

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

Der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan reduziert die Leukozyten-  
Endothel-Interaktion und die Aktivität chronisch entzündlicher  
Darmerkrankungen  
- Eine tierexperimentelle intravitalmikroskopische Studie -

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms – Universität Münster

vorgelegt von Rudolf Mennigen

aus Gronau

2004

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

Dekan: Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. P. Zimmer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Schürmann, FACS

Tag der mündlichen Prüfung: 23.08.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
- Direktor: Prof. Dr. N. Senninger –  
Referent: Prof. Dr. K. P. Zimmer  
Koreferent: Prof. Dr. G. Schürmann, FACS

### **Zusammenfassung**

Der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan reduziert die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Aktivität chronisch entzündlicher Darmerkrankungen  
– eine tierexperimentelle intravitalmikroskopische Studie -  
Mennigen, Rudolf

**Einleitung:** Endotheline fördern die Adhäsion zirkulierender Leukozyten an venöses Endothel. Diese Adhäsion ist ein initialer Schritt in der Entstehung des entzündlichen Zellinfiltrates bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn und Colitis ulcerosa). Die Wirkung des Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Aktivität einer Dextran-Sodium-Sulfat (DSS) - induzierten Colitis der Maus wurde untersucht.

**Material/Methode:** 30 Balb/c Mäuse wurden in drei Versuchsgruppen à 10 Tiere aufgeteilt (Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen durch die Bezirksregierung Münster: Aktenzeichen G31/2000 vom 12.5.2000): unbehandelte gesunde Tiere, Tiere mit induzierter Colitis (zyklische Verabreichung von DSS 3% w/v im Trinkwasser über 30 Tage zur Induktion einer chronischen Colitis) und Tiere mit induzierter Colitis und zusätzlicher Bosentan-Therapie (Colitisinduktion wie oben, Behandlung mit Bosentan 30 mg/kg KG ip. täglich an Tag 26-30). An Tag 30 wurde intravitalmikroskopisch die Anzahl permanent adhärenter Leukozyten, rollender Leukozyten sowie deren Geschwindigkeit in submukosalen Venolen des Colons ermittelt. Die histologische und klinische Entzündungsaktivität wurden jeweils mit einem Score quantifiziert.

**Ergebnisse:** Im Vergleich zu gesunden Tieren zeigten colitisinduzierte Tiere eine deutliche klinische und histologische Entzündungsaktivität ( $16.6 \pm 0.9$  vs.  $1.8 \pm 0.1$  Punkte,  $p < 0.05$ ), sowie eine massiv erhöhte Zahl rollender ( $67.1 \pm 9.5$  vs.  $25.0 \pm 3.5$  rollende Zellen/30sec/100 $\mu$ m Gefäßdurchmesser,  $p < 0.05$ ) und fest adhärenter ( $23.7 \pm 2.8$  vs.  $0.6 \pm 0.1$  adhärenzte Zellen/0.01 mm<sup>2</sup>,  $p < 0.05$ ) Leukozyten. Colitisinduzierte Tiere mit Bosentantherapie zeigten gegenüber den unbehandelten colitisinduzierten Tieren eine geringere klinische ( $2.4 \pm 0.4$  vs.  $5.2 \pm 0.5$  Punkte,  $p < 0.05$ ) und histologische Entzündung ( $9.6 \pm 0.7$  vs.  $16.6 \pm 0.9$  Punkte,  $p < 0.05$ ). Die Zahl fest adhärenter Leukozyten war unter Bosentantherapie deutlich niedriger ( $1.2 \pm 0.3$  vs.  $23.7 \pm 2.8$  adhärenzte Zellen/0.01mm<sup>2</sup>,  $p < 0.05$ ). Die Zahl rollender Leukozyten war nicht unterschiedlich ( $95.0 \pm 7.9$  vs.  $67.1 \pm 9.5$  rollende Zellen/30sec/100 $\mu$ m Gefäßdurchmesser, N.S.), ihre Rollgeschwindigkeit jedoch erheblich höher ( $91.5 \pm 14.0$  vs.  $19.0 \pm 1.6$   $\mu$ m/sec,  $p < 0.05$ ).

**Schlussfolgerungen:** Der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan reduziert die Leukozytenadhärenz und die Entzündung in der murinen DSS-Colitis. Durch eine Blockade des entzündlichen Zellinfiltrats könnte Bosentan somit auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen therapeutisch wirksam sein.

Meiner Frau Birgit in Dankbarkeit.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG UND HINTERGRUND</b>	<b>3</b>
<b>1.1. CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN</b>	<b>3</b>
<b>1.2. ENDOTHELIN: MULTIFUNKTIONALE MEDIATOREN</b>	<b>11</b>
1.2.1. <i>Endotheline und ihre Rezeptoren: Physiologie und Pathophysiologie</i>	11
1.2.2. <i>Rolle der Endotheline in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen</i>	15
1.2.3. <i>Der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan</i>	16
<b>1.3. ZELLADHÄSION</b>	<b>18</b>
1.3.1. <i>Physiologie der Leukozytenadhäsion</i>	18
1.3.2. <i>Leukozyten-Endothel-Interaktion als initialer Schritt der Entzündungspathogenese</i>	23
1.3.3. <i>Endotheline und Zelladhäsion</i>	26
1.3.4. <i>Intravitalmikroskopie</i>	30
<b>1.4. DIE DEXTRAN SODIUM SULFAT (DSS) - INDUZIERTER COLITIS DER MAUS</b>	<b>31</b>
<b>1.5. ZUSAMMENFASSUNG UND FRAGESTELLUNG</b>	<b>36</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODE</b>	<b>39</b>
<b>2.1. VERSUCHSTIERE</b>	<b>39</b>
<b>2.2. VERSUCHSGRUPPEN</b>	<b>39</b>
2.2.1. <i>Gesunde Kontrolle</i>	39
2.2.2. <i>Colitis</i>	40
2.2.3. <i>Colitis + Bosentan-Therapie</i>	40
<b>2.3. COLITIS - INDUKTION</b>	<b>40</b>
<b>2.4. THERAPIE MIT DEM ENDOTHELIN-REZEPTORANTAGONISTEN BOSENTAN</b>	<b>41</b>
<b>2.5. KLINISCHER DISEASE ACTIVITY INDEX</b>	<b>42</b>
<b>2.6. INTRAVITALMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER LEUKOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION IM COLON</b>	<b>42</b>
2.6.1. <i>Perioperatives Management</i>	43
2.6.2. <i>Zellmarkierung</i>	44
2.6.3. <i>Intravitalmikroskopie des Colons</i>	46
<b>2.7. AUSWERTUNG DER INTRAVITALMIKROSKOPIE</b>	<b>50</b>
2.7.1. <i>Mikrozirkulatorische Parameter</i>	51
2.7.2. <i>Leukozyten-Endothel-Interaktion</i>	52
<b>2.8. HISTOLOGIE</b>	<b>53</b>
2.8.1. <i>Asservierung des Colons für die histologische Untersuchung</i>	53
2.8.2. <i>Histologischer Colitis-Score</i>	54
<b>2.9. STATISTISCHE METHODEN</b>	<b>55</b>

---

<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
<b>3.1. KLINISCHER DISEASE ACTIVITY INDEX</b>	<b>57</b>
<b>3.2. HISTOLOGIE</b>	<b>58</b>
3.2.1. <i>Morphologie</i>	58
3.2.2. <i>Histologischer Colitis-Score</i>	61
<b>3.3. KORRELATION HISTOLOGISCHER COLITIS-SCORE MIT DISEASE ACTIVITY INDEX</b>	<b>63</b>
<b>3.4. LEUKOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION IN SUBMUKOSALEN VENOLEN DES COLONS</b>	<b>64</b>
3.4.1. <i>Hämodynamische Parameter</i>	64
3.4.2. <i>Rollende Leukozyten</i>	65
3.4.3. <i>Geschwindigkeit rollender Leukozyten</i>	66
3.4.4. <i>Permanent adhärente Leukozyten</i>	67
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>68</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>78</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>80</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>92</b>

## 1. Einleitung und Hintergrund

### 1.1. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), mit den Krankheitsentitäten Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU), sind definiert als chronische, rezidivierende intestinale Entzündungen unklaren Ursprungs. In bis zu 20% der Fälle sind MC und CU diagnostisch nicht zu unterscheiden (36, 74), was für eine Verwandtschaft der Erkrankungen spricht. Diese Fälle werden mitunter auch als „indeterminierte Colitis“ bezeichnet.

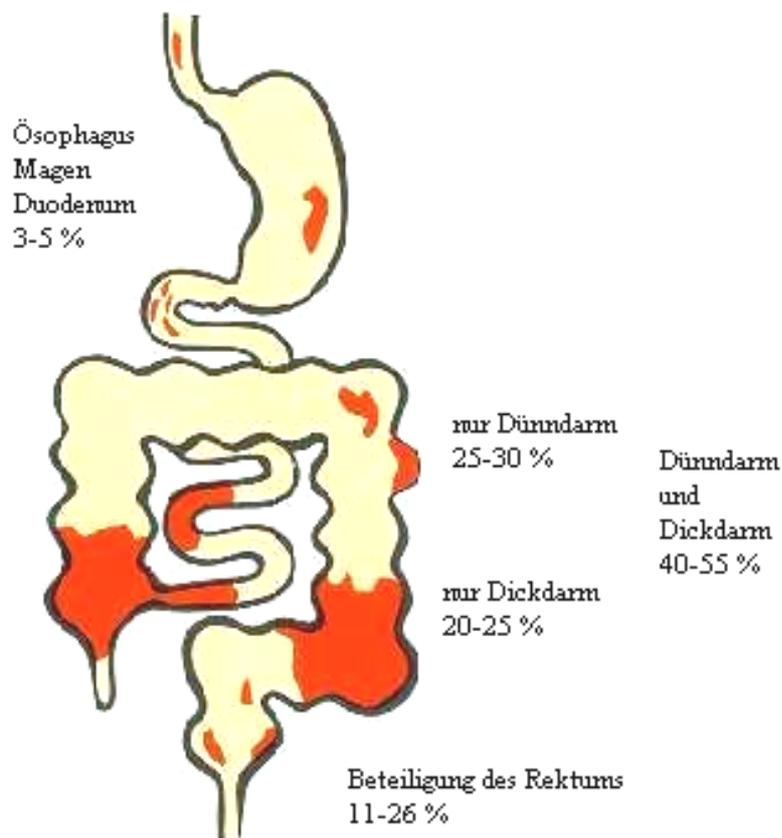
Die prospektiv erhobene Inzidenz in Europa für die Altersgruppe der 15-64jährigen beträgt für Colitis ulcerosa 10.4, für Morbus Crohn 5.6 Neuerkrankungen / 100.000 Einwohner und Jahr (74). In Europa gibt es ein Nord-Süd-Gefälle in der Inzidenz der CED, wobei die Inzidenz von CU und MC in Nordeuropa jeweils 40% bzw. 80% höher liegt als in Südeuropa (74). Vor allem bei MC findet sich eine familiäre Häufung. Weiße Bevölkerungsgruppen, insbesondere Juden, erkranken ca. 4-fach häufiger an CED als Farbige. Raucher erkranken seltener an Colitis ulcerosa, jedoch häufiger an M. Crohn.

Die Ätiologie und die Pathogenese der CED sind bis heute nur unzureichend verstanden. Der Einfluss genetischer Prädisposition sowie von Umweltfaktoren, beispielsweise Zigaretten-Rauchen, auf die Entwicklung einer CED gilt als gesichert. Vor diesem Hintergrund werden heute insbesondere drei Theorien der CED-Ätiologie diskutiert, die von einer persistierenden Infektion, einer defekten mukosalen Barriere oder von einer abnormalen Immunantwort auf ubiquitäre Antigene ausgehen.

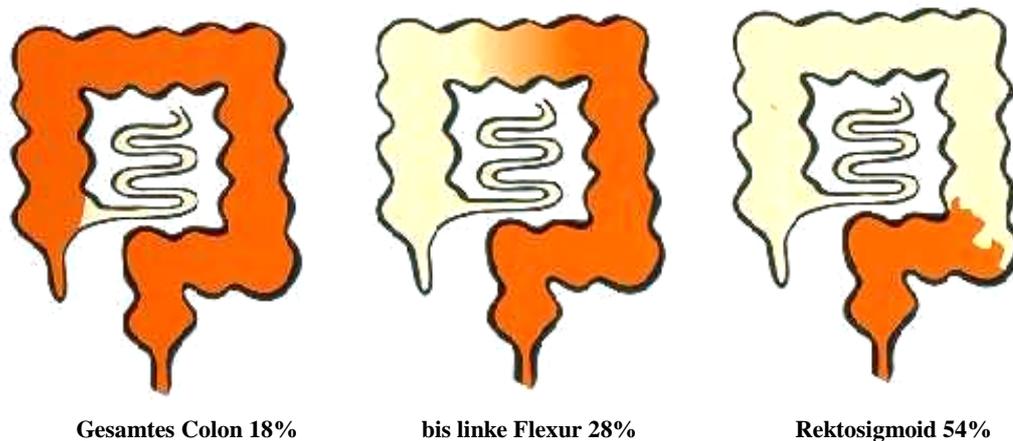
Für die Pathogenese der CED wurde die Abfolge mehrerer Schritte hypothetisch angenommen (66). Ein initial schädigendes Ereignis durchbricht die Mukosabarriere. Dies ermöglicht die Aufnahme perpetuierender Faktoren in das Gewebe, beispielsweise luminaler Bakterien oder Nahrungsantigene. Dann kommt es offenbar zu einer abnormalen, überschießenden Aktivierung des mukosalen Immunsystems. Die

immunologische Aktivierung führt im Sinne einer gemeinsamen Endstrecke schließlich zum Gewebeschaden und zu den einschlägigen klinischen Symptomen der CED.

Die Entzündung kann bei MC prinzipiell an jeder Stelle des Verdauungstraktes auftreten, besonders häufig jedoch im terminalen Ileum (Abb. 1-1). Bei der CU hingegen (Abb. 1-2) breitet sie sich vom Rektum kontinuierlich nach proximal aus, im Gegensatz zur diskontinuierlichen Entzündung bei MC.



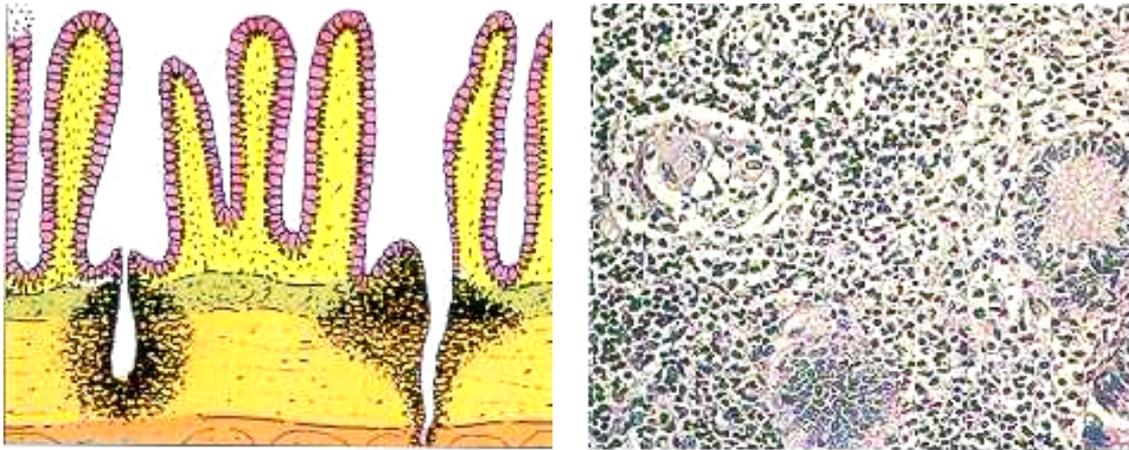
**Abb. 1-1. Lokalisation Morbus Crohn (Häufigkeiten in Prozent).** Prinzipiell jeder Abschnitt des Gastrointestinaltraktes kann betroffen sein. Hauptlokalisierung ist das terminale Ileum. (entnommen aus (64) )



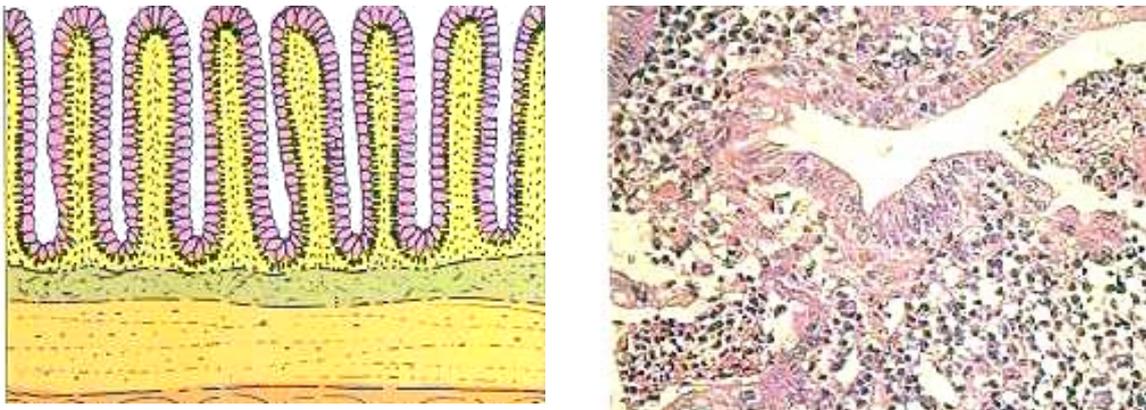
**Abb. 1-2. Lokalisation Colitis ulcerosa.** Die Colitis ulcerosa nimmt stets ihren Ausgang im Rektum und setzt sich in einem kontinuierlichen Befallsmuster nach proximal fort. (entnommen aus (64) )

Bei MC findet sich eine transmurale Entzündung, die in tiefer gelegenen Wandschichten häufig stärker ist als in oberflächlichen Schichten (disproportionierte Entzündung) (Abb. 1-3). Die entzündlichen Läsionen sind segmental angeordnet und können sich direkt neben völlig unveränderten befinden („skip lesions“). Es finden sich aphtenähnliche Geschwüre auf der Schleimhaut, Fissuren, Fisteln und scharf begrenzte, landkartenartige Ulzera. Eine ödematöse Schwellung der Darmwand ist ebenso typisch wie die fibrotische Wandverdickung, die zu einer Stenose des Darmlumens führen kann. Histologisch ist der MC gekennzeichnet durch Epitheloidzellgranulome und Riesenzellen (40% der Fälle), ferner durch Lymphangiektasien (Abb. 1-3). Die tributären Lymphknoten sind in 70% der Fälle hyperplastisch (59).

Die CU ist im akuten Stadium vor allem durch eine stark gerötete und ödematöse Schleimhaut gekennzeichnet, die bei Kontakt leicht blutet. Im chronisch fortgeschrittenen Stadium der CU bilden sich rezidivierende Ulzerationen aus, die die normale Schleimhautoberfläche sukzessive zerstören. Histologisch zeigt sich in akuten Stadien eine Infiltration der Schleimhaut mit Granulozyten und eine Ausbildung sogenannter Kryptenabzesse (Abb. 1-4), in chronischen Stadien zeigen sich Lymphozyten und Histiozyten sowie dysplastische Epithelien (59). In allen Stadien der CU ist die Entzündung auf die oberen Schichten der Darmwand beschränkt (Mukosa und Submukosa, proportionierte Entzündung) (Abb. 1-4).



**Abb. 1-3. Morphologie Morbus Crohn (links schematischer Gewebeschnitt, rechts Histologie).** Der MC ist durch eine transmurale, teils fissurale Entzündung gekennzeichnet, die diskontinuierlich verteilt ist (links). Histologisch ist sie durch eine lymphozytäre Infiltration, eine lymphoide Hyperplasie und eine Fibrosierung aller Wandschichten gekennzeichnet. In 30 – 60% der Fälle finden sich Epitheloidzellgranulome (rechts). (entnommen aus (64) )



**Abb. 1-4. Morphologie Colitis ulcerosa (links schematischer Gewebeschnitt, rechts Histologie).** Bei der CU tritt eine kontinuierlich ausgebreitete mukosale Entzündung auf, die häufig mit Kryptenabszessen vergesellschaftet ist (links). Histologisch finden sich eine auf die Mukosa beschränkte polymorphkernige Infiltration, Kryptenabszesse und eine reduzierte Becherzellmasse (rechts). (entnommen aus (64) )

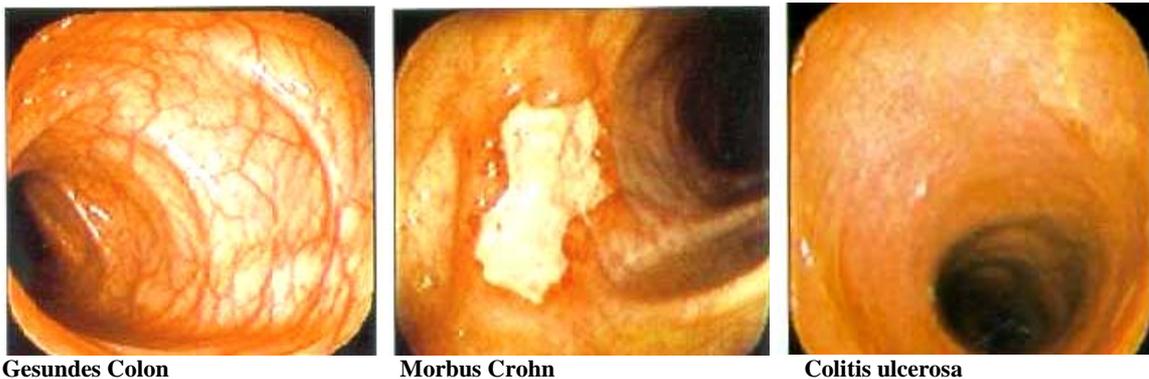
Patienten mit MC leiden im Schub vor allem unter krampfartigen Abdominalschmerzen und Diarrhöen, die zumeist keine Blutbeimengungen aufweisen (36). Es können bei Befall des terminalen Ileums Symptome ähnlich einer Appendizitis auftreten. Außerdem kann es zu zahlreichen Komplikationen kommen. Vor allem Fisteln (40-50%) und anorektale Abszesse sind typisch für MC. Es kommt oft zu einer Darmstenose, die eine Ileussympomatik erzeugen kann. Auch Malabsorptionssyndrome treten auf. Nach langem Verlauf sind die Patienten durch ein erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome bedroht. Typisch für den MC ist auch das Auftreten

extraintestinaler Krankheitserscheinungen. Dazu gehören das Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Arthritiden, aber auch eine Iritis oder Episkleritis (36).

Der Verlauf des MC ist in der Regel chronisch rezidivierend.

Die CU manifestiert sich meist in Form von blutig-schleimigen Durchfällen, ferner in krampfartigen Abdominalschmerzen (36). Auch bei der CU kann es zu Komplikationen kommen. Dazu gehören massive Blutungen aus den ulzerierten Schleimhautarealen, sowie im akuten Schub das toxische Megacolon, das mit septischen Temperaturen, einer Peritonitis und einer Perforationsgefahr einhergehen kann. Wie beim MC können bei der CU extraintestinale Symptome auftreten, sie sind jedoch insgesamt seltener. Nach langem Verlauf ist bei der CU das Risiko kolorektaler Karzinome deutlich erhöht. Die Karzinome entstehen dabei auf dem Boden von sich multilokulär entwickelnden Dysplasien.

Man unterscheidet eine chronisch rezidivierende Verlaufsform der CU von einer chronisch-kontinuierlichen ohne Remissionen. In einigen Fällen kommt es zu einem akut-fulminanten Verlauf (36).



**Abb. 1-5. Endoskopische Diagnostik chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.** Die normale Colonschleimhaut stellt sich coloskopisch als spiegelnd dar mit einer scharfen Gefäßzeichnung. Die mittlere Abbildung zeigt ein typisches landkartenförmiges Ulkus mit rotem erhabenen Rand bei Morbus Crohn. Die rechte Abbildung zeigt einen Befund bei Colitis ulcerosa mit aufgehobener Gefäßzeichnung, Granulation und samtartiger Rötung. (entnommen aus (64) )



Morbus Crohn



Colitis ulcerosa

**Abb. 1-6. Röntgendiagnostik bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.** Gezeigt sind jeweils Ausschnitte eines Colon-Kontrasteinlaufs. Im linken Bild erkennt man für Morbus Crohn typische segmentale Stenosen und angedeutet ein Pflastersteinrelief im terminalen Ileum. Im rechten Bild sind in der linken Hälfte eine fehlende Haustrierung, in der rechten Hälfte zusätzlich Pseudopolypen zu erkennen. Zusammen mit dem radiologischen Aspekt eines „starrten Rohres“ führt dies zur Diagnose Colitis ulcerosa. (entnommen aus (64) )

Befunde	Colitis ulcerosa	Morbus Crohn
Blutige Stühle	häufig	selten
Bauchschmerzen	selten	häufig
Beteiligung des Rektums	immer	selten (20%)
Perianale Läsionen	selten	häufig
Fisteln	selten	häufig
Toxische Dilatation	selten	selten
Rezidiv nach kurativer Operation	nein	häufig
<b>Endoskopie:</b>		
Aphten	nein	häufig
Längsgestellte Ulcera	nein	häufig
Kontinuierlicher Befall	regelmäßig	selten
Befall d. terminalen Ileums	nein	häufig (80%)
Epitheloidzellige Granulome	nein	vorhanden (40%)

**Tab. 1-1. Differentialdiagnose zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.** (Nach (36) )

Die Diagnose der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird durch Klinik und Anamnese gestellt, ferner durch eine Coloskopie (Abb. 1-5), gegebenenfalls mit Biopsieentnahme. Meist ist eine sichere Unterscheidung der beiden Krankheitsentitäten möglich (Tab. 1-1). Bei den bildgebenden Verfahren sind vor allem die Sellink-

Darstellung des Dünndarms (MC) sowie der Colonkontrasteinlauf (MC und CU) von Bedeutung (Abb. 1-6). In bis zu 5% der Fälle ist auch nach einem Verlauf von einem Jahr eine sichere Unterscheidung der beiden Krankheitsbilder nicht möglich (74), man spricht von einer „indeterminierten Colitis“, oder die ursprüngliche Diagnose wird später revidiert, man spricht von sogenannten „Konversionsfällen“.

Die Therapie des Morbus Crohn ist vor allem konservativ. In der medikamentösen Therapie (64) erweisen sich Glukokortikoide als besonders wirksam. Außerdem spielt die 5-Aminosalicylsäure bei der Therapie leichterer Schübe sowie in der Rezidivprophylaxe eine Rolle. Als Reservemedikament bei steroidabhängigen oder steroidrefraktären Verläufen steht das immunsuppressive Azathioprin zur Verfügung. Ferner kommen Metronidazol und andere Antibiotika sowie Methotrexat zur Anwendung.

Kommt es zu Komplikationen, so kann mit interventionellen endoskopischen Verfahren versucht werden, stenosierte Darmabschnitte zu dilatieren bzw. Fisteln zu verschließen. In der Behandlung von Komplikationen liegt auch die Domäne der chirurgischen Therapie. Da die Erkrankung durch operative Maßnahmen nicht heilbar ist, ist eine möglichst zurückhaltende und darmerhaltende Operationstechnik bedeutsam (71). Bei zu ausgedehnten Resektionen, insbesondere nach mehrfacher Chirurgie, drohen Komplikationen wie Kurzdarmsyndrom, chologene Diarrhöe oder Vitamin B<sub>12</sub>-Mangel.

Bei der Colitis ulcerosa ist die medikamentöse Therapie ähnlich jener bei Morbus Crohn (64). Im Vordergrund steht die Therapie mit Mesalazin oder Sulfasalazin. Bei schwereren Verläufen kommen auch Kortikosteroide und Immunsuppressiva zum Einsatz.

Ganz anders als beim MC ist die Rolle der chirurgischen Therapie bei der CU: neben den akuten OP-Indikationen im Sinne einer Komplikationschirurgie ist es möglich, die CU durch eine elektive totale Proktokolektomie mit transanaler Mukosektomie und Anlage eines ileo-analen Pouches zu heilen.

Mittlerweile konnten einige neue Ansätze in der Therapie der CED entwickelt werden. Der Einsatz von Antikörpern gegen das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  erwies

sich als sehr wirksam in der Behandlung von steroidrefraktären Verläufen und von Fistelungen; das Präparat hat bereits breiten Eingang in das Therapieregime gefunden (Präparat: Remicade®). Die Gabe des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 erwies sich in ersten klinischen Versuchen als vielversprechend.

Gegen die Leukozyten-Endothel-Interaktion gerichtete Therapiestrategien sind ein weiterer Ansatz. Der Einsatz von sogenannten Antisense- Oligonukleotiden, die die Expression des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 selektiv hemmen, erzielte sowohl im Tierversuch als auch im klinischen Versuch bei steroidrefraktären Verläufen des MC gute Ergebnisse (61, 88, 89).

Eine weitere Strategie, die verfolgt wird, ist die Modifikation der luminalen Bakterienflora durch Substitution mit Lactobacillen. In naher Zukunft könnten auch gentherapeutische Ansätze eine Rolle spielen, die genetisch determinierte Defekte in der Immunregulation und Mukosabarrierefunktion korrigieren.

Die Prognose bei Morbus Crohn wird vor allem durch die sehr hohe Rezidivrate bestimmt. Bei Erkrankungsbeginn müssen bis zu 92% aller Patienten, abhängig von der Lokalisation der Erkrankung, wegen aufgetretener Komplikationen einer Operation zugeführt werden (36). Das Risiko einer notwendigen erneuten operativen Revision liegt nach 5 Jahren bei ca. 20%, nach 10 Jahren bei etwa 36% und nach 15 Jahren bei knapp 50% (Metaanalyse mehrerer Studien in (8) ). Unter optimaler Therapie ist für die Mehrzahl der Patienten eine normale Lebenserwartung zu erreichen. Das Risiko für kolorektale Karzinome und besonders für Dünndarmkarzinome ist erhöht.

Die Prognose bei Patienten mit CU hängt von der Schwere der Erkrankung ab. Patienten mit isolierter Proktosigmoiditis haben eine gute Prognose mit normaler Lebenserwartung. Auch bei CU-Patienten besteht ein deutlich erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome (70), nach 10 Erkrankungsjahren liegt das Risiko eines Karzinoms bei etwa 10% (70). Dies macht nach langen chronischen Verläufen und Vorliegen mittlerweile gut definierter Risikofaktoren oft eine prophylaktische totale Kolektomie erforderlich.

## 1.2. Endotheline: multifunktionale Mediatoren

### 1.2.1. Endotheline und ihre Rezeptoren: Physiologie und Pathophysiologie

Bereits in den 80er Jahren war bekannt, dass Endothelien auf bestimmte Reize hin einen vasokonstriktiven Faktor freisetzen können, zunächst „endothelial derived constricting factor“ genannt, in Analogie zum mittlerweile als NO (nitric oxide) identifizierten vasodilatierenden „endothelial derived relaxing factor“. Yanagisawa und Mitarbeiter konnten 1988 diesen Faktor aus dem Überstand einer Endothelzellkultur einer Schweineaorta isolieren und nannten ihn „Endothelin“ (90). Es handelt sich dabei um eine Familie von bis dahin unbekanntem Peptiden, die aus 21 Aminosäuren bestehen. Sie entstehen aus einem 39- Aminosäuren-Vorläuferpeptid, dem sogenannten „big endothelin“, durch Einwirkung von Endothelin Converting Enzyme, Cathepsin D und anderen Metalloproteinasen (90). Es sind mittlerweile vier verschiedene Endotheline (ET) bekannt, die als ET-1, ET-2, ET-3 und ET-4 bezeichnet werden (Tab. 1-2). Sie unterscheiden sich jeweils in einigen Positionen der Aminosäuresequenz, was ihre unterschiedliche Rezeptoraffinität bedingt (Übersicht in (48) ). Die vier verschiedenen Endotheline wurden in allen bisher untersuchten Säuger-Genomen gefunden. ET-1 und ET-2 kommen ubiquitär in verschiedensten Geweben vor. ET-3 ist vor allem im Nervengewebe, ET-4, auch als „vasoactive intestinal contractor = VIC“ bekannt, ist ausschließlich in der Mukosa des Gastrointestinaltrakts vorhanden (Übersicht in (48) ).

Endothelin wird vor allem von Endothelzellen synthetisiert. Stimuliert wird die Freisetzung durch Gefäßverletzung, Ischämie, Endotoxin, Entzündungsmediatoren, Thrombin, turbulenten Blutfluss sowie Scher- und Dehnkräfte am Endothel (48). Mittlerweile sind aber auch zahlreiche andere Zelltypen als Syntheseort des Endothelins bekannt, z.B. Makrophagen, Monozyten und Kupffer-Zellen, Granulozyten, Hepatozyten, Schilddrüsen-Epithelien und Glia-Zellen (20, 48, 73). ET-1 erreicht die höchsten Konzentrationen in Gefäßen des inneren Nierenmarks und in der Lunge, ist aber in nahezu allen Geweben in unterschiedlicher Konzentration vorhanden.

	Lokalisation	Liganden
<b>Endotheline</b>		
ET-1	ubiquitär	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>
ET-2	ubiquitär	ET <sub>A</sub> , ET <sub>B</sub>
ET-3	v.a. neuronales Gewebe	ET <sub>B</sub> , schwächer auch ET <sub>A</sub> (in dermalen Melanophoren des Frosches ET <sub>C</sub> )
ET-4 (= VIC, "vasoactive intestinal contractor")	Mukosa des Gastrointestinaltrakts	ET <sub>B</sub> , vermutlich auch ET <sub>A</sub>
<b>Endothelinrezeptoren</b>		
ET <sub>A</sub>	Glatte Gefäßmuskulatur, Leukozyten, u.a.	ET-1, ET-2, ET-4, schwächer ET-3
ET <sub>B</sub>	Endothel, glatte Gefäßmuskulatur, u.a.	ET-1, ET-2, ET-3, ET-4
ET <sub>C</sub>	bisher nur in dermalen Melanophoren des Frosches kloniert	ET-3

**Tab. 1-2. Endotheline und ihre Rezeptoren.** Die Tabelle zeigt jeweils Lokalisation und Liganden.

Endotheline wirken vor allem autokrin und parakrin, weniger systemisch. Sie sind kurzlebige Mediatoren, ihre Plasmahalbwertszeit beträgt ca. 2 Minuten. Dementsprechend ist die Konzentration im Gewebe etwa 1000fach höher als jene im Plasma. Die systemischen Wirkungen der im Plasma zirkulierenden Endotheline sind noch nicht genau verstanden (48).

Die Wirkung der Endotheline wird über verschiedene Rezeptoren vermittelt (Tab. 1-2). Der erste, der sogenannte ET<sub>A</sub>-Rezeptor, bindet dabei ET-1 und ET-2 mit gleicher Affinität, weniger ET-3. Der zweite, der ET<sub>B</sub>-Rezeptor, bindet mit etwas schwächerer Affinität gleichermaßen ET-1, ET-2 und ET-3 (35). Mittlerweile ist in dermalen Melanophoren des Frosches ein dritter Rezeptor entdeckt worden, der ET<sub>C</sub>-Rezeptor, der ET-3 stärker bindet als die anderen Endotheline. In Säugern konnte dieser Rezeptortyp

jedoch nicht kloniert werden (5, 48). Der ET<sub>A</sub>-Rezeptor ist gekoppelt an ein G-Protein, das die Phospholipase C aktiviert. Über ein second messenger System werden ionisiertes Calcium freigesetzt und Zellproteine über die Proteinkinase C phosphoryliert. Dies beeinflusst sekretorische, kontraktile und proliferative Zellfunktionen (48). Phosphorylierte Proteine gelangen in den Zellkern und beeinflussen die Transkription bestimmter Gene. In manchen Zelltypen wird auch die Funktion von membranständigen Ionenkanälen beeinflusst. Für den ET<sub>B</sub>-Rezeptor sind ähnliche Wege der Signaltransduktion beschrieben (48). Endothelinrezeptoren weisen in den unterschiedlichen Organen eine erhebliche Heterogenität in ihrer Verteilung und Funktion auf, was die unterschiedliche Wirkung von Endothelinen in den verschiedenen Organsystemen erklärt (48).

Endotheline sind die potentesten heute bekannten Vasokonstriktoren. Die ET-induzierte Vasokonstriktion kann durch Nitrate und bestimmte Ca-Antagonisten antagonisiert werden, nicht jedoch durch adrenerge, cholinerge, serotoninerge und histaminerge Blockade (48). Die glatte Gefäßmuskulatur trägt hauptsächlich ET<sub>A</sub>-Rezeptoren, weniger ET<sub>B</sub>-Rezeptoren. Das Endothel besitzt fast ausschließlich ET<sub>B</sub>-Rezeptoren (32, 51, 91). Die Stimulation der ET<sub>A</sub>-Rezeptoren auf der Gefäßmuskulatur führt zu einer starken ET-induzierten Vasokonstriktion. Die Stimulation der ET<sub>B</sub>-Rezeptoren auf der Gefäßmuskulatur führt ebenfalls zur Vasokonstriktion, die Stimulation der endothelialen ET<sub>B</sub>-Rezeptoren hingegen führt über die Freisetzung von NO aus dem Endothel zu einer moderaten Vasorelaxation (54). Daher können Endotheline über ET<sub>B</sub>-Rezeptoren im gesunden Gewebe eine transiente Vasodilatation verursachen. In einigen Gefäßsystemen ist jedoch auch eine ET<sub>B</sub>-vermittelte Vasokonstriktion beschrieben worden, beispielsweise in humanen Koronararterien (5). Insbesondere in Zuständen der Ischämie scheint die vasodilatatorische Komponente der Endothelinwirkung abzunehmen, eventuell wegen gestörter NO- und Prostacyclin-Freisetzung aus dem Endothel (5), so dass in solchen pathologisch veränderten Geweben die konstriktorische Wirkung der Endotheline ganz im Vordergrund steht.

Seit der Entdeckung der Endotheline ist das Wissen um ihre Funktion erheblich angewachsen. Neben der vasomotorischen Wirkung haben Endotheline eine mitogene

Wirkung auf vaskuläre Endothelien und auf Gefäßmuskulatur sowie eine angiogene Wirkung. Außerdem sind Endotheline Regulatoren der renalen mesangialen Funktion, der Hypophysenfunktion, der Bronchokonstriktion, der kardialen Funktion, der Leberzellfunktion, der endokrinen Funktion und sogar verschiedener Immunmechanismen (48).

Endotheline besitzen eine erhebliche proinflammatorische und gewebeschädigende Potenz. Erhöhte Endothelinspiegel im Serum und im Gewebe finden sich im Rahmen verschiedenster Pathophysiologien, etwa bei Sepsis, Herzinsuffizienz, pulmonalem Hypertonus, Ischämie/Reperfusionsschäden oder gestörter Nierenfunktion (5, 48). Die proinflammatorische Potenz entfalten sie über verschiedene Mechanismen:

Endotheline steigern die Adhäsion von Leukozyten an venöses Endothel (9) (siehe „Endotheline und Zelladhäsion“). Eine gesteigerte Leukozytenadhäsion ist ein wichtiger initialer Schritt in der Genese jeder Entzündung, da sie für die Sequestration zirkulierender Leukozyten in das Gewebe und somit für die Entwicklung eines zellulären entzündlichen Infiltrates notwendig ist.

Ferner wirken Endotheline proinflammatorisch, indem sie die Freisetzung sekundärer proinflammatorischer Mediatoren aus Leukozyten induzieren. Mit Endothelin stimulierte Monozyten sezernieren die Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF (13) sowie das Prostaglandin PGE<sub>2</sub> (47). Ferner steigern Endotheline über die Aktivierung von Monozyten die Produktion reaktiver Sauerstoffmetaboliten in neutrophilen Granulozyten (30).

Auch die starke vasokonstriktorische Wirkung der Endotheline kann gewebeschädigend wirken, insbesondere im Rahmen eines Ischämie/Reperfusionsschadens (5). Die partiell vasodilatierende Komponente der ET-Wirkung über ET<sub>B</sub>-Rezeptoren könnte dabei für die Phase der Reperfusion entscheidend sein (47). Die angiogene Wirkung der Endotheline könnte zum Teil die bei Morbus Crohn beschriebenen Neovaskularisationen erklären (48).

### **1.2.2. Rolle der Endotheline in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Endotheline erfüllen im Gastrointestinaltrakt zahlreiche physiologische Funktionen. Sie sind potente Regulatoren des mesenterialen und mukosalen Blutflusses, inhibieren absorptive Prozesse im Colon, erhöhen aber gleichzeitig die Permeabilität der Darmmukosa (48, 57). Eine Besonderheit im Gastrointestinaltrakt ist das Vorhandensein von ET-4 (VIC), welches über ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren eine starke Kontraktion der intestinalen Längsmuskulatur bewirkt (48).

Untersuchungen am humanen Colon und am Rattendarm zeigten, dass Endothelin-Rezeptoren in den vegetativen Nerven-Plexus, in der Mukosa, in den Muskelschichten und Gefäßwänden exprimiert werden und mutmaßlich eine wichtige Rolle für die intestinale Motilität und Sekretion spielen (31, 78).

Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sind per Radioimmunoassay erhöhte Serumspiegel von ET-1 gefunden worden (42). Bei MC sind die Plasmaspiegel dabei ca. dreifach, bei CU ca. zweifach höher als bei gesunden Kontrollpersonen. Dabei ist die Plasmakonzentration bei MC signifikant höher als bei CU (42). Alter, Geschlecht, klinische Entzündungsaktivität, Krankheitsdauer, anatomischer Entzündungsort und Therapie haben keinen signifikanten Einfluss auf die Plasmaspiegel (42).

Die mediane Endothelinkonzentration im Überstand von Gewebeproben, gemessen mit Radioimmunoassay, ist bei Proben aus MC-Gewebe (entnommen aus Dünndarm und Colon) und CU-Gewebe (Colon) signifikant höher als bei Proben von gesunden Probanden (Colon) (50).

Immunhistochemisch ist semiquantitativ ein erhöhter Anteil Endothelin-positiver Zellen in histologischen Darmpräparaten von CED-Patienten nachgewiesen worden (50). Während bei gesunden Kontrollen nur wenige Endothelin-positive Zellen im Gewebe vorliegen, ist der Anteil positiver Zellen in Proben von MC- und CU - Gewebe deutlich höher. Der größte Anteil positiver Zellen findet sich bei MC in der Submukosa, bei CU in der Lamina propria, was den typischen morphologischen Entzündungslokalisationen entspricht (50). In der Submukosa von MC-Präparaten finden sich eine deutliche Endothelin-positive Makrophageninfiltration sowie perivaskuläre und intravaskuläre Aggregate von Endothelin-positiven Zellen (50).

Mit Methoden der In-vitro-Autoradiographie wurden in CED-Darm semiquantitativ deutlich mehr Bindungsstellen für Endothelin-1 nachgewiesen als in gesundem Darm (29). Bei MC ist dabei die Dichte von Endothelinrezeptoren in Villi und Muskulatur der Darmwand erhöht. Bei MC und CU finden sich zudem an submukosalen Gefäßen vermehrt Endothelinrezeptoren.

Diese Beobachtungen machen eine Beteiligung der Endotheline an der Pathogenese der CED wahrscheinlich. Daher wurde in dieser Studie der therapeutische Effekt einer Endothelinblockade bei einer chronischen tierexperimentellen Colitis untersucht.

### **1.2.3. Der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan**

Mittlerweile wurden verschiedene Endothelin-Rezeptorantagonisten entwickelt, die spezifisch einen Rezeptortypen oder unspezifisch mehrere Rezeptortypen blockieren. Die Endothelin-Rezeptorantagonisten ermöglichten eine umfassende Erforschung der Endothelinwirkungen im gesunden sowie pathologisch veränderten Gewebe. Die Blockade von Endothelinrezeptoren minderte histologische Schäden in tierexperimentellen Modellen von Brandverletzungen (4), akuter Pankreatitis (22), maligner Hypertonie (33, 37), Ischämie/Reperfusion der Leber (34, 75, 76) und Myokarditis (58). Diese Befunde bestätigen die Annahme, dass Endotheline in diesen pathologischen Prozessen eine essentielle Rolle spielen.

In dieser Studie wurde der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan eingesetzt (chemische Bezeichnung: Ro 47-0203; 4-tert-butyl-N-[6-(2-hydroxy-ethoxy)-5-(2-methoxy-phenoxy)2,2'-bipyrimidin-4-yl]benzen-sulphon-amid). Es handelt sich dabei um einen neuen, auch oral wirksamen Non-Peptid-Antagonisten (Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz). Bosentan weist eine Plasma-Halbwertszeit von 3 Stunden auf. Laut Hersteller liegt der therapeutische Bereich dieser Substanz bei 3-30mg/kg KG parenteral. Bosentan blockiert ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptoren gleichermaßen, ist also ein unspezifischer Rezeptorantagonist.

In unserer Klinik bestehen bereits Erfahrungen mit Bosentan. Die Arbeitsgruppe um Prof. Spiegel (Abteilung chirurgische Forschung) untersuchte die Auswirkungen von Bosentan auf einen experimentellen Ischämie/Reperfusionsschaden der Leber. Mit

Hilfe der Intravitalmikroskopie der Leber konnte demonstriert werden, dass Bosentan einen günstigen Effekt auf die postischämische Mikrozirkulation hat. Bosentan hebt die Konstriktion der Sinusoide auf, die Perfusionsrate wird verbessert, und die Zahl adhärenter Leukozyten wird reduziert (76). Bosentan konnte außerdem den Transaminasenanstieg im Serum nach Ischämie reduzieren und die Sauerstoffversorgung der Leber verbessern (75, 76, 80, 81, 82).

Es liegen bereits Arbeiten vor, die eine antiinflammatorische Wirksamkeit von Bosentan auch bei experimentellen Darmentzündungen wahrscheinlich machen. Hogaboam konnte in der Trinitrobenzen-Sulfonsäure (TNBS) - Colitis der Ratte durch orale Bosentangebe die klinische Entzündung sowie die Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität (Marker einer Gewebeeinfiltration mit neutrophilen Granulozyten) im Colon senken (27). Es erfolgte jedoch keine quantitative histologische Auswertung, so dass die Reduktion der histologischen Entzündungsaktivität rein deskriptiv blieb und nicht statistisch gesichert werden konnte. Interessanterweise konnte eine Bosentangebe, die eine Stunde nach der Entzündungsinduktion begann, keinen signifikanten Effekt auf die Entzündung ausüben. Hogaboam stellte daher die These auf, Bosentan habe möglicherweise nur einen prophylaktischen Effekt, jedoch keinen Effekt auf eine etablierte Entzündung (27). Güllüoğlu konnte ebenfalls in der TNBS-Colitis der Ratte durch eine orale Bosentangebe, die simultan mit der Entzündungsinduktion einsetzte, eine Reduktion der klinischen Entzündung erreichen (24). Auch hier erfolgte jedoch keine quantitative histologische Auswertung.

Neben der fehlenden Quantifizierung des histologisch sichtbaren Effektes ist das in den genannten Studien verwendete Modell der TNBS-Colitis der Ratte problematisch, da insbesondere die ersten 7 Tage der Entzündung in diesem Modell durch eine direkt toxische Wirkung der rektal applizierten Trägersubstanz Ethanol auf die Darmmukosa gekennzeichnet sind (21). Untersuchungen des Bosentaneffektes innerhalb dieser Zeitspanne, wie sie Hogaboam und Güllüoğlu durchführten, haben deshalb nur eine sehr beschränkte Aussagekraft bezüglich der Wirkung von Bosentan auf eine chronische Entzündung, wie sie bei humanen CED vorliegt.

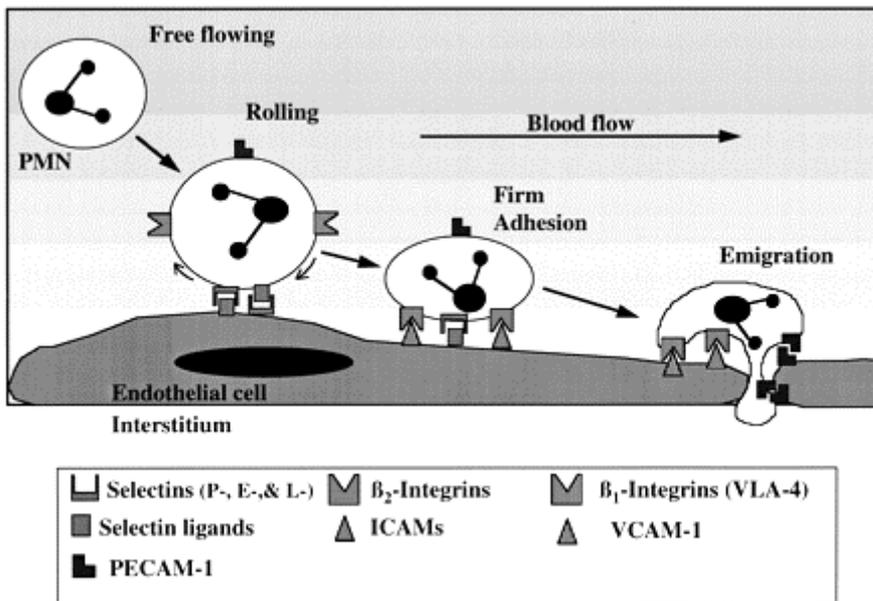
Schließlich wurde bisher noch nicht untersucht, auf welche Weise Bosentan die intestinale Entzündung reduziert. Damit ist die Datenlage zur Wirkung von Bosentan auf eine chronische Colitis noch unzureichend.

### **1.3. Zelladhäsion**

#### **1.3.1. Physiologie der Leukozytenadhäsion**

Blutzellen, die im Körperkreislauf zirkulieren, erfüllen nur teilweise bereits im Blutstrom ihre spezifische Funktion. Für zahlreiche Zellen, insbesondere Leukozyten, ist der Aufenthalt in strömendem Blut lediglich vorübergehend und vor allem für einen Transport zu peripheren Geweben erforderlich. Ein neutrophiler Granulozyt beispielsweise erfüllt seine wichtigen Funktionen in der Abwehr bakterieller Infektionen nicht in der Blutbahn, sondern im Gewebe. Seine Halbwertszeit für den Verbleib im Blutkreislauf beträgt nur etwa 6-7 Stunden, seine Gesamtlebenszeit jedoch etwa 2-3 Tage. Viele Autoren rechnen den hämatopoetischen Zellverband und das Blut zu den „Geweben“, um ihre funktionell enge Verwandtschaft zu den „festen“ Geweben des Körpers zu betonen. Zirkulierende Zellen stehen in einem ständigen Austausch und Gleichgewicht mit den Blutzellen, die sich im Gewebe aufhalten.

Zellen, die die Blutbahn verlassen und in umliegendes Gewebe emigrieren, müssen zunächst einen Kontakt zum Gefäßendothel herstellen. An dieses müssen sie sich anheften, um dann in einem nächsten Schritt das Gefäßendothel zu durchqueren (Diapedese) und ins Gewebe zu emigrieren. Diese Kontaktaufnahme zwischen Leukozyten und Endothel ist für zahlreiche physiologische sowie pathophysiologische Prozesse essentiell. Die Mechanismen dieser Adhäsion sind sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden. Verantwortlich für die Kontaktaufnahme zwischen Endothelzelle und Leukozyt sind sogenannte Zelladhäsionsmoleküle (Tab. 1-3). Über diese „Rezeptoren“ erkennen sich die beiden Zellen.



**Abb. 1-7. Zelladhäsionskaskade.** Der Leukozyt verläßt die zentrale Strombahn, rollt dann am Endothel entlang. Dieser Schritt wird vor allem von Selektinen vermittelt. Später kommt es zu einer festen Anheftung, die vor allem abhängig ist von Integrinen, die mit ICAM und VCAM Kontakt aufnehmen. Es schließt sich die Emigration an, indem der Leukozyt das Gefäß durch einen endothelialen Interzellularspalt verläßt. (Abb. aus (60) )

Den Prozess der Zelladhäsion kann man in mehrere aufeinanderfolgende Schritte einteilen, so dass sich eine „Zelladhäsionskaskade“ ergibt (Abb. 1-7) (60, 69). In einem ersten Schritt verläßt der Leukozyt die zentrale Strombahn des Gefäßes und gelangt in die Nähe des Endothels. Diesen Prozess bezeichnet man als „Margination“. Nachfolgend nimmt der Leukozyt lockeren Kontakt zum Endothel auf und „rollt“ an ihm entlang, wobei er seine Geschwindigkeit drastisch reduziert. Kommt es während dieser Kontaktaufnahme zu einer weiteren Aktivierung, so verstärkt sich die Bindung zwischen Leukozyt und Endothel, und der Leukozyt haftet fest an einer Stelle. Er flacht ab und beginnt dann in einem letzten Schritt das Endothel zu durchqueren und somit in das Gewebe zu gelangen.

Die Margination ist zunächst als überwiegend passiver Prozess zu verstehen. Der Leukozyt gelangt von einer zentralen Position innerhalb des Gefäßes in eine randständige Position. Dies bedeutet erstens eine räumliche Nähe zum Endothel, so dass eine Kontaktaufnahme möglich wird, zweitens eine deutlich reduzierte Geschwindigkeit. Diese reduzierte Geschwindigkeit erklärt sich aus dem

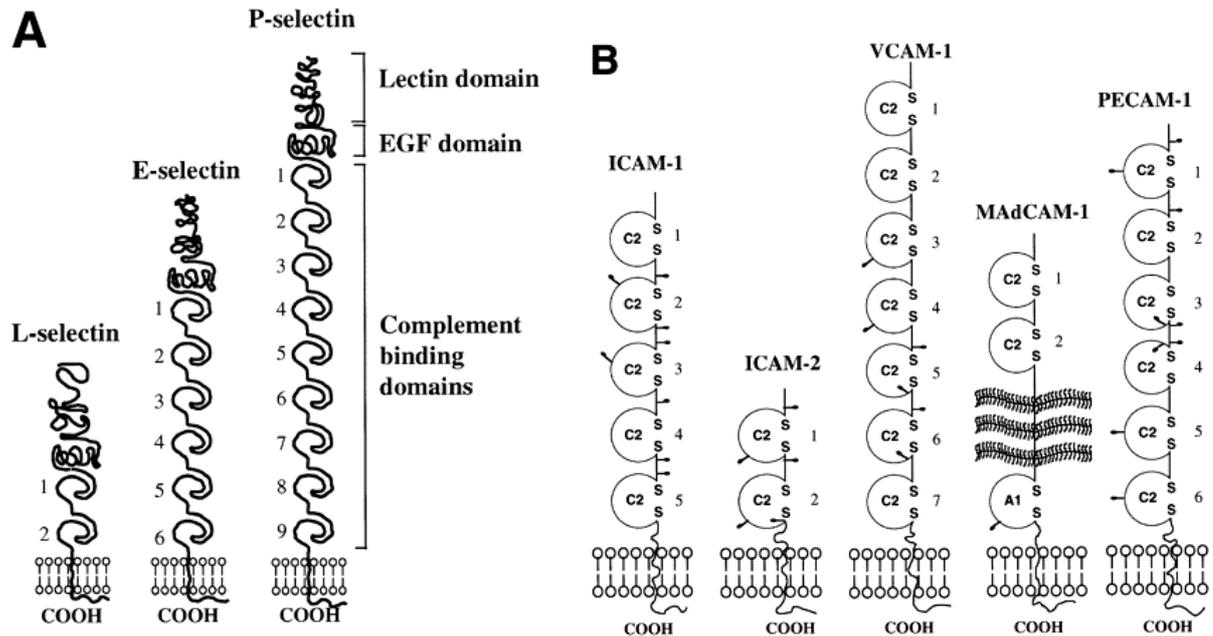
Geschwindigkeitsprofil einer laminaren Strömung innerhalb eines Gefäßes, welches im Zentrum ein Maximum aufweist und zu den Wänden hin abfällt. Diese Faktoren ermöglichen dem Leukozyten eine Kontaktaufnahme.

Adhäsionsmolekül	Synonyme	Lokalisation	Expression		Ligand	Funktion
			konstitutiv	induzierbar		
<b>Selektin-Familie</b>						
L-Selektin	LAM-1, LECAM-1, MEL-14 Ag, CD 62L	alle Leukozyten	ja	nein; Herunterregulation bei Aktivierung	P-Selektin, E-Selektin, GlyCAM, CD14, MAdCAM	Rolling
P-Selektin	PADGEM, GMP-140, CD62P	Endothel, Thrombozyten	ja	ja	L-Selektin, PSGL-1, 120-Kilodalton-PSL	Rolling
E-Selektin	ELAM-1, CD62E	Endothel	nein	ja	L-Selektin, CLA, SSEA-1, 250-Kilodalton ESL	Rolling
<b>Integrin-Familie</b>						
CD11a/CD18	LFA-1, $\alpha_L\beta_2$	alle Leukozyten	ja	nein	ICAM-1, ICAM-2	Adhärenz, Emigration
CD11b/CD18	Mac-1, MO1, CR3, $\alpha_M\beta_2$	Granulozyten, Monozyten	ja	ja	ICAM-1, iC3b; Fb	Adhärenz, Emigration
CD11c/CD18	p150,95, $\alpha_X\beta_2$	Granulozyten, Monozyten	ja	ja	Fb; iC3b?	?
CD49d/CD29	VLA-4, $\alpha_4\beta_1$	Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile, Basophile	ja	nein	VCAM-1, extrazelluläre Matrix	Adhärenz
CD49d/ $\beta_7$	$\alpha_4\beta_7$	Lymphozyten	ja	nein	MAdCAM-1, VCAM-1, Fibronektin	Adhärenz
<b>Immunglobulin-Supergen-Familie</b>						
ICAM-1	CD54a	Endothel, Monozyten	ja	ja	LFA-1, Mac-1, CD43	Adhärenz, Emigration
ICAM-2	CD102	Endothel	ja	nein	LFA-1	Adhärenz, Emigration
VCAM-1	CD106	Endothel	nein	ja	VLA-4	Adhärenz
PECAM-1	CD31	Endothel, Leukozyten, Thrombozyten	ja	nein	PECAM-1 (homophil)	Adhärenz, Emigration
MAdCAM-1		Endothel (Darm)	ja	ja	L-Selektin, CD49d/ $\beta_7$	Adhärenz, Emigration

**Tab. 1-3. Für die Leukozyten-Endothel-Interaktion bedeutsame Zelladhäsionsmoleküle (Auswahl).** (Tabelle entnommen aus (60) )

Diese ersten physikalischen und unspezifischen Annäherungen sind die Voraussetzung für die nun folgende spezifische Kontaktaufnahme. Bestimmte Zelladhäsionsmoleküle auf dem Leukozyten stellen eine Bindung zu Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel her (Tab 1-3). Der Leukozyt „rollt“ am Endothel entlang, seine Bindung ist noch nicht stark genug, um ihn am Endothel zu fixieren. Das bedeutet, dass einzelne Adhäsionsmolekülbindungen sich immer wieder lösen, an anderer Stelle jedoch wieder etabliert werden: so entsteht das „Rollen“ entlang des Endothels. Es entstehen adhäsive Kräfte zwischen Leukozyt und Endothel, die sich aus der Verbindung der Zelladhäsionsmoleküle ergeben (43). Je stärker die Adhäsion zwischen Endothel und Leukozyt, desto stärker wird er gegenüber dem Blutstrom abgebremst; daher ist die Roll-Geschwindigkeit der Leukozyten ein quantitatives Maß für die Adhäsionsstärke (2, 44).

Für den Prozess der ersten Kontaktaufnahme und für das „Rollen“ ist eine bestimmte Untergruppe der Zelladhäsionsmoleküle zuständig: die Gruppe der Selektine (60, 69). Man unterscheidet P-Selektin, L-Selektin und E-Selektin (siehe Tab. 1-3). P-Selektin erhielt seinen Namen nach den Zellen, auf denen es als erstes entdeckt wurde (Plättchen = *engl.* platelets), ebenso L-Selektin (Leukozyten) und E-Selektin (Endothel). Selektine sind Glykoproteine mit besonders langen extrazellulären Domänen (79) (Abb. 1-8), was wahrscheinlich ein „Einfangen“ der Leukozyten aus dem Blutstrom begünstigt (41). Wichtige Liganden für alle drei Selektine sind die Tetrasaccharide Sialyl Lewis X (sLe<sup>x</sup>) und Sialyl Lewis A (sLe<sup>a</sup>) (41), für P-Selektin ist weiterhin der P-selectin glycoprotein ligand (PSGL)-1 ein wichtiger Bindungspartner.



**Abb. 1-8. Struktur der Selektine (A) und der Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (B).** (A) Bei allen Selektinen findet sich eine Lektin-Domäne N-terminal, gefolgt von einer EGF (Epidermal-growth-factor)-Domäne und einer unterschiedlich langen komplementbindenden Region. (B) Kreise stehen für proteingebundene Zucker-Seitenketten. C2 steht für die konstante Ig Domäne 2, A1 für eine IgA Domäne. Disulfidbrücken sind als S-S gekennzeichnet. (Abb. aus (60) )

Während des durch Selektine vermittelten Rollens muss eine weitergehende Aktivierung des Leukozyten erfolgen, andernfalls löst er schließlich seinen lockeren Kontakt zum Endothel und gelangt wieder in den freien Blutstrom. Findet eine Aktivierung statt, so wird auf dem Leukozyten die Expression der sogenannten Integrine hochreguliert. Diese binden an endothelseitige Adhäsionsmoleküle der sogenannten Immunglobulin-Superfamilie und vermitteln so eine stabile Adhäsion, die Rollbewegung kommt zum Stillstand. Die Aktivierung des Leukozyten geschieht unter Einfluß von verschiedenen Chemokinen und anderen chemotaktischen Faktoren, u.a. bakterielle Peptide, PAF (platelet activating factor), Leukotrien B<sub>4</sub> und Interleukin-8 (60).

Integrine sind heterodimere Proteine, welche aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. 15 verschiedene  $\alpha$ -Einheiten und 8 verschiedene  $\beta$ -Ketten sind zur Zeit bekannt (60). Von den rechnerisch 120 Möglichkeiten werden allerdings nur 13 verschiedene Integrin-Varianten auf Leukozyten exprimiert. Von diesen haben fünf eine

besondere Bedeutung für die stabile Zelladhäsion (siehe Tab. 1-3). Nach der  $\beta$ -Kette teilt man die Integrine in  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_7$ -Integrine ein. Diese haben jeweils spezifische Liganden auf dem Endothel (siehe Tab. 1-3).

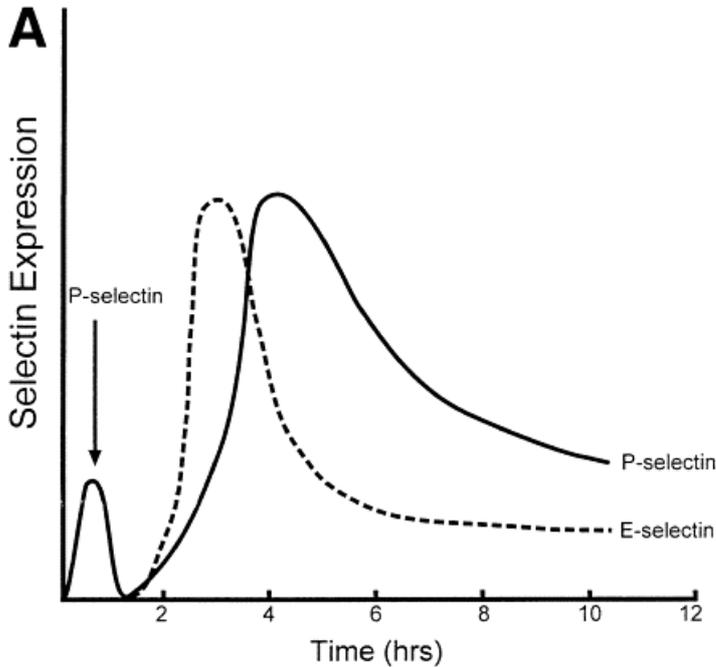
Die Liganden für die leukozytenständigen Integrine sind die auf Endothelien exprimierte Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Supergen-Familie. Diese werden aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaft mit Immunglobulinen so bezeichnet. Die Immunglobulin-Supergen-Familie beinhaltet eine sehr große Zahl von verschiedenen Molekülen. Fünf dieser Moleküle spielen für die Zelladhäsion eine wesentliche Rolle: intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 (CD56), ICAM-2 (CD102), vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1 (CD31) und das mucosal addressin cell adhesion molecule (MAdCAM)-1. Gemeinsam ist allen Molekülen, dass sie multiple immunglobulinartige Domänen in ihrer Proteinstruktur besitzen (60) (Abb. 1-8).

Das Zusammenspiel der verschiedenen Zelladhäsionsmoleküle ermöglicht komplexe Funktionen des Leukozyten-„Verkehrs“ zwischen Blutstrom und Gewebe. Manche Adhäsionsmoleküle kommen nur auf bestimmten Leukozyten oder nur auf dem Endothel bestimmter Gewebe vor. So wird beispielsweise auch das spezifische Lymphozyten-Homing erklärt, also die Rückkehr von immunkompetenten Lymphozyten in die Darmmukosa. Auf diese Weise kann der Strom von Leukozytensubpopulationen effektiv kontrolliert werden.

### **1.3.2. Leukozyten-Endothel-Interaktion als initialer Schritt der Entzündungspathogenese**

Eine wichtige Rolle in der Entzündungspathogenese spielt die Variabilität der Adhäsionsmolekülexpression. Bestimmte Moleküle werden konstitutiv exprimiert, sie sind für die basale Adhäsionsaktivität von Leukozyten verantwortlich. Diese muss natürlich auch im gesunden Gewebe in einem gewissen Maße erfolgen. Ein völliges Fehlen von biologischer Leukozytenadhäsion liegt im Rahmen des sogenannten LAD-Syndroms vor (leukocyte adherence deficiency syndrome). Patienten mit dieser

Erkrankung, bei der bestimmte Integrine fehlen, erleiden schwere ubiquitäre Infekte, in Entzündungsgeweben sind u.a. keine Neutrophilen nachweisbar (69).



**Abb. 1-9. Kinetik der Selektin-Expression in mit Zytokinen oder Endotoxinen behandeltem Dünndarm.** Der erste initiale Anstieg der P-Selektin-Expression wurde durch Histamin erzeugt, das spätere Maximum der P-Selektin- und der E-Selektin-Expression geht auf eine verstärkte Transkription nach Stimulation mit Endotoxin zurück. (Abb. aus (60) )

Wenn es zu einer Entzündungsreaktion kommt, so wird die Expression der basal vorhandenen Adhäsionsmoleküle gesteigert, bzw. vorher nicht vorhandene Moleküle werden nun exprimiert (siehe Abb. 1-9). Diese Expressionssteigerung wird durch die im Rahmen einer Entzündung vermehrt freigesetzten Chemokine, Zytokine, Endotheline und andere Mediatoren verursacht (60). So ist die massiv gesteigerte Adhäsion von Leukozyten in entzündetem Gewebe, beispielsweise in der Colon-Mukosa im Rahmen einer Colitis, zu erklären. Die stabile Adhäsion ermöglicht die Extravasation der Leukozyten und Migration in das entzündete Gewebe. Auf diese Weise kommt die zelluläre Entzündungsreaktion zustande.

Das für das initiale „Leukozyten-Rollen“ verantwortliche P-Selektin wird in entzündlichen Läsionen bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa verstärkt in

Darmvenolen exprimiert, wie immunhistochemische Studien zeigen konnten (68). Unbefallene Darmabschnitte hingegen zeigen eine nahezu normale Expression, wie im Darm gesunder Personen (68). Allerdings zeigt auch der makroskopisch und histologisch unauffällige (unbeteiligte) Darm in Nachbarschaft zu entzündlichen Läsionen Veränderungen in der Adhäsionsmolekülexpression. Im Vergleich zu gesundem Darm wird PECAM-1 in Mukosagefäßen von unbeteiligtem CU-Darm verstärkt exprimiert. Bei MC zeigt sich verglichen mit gesundem Darm eine verminderte ICAM-1-Expression in den Mukosagefäßen unbeteiligter Darmabschnitte (67). Die hier genannten Veränderungen der Adhäsionsmolekülexpression könnten zu den frühen entzündlichen Läsionen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beitragen.

Die Interaktion von im Blut zirkulierenden Leukozyten mit dem venösen Endothel spielt eine essentielle Rolle bei der Entwicklung eines zellulären entzündlichen Infiltrats (69). Es handelt sich bei der Adhäsion zirkulierender Leukozyten an venöses Endothel um einen initialen und zugleich geschwindigkeitslimitierenden Schritt in der Pathogenese experimenteller Darmentzündungen (60). Neutrophile Granulozyten, die wesentlich für den entzündlichen Gewebeschaden verantwortlich sind, besitzen eine Lebensdauer von lediglich 3 Tagen, die in entzündlichen Läsionen noch deutlich verkürzt sein kann. Es muss ein ständiger Einstrom von Leukozyten aus dem Blut in das Interstitium erfolgen, um ein entzündliches Zellinfiltrat aufrecht zu erhalten. Dies unterstreicht die essentielle Rolle einer gesteigerten Leukozytenadhäsion für die Initiation und Aufrechterhaltung einer intestinalen Entzündung. Sind aktivierte Leukozyten in das entzündete Gewebe emigriert, tragen sie erheblich zum Gewebeschaden bei. Insbesondere reaktive Sauerstoffmetaboliten, die von Neutrophilen und Makrophagen freigesetzt werden, schädigen das Gewebe, indem sie essentielle Sulfhydrylgruppen oxidieren, Proteine degradieren, Membranlipide peroxidieren und DNA-Strangbrüche verursachen (66). Das von Makrophagen freigesetzte IFN- $\gamma$  schädigt interzelluläre *tight junctions* und fördert die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, was die Emigration weiterer Leukozyten in das Gewebe verstärkt (66).

Wird die Leukozytenadhäsion therapeutisch reduziert, so entfällt der Einstrom der Leukozyten in das entzündete Gewebe, der für die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung notwendig ist. Dieser therapeutische Ansatz hat den Vorteil, in einer sehr frühen Phase der Entzündungspathogenese einzugreifen.

Tatsächlich erwiesen sich therapeutische Strategien, die gegen die leukozytäre Zelladhäsion gerichtet sind, als effektiv in der Behandlung chronischer Darmentzündungen. An unserer Klinik konnte gezeigt werden, dass die Blockade des Integrins CD11b (MAC-1) mit monoklonalen Antikörpern die Aktivität der Indomethacin-induzierten Ileitis der Ratte reduzieren kann (39), ebenso wie Antisense-Oligonukleotide, die gegen ICAM-1 oder VCAM-1 gerichtet sind (61). Antisense-Oligonukleotide, die die m-RNA von ICAM-1 binden und blockieren, zeigten im klinischen Versuch bei Patienten mit steroidabhängigem Morbus Crohn einen steroidsparenden Effekt (89).

### **1.3.3. Endotheline und Zelladhäsion**

Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass Endotheline (ET) die Zelladhäsion von Leukozyten verstärken können. Die intravenöse Gabe sowie die intraarterielle Infusion von ET-1 in die darmversorgenden Arterien der Ratte steigern die Zelladhäsion in submukosalen Venolen des Ratten-Ileums erheblich innerhalb kurzer Zeit (9). Diese akute Adhäsionssteigerung wird wahrscheinlich durch den ET<sub>A</sub> – Rezeptor und in geringerem Maße über den ET<sub>B</sub> –Rezeptor getriggert, da ein Block dieser Rezeptoren mit Antagonisten die Adhäsionssteigerung neutralisiert. Auch das lokale Überspülen des Mesenteriums der Ratte mit ET-1 führt innerhalb weniger Minuten zu einer Zunahme rollender und adhärerender Leukozyten in den Venolen des Darmes (65).

Ferner zeigen *in vitro* Versuche, dass neutrophile Granulozyten verstärkt auf Endothelzellkulturen und auf Plastikoberflächen adhäreren, wenn sie mit ET-1 aktiviert werden (45, 91).

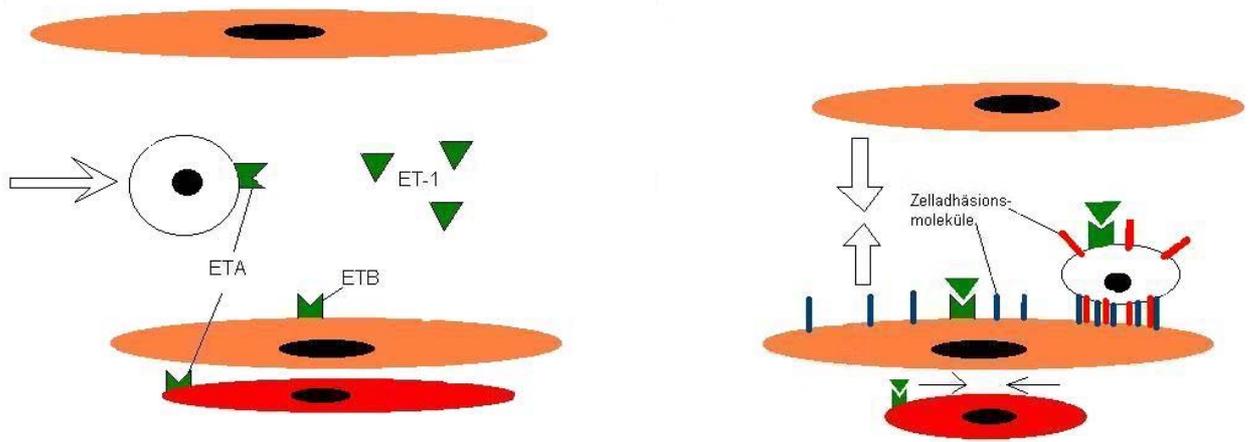
Schließlich belegen zahlreiche Studien indirekt eine durch ET gesteigerte Zelladhäsion. Durch die Messung der Aktivität von Myeloperoxidase (MPO) im Gewebe, einem *v.a.* in Neutrophilen vorkommenden Enzym, kann auf die Menge der dort vorliegenden Neutrophilen geschlossen werden (38). Da Granulozyten nur zu einem geringen Anteil

im Gewebe proliferieren und daher durch Zelladhäsion und Extravasation in das Gewebe gelangen müssen, ist die Aktivität der MPO im Gewebe indirekt ein Maß für die Zelladhäsion. Dies gilt v.a. in akut entzündlichen Zuständen, bei denen die Neutrophilen den größten Anteil des entzündlichen Zellinfiltrats darstellen. Darmnahe intraarterielle ET-1 Gabe erzeugt im Rattendarm eine Steigerung der MPO-Aktivität schon nach 30 Minuten (57). Eine systemische Gabe von ET-1 erhöht die MPO-Aktivität in Herz und Nieren (45).

Der Mechanismus der Endothelin-induzierten Adhäsionssteigerung ist noch nicht vollständig verstanden. Bisherige empirische Ergebnisse legen nahe, dass Endothelin die Adhäsion über eine Kombination der folgenden Mechanismen verstärkt (Tab. 1-4, Abb. 1-10):

Wirkort	Rezeptor	Proadhäsiver Effekt	Wirkmechanismus	Literatur
<b>(1) Vasokonstriktion</b>				
Glatte Muskulatur postkapillärer Venolen	ET <sub>A</sub>	Reduktion von Scherkräften, Flussminderung	Vasokonstriktion	McMillen 1995
<b>(2) Zelladhäsionsmoleküle</b>				
Neutrophile Granulozyten	ET <sub>A</sub>	Gesteigerte Expression des Integrins CD18 / CD11b (Zelladhäsionsmolekül)	Translokation präformierter Integrine an die Zelloberfläche / Konformationsänderung bestehender Integrine	Lopez Farre 1993, Zouki 1999
Endothel	ET <sub>B</sub>	Gesteigerte Expression der Zelladhäsionsmoleküle P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1	Translokation von P-Selektin aus Weibel-Palade-Körperchen an die Zelloberfläche, transkriptionelle Hochregulation von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1	McCarron 1993, Hayasaki 1996, Schürmann 1997, Ishizuka 1999, Sanz 1999, Zouki 1999
<b>(3) sekundäre Mediatoren</b>				
Monozyten / Makrophagen	ET <sub>A</sub>	Indirekte Steigerung der Zelladhäsionsmolekülexpression, Chemotaxis	Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, die die Adhäsionsmolekülexpression induzieren und chemotaktische Wirkung haben	McMillen 1993, Arndt 1996, Cunningham 1997, Panés 1998

**Tab. 1-4. Mechanismen der Endothelin-induzierten Leukozytenadhäsion.** Die Übersicht erläutert die drei wichtigsten Mechanismen (halbfett gedruckt) der durch Endothelin induzierten Leukozyten-Endothel-Interaktion.



**Abb. 1-10. Mechanismen der Endothelin-induzierten Leukozytenadhäsion.** Dargestellt ist eine postkapilläre Venole (Endothelzellen orange, glatte Gefäßmuskelzelle rot, Leukozyt weiß, Endothelin und Rezeptoren grün). Bei Endothelinrezeptor-Aktivierung kommt es zur Verengung des Gefäßes durch Vasokonstriktion mit konsekutiver Abnahme der wirksamen Scherkräfte, sowie zur Induktion von Zelladhäsionsmolekülen auf Endothel (blau) und Leukozyt (rot). Diese Vorgänge führen zur Adhäsion des Leukozyten am Endothel.

Ein erster Mechanismus ist die durch ET induzierte Änderung von Fluss und Scherkräften in den postkapillären Venolen, dem Ort der leukozytären Zelladhäsion. Bei einer Vasokonstriktion mindern sich mit dem Fluss in einem Gefäß gleichzeitig die Scherkräfte, die am Endothel wirken. Leukozyten werden bei reduzierten Scherkräften weniger stark von der Gefäßwand fortgerissen und können somit besser adhären. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass die Gabe von Noradrenalin, einem potenten Vasokonstriktor, trotz starker Flussminderung keine gesteigerte Zelladhäsion bewirkt (9). Andere *in vivo* Versuche zeigten, dass die alleinige experimentelle Reduktion von Fluss und Scherrate in Venolen die Adhäsion von Leukozyten nicht verstärkt, wenn keine Aktivierung von Endothel und Leukozyten hinzukommt (28, 63, 65).

In einem zweiten Mechanismus steigert Endothelin direkt die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, die die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel vermitteln. Zahlreiche *in vitro* Versuche belegen eine solche ET-Wirkung. Schon 30 Minuten nach ET-Einwirkung wird das Integrin CD18/CD11b auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten verstärkt exprimiert, was zu einer Adhäsion der Neutrophilen auf Endothelzellkulturen führt (45, 91). Dabei wird dieser Effekt durch den auf Neutrophilen fast ausschließlich vorhandenen  $ET_A$  – Rezeptor vermittelt (91). Auch auf

dem Endothel, dem Bindungspartner für die Leukozyten, kommt es unter ET-Einwirkung zu Veränderungen in der Zelladhäsionsmolekülexpression. Das Endothel besitzt v.a. ET<sub>B</sub>-Rezeptoren, kaum ET<sub>A</sub>-Rezeptoren; daher ist der ET<sub>B</sub>-Rezeptor der Vermittler der ET-Wirkungen auf das Endothel. Schon nach wenigen Minuten kommt es im Mesenterium der Ratte nach Überspülung mit ET zu einer massiven Zunahme von P-Selektin-abhängigem Rollen der Leukozyten und zu fester Leukozytenadhärenz (65). P-Selektin wird im Endothel in sogenannten Weibel-Palade-Körperchen gespeichert und kann innerhalb kurzer Zeit auf die Oberfläche transloziert werden (69). Auf diese Weise kann ET sehr schnell die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel verstärken. Endothelzellkulturen, die mit ET-1 inkubiert werden, zeigen mit einer Verzögerung von ca. 4 Stunden einen Anstieg in der Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin, der ET<sub>B</sub>-Rezeptor-abhängig ist (25, 32, 46, 91). Diese verstärkte Zelladhäsionsmolekülexpression führt zu einer verstärkten Adhäsion von Neutrophilen an diese Endothelzellkulturen (91). Die Stimulation mit ET-1 führt auf einer Kultur von fibroblastenähnlichen Synovialzellen zu der verstärkten Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und CD44, hier allerdings ET<sub>A</sub>-vermittelt (72).

In einem dritten Mechanismus steigert Endothelin die Adhäsion von Leukozyten indirekt, indem es sekundäre Mediatoren aus verschiedenen Zellen freisetzt. Mit ET-1 in vitro stimulierte Monozyten produzieren deutlich erhöhte Mengen von IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF (13) sowie PGE<sub>2</sub> (47). Endothelin kann sowohl lokal im Gewebe als auch durch systemische Zirkulation die genannten Zytokine und Mediatoren freisetzen. Viele von ihnen steigern nachgewiesenermaßen die Expression von Zelladhäsionsmolekülen und die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (1, 60). Ferner wirken einige von ihnen chemotaktisch und fördern somit die Akkumulation von Leukozyten im Gewebe. Somit ist auch eine indirekte Zelladhäsionssteigerung durch ET über die Freisetzung sekundärer Mediatoren möglich.

In welchem Ausmaß die genannten drei Mechanismen zur Adhäsion von Leukozyten an das Endothel unter ET-Einwirkung beitragen, kann aus heutiger Sicht nicht exakt abgeschätzt werden. Wahrscheinlich bewirkt ET eine Steigerung der Zelladhäsion über

die Kombination oben genannter Mechanismen, wobei die Adhäsionssteigerung wahrscheinlich v.a. über  $ET_A$  – Rezeptoren auf Leukozyten vermittelt wird.

Es scheint plausibel, dass im Rahmen einer chronischen Darmentzündung endogene Endotheline an der Hochregulation der leukozytären Zelladhäsion beteiligt sind und so den Einstrom von Leukozyten in das chronisch entzündete Darmgewebe unterhalten. Daher wurde in der vorliegenden Studie überprüft, ob die Therapie mit dem Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan die Zelladhäsion effektiv reduzieren kann und so die chronische Entzündungsaktivität mindert.

#### **1.3.4. Intravitalmikroskopie**

Die Intravitalmikroskopie bezeichnet ein Verfahren, das die Mikrozirkulation im lebenden Organismus sichtbar macht. Sie ermöglicht die Untersuchung zahlreicher mikrozirkulatorischer Parameter, wie Gefäßbreite, Kapillardichte oder Blutfluss. Besondere Bedeutung hat die Intravitalmikroskopie erlangt durch ihre Fähigkeit, die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel in Echtzeit sichtbar zu machen. Die oben geschilderten Mechanismen der Adhäsionskaskade können so visuell dargestellt und überprüft werden. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie ist das Wissen um die Vorgänge der Leukozytenadhäsion in der Mikrozirkulation in den letzten Jahren immens angewachsen. Die Intravitalmikroskopie ist das Mittel der Wahl für die Untersuchung der *in vivo* Leukozytenadhäsion unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.

Das Prinzip der Intravitalmikroskopie besteht darin, mit einem Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop in ein Gewebe hineinzufokussieren, wobei je nach Gewebe eine unterschiedliche Eindringtiefe erreicht werden kann. Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbten zellulären Blutbestandteile, wie Erythrozyten oder Leukozyten, können dann in den Gefäßen dargestellt werden.

Da für dieses Verfahren das Aufsetzen des Mikroskopes auf das entsprechende Organ oder Gewebe notwendig ist, ist es beim Menschen nur begrenzt einsetzbar, beispielsweise am Nagelbett. Im Tierversuch hingegen können verschiedenste Organe

operativ exponiert werden und so der Intravitalmikroskopie zugänglich gemacht werden.

In unserem Labor bestehen umfangreiche Erfahrungen mit der Intravitalmikroskopie. Sie wird in unserem Mikrozirkulationslabor durchgeführt am Dünndarm der Ratte (39, 61) sowie in neuerer Zeit auch am Colon der Maus (wie in der vorliegenden Arbeit). Die Intravitalmikroskopie des Darmes ermöglicht es, die Leukozytenadhäsion im Rahmen einer experimentell induzierten chronischen Entzündung sowie ihre therapeutische Beeinflussung zu untersuchen. Die Untersuchung von Ischämie/Reperfusionsschäden am Darm ist ein weiteres Anwendungsgebiet.

Ferner untersuchten wir die Mikrozirkulation der Leber (83). Hier konnten u.a. wichtige Befunde zur Mikrozirkulation und Leukozytenadhäsion in der Leber nach Ischämie/Reperfusion erhoben werden (75, 76, 80, 81, 82). In jüngster Zeit gelang einer Arbeitsgruppe unseres Labors auch der intravitalmikroskopische Nachweis einer Lebermetastasierung von Colon-Karzinomzellen im Tiermodell.

Für die Fragestellung der vorliegenden Studie, die Untersuchung des Effektes von Bosentan auf die Leukozytenadhäsion in der chronischen Colitis, ist die Intravitalmikroskopie das beste zur Zeit verfügbare Verfahren.

#### **1.4. Die Dextran Sodium Sulfat (DSS) - induzierte Colitis der Maus**

Okayasu beschrieb 1990 ein neues Modell einer akuten und chronischen Colitis der Maus, die durch orale Gabe von Dextransulfat (DSS, für engl.: Dextran- Sodium Sulphate), einem sulfatierten Polysaccharid, induziert wird (56). DSS wird dabei dem Trinkwasser der Mäuse zugesetzt, zu welchem sie freien Zugang haben. Die Gabe von DSS im Trinkwasser von Mäusen induziert innerhalb von 6-10 Tagen eine akute Colitis, die klinisch durch Gewichtsverlust, Diarrhoe und Blut im Stuhl gekennzeichnet ist. Durch die längerfristige Gabe von DSS über 7 Tage im Wechsel mit reinem Trinkwasser über 10 Tage kann eine chronische Colitis erzeugt werden (56).

Seit der Erstbeschreibung sind zahlreiche Modifikationen der DSS-Applikation vorgestellt worden, mit denen eine akute oder eine chronische Colitis induziert werden kann. Die meisten Autoren verwenden dabei DSS-Konzentrationen von 3-10 % w/v in

Wasser, entweder für 5-7 Tage zur Induktion einer akuten Colitis, oder für mehrere Zyklen zur Induktion einer chronischen Colitis, wobei ein Zyklus jeweils aus einigen Tagen DSS in Wasser gefolgt von einigen Tagen reinen Wassers besteht. Offensichtlich kann bereits ein einziger Zyklus mit DSS zu einer chronifizierten Entzündung trotz Fernbleibens der Noxe führen (12). Diese Chronifizierung ist eine Eigenschaft, die bei weitem nicht alle verfügbaren Tiermodelle der CED aufweisen (21).

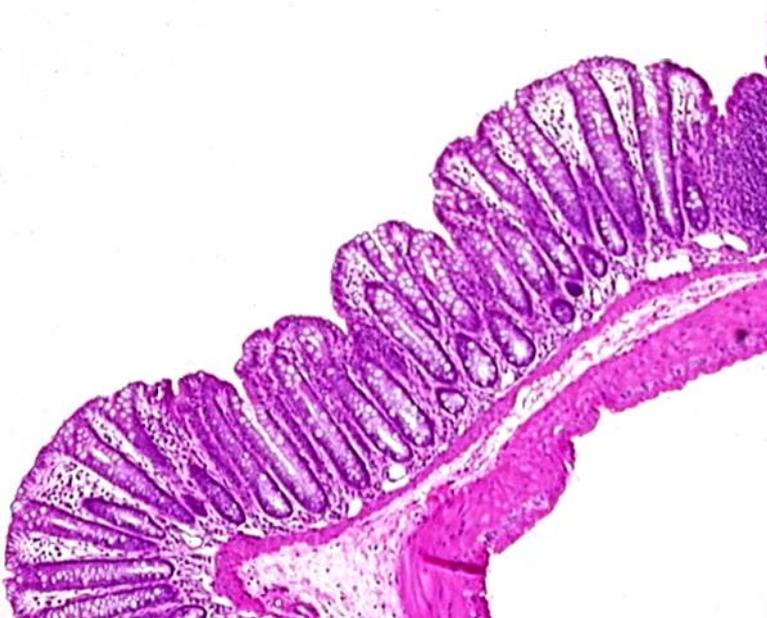
Das Colon ist sowohl bei der akuten als auch der chronischen Colitis typischerweise makroskopisch unauffällig, d.h. es sind keine Ulzerationen oder andere Läsionen zu erkennen (12). Das chronisch entzündete Colon weist jedoch im Vergleich zum gesunden Colon eine deutliche Verkürzung auf (56).

Histologisch treten während der Entzündungsinduktion mit oralem DSS im Mäusecolon typische morphologische Veränderungen auf (Tab. 1-5; Abb. 1-11, Abb. 1-12, Abb. 1-13). Auffälligstes Merkmal ist dabei die zunehmende Verkürzung der Krypten, die mit ihrer Basis nicht mehr die Lamina muscularis mucosae erreichen. Später kommt es auch zu Erosionen und zu einem zunehmenden entzündlichen Zellinfiltrat. Die Läsionen sind meist diskontinuierlich, fokale Bezirke unveränderter Schleimhaut bleiben bestehen.

Die chronische DSS-Colitis nach mehreren Zyklen DSS im Wechsel mit Wasser zeigt qualitativ die gleichen Läsionen wie die akute DSS-Colitis. Interessanterweise werden die Läsionen des Colons mit zunehmender Zahl von DSS-Zyklen immer fokaler, es gibt Areale morphologisch unveränderter Schleimhaut. Das inflammatorische Infiltrat besteht aus Neutrophilen, Lymphozyten und Plasmazellen und tritt v.a. in der Mukosa und der Submukosa auf, seltener auch fokal in der Muscularis propria. Es treten in der chronischen Colitis teilweise Zeichen einer mittel- bis hochgradigen Dysplasie auf. Auch treten Störungen der Kryptenarchitektur auf, begleitet von Lymphozyten und Plasmazellen, was der Morphologie der menschlichen Colitis ulcerosa ähnelt (12).

Tag	Histologie	Makroskopie
1	normal	normal
2	normal	
3	fokale Verkürzung der Krypten, zunächst kein inflammatorisches Infiltrat	
4	fokale Veränderungen konfluieren, mildes inflammatorisches Infiltrat aus Neutrophilen, Lymphozyten und Plasmazellen, weitere Kryptenverkürzung	
5	weiteres Konfluieren der Läsionen, erste Erosionen mit Verlust des Deckepithels, Zunahme des entzündlichen Zellinfiltrats	
6	Zunahme der Erosionen und des Zellinfiltrats	
7	Erosionen und entzündliches Zellinfiltrat erreichen ein Maximum, v.a. Mukosa und Submukosa betroffen, Fortbestehen einiger unveränderter Schleimhautbezirke	unauffällige Makroskopie; jedoch deutliche Verkürzung gegenüber gesundem Colon

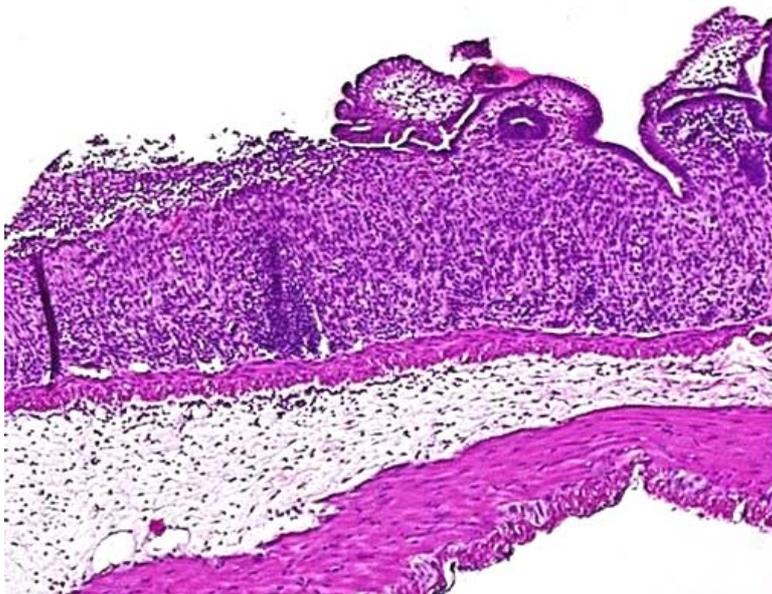
**Tab 1-5. Morphologische Charakteristika der akuten DSS-Colitis während der Entzündungsinduktion.** Gezeigt sind histologische und makroskopische Veränderungen des Mäuse-Colons während oraler DSS-Gabe (5% w/v) über 7 Tage. Typisches Merkmal ist dabei die zunehmende Verkürzung der Krypten, die nicht mehr die Lamina muscularis mucosae erreichen.



**Abb. 1-11. Histologie gesundes Colon (40X).** Gezeigt ist ein histologisches Präparat einer unbehandelten Maus der Kontrollgruppe.



**Abb. 1-12. Histologie DSS- Colitis I (40X).** Dieses Colon-Präparat zeigt typische Veränderungen der Histoarchitektur unter DSS-Gabe. Die Krypten sind in unterschiedlichem Maße verkürzt und erreichen mit ihrer Basis nicht mehr die Lamina muscularis mucosae. Stellenweise ist nur noch ein einschichtiges Deckepithel zu sehen. In der Mukosa liegt ein mäßiges inflammatorisches Zellinfiltrat.



**Abb. 1-13. Histologie DSS- Colitis II (40X).** Es sind keinerlei Krypten mehr erkennbar. In der rechten Bildhälfte ist noch ein Deckepithel vorhanden, in der linken Bildhälfte liegt eine Erosion vor. Die Mukosa ist mit einem dichten inflammatorischen Zellinfiltrat durchsetzt. Auch in der Submukosa liegen Leukozyten.

Die genaue Pathogenese der DSS-Colitis ist noch nicht vollständig geklärt. Offensichtlich schädigt DSS primär das Epithel (12) und hemmt seine Proliferationsrate und Vitalität (15). Wahrscheinlich spielt auch eine gestörte Phagozytose-Aktivität von DSS-gesättigten Makrophagen eine Rolle (56). Die akute DSS-Colitis tritt auch bei SCID-Mäusen auf (Severe Combined Immunodeficiency), so dass eine Rolle des erworbenen Immunsystems im Akutstadium unwahrscheinlich ist. Wie nach dem initialen Endothelschaden die chronische Entzündung entsteht, ist noch unklar. Bedeutung haben wahrscheinlich Makrophagen, die DSS phagozytiert haben (56), die zerstörte Epithelzellbarriere mit der Translokation von luminalen Bakterienprodukten in die Mukosa, sowie komplexe immunologische Mechanismen, die eine wichtige Rolle von T-Zellen beinhalten (16, 18, 19, 49). Die chronische DSS-Colitis spricht auf immunsuppressive Therapie an (52). Das führte zu der Hypothese, dass die akute DSS-Colitis vor allem durch Makrophagen ohne die Beteiligung von T-Lymphozyten getriggert wird (15, 19), die chronische Colitis jedoch durch aktivierte Makrophagen in Interaktion mit aktivierten T-Zellen unterhalten wird (19).

Der Verlauf der DSS-Colitis ist nicht bei allen Mäuse-Stämmen einheitlich. Während bei Swiss-Webster Mäusen die Entzündungsaktivität vor allem im mittleren Colon-Segment am stärksten ist (12), ist sie bei den in dieser Studie verwendeten balb/c Mäusen vor allem im linken Colon betont (56). Auch die klinische Aktivität der Colitis sowie die Mortalität der mit DSS behandelten Mäuse variierten erheblich zwischen den einzelnen Stämmen (12).

Für die Fragestellung dieser Studie ist die chronische DSS-Colitis der Maus hervorragend geeignet. Vorteile sind vor allem die gleichmäßige, reproduzierbare Entzündung, sowie die sichere Chronifizierung zum Zeitpunkt der durchgeführten Versuche. Es handelt sich um ein valides Modell zur Untersuchung chronischer intestinaler Entzündungen. Auf die Vorteile insbesondere gegenüber der TNBS-Colitis der Ratte, die andere Autoren zur Überprüfung von Bosentaneffekten auf intestinale Entzündungen verwendeten, wurde bereits eingegangen.

In dieser Studie wurden balb/c Mäuse verwendet. Ziel war die Induktion einer chronischen Colitis. Die von anderen Autoren verwendeten Zyklen mit 5% DSS erwiesen sich in Vorversuchen als nicht praktikabel, da der von uns verwendete Mäusestamm eine erhebliche Mortalitätsrate unter Behandlung mit 5% DSS aufwies. Das von uns verwendete Schema mit 3 Zyklen, bestehend aus jeweils 5 Tagen DSS 3% gefolgt von 5 Tagen Wasser, erwies sich in den Vorversuchen als schonende und reproduzierbare Methode der Induktion einer chronischen Colitis. Insbesondere waren die Tiere gleichmäßig krank, d.h. der Colitis-Aktivitätsgrad war zwischen den Tieren vergleichbar ausgeprägt (eigene Daten).

### **1.5. Zusammenfassung und Fragestellung**

Die Ätiologie und Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sind noch nicht vollständig geklärt. Vor allem steroidabhängige oder steroidrefraktäre Verläufe der CED bereiten noch immer klinische Probleme. Die Schwierigkeiten der konservativen und chirurgischen Therapie machen es notwendig, die Ätiopathogenese der CED weiter aufzuklären und neue Angriffspunkte pharmakologischer Therapie zu etablieren.

Neuerdings werden sogenannte Endotheline, eine Gruppe polyfunktionaler Mediatoren, mit der Ätiopathogenese der CED in Verbindung gebracht. Endotheline sind die stärksten zur Zeit bekannten Vasokonstriktoren, haben jedoch zahlreiche weitere Funktionen, die noch unvollständig aufgeklärt sind (48). Endotheline scheinen auch in der CED eine pathogenetische Rolle zu spielen. Bei Patienten mit CED ist der Plasmaspiegel von Endothelin-1 gegenüber gesunden Personen deutlich erhöht (42). Endothelinrezeptoren werden bei Patienten mit CED in erhöhter Dichte in der Darmwand exprimiert (29). Auch die Dichte endothelinpositiver Zellen in der Darmwand ist bei diesen Patienten erhöht (50).

Endotheline können ihre entzündungsfördernde Wirkung im Darmgewebe potentiell über mehrere Mechanismen ausüben, u.a. über die Induktion proinflammatorischer

Zytokine (13, 47), über die Provokation lokaler Ischämien (50) oder über die Erhöhung der Permeabilität der Darmmukosa mit nachfolgender Translokation von Antigenen in die Mukosa (57).

Besondere Bedeutung hat aber die Beobachtung, dass Endotheline die Adhäsion von Leukozyten am Endothel submukosaler Venolen des Darmes induzieren (9, 65), wahrscheinlich indem sie Zelladhäsionsmoleküle auf dem Endothel und den Leukozyten hochregulieren (25, 32, 45, 46, 72, 91). Eine gesteigerte Leukozytenadhäsion ist für die Entstehung und Aufrechterhaltung eines entzündlichen Zellinfiltrats der initiale und geschwindigkeitslimitierende Schritt (60). Endotheline könnten über die Verstärkung der leukozytären Zelladhäsion eine entscheidende Rolle für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer chronischen Darmentzündung spielen.

Der Einsatz von Endothelin-Rezeptorantagonisten könnte aufgrund dieser Befunde ein effektiver Ansatz in der Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sein. Dies sollte in der vorliegenden Studie überprüft werden.

Als Modell einer chronischen Colitis diene in dieser Studie die Dextran-Natrium-Sulfat (DSS)- induzierte Colitis der Maus. Dabei handelt es sich um ein valides Modell zur Erforschung pathogenetischer Mechanismen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (16, 19, 56). Die chronische DSS-induzierte Colitis der Maus wurde mit dem unspezifischen Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan therapiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte folgende erste Fragestellung beantwortet werden:

**Reduziert die Behandlung mit dem Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan die klinische und histologische Entzündungsaktivität der chronischen Dextran-Natrium-Sulfat-induzierten Colitis der Maus?**

---

Um diese Frage zu beantworten, wurden die Auswirkungen der Bosentan-Gabe auf die klinische und histologische Entzündungsaktivität der chronischen DSS-Colitis untersucht. Die klinische und histologische Entzündungsaktivität wurden dazu jeweils mit einem Score quantifiziert (klinischer Disease Activity Index und histologischer Colitis-Score).

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Aufklärung eines möglichen antiinflammatorischen Wirkmechanismus des Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan. Dazu wurde die Hypothese überprüft, dass die Endothelin-Rezeptorblockade mit Bosentan die Adhäsion von Leukozyten an venöses Endothel reduziert. Daher lautete die zweite Fragestellung:

**Reduziert Bosentan die Leukozyten-Endothel-Interaktion in submukosalen Venolen des chronisch entzündeten Colons?**

Für die Untersuchung des Bosentan-Effektes auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion *in vivo* wurde die Methode der sogenannten „Intravitalmikroskopie“ verwendet. Am operativ exponierten Colon der Maus konnte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Auflichtmikroskops und einer *in vivo* Fluoreszenzfärbung der zellulären Blutbestandteile die Adhäsion von Leukozyten in submukosalen Venolen direkt sichtbar gemacht werden. Das Verfahren erlaubte somit eine *in vivo* Beobachtung und Auswertung der einzelnen Phasen der Leukozyten-Endothel-Interaktion im Rahmen der chronischen Colitis sowie deren therapeutische Beeinflussung durch den Endothelin-Antagonisten Bosentan.

## 2. Material und Methode

### 2.1. Versuchstiere

Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt (Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen: G31/2000 vom 12. Mai 2000). Als Versuchstiere dienten weibliche balb/c Mäuse mit einem Gewicht von ca. 20 Gramm (Charles River Deutschland, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld). Die Haltung der Mäuse erfolgte nach dem Eintreffen in unserer Klinik in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster (Leiter: Prof. Dr. med. vet. K.-D. Richter). Jeweils zwei Mäuse wurden zusammen in einer Standard-Kunststoffbox gehalten. Die Tiere waren einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus ausgesetzt. Standard-Nahrung war den Tieren frei zugänglich. Trinkwasser bzw. Dextran-Natrium-Sulfat in Wasser zur Induktion einer Colitis wurde den Tieren in Trinkflaschen ad libitum zur Verfügung gestellt.

### 2.2. Versuchsgruppen

30 Versuchstiere wurden zufällig in folgende **3 Gruppen à 10 Tiere** aufgeteilt:

#### 2.2.1. Gesunde Kontrolle

Tiere der Gruppe „Gesunde Kontrolle“ (n=10) erhielten nur Standard-Nahrung und Trinkwasser, bevor sie ohne Vorbehandlung den Versuchen zugeführt wurden.

Bei n=10 Tieren wurde eine Intravitalmikroskopie des Colons zur Messung der Leukozyten-Endothel-Interaktion in submukosalen Sammelvenolen durchgeführt, bei n=9 Tieren wurde das Colon histologisch untersucht.

### 2.2.2. Colitis

Bei Tieren der Gruppe „Colitis“ (n=10) wurde durch zyklische Applikation von Dextran-Natrium-Sulfat (DSS) im Trinkwasser über 30 Tage eine Colitis induziert (siehe „Colitis-Induktion“). An Tag 30 der Colitis-Induktion wurden die Tiere den Versuchen zugeführt.

Bei n=10 Tieren wurde eine Intravitalmikroskopie des Colons durchgeführt. Bei n=9 Tieren erfolgte die histologische Untersuchung des Colons.

### 2.2.3. Colitis + Bosentan-Therapie

Tiere der Gruppe „Colitis + Bosentan-Therapie“ (n=10) erhielten zyklisch DSS in Wasser über 30 Tage zur Induktion einer Colitis. Während der letzten 5 Tage der Entzündungsinduktion (Tag 26-30) wurde einmal täglich Bosentan 30 mg/kg KG i.p. appliziert (siehe „Therapie mit dem Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan“).

Auch in dieser Gruppe wurde bei n=10 Tieren eine Intravitalmikroskopie des Colons durchgeführt und bei n=9 Tieren das Colon histologisch untersucht.

## 2.3. Colitis - Induktion

Zur Induktion einer chronischen Colitis erhielten die Tiere nach dem in Abb. 2-1 dargestellten Schema jeweils Trinkwasser mit oder ohne Zusatz von 3 % w/v DSS in einer Trinkflasche ad libitum. Die Behandlung erstreckte sich über drei Zyklen, wobei ein Zyklus aus 5 Tagen DSS in Wasser gefolgt von 5 Tagen Wasser ohne DSS-Zusatz bestand. An Tag 30 wurden die Tiere dem entsprechenden Versuch zugeführt (intravitalmikroskopische Untersuchung, Gewebeentnahme für Histologie).

	DSS in H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	DSS in H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	DSS in H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	Tag 30
Tag	1 bis 5	6 bis 10	11 bis 15	16 bis 20	21 bis 25	26 bis 30	Versuch
	- Zyklus 1 -		- Zyklus 2 -		- Zyklus 3 -		

**Abb. 2-1. Schema der DSS-Applikation im Trinkwasser über 30 Tage.** An Tag 30 fand der Versuch statt. Tiere der Therapiegruppe wurden an Tag 26-30 mit dem Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan behandelt.

Zur Zubereitung der Lösung von DSS in Wasser wurden 3 Gramm DSS (ICN Biomedicals, 160111 RT; Mol.-Gewicht: 40.000) in 100 ml Wasser gelöst, so dass eine Lösung von 3 % w/v entstand. 100 ml Lösung genügten erfahrungsgemäß für eine fünftägige DSS - Verabreichung eines Käfigs (= 2 Tiere).

Die Tiere wurden zu Beginn der Entzündungsinduktion auf Anzeichen einer bestehenden Erkrankung untersucht, da jede Erkrankung die Tiere vom Versuch ausschloss. Ferner wurde das Gewicht der Tiere ermittelt, um sicherzustellen, dass sie etwa 20 Gramm wogen. Jeweils zwei Mäuse wurden ab Beginn der Entzündungsinduktion in einem Käfig gehalten und am Schwanz farblich markiert. So konnten die Individuen unterschieden werden.

Der Tag nach Wägung, Kennzeichnung und Versorgung mit DSS in Wasser wurde als Tag 1 gerechnet. An Tag 5 wurde die Trinkflasche, die DSS in Wasser enthielt, gegen eine Trinkflasche mit Wasser allein ausgetauscht. Analog erfolgten die weiteren erforderlichen Umstellungen der dargebotenen Flüssigkeit.

#### **2.4. Therapie mit dem Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan**

Tiere der Gruppe „Colitis + Bosentan-Therapie“ erhielten an Tag 26 bis Tag 30 der Colitisinduktion einmal täglich eine intraperitoneale Injektion des Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan (Ro 47-0203; 4-tert-butyl-N-[6-(2-hydroxy-ethoxy)-5-(2-methoxy-phenoxy)-2,2'-bipyrimidin-4-yl]-benzenesulfonamid; Hoffman-La Roche, Basel/Schweiz). Die letzte Injektion erfolgte am Morgen von Tag 30, bevor nachmittags der Versuch durchgeführt wurde.

Für jedes Tier wurden 30 mg / kg Körpergewicht Bosentan abgewogen und in 0,1 ml Aqua ad iniectabilia gelöst. Durch Fixieren des Schwanzes der Tiere zwischen Kleinfinger und Ringfinger der rechten Hand und gleichzeitigem Greifen einer großen Nackenfalte konnten die Tiere fixiert und in eine Kopftieflage gebracht werden. Dies bewirkte eine Verschiebung des Darmes nach kranial und senkte die Gefahr, bei der anschließenden Punktion den Darm zu perforieren.

Es wurde mit einer Insulinspritze im unteren rechten Quadranten des Abdomens eingegangen und die Bosentanlösung intraperitoneal appliziert.

### 2.5. Klinischer Disease Activity Index

Die mit DSS zur Induktion einer Colitis behandelten Tiere (Gruppen „Colitis“ und „Colitis + Bosentan“) wurden täglich auf klinische Symptome der Colitis untersucht.

Die klinische Colitis-Aktivität wurde quantitativ erfasst. Dazu wurde ab Tag 1 für jedes Tier täglich ein Disease Activity Index (DAI) ermittelt (12). Der Index berücksichtigt drei Parameter: Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz und Anwesenheit von Blut im Stuhl. Die Zusammensetzung des DAI geht aus Tab. 2-1 hervor.

Punkte	Gewichtsverlust	Stuhlkonsistenz	Blutung
0	0%	gut geformt	keine
1	0 - 5 %		
2	5- 10 %	weich	Okkultes Blut
3	15 - 20 %		
4	> 20 %	Diarrhoe	Makroskopische Blutung

**Tab. 2-1. Disease Activity Index (DAI).** Der DAI ist ein zusammengesetzter Score aus den drei Parametern Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz und Blutung (12). Die Punktschritte der drei Parameter ergibt den DAI. Der Gewichtsverlust bezieht sich auf das Ausgangsgewicht der Tiere zu Beginn der Entzündungsinduktion. Stuhl galt als Diarrhoe, wenn er am Anus klebte. Die Anwesenheit einer okkulten Blutung wurde mit Hämocult<sup>®</sup>-Testbriefchen überprüft.

### 2.6. Intravitalmikroskopische Untersuchung der Leukozyten-Endothel-Interaktion im Colon

Bei n=10 Tieren jeder Versuchsgruppe wurde die Adhäsion von Leukozyten in den submukosalen Venolen des Colon descendens mit Hilfe der Intravitalmikroskopie untersucht. Vor der intravitalmikroskopischen Untersuchung eines Tieres musste dieses für die notwendige intravenöse Applikation von Farbstoffen zunächst mit einem zentralvenösen Zugang versorgt werden. Eine Punktion der Schwanzvenen war für diesen Zweck ungeeignet, da größere Volumengaben erforderlich waren.

### 2.6.1. Perioperatives Management

Für die Anlage eines zentralvenösen Zugangs sowie für die gesamte Dauer der sich anschließenden Intravitalmikroskopie wurden die Tiere anästhesiert. Zu diesem Zweck diente ein mit Isofluran (Forene<sup>®</sup>) befüllter Verdampfer (Abbott).

Zur Narkoseeinleitung wurde ein durchsichtiger Plastikbecher über die Maus gestülpt. Im Boden des Plastikbeckers befand sich eine Öffnung, durch welche die Anästhesiegase eingeleitet wurden (Verdampfer-Einstellungen: O<sub>2</sub> 0,5 l/min, N<sub>2</sub>O 1 l/min, Isofluran 2,5 Vol%). Nach Durchlaufen eines kurzen Exzitationsstadiums verlöschten die Stellreflexe des Tieres, und der Plastikbecher wurde entfernt. Über die Schnauze der Maus wurde nun ein Tubus gestülpt, der die Schnauze eng umschloss. In diesen Tubus wurde zur Fortführung der Anästhesie wiederum ein Gasgemisch geleitet (Verdampfer-Einstellungen: O<sub>2</sub> 0,15 l/min, N<sub>2</sub>O 0,3 l/min, Isofluran 1,5 Vol%). So konnte während der chirurgischen Manipulationen und der Intravitalmikroskopie eine hinreichende Analgesie und chirurgische Toleranz erreicht werden. Während des gesamten Versuchs atmeten die Tiere spontan.

Ein ca. 15 cm langer Polyethylenkatheter (Innendurchmesser: 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm; Portex Ltd., UK) wurde an einem Ende in den Plastikbecher einer Venenverweilkanüle (G 22, Firma Braun) eingeführt, so dass dieser den Katheter fest und luftdicht umschloß. Auf die Venenverweilkanüle wurde eine 1ml-Insulinspritze mit isotoner Kochsalzlösung aufgesteckt und der Katheter entlüftet.

Zum Einbringen des Katheters wurde die Maus nach der Narkoseeinleitung in Rückenlage mit dem Kopf zum Operateur auf einer elektrischen Heizplatte gelagert (Rhema-Labortechnik, Typ 8102), welche eine Temperatur von 37 °C konstant hielt. Die Maus wurde mit Klebestreifen an der Unterlage fixiert, wobei die Vorderläufe seitlich abduziert wurden, um das vordere Halsgebiet optimal darzustellen. Die Haare auf der vorderen rechten Halsseite des Tieres wurden mit Hilfe eines Keratolytikums entfernt. Es erfolgte zunächst eine mediane Hautinzision (ca. 1 cm lang), beginnend oberhalb des Jugulums in Richtung Mandibula.

Ein Operationsmikroskop (Mentor, Zeiss, Okulare: CM 15X) war für die folgenden Schritte notwendig.

Das mediane Bindegewebsseptum wurde aufgesucht und gespreizt, um die beiden auf der ventralen Halsseite liegenden großen Speicheldrüsen voneinander zu trennen. Die rechte Speicheldrüse wurde aus ihrem Bindegewebsbett befreit und vorluxiert, an ihrem apikalen Ende mit einer Naht nach kranial, in Richtung auf den Operateur gezogen und in dieser Lage fixiert. Am Hilus der Speicheldrüse zeigten sich dann bereits Äste der großen Jugularvene sowie die Jugularvene selbst. Die Jugularvene wurde in ihrem Verlauf zwischen Klavikel und Gabelung in zwei große Hauptstämme freigelegt und unterfahren. Ein Plastikspatel (ca. 5mm breit) wurde unter das Gefäß gebracht, welches auf diese Weise aus seinem Bett luxiert wurde. Diese Technik verhinderte einen retrograden Blutfluss in das freigelegte Gefäß von kaudal. Kranial, in Höhe der Gabelung in zwei große Hauptäste, erfolgte eine Ligatur des Gefäßes, am kaudalen Abschnitt wurde eine Ligatur vorgelegt, jedoch nicht zugezogen (Perma Handseide 4-0, resorbierbar). Das Gefäß konnte mit Hilfe einer kleinen Klemme an der oberen Ligatur etwas nach kranial gezogen und so unter Spannung gesetzt werden. Mit einer Mikroschere wurde das Gefäß in seiner oberen Zirkumferenz inzidiert, um das Lumen des Gefäßes darzustellen. Die Gefäßöffnung wurde mit dem Katheter intubiert und der Katheter dann vorsichtig bis hinter die Klavikel vorgeschoben. Die korrekte zentralvenöse Lage des Katheters wurde durch Anspritzen mit isotoner Kochsalzlösung und anschließendem Aspirieren von Blut überprüft. Die Lage des Katheters wurde durch Zuziehen der vorgelegten distalen Ligatur gesichert.

Eine Spülung der entstandenen Wundhöhle mit isotoner Kochsalzlösung vermied bei den folgenden intravitalmikroskopischen Untersuchungen ein Austrocknen.

### **2.6.2. Zellmarkierung**

Der Einsatz eines Auflichtmikroskops machte den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen erforderlich. In dieser Studie wurden zwei verschiedene Farbstoffe verwendet: Fluoreszein-Isothiocyant (FITC) (Sigma-Aldrich, F-1628) und Rhodamin 6G (Sigma-Aldrich, R 4127).

FITC färbt Zellen unspezifisch an. Es verbindet sich unter physiologischen Bedingungen kovalent mit Zellproteinen, insbesondere mit dem Epsilon-Aminostickstoff des Lysins (10). FITC wurde verwendet, um die einem Spendertier

entnommenen Erythrozyten zu markieren (*in vitro* Färbung). Während der Mikroskopie wurden diese dann dem Versuchstier injiziert und konnten so in dessen Gefäßen sichtbar gemacht werden.

Rhodamin 6G ist ein Farbstoff, der bis zu einer Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l selektiv Mitochondrien markiert. Grundlage dafür ist eine Salzbindung zwischen dem positiv geladenen Farbstoff und dem negativ geladenen Cardiolipin, einem integralen Bestandteil der Mitochondrienmembran (3). Angefärbt werden also alle mitochondrienhaltigen Zellen. Rhodamin 6G wurde dem Versuchstier intravenös appliziert, um seine Leukozyten zu markieren; es handelt sich also um eine *in vivo* Färbung. Da Erythrozyten und Thrombozyten keine Mitochondrien enthalten, wurden selektiv die Leukozyten des Versuchstieres, nicht aber seine Erythrozyten und Thrombozyten angefärbt.

Die Rhodamin 6G-Lösung musste vor der Applikation verdünnt werden. Dazu wurden 100 µl der vorliegenden Rhodamin 6G-Lösung (20mg/ml) in 5 ml Aqua ad iniectabilia gelöst, so dass die gebrauchsfertige Lösung eine Konzentration von 0,4 mg/ml aufwies. Die Lösung wurde gegen Lichteinfall geschützt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden.

Anders als Rhodamin 6G färbt FITC alle Zellen an, mit denen es zusammen inkubiert wird. Es handelt sich also um eine unspezifische Färbung.

Vor jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung musste bei gesunden Mäusen, die nicht am Versuch teilnahmen, Blut entnommen werden. Zu diesem Zweck wurde in Anästhesie mit einer mit Heparin befeuchteten Pasteurpipette unter leicht drehenden Bewegungen in den medialen Augenwinkel eingegangen, bis der venöse retroorbitale Plexus eröffnet war und Blut in der Pipette aufstieg. Auf diese Weise wurde einem Tier bis zu 0,5 ml Blut entnommen.

Insgesamt 2 ml Vollblut wurden von Spendertieren gewonnen und in einem 4ml Reagenzglas gesammelt. Dann wurde das Blut mit Bicine-Puffer (Bicine, SigmaUltra, Sigma-Aldrich, B-8660) gewaschen. Das Reagenzglas wurde dazu mit Bicine-Puffer auf 4 ml aufgefüllt und der Inhalt vermischt. Dann wurde die Erythrozytensuspension bei 2000 U/min 10 min zentrifugiert und der Überstand anschließend abpipettiert.

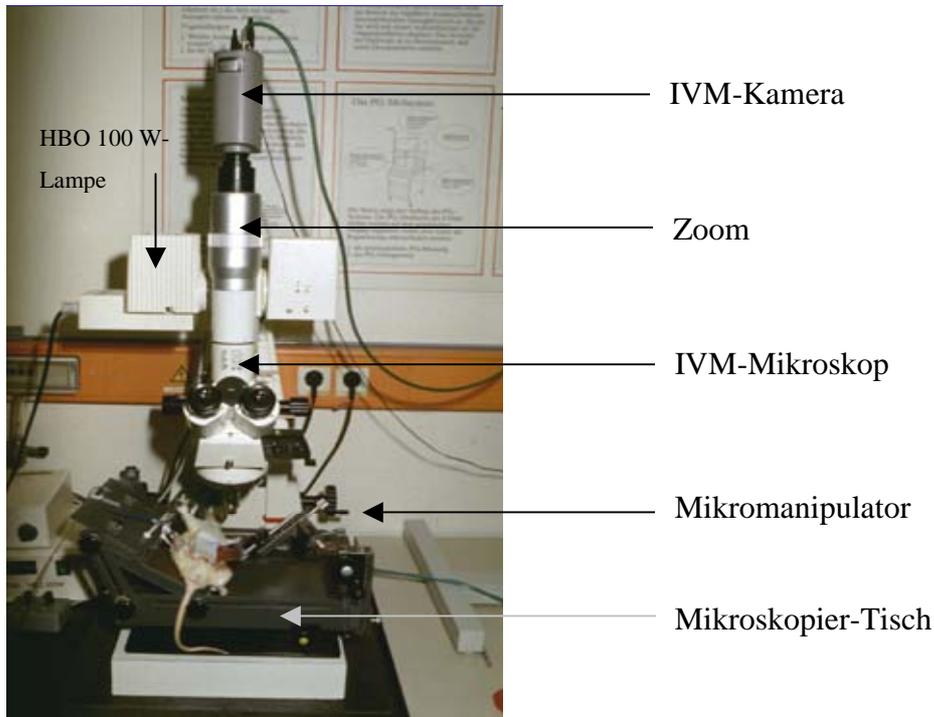
Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt. Beim dritten Mal wurde mit Alseyer's Puffer gewaschen (Apotheke des Universitätsklinikums Münster; Rezept: 1 Liter Aqua dest., 20,5 g Dextrose oder Glukose, 8,0 g Citrat (Citric acid, Trisodium Salt Dihydrat, Sigma-Aldrich C-7254), 0,55g Citrat (Citric acid, Free Acid, anhydrous, Sigma-Aldrich C-0759). Mischen, mit NaOH/HCl auf pH 6,2 und mit NaCl auf 290 mosmol einstellen).

Nun wurden pro ml gewonnener Erythrozytensuspension 9mg FITC auf einer Petrischale mit 100 µl N,N-Dimethylformamid (Sigma D-4254) gelöst und in die Erythrozytensuspension gegeben. Die Suspension wurde mit Bicine-Puffer wiederum auf 4 ml aufgefüllt. Das Reagenzglas mit der Suspension wurde nun verschlossen und lichtundurchlässig beklebt, um den Inhalt vor Lichteinfall zu schützen. Anschließend war eine Inkubationszeit von 60 min notwendig.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Erythrozytensuspension zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die Suspension wurde nun so oft mit Bicine-Puffer gewaschen, bis der nach der Zentrifugation verbleibende Überstand klar war. Nach Abpipettieren des klaren Überstands wurde die FITC-markierte Erythrozytensuspension 1 : 1 mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und lichtgeschützt unter ständigem Umwenden bei Raumtemperatur gelagert, bis sie den Versuchstieren unmittelbar vor der Mikroskopie injiziert wurde.

### **2.6.3. Intravitalmikroskopie des Colons**

Nach den oben genannten Vorbereitungen erfolgte die Lagerung des Versuchstiers unter dem Intravitalmikroskop in Rückenlage auf einer beheizten Plattform (eigene Anfertigung), welche die optimale Position des Tieres unter dem Mikroskop ermöglichte (Abb. 2-2). Die Plattform war in einem Winkel von ca. 45° gekippt, so dass der später von lateral in das Abdomen eingeführte Löffel spannungsfrei unter das Colon descendens gelangen konnte. Stellschrauben an der Plattform ermöglichten die Verschiebung des Tieres in der Horizontalen, um während der Mikroskopie den betrachteten Ausschnitt zu verändern.



**Abb. 2-2. Versuchsaufbau für die Intravitalmikroskopie.** Das laparotomierte Tier liegt auf dem in der Horizontalen beweglichen Mikroskopiertisch. Das Colon ist auf eine kleine Plattform ausgelagert, die von der rechten Bildseite kommend in das Abdomen des Tieres eingeführt wurde. Zur Mikroskopie wurde das Auflichtmikroskop auf den Darm abgesenkt. Zur Veränderung des mikroskopierten Darmabschnitts wurde das Tier mit dem Mikroskopiertisch relativ zum Objektiv bewegt. Eine am Mikroskop angebrachte Videokamera zeichnete die mikroskopierten Sequenzen für eine spätere Auswertung auf.

Nach medianer Laparotomie wurde das Dünndarmkonvolut aus der Bauchhöhle luxiert und in einem mit warmer isotoner Kochsalzlösung getränkten Lappen auf die rechte Bauchdecke des Tieres gelagert. Das retroperitoneale Colon descendens wurde mittels feuchter Stieltupfer möglichst schonend angehoben und das Peritoneum, welches das Colon mit der Hinterwand der Peritonealhöhle verband, mit einer spitzen Pinzette durchtrennt und gespreizt. Die Intravitalmikroskopie erforderte die Lagerung des Colon descendens auf einen speziell angefertigten Metalllöffel, der von der linken Seite der Maus unter das Colon gefahren wurde. Dieser Löffel war ca. 1,5 cm breit, so dass das Colon nun auf einer Strecke von ca. 1,5 cm der festen Oberfläche des Löffels auflag. Besondere Beachtung fand dabei die möglichst schonende Manipulation des Colons mit feuchten Stieltupfern. Das ausgelagerte, spannungsfreie Colon wurde mit einer ca. 2 cm

X 2cm große Cyprophanfolie bedeckt und mit warmer isotoner Kochsalzlösung überspült.

Eine Äquilibrationszeit von 20 min nach Auslagerung des Colons stellte sicher, dass die Zirkulation des Darmes sich auf einem stabilen, konstanten Niveau an die Gegebenheiten der Colonauslagerung adaptiert hatte. Während dieser Zeit sowie während der gesamten Mikroskopie wurde der Darm immer wieder mit körperwarmer Kochsalzlösung überspült, um Austrocknung und Auskühlung zu verhindern.

Zur Mikroskopie diente ein Epilumineszenz-Mikroskop (Zeiss Germany) mit Wasser-Immersion-Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 16X / 0,50 mm Wasserimmersionsobjektiv) und Okular (PL 10 x/ 20) sowie einer 100W-Quecksilber-Lampe (Osram HBO W/2, K-36169) als Lichtquelle.

Das Arbeitsprinzip dieses Mikroskops besteht darin, Licht einer bestimmten Wellenlänge auf das Präparat zu strahlen. Dazu passiert das vom Mikroskop ausgehende Licht einen Filter, welcher nur Licht einer bestimmten Wellenlänge hindurch lässt. Ein in dem Präparat befindlicher Fluoreszenzfarbstoff, der durch Licht dieser Wellenlänge angeregt wird, emittiert seinerseits Licht einer anderen (größeren) Wellenlänge. Dieses Licht wird durch das Objektiv des Mikroskops aufgenommen. Um selektiv nur das vom Fluoreszenzfarbstoff ausgehende Licht sichtbar zu machen, läßt ein zweiter Filter des Mikroskops nur das Licht der vom Fluoreszenzfarbstoff emittierten Wellenlänge passieren.

Welche Wellenlängen zur Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffs nötig sind, und welche Wellenlänge vom Farbstoff wieder emittiert wird, ist von Farbstoff zu Farbstoff unterschiedlich. Für jeden Farbstoff benötigt man daher zwei auf ihn abgestimmte Filter: einen für das Anregungslicht und einen für das vom Farbstoff emittierte Licht.

Es wurden zwei Lichtfiltersätze eingesetzt. Mit dem einen konnte selektiv der Farbstoff FITC, mit dem anderen der Farbstoff Rhodamin 6 G dargestellt werden (Filter für FITC: 450-490 / 515-565 nm; Filter für Rhodamin 6G: 510-560, >590 nm). Durch Wechsel der Filter, die in einem Schlitten untergebracht waren und somit in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht werden konnten, konnte während der Mikroskopie somit selektiv entweder der Farbstoff FITC oder der Farbstoff Rhodamin 6G dargestellt werden.

Dieses Vorgehen erlaubte es, isoliert voneinander Spendererythrozyten (durch FITC markiert) und Leukozyten (durch Rhodamin 6G markiert) in den Gefäßen des Versuchstieres zu betrachten.

Am Mikroskop war, zusätzlich zu den Okularen, die eine direkte Betrachtung des mikroskopischen Bildes erlaubten, eine Videokamera mit 0,5 Zoom angebracht (Pieper FK 6990-IQ). Die Kamera war mit einem Bildschirm (PIEPER IQM 538) verbunden, auf dem so eine 760fache Vergrößerung erreicht wurde. Auf diesen Bildschirm wurde die Anzeige eines Timers (FOR-A VTG 33) eingespielt, um die mikroskopierten Sequenzen eindeutig identifizieren zu können. Die gesamte Mikroskopie wurde mit einem Videorecorder (PANASONIC AG-7350) aufgezeichnet, um die Sequenzen später, nach Abschluss der Mikroskopie, auswerten zu können.

Unmittelbar vor Beginn der Mikroskopie erfolgte die Applikation von ca. 0,1 ml der FITC-markierten Spendererythrozyten-Suspension sowie ca. 0,1 ml Rhodamin 6G-Lösung über den zentralvenösen Katheter. Die systemische Applikation von Rhodamin 6G färbte in vivo die Leukozyten des Versuchstieres.

Nach Überspülen des mit Folie bedeckten Colon descendens mit Kochsalzlösung wurde das Objektiv des Mikroskops in der Nähe der linken Flexur auf das Colon abgeseht. Das Objektiv tauchte dabei in den Flüssigkeitsfilm auf der Folie ein (Wasser-Immersion).

Je nach Wahl der Filtersätze konnten nun die applizierten Spendererythrozyten in den Gefäßen dargestellt werden, um die Flusseigenschaften zu überprüfen, oder die gefärbten Leukozyten des Versuchstieres dargestellt werden.

Zunächst wurde der Filtersatz zur Darstellung der Spendererythrozyten verwendet. So konnten Gefäße leicht anhand der sie durchströmenden, leuchtenden Erythrozyten erkannt werden. Beim Durchfokussieren stellte sich dabei in der oberflächlichsten Ebene der Colonwand die Lamina muscularis propria dar, erkennbar an sehr kleinen, rechtwinklig zueinander verlaufenden Kapillaren, und schließlich die Submukosa. Hier befinden sich unter anderem größere Sammelvenolen mit einem Durchmesser von ca. 100 µm, welche von Arterien begleitet werden. In diese Sammelvenolen münden

zahlreiche postkapilläre Venolen mit einem Durchmesser von ca. 50  $\mu\text{m}$ , die ebenfalls von Arterien begleitet werden. Diese Venolen entsprechen 2V-Gefäßen nach Bohlen und Gore (7). Dies bedeutet, dass es sich um Gefäße zweiter Ordnung handelt, welche in größere Sammelvenolen (1V) mündeten. Die betrachteten Venolen mussten im beobachteten Abschnitt unverzweigt und gut einsehbar sein.

Zehn solcher Venolen wurden aufgesucht, indem die Plattform, auf dem die Maus gelagert war, mit den Stellschrauben bewegt wurde. Es wurde dabei von der linken Flexur weiter nach aboral in Richtung Sigmoid vorgegangen, so dass möglichst alle Abschnitte des Colon descendens mikroskopiert werden konnten.

Für jedes Gefäß wurde zunächst für ca. 30 Sekunden ein FITC-Bild aufgezeichnet, welches die Darstellung der FITC-markierten Spendererythrozyten gestattete, anschließend für ca. 60 Sekunden ein Rhodamin 6G-Bild (durch entsprechenden Wechsel des Filtersatzes). So konnten die körpereigenen Leukozyten des Versuchstieres dargestellt werden (siehe dazu Abb. 3-10 in Kapitel 3.4.). Neben frei im Strom fließenden Leukozyten konnten Leukozyten beobachtet werden, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingegangen waren und am Endothel entlang rollten oder bereits fest an ihm hafteten.

Die Notierung des Timerstandes für jede der 10 Venolen ermöglichte die spätere Identifizierung der Gefäße auf der Videoaufzeichnung.

Nachdem auf diese Weise für zehn submukosale Venolen jeweils eine Erythrozytensequenz und eine Leukozytensequenz aufgezeichnet wurden, wurde das Tier durch eine intravenöse Gabe einer Überdosis von Kalium-Chlorid sakrifiziert.

### **2.7. Auswertung der Intravitalmikroskopie**

Die aufgezeichneten intravitalmikroskopischen Bilder wurden zeitversetzt nach Abschluss der Mikroskopie ausgewertet („off-line“). Anhand des entsprechenden Timer-Standes wurden nacheinander die 10 pro Tier mikroskopierten Gefäße auf der Videoaufnahme aufgesucht. Mit Hilfe einer morphometrischen Software (AnalySIS<sup>®</sup>, Version 2.11, Soft Imaging Systems, Münster) konnten am Bildschirm eines PCs die unten aufgeführten Parameter ermittelt werden. Für alle Parameter gilt, dass zunächst ein (Mittel-)Wert für das beobachtete Gefäß errechnet wurde. Anschließend wurde aus

den 10 Werten der pro Tier mikroskopierten 10 Gefäße ein repräsentativer Mittelwert für das Versuchstier gebildet.

### 2.7.1. Mikrozirkulatorische Parameter

An 5 unterschiedlichen Stellen des mikroskopierten Gefäßes wurde der **Innendurchmesser**  $D$  [ $\mu\text{m}$ ] bestimmt.

Aus dem FITC-Bild, welches die Spendererythrozyten abbildete, wurde die **Mittelliniengeschwindigkeit**  $V_{\text{Ery}}$  [ $\mu\text{m/s}$ ] von je 5 frei im Zentrum des Gefäßes strömenden Erythrozyten pro Gefäß ermittelt, indem sie von Bild zu Bild der Aufzeichnung verfolgt wurden. Der Computer errechnete aus der zurückgelegten Entfernung und der verstrichenen Zeit die Geschwindigkeit.

Der **volumetrische Fluss** in den beobachteten Gefäßen wurde unter der Annahme einer zylindrischen Geometrie aus dem Produkt der Querschnittsfläche ( $\pi \cdot D^2/4$ ) und der mittleren Flussgeschwindigkeit  $V_{\text{mittel}}$  geschätzt (14, 28). Die mittlere Flussgeschwindigkeit  $V_{\text{mittel}}$  ergibt sich aus  $V_{\text{Ery}}$  nach der empirischen Beziehung:

$$V_{\text{mittel}} [\mu\text{m/s}] = V_{\text{Ery}} / 1.6 \quad (14)$$

Der Blutfluss  $Q$  errechnet sich dann nach der Formel

$$Q [\text{nL/min}] = V_{\text{mittel}} \cdot (D^2/4) \cdot \pi \cdot 60 \cdot 10^{-6}$$

( $D$  = mittlerer Gefäßdurchmesser in  $\mu\text{m}$ )

Die auf das Endothel einwirkende **Scher-Rate**  $SR$  wurde mit Hilfe der Newton'schen Definition berechnet als

$$SR [\text{s}^{-1}] = 8 \cdot (V_{\text{mittel}} / D) \quad (63)$$

( $V_{\text{mittel}}$  = mittlere Flussgeschwindigkeit;  $D$  = mittlerer Gefäßdurchmesser)

### 2.7.2. Leukozyten-Endothel-Interaktion

In den aufgezeichneten Sequenzen, die die mit Rhodamin 6G angefärbten Leukozyten darstellten, konnten verschiedene Grade der Kontaktaufnahme der Leukozyten mit dem Endothel der Venolen beobachtet werden. Frei im Blutstrom fließende Leukozyten wurden nicht erfasst. Bei Leukozyten, die Kontakt zum Endothel aufgenommen hatten, wurden am Endothel entlang rollende Leukozyten von permanent an einer Stelle adhärierenden Leukozyten unterschieden.

Zur Bestimmung der Anzahl der **rollenden Leukozyten** wurde eine gedachte Linie senkrecht zum Verlauf des betrachteten Gefäßes gezogen. Für 30 Sekunden wurden alle Leukozyten gezählt, die diese Linie mit einer geringeren Geschwindigkeit als die frei fließender Erythrozyten passierten.

Die beobachteten Gefäße wiesen nicht alle exakt die gleiche Breite auf, und in breiteren Gefäßen war so eine höhere Anzahl von Leukozyten zu zählen als in schmaleren. Daher wurden die ermittelten Zahlen auf ein fiktives Standardgefäß mit einer Breite von 100µm bezogen, um die unterschiedlichen Gefäßbreiten zu normieren. Dies geschah nach folgender Formel:

$$\text{Zahl rollender Leukozyten} / 30 \text{ sec} / 100\mu\text{m Gefäßbreite} = \\ (\text{beobachtete Zahl rollender Leukozyten}) \cdot 100 / (\text{gemessene Gefäßbreite in } \mu\text{m})$$

Zur Bestimmung der Zahl **permanent adhärenter Leukozyten** wurde ein Gefäßabschnitt von 100 µm Länge betrachtet. Diesem Zweck diene eine Schablone, die auf dem Auswertebildschirm einen Abstand von 100 µm anzeigte. Alle Leukozyten, die während 30 Sekunden Beobachtungszeit in diesem Gefäßabschnitt an unveränderter Stelle dem Endothel aufsaßen, wurden als permanent adhärente Leukozyten gezählt.

Auch die hier ermittelten Zahlen wurden auf das fiktive Standardgefäß von 100 µm Breite bezogen, das über eine Strecke von 100 µm beobachtet wurde. Unter der Annahme, dass mit dem Mikroskop eine flache Ebene fokussiert und beobachtet wird, betrachtet man eine Fläche von 100 µm X 100 µm = 0,01 mm<sup>2</sup>. Auf diese Standardfläche wurden mit folgender Formel alle Zahlen für permanent adhärente Leukozyten bezogen:

Zahl permanent adhärenter Leukozyten /  $0,01 \text{ mm}^2 =$

(beobachtete Zahl permanent adhärenter Leukozyten)  $\cdot 100 /$  (Gefäßbreite in  $\mu\text{m}$ )

Auf diese Weise erfolgte die Auswertung von 10 Venolen für jedes mikroskopierte Versuchstier, die somit je 10 Werte für die rollenden und permanent adhärenen Leukozyten ergab. Aus den Werten wurden die Mittelwerte berechnet, so dass sich für jedes Tier ein repräsentativer Wert für den Gehalt an rollenden und permanent adhärenen Leukozyten ergab.

Ein weiterer Parameter zur Beschreibung der Zelladhäsion war die **Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten**.

Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe der morphometrischen Software für jedes Gefäß die Geschwindigkeiten von 5 zufällig ausgewählten rollenden Leukozyten bestimmt. Dies geschah durch die Verfolgung eines rollenden Leukozyten über eine möglichst lange Strecke von Bild zu Bild der Videoaufzeichnung. Der Computer errechnete aus der vom Leukozyten zurückgelegten Distanz und der auf der Videoaufzeichnung verstrichenen Zeitspanne die Geschwindigkeit des Leukozyten.

Der Mittelwert der 5 Geschwindigkeiten wurde für jedes Gefäß gebildet, ferner ein Mittelwert der Geschwindigkeiten in den 10 Gefäßen. Dieser Mittelwert der 10 Gefäße war ein repräsentatives Maß für die Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten in dem jeweiligen Versuchstier.

## 2.8. Histologie

Bei jeweils  $n=9$  Tieren jeder Versuchsgruppe wurde das Colon histologisch begutachtet.

### 2.8.1. Asservierung des Colons für die histologische Untersuchung

Das Colon wurde in der gesamten Länge (Anus bis ileocaecaler Übergang) entnommen, vom Mesenterium gelöst und nach Längseröffnung vom Anus bis zur Appendixspitze von Stuhlresten befreit.

Das Colon wurde nun in vier Segmente geteilt. Das erste bestand aus dem Caecum mit anhängender Appendix. Das restliche Colon wurde gedrittelt und in proximales, mittleres und distales Colon geteilt. Die vier Colonssegmente wurden nun einzeln in Formalin (3.5 - 3.7 %) überführt und später in Paraffin eingebettet. Von jedem der vier Darmsegmente wurden jeweils 4 Schnitte aus verschiedenen Schnittebenen angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Auf diese Weise entstanden pro Tier 16 verschiedene Schnittebenen (4 Segmente mit jeweils 4 Schnittebenen). Auf diese Weise konnte das Colon an 16 verschiedenen Stellen repräsentativ histologisch begutachtet werden.

### **2.8.2. Histologischer Colitis-Score**

Zur Auswertung der histologischen Präparate wurde ein von Dielemann entwickelter Score zur Beurteilung der histologischen Entzündungsaktivität in der DSS-Colitis verwendet (16). Dieser Score umfasst drei Einzelkriterien:

- 1) Dichte des entzündlichen Zellinfiltrats
- 2) Tiefe der Entzündungsausdehnung in der Colonwand
- 3) Kryptenschaden.

Für jedes der drei Kriterien wurden Punktzahlen vergeben, die mit einem Faktor multipliziert wurden, der die prozentuale Beteiligung der sichtbaren Epitheloberfläche erfasste. Die Punktzahlen der drei Einzelkriterien wurden addiert. So entstand für jeden Schnitt ein Score zwischen 0 und 40 Punkten (Tab. 2-2).

Lagen verschiedene Grade einer Läsion in einem Kriterium vor, so wurde diejenige Läsion ausgewählt, welche multipliziert mit ihrem Ausdehnungsfaktor die höchste Punktzahl erbrachte. Lag beispielsweise in der Kategorie „Kryptenschaden“ eine Läsion mit einer Punktzahl von 3 vor (nur Oberflächenepithel intakt) in bis zu 25 % der auf dem Schnitt sichtbaren Epitheloberfläche ( $3 \times 1 = 3$  Punkte), gleichzeitig aber eine schwächere Läsion von 2 Punkten (basale 2/3 der Krypten defekt) in 75 % vor ( $2 \times 3 = 6$  Punkte), so kam die schwächere Läsion zur Auswertung, da sie mehr Punkte erbrachte.

Punkte	Infiltrat	Ausdehnung	Kryptenschaden
0	keines	keine	keiner
1	leicht	bis Mukosa	basales 1/3
2	mäßig	bis Submukosa	basale 2/3
3	schwer	transmural	nur Oberflächenepithel intakt
4			Kryptenverlust, Epithel zerstört
X Faktor (1 - 4)	0 - 12	0 - 12	0 - 16

beteiligte Fläche	Faktor
1 - 25 %	X 1
26 - 50 %	X 2
51 - 75 %	X 3
76 - 100 %	X 4

**Tab. 2-2. Histologischer Score (Dielemann 1998).** Die Punktzahlen in den drei Kriterien wurden einzeln jeweils nach Ausmaß der Beteiligung der sichtbaren Epitheloberfläche mit einem Faktor zwischen 1 und 4 multipliziert (maximale Punktzahl: 40 Punkte). Dabei wurde immer diejenige Läsion ausgewählt und bewertet, die multipliziert mit ihrem Ausdehnungsfaktor die höchste Punktzahl erbrachte. Die Summe der drei Einzelkriterien ergibt den Gesamtscore für den betrachteten Schnitt. „Infiltrat“: hier wurde semiquantitativ der Gehalt an Entzündungszellen im Schnitt beurteilt, verglichen mit einem gesunden Colonpräparat. „Ausdehnung“: hier wurde die Tiefenausdehnung der Entzündung bewertet, indem die tiefste noch entzündlich veränderte Schicht identifiziert wurde. „Kryptenschaden“: Hier wurde bewertet, ob die Krypten noch der Lamina muscularis mucosae aufsaßen (normal), oder ob basale Anteile fehlten bzw. Krypten völlig fehlten. Bei einer Maximalläsion fehlte auch ein bedeckendes Oberflächenepithel.

Auf diese Weise erhielt man einen histologischen Score für jeden betrachteten Schnitt. Zur Ermittlung des Scores für ein Darmsegment wurde der Mittelwert der 4 zugehörigen Schnitte gebildet. Um einen Score für das gesamte Tier zu erhalten, wurde wiederum der Mittelwert der vier Darmsegmente gebildet.

## 2.9. Statistische Methoden

Zur Beschreibung der gemessenen Werte wurden jeweils der arithmetische Mittelwert sowie die empirische Standardabweichung als Lage- und Streuungsmaß einer Stichprobe berechnet. Aus der Standardabweichung der Messwerte wurde die mittlere Abweichung des Mittelwertes (auch „Standardfehler“ genannt) berechnet nach der Formel:

$$SE = SD / \sqrt{n}$$

SE (standard error) = Standardfehler, SD (standard deviation) = Standardabweichung, n= Größe der Stichprobe.

Diese Maßzahl gibt an, wie groß die Streuung des Mittelwertes ist, der aus einer bestimmten Messreihe (Stichprobe) berechnet wurde. Je größer die Stichprobe (n), desto geringer streut der errechnete Mittelwert eines Experiments, wenn man dieses wiederholt. Die Standardabweichung hingegen gibt die Streuung der einzelnen Messwerte, nicht ihres Mittelwertes, wieder.

Alle Ergebnisse dieser Arbeit werden in der Form Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

Zum statistischen Vergleich der drei Versuchsgruppen wurde für die meisten Ergebnisse (Zelladhäsion, Geschwindigkeit rollender Leukozyten, hämodynamische Parameter der Mikrozirkulation, Histologie) der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet (26). Es handelt sich dabei um einen Rangsummentest. Dieser Test setzt Stetigkeit, jedoch keine Normalverteilung der Daten voraus und prüft die Datenverteilung in den drei zu vergleichenden unverbundenen Stichproben auf systematische Lageunterschiede. Diese Voraussetzungen sind bei den vorliegenden Daten erfüllt. Zur Feststellung von Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen wurde anschließend Dunn's Methode angewendet (26).

Für den Vergleich des durchschnittlichen Disease Activity Index der Tage 26-30 der Colitis-Induktion zwischen Colitis-Gruppe und Colitis+Bosentan-Gruppe wurde der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test verwendet (26). Es handelt sich dabei um einen nichtparametrischen Rangsummentest zum Vergleich zweier unverbundener Stichproben.

Eine Fehlerwahrscheinlichkeit 1. Art von  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.

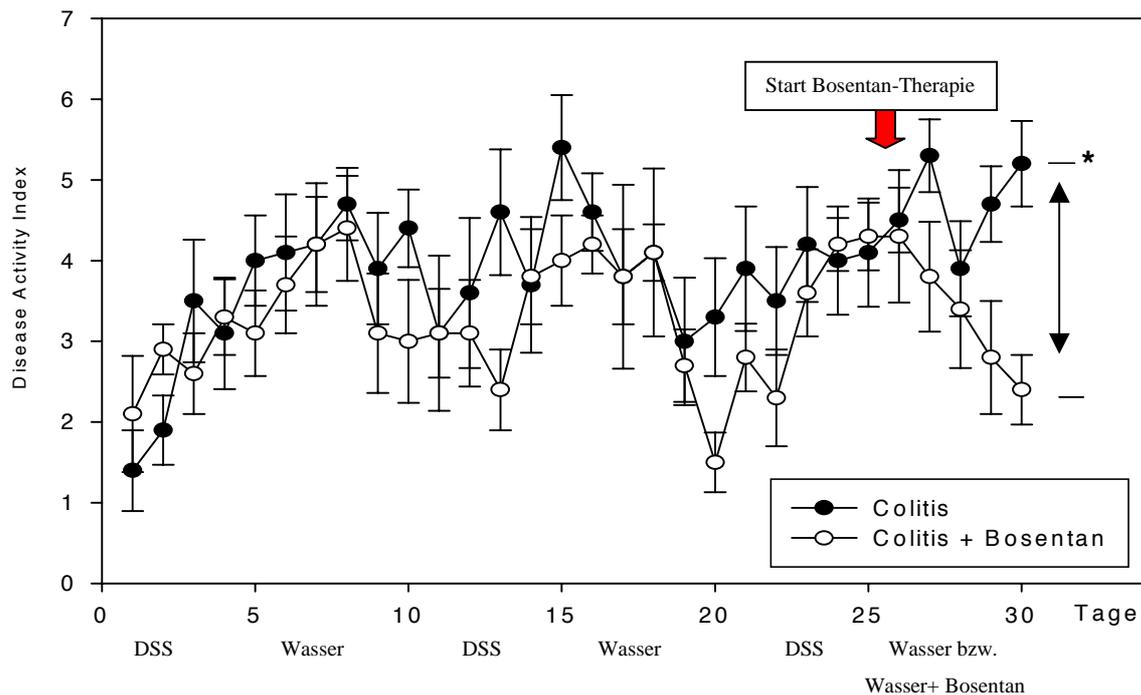
### 3. Ergebnisse

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die Bezeichnungen „Kontrolle“, „Colitis“ und „Colitis + Bosentan“ beziehen sich auf die im Methodenteil beschriebenen drei Versuchsgruppen. Bei Tieren der Gruppe „Kontrolle“ (n=10) handelte es sich um gesunde Tiere. Tiere der Gruppe „Colitis“ (n=10) wurden 30 Tage lang zyklisch mit DSS oral zur Colitis-Induktion behandelt, Tiere der Gruppe „Colitis + Bosentan“ (n=10) erhielten neben DSS während der letzten 5 Tage (Tag 26-30) der Colitis-Induktion den Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan (einmal täglich 30mg/kg KG i.p.)

#### 3.1. Klinischer Disease Activity Index

Mit DSS zur Colitis-Induktion behandelte Tiere zeigten bereits nach 1-2 Tagen erste klinische Symptome, die in der Regel aus einem weichen Stuhl bestanden. Später traten massive Diarrhoe, Gewichtsverlust und Blut im Stuhl auf. Diese Symptome wurden durch den Disease Activity Index (DAI) quantifiziert (siehe Material und Methode).

Der Disease Activity Index zeigte bei Tieren der „Colitis“-Gruppe einen angedeutet wellenförmigen Verlauf. Dabei wurde ein Maximum der Entzündungsaktivität jeweils 1-2 Tage nach Beendigung eines 5-Tage-Zyklus DSS erreicht. In den dazwischenliegenden 5 Tagen Wasser-Gabe ging der DAI zurück, ohne sich jedoch vollständig zurückzubilden (Abb. 3-1). Die Tiere der „Colitis + Bosentan“-Gruppe zeigten einen sehr ähnlichen Verlauf bis zum Einsetzen der Bosentan-Therapie. In der Phase der Bosentan-Therapie (Tag 26-30) divergierte der DAI von „Colitis“-Gruppe und „Colitis + Bosentan“-Gruppe. An Tag 30 lag der DAI der „Colitis“-Gruppe 2.17fach höher als der DAI der „Colitis + Bosentan“-Gruppe ( $p < 0.05$ ; Abb. 3-1).



**Abb. 3-1. Disease Activity Index, Verlauf über 30 Tage.** Für alle mit DSS behandelten Tiere wurde täglich ein klinischer Disease Activity Index ermittelt (siehe Material und Methode). Die Tiere wurden zur Induktion einer Colitis mit 3 Zyklen, bestehend jeweils aus 5 Tagen DSS 3% gefolgt von 5 Tagen Wasser, behandelt. Die Gruppe „Colitis + Bosentan“ wurde während der letzten 5 Tage mit Bosentan 30mg/kg i.p. einmal täglich therapiert. n = 10 Tiere pro Gruppe. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

\*:  $p < 0.05$  versus Colitis + Bosentan für die Mittelwerte Tag 26-30

## 3.2. Histologie

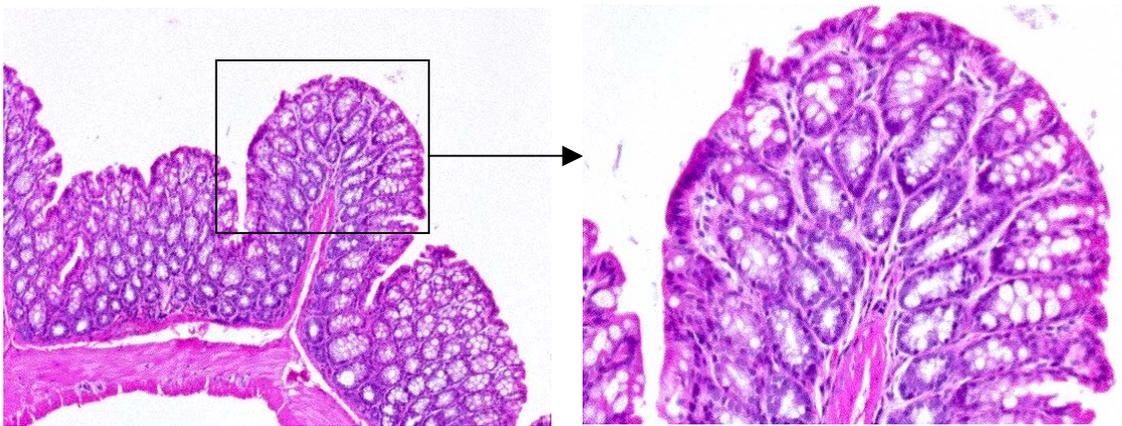
### 3.2.1. Morphologie

Die histologischen Schnitte der Tiere der Gruppe „Kontrolle“ zeigten eine regelrechte Morphologie der Colonwand (Abb. 3-2). Es wurden nur sehr selten Veränderungen der Kryptenmorphologie beobachtet. Gelegentlich fanden sich Abschnitte mit einem leichten leukozytären Infiltrat, was einen histologischen Colitis-Score  $>0$  bedeuten konnte. In der Regel jedoch fanden sich keine Zeichen einer Entzündungsaktivität.

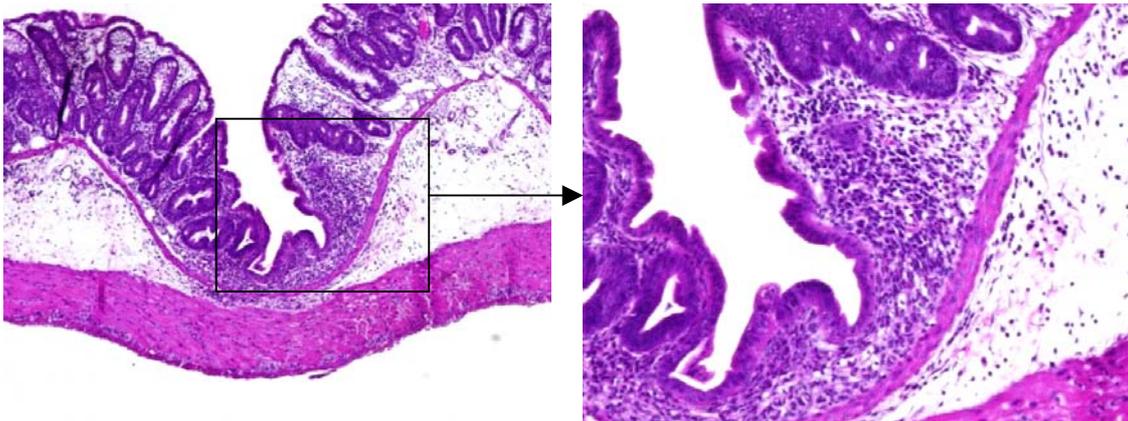
Bei Tieren der „Colitis“-Gruppe ohne Therapie fanden sich alle morphologischen Charakteristika der DSS-Colitis, die durch Cooper beschrieben wurden (12) (Abb. 3-3, 3-4, 3-5). Histologisch fanden sich teilweise dichte Infiltrate von Leukozyten, die vor allem aus Lymphozyten und Makrophagen bestanden, aber auch segmentkernige Leukozyten enthielten. Es handelte sich somit um ein Infiltrat vom chronischen Entzündungstyp. Diese Infiltrate waren vor allem betont in Mukosa und Submukosa zu

finden, in Einzelfällen war aber auch eine fokale Beteiligung der Muscularis propria zu beobachten (transmurale Entzündung). Lymphfollikel der Darmwand erschienen teilweise hyperplastisch und aktiviert, aber nicht in ihrer Zahl vermehrt. Die Morphologie des Epithels war deutlich verändert. Häufig fand sich eine Abflachung des Epithels und der darin enthaltenen Becherzellen, diese erschienen entleert. Die Krypten waren in unterschiedlichem Maße verkürzt und erreichten mit ihrer Basis nicht mehr die Lamina muscularis mucosae. Die Verkürzung war zum Teil so stark ausgeprägt, dass nur noch ein bedeckendes Oberflächenepithel vorhanden war, welches keine Krypten mehr ausbildete. Es traten auch Läsionen auf, die kein Deckepithel mehr aufwiesen, so dass eine Erosion bzw. ggf. ein Ulkus vorlag. Die Kriptenveränderungen waren vergesellschaftet mit lymphozytären Infiltraten. Abschnitte mit starker Entzündungsaktivität existierten in direkter Nachbarschaft zu Abschnitten, die histologisch nahezu unverändert schienen. Es handelte sich somit um eine diskontinuierliche Entzündung.

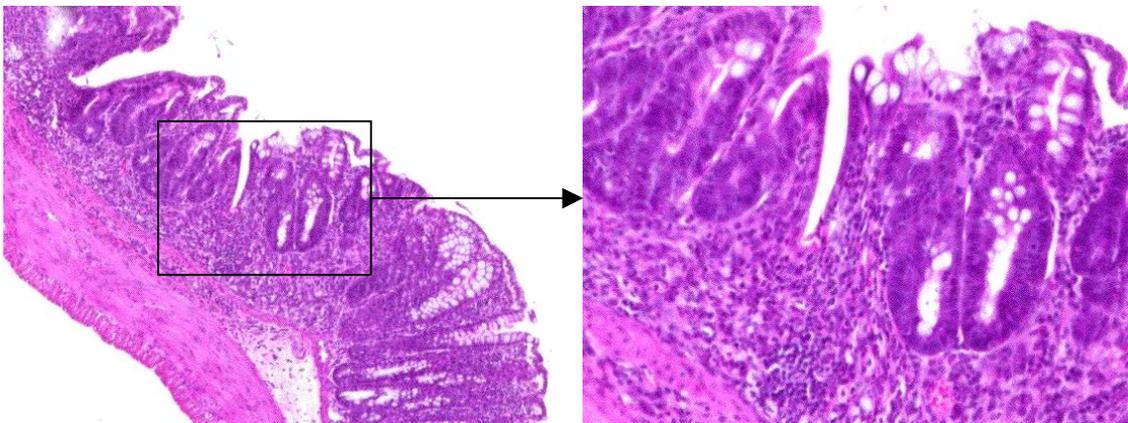
Tiere der Gruppe „Colitis + Bosentan“ zeigten prinzipiell die gleichen morphologischen Charakteristika wie Tiere der Gruppe „Colitis“, jedoch war die Entzündung insgesamt wesentlich schwächer (Abb. 3-6). Geringgradige Läsionen waren deutlich häufiger als schwergradige. Viele Abschnitte schienen morphologisch gesund.



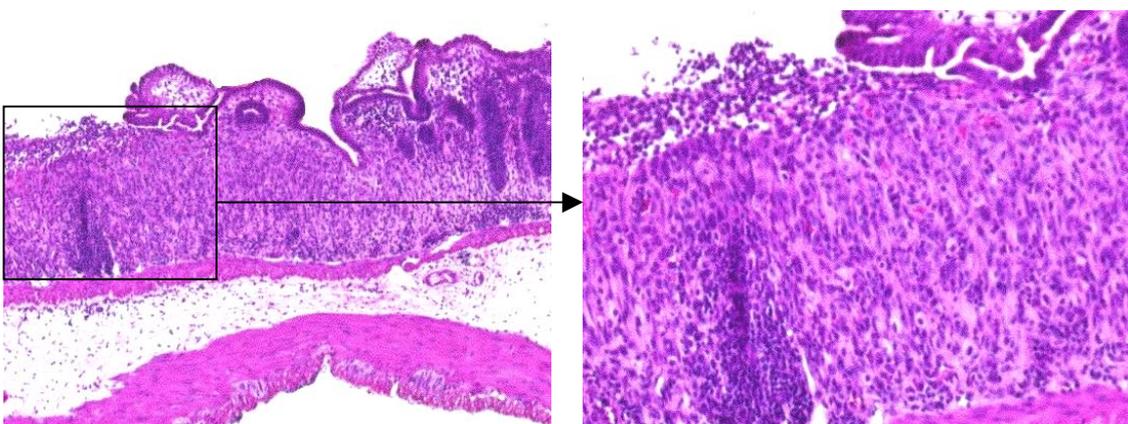
**Abb. 3-2. Histologie gesundes Colon (links 40X, rechts 100X).** Gezeigt ist ein histologisches Präparat einer unbehandelten Maus der Kontrollgruppe. Das Epithel ist nicht verändert, die Becherzellen sind nicht entleert. Die Schleimhautarchitektur ist normal, die Krypten erreichen die Lamina muscularis mucosae, es ist kein entzündliches Infiltrat zu erkennen.



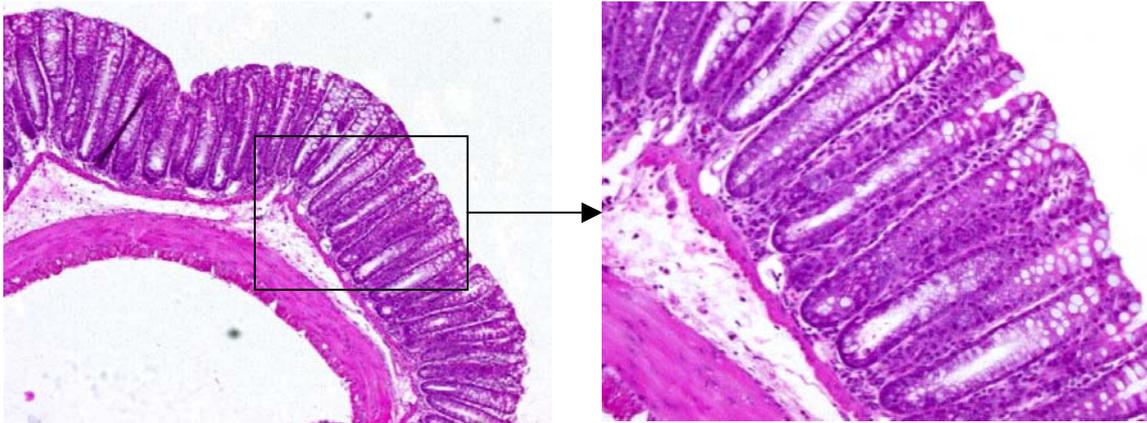
**Abb. 3-3. Histologie DSS-Colitis I (links 40X, rechts 100X).** Histologisches Colon-Präparat einer mit DSS zur Colitis-Induktion behandelten Maus. Die Becherzellen scheinen entleert. Die Krypten zeigen unterschiedliche Grade der Verkürzung. Im linken Bereich der Abbildung (geringe Vergrößerung) erreichen sie die Lamina muscularis mucosae, im rechten Bereich fehlt das untere Drittel der Krypten. In der Mitte fehlen Krypten vollständig, es ist nur ein einlagiges, eosinophiles Epithel vorhanden (starke Vergrößerung). Darunter ist ein mäßiges, hauptsächlich auf die Mukosa beschränktes entzündliches Infiltrat vorhanden.



**Abb. 3-4. Histologie DSS-Colitis II (links 40X, rechts 100X).** Dieses Präparat einer DSS-behandelten Maus zeigt eine unterschiedlich starke Kryptenverkürzung. Im mittleren Bereich der Abbildung (geringe Vergrößerung) fehlen Krypten fokal vollständig, und es ist nur ein einschichtiges, flaches Epithel vorhanden (starke Vergrößerung), welches das Stroma bedeckt. Unter der Läsion befindet sich ein mäßiges entzündliches Infiltrat, das bis in die Submukosa reicht.



**Abb. 3-5. Histologie DSS-Colitis III (links 40X, rechts 100X).** Es handelt sich hier um eine ausgedehnte Läsion mit vollständigem Verlust der Krypten. Die Mukosa ist im mittleren und rechten Bildabschnitt (geringe Vergrößerung) noch mit einem einschichtigem Epithel bedeckt, im linken Abschnitt fehlt ein Epithel (starke Vergrößerung). Es handelt sich somit um eine Erosion. Das unter dem Defekt liegende Stroma ist stark angefärbt wegen der dicht gelagerten Stromazellen und des entzündlichen Infiltrats.

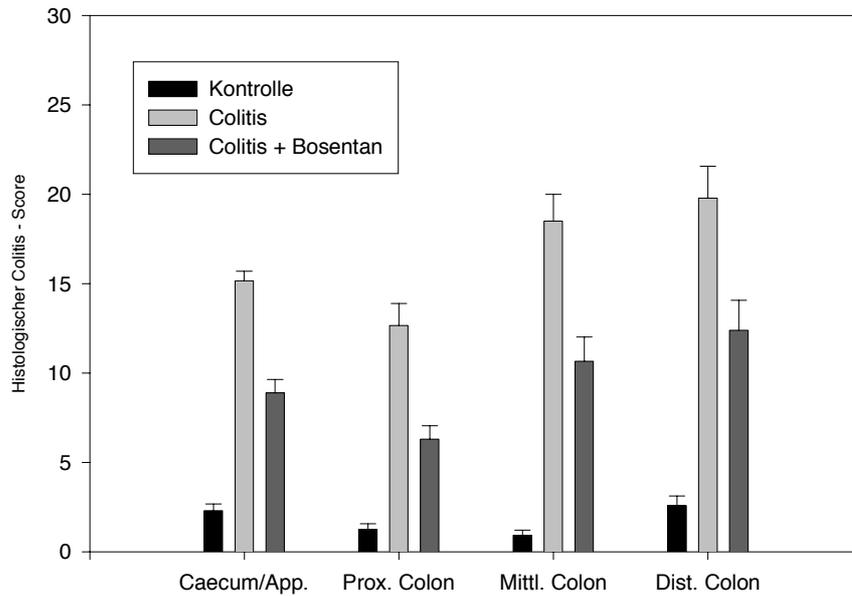


**Abb. 3-6. Histologie DSS-Colitis, Therapie mit Bosentan (links 40X, rechts 100X).** Gezeigt ist ein Colon-Präparat eines mit dem Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan therapierten Tieres. Das Epithel ist nicht verändert, Becherzellen nicht entleert. Die Schleimhautarchitektur ist normal, die Krypten erreichen die Muscularis mucosae. Es ist kein wesentliches entzündliches Infiltrat vorhanden.

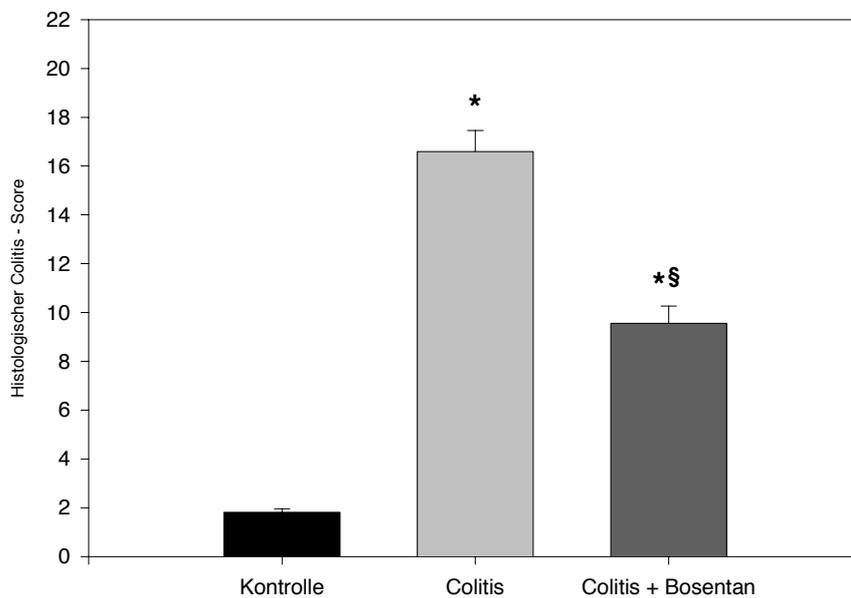
### 3.2.2. Histologischer Colitis-Score

Der histologische Grad der Colitis-Aktivität, gemessen am histologischen Colitis-Score (siehe Methoden), war bei Tieren der „Colitis“ und „Colitis+Bosentan“-Gruppe jeweils im distalen Colon am stärksten ausgeprägt (Abb. 3-7).

Der histologische Colitis-Score für das gesamte Colon (Abb. 3-8) war bei der „Colitis“-Gruppe 9.15fach größer als bei der „Kontrolle“ ( $p < 0.05$ ). Die Bosentan-Therapie reduzierte den Colitis-Score der Gruppe „Colitis+Bosentan“ gegenüber der „Colitis“-Gruppe um 42.4% ( $p < 0.05$ ), er war dennoch signifikant größer als jener der „Kontrolle“ ( $p < 0.05$ ).



**Abb. 3-7. Histologischer Colitis-Score in den verschiedenen Darmabschnitten.** Gezeigt ist der histologische Colitis-Score in den einzelnen Darmabschnitten für die drei Versuchsgruppen. n=9 Tiere pro Gruppe. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

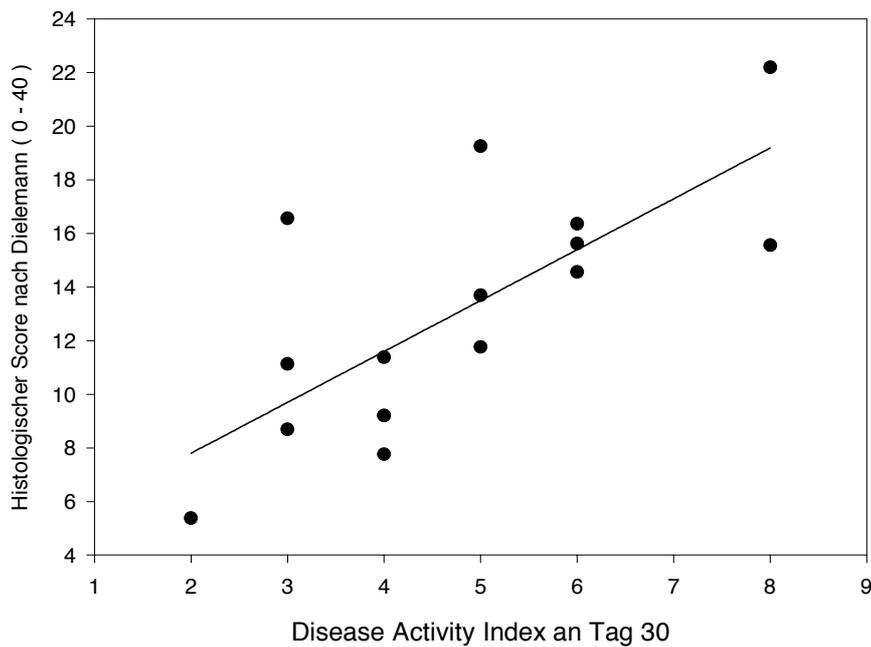


**Abb. 3-8. Histologischer Colitis-Score des gesamten Colons.** Der durchschnittliche histologische Colitis-Score, errechnet aus allen Darmabschnitten, ist für die drei Versuchsgruppen dargestellt. n=9 Tiere pro Gruppe. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

\*:  $p < 0.05$  versus Kontrolle; §:  $p < 0.05$  versus Colitis

### 3.3. Korrelation histologischer Colitis-Score mit Disease Activity Index

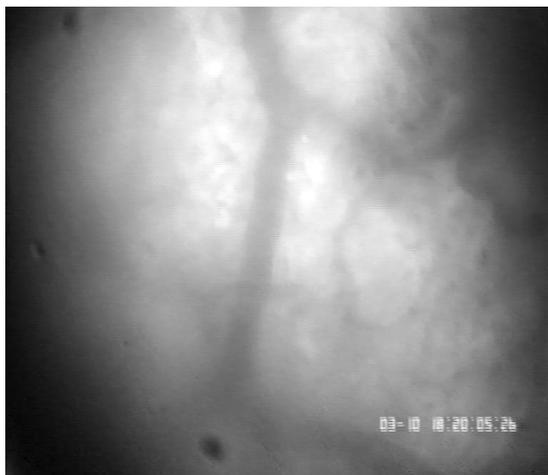
Für jedes einzelne mit DSS behandelte Tier (Gruppen „Colitis“ und „Colitis + Bosentan“) wurde ein Wertepaar bestehend aus DAI an Tag 30 und histologischem Colitis-Score ermittelt. Diese Wertepaare wurden in Abb. 3-9 aufgetragen und eine Regressionsgerade errechnet. Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0.73$ .



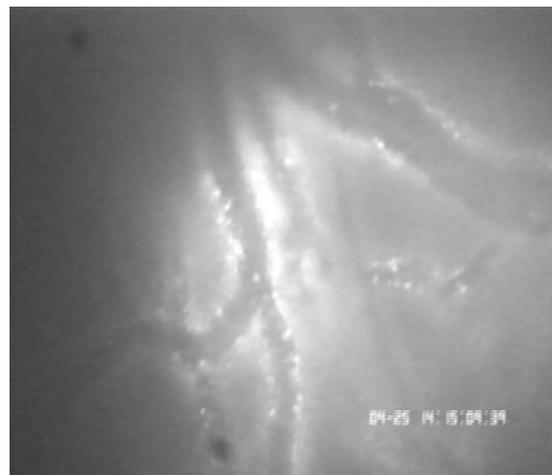
**Abb. 3-9. Korrelation Disease Activity Index (Tag 30) und histologischer Score.** DAI (Tag 30) und histologischer Score der einzelnen Tiere wurden gegeneinander aufgetragen und eine Regressionsgerade errechnet.  
 $n=26$  Tiere,  $r=0.73$ .

### 3.4. Leukozyten-Endothel-Interaktion in submukosalen Venolen des Colons

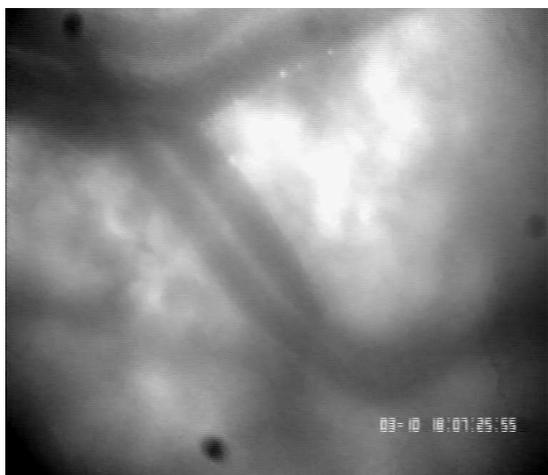
Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie konnte die Adhäsion von Leukozyten in den submukosalen Venolen des Colons sichtbar gemacht werden (Abb. 3-10).



A) Gesunde Kontrolle



B) DSS-Colitis



C) DSS-Colitis + Bosentan

**Abb. 3-10. Adhäsion von Leukozyten in submukosalen Venolen des Colons.** Gezeigt sind intravitalmikroskopische Aufnahmen. Die Gefäße sind als dunkle Strukturen gegenüber hellerem Hintergrund abgrenzbar. Adhärierende Leukozyten sind als helle Punkte zu erkennen, frei fließende sind auf den Aufnahmen nicht zu erkennen.

**A: Gesunde Kontrolle.** In dem abgebildeten Gefäß sind keine adhärierenden Leukozyten zu erkennen.

**B: DSS-Colitis.** In den abgebildeten Gefäßen sind zahlreiche am Endothel adhärierende Leukozyten zu erkennen. Es handelt sich hierbei um rollende und um fest adhärierende Leukozyten (in einer unbewegten Aufnahme nicht zu differenzieren).

**C: DSS-Colitis, Therapie mit Bosentan.** Es sind nur wenige adhärierende Leukozyten in der oberen Bildhälfte vorhanden.

#### 3.4.1. Häodynamische Parameter

Die mikroskopierten Venolen der Gruppe „Colitis + Bosentan“ zeigten gegenüber der „Colitis“-Gruppe einen größeren Durchmesser, eine größere Mittelliniengeschwindigkeit der Erythrozyten sowie einen größeren Fluss ( $p < 0.05$ ) (Tab. 3-1). Die Scher-Rate war statistisch in den drei Gruppen nicht unterschiedlich.

	Venolendurchmesser ( $\mu\text{m}$ )	Mittelliniengeschwindigkeit der Erys ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ )	Fluss (nl/min)	Scher-Rate ( $\text{sec}^{-1}$ )
<b>Kontrolle</b>	51.3 $\pm$ 1.2	1508.1 $\pm$ 81.5	124.3 $\pm$ 12.0	146.4 $\pm$ 5.5
<b>Colitis</b>	46.9 $\pm$ 1.3	1317.5 $\pm$ 53.2	88.4 $\pm$ 5.4	141.6 $\pm$ 7.4
<b>Colitis + Bosentan</b>	54.6 $\pm$ 1.0 *	1667.0 $\pm$ 49.5 *	148.3 $\pm$ 6.6 *	153.4 $\pm$ 5.9

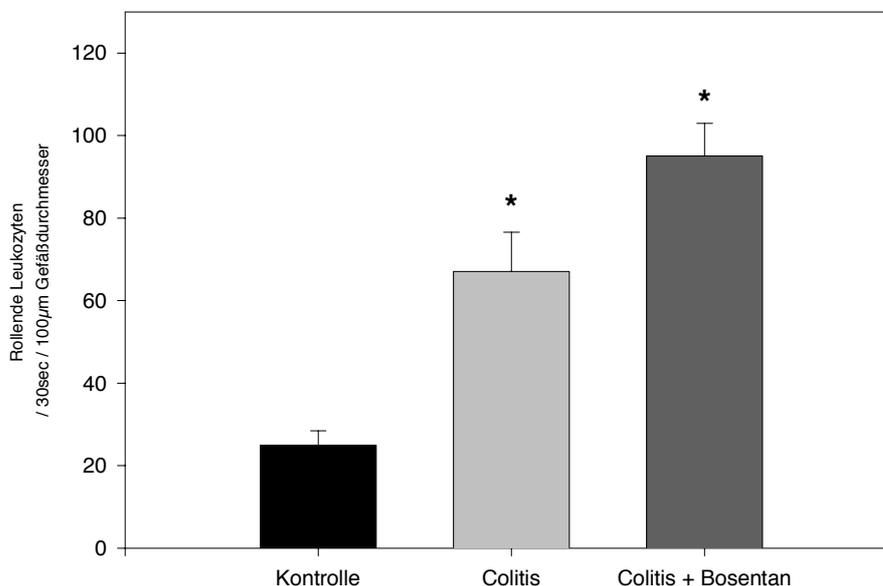
**Tabelle 3-1. Hämodynamische Parameter der Mikrozirkulation.** Angegeben sind die intravitalmikroskopisch erhobenen Parameter der Mikrozirkulation in den beobachteten Venolen.

n = 10 Tiere pro Gruppe. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

\*: p<0.05 versus Colitis

### 3.4.2. Rollende Leukozyten

Die Anzahl der in den submukosalen Venolen des Colons am Endothel entlang rollenden Leukozyten war sowohl in der „Colitis“-Gruppe (p<0.05) als auch in der „Colitis + Bosentan“-Gruppe (p<0.05) signifikant größer als in der Gruppe „Kontrolle“ (Abb. 3-11). „Colitis“ und „Colitis + Bosentan“ unterschieden sich nicht statistisch signifikant.

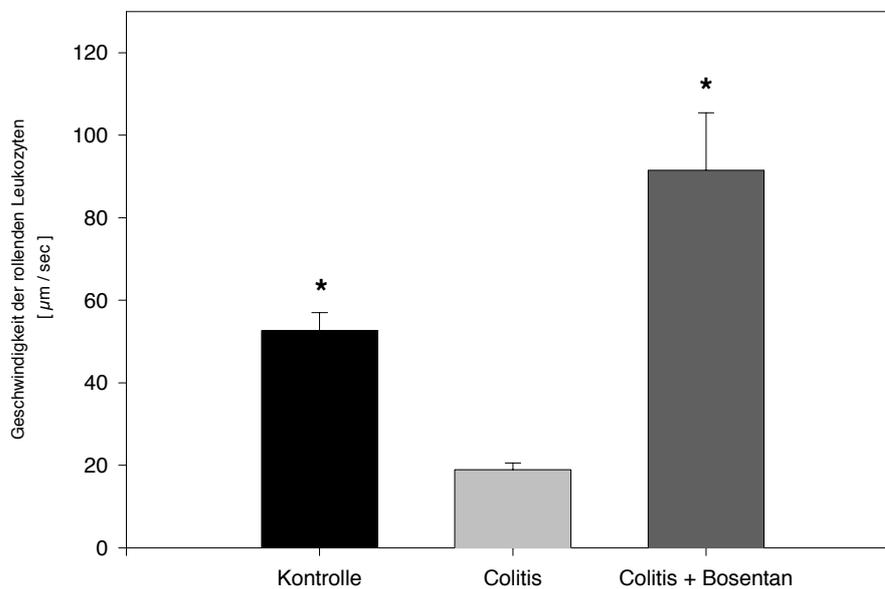


**Abb. 3-11. Rollende Leukozyten in submukosalen Venolen des Colons.** Leukozyten, die innerhalb von 30 sec eine Linie quer zum beobachteten Gefäß mit einer Geschwindigkeit kleiner als die der Erythrozyten überquerten, wurden als rollende Leukozyten gezählt. Angaben normiert auf 100µm Gefäßbreite. n=10 Tiere pro Gruppe. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

\*: p<0.05 versus Kontrolle

### 3.4.3. Geschwindigkeit rollender Leukozyten

Die Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten war in der „Colitis“ Gruppe signifikant niedriger als in den Gruppen „Kontrolle“ ( $p < 0.05$ ) und „Colitis+Bosentan“ ( $p < 0.05$ ) (Abb. 3-12). „Kontrolle“ und „Colitis+Bosentan“ unterschieden sich nicht statistisch signifikant.

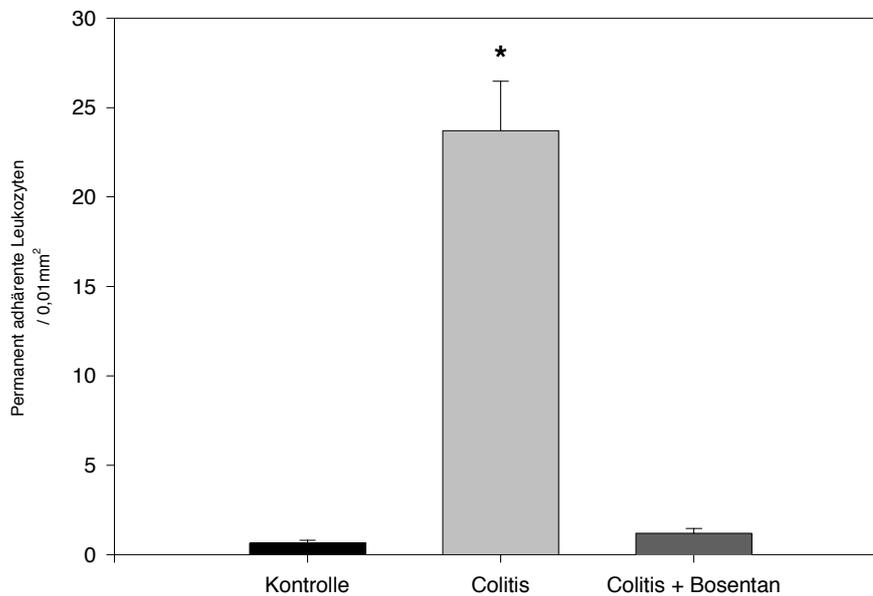


**Abb. 3-12. Geschwindigkeit rollender Leukozyten in submukosalen Venolen des Colons.** Gezeigt ist die durchschnittliche Geschwindigkeit rollender Leukozyten in den beobachteten Venolen für die drei Versuchsgruppen.  $n=10$  Tiere pro Gruppe. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

\*:  $p < 0.05$  versus Colitis

### 3.4.4. Permanent adhärenente Leukozyten

Die Anzahl der Leukozyten, die permanent am Endothel der submukosalen Venolen des Colons adhärerten, war in der Gruppe „Colitis“ signifikant größer als in den Gruppen „Kontrolle“ ( $p < 0.05$ ) und „Colitis+Bosentan“ ( $p < 0.05$ ) (Abb. 3-13). „Kontrolle“ und „Colitis+Bosentan“ unterschieden sich nicht statistisch signifikant.



**Abb. 3-13. Permanent adhärenente Leukozyten in submukosalen Venolen des Colons.** Leukozyten wurden als permanent adhärenent gezählt, wenn sie mindestens 30 Sekunden an unveränderter Stelle am Endothel hafteten. Angaben bezogen auf  $0.01\text{mm}^2$  beobachtete Fläche.  $n=10$  Tiere pro Gruppe. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler.

\*:  $p < 0.05$  versus Kontrolle und versus Colitis + Bosentan

#### 4. Diskussion

Endotheline sind als polyfunktionale Mediatoren an der Entstehung verschiedenster pathologischer Zustände beteiligt (5, 48). Mehrere Befunde legen eine Beteiligung der Endotheline an der Pathogenese der CED nahe (24, 27, 29, 42, 50). Experimentelle Befunde deuten zudem auf eine Verstärkung der Leukozyten-Endothel-Interaktion durch Endotheline hin (9, 45), wobei die Leukozytenadhäsion am Endothel ein essentieller Schritt der Entzündungspathogenese ist (60).

Vor diesem Hintergrund war die Fragestellung dieser Studie, ob der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan die Aktivität einer etablierten chronischen DSS-Colitis der Maus mindert, und ob dies mit einer Reduktion der Leukozytenadhäsion im entzündeten Colon einhergeht.

Zur Beantwortung dieser Fragen war ein Verfahren notwendig, das die Interaktion von Leukozyten mit dem venösen Endothel des Darmes in vivo erfassbar macht. Die sogenannte Intravitalmikroskopie erlaubte in dieser Studie die direkte Untersuchung dieser Interaktion in Venolen des Mäusecolons. Mit dieser aufwändigen Methode, welche das beste z.Z. verfügbare Verfahren zur Untersuchung von Leukozyten-Endothel-Interaktionen darstellt, konnte der Effekt von Bosentan auf die Adhäsion von Leukozyten am Ort der chronischen Entzündung quantitativ ausgewertet werden.

Offensichtlich sind beide Endothelin-Rezeptortypen,  $ET_A$  und  $ET_B$ , an der Verstärkung von Leukozytenadhäsion und an der proinflammatorischen Wirkung der Endotheline beteiligt. Boros zeigte, dass sowohl eine  $ET_A$  - Blockade als auch eine  $ET_B$  - Blockade die ET-induzierte Leukozytenadhäsion im Rattendarm reduziert. Er spekuliert, dass eine gleichzeitige Blockade beider Rezeptoren eine noch stärkere Adhäsionshemmung bewirken könnte (9). Auch in vitro Studien legen nahe, dass sowohl  $ET_A$  - als auch  $ET_B$ - Rezeptoren die Adhäsion von Leukozyten an Endothel verstärken können (25, 91). In Tiermodellen endothelininduzierter Schäden am Gastrointestinaltrakt und der Lunge ist die gemeinsame Blockade von  $ET_A$ - und  $ET_B$  - Rezeptoren effektiver in der Verhinderung von Gewebeschäden als der alleinige  $ET_A$  - Block (27). In einem Modell

einer akuten Pankreatitis jedoch ist die alleinige ET<sub>A</sub> - Blockade in dieser Hinsicht effektiver als der Block beider Rezeptoren (22).

In dieser Studie wurden daher beide Rezeptoren, ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub>, durch den unspezifischen Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan blockiert. Dabei handelt es sich um einen oral wirksamen Non-Peptid-Antagonisten mit einer Plasma-Halbwertszeit von 3 Stunden, der unspezifisch an ET<sub>A</sub> – und ET<sub>B</sub> – Rezeptoren antagonistisch wirkt.

Die Bosentantherapie der chronischen DSS-Colitis der Maus erfolgte in einer Dosierung von 30 mg/ kg KG (intraperitoneal) täglich, was dem oberen vom Hersteller empfohlenen therapeutischen Bereich entspricht. Hogaboam erzielte in der TNBS-Colitis der Ratte mit Dosierungen von 30-60mg Bosentan oral die beste antiinflammatorische Wirkung (27), Güllüoglu verwendete sogar 100mg oral (24). Bei Annahme von 50% oraler Bioverfügbarkeit ist die hier gewählte Dosierung also mit der von Hogaboam benutzten vergleichbar.

Das Therapieschema dieser Studie zielte auf die Behandlung einer etablierten, chronifizierten DSS-Colitis der Maus. Daher wurde die Therapie erst an Tag 26-30 der 30tägigen DSS-Applikation durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt ist die DSS-Colitis chronifiziert und durch histologische Merkmale einer chronischen Entzündung gekennzeichnet (12). So wurde die Situation einer therapeutischen Intervention bei chronisch-aktiver Colitis nachgestellt.

Die Intravitalmikroskopie zeigte in der Colitis-Gruppe ohne Bosentantherapie im Vergleich zu gesunden Tieren eine signifikant größere Anzahl permanent adhärenter und rollender Leukozyten in Venolen des Colons. Die Geschwindigkeit rollender Leukozyten war niedriger, was höhere Adhäsionskräfte zwischen Leukozyten und Endothel anzeigt (2, 44). Eine derart gesteigerte Adhäsion von Leukozyten ist typisch für chronische intestinale Entzündungen (39, 61).

In dieser Studie konnte nun erstmals belegt werden, dass Bosentan die Leukozyten-Endothel-Interaktion im Rahmen der DSS-Colitis reduziert.

Bosentan verringerte in der Therapie-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Colitis-Gruppe die Zahl permanent adhärenter Leukozyten um 95% (Abb. 3-13). Diese

Reduktion der fest adhärierenden Leukozyten auf das Niveau gesunder Tiere ist ein Schlüsselbefund dieser Studie.

Die feste Adhäsion eines Leukozyten an das Endothel ist die Voraussetzung für eine nachfolgende Extravasation in das entzündete Gewebe und für die Entwicklung eines inflammatorischen Zellinfiltrates. Eine Verminderung der festen Adhäsion von Leukozyten durch antiadhäsive Therapiestrategien führt daher zur Reduktion einer intestinalen Entzündung (39, 61, 89). Offensichtlich besitzt der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan antiadhäsive Wirkungen und kann so diesen entscheidenden Schritt der Entzündungspathogenese günstig beeinflussen.

Diese Studie kann damit einen Mechanismus der antiinflammatorischen Bosentanwirkung in chronischen Darmentzündungen aufklären: die Reduktion der Leukozytenadhäsion in submukosalen Venolen des entzündeten Darmes. Die intravitalmikroskopische Untersuchung wies klar eine antiadhäsive Potenz des Endothelin-Rezeptorantagonisten nach.

Die Anzahl rollender Leukozyten unter Bosentantherapie war allerdings statistisch nicht von der Colitis-Gruppe zu unterscheiden, sie lag trotz Therapie signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe (Abb. 3-11). Die Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten unter Bosentan-Therapie war jedoch signifikant höher als in der Colitis-Gruppe (Abb. 3-12).

Trotz gleicher Anzahl unterschieden sich die rollenden Leukozyten in der Gruppe „Colitis“ deutlich von jenen der Gruppe „Colitis + Bosentan“. Das intravitalmikroskopische Bild war qualitativ unterschiedlich. Bei untherapierten Tieren bewegten sich die Leukozyten sehr langsam, so dass sie sich teils nur durch minimale Fortbewegung von einem permanent adhären Leukozyten unterschieden (durchschnittliche Geschwindigkeit  $19.0 \pm 1.6 \mu\text{m/s}$ , gesunde Tiere  $52.7 \pm 4.4 \mu\text{m/s}$ ). Es handelte sich somit um Leukozyten, die in der Zelladhäsionskaskade bereits kurz vor der festen Adhäsion standen. In der Bosentan-therapierten Gruppe hingegen imponierten vor allem Leukozyten, die jeweils nur kurz mit dem Endothel Kontakt aufnahmen und dann saltatorisch vom Blutstrom am Endothel entlang getrieben wurden. Dies belegt die deutlich höhere Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten von

$91.5 \pm 14.0 \mu\text{m/s}$  unter Bosentan-Therapie. Diese Geschwindigkeit liegt tendenziell, wenngleich nicht signifikant, sogar über jener der gesunden Kontrolle.

Die Geschwindigkeit rollender Leukozyten ist ein anerkanntes Maß für die Adhäsionsstärke zwischen Leukozyt und Endothel (2, 44). Bei gleicher Scher-Rate am Endothel, wie in dieser Studie in allen drei Versuchsgruppen gegeben, bedeutet die hohe Rollgeschwindigkeit unter Bosentantherapie eine schwache Adhäsionskraft zwischen rollendem Leukozyten und Endothel.

Insgesamt lässt sich die Wirkung von Bosentan auf die Leukozytenadhäsion in der chronischen Colitis damit wie folgt beschreiben: Innerhalb der Kaskade vom schnell rollenden Leukozyten über den langsam rollenden zum fest adhärenen Leukozyten kam es deutlich zu einer Verschiebung zugunsten der früheren Phasen der Kaskade. Die Leukozyten befanden sich hauptsächlich in frühen Stadien der Adhäsion und erreichten die für die Extravasation notwendige feste Adhärenz zu großen Teilen nicht.

Auf welchem Wege Bosentan die leukozytäre Adhäsion im entzündeten Colon reduziert, bleibt vorerst Spekulation. Wahrscheinlich verhindert Bosentan die Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen, die durch Endotheline auf Endothel und Leukozyten induziert werden (25, 32, 45, 46, 65, 91). Denkbar ist auch eine Reduktion sekundärer Mediatoren, wie IL-1, IL-6, IL-8 oder TNF- $\alpha$ , die als Antwort auf Endothelin-Einwirkung aus Monozyten freigesetzt werden (13, 47). Viele von ihnen steigern die Zelladhäsionsmolekülexpression und die Leukozytenadhäsion (1, 60).

Man kann auch über eine Vasodilatation durch Antagonisierung der vasokonstriktiven Endothelin-Wirkungen spekulieren. Der dadurch erhöhte Blutfluss könnte dabei die Leukozytenadhäsion vermindern. Tatsächlich waren Venolendurchmesser und Blutfluss in der Bosentan-therapierten Gruppe signifikant größer als in der unbehandelten Gruppe (Tab. 3-1). Entscheidender als der Blutfluss ist jedoch die Größe der Scherkraft am Endothel, da diese Kraft der Adhäsion direkt entgegenwirkt. Sie wird meist als Scher-Rate quantifiziert. Zahlreiche Studien zeigten, dass die Zahl rollender und fest adhärenen Leukozyten sich umgekehrt zur Scher-Rate verhält: geringe Scher-Rate bedeutet starke Adhäsion (6, 28, 43, 62).

Diese Überlegungen werden jedoch hinfällig durch die überraschende Tatsache, dass die Scher-Rate in allen drei Versuchsgruppen statistisch nicht unterschiedlich war. Dies erklärt sich aus der mathematischen Herleitung der Scher-Rate (Kapitel 2.7.1.): sie bleibt bei gleichsinniger Zunahme von Gefäßbreite und Flussgeschwindigkeit gleich. Außerdem spielt die Reduktion der Scher-Rate ohnehin nur eine untergeordnete Rolle; eine alleinige Reduktion der Scher-Rate ohne Aktivierung von Endothel und Leukozyt führt nicht zu einer gesteigerten Leukozytenadhäsion (28, 63, 65).

Weitere Studien sind notwendig, um den Mechanismus der antiadhäsiven Bosentanwirkung in der DSS-Colitis genauer zu klären. Dazu könnten insbesondere der immunhistochemische Nachweis von Zelladhäsionsmolekülen in Venolen des Colons oder der Nachweis der Zelladhäsionsmolekülexpression auf Leukozyten mit Hilfe einer FACS (fluorescence activated cell sorter)-Analyse dienen. Hier wären gegebenenfalls eine verminderte Expression der Adhäsionsmoleküle unter Bosentantherapie zu erwarten. Ferner könnten durch Leukozytenseparation, *in vitro* Anfärbung und intravenöse Applikation mit der Intravitalmikroskopie verschiedene Leukozytensubpopulationen selektiv untersucht werden. Durch diese momentan in unserer Arbeitsgruppe angestrebte Weiterentwicklung kann die Aussagekraft der Intravitalmikroskopie, die zur Zeit nur alle Leukozyten gleichzeitig abbilden kann, durch zellspezifische Analysen deutlich erhöht werden.

Die Therapie mit Bosentan reduzierte die klinische Entzündungsaktivität der Colitis, gemessen mit einem Disease Activity Index (DAI), um etwa 50% (Abb. 3-1). Gewichtsverlust, Diarrhoe und Blut im Stuhl als Symptome der Colitis nahmen nach Beginn der Bosentantherapie deutlich ab.

Diese Beobachtung ist konsistent mit anderen Studienergebnissen. Hogaboam und Güllüoglu fanden eine reduzierte klinische Entzündungsaktivität der TNBS-Colitis der Ratte unter prophylaktischer oraler Bosentan-Therapie, die kurz vor oder simultan mit der Entzündungsinduktion begann (24, 27). Die Effektivität der Bosentantherapie in beiden Modellen, TNBS- und DSS-Colitis, schließt als wichtige Erkenntnis eine Modellabhängigkeit der antiinflammatorischen Bosentaneffekte aus.

Die vorliegende Studie belegt nun erstmals die therapeutische Wirksamkeit von Bosentan auch in einer etablierten chronischen Entzündung. Hogaboam bezweifelte dies, da in seiner Studie eine 60 min nach der Colitis-Induktion mit TNBS einsetzende Bosentantherapie die Entzündungsaktivität nicht signifikant reduzieren konnte (27). Dies könnte zwei Ursachen haben:

Erstens beruht die proinflammatorische TNBS-Wirkung insbesondere in den ersten Tagen nach rektaler Applikation vor allem auf einer direkten toxischen Wirkung der Trägersubstanz Ethanol auf das Colon-Epithel mit Zerstörung der Mukosabarriere. Es ist denkbar, dass Bosentan die akut-toxischen Wirkungen von TNBS in Ethanol nur bei prophylaktischer Gabe suffizient abschwächen kann. Ist die Mukosabarriere einmal gestört, so fällt der therapeutische Effekt von später appliziertem Bosentan offensichtlich schwächer aus. Der fehlende therapeutische Effekt in TNBS-Studien könnte somit modellbedingt sein. Die in dieser Studie verwendete DSS-Colitis hingegen verläuft wesentlich gleichförmiger und ohne chemisch-toxische Schädigung des Colon-Epithels. Die DSS-Colitis zeigt erst nach einigen Tagen histologisch-morphologische Veränderungen. Insgesamt erscheint die DSS-Colitis als das geeignetere Modell zur Untersuchung insbesondere chronischer Entzündungen. Sie beruht nicht auf akuter chemischer Toxizität und ergibt in dieser Studie über 30 Tage eine reproduzierbare, gleichförmige und chronische Entzündung.

Zweitens könnte allerdings auch die hier gewählte parenterale Applikation (intraperitoneal) ein Vorteil gegenüber der oralen Applikation in früheren Studien sein. Eventuell werden bei parenteraler Verabreichung zuverlässigere oder höhere Wirkspiegel erreicht. Denkbar ist zudem, dass die intraperitoneale Injektion eine erhöhte Konzentration in unmittelbarer Nähe zum entzündeten Colon erzielte und somit vorteilhaft ist.

Weitere Studien sollten die verschiedenen Applikationswege von Bosentan systematisch vergleichen, indem der Effekt auf die Entzündungsaktivität der DSS-Colitis der Maus ebenso wie pharmakologische Parameter (Plasmaspiegelverläufe) verglichen werden. In diesem Zusammenhang erscheint auch eine rektale Applikation sinnvoll, nach dem Vorbild lokaler Klysmenbehandlung der CED beim Menschen. Auf diese Weise könnten eventuell besonders hohe Wirkkonzentration direkt in der

entzündeten Colon-Mukosa erreicht werden. Mit diesen Versuchen könnte der beste Applikationsmodus gefunden werden, was insbesondere in Hinblick auf mögliche klinische Versuche eine Rolle spielt, da die tägliche intraperitoneale Injektion bei Patienten nicht als praktikabel erscheint.

Die Bosentan-Therapie senkte den histologischen Colitis-Score DSS-behandelter Tiere um 42% gegenüber der untherapierten Gruppe (Abb. 3-8). Somit konnte erstmals der Eindruck früherer Studien quantitativ bestätigt und statistisch gesichert werden, dass die histologische Entzündungsaktivität einer chronischen Colitis durch Bosentantherapie gesenkt werden kann (24, 27).

In anderen experimentellen Modellen ist der histoprotektive Effekt der Endothelin-Rezeptorblockade bereits nachgewiesen worden, so bei Brandverletzungen der Haut (4), akuter Pankreatitis (22), bei maligner Hypertonie (33, 37), Ischämie/Reperfusion der Leber (34, 75, 76) und Myokarditis (58).

Die Therapie mit Bosentan konnte keine vollständige Remission der histologischen und klinischen Entzündungsaktivität erreichen. Klinisch milde Veränderungen, wie weicher Stuhl, milder Gewichtsverlust und okkultes Blut im Stuhl blieben meist auch unter Therapie nachweisbar.

Eine vollständige Remission histologischer Veränderungen unter 5-tägiger Bosentan-Therapie wäre theoretisch durchaus denkbar gewesen, da bei Aussetzen aller Noxen die Darmmukosa über eine erhebliche Regenerationsfähigkeit verfügt. Es wird angenommen, dass eine Verletzung des oberflächlichen Epithels in Versuchstieren innerhalb von Stunden, tiefere Verletzungen der Darmwand innerhalb von Tagen heilen (21). Bei den histologischen Alterationen durch DSS handelt es sich vornehmlich um Zerstörungen der Mukosa und ihrer Krypten, so dass eine vollständige Heilung innerhalb der fünf Therapietage mit Bosentan durchaus möglich erscheint.

Es gibt wahrscheinlich mehrere Ursachen für die unvollständige Remission der histologischen und klinischen Merkmale der DSS-Colitis unter Bosentan-Therapie. Eine Ursache ist sicherlich die Tatsache, dass Endothelin nur einen von vielen in der chronischen DSS-Colitis beteiligten Faktoren darstellt. Viele immunologische Faktoren, Zytokine, zellgebundene Reaktionen, Sauerstoffmetaboliten und andere sind an der

Perpetuierung der DSS-Colitis in noch nicht genau definierter Zusammensetzung beteiligt (16, 19, 56).

Ein weiterer Grund für die nur unvollständige histologische Remission ist eventuell die direkte DSS-induzierte Hemmung der Regenerationsfähigkeit des Colon-Epithels. In Zellkulturen reduziert DSS die Proliferationsrate und die Zellvitalität von Colonepithelien in Konzentrationen, die bei oraler Applikation regelmäßig erreicht werden (15). Diese DSS-Wirkungen könnten die physiologische Mukosa-Regeneration in vivo behindern. Tatsächlich heilen durch DSS verursachte akute Mukosaschäden langsamer als durch andere Noxen ausgelöste Schäden (16). Weitere Studien sind notwendig, die den Einfluss von DSS auf die histologische Heilungspotenz in vivo erfassen. In dieser Studie zeigten mit Bosentan therapierte Tiere oft histologische Bilder, die ein regeneriertes einlagiges Epithel als Zeichen der Heilung, nicht jedoch ausdifferenzierte Krypten aufweisen. Dies könnte ein Hinweis auf eine langsame, noch nicht abgeschlossene histologische Heilung sein, die ausdifferenzierte Krypten erst nach einer längeren Therapiedauer hervorbringen würde.

Es ist denkbar, dass eine längere Therapiedauer als in dieser Studie die histologische und klinische Entzündungsaktivität weiter senken könnte. Möglich wäre eine früher (also vor Tag 26 der Entzündungsinduktion) einsetzende oder länger fortgeführte Therapie (über Tag 30 hinaus). Die Auswirkungen einer längeren Therapie in der DSS-Colitis der Maus könnten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Des weiteren ist auch der prophylaktische Einsatz von Bosentan in der chronischen Colitis relevant. Simuliert diese Studie die Therapie einer etablierten Colitis, so ist natürlich auch die Frage einer Prophylaxe oder Remissionserhaltung für den klinischen Alltag bedeutsam. Man kann spekulieren, dass die Blockade von Endothelin-Rezeptoren in einer frühen Phase der Entzündungsinitiation die Aktivität der Colitis noch effektiver unterdrückt als der hier gewählte therapeutische Einsatz. Weitere Studien zur Erprobung optimaler Therapieschemata und Dosierungen sind hier notwendig. So könnte beispielsweise die Bosentan-Behandlung niedrig dosiert bereits vor der Colitis-Induktion mit DSS begonnen werden. Erkenntnisse dieser Studien könnten prospektiv auch für die Rezidivprophylaxe des Colitis ulcerosa Patienten bedeutsam werden.

Es ist wahrscheinlich, dass neben der in dieser Studie nachgewiesenen Reduktion der Leukozytenadhäsion noch weitere Mechanismen an der antiinflammatorischen Wirkung des Endothelinantagonisten in der chronischen Colitis beteiligt sind. Endotheline fördern die Freisetzung von sekundären Mediatoren aus Leukozyten, die ihrerseits gewebeschädigend sein können (13, 47). Außerdem könnten Endotheline lokale Ischämien verursachen, ihre Bedeutung im Ischämie/Reperfusionsschaden ist gut dokumentiert (5). Schließlich steigern Endotheline die Permeabilität der Darmmukosa, wie in vivo Messungen am Rattendarm mit der Methode der Blut-zu-Lumen Clearance von  $^{51}\text{Cr}$ -EDTA nahelegen (57). Es ist denkbar, dass durch diese Permeabilitätserhöhung die Aufnahme von Antigenen von luminal begünstigt wird. Eine solche verstärkte Antigentranslokation in das Gewebe wird auch bei der menschlichen CED als pathogenetischer Faktor angesehen (55).

Eine Endothelin-Rezeptorblockade könnte potentiell alle diese Mechanismen unterbrechen.

In weiteren Untersuchungen, beispielsweise mittels Bestimmung der Mediatorenkonzentrationen im Gewebe, Nachweis von Sauerstoffradikalen oder Permeabilitätsmessungen, könnte die Bedeutung dieser Mechanismen in der DSS-Colitis weiter präzisiert werden. Insbesondere die Messung der Endothelin-Konzentrationen in Gewebe und Serum, und auch die immunhistochemische Erfassung der Endothelin-Rezeptordichte im Zeitverlauf kann weitere Aufschlüsse über die Wirkungsweise von Bosentan liefern.

Bei verschiedenen Krankheitsbildern mit pathologischen Endothelin-Konzentrationen in Gewebe oder Serum wurde Bosentan bereits erfolgreich in klinischen Versuchen eingesetzt. In Phase I Studien an gesunden Probanden erwies sich Bosentan als für den Menschen gut verträgliches, oral bioverfügbares Pharmakon (84, 85). Positive klinische Erfahrungen mit Bosentan stammen vor allem aus der Therapie von kardiologisch-angiologischen Krankheitsbildern, wie symptomatischer Herzinsuffizienz (23, 53, 77), primärem pulmonalen Hypertonus (11, 87), koronarer Herzkrankheit (86) oder essentieller Hypertonie (40).

Diese guten Erfolge der klinischen Bosentantherapie, die vorliegenden Hinweise auf eine Beteiligung der Endotheline in CED, und die Befunde tierexperimenteller Studien

---

wie der vorliegenden legen in der Zusammenschau die klinische Prüfung von Bosentan bei CED nahe.

Zunächst muss aber anhand weiterer tierexperimenteller Studien, beispielsweise anhand des in dieser Studie verwendeten Modells, das bestmögliche Therapieschema erarbeitet werden. Dabei muss die Evaluation prophylaktischer Anwendung und therapeutischer Anwendung gleichermaßen berücksichtigt werden. Da die orale Anwendung beim Menschen wesentlich besser verträglich ist als die parenterale, sollte auch die Wirksamkeit von Bosentan bei oraler Anwendung weiter abgesichert werden.

Dann sollte Bosentan in ersten Phase II Versuchen beispielsweise bei steroidrefraktären Verläufen von Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa oral eingesetzt werden. Bei positiven Ergebnissen wären dann auch Protokolle denkbar, die eine Rezidivprophylaxe und Remissionserhaltung berücksichtigen. Es ist möglich, dass Bosentan durch die effektive Senkung der Leukozytenadhäsion den Nachstrom von Leukozyten in entzündetes Darmgewebe primär verhindert und so einen Stellenwert in der Remissionserhaltung und Rezidivprophylaxe einnimmt. Bei guter Wirksamkeit könnte Bosentan nebenwirkungsreichere Medikamente supplementieren oder gar ersetzen.

Zusammengefasst zeigt diese Studie, dass der Endothelin-Rezeptorantagonist Bosentan die histologische und klinische Aktivität der chronischen DSS-Colitis der Maus deutlich senkt. Die Bosentan-Therapie reduzierte die Adhäsion von Leukozyten an venöses Endothel des Colons. Diese antiadhäsive Wirkung ist wahrscheinlich wesentlich verantwortlich für die antiinflammatorische Wirkung des Bosentan. Die vorliegenden Befunde legen eine klinische Prüfung von Endothelin-Rezeptorantagonisten in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nahe.

## 5. Zusammenfassung

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, stellen mit einer Inzidenz von 5.6 bzw. 10.4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr ein relevantes Krankheitsbild in Europa dar. Die Ätiologie und Pathogenese der CED sind noch unvollständig bekannt, diskutiert werden genetische Faktoren, Umweltfaktoren, infektiöse Faktoren sowie Alterationen des lokalen intestinalen Immunsystems.

Endotheline, eine Gruppe vasokonstriktorischer Mediatoren mit proinflammatorischer Wirkung, sind wahrscheinlich an der Pathogenese der CED beteiligt. Endotheline verstärken in tierexperimentellen Studien die Adhäsion von Leukozyten an venöses Endothel des Darmes. Die Adhäsion an das Endothel verläuft dabei in einer Kaskade, die aus initialem Rollen entlang des Endothels, anschließender permanenter Adhärenz und schließlich der Emigration der Leukozyten in das Gewebe besteht. Die Leukozytenadhäsion ist ein initialer und geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Entstehung eines entzündlichen Zellinfiltrats und hat somit eine Schlüsselfunktion für die Entzündungsentstehung und –perpetuierung.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der Studie, die Wirkung des Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan auf die Aktivität einer chronischen Colitis sowie auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion im entzündeten Colon zu untersuchen.

Als Modell einer chronischen Colitis diente die Dextran-Natriumsulfat (DSS)-induzierte Colitis der Maus (Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen: Aktenzeichen G31/2000 vom 12.5.2000). Es wurden drei Versuchsgruppen gebildet: Die erste Gruppe bestand aus gesunden Tieren ohne Colitis (n=10), die zweite aus Tieren mit einer über 30 Tage mit DSS induzierten Colitis (n=10). Die dritte Gruppe wurde ebenfalls mit DSS behandelt, die Colitis aber mit dem Endothelin-Rezeptorantagonisten Bosentan an Tag 26-30 der Colitisinduktion behandelt (n=10). Die gesunden Tiere wurden ohne Vorbereitung untersucht, die übrigen Tiere jeweils an Tag 30 der Entzündungsinduktion. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie, die die Adhäsion von Leukozyten an venöses Endothel in vivo sichtbar macht, wurde die Zahl rollender bzw. fest adhärenter Leukozyten in den submukosalen Venolen des Colons erfasst und die Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten als Maß für die

Adhäsionsstärke gemessen. Ferner wurde die klinische und die histologische Colitis-Aktivität aller Tiere jeweils mit einem Score quantifiziert (klinischer Disease Activity Index und histologischer Colitis-Score).

Die Colitis-Induktion mit DSS führte zu klinischen Symptomen einer Colitis, die mit dem Disease Activity Index erfasst wurden ( $5.2 \pm 0.5$  Punkte), sowie zu einer ausgeprägten histologischen Entzündungsaktivität, gemessen am histologischen Colitis-Score ( $16.6 \pm 0.9$  vs.  $1.8 \pm 0.1$  Punkte bei gesunden Tieren;  $p < 0.05$ ). Die mit DSS behandelten Tiere wiesen intravitalmikroskopisch im Vergleich zu gesunden Tieren eine massiv erhöhte Zahl fest adhärenter und rollender Leukozyten auf ( $23.7 \pm 2.8$  vs.  $0.6 \pm 0.1$  adhärente Zellen/ $0.01\text{mm}^2$  bzw.  $67.1 \pm 9.5$  vs.  $25.0 \pm 3.5$  rollende Zellen/ $30\text{sec}/100\mu\text{m}$  Gefäßdurchmesser; jeweils  $p < 0.05$ ), und die rollenden Leukozyten waren langsamer ( $19.0 \pm 1.6$  vs.  $52.7 \pm 4.4 \mu\text{m}/\text{sec}$ ;  $p < 0.05$ ).

Die Therapie mit Bosentan führte gegenüber der unbehandelten Colitis zu einer deutlich reduzierten klinischen ( $2.4 \pm 0.4$  vs.  $5.2 \pm 0.5$  Punkte;  $p < 0.05$ ) und histologischen Entzündungsaktivität ( $9.6 \pm 0.7$  vs.  $16.6 \pm 0.9$  Punkte;  $p < 0.05$ ). Der histologische Colitis-Score war allerdings trotz Therapie noch signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe ( $p < 0.05$ ), es wurde also keine komplette histologische Remission erreicht. Die Zahl fest adhärenter Leukozyten war deutlich geringer ( $1.2 \pm 0.3$  vs.  $23.7 \pm 2.8$  adhärente Zellen/ $0.01\text{mm}^2$ ;  $p < 0.05$ ). Die Zahl rollender Leukozyten unterschied sich statistisch nicht zwischen therapierten und untherapierten Tieren ( $95.0 \pm 7.9$  vs.  $67.1 \pm 9.5$  rollende Zellen/ $30 \text{ sec}/100\mu\text{m}$  Gefäßdurchmesser; N.S.), ihre Geschwindigkeit war unter Bosentantherapie jedoch deutlich höher ( $91.5 \pm 14.0$  vs.  $19.0 \pm 1.6 \mu\text{m}/\text{sec}$ ;  $p < 0.05$ ).

Diese Studie zeigt, dass Bosentan die klinische und histologische Entzündungsaktivität der chronischen DSS-Colitis der Maus effektiv senkt. Bosentan reduzierte die Adhäsionsaktivität von Leukozyten in Venolen des Colons. Dieser antiadhäsive Effekt ist wahrscheinlich wesentlich für die antiinflammatorische Wirkung von Bosentan verantwortlich. Die erhobenen Befunde legen eine klinische Prüfung von Endothelin-Rezeptorantagonisten als Therapie der CED nahe.

---

**Literaturverzeichnis**

- (1) Arndt H, Bolanowski MA, Granger DN (1996) Role of interleukin 8 on leucocyte-endothelial cell adhesion in intestinal inflammation. *Gut* 38: 911-915
- (2) Atherton A, Born GVR (1972) Quantitative investigation of the adhesiveness of circulating polymorphnuclear leukocytes to blood vessel walls. *J Physiol Lond* 222: 447-474
- (3) Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F (1995) Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of Rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 15 (2): 85-91
- (4) Battal MN, Hata Y, Matsuka K, Ito O, Matsuda H, Yoshida Y, Kawazoe T (1997) Reduction of progressive burn injury by using a new nonselective endothelin-A and endothelin-B receptor antagonist, TAK-044: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg* 99: 1610-1619
- (5) Battistini B, Dussault P (1998) The many aspects of endothelins in ischemia-reperfusion injury: Emergence of a key mediator. *J Invest Surg* 11 (5): 297-313
- (6) Bienvenue K, Granger DN (1993) Molecular deteminants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *Am J Physiol* 264 (Heart Circ Physiol 33): H1504-H1508
- (7) Bohlen HG, Gore RW (1976) Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies. *Microvasc Res* 11: 103-110
- (8) Borley NR, Mortensen NJ, Jewell DP (1997) Preventing postoperative recurrence of Crohn´s disease. *Br J Surg* 84 (11): 1493-1502

- 
- (9) Boros M, Massberg S, Baranyi L, Okada H, Messmer K (1998) Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology* 114: 103-114
- (10) Butcher EC, Weissman IL (1980) Direct fluorescent labeling of cells with fluorescein or rhodamine isothiocyanate. *J Immunol Methods* 37: 97-108
- (11) Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ (2001) Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 358: 1119-1123
- (12) Cooper HS, Murthy SNS, Shah RS, Sedergran DJ (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory Investigation* 69 (2): 238-249
- (13) Cunningham ME, Huribal M, Bala RJ, McMillen MA (1997) Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. *Crit Care Med* 25 (6): 958-964
- (14) Davis MJ (1987) Determination of volumetric flow in capillary tubes using an optical doppler velocimeter. *Microvascular Research* 34: 223-230
- (15) Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO (1994) Dextran Sulfate Sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* 107: 1643-1652
- (16) Dieleman LA, Palmen MJHJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SGM (1998) Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 114: 385-391

- 
- (17) Duggan AE, Stack W, Hull M, Filipowicz B, Knifton A, Crome R, Weber C, Bishop A, Polak J, Hawkey CJ (1999) Protection against aspirin-induced human gastric mucosal injury by bosentan, a new endothelin-1 receptor antagonist. *Aliment Pharmacol Ther* 13: 631-635
- (18) Egger B, Carey HV, Procaccino F, Chai N-N, Sandgren EP, Lakshmanan J, Buslon VS, French SW, Büchler MW, Eysselein VE (1998) Reduced susceptibility of mice overexpressing transforming growth factor  $\alpha$  to dextran sodium sulphate induced colitis. *Gut* 43: 64-70
- (19) Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inghin R, Eysselein VE, Büchler MW (2000) Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* 62: 240-248
- (20) Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS (1990) Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med* 172 (6): 1741-1748
- (21) Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH (1995) Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109: 1344-1367
- (22) Foitzik T, Eibl G, Buhr HJ (2000) Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: comparison of delayed therapy with ICAM-1 antibodies and a specific endothelin A receptor antagonist. *J Gastrointest Surg* 4 (3): 240-247
- (23) Givertz MM, Colucci WS, LeJemtel TH, Gottlieb SS, Hare JM, Slawsky MT, Leier CV, Loh E, Nicklas JM, Lewis BE (2000) Acute endothelin A receptor blockade causes selective pulmonary vasodilation in patients with chronic heart failure. *Circulation* 101 (25): 2922-2927

- 
- (24) Güllüoğlu BM, Kurtel H, Güllüoğlu MG, Yegen C, Aktan AÖ, Dizdaroğlu F, Yalin R, Yegen BC (1999) Role of endothelins in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Digestion* 60: 484-492
- (25) Hayasaki Y, Nakajima M, Kitano Y, Iwasaki T, Shimamura T, Iwaki K (1996) ICAM-1 expression on cardiac myocytes and aortic endothelial cells via their specific endothelin receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun* 229 (3): 817-824
- (26) Heinecke A, Hultsch E, Repges R (1992) *Medizinische Biometrie: Biomathematik und Statistik*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- (27) Hogaboam CM, Muller MJ, Collins SM, Hunt RH (1996) An orally active non-selective endothelin receptor antagonist, bosentan, markedly reduces injury in a rat model of colitis. *Eur J Pharmacol* 309 (3): 261-269
- (28) House SD, Lipowsky HH (1987) Leukocyte-endothelium adhesion: microhemodynamics in mesentery of the cat. *Microvasc Res* 34 (3): 363-379
- (29) Hudson M, Dashwood MR, Pounder RE, Wakefield AJ (1994) [<sup>125</sup>I] Endothelin-1 binding in normal human intestine and in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 106 (4): A239 (AGA-Abstract)
- (30) Huribal M, Kumar R, Cunningham ME, Sumpio BE, McMillen MA (1994) Endothelin-stimulated monocyte supernatants enhance neutrophil superoxide production. *Shock* 1 (3): 184-187
- (31) Inagaki H, Bishop AE, Escrig C, Wharton J, Allen-Mersh TG, Polak JM (1991) Localization of endothelinlike immunoreactivity and endothelin binding sites in human colon. *Gastroenterology* 101 (1): 47-54

- 
- (32) Ishizuka T, Takamizawa-Matsumoto M, Suzuki K, Kurita A (1999) Endothelin-1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor  $\alpha$ -stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 369: 237-245
- (33) Karam H, Heudes D, Bruneval P, Gonzales M-F, Loffler B-M, Clozel M, Clozel J-P (1996) Endothelin antagonism in end-organ damage of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 28 (3): 379-385
- (34) Kitayama Y, Yamanaka N, Kawamura E, Kuroda N, Okamoto E (1997) Hepatoprotective effect of the endothelin receptor antagonist TAK-044 against ischemia-reperfusion injury in the canine liver. *Hepatology* 25: 938-942
- (35) Kitsukawa Y, Gu Z-F, Hildebrand P, Jensen RT (1994) Gastric smooth muscle cells possess two classes of endothelin receptors but only one alters contraction. *Am J Physiol* 266 (Gastrointest Liver Physiol 29): G713-G721
- (36) Kodner IJ, Fry RD, Fleshman JW, Birnbaum EH, Read TE (1999) Inflammatory bowel disease. In: Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Fischer JE, Galloway AC (Hrsg) *Principles of surgery*. McGraw-Hill, New York, 7. Auflage, S. 1311 ff.
- (37) Kohno M, Yokokawa K, Yasunari K, Kano H, Minami M, Ueda M, Tatsumi Y, Yoshikawa J (1997) Renoprotective effects of a combined endothelin type A / type B receptor antagonist in experimental malignant hypertension. *Metabolism* 46 (9): 1032-1038
- (38) Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF (1984) Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. *Gastroenterology* 87 (6): 1344-1350
- (39) Krieglstein CF, Anthoni C, Laukötter MG, Rijcken E, Spiegel HU, Senninger N, Schurmann G (1999) Effect of anti-CD11b (alphaM-MAC-1) and anti-CD54 (ICAM-1) monoclonal antibodies on indomethacin induced chronic ileitis in rats. *Int J Colorectal Dis* 14 (4-5): 219-223

- 
- (40) Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V (1998) The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 338 (12): 784-790
- (41) Lasky LA (1992) Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258: 964-969
- (42) Letizia C, Boirivant M, De Toma G, Cerci S, Subioli S, Scuro L, Ferrari P, Pallone F (1998) Plasma levels of endothelin-1 in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 30: 266-269
- (43) Ley K, Gaehtgens P (1991) Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ Res* 69 (4): 1034-1041
- (44) Lipowsky HH, Scott DA, Cartmell JS (1996) Leukocyte rolling velocity and its relation to leukocyte-endothelium adhesion and cell deformability. *Am J Physiol* 270 (Heart Circ Physiol 39): H1371-H1380
- (45) López Farré A, Riesco A, Espinosa G, Digiuni E, Cernadas MR, Alvarez V, Montón M, Rivas F, Gallego MJ, Egido J, Casado S, Caramelo C (1993) Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 88 (3): 1166-1171
- (46) McCarron RM, Wang L, Stanimirovic DB, Spatz M (1993) Endothelin induction of adhesion molecule expression on human brain microvascular endothelial cells. *Neurosci Lett* 156: 31-34
- (47) McMillen MA, Huribal M, Kumar R, Sumpio BE (1993) Endothelin-stimulated human monocytes produce prostaglandin E<sub>2</sub> but not leukotriene B<sub>4</sub>. *J Surg Res* 54 (4): 331-335

- 
- (48) McMillen MA, Sumpio BE (1995) Endothelins: Polyfunctional cytokines. *J Am Coll Surg* 180 (5): 621-637
- (49) Minocha A, Thomas C, Omar R (1995) Lack of crucial role of mast cells in pathogenesis of experimental colitis in mice. *Dig Dis Sci* 40 (8): 1757-1762
- (50) Murch SH, Braegger CP, Sessa WC, MacDonald TT (1992) High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Lancet* 339: 381-385
- (51) Murohara T, Lefer AM (1996) Autocrine effects of endothelin-1 on leukocyte-endothelial interaction: stimulation of endothelin B receptor subtype reduces endothelial adhesiveness via a nitric oxide-dependent mechanism. *Blood* 88 (10): 3894-3900
- (52) Murthy SNS, Cooper HS, Shim H, Shah RS, Ibrahim SA, Sedergran DJ (1993) Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Dig Dis Sci* 38 (9): 1722-1734
- (53) Mylona P, Cleland JGF (1999) Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure. *Eur J Heart Fail* 1 (2): 197-200
- (54) Namiki A, Hirata Y, Ishikawa M, Moroi M, Aikawa J, Machii K (1992) Endothelin-1 and endothelin-3-induced vasorelaxation via common generation of endothelium-derived nitric oxide. *Life Sci* 50 (10): 677-682
- (55) Neurath MF, Schürmann G (2000) Zur Immunpathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Chirurg* 71: 30-40
- (56) Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98 (3): 694-702

- 
- (57) Oktar BK, Coskun T, Bozkurt A, Yegen BC, Yüksel M, Haklar G, Bilsel S, Aksungar FB, Cetinel S, Granger DN, Kurtel H (2000) Endothelin-1-induced PMN infiltration and mucosal dysfunction in the rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 42: G483-G491
- (58) Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S (1999) Contribution of endothelin-1 to myocardial injury in a murine model of myocarditis. *Circulation* 100: 1823-1829
- (59) Otto HF (1997) Idiopathische chronisch entzündliche Darmerkrankungen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PhU (Hrsg) *Pathologie*. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore, S. 645-649
- (60) Panés J, Granger DN (1998) Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 114 (5): 1066-1090
- (61) Rijcken E, Krieglstein CF, Anthoni C, Laukötter MG, Mennigen R, Spiegel HU, Senninger N, Bennett CF, Schuermann G (2002) ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate in vivo leukocyte adherence and inflammation in rat inflammatory bowel disease. *Gut* 51 (4): 529-535
- (62) Ritter LS, McDonagh PF (1997) Low-flow reperfusion after myocardial ischemia enhances leukocyte accumulation in coronary microcirculation. *Am J Physiol* 273 (Heart Circ Physiol 42): H1154-H1165
- (63) Ritter LS, Orozco JA, Coull BM, McDonagh PF (2000) Leukocyte accumulation and hemodynamic changes in the cerebral microcirculation during early reperfusion after stroke. *Stroke* 31: 1153-1161

- 
- (64) Roth M, Bernhardt V, Dischler W (2000) Praxismanual – Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Dr Falk Pharma GmbH, 6. Auflage
- (65) Sanz MJ, Johnston B, Issekutz A, Kubes P (1999) Endothelin-1 causes P-selectin-dependent leukocyte rolling and adhesion within rat mesenteric microvessels. *Am J Physiol* 277 (Heart Circ Physiol 46): H1823-H1830
- (66) Sartor RB (1997) Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 92 (12): 5S-11S
- (67) Schürmann GM, Aber-Bishop AE, Facer P, Lee JC, Rampton DS, Dore CJ, Polak JM (1993) Altered expression of cell adhesion molecules in uninvolved gut in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 94 (2): 341-347
- (68) Schürmann GM, Bishop AE, Facer P, Vecchio M, Lee JC, Rampton DS, Polak JM (1995) Increased expression of cell adhesion molecule P-selectin in active inflammatory bowel disease. *Gut* 36 (3): 411-418
- (69) Schürmann G (1997) Zelladhäsion – Molekulare Grundlagen und erste Aspekte für die Chirurgie. *Chirurg* 68: 477-487
- (70) Schürmann G, Ochmann S, Neurath MF (2000) Das Colitis ulcerosa-assoziierte Kolonkarzinom. *Dtsch med Wochenschr* 125: 1045-1050
- (71) Schürmann G, Bode M (2002) Morbus Crohn-Chirurgie. *Chirurg* 73: 1138-1149
- (72) Schwarting A, Schlaak J, Lotz J, Pfers I, Meyer zum Büschenfelde K-H, Mayet W-J (1996) Endothelin-1 modulates the expression of adhesion molecules on fibroblast-like synovial cells (FLS). *Scand J Rheumatol* 25: 246-256

---

(73) Sessa WC, Kaw S, Hecker M, Vane JR (1991) The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 174 (2): 613-618

(74) Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M (1996) Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut* 39: 690-697

(75) Spiegel HU, Uhlmann D, Scommotau S, Giersch B, Sulkowski U (1996) Effect of the endothelin receptor antagonist bosentan on postischemic oxygen supply of the liver. *J Invest Surg.* 9 (6): 439-445

(76) Spiegel HU, Scommotau S, Uhlmann D, Giersch B (1996) Effect of the endothelin receptor antagonist bosentan on postischemic liver microcirculation. *Zentralbl Chir* 121 (9): 788-793

(77) Sütsch G, Kiowski W, Yan X-W, Hunziker P, Christen S, Strobel W, Kim J-H, Rickenbacher P, Bertel O (1998) Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 98: 2262-2268

(78) Takahashi K, Jones PM, Kanse SM, Lam H-C, Spokes RA, Ghatei MA, Bloom SR (1990) Endothelin in the gastrointestinal tract – presence of endothelinlike immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. *Gastroenterology* 99 (6): 1660-1667

(79) Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 9 (10): 866-873

- 
- (80) Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU (2000) Endothelin / nitric oxide balance influences hepatic ischemia – reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 36 (5 Suppl. 1): S212-214
- (81) Uhlmann D, Uhlmann S, Loffler BM, Witzigmann H, Spiegel HU (2001) Pharmacological regulation of postischemic sinusoidal diameters in rats – a new approach for reducing hepatic ischemia / reperfusion injury. *Clin Hemorheol Microcirc* 24 (4): 233-246
- (82) Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU (2001) Important role for endothelins in acute hepatic ischemia / reperfusion injury. *J Invest Surg* 14 (1): 31-45
- (83) Uhlmann S, Uhlmann D, Spiegel HU (1999) Evaluation of hepatic microcirculation by in vivo microscopy. *J Invest Surg* 12 (4): 179-193
- (84) Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, Hopfgartner G, van Marle SP, Peeters PA, Jonkman JH, Jones CR (1996) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the endothelin-receptor antagonist bosentan in healthy human subjects. *Clin Pharmacol Ther* 60 (2): 124-137
- (85) Weber C, Schmitt R, Birnboeck H, Hopfgartner G, Eggers H, Meyer J, van Marle S, Viischer HW, Jonkman JH (1999) Multiple-dose pharmacokinetics, safety, and tolerability of bosentan, an endothelin receptor antagonist, in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 39 (7): 703-714
- (86) Wenzel RR, Fleisch M, Shaw S, Noll G, Kaufmann U, Schmitt R, Jones CR, Clozel M, Meier B, Lüscher TF (1998) Hemodynamic and coronary effects of the endothelin antagonist bosentan in patients with coronary artery disease. *Circulation* 98: 2235-2240

- 
- (87) Williamson DJ, Wallman LL, Jones R, Keogh AM, Scroope F, Penny R, Weber C, MacDonald PS (2000) Hemodynamic effects of bosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with pulmonary hypertension. *Circulation* 102 (4): 411-418
- (88) Yacyshyn BR, Bowen-Yacyshyn MB, Jewell L, Tami JA, Bennett CF, Kisner DL, Shanahan WR (1998) A placebo-controlled trial of ICAM-1 antisense oligonucleotide in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 114: 1133-1142
- (89) Yacyshyn BR, Chey WY, Goff J, Salzberg B, Baerg R, Buchman AL, Tami J, Yu R, Gibiansky E, Shanahan WR; ISIS 2302-CS9 Investigators (2002) Double blind, placebo controlled trial of the remission inducing and steroid sparing properties of an ICAM-1 antisense oligodeoxynucleotide, alicaforsen (ISIS 2302), in active steroid dependent Crohn's disease. *Gut* 51 (1): 30-36
- (90) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415
- (91) Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG (1999) Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET<sub>A</sub> receptors and platelet-activating factor. *British Journal of Pharmacology* 127: 969-979



