997)
- Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, von Andrian UH  
Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules  
Science 273, 252-255 (1996)
- Diamond MS, Staunton DE, de Fougerolles AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J,  
Hibbs ML, Springer TA  
ICAM-1 (CD54): a counterreceptor for Mac-1 (CD11b/CD18)  
J Cell Biol 111, 3129-3139 (1990)
- Diamond MS, Garcia A-J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA  
The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1  
(CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands  
J Cell Biol 120, 1031-1043 (1993)
- Duchmann R, Kaiser I, Hermann AE, Mayet W, Ewe K, Meyer zum  
Buschenfelde KH  
Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active  
inflammatory bowel disease (IBD)  
Clin Exp Immunol 102, 448-455 (1995)

- Durum SK, Oppenheim JJ  
Proinflammatory cytokines and immunity  
In: Paul WE (ed.)  
Fundamental Immunology, 3<sup>rd</sup> edition  
Raven press, New York, 801-835 (1993)
- Dustin ML, Rothlein R, Bhan AF, Dinarello CA, Springer TA  
Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)  
J Immunol 137, 245-254 (1986)
- Ebnet K, Vestweber D  
Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokins  
Histochem Cell Biol 112 (1), 1-23 (1999)
- Eckert R, Randall D, Burggren W, French K  
Tierphysiologie  
Thieme, 4.Auflage, (2002)
- Ekblom A, Helmick CG, Zack M, Holmberg L, Adami HO  
Survival and causes of death in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study  
Gastroenterology 103, 954-960 (1992)
- Ekblom A, Wakefield AJ, Zack M, Adami HO  
Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease  
Lancet 344, 508-510 (1994)
- Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR  
VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site  
Cell 60, 577-584 (1990)
- Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH  
Experimental models of inflammatory bowel disease  
Gastroenterology 109, 1344-1367 (1995)
- Fabbri M, Bianchi E, Fumagalli L, Pardi R  
Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules  
Inflamm Res 48, 239-246 (1999)
- Fang WF, Broughton A, Jacobson ED  
Indomethacin-induced intestinal inflammation  
Am J Dig Dis 22 (9), 749-760 (1977)

Fantone JC, Ward PA  
Polymorphonuclear leukocyte-mediated cell and tissue injury: oxygen metabolites and their relations to human disease  
Hum Pathol 16, 973-978 (1985)

Fedorak R  
Naturally occurring and experimental models of inflammatory bowel disease  
In: Inflammatory bowel disease  
Williams and Wilkins, Baltimore, 4<sup>th</sup> ed, 71-95 (1995)

Feigen LP, King LW, Ray J, Beckett W, Kadowitz PJ  
Differential effects of ibuprofen and indomethacin in the regional circulation of the dog  
J Pharmacol Exp Ther 219, 679-684 (1981)

Ferguson D, McDonagh PF, Biewer J, Paidas CN, Clemens MG  
Spatial relationship between leukocyte accumulation and microvascular injury during reperfusion following hepatic ischemia  
Int J Microcirc: Clin Exp 12, 45-60 (1993)

Fiocchi C  
Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis  
Gastroenterology 115, 182-105 (1998)

Foitzik T, Kruschewski M, Kroesen A, Buhr HJ  
Does microcirculation play a role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease?  
Int J Colorect Dis 14, 29-34 (1999)

Franik A  
Einfluß der Äther- und der Neuroleptanaesthesie mit Ketamin-Xylazin auf die Makro- und Mikrozirkulation der Ratte  
Inaugural-Dissertation, Münster (1995)

Gahmberg CG  
Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules  
Curr Opin Cell Biol 9 (5), 643-650 (1997)

Galbourn JP, Johnston B, Niu XF, Kubes P  
Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo  
J Immunol 154, 804-813 (1995)

Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC  
A cell surface molecule involved in organ specific homing of lymphocytes  
Nature 330, 30-34 (1983)

- Gannon BJ, Gore RW, Rogers PAW  
Dual blood supplies to intestinal villi of rabbit and rat  
Microvasc Res 19, 247 (1980)
- Gannon BJ, Gore RW, Rogers PA  
Is there an anatomical basis for a vascular counter-current mechanism in rabbit and human intestinal villi?  
Biomedical Res suppl 2, 235-241 (1981)
- Gannon BJ  
The co-existence of fountain and tuft patterns of blood supply in individual intestinal villi of rabbit and man: Resolution of an old controversy  
Biblthca anat Karger Basel 20, 130-133 (1981)
- Gannon BJ  
The vasculature and lymphatic drainage  
In: Whitehead  
Gastrointestinal and oesophageal pathology  
Churchill-Livingstone, London 117-160 (1989)
- Gannon B, Carati C  
Intestinal Microvascular Organization  
In: Messmer K, Hammersen F (eds)  
Gastrointestinal Microcirculation  
Prog Appl Microcirc, Karger, Basel, 55-89 (1990)
- Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrock ET, Coggon D  
Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy  
Lancet 343, 766-767 (1994)
- Giblin PA, Hwang ST, Katsumoto TR, Rosen SD  
Ligation of L-selectin on T lymphocytes activates beta1 integrins and promotes adhesion to fibronectin  
J Immunol 159, 3498-3507 (1997)
- Gilroy D, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA  
Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties  
Nat Med 5, 698-701 (1999)
- Ginis I, Schweizer U, Brenner M, Liu J, Azzam N, Spatz M, Hallenbeck JM  
TNF-alpha pretreatment prevents subsequent activation of cultured brain cells with TNF-alpha and hypoxia via ceramide  
Am J Physiol 276, C1171-1183 (1999)
- Girard JP, Springer TA  
High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration  
Immunol Today 16, 449-457 (1995)



Goebell H, Dirks E, Foerster S, Strey B, Quebbe-Fehling E  
A prospective analysis of the incidence and prevalence of Crohn's disease in an urban population in Germany  
Europ J Gastroenterol Hepatol 11, 1039-1045 (1994)

Gonzales AP, Sepulveda S, Massberg S, Baumeister R, Menger MD  
In Vivo Fluorescence Microscopy for the Assessment of Microvascular Reperfusion Injury in Small Bowel Transplants in Rats  
Transplantation 58, 403-408 (1994)

Gore RW, Bohlen HG  
Microvascular pressures in rat intestinal muscle and mucosal villi  
Am J Physiol 233, 685-693 (1977)

Gotloib L, Digenis GE, Rabinovich S, Medline A, Oreopoulos DG  
Ultrastructure of normal rabbit mesentery  
Nephron 34, 248-255 (1983)

Granger DN, Kubes P  
The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion  
J Leukoc Biol 55, 662-675 (1994)

Green CJ  
Animal anesthesia  
Laboratory Animals, Ltd, London (1982)

Grisham MB  
Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease  
Lancet 344, 859-861 (1994)

Grisham MB, Jourdain D, Wink DA  
Nitric oxide  
In: Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: Implications in inflammation  
Am J Physiol 276, 315-321 (1999)

Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT  
A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes  
Proc Natl Acad Sci USA 95, 258-263 (1998)

Guslandi M, Polli D, Sorghi M, Tittobello A  
Rectal blood flow in ulcerative colitis  
Am J Gastroenterol 90, 579-580 (1995)

- Hamamoto N, Maemura K, Hirata I, Murano M, Sasaki S, Katsu K  
Inhibition of dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice by intracolonicly administered antibodies against adhesion molecules (endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) or intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1))  
*Clin Exp Immunol* 117 (3), 462-468 (1999)
- Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K  
An improved intravital microscopy system  
*Int J Microcirc Clin Exp* 17, 322 (1997)
- Haug CE, Colvin RB, Delnonico FL, Auchincloss G, Tolkoff-Rubin N, Preffer FI, Rothlein R, Norris S, Scharschmidt L, Cosimi AB  
A phase I trial of immunosuppression with anti-ICAM-1 (CD54) mAb in renal allograft recipients  
*Transplantation* 55, 766-772 (1993)
- Hawkins HP  
Natural history of ulcerative colitis and its bearing on treatment  
*Brit med J* 1, 765-770 (1909)
- Henninger DD, Panés J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN  
Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse  
*J Immunol* 158, 1825-1832 (1997)
- Heuschen UA, Hinz U, Allemeyer EH, Stern J, Lucas M, Autschbach F, Herfarth C, Heuschen G  
Backwash ileitis is strongly associated with colorectal carcinoma in ulcerative colitis  
*Gastroenterology* 120, 841-847 (2001)
- Hogaboam CM, Befus AD, Wallace JL  
Modulation of rat mast cell reactivity by IL-1 $\beta$ . Divergent effects on nitric oxide and platelet-activating factor release  
*J Immunol* 151, 3767-3774 (1993)
- Hogaboam CM, Bissonnette EY, Chin BC, Befus AD, Wallace JL  
Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells  
*Gastroenterology* 104, 122-129 (1993)
- Hollander D  
Permeability in Crohn's disease: Altered barrier functions in healthy relatives?  
*Gastroenterology* 104, 1848-1873 (1993)

Hucker HB, Zacchei AG, Cox SV, Brodie DA, Cantwell HR  
Studies on the absorption, distribution and excretion of indomethacin in various species  
J Pharmacol Exp Ther 153, 237-249 (1966)

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C et al.  
Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16  
Nature 379, 821-823 (1996)

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al.  
Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease  
Nature 411, 599-603 (2001)

Hynes R  
Integrins, versatility, modulation and signaling in cell adhesion  
Cell 69, 11-25 (1992)

Iizuka T, Tanaka T, Suematsu M, Miura S, Watanabe T, Koike R, Ishimura Y, Ishii H, Miyasaka N, Miyasaka M  
Stage-specific expression of mucosal addressin cell adhesion molecule 1 during embryogenesis in rats  
J Immunol 164, 2463-2471 (2000)

Imhof BA, Dunon D  
Basic Mechanism of Leukocyte Migration  
Horm Metab Res 29, 614-621 (1997)

Intaglietta M, Messmer K  
Technological Developments in the study of microcirculation in:  
Barker JH, Anderson GL, Menger MD  
Clinical applied microcirculation research  
CRC Press, Boca Raton, FL, 139-148 (1995)

Isaacs KL, Sartor RB, Haskill JS  
Cytokine mRNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by PCR amplification  
Gastroenterology 103, 1587-1595 (1992)

Issekutz AC, Issekutz TB  
The contribution of LFA-1 (CD11a/CD18) and MAC-1 (CD11b/CD18) to the in vivo migration of polymorphonuclear leucocytes to inflammatory reactions in the rat  
Immunology 76, 655-661 (1992)

Jacobson LF, Noer RJ  
The vascular pattern of the intestinal villi in various laboratory animals and man  
Anat Rec 114, 85-101 (1952)

- Janeway CA jr., Bottomly K  
Signals and signs for lymphocyte responses  
Cell 76, 275-285 (1994)
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM  
Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes  
Science 275, 218-220 (1997)
- Jones SC, Banks RE, Haidar A, Gearing AJH, Hemmingway IK, Ibbotson SH, Dixon MF, Axon ATR  
Adhesion molecules in inflammatory bowel disease  
Gut 36, 724-730 (1995)
- Kagnoff MF, Eckmann L  
Epithelial cells as sensors for microbial infection  
J Clin Invest 100, 6-10 (1997)
- Kavanaugh AF, Davis LS, Nichols LA, Norris SH, Rothlein R, Scharschmidt LA, Lipsky PE  
Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1  
Arthritis Rheum 37, 992-999 (1994)
- Koizumi M, King N, Lobb R, Benjamin C, Podolsky DK  
Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease  
Gastroenterology 103, 840-847 (1992)
- Konaka A, Tanaka A, Kato S, Nishijima M, Takeuchi K  
Nitric oxide, superoxide radicals and mast cells in pathogenesis of indomethacin-induced intestinal lesions in rats  
J Physiol Pharmacol 50, 25-38 (1999)
- Konaka A, Kato S, Tanaka A, Kunikata T, Korolkiewicz R, Takeuchi K  
Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats.  
Pharmacological Research 40, 517-524 (1999)
- Krieglstein CF, Anthoni C, Laukötter MG, Spiegel HU, Schürmann G  
Flußgeschwindigkeitsbestimmung an gesunder und Indomethacin-entzündeter Rattendünndarmserosa mittels FITC-markierter Erythrozyten  
Langenbecks Arch. Chir. I:209-212 (1998)

Krieglstein CF, Anthoni C, Laukötter MG, Rijcken E, Spiegel H, Senninger N, Schürmann G

Effects of anti-CD11b ( $\alpha^M$ -MAC-1) and anti-CD54 (ICAM-1) monoclonal antibodies on indomethacin induced chronic ileitis in rats  
*Int J Colorectal Dis* 14, 219-223 (1999)

Krieglstein CF, Salter JW, Cerwinka WH, Russell J, Schürmann G, Brüwer M, Laroux S, Grisham MB, Granger DN

Role of intercellular adhesion molecule 1 in indomethacin-induced ileitis  
*Biochem Biophys Res Commun* 282 (2), 635-642 (2001)

Kurose I, Wolf R, Miyasaka M, Anderson DC, Granger DN

Microvascular dysfunction induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs: role of leukocytes  
*Am J Physiol* 270, G363-G369 (1996)

Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, Kim HS, Smithies O

Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration  
*Cell* 83, 483-492 (1995)

Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V

Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years  
*Gastroenterology* 107, 3-11 (1994)

Langholz E, Nielsen OH, Munkholm P, Davidsen M, Binder V

Course and prognosis factors influencing changes in the anatomical extent of ulcerative colitis  
*Gastroenterology* 108, A857 (1995)

Lasky LA

Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response  
*Annu Rev Biochem* 64, 113-139 (1995)

Laszlo F, Whittle BJR

Role of nitric oxide and platelet-activating factor in the initiation of indomethacin-provoked intestinal inflammation in rats  
*Eur J Pharmacol* 344, 191-195 (1998)

Lehr HA, Arfors KE

Mechanisms of tissue damage by leukocytes  
*Current Opinion in Hematology* 1, 92-99 (1994)

Lenschow DJ, Su GH, Zuckermann LA

Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4  
*Proc Natl Acad Sci USA* 90, 11054-11058 (1993)

- Leung FW, Su KC, Yonei Y, Passaro E, Guth PH  
Regional differences in mucosal hemodynamics in experimental colonic injury  
in rats  
Dig Dis Sci 38, 1220-1223 (1993)
- Levinovitz A, Muhlhoff J, Isenmann S, Vestweber D  
Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells  
J Cell Biol 121, 449-459 (1993)
- Ley K, Gaehtgens P  
Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential  
leukocyte rolling in rat mesenteric venules  
Circ Res 69 (4), 1034-1041 (1991)
- Ligumsky M, Golanska EM, Hansen DG, Kauffman GL jr.  
Aspirin can inhibit gastric mucosal cyclooxygenase without causing lesions in  
rat  
Gastroenterology 84, 756-761 (1983)
- Lopez-Belmonte J, Whittle BJR, Moncada S  
The action of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the  
rat gastric mucosa  
Br J Pharmacol 108, 73-78 (1993)
- Lugea A, Antolin M, Mourelle M, Guarner F, Malagelada JR  
Deranged hydrophobic barrier of the rat gastroduodenal mucosa after parenteral  
nonsteroidal anti-inflammatory drugs  
Gastroenterology 112, 1931-1939 (1997)
- Malchow H, Scheurlen M, Daiss W, Kuester B, Schmitz-Moormann P  
Localization of Crohn's disease  
Gastroenterology 90, 1531 (1986)
- Malizia G, Calabrese A, Cottone M, Raimondo M, Trejdosiewicz T, Smart CJ,  
Oliva L, Pagliaro L  
Expression of leukocyte adhesion molecules by mononuclear phagocytes in  
inflammatory bowel disease  
Gastroenterology 100, 150-159 (1991)
- Marlin SD, Springer TA  
Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte  
function associated antigen-1 (LFA-1)  
Cell 51, 813-819 (1987)
- Martin-Henao GA, Quiroga R, Sureda A, Gonzalez JR, Moreno V, Garcia J  
L-selectin expression is low on CD34+ cells from patients with chronic myeloid  
leukemia and interferon- $\alpha$  up-regulates this expression  
Haematologica 85, 139-146 (2000)

- Marzi I, Bauer C  
Mikrozirkulationsstörungen der Leber nach hämorrhagischen Schock  
Acta Chir Austriaca Suppl 111, 18-20 (1994)
- Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC  
Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor  
Science 274, 262-265 (1996)
- Mayer L, Eisenhardt D, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L  
Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans.  
Differences between normal and inflammatory bowel disease  
Gastroenterology 100, 3-12 (1991)
- Menger MD, Marzi I, Messmer K  
In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic  
microcirculation in hamsters and rats  
Eur Surg Res 99, 158-169 (1991)
- Messmer K, Funk W, Endrich B, Zeintl H  
The perspectives of new methods in microcirculation research  
In: Messmer K (ed)  
Progress in applied microcirculation vol 6, Karger, Basel, p 77 (1984)
- Messmer K, Krombach F  
Mikrozirkulationsforschung in der experimentellen Chirurgie  
Chirurg 69, 333-338 (1998)
- Meyers S, Janowitz HD  
The „natural history“ of ulcerative colitis: an analysis of the placebo response  
J Clin Gastroenterol 11, 33-37 (1989)
- Miller DS, Rahman MA, Tanner R, Mathan VI, Baker SJ  
The vascular architecture of the different forms of small intestinal villi in the rat  
(Rattus norvegicus)  
Scand J Gastroent 4, 477-482 (1969)
- Miner PB  
Clinical features, course, laboratory findings and complications in ulcerative  
colitis. In: Kirsner JB (ed) Inflammatory bowel disease, 5<sup>th</sup> ed. Saunders,  
Philadelphia, 299-304 (2000)
- Miura S, Suematsu M, Tanaka S, Nagata H, Houzawa S, Suzuki M, Kurose I,  
Serizawa H, Tsuchiya M  
Microcirculatory disturbance in indomethacin-induced intestinal ulcer  
Am J Physiol 261, G213-219 (1991)

- Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V  
Intestinal cancer risk and mortality in patients with Crohn's disease  
*Gastroenterology* 105, 1716-1723 (1993)
- Nakamura S, Ohtani H, Watanabe Y, Fukushima K, Matsumoto T, Kitano A, Kobayashi K, Nagura  
In situ expression of the cell adhesion molecules in inflammatory bowel disease  
*Lab Invest* 69, 77-85 (1993)
- Neish AS, Read MA, Thanos D, Pine R, Maniatis T, Collins T  
Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF- $\kappa$ B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1  
*Mol Cell Biol* 15, 2558-2569 (1995)
- Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M  
Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice  
*Eur J Immunol* 27, 1743-1750 (1997)
- Nylander G, Olerud S  
The vascular pattern of an isolated jejunal loop. A microangiographic study in the rat  
*Acta chir scand* 121, 39-46 (1961)
- Ochsenkühn T, Sackmann M, Göke B  
Inflammation of the jejunum in Crohn's disease: detection by MRI-enteroclysis  
*Gastroenterology* 120, A271 (2001)
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH  
A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease  
*Nature* 411, 603-606 (2001)
- Ohashi Y, Kita S, Murakami T  
Microcirculation of the rat small intestine as studied by the injection replica scanning electron microscope method  
*Arch histol jap* 39, 271-282 (1976)
- Ohtani H, Nakamura S, Watanabe Y, Fukushima K, Mizoi T, Kimura M, Hiwatashi N, Nagura H  
Light and electron microscopic immunolocalization of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 in inflammatory bowel disease  
*Virchows Archiv A Pathol Anat* 420, 403-439 (1992)
- Olds RJ, OldsJR  
A colour atlas of the rat  
Wolfe Medical Publications Ltd, London (1979)



- Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Soerensen TIA, Binder V  
Familial occurrence of inflammatory bowel disease  
N Engl J Med 324, 84-88 (1991)
- Ostro MJ, Greenberg GR, Jeejeebhoy KN  
Total parenteral nutrition and complete bowel rest in the management of Crohn's disease  
JPEN J Parenter Enteral Nutr 9, 280-287 (1985)
- Palmen MJ, Dijkstra CD, von der Ende MB, Pena AS, von Rees EP  
Anti-CD11b/CD18 antibodies reduce inflammation in acute colitis in rats  
Clin Exp Immunol 101, 351-356 (1995)
- Panés J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, Rosenbloom CL, Miyasaka M, Kvietys PR, Granger DN  
Regional differences in constitutive and induced CD54 expression in vivo  
Am J Physiol 269, H 1955-1964 (1995)
- Panés J, Granger DN  
Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease  
Gastroenterology 114(5), 1066-90 (1998)
- Panés J, Perry M, Granger DN  
Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic interventions  
Br J Pharmacol 126(3), 537-550 (1999)
- Panés J  
Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions  
Acta Physiol Scand 173, 159-165 (2001)
- Parkin J, Cohen B  
An overview of the immune system  
Lancet 357, 1777-1789 (2001)
- Patel RT, Pall AA, Adu D, Keighley MR  
Circulating soluble adhesion molecules in inflammatory bowel disease  
Eur J Gastroenterol Hepatol 7, 1037-1041 (1995)
- Patel KD, McEver RP  
Comparison of tethering and rolling of eosinophils and neutrophils through selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1  
J Immunol 159, 4555-4565 (1997)
- Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S  
Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment  
Seminars in Immunology 14, 73-81 (2002)

- Paul LC, Davidoff A, Benediktsson H, Issekutz T  
Ani-integrin (LFA-1, VLA-4, and Mac-1) antibody treatment and acute cardiac graft rejection in the rat  
Transpl Int 9, 420-425 (1996)
- Piali L, Albelda SM, Baldwin GS, Hammel P, Gisler RH, Imhof BA  
Murine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)/CD31 modulates  $\beta$  2 integrins on lymphokine-activated killer cells  
Eur J Immunol 23, 2464-2471 (1993)
- Piali L, Hammel P, Uherek C, Bachmann F, Gisler RH, Dunon D, Imhof BA  
CD31/PECAM-1 is a ligand for  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin involved in adhesion of leukocytes endothelium  
J Cell Biol 130, 451-460 (1995)
- Picarella D, Hurlbut P, Rottman J, Shi X, Butcher E, Ringler DK  
Monoclonal antibodies specific for  $\beta$ 7 integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1) reduce inflammation in the colon of SCID mice reconstituted with CD45RB<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells  
J Immunol 158, 2099-2106 (1997)
- Picker LJ, Michie SA, Rott LS, Butcher EC  
A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites  
Am J Pathol 136, 1053-1068 (1990)
- Picker LJ, Kishimoto TK, Smith CW, Warnock RA, Butcher EC  
ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells  
Nature 349, 796-799 (1991)
- Pique JM, Whittle BJR, Moncada S  
The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the gastric microcirculation  
Eur J Pharmacol 74, 293-296 (1989)
- Pizarro TT, Michie MH, Bentz M  
IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells  
J Immunol 162, 6829-6835 (1999)
- Plevy SE, Landers CJ, Prehn J  
A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease  
J Immunol 159, 6276-6282 (1997)

Podolsky DK, Fournier DA  
Alterations in mucosal content of colonic glycoconjugates in inflammatory bowel disease defined by monoclonal antibodies  
*Gastroenterology* 95, 379-387 (1988)

Podolsky DK  
Inflammatory bowel disease  
*New Engl J Med* 347, 417-429 (2002)

Post S, Gonzales AP, Palma P, Rentsch M, Stiehl A, Menger MD  
Assessment of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat  
*Hepatology* 16, 803-809 (1992)

Post S, Menger MD, Rentsch M, Gonzales AP, Palma P, Messmer K  
New potentials of intravital fluorescence microscopy of the liver  
*Int J Microcirc Clin Exp* 11, 216 (1992)

Pouyani T, Seed B  
PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus  
*Cell* 83, 333-343 (1995)

Puri KD, Finger EB, Gaudernack G, Springer TA  
Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules  
*J Cell Biol* 131, 261-270 (1995)

Que LG, Kang BH, Huang YC, Piantadosi CA, Chang LY  
Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody and intercellular adhesion molecule-1 gene deficiency do not prevent pulmonary neutrophil recruitment in polymicrobial sepsis  
*Shock* 9, 304-309 (1998)

Rath HC, Andus T, Caesar I, Schölmerich J  
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen – Erstsymptome, extraintestinale Manifestationen und Schwangerschaftsverlauf  
*Med Klin* 93(7), 395-400 (1998)

Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Schölmerich J, Sartor RB  
Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice  
*Infect Immun* 69, 2277-2285 (2001)

Raud J, Lindbom L  
Leucocyte rolling and firm adhesion in the microcirculation  
*Gastroenterology* 104, 310-323 (1993)

- Redfern JS, Blair AJ, Lee E, Feldman M  
Gastrointestinal ulcer formation in rabbits immunized with prostaglandin E<sub>2</sub>  
*Gastroenterology* 93, 744-752 (1987)
- Riddell RH  
Pathology of idiopathic inflammatory bowel disease. In: Kirsner JB (ed)  
*Inflammatory bowel disease*, 5<sup>th</sup> ed. Saunders, Philadelphia, 427-450 (2000)
- Rijcken E, Krieglstein CF, Anthoni C, Laukötter MG, Mennigen R, Spiegel HU,  
Senninger N, Bennett CF, Schürmann G  
ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate in vivo leucocyte  
adherence and inflammation in rat inflammatory bowel disease  
*Gut* 51, 529-535 (2002)
- Robert A, Asano T  
Resistance of germfree rats to indomethacin-induced intestinal lesions  
*Prostaglandins* 14(2), 333-341 (1977)
- Robinson AP, White TM, Mason DW  
Macrophage heterogeneity in the rat as delineated by two monoclonal antibodies  
MRC OX-41 and MRC OX-42-the latter recognizing complement receptor type 3  
*Immunology* 57, 239-247 (1986)
- Roediger W  
A new hypothesis for the aetiology of Crohn's disease: Evidence from lipid  
metabolism and intestinal tuberculosis  
*Postgrad Med J* 67, 666-671 (1991)
- Romeis B  
*Mikroskopische Technik*  
Urban und Schwarzenberg, 17. Aufl, München, Wien, Baltimore (1989)
- Romer LH, McLean NV, Yan HC, Daise M, Sun J, De Lissier HM  
IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human  
endothelial cells  
*J Immunol* 154, 6582-6592 (1995)
- Rot A, Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, Schall TJ, Dahinden CA  
RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce migration and  
activation of normal human eosinophil granulocytes  
*J Exp Med* 176 (6), 1489-1495 (1992)
- Roth SJ, Carr MW, Rose SS, Springer TA  
Characterization of transendothelial chemotaxis of T lymphocytes  
*J Immunol Methods* 188 (1), 97-116 (1995)

Rutgeerts P, Boboës K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R, Vantrappen G  
Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum  
*Lancet* 338, 771-774 (1991)

Rücker W, Schrör K  
Nonsteroidal anti-inflammatory agents - pharmacokinetics, biological effects and mechanism of action  
*Med Monatsschr Pharm* 5, 105-19 (1982)

Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I  
Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene  
*Cell* 75, 253-261 (1993)

Sako D, Comess KM, Barone KM, Camphausen RT, Cumming DA, Shaw GD  
A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding  
*Cell* 83, 323-331 (1995)

Salas A, Sans M, Soriano A  
Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism  
*Gut* 47, 88-96 (2000)

Salmela K, Wramner L, Ekberg H, Hauser I, Bentdal O, Lins LE, Isoniemi H, Backman L, Persson N, Neumayer HH, Jorgensen PF, Spieker C, Hendry B, Nicholls A, Kirste G, Hasche G  
A randomised multicenter trial of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab) for the prevention of acute rejection and delayed onset of graft function in cadaveric renal transplantation: a report of the European Anti-ICAM-1 Renal Transplant Study Group  
*Transplantation* 67, 729-736 (1999)

Salmi M, Jalkanen S  
Molecules controlling lymphocyte migration to the gut  
*Gut* 45, 148-153 (1999)

Salmi M, Alanen K, Grenman S, Briskin M, Butcher EC, Jalkanen S  
Immune cell trafficking in uterus and early life is dominated by the mucosal addressin MAdCAM-1 in humans  
*Gastroenterology* 121, 853-864 (2001)

Sans M, Panes J, Ardite E, Elizalde JI, Arce Y, Elena M, Palacin A, Fernandez JC, Anderson DC, Lobb R, Pique JM  
VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis  
*Gastroenterology* 116, 874-883 (1999)

- Santucci L, Fiorucci S, Di Matteo FM  
Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  release and leukocyte margination in indomethacin-induced gastric injury in rats  
*Gastroenterology* 108, 393-401 (1995)
- Sartor RB  
Animal models of intestinal inflammation: Relevance to inflammatory bowel disease  
In: *Inflammatory Bowel Disease*  
Elsevier, New York, 337-353 (1991)
- Sartor RB, Bender DE, Holt LC  
Susceptibility of inbred rat strains to intestinal inflammation induced by indomethacin  
*Gastroenterology* 102, A690 (1992)
- Sartor RB  
Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel disease  
*Am J Gastroenterol* 92, 5S-11S (1997)
- Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, Bell JI  
Genetics of inflammatory bowel disease  
*Gut* 35, 696-700 (1994)
- Saverymuttu SH, Chadwick VS, Hodgson HJ  
Granulocyte migration in ulcerative colitis  
*Eur J Clin Invest* 15, 60-63 (1985)
- Schmid-Schönbein GW, Usami S, Skalak R, Chien S  
The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels  
*Microvasc Res* 19, 45-70 (1980)
- Schmidt H, Ebeling D, Bauer H, Bohrer H, Gebhard MM, Martin E  
Influence of the platelet-activating factor receptor antagonist BN 52021 on endotoxin-induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules  
*J Surg Res* 60, 29-35 (1996)
- Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M et al.  
Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis  
*Gastroenterology* 116, 301-309 (1999)
- Schölmerich J  
Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen – Colitis ulcerosa und Morbus Crohn  
In: Peter HH, Pfreundschu M, Philipp T, Schuster HP, Sybrecht GW (Hrsg)  
*Klinik der Gegenwart, Urban und Schwarzenberg, München, S IV, 1-44 (1996)*

Schreiber S, Heinig T, Panzer U, Reinking R, Bouchard A, Stahl PD, Raedler A  
Impaired response of activated mononuclear phagocytes to Interleukin 4 in  
inflammatory bowel disease  
Gastroenterology 108, 21-33 (1995)

Schürmann G, Aber-Bishop AE, Facer P, Lee JC, Rampton DS, Dore C, Polak J  
Altered expression of cell adhesion molecules in uninvolved gut in inflammatory  
bowel disease  
Clin Exp Immunol 94, 341-347 (1993)

Schürmann G, Bishop AE, Facer P, Vecchio M, Lee JCW, Rampton DS, Polak J  
Increased expression of cell adhesion molecule P-selectin in active inflammatory  
bowel disease  
Gut 36, 411-418 (1995)

Schürmann G  
Zelladhäsion, Molekulare Grundlagen und erste Aspekte für die Chirurgie  
Chirurg 68, 477-487 (1997)

Seibold F, Egger B, Göke B  
Neues von der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen:  
Was haben wir von Colitis-Tiermodellen gelernt?  
Schweiz Med Wocheschr 130, 749-755 (2000)

Sheffield BF, Carney MW  
Crohn's disease: a psychosomatic illness?  
Br J Psychiatry 128, 446-450 (1976)

Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van  
Blankenstein M  
Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference  
between north and south? Results of the european Collaborativ Study on  
Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)  
Gut 39 (5), 690-697 (1996)

Sitrin RG, Pan PM, Blackwood RA, Huang J, Petty HR  
Cutting edge: evidence for a signalling partnership between urokinase receptors  
(CD87) and 1-selectin (CD62L) in human polymorphonuclear neutrophils  
J Immunol 166, 4822-4825 (2001)

Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC  
Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion  
molecule 1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human  
neutrophils in vitro  
J Clin Invest 83, 2008-2017 (1989)

- Smith CW  
Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation  
Can J Physiol Pharmacol 71, 76-87 (1993)
- Smith JR, O'Rourke LM, Becker MD, Cao M, Williams KA, Planck SR, Rosenbaum JT  
Anti-rat ICAM-1 antibody does not influence the course of experimental melanin-induced uveitis  
Curr Eye Res 21, 906-912 (2000)
- Soriano A, Salas A, Salas A, Sans M, Gironella M, Elena M, Anderson DC, Piyué JM, Panés J  
VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice  
Lab Invest 80, 1541-1551 (2000)
- Stamper HB, Woodruff JJ  
Lymphocyte homing into lymph nodes: in vitro demonstration of selective affinity of recirculating lymphocytes for high endothelial venules  
J Exp Med 144, 828-833 (1976)
- Stegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher HP, Kleuser B, Vestweber D  
The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor  
Nature 373, 615-620 (1995)
- Steinhoff G, Behrend M, Schrader B, Duijvestijn AM, Wonigeit K  
Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia  
Am J Pathol 142, 481-488 (1993)
- Stewart MP, Cabanas C, Hogg N  
T cell adhesion to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is controlled by cell spreading and the activation of integrin LFA-1  
J Immunol 156, 1810-1817 (1996)
- Strauch UG, Lifka A, Gossler U, Kilshaw PJ, Clements J, Holzmann B  
Distinct binding specificities of integrins  $\alpha_4\beta_7$  (LPAM-1),  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4), and IEL  $\beta_7$   
Int Immunol 6, 263-275 (1994)
- Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze FR, Butcher EC  
A tissue-specific endothelial cell molecule involved in leukocyte homing  
Nature 331, 41-46 (1988)



Strober W, Ehrhart RO  
Chronic intestinal inflammation: An unexpected outcome in cytokine or T cell  
receptor mutant mice  
Cell 75, 203-205 (1993)

Stryer L  
Fatty acid metabolism  
In: Biochemistry, Freeman, New York, 603-628 (1995)

Swerlick RA, Lee KH, Li LJ, Sepp NT, Caughman SW, Lawley TJ  
Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular  
endothelial cells  
J Immunol 149, 698-705 (1992)

Tajra LCF, Martin X, Margonari J, Blanc-Brunat N, Ishibashi M, Vivier G,  
Steghens JP, Kawashima H, Miyasaka M, Dubernard JM, Revillard JP  
Antibody-induced modulation of the leukocyte CD11b integrin prevents mild  
but not major renal ischaemic injury  
Nephrol Dial Transplant 15, 1556-1561 (2000)

Tamatani T, Miyasaka M  
Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-  
1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1 in the adherence of  
resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells  
Int Immunol 2 (2), 165-171 (1990)

Tan TQ, Smith CW, Hawkins EP, Kaplan SL  
Anti-CD11b monoclonal antibody in an infant rat model of Haemophilus  
influenzae type b sepsis and meningitis  
J Antimicrobial Chemotherapy 39, 209-216 (1997)

Tangemann K, Bistrup A, Hemmerich S, Rosen SD  
Sulfation of a high endothelial venule-expressed ligand for L-selectin. Effects on  
tethering and rolling of Lymphocytes  
J Exp Med 190, 935-942 (1999)

Taniguchi T, Tsukada H, Nakamura H, Kodama M, Fukuda K, Saito T,  
Miyasaka M, Seino Y  
Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody on dextran sodium sulphate-  
induced colitis in rats  
J Gastroenterol Hepatol 13, 945-949 (1998)

Taub DD, Oppenheim JJ  
Chemokines, inflammation and the immune system  
Ther Immunol 1 (4), 229-246 (1994)

Taurog JD, Richardson JA, Croft JT  
The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease  
in HLA-B27 transgenic rats  
J Exp Med 180, 2359-2364 (1994)

Taylor PM, Rose ML, Yacoub MH, Pigott R  
Induction of vascular adhesion molecules during rejection of human cardiac  
allografts. Transplantation 54, 451-457 (1992)

Tirpitz, von C, Reinshagen M, Adler G  
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen  
In: Classen, Diehl, Kochsiek – Innere Medizin, 5. Auflage  
Urban & Fischer Verlag, München / Jena (2003)

Tober-Meyer B  
Vorschläge zur Narkose bei Kanninchen, Meerschweinchen und kleinen Nagern  
Kleintierpraxis 22, 335-346 (1977)

Tsuzuki Y, Miura S, Suematsu M, Kurose I, Shigematsu T, Kimura H, Higuchi  
H, Serizawa H, Yagita H, Okumura K, Ishii H  
 $\alpha 4$  integrin plays a critical role in early stages of T lymphocyte migration in  
Peyer's patches of rats  
Int Immunol 8, 287-295 (1996)

Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Floderu-Myrhed B  
Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic  
and dizygotic twins: a study of heritability and the influence of smoking  
Gut 29, 990-996 (1988)

Van der Gulden WJI, Van Hooijdonk CL, De Jong P, Kremer AK  
Versuchstiere und Versuchstieretechnik  
Veröffentlichungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde 5, Basel (1975)

Van de Stolpe A, van der Saag PT  
Intercellular adhesion molecule 1  
J Mol Med 74, 13-33 (1996)

Van de Wiel-van Kemenade E, van Kooyk Y, de Boer AJ, Huijbens RJ, Weder  
P, van de Kastele W, Melief CJ, Figdor CG  
Adhesion of T and B lymphocytes to extracellular matrix and endothelial cells  
can be regulated through the  $\beta$  subunit of VLA  
J Cell Biol 117, 461-470 (1992)

Varani J, Ginsburg I, Schuger L, Gibbs DF, Bromberg J, Johnson KJ, Ryan US,  
Ward PA  
Endothelial cell killing by neutrophils – Synergistic interaction of oxygen  
products and proteases  
Am J Pathol 135, 435-438 (1989)

- Varki A  
Selectin ligands: will the real ones please stand up?  
J Clin Invest 99, 158-162 (1997)
- Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM  
A monoclonal antibody to the adherence-promoting leucocyte glycoprotein, CD18, reduces organ injury and improves survival from hemorrhagic shock in rabbits  
J Clin Invest 81, 939-944 (1988)
- Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM  
Inhibition of leukocyte adherence by anti CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in rabbit ear  
Proc Natl Sci USA 87, 2643-2646 (1990)
- Vilaseca J, Salas A, Guarner F, Rodriguez R, Malagelda JR  
Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis  
Gastroenterology 98, 269-277 (1990)
- Vogt C, Vogel A, Holliger C, Radzyner M, Anliker M, Knoblauch M  
The microcirculatory system of the jejunal villus of the rat. Correlation of intravital microscopy, injection casts and electron microscopy  
Bibliotheca anat Karger, Basel 20, 69-70 (1981)
- Wakefield AJ, Sawyerr AM, Dhillon AP, Pittilo RM, Rowles PM, Lewis AAM, Pounder RE  
Pathogenesis of Crohn's disease: multifocal gastrointestinal infarction  
Lancet 334, 1057-1062 (1989)
- Wakelin MW, Sanz MJ, Dewar A, Albelda SM, Larkin SW, Boughton-Smith N, Williams TJ, Nourshargh S  
An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane  
J Exp Med 184, 229-239 (1996)
- Walcheck B, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK  
Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro  
J Clin Invest 98, 1081-1087 (1996)
- Wallace JL, Arffors KE, McKnight GW  
A monoclonal antibody against the CD18 leukocyte adhesion molecule prevents indomethacin induced gastric damage in the rabbit  
Gastroenterology 100, 878-883 (1991)

Wallace JL, Higa A, McKnight GW, MacIntyre DE  
Prevention and reversal of experimental colitis by a monoclonal antibody which inhibits leukocyte adherence  
Inflammation 16 (4), 343-354 (1992)

Warnock RA, Askari S, Butcher EC, et al.  
Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes  
J Exp Med 187, 205-216 (1998)

Warwick R, Williams PL  
Grays anatomy  
WB Saunders company, 35<sup>th</sup> ed, Philadelphia (1973)

Weiss SJ  
Tissue destruction by neutrophils  
N Engl J Med 320, 365-376 (1989)

Whitcup SM, Chan CC, Kozhich AT, Magone MT  
Blocking ICAM-1 (CD54) and LFA-1 (CD11a) inhibits experimental allergic conjunctivitis  
Clin Immunol 93, 107-113 (1999)

Whittle BJR  
Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat  
Gastroenterology 80, 94-98 (1981)

Whittle BJR, Lazlo F, Evans AM, Moncada S  
Inducible nitric oxide synthase and microvascular injury in the rat jejunum provoked by indomethacin  
Br J Pharmacol 116, 2286-90 (1995)

Winne D  
The vasculature of the jejunal villus  
Excerpta Med Int Congr Ser 391, 56-57 (1973)

Wong K, Freund F  
Inhibition of n-formylmethionyl-leucylphenylalanine induced respiratory burst in human neutrophils by adrenergic agonists and prostaglandins of the E series  
Can J Physiol Pharmacol 59, 915-920 (1981)

Wyatt J, Vogelsang H, Hubl W, Walshoer T, Lochs H  
Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease  
Lancet 341, 1437-1439 (1993)

Yacyshyn BR, Bowen-Yacyshyn MB, Jewell L, Tami JA, Bennett CF, Kisner DL, Shanahan WR

A placebo controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease

Gastroenterology 114, 1133-1142 (1998)

Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB

Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin Inflammation 17, 641-662 (1993)

Yamazaki T, Seko Y, Tamatani T

Expression of intercellular adhesion molecule-1 in rat heart with ischemia/reperfusion and limitation of infarct size treatment with antibodies against cell adhesion molecules

Am J Pathol 143, 410-418 (1993)

Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI

Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: Differences between jews and non-jews

Gut 34, 517-524 (1993)

Yang H, Rotter J, Toyoda H, Landers C, Tyan D, McElree C, Targan S

Ulcerative colitis: a genetically heterogeneous disorder defined by genetic (HLA Class II) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers

J Clin Invest 92, 1080-1084 (1993)

Yasuhiro T, Ukawa H, Kato S, Takeuchi K

Involvement of nitric oxide (NO) and inducible NO synthase in the pathogenesis of inflammatory gastric lesions induced by compound 48/80 in rats

J Physiol (Paris) 91, 131-138 (1997)

Zahler S, Kupatt C, Becker BF

Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF-alpha

FASEB J 14 (3), 555-564 (2000)

Zeni F, Parent C, Correa R, Natanson C, Freeman B, Fontana J, Quezado M, Danner RL, Fitz Y, Richmond S, Gerstenberger E, Banks SM, Eichacker PQ

ICAM-1 and CD11b inhibition worsen outcome in rats with E. coli pneumonia

J Appl Physiol 87, 299-307 (1999)

Zimmerhackl B, Parekh N, Brinkhus H, Steinhausen M

The use of fluorescent labelled erythrocytes for intravital investigation of flow and local hematocrit in glomerular capillaries in the rat

Int J Microcirc 2, 119-129 (1983)

Zimmerman GA, Kubes P, Granger ND  
A model of acute intestinal inflammation  
In: Snape WJ, Collins S (Hrsg.): Effects of immune cells and inflammation on  
smooth muscle and enteric nerves  
CRC Press Inc, New York, 327-337 (1991)

Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre M  
Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signalling  
molecules  
Immunol Today 13, 93-100 (1992)

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Mike Georg Laukötter  
Geburtsdatum 07.08.1972  
Geburtsort Metelen  
Nationalität deutsch  
Konfession röm.-katholisch

### Schulbildung

1979 – 1983 St. Vitus-Grundschule, Metelen  
1983 – 1992 Städt. Gymnasium, Ochtrup

### Zivildienst

01.07.'92 – 30.09.'93 St. Marien-Hospital, Ahaus

### Studium

1993-2000 Studium der Humanmedizin an der WWU-Münster  
09 / 1995 Physikum  
08 / 1996 Erstes Staatsexamen  
04 / 1999 Zweites Staatsexamen  
05 / 2000 Drittes Staatsexamen

### Klinische Ausbildung

29.02.-30.03.1996 **Innere Medizin** (WHO Collaborating Centre for Traditional Medicine / China Academy for Traditional Chinese Medicine, Peking, China)

04.08.-05.10.1997 **Allgemeine Chirurgie** (WWU – Münster)  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
Prof. Dr. med. N. Senninger, FACS

01.03.-31.03.1998 **Abdominal Organ Transplantation** (Houston – USA)  
University of Texas / Division of Immunology and Organ Transplantation  
Barry D. Kahan, MD, PhD / Carlos Emparan, MD, PhD

01.04.-30.04.1998 **Cardiovascular Surgery** (Houston – USA)  
Surgical Associates of Texas, P.A. / Texas Heart Institute  
Denton A. Cooley, MD, FACS, FACC, FCCP

03.08.-20.09.1998 **Allgemeine Chirurgie** (WWU – Münster)  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
Prof. Dr. med. N. Senninger, FACS

- 19.04.-08.08.1999      **Innere Medizin** (WWU – Münster)  
Med. Klinik B / Gastroenterologie  
Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Domschke, FACG, FRCG (Lond.)
- 09.08.-28.11.1999      **Anesthesiology** (New Orleans - USA)  
Department of Anesthesiology  
Tulane University School of Medicine  
Yoogoo Kang, MD, Merryl and Sam Israel Professor
- 29.11.-19.03.2000      **Cardiovascular Surgery** (Houston - USA)  
Surgical Associates of Texas, P.A. / Texas Heart Institute  
Denton A. Cooley, MD, FACS, FACC, FCCP
- 01.07.`00 - 31.12.`01      AiP – Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie–UKM
- seit dem 01.01.2002      Wissenschaftl. Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für  
Allgemeine Chirurgie – Universitätsklinikum, Münster
- 31.01.2003              Fachkunde Rettungsdienst

### Wissenschaftliche Ausbildung

- Seit 11 / 1996              Mitarbeit und Durchführung mehrerer Projekte zur  
intravitalmikroskopischen Untersuchung und Blockade der  
intestinalen Zelladhäsion in CED - Tiermodellen

### Originalpublikationen, publizierte Vorträge, Buchbeiträge

- 1.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Schürmann G  
Measuring blood flow velocity in healthy and indomethacin-induced inflammation  
in rat small intestine serosa with FITC-marked erythrocytes  
Langenbecks Arch Chir 115 (I), 209-212 (1998)
- 2.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Schmid  
KW, Schürmann G  
In vivo Untersuchung zur Beeinflussung der Leukozytenadhärenz durch Antikörper  
gegen Mac-1 und ICAM-1 im Indomethacin Rattenmodell chronisch entzündlicher  
Darmerkrankungen  
Langenbecks Arch Chir (I), 439-442 (1999)
- 3.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Rijcken E, Spiegel HU, Senninger N,  
Schürmann  
Effects of anti-CD11b ( $\alpha^M$ -MAC-1) and anti-CD54 (ICAM-1) monoclonal  
antibodies on indomethacin induced chronic ileitis in rats  
Int J Colorectal Dis 14, 219-223 (1999)



- 4.) Krieglstein CF, Anthoni C, Rijcken E, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Boden SE, Schweizer S, Safayhi H, Senninger N, Schürmann G  
Acetyl-11-keto- $\beta$ -boswellic acid, a constituent of a herbal medicine from *Boswellia serrata* resin, attenuates experimental ileitis  
Int J Colorectal Dis 16, 88-95 (2001)
- 5.) Rijcken E, Anthoni C, **Laukötter MG**, Schürmann G  
Supprimierung der Leukozytenadhäsion und der intestinalen Entzündung durch einen Endothelinrezeptor-Antagonisten im DSS-Maus-Modell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen  
Lang Arch Chir 30 (I), 187-189 (2001)
- 6.) Rijcken E, Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Bennett CF, Schürmann G  
ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate in vivo leukocyte adherence and inflammation in rat inflammatory bowel disease  
Gut 51, 529-535 (2002)
- 7.) Anthoni C, Rijcken E, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Schürmann G, Krieglstein CF  
Submucosal collecting venules: A reliable site for intestinal intravital microscopy in rats  
J Invest Surg 15, 259-267 (2002)
- 8.) **Laukötter MG**, Rijcken E, Anthoni C, Meier S, Vestweber D, Senninger N, Schürmann G, Krieglstein CF  
Antikörperblockade von VLA-4 beeinflusst die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und wirkt entzündungshemmend im DSS-Mausmodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen  
Lang Arch Chir (I), 157-159 (2002)
- 9.) Brüwer M, Krieglstein CF, Utech M, Bode M, Rijcken E, Anthoni C, **Laukötter MG**, Schürmann G, Senninger N  
Is colonoscopy alone sufficient to screen for ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma?  
World J Surg 27 (5), 611-615 (2003)
- 10.) Empanan C, Wolters H, **Laukötter MG**, Dame C, Senninger N  
Cost-effectiveness analysis of basiliximab induction and calcineurin-sparing protocols in "old to old" programs using Markov models  
Transplant Proc 35 (4), 1324-1325 (2003)
- 11.) Empanan C, **Laukötter MG**, Wolters H, Dame C, Heidenreich S, Senninger N  
Calcineurin-free protocols with basiliximab induction allow patients included in "old to old" programs achieve standard kidney transplant function  
Transplant Proc 35 (4), 1326-1327 (2003)

- 12.) **Laukötter MG**, Wolters H, Dame C, Emparan C, Senninger N, Krieglstein CF  
Induktionstherapie mit einem Interleukin-2-Rezeptorantagonisten bei der Nierentransplantation im Eurotransplant „Old-For-Old“-Programm  
Transplantationsmedizin (Supp), 20 (2003)
- 13.) Brüwer M, Utech M, Rijcken E, Anthoni C, **Laukötter MG**, Kersting S, Senninger N, Krieglstein CF  
Preoperative steroid administration: effect on morbidity among patients undergoing intestinal bowel resection for Crohn's disease  
World J Surg 27 (12), 1306-1310 (2003)
- 14.) Rijcken EM, **Laukötter MG**, Anthoni C, Meier S, Mennigen R, Spiegel HU, Brüwer M, Senninger N, Vestweber D, Krieglstein CF  
Immunoblockade of PSGL-1 attenuates established experimental murine colitis by reduction of leukocyte rolling  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol (in press – Epub ahead of print) (2004)
- (The first two authors -Rijcken EM and **Laukötter MG**- contributed equally to this work)

#### **Publizierte Abstracts (zitierfähig)**

- 1.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Schmid KW, Senninger N, Schürmann G  
Anti-CD11b (LFA-1) blockt die Indomethacin-induzierte Rattenileitis –  
Intravitalmikroskopische Messungen der intestinalen Mikrozirkulation  
Z Gastroenterol 36, 728 (1998)
- 2.) Schürmann G, Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Schmid KW, Senninger N  
Cell adhesion molecules CD11b but not CD54 mediate leukocyte adhesion in experimental inflammatory bowel disease (IBD)  
Dis Co Rect 42 (4), A45-46 (1999)
- 3.) Schürmann G, Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Schmid KW, Senninger N  
The contribution of CD11b and CD54 to the sequestration of circulating leukocytes in intestinal inflammation  
Gastroenterology 114 (4), G3539 (1999)
- 4.) Krieglstein CF, Schürmann G, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Schmid KW, Senninger N  
The effect of boswellic acids on the intestinal inflammation in a rat model of IBD  
Gastroenterology 114 (4), G3270 (1999)

- 5.) Schürmann G, Rijcken E, Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Condon TP, Senninger N  
ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate leukocyte adhesion and inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease  
Gastroenterology 118(4), A577 (2000)
- 6.) Anthoni C, Krieglstein CF, Rijcken E, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Schürmann G  
Endothelin receptor antagonist bosentan attenuates leukocyte-endothelial adhesion and inflammation in a rat model of IBD  
Gastroenterology 118(4), A570 (2000)
- 7.) Anthoni C, Krieglstein CF, Rijcken E, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Schürmann G  
Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan vermindert die in vivo Leukozytenadhärenz im Tiermodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen  
Z Gastroenterol 38:672, A54 (2000)
- 8.) Rijcken EM, Anthoni C, **Laukötter MG**, Mennigen RB, Meier S, Krieglstein CF, Spiegel HU, Senninger N, Schürmann G  
Blockade of endothelin-receptors ameliorates in vivo leukocyte adhesion and inflammation in murine DSS-colitis  
Gastroenterology 120 (5), A689 (2001)
- 9.) Rijcken EM, **Laukötter MG**, Anthoni C, Krieglstein CF, Mennigen R, Meier S, Spiegel HU, Senninger N, Vestweber D, Schürmann G  
Anti-PSGL-1 ameliorates colitis by reduction of leukocyte rolling in a murine model of inflammatory bowel disease  
Proceedings for the 56<sup>th</sup> Annual Sessions of the Owen H. Wangensteen Surgical Forum, 87<sup>th</sup> clinical congress (II), 59-60 (2001)
- 10.) **Laukötter MG**, Rijcken EM, Anthoni C, Krieglstein CF, Meier S, Mennigen R, Spiegel HU, Vestweber D, Senninger N, Schürmann G  
PSGL-1 Antikörperblockade beeinflusst die DSS-induzierte Colitis durch Reduktion des Leukozyten-Rollings  
Z Gastroenterol 39, 623 (2001)
- 11.) Rijcken E, **Laukötter MG**, Anthoni C, Meier S, Mennigen R, Spiegel HU, Senninger N, Schürmann G, Vestweber D, Krieglstein CF  
Anti-PSGL-1 ameliorates experimental murine colitis by reduction of leukocyte rolling.  
Gastroenterology 122 (4), T966 (2002)

---

**Vorträge, Poster****a) Vorträge**

- 1.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Senninger N, Schürmann G  
Intravitalmikroskopische Messung der intestinalen Mikrozirkulation  
Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft Chronisch Entzündlicher  
Darmerkrankungen (DACED) – Mainz, 05.-06. 06. 1998
- 2.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Schürmann G  
Flußgeschwindigkeitsbestimmung an gesunder und Indomethacin-entzündeter  
Rattendünndarmserosa mittels FITC-markierter Erythrozyten  
115. Kongreß, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie – Berlin, 28.04.-02.05. 1998
- 3.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Schmid  
KW, Schürmann G  
In vivo Untersuchung zur Beeinflussung der Leukozytenadhärenz durch Antikörper  
gegen Mac-1 und ICAM-1 im Indomethacin Rattenmodell chronisch-entzündlicher  
Darmerkrankungen  
116. Kongreß, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie – München, 06.-09.04. 1999
- 4.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Schmid  
KW, Schürmann G  
Novel localisation of intravital microscopy for the study of intestinal  
microcirculation  
International Surgical Week (ISW) – Wien, 15.-20.08. 1999
- 5.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Schmid  
KW, Schürmann G  
The contribution of CD11b and CD54 to the sequestration of circulating leukocytes  
in intestinal inflammation  
85<sup>th</sup> Clinical Congress of the American College of Surgeons, Surgical Forum, San  
Francisco, 10.-15.10. 1999
- 6.) Rijcken E, Anthoni C, Krieglstein CF, **Laukötter MG**, Mennigen R, Spiegel HU,  
Senninger N, Bennett CF, Schürmann G  
Einsatz von Antisense Oligonukleotiden gegen ICAM-1 und VCAM-1 im CED-  
Tiermodell: eine intravitalmikroskopische Studie  
Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für chronisch entzündliche  
Darmerkrankungen (DACED) – Mainz, 30.06.-01.07. 2000
- 7.) Rijcken E, Anthoni C, **Laukötter MG**, Schürmann G  
Supprimierung der Leukozytenadhäsion und der intestinalen Entzündung durch  
einen Endothelinrezeptor-Antagonisten im DSS-Modell chronisch entzündlicher  
Darmerkrankungen  
118. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie - München, 01.-05.05.  
2001

- 8.) Anthoni C, Krieglstein CF, Rijcken E, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senningr N, Schürmann G  
Endothelin-Rezeptor-Antagonist Bosentan vermindert die in vivo Leukozytenadhärenz im Tiermodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen  
55. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – Hamburg, 13.-16.09. 2000
- 9.) Rijcken E, **Laukötter MG**, Anthoni C, Meier S, Mennigen R, Spiegel HU, Schürmann G, Vestweber D, Krieglstein CF  
PSGL-1 Antikörperblockade beeinflusst die DSS-Colitis durch Reduktion des Leukozyten-Rollings  
Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (DACED) – Mainz, 29-30.06. 2001
- 10.) **Laukötter MG**, Rijcken E, Anthoni C, Krieglstein CF, Meier S, Mennigen R, Spiegel HU, Vestweber D, Senninger N, Schürmann G  
PSGL-1 Antikörperblockade beeinflusst die DSS-induzierte Colitis durch Reduktion des Leukozyten-Rollings  
56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) - Münster, 12.-15.09. 2001
- 11.) Rijcken E, **Laukötter MG**, Anthoni C, Krieglstein CF, Mennigen R, Meier S, Spiegel HU, Senninger N, Vestweber D, Schürmann G:  
Anti-PSGL-1 ameliorates colitis by reduction of leukocyte rolling in a murine model of inflammatory bowel disease  
Owen Wangenstein Surgical Forum, American College of Surgeons Clinical Congress -New Orleans, LA, USA, 10.10. 2001
- 12.) **Laukötter MG**, Rijcken E, Anthoni C, Meier S, Vestweber D, Senninger N, Schürmann G, Krieglstein CF  
Antikörperblockade von VLA-4 beeinflusst die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und wirkt entzündungshemmend im DSS\_Mausmodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen  
119. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie – Berlin, 07.-10.05. 2002
- 13.) **Laukötter MG**, Hausberg M  
Bluthochdruck und Fettstoffwechsel  
6. Arzt-Patienten-Seminar „Nierentransplantation-Lebendspende-Risikofaktoren“ – Münster, 02.11. 2002
- 14.) **Laukötter MG**, August C  
Frühe Transplantatbiopsien: Regel oder Sonderfall  
14. Münsteraner Symposium: Was gibt es Neues in der Nierentransplantation? – Münster, 29.03. 2003
- 15.) **Laukötter MG**, Diller R, Kempkes M  
7. Arzt-Patienten-Seminar „Viruserkrankungen im Rahmen der Transplantation – Münster, 27.09. 2003

- 16.) **Laukötter MG**, Wolters H, Dame C, Emparan C, Senninger N, Krieglstein CF  
Induktionstherapie mit einem Interleukin-2-Rezeptorantagonisten bei der  
Nierentransplantation im Eurotransplant „Old-For-Old“-Programm  
12. Jahrestagung der Deutschen Transplantations-Gesellschaft (DTG) -  
Münster, 02.-04.10. 2003

**b) Poster**

- 1.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Schmid KW, Schürmann G  
Serosal microcirculation in normal and chronically inflamed small bowel in rats:  
FITC-labelled red blood cells  
XXXIIIrd Congress of the European Society for Surgical Research - Padua/Italy,  
22.-25.05. 1998
- 2.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Schmid KW, Senninger N, Schürmann G  
Anti-CD11b (LFA-1) blockt die Indomethacin-Rattenileitis –  
Intravitalmikroskopische Messungen der intestinalen Mikrozirkulation  
53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und  
Stoffwechselkrankheiten (DGVS) – Kiel, 02.-05.09. 1998
- 3.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Schmid KW, Schürmann G  
The contribution of CD11b and CD54 to the sequestration of circulating leukocytes  
in intestinal inflammation  
AGA Annual Meeting - Orlando, 16.-19.05 1999
- 4.) Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Schmid KW, Schürmann G  
The effect of boswellic acids on the intestinal inflammation in a rat model of IBD  
AGA Annual Meeting - Orlando, 16.-19.05 1999
- 5.) Krieglstein CF, Anthoni C, Rijcken E, **Laukötter MG**, Spiegel HU, Senninger N, Schürmann G, Münster, Safayhi H, Tübingen  
Boswelliasäuren beeinflussen die Leukozyten / Endothelzellinteraktion im  
Tiermodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED)  
54. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und  
Stoffwechselkrankheiten (DGVS) - Leipzig, 22-25.09 1999
- 6.) Schürmann G, Rijcken E, Krieglstein CF, Anthoni C, **Laukötter MG**, Spiegel H, Condon TP, Senninger N  
ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate leukocyte adhesion and  
inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease  
Digestive Disease Week - San Diego, USA, 21.-24.05. 2000

- 
- 7.) Anthoni C, Krieglstein CF, Rijcken E, **Laukötter MG**, Mennigen R, Spiegel HU, Senninger N, Schürmann G  
Endothelin receptor antagonist bosentan attenuates leukocyte-endothelial adhesion and inflammation in a rat model of IBD  
Digestive Disease Week / American Gastroenterological Association - San Diego, USA, 21.-24.05. 2000
  - 8.) Rijcken EM, Anthoni C, **Laukötter MG**, Mennigen RB, Meier S, Krieglstein CF, Spiegel HU, Senninger N, Schürmann G  
Blockade of endothelin-receptors ameliorates in vivo leukocyte adhesion and inflammation in murine DSS-colitis  
Digestive Disease Week / American Gastroenterological Association - Atlanta, USA, 20.-23.05. 2001
  - 9.) Anthoni C, Brüwer M, Rijcken EM, **Laukötter MG**, Schürmann G, Senninger N, Krieglstein CF  
Wie zuverlässig ist die Koloskopie als Screening-Untersuchung für ein Colitis ulcerosa assoziiertes Karzinom?  
119. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie - Berlin, 07.-10.05. 2002
  - 10.) Rijcken E, **Laukötter MG**, Anthoni C, Meier S, Mennigen R, Spiegel HU, Senninger N, Schürmann G, Vestweber D, Krieglstein CF  
Anti-PSGL-1 ameliorates experimental murine colitis by reduction of leukocyte rolling  
Digestive Disease Week / American Gastroenterological Association - San Fransisco, USA, 18.-22.05. 2002
  - 11.) **Laukötter MG**, Rijcken E, Brüwer M, Senninger N, Krieglstein CF  
Inzidenz von Morbus Crohn-assoziierten Karzinomen in einer chirurgischen Universitätsklinik  
6. Chirurgische Forschungstage - Köln, 28.-30.11. 2002

## 11. Nachwort

Diese Dissertation wäre ohne die Förderung und Unterstützung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. C.F. Krieglstein, Prof. Dr. med. G. Schürmann und Prof. Dr. med. N. Senninger nicht möglich gewesen. Für die Überlassung der Thematik, ihr Vertrauen, ihr Engagement und persönlichen Rat sowie die Energie, mit der ich kontinuierlich betreut wurde, möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Wissenschaftliche Untersuchungen sind keine Einzelleistungen, sondern basieren auf gemeinsamen Anstrengungen. Den Kollegen der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, insbesondere den Kollegen aus der CED-Gruppe, die direkt oder indirekt an den verschiedenen Versuchsdurchführungen beteiligt waren, möchte ich daher für ihre wertvolle Unterstützung und Zusammenarbeit danken.

Die gute Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Abteilung Chirurgische Forschung, insbesondere mit Prof. Dr. med. H.U. Spiegel, war eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg dieser tierexperimentellen Studie. Ich danke für die vielen Diskussionen über wissenschaftliche und technische Probleme sowie die zuverlässige Hilfe bei der Analyse und Bewertung von Ergebnissen. Die Durchführung dieser Studie wäre ohne die bereitgestellte Infrastruktur der Chirurgischen Forschung so nicht möglich gewesen.

Meiner damaligen Freundin und heutigen Frau Susanne danke ich für ihre Liebe. Ich danke für ihre andauernde Geduld und ihr Verständnis.

Meinen Eltern danke ich für ihre Liebe und ihre kompromißlose Unterstützung aller meiner Pläne und Ziele.