

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie

Der selektive Zytokininhibitor RDP58  
bei der experimentellen Kolitis der  
Ratte

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Dorothee Verena Schönfeld  
aus Köln  
2005

Dekan:

Univ.- Prof. Dr. rer. nat. K.- H. Jöckel

1. Gutachter:

Priv.- Doz. Dr. med. J. Zeeh

2. Gutachterin:

Priv.- Doz. Dr. med. U. Dahmen

Tag der mündlichen Prüfung:

30. November 2006

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	5
1.1. Morbus Crohn .....	5
1.1.1 Ätiopathogenese .....	5
1.1.2 Klinisches Bild des M. Crohn .....	7
1.1.3 Therapie .....	8
1.2. RDP58 .....	8
1.2.1 Einführung .....	8
1.2.2 Präklinische Studien mit RDP58 <i>in vitro</i> .....	11
1.2.3 Präklinische Studien mit RDP58 <i>in vivo</i> .....	11
1.2.4 Klinische Studien mit RDP58 .....	12
1.2.5 Pharmakokinetik und toxikologische Studien zu RDP58 .....	12
1.3. Die experimentelle Kolitis bei der Ratte .....	13
1.3.1 TNBS/Ethanol induzierte Kolitis der Ratte .....	13
1.4. Fragestellung und Zielsetzung .....	13
1.4.1 Zielsetzung .....	13
1.4.2 Fragestellung .....	14
2. Material und Methoden .....	15
2.1. Tierversuch .....	15
2.2. Material .....	15
2.3. Methoden .....	16
2.3.1 Induktion der experimentellen Kolitis .....	16
2.3.2 TNBS Konzentration .....	17
2.3.3 Verabreichung von RDP58 .....	17
2.3.4 Experimentelles Design .....	17
2.3.5 Tötung der Tiere und Sektion .....	22
2.3.6 Makroskopische Evaluation .....	22
2.3.7 Mikroskopische Evaluation .....	24
2.4. Statistik .....	25
3. Ergebnisse .....	26
4. Diskussion .....	35
5. Zusammenfassung .....	41

6. Literaturverzeichnis.....	42
7. Anhang .....	55
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	55
7.2. Abbildungsverzeichnis.....	57
7.3. Tabellenverzeichnis.....	58
8. Danksagung.....	59
9. Lebenslauf .....	60

# 1. Einleitung

## 1.1. Morbus Crohn

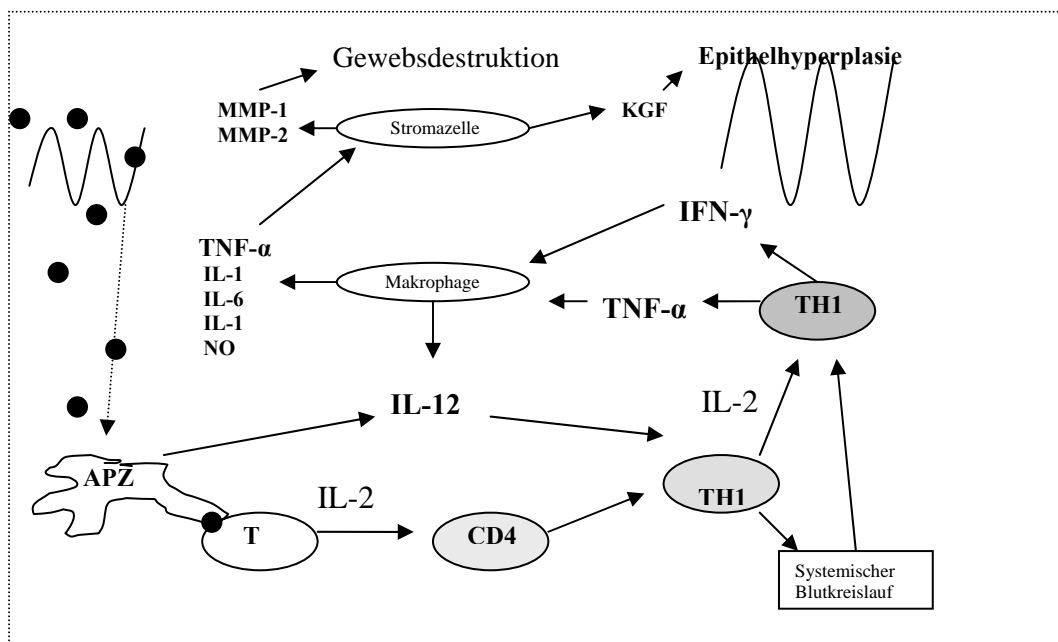
Der M. Crohn (MC) zählt zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Er ist eine in Schüben verlaufende, destruierende Entzündung des Gastrointestinaltraktes (GIT). Bei 10% bis 20% der Patienten kommt es zusätzlich zu extraintestinalen Manifestationen. Im Intestinum kann sich der MC transmural und in allen Segmenten des GIT manifestieren. Aphthöse Läsionen und Erosionen sind Frühformen der Entzündung. Diese gehen in schmerzhafte Ulzerationen über, aus denen sich Fissuren und Fisteln entwickeln können. Histologisch findet man ein ausgeprägtes lymphoplasmazelluläres Infiltrat, welches vorwiegend in der Lamina propria lokalisiert ist. In etwa 50% bis 60% können die für den MC typischen, nicht verkäsigen Granulome nachgewiesen werden. Diese bestehen aus T-Zellen, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Makroskopisch imponiert der diskontinuierliche Befall des Darms mit „skip lesion“, das heißt zwischen befallenen Arealen finden sich Segmente ohne erkennbare Entzündungszeichen. Zwischen den zum Teil länglich angeordneten Fissuren kann die entzündlich verdickte Schleimhaut hervortreten und das endoskopisch und radiologisch nachweisbare pathognomonische „Pflastersteinrelief“ hervorrufen [Lockhart-Mummery et al., 1960; Lockhart-Mummery et al., 1964; Shanahan, 2000].

Der Altersgipfel liegt zwischen dem 20. bis 30., sowie dem 60. bis 70. Lebensjahr. Die Inzidenz beträgt 4 bis 6 Fälle, bei einer Prävalenz von 30 bis 90 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner [Shanahan, 2002].

### 1.1.1 Ätiopathogenese

Die Ursachen, sowie die Pathogenese des M. Crohn sind nicht geklärt. Die meisten Autoren postulieren eine Störung in der Interaktion zwischen dem darmassoziierten Immunsystem und der Umwelt. Man diskutiert eine überschießende Immunabwehr genetisch prädisponierter Individuen auf die Darmflora [Bickston et al., 2003; Hollander et al., 1986; Hugot et al., 2001]. Das regionale Immunsystem des Darms ist nicht in der Lage Pathogene von Nahrungsmittelantigenen und anderen harmlosen Keimen

zu unterscheiden, es kommt zu einer unkontrollierten Entzündungsreaktion [Shanahan, 2002]. Die sich daraus ergebende erhöhte Permeabilität der Lamina epithelialis mucosa erleichtert die weitere antigene Invasion, die durch Penetration in tiefere Schichten den Entzündungsmodus verstärkt [Fuss et al., 1996; Rogler et al., 1998; Teahon et al., 1992]. **Abbildung (Abb.) 1** zeigt schematisch vereinfacht die lokale zelluläre Interaktion in der Pathogenese des M. Crohn.



**Abb. 1:** Zytokinmuster und Zellinteraktion in der Pathogenese des MC. Gezeigt sind die Entzündungsprozesse in der Darmwand [Neurath et al. 2001].

Die Expression von Interferon gamma (IFN-γ), Interleukin (IL) - 2, IL-12 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α), führt zu einer Aktivierung von Makrophagen und Förderung der zytotoxischen Aktivität mit klinischem Bild des M. Crohn [Monteleone et al., 1997; Mullin et al., 1992].

### 1.1.2 Klinisches Bild des M. Crohn

Dieses prägt sich durch die Darmerkrankung. Extraintestinale Manifestationen und Komplikationen können hinzutreten. Kennzeichnend ist der chronisch rezidivierende Verlauf [Lorusso et al., 1989].

#### Leitsymptome

Krampfartige Bauchschmerzen und chronische Diarrhöe treten mit Fieber, Anämie, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust auf. Die subjektive Schwere der Erkrankung und entzündliche Aktivität sind nicht zwingend korrelierbar.

#### Komplikationen

Erschwerend kann es im Verlauf der Erkrankung zu Fistelbildung nach außen oder in ein Nachbarorgan, sowie Abszedierung mit Sepsis, Blutungen und Perforationen mit konsekutiver Peritonitis kommen. Als Folge der chronischen Entzündung kann eine Darmwandfibrose eintreten. Die Retraktionstendenz des fibrotischen Gewebes führt zu Stenosen des Darmlumens. Die chronifizierte Entzündung kann eine maligne Entartung des Intestinums bedingen. Diese ist meist niedrig differenziert und hat eine schlechte Prognose.

#### Extraintestinale Manifestationen

Diese können zusätzlich auftreten (**Tabelle, Tab. 1**) und verlaufen nicht unbedingt parallel zu dem intestinalen Prozess.

**Tab. 1:** Extraintestinale Manifestationen des M. Crohn

---

• <b>Gelenke:</b>	HLA-B27-assoziierte ankylosierende Spondylitis oligoartikuläre asymmetrische Arthritis
• <b>Gallenwege:</b>	Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)
• <b>Auge:</b>	Episkleritis Iridozyklitis
• <b>Haut:</b>	Erythema nodosum Pyoderma gangraenosum Cheilitis angularis periorales Ekzem
• <b>Schleimhaut:</b>	apthoide und ulzeröse Stomatitiden granulomatöse Makrocheilie

---

### 1.1.3 Therapie

Der M. Crohn ist nicht heilbar. Behandlungsziel ist es, Dauer und Schwere eines entzündlichen Schubes zu reduzieren, sowie das Auftreten von Rezidiven zu verhindern.

Neben Glukokortikoiden, Sulfasalazinen und Salyzilaten kommen auch Azathioprin, 6-Mercaptopurine und biologische Therapeutika in der Standardtherapie zum Einsatz. Die Wahl der medikamentösen Therapie richtet sich nach Krankheitsaktivität und intestinalem Befallsmuster [Domenech, 2006; Baumgart et al., 2003; Seibold et al., 2000; Stange et al., 2002].

Die chirurgische Therapie ist indiziert bei lebensgefährlichen Komplikationen (Stenosen, Fisteln, Abszessen), sowie nicht konservativ beherrschbaren Kolitiden und Blutungen [Müller et al., 1997].

## 1.2 RDP58

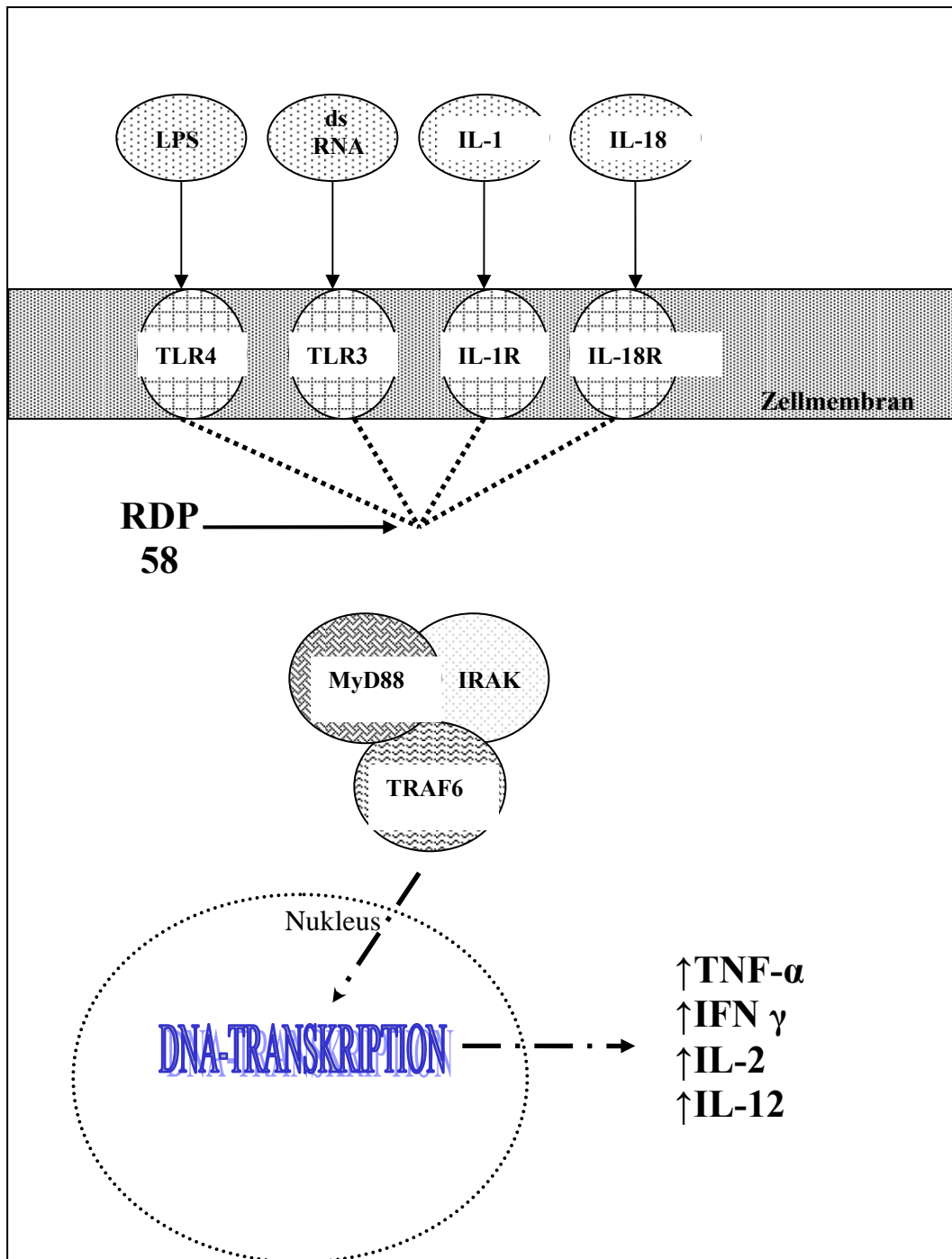
### 1.2.1 Einführung

RDP (Rational Designed Peptid) 58 ist ein Protease resistentes Dekapeptid ( $\text{H}_2\text{N} - \text{Arg} - \text{Nle} - \text{Nle} - \text{Nle} - \text{Arg} - \text{Nle} - \text{Nle} - \text{Gly} - \text{Tyr} - \text{CONH}_2$ ). Es wurde durch aufwendige, Computer gestützte Technik aus Abkömmlingen der Humanen – Leukozyten - Antigen (HLA) - Peptide entwickelt [Iyer et al., 2002]. Das Präparat (1228 Dalton) wird oral appliziert und wirkt topisch auf die gastrointestinale Schleimhaut. Es wird unverändert fäkal ausgeschieden und ist bei fehlender Resorption nicht systemisch verfüg- und nachweisbar [Holtmann, 2003; Murdock et al., 2003].

RDP58 ist ein immunsuppressiv wirkendes Protein, es hemmt die pathologisch erhöhte Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 und IL-12. Der genaue Mechanismus ist derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. RDP58 hemmt, wie im Folgenden beschrieben, die Formation des intrazellulären Signalkomplexes der MyD88 IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK) und dem TNF-Rezeptor-assoziiertem Faktor (TRAF) 6 (**Abb. 2**): bei Aktivierung durch ihre Liganden rekrutieren Toll-like-Rezeptoren (TLR) das zytosolische Protein



MyD88 [Wesche et al., 1997]. Dieses zählt zu den Adapterproteinen. Durch Aktivierung phosphoryliert es die IRAK und aktiviert sie, mit dem TRAF6 einen Komplex zu bilden [Li et al., 2001]. Die weitere Phosphorylierungskaskade über die I $\kappa$ B Kinase und die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) endet in einer Translokation in den Zellkern und führt dort zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Diese induzieren mit komplementären Elementen der Promotorregion der Desoxyribonukleinsäure (DNA) die Synthese von akute Phase Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-2 und IL-12 [Holtmann, 2003; Iyer et al., 2001]. RDP58 hemmt somit in einer frühen Phase die stressinduzierte Synthese der proinflammatorischen Zytokine und wirkt antiinflammatorisch.



**Abb. 2:** Inhibition der Zytokinsynthese durch RDP58. Es hemmt die Formation des MyD88 - IRAK – TRAF – 6 – Proteinkomplex und somit die stressinduzierte Synthese proinflammatorischer Zytokine (LPS = Lipopolysaccharid, dsRNA = doppelsträngige Ribonukleinsäure).

Aufgrund seiner Fähigkeit T-Helferzellen Typ 1 (TH<sub>1</sub>) Zytokine zu supprimieren, wurde die Wirksamkeit von RDP58 in präklinischen und klinischen Studien bei CED untersucht [Travis et al., 2005].

### 1.2.2 Präklinische Studien mit RDP58 *in vitro*

*In vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass RDP58 dosisabhängig die LPS induzierte TNF- $\alpha$  Produktion in Makrophagen reduziert [Kontoyiannis et al., 1999]. Eine signifikant verringerte Produktion von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  durch RDP58 wurden in bioptisch gewonnener Kolonmukosa und Lamina propria mononuclear cells (LPMNC) von M.Crohn Patienten gezeigt [Han et al., 1990; Kruys et al., 1993].

### 1.2.3 Präklinische Studien mit RDP58 *in vivo*

Die Effekte von RDP58 wurde in zahlreichen *in vivo* Modellen untersucht.

- LPS induzierte TNF- $\alpha$  Produktion der Maus wurde signifikant vermindert [Iyer et al., 2000].
- Murine Concavalin (Con) A induzierte Produktion von TNF- $\alpha$  wurde um 75% reduziert, von Il-12 um 30% und von IFN- $\gamma$  um 50% [Iyer et al., 2000].
- Bei Untersuchung der durch TNF- $\alpha$  vermittelten, UV-B (280-320 nm) induzierten murinen Dermatitis [Effendy et al., 2000; Yoshikawa et al., 1991] zeigten Oberyszyn et al. [2001], dass RDP58 die TNF- $\alpha$ -Proteinlevel signifikant senkt, was eine symptomatische Besserung der Dermatitis zur Folge hatte.
- Bei Mäusen mit Graft-versus-Host-Disease (GVHD) reduziert RDP58 signifikant die Serumlevel von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 [Tice et al., 1997].
- RDP 58 führt zu einer Besserung des Verlaufs bei der experimentell induzierten Kolitis von Mäusen. Es kommt dabei zu einer

Verringerung der intrainestinalen TNF- $\alpha$  Level um 75% [Boismenu et al., 2002; Murthy et al., 2002].

- Eine der Colitis ulzerosa ähnlichen, bei Rhesus-Affen sporadisch auftretenden Kolitis mit anfallsartigen Durchfällen [Elmore et al., 1992; Ribbons et al., 1995, 1997] zeigte unter Therapie mit RDP58 einen mildereren Verlauf [Iyer et al., 2002].

#### **1.2.4 Klinische Studien mit RDP58**

Derzeit existieren zwei randomisierte, doppelblinde, plazebo-kontrollierte, multi-zentrierte Phase II Studien, welche insgesamt 231 Patienten mit M. Crohn und Colitis ulzerosa umfassen.

Bei Patienten mit Morbus Crohn führte die Behandlung mit RDP58 zu einer Verbesserung des Crohn's Disease Activity Index (CDAI) bei 60 Prozent der Erkrankten [Martin, 2004].

Bei Patienten mit Colitis ulzerosa führte RDP58 zu einer signifikanten Besserung der Aktivitätsscores. Ein klinisches Ansprechen war bei 77% der Patienten zu beobachten, eine klinische Remission der Erkrankung trat in 72% der Fälle ein. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Übelkeit und Kopfschmerzen. Diese waren weder dosisabhängig, noch statistisch signifikant [Ireland, 2005; Travis et al., 2005].

#### **1.2.5 Pharmakokinetik und toxikologische Studien zu RDP58**

In allen durchgeführten Untersuchungen war RDP nach oraler Applikation nicht systemisch nachweisbar und wurde innerhalb 24 Stunden zu 99% in den Fäzes der Versuchstiere wieder nachgewiesen.

RDP58 zeigte weder systemische noch lokale Nebenwirkungen, histologische Veränderungen am Darm waren nicht nachweisbar. Allergische Reaktionen auf Gabe von RDP58 wurden bislang nicht beschrieben [Holtmann, 2003; Iyer et al., 2001].

### **1.3. Die experimentelle Kolitis bei der Ratte**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von RDP58 in der Ratte untersucht. Eine experimentelle Kolitis wurde mit Trinitrobenzenesulfonsäure (TNBS)/Ethanol induziert.

#### **1.3.1 TNBS/Ethanol induzierte Kolitis der Ratte**

Morris et al. [1989] beschrieben dieses einfache und reproduzierbare Model, indem die intraluminale Applikation einer TNBS Lösung mit 50% Ethanol eine dosisabhängige Kolitis in der Ratte induziert.

Die Trinitrophenylgruppe des TNBS wirkt als Hapten und führt im Nagerdarm zu einer T-Zell vermittelten Immunantwort mit konsekutiver transmuraler Entzündung. Durch die Beimischung von Ethanol kommt es zu einer großflächigen akuten Läsion der Mukosa (Barrierenbrecher) mit nachfolgend verbesserten Penetration von TNBS in tiefere Darmschichten [Ward et al., 1977; Shorter et al., 1972].

TNBS führt nach intrarektaler Applikation zu einer T-Zell medierten Immunantwort der Darmwand. Histologisch imponiert eine dichte Infiltration der Mukosa und Submukosa mit polymorphkernigen Leukozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und Mastzellen. Typisch ist eine segmental angeordnete Schleimhautreaktion mit Granulomformation und Darmwandverdickung. Das histopathologische Bild wird begleitet durch Gewichtsverlust des Versuchstieres, struppiges Fell und blutige Durchfälle. Das Modell teilt sich viele histopathologische und klinische Eigenschaften mit dem humanen M. Crohn [Neurath et al., 2000; 2001].

### **1.4. Fragestellung und Zielsetzung**

#### **1.4.1. Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit des oral applizierbaren und topisch wirksamen TNF- $\alpha$  Inhibitors RDP58 untersucht.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung befand sich die Substanz RDP58 in der präklinischen Testung. Erfahrungen mit einer experimentell induzierten

Kolitis lagen nicht vor. Erste klinische Untersuchungen bei Menschen wurden im Jahre 2004/2005 publiziert.

#### **1.4.2. Fragestellung**

- Welche Wirkung hat RDP58 auf den Verlauf der TNBS induzierten Kolitis in der Ratte?
  - vor Induktion der Kolitis
  - nach Induktion der Kolitis
  - vor und nach Induktion der Kolitis
  
- Kann man durch eine Erhöhung der RDP58 Dosis den Effekt auf die TNBS induzierte Kolitis verändern?
  
- Kommt es zu einer Veränderung des Effekts von RDP58 auf den Verlauf der Kolitis unter Reduktion der TNBS Konzentration?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tierversuch

Die Versuche wurden an Ratten nach den Richtlinien des „Deutschen Tierschutzgesetzes“ (in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. August 1986 Bundesgesetzblatt BGBII, S. 1319) durchgeführt.

(Tierversuchsgenehmigung: Aktenzeichen – 50.05-230-13/02)

Im Zentralen Tierlabor (ZTL) am Universitätsklinikum Essen der Universität Duisburg-Essen werden Wistar Ratten unter konventionellen Bedingungen gehalten. Die Tiere wurden im ZTL der Uniklinik Essen gezüchtet. Die ursprünglichen Zuchttiere kamen von der Firma Harlan Winkelmann (D-33178 Borchern). Weitere Kenndaten zu den Versuchstieren sind aus **Tab. 2** ersichtlich.

**Tab.2:** Versuchstiere

Art	Ratte
Stamm	Wistar, Unilever
Geschlecht	männlich
Alter	3 Monate
Gewicht	280g – 340g

### 2.2 Material

Für die Induktion der Kolitis wurden die Ratten mit einer Ketamin-Xylazin-Mischnarkose (**Tab. 3**) vollanästhesiert. Ketanest® (Ketamin 100 mg/ml, Parke-Davis GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Rompun® 2% (Xylazin 20 mg/ml, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) wurden in den angegebenen Mengen (s. **Tab. 3**) durchmischt und intraperitoneal appliziert.

**Tab.3:** Narkose

Ketamin ad us. vet.	0,1 ml Injektionslösung /100g Körpergewicht (KG)
Xylazin ad us. vet.	0,05 ml Injektionslösung /Tier
Narkosedauer	ca. 1 Stunde

### **TNBS/Ethanol zur Induktion der Kolitis**

Wir bezogen die Produkte von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Vor der rektalen Instillation des TNBS wurde eine Mischung mit Ethanol zu jeweils gleichen Teilen (1:1) hergestellt.

### **RDP58**

RDP58 wurde von der Firma Sangstat Medical Corporation, Fremont, Kalifornien, USA bezogen.

Lyophilisiertes RDP58 wurde in Aqua ad injectabile® (Firma Delta Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland) durch Einrühren gelöst und mit einer Knopfkanüle intragastral verabreicht.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Induktion der experimentellen Kolitis**

Allen Tieren wurde 24 Stunden vor Kolitisinduktion das Futter, bei Trinkwasser ad libitum, entzogen. Die rektale Instillationsbehandlung erfolgte am vollnarkotisierten Tier. Der im distalen Kolon und Rektum befindliche Kot wurde mit einem 8 French Blasenkatheter entfernt. Dieser wurde ungeblockt rektal eingeführt und vorsichtig in geblockten Zustand heraus gezogen.

Das TNBS/Ethanol-Gemisch wurde mit Hilfe eines Katheters mit Spritzenaufsatz in den Nagerdarm instilliert. Der Katheter wurde in den Anus eingeführt, bis zu 8 - 10 cm proximal eingebracht und das TNBS-Gemisch instilliert. Nach dem Eingriff wurden die Tiere für 20 Minuten in Kopftieflage gelagert, um einen ausreichenden Kontakt des Wirkstoffes mit der Kolonschleimhaut zu gewährleisten.

Im Rahmen der Kolitisinduktion kann es durch das Einführen des Applikationskatheters zu einer Darmperforation kommen, von der Tiere aller Behandlungsgruppen in gleichem Masse betroffen waren. Diese Tiere wurden dann umgehend getötet.



### 2.3.2 TNBS Konzentration

Um zu untersuchen, ob es zu einer Veränderung des Effekts von RDP58 unter Reduktion der TNBS Konzentration kommt, wurde die Kolitis mit zwei unterschiedlichen TNBS Konzentrationen induziert.

- 50 mg/kg KG TNBS (Gruppen I – IV)
- 25 mg/kg KG TNBS (Gruppe V)

### 2.3.3 Verabreichung von RDP58

Die Applikation erfolgte täglich zur gleichen Uhrzeit (17.30 Uhr).

RDP58 oder das Plazebo wurde durch Sondierung des Magens mit einer Knopfkanüle per os (Firma Accufirm, 1,2mm Durchmesser, 6 cm Länge) intragastral appliziert. Der Bolus pro Tier betrug 1 ml.

### 2.3.4 Experimentelles Design

Die Untersuchungen umfassten fünf Versuchsgruppen (Gruppe I-V). Die Zusammenstellung wird in **Tab. 4** näher ausgeführt.

Eine Versuchsgruppe umfasste 40 Tiere. Davon wurden jeweils 20 Tiere mit RDP58 behandelt, die Tiere der Kontrollgruppe (n = 20) erhielten Plazebo (Aqua ad injectabile®).

**Tab.4:** Übersicht der Versuchszusammenstellung. Die Gruppen wurden unterschiedlich lang behandelt. Die Konzentration von TNBS und RDP58 variierten.

Versuchsgruppe	I	II	III	IV	V
Konzentration TNBS/Ethanol (mg/kgKG)	50	50	50	50	25
Konzentration RDP58 (mg/kgKG)	5	5	10	5	10
Behandlungstage	1 – 3	4 – 10	4 – 10	1 – 10	1 – 10
Behandlungsdauer (Tage)	3	7	7	10	10

Die Tiere der Gruppe I wurden täglich 3 Tage vor Induktion der Kolitis mit RDP58 vorbehandelt. In dieser Gruppe sollte untersucht werden, ob RDP58 einen prophylaktischen Effekt auf den Verlauf der experimentellen Kolitis der Ratte hat.

Die Tiere der Gruppe II wurden täglich 7 Tage nach Induktion der Kolitis behandelt. In dieser Gruppe wurde untersucht, ob RDP58 einen therapeutischen Effekt auf die Kolitis hat, und ob dieser durch Erhöhung des RDP58 in Gruppe III von der Dosis abhängig ist.

Die Tiere der Gruppen IV wurden täglich 3 Tage vor und 7 Tage nach Induktion der Kolitis behandelt. Hier sollte untersucht werden, ob eine prophylaktische Behandlung, kombiniert mit einer therapeutischen Behandlung einen zusätzlichen Effekt hat und ob es zu einer Veränderung des Effekts kommt unter Reduktion der TNBS Konzentration (25 mg/kg KG) in Gruppe V (**Tab. 4**).

Die Gruppen wurden im Einzelnen wie folgt behandelt.

### I. Vorbehandlung mit RDP58 (5 mg/kg KG)

In Gruppe I wurde der Effekt von RDP58 (5 mg/kg KG) auf die TNBS-Kolitis (50 mg/kg KG) von Ratten untersucht. RDP58 wurde 3 Tage täglich vor Induktion der Kolitis verabreicht (**Abb. 3**).

<b>I</b>	X	X	X	Kolitisinduktion mit TNBS (50 mg/kg)						
<b>Versuchs- tag</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>

**Abb. 3:** Applikationsschema der Vorbehandlung,  
X = RDP58 (5mg/kg) resp. Plazebo

### II. Nachbehandlung mit 5 mg RDP58/kg KG

In Gruppe II wurde der Effekt einer täglichen Nachbehandlung mit 5 mg/kg KG RDP58 auf die TNBS-Kolitis (50 mg/kg KG) untersucht (**Abb. 4**).

<b>II</b>				Kolitisinduktion mit TNBS (50 mg/kg) X	X	X	X	X	X	X
<b>Tag</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>

**Abb. 4:** Applikationsschema der Nachbehandlung,  
X = 5 mg RDP58/kg KG resp. Plazebo

### III. Nachbehandlung mit 10 mg RDP58/kg KG

In Gruppe III wurde der Effekt einer Nachbehandlung mit RDP58 auf die TNBS-Kolitis (50 mg/kg KG) untersucht. In dieser Versuchsgruppe wurde 10 mg RDP58 pro kg KG (**Abb. 5**) verabreicht.

III				Kolitisinduktion mit TNBS (50 mg/kg) X	X	X	X	X	X	X
Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

**Abb. 5:** Applikationsschema der Nachbehandlung,  
X = 10 mg RDP58/kg KG resp. Plazebo

### IV. Vor- und Nachbehandlung mit RDP58 5 mg/kg

In Gruppe IV sollte der Effekt einer Behandlung mit 5 mg RDP58 pro kg KG vor und nach Induktion der TNBS-Kolitis (50 mg/kg KG) untersucht werden (**Abb. 6**).

IV				Kolitisinduktion mit TNBS (50 mg/kg) X	X	X	X	X	X	X
Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

**Abb. 6:** Applikationsschema der Vor- und Nachbehandlung  
X = RDP58 (5mg/kg) resp. Plazebo

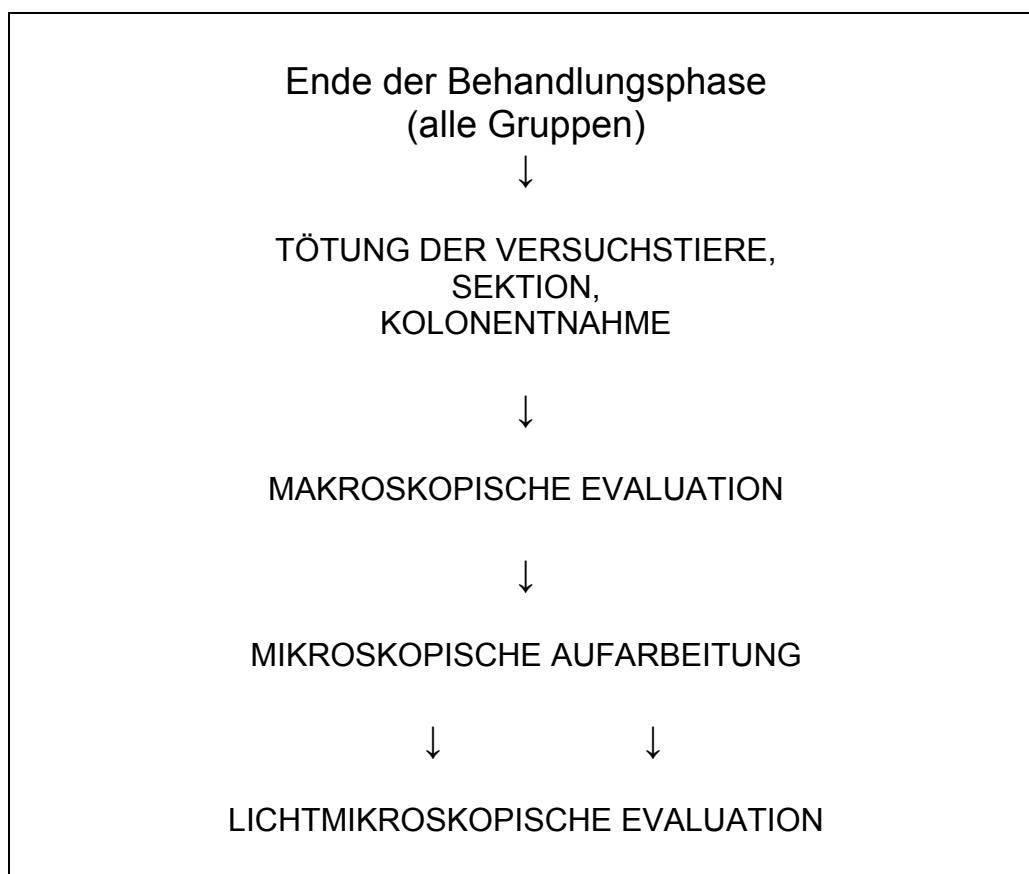
### V. Vor- und Nachbehandlung mit RDP58 10 mg/kg

In Gruppe V fand eine Vor – und Nachbehandlung mit 10mg/kg KG RDP58 statt. Wir nutzten den dosisabhängigen Effekt der TNBS-Lösung und reduzierten diese auf 25mg/kg KG (**Abb. 7**).

<b>V</b>	X	X	X	Kolitisinduktion mit TNBS (25 mg/kg) X	X	X	X	X	X	X
<b>Tag</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>

**Abb. 7:** Applikationsschema der Vor- und Nachbehandlung,  
X = RDP58 (10 mg/kg) resp. Plazebo

Die **Abb. 8** zeigt schematisiert die Aufarbeitung des Kolons nach Ende der Behandlungsphase. Die Einzelheiten werden im Folgenden erläutert.



**Abb. 8:** Aufarbeitung des Kolons

### **2.3.5 Tötung der Tiere und Sektion**

Sechs Tage nach Induktion der Kolitis wurden die Tiere getötet und eine standardisierte Sektion durchgeführt.

Die Tötung erfolgte durch Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) in einem geschlossenen System.

Direkt anschließend erfolgte die mediane Laparotomie und das Kolon wurde entnommen.

In jeder der 5 Gruppen gab es Ratten, die vor Ende des Versuches ein klinisches Bild zeigten, welches im Rahmen des Tierschutzgesetzes ein sofortiges Töten der Tiere erforderte. Sie zeigten einen schlaffen Muskeltonus bei reduziertem Kräftezustand, eine Gewichtsreduktion von 10 – 12 %, struppiges Fell. Diese Tiere wurden getötet. Jedes zeigte den makroskopischen Befund einer Darmperforation mit Peritonitis. Die Komplikation trat unabhängig von der Schwere der induzierten Kolitis auf.

Die makroskopische und mikroskopische Quantifizierung der Gewebeläsionen im entnommenen Kolon ist ein anerkanntes, mehrfach publiziertes Verfahren [Reinshagen et al., 1995; Egger et al., 2001; Hoffmann et al., 1997; Zeeh et al., 1996].

### **2.3.6 Makroskopische Evaluation**

Das entnommene Kolon wurde mit isotoner Kochsalzlösung gespült, longitudinal entlang der peritonealen Umschlagsfalte eröffnet und die Schleimhaut inspiziert. Für die Auswertung wurde ein repräsentatives entzündungstragendes Segment exzidiert, auf einem Korkstreifen mit Nadeln fixiert und makroskopisch auf Schleimhautläsionen (Ulzerationen, Nekrosen) untersucht.

Das entzündungstragende Segment des Kolons erstreckte sich maximal über 4 cm. Dabei waren die Schleimhautläsionen teilweise konfluent, teilweise segmental angeordnet. Die Gesamtfläche der Läsionen wurde vermessen und semiquantitativ als prozentualer Anteil der Gesamtfläche des 4 cm Kolonsegments angegeben.

Die Beurteilung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher. Die Ergebnisse sind der Mittelwert beider Beurteilungen.

### Histologische Aufbereitung der Präparate

1. Immersions-Fixierung der Präparate in 4% Formalin.
2. Auswaschung der Präparate mit fließendem Leitungswasser.
3. Einbettung: Das einzubettende Gewebe wurde in einem Entwässerungsautomaten mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Nach Zwischenschaltung eines Intermediums wurde das 4 cm lange repräsentative Kolonstück U-förmig in Paraffin eingeblockt.
4. Schneiden: Das Schneiden erfolgte mit einem Schlittenmikrotom in 3 µm dicke Gewebescheiben, die auf einen beschichteten Objektträger transferiert und histologisch ausgewertet wurden (**Abb. 9**).
5. Trocknung für 30 Minuten bei 58°C im Brutschrank.

Alle Präparate wurden nach Deparaffinierung mit Xylol mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

Nach der Färbung wurden die Präparate mit Eukitt® blasenfrei und luftdicht abgedeckt um den Schnitt zu erhalten und eine homogene Lichtbrechung zu gewährleisten.



**Abb.9:** Fertiges histologische Präparat (HE). Das Kolongewebe liegt U-förmig auf, die Lamina epithelialis mucosae weist nach außen.

### 2.3.7 Mikroskopische Evaluation

Die histopathologische Untersuchung der Kolonpräparate erfolgte in Kooperation mit dem Pathologischen Institut des Universitätsklinikum Essen.

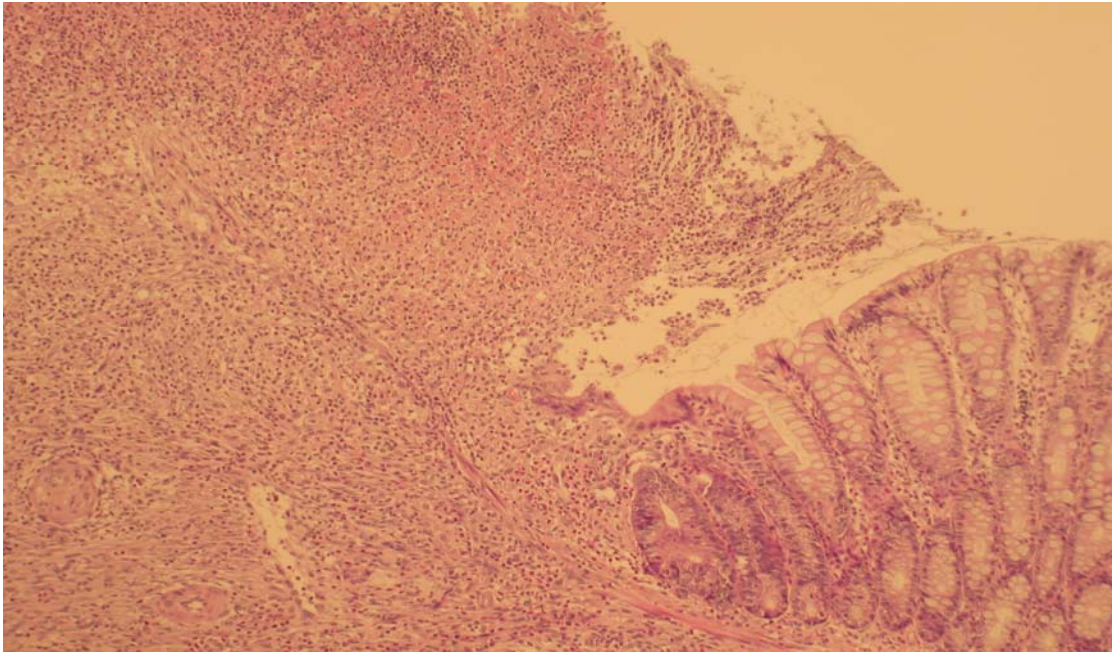
Die Begutachtung der Kolonschnitte erfolgte am Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung.

Die Präparate der HE gefärbten 4 cm Kolonstreifen (**Abb. 9**) wurden auf mikroskopische Schleimhautschädigungen untersucht. Es wurde der gesamte Gewebstreifen von einem zum anderen Ende ausgewertet. Dabei wurde pro Gesichtsfeld der prozentuale Anteil der Schleimhautläsionen im gesamten Präparat abgeschätzt und schließlich sämtliche Werte beider unabhängiger Untersucher gemittelt (**Abb. 10** und **11**).



**Abb. 10:** Kolonschleimhaut (HE) einer RDP58 behandelten Ratte der Gruppe V (100fache Vergrößerung).





**Abb. 11:** Kolonschleimhaut (HE) einer plazebobehandelten Ratte der Gruppe IV. Die Darmwand ist geschädigt und dicht mit Entzündungszellen infiltriert (100fache Vergrößerung).

## 2.4. Statistik

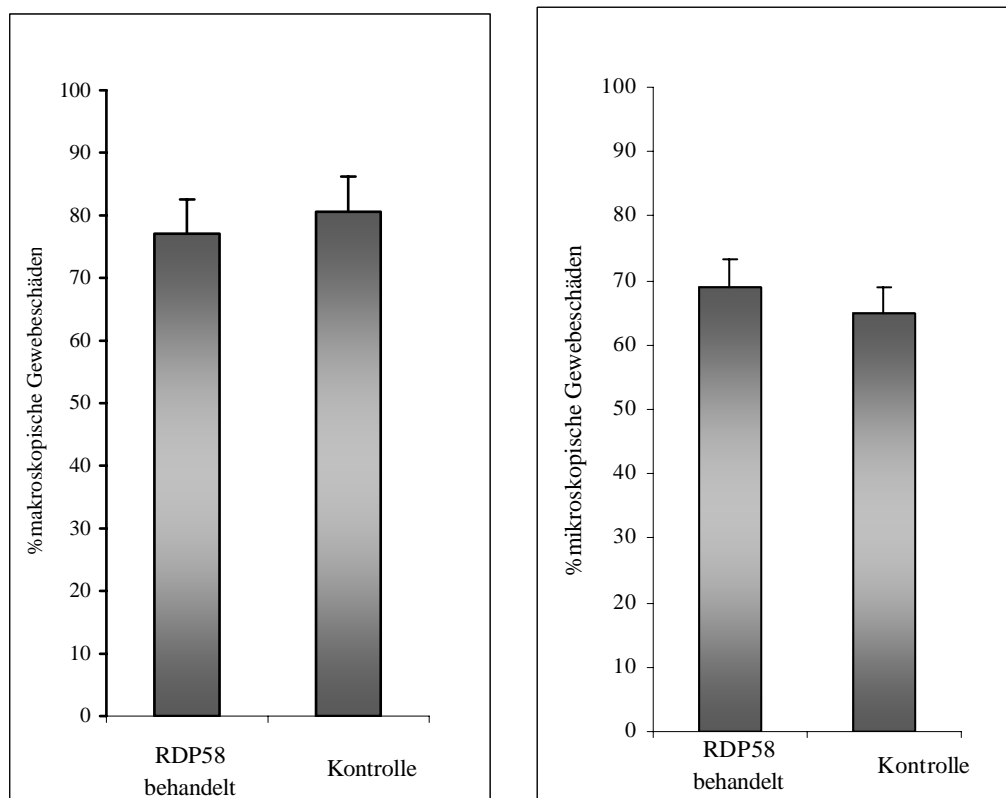
Die Ergebnisse sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes. Die Berechnung zweiseitiger Signifikanzniveaus ( $p$ ) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ( $p < 0,05$ ) erfolgte anhand des U Mann-Whitney Tests (nichtparametrischer Test). Die statistischen Berechnung und Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte durch die GraphPad InStat Version 2.04.

### 3. Ergebnisse

#### I. Vorbehandlung mit RDP58 (5 mg/kg KG)

Die Gruppe der mit RDP58 vorbehandelten Ratten zeigte einen Anteil makroskopischer Läsionen von  $77\% \pm 6\%$  gegenüber  $84\% \pm 4\%$  bei den Tieren der Kontrollgruppe.

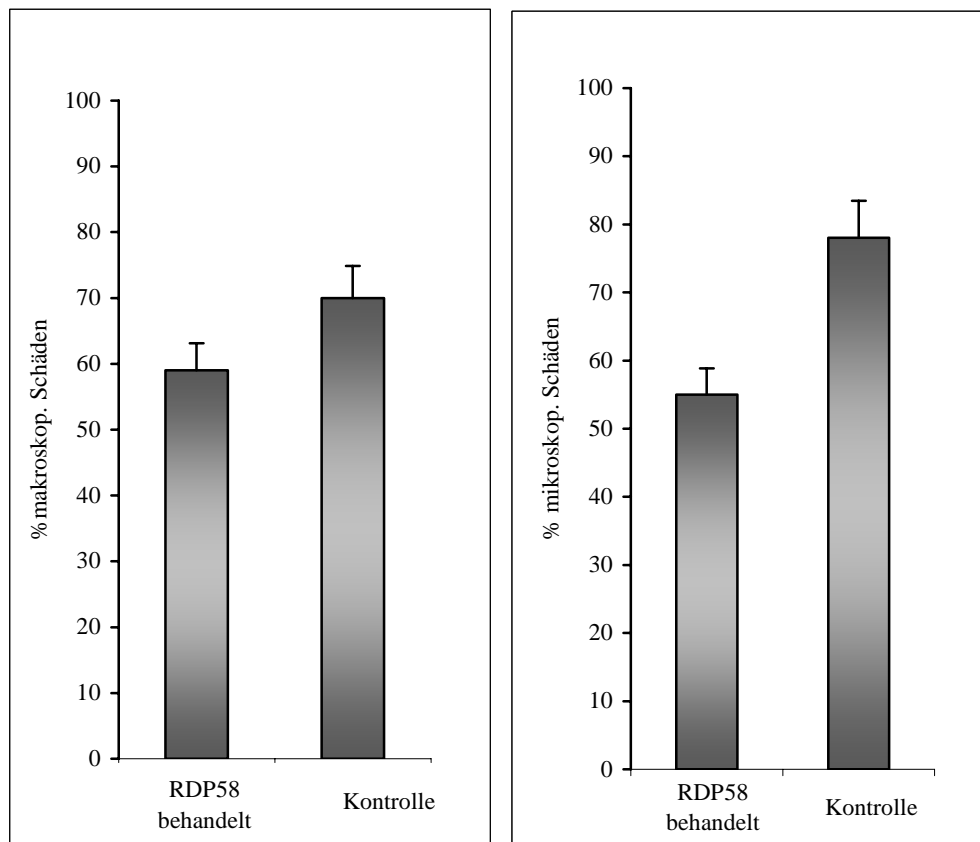
Die mikroskopische Auswertung zeigte einen Anteil an Ulzerationen von  $69\% \pm 6\%$  gegenüber  $65\% \pm 6\%$  bei der Kontrollgruppe. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren nicht statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ). Die Ergebnisse der Gruppe I sind in **Abb. 12** dargestellt.



**Abb. 12:** Makroskopisch und mikroskopisch erfasste Gewebläsion des Kolons der Tiere mit TNBS – induzierter Kolitis nach 3tägiger Vorbehandlung mit 5 mg RDP58 resp. Plazebo.

## II. Nachbehandlung mit 5 mg RDP58/kg KG

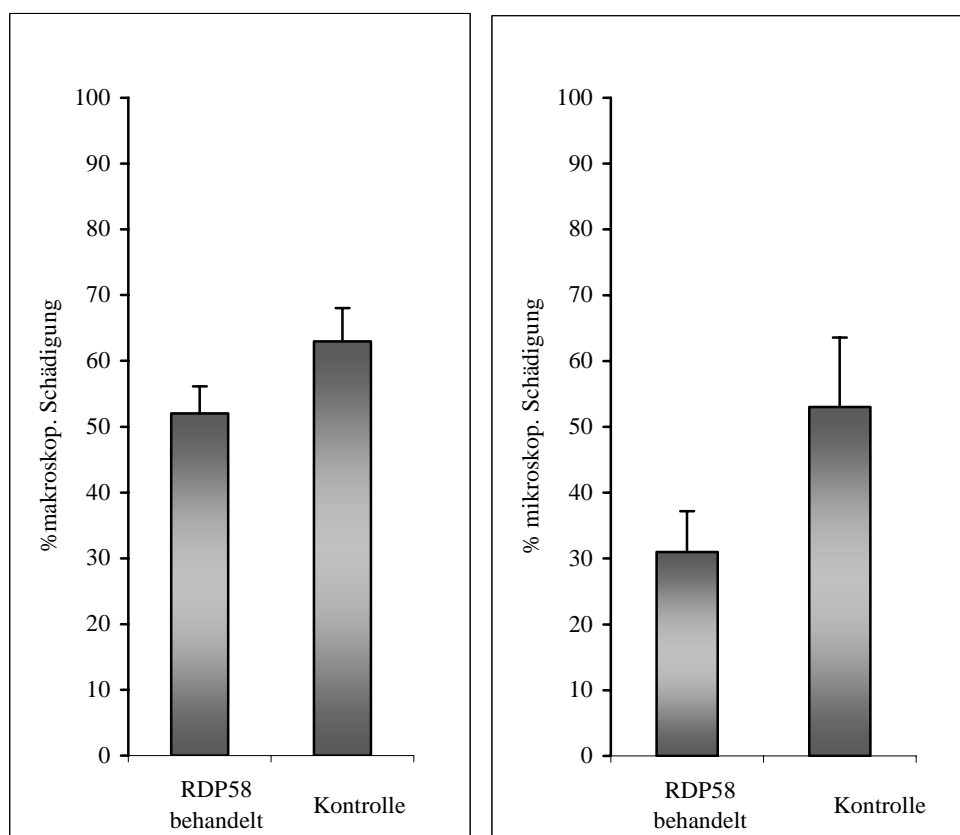
Der durchschnittliche makroskopische Gewebeschaden lag bei den RDP58 behandelten Tieren bei  $59\% \pm 8\%$ , bei den Tieren der Kontrollgruppe bei  $70\% \pm 7\%$ . Die Gruppe der RDP58 behandelten Ratten zeigte  $55\% \pm 5\%$ , in der Kontrollgruppe fanden sich  $78\% \pm 6\%$  mikroskopische Schädigung des untersuchten Gewebestückes (**Abb. 13**). Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,05$ ).



**Abb. 13:** Makroskopisch und mikroskopisch erfasste Gewebeschädigung des Kolons der Tiere mit TNBS – induzierter Kolitis nach 7-tägiger Behandlung mit 5 mg RDP58 resp. Placebo.

### III. Nachbehandlung mit 10 mg RDP58/kg KG

Der durchschnittliche makroskopische Gewebeschaden bei den Ratten, die mit RDP58 behandelt wurden lag bei  $52\% \pm 8\%$ . Die Tiere der Kontrollgruppen wiesen eine Schädigung der Darmschleimhaut von  $63\% \pm 9\%$  auf. RDP58 behandelte Tiere wiesen eine prozentuale mikroskopisch erfassbare Schleimhautschädigung von  $31\% \pm 11\%$  auf. Bei plazebobehandelten Ratten belief sich dieser auf  $53\% \pm 9\%$  (**Abb. 14**). Diese Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

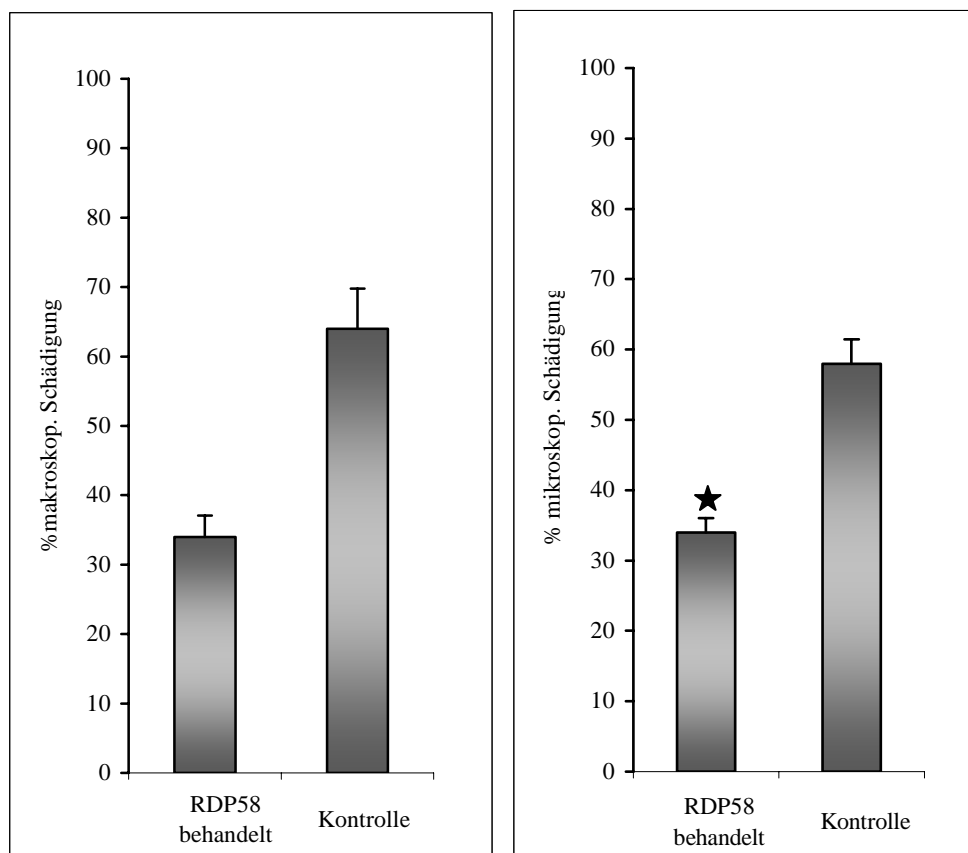


**Abb. 14:** Makroskopisch und mikroskopisch erfasste Gewebläsion des Kolons der Tiere mit TNBS – induzierter Kolitis nach 7tägiger Behandlung mit 10 mg RDP58 resp. Plazebo.

#### IV. Vor- und Nachbehandlung mit RDP58 5 mg/kg

Der durchschnittlich makroskopisch erfasste Schaden lag bei den RDP58 behandelten Tieren bei  $34\% \pm 5\%$ , bei den plazebobehandelten Tieren bei  $64\% \pm 8\%$ .

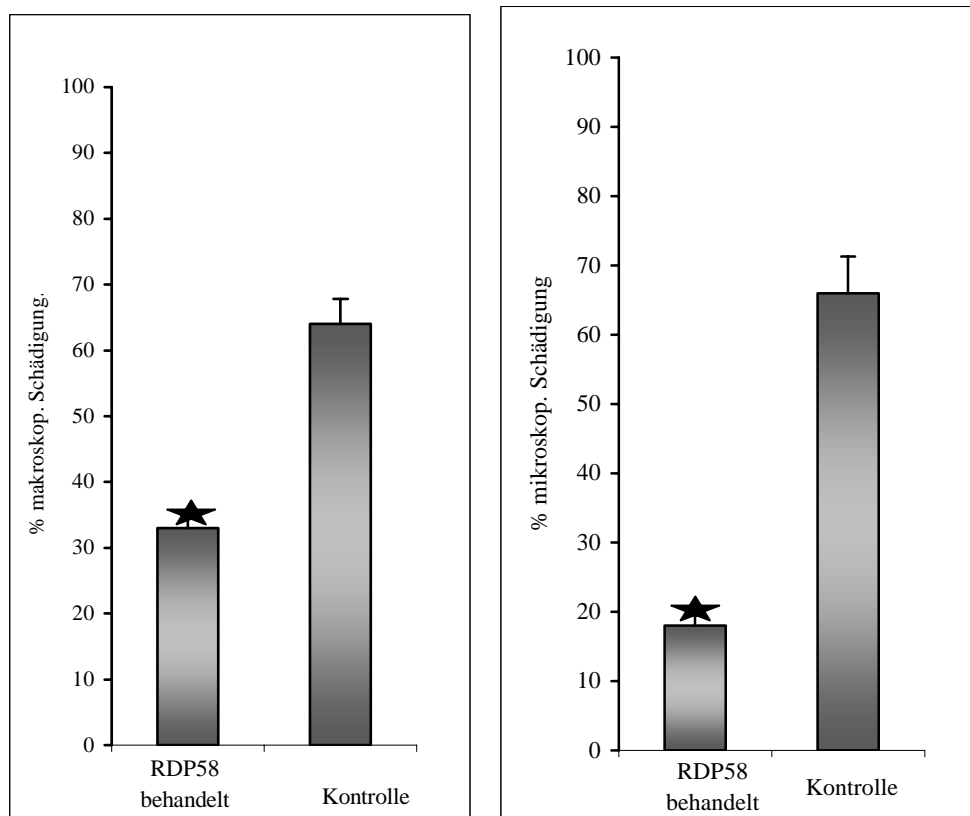
RDP58 behandelte Ratten wiesen bei der mikroskopischen Evaluation  $34\% \pm 6\%$  Läsionen auf. Die Kontrolltiere zeigten im Durchschnitt  $58\% \pm 6\%$  mikroskopische Läsionen (**Abb. 15**). Dieses Ergebnis war signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 15:** Makroskopisch und mikroskopisch erfasste Gewebläsion des Kolons der Tiere mit TNBS – induzierter Kolitis nach 10tägiger Behandlung mit 5 mg RDP58 resp. Plazebo.

## V. Vor- und Nachbehandlung mit RDP58 10 mg/kg bei TNBS 25mg/kgKG

Der durchschnittliche makroskopische Gewebeschaden bei den Ratten, die mit RDP58 behandelt wurden lag bei  $33\% \pm 5\%$ . Die Tiere der Kontrollgruppen wiesen eine Schädigung der Darmschleimhaut von  $64\% \pm 8\%$  auf. RDP58 behandelte Tiere wiesen eine prozentuale mikroskopisch erfassbare Schleimhautschädigung von  $18\% \pm 5\%$  auf. Bei plazebobehandelten Ratten belief sich dieser auf  $66\% \pm 9\%$  (**Abb. 16**). Diese Ergebnisse waren signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 16:** Makroskopisch und mikroskopisch erfasste Gewebläsion des Kolons der Tiere mit TNBS – induzierter Kolitis nach 10tägiger Behandlung mit 10 mg RDP58 resp. Plazebo.

## **Zusammenfassung der Ergebnisse**

### **Gruppe I: Vorbehandlung 5mg/kg RDP58 vs. 50 mg TNBS**

Der Vergleich der makroskopischen Ergebnisse konnte eine nicht signifikante Reduktion der Gewebeschäden von 9% durch die RDP58 Vorbehandlung zeigen ( $p > 0,05$ ). Auch mikroskopisch wurde keine signifikante Reduktion des Gewebeschadens durch eine Vorbehandlung mit RDP58 nachgewiesen ( $p > 0,05$ ). Im Vergleich schnitten RDP58 behandelte Tiere um 6% schlechter ab.

### **Gruppe II: Nachbehandlung 5 mg/kg RDP58 vs. 50 mg TNBS**

Die makroskopischen Ergebnisse zeigen eine Abnahme der Gewebeschäden im Kolon von 16% bei den RDP58 behandelten Tieren ( $p > 0,05$ ). Die mikroskopische Auswertung der beiden Gruppen wies eine Reduktion der Gewebeschäden RDP58 behandelter Ratten von 30% auf ( $p > 0,05$ ). Die Reduktionen liegen nicht im signifikanten Bereich.

### **Gruppe III: Nachbehandlung 10 mg/kg RDP58 vs. 50 mg TNBS**

Die makroskopischen Ergebnisse zeigen eine Reduktion der Gewebeschäden um 18% ( $p > 0,05$ ) bei den RDP58 behandelten Tieren. Die mikroskopische Auswertung der beiden Gruppen wies eine Reduktion der Gewebeschäden um 42% ( $p > 0,05$ ) RDP58 behandelter Ratten auf. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der RDP58 Dosis bei postkolitischer Behandlung zwar zu einer Verminderung der Gewebeschäden führt, diese jedoch nicht im signifikanten Bereich liegt.

### **Gruppe IV: Vor- und Nachbehandlung 5 mg/kg RDP58 vs. 50 mg TNBS**

Die makroskopischen Ergebnisse zeigen eine Abnahme der Gewebeschäden im Kolon von 47% bei den RDP58 behandelten Tieren ( $p > 0,05$ ). Die mikroskopische Auswertung der beiden Gruppen wies eine Reduktion der Gewebeschäden RDP58 behandelter Ratten von

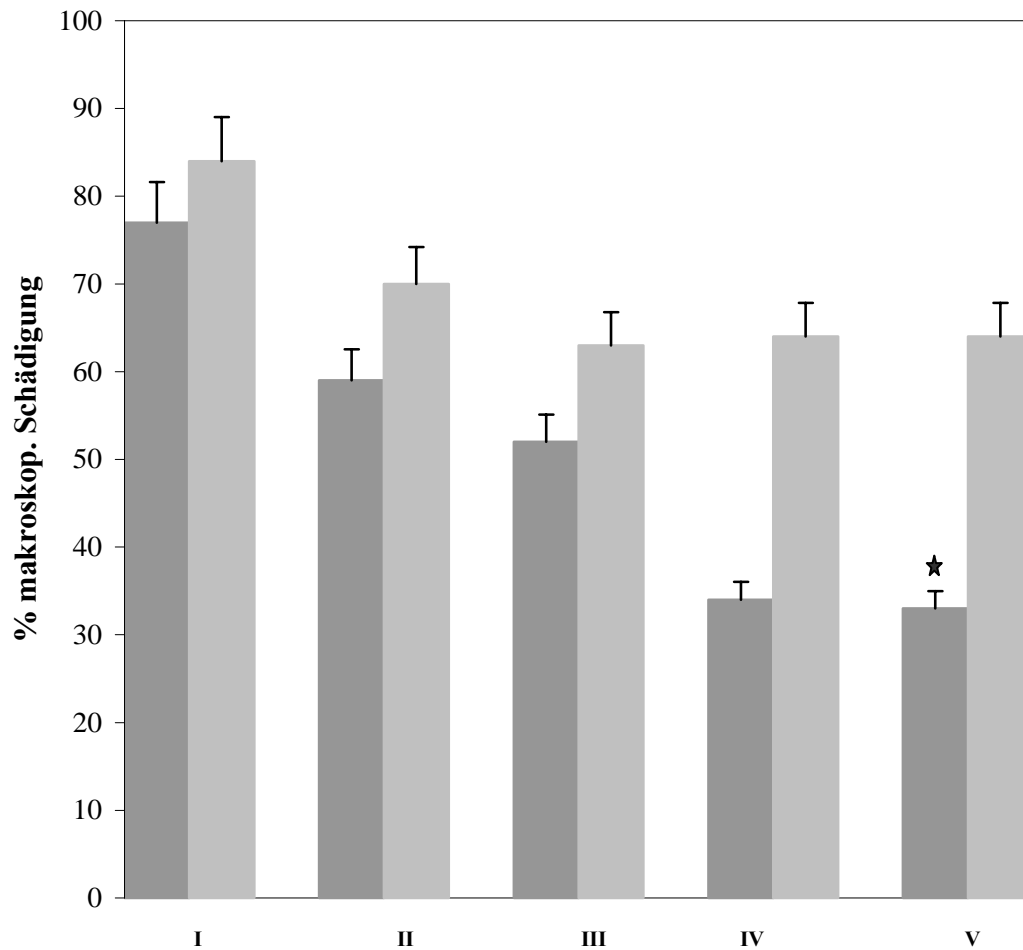
41% auf ( $p < 0,05$ ). Die Reduktionen der mikroskopischen Auswertung liegen im signifikanten Bereich.

**Gruppe V: Vor- und Nachbehandlung 10 mg/kg RDP58 vs. 25 mg TNBS**

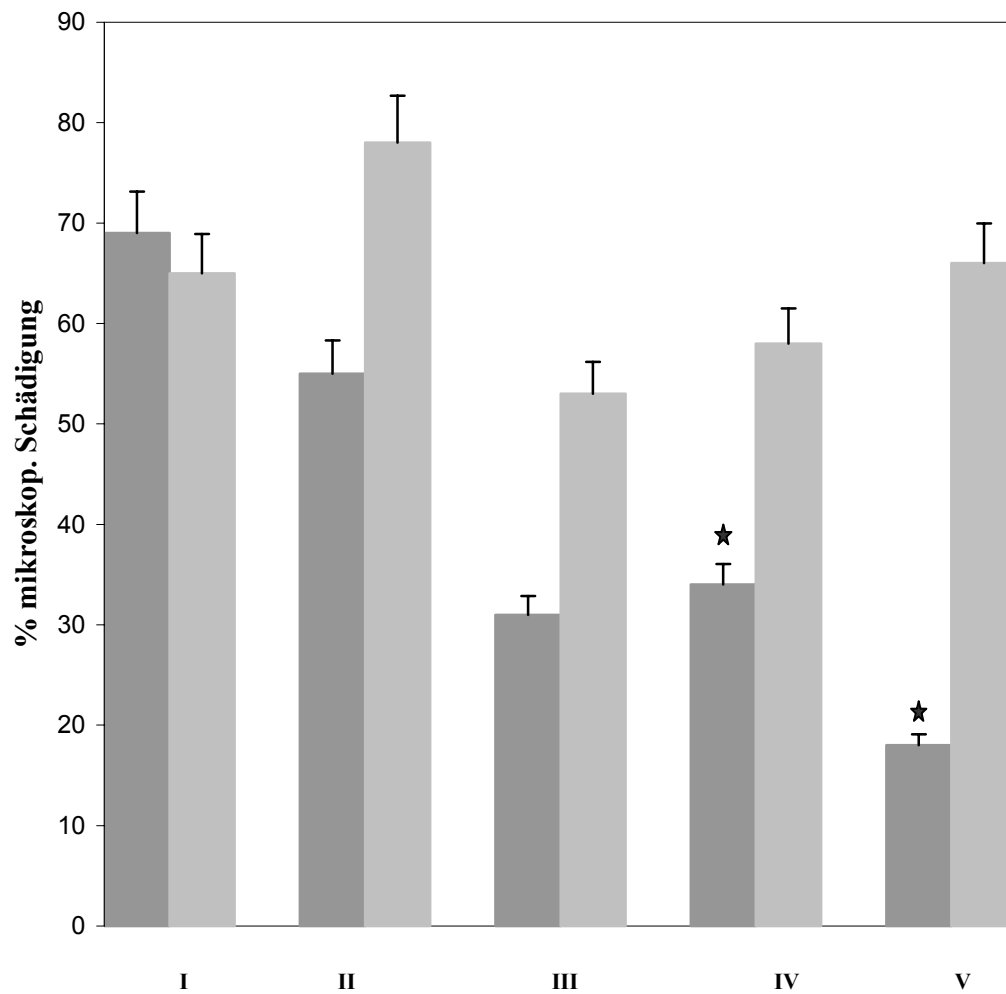
Die makroskopischen Ergebnisse zeigen eine Abnahme der Gewebsläsionen im Kolon von 60% bei den RDP58 behandelten Tieren ( $p < 0,05$ ). Die mikroskopische Auswertung der beiden Gruppen wies eine Reduktion der Gewebeschäden RDP58 behandelter Ratten um 71% auf ( $p < 0,05$ ). Die Reduktionen der makroskopischen mikroskopischen Auswertung liegen im signifikanten Bereich.

Die Ergebnisse sind nochmals in **Abb. 17** und **Abb. 18** nebeneinander im Balkendiagramm dargestellt.





**Abb. 17:** Makroskopische Ergebnisse im Vergleich. Die Unterschiede waren in Gruppe V statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). (Dunkelgraue Balken = Ergebnisse der RDP58 behandelten Tiere, hellgraue Balken = Ergebnisse der plazebobehandelten Tiere).



**Abb. 18:** Mikroskopische Ergebnisse im Vergleich. Die Unterschiede waren in den Gruppen IV und V statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). (Dunkelgraue Balken = Ergebnisse der RDP58 behandelten Tiere, hellgraue Balken = Ergebnisse der plazebobehandelten Tiere).

## 4. Diskussion

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen zeigen in etwa der Hälfte der Fälle einen intermittierenden, rezidivierenden Verlauf, mit Krankheitsschüben, die in der Regel zufrieden stellend behandelt werden können [Bickston et al., 2003; Gibson et al., 2005; Michetti et al., 2005]. Die Therapie im akuten Schub umfasst die Kombination einer passageren immunsuppressiven und antiphlogistischen Medikation [Baumgart et al., 2003; Herrlinger et al., 2004; Nayar et al., 2004; Vogt, 2005]. Abhängig von der Lokalisation im Magen-Darm-Trakt stehen heute neben systemischen auch mehrere topisch wirksame Präparate in Form von Klysmata, Suppositorien oder Rektalschäumen zur Verfügung [Greenfield et al., 1993; Hanauer et al., 2004; Michetti et al., 2005]. Ferner besteht die Möglichkeit, durch bestimmte Verkapselungen den Wirkstoff verzögert, meist pH - abhängig freizusetzen. Diese Patienten sind damit in eine stabile Remission der Erkrankung zu bringen, die unterschiedlich lange anhalten kann [Baker, 2001; Edsbacker et al., 2004; McKeage et al., 2002]. Im Falle eines Rezidivs erfolgt dann eine erneute, identische Therapie.

In etwa 50% der Fälle kommt es jedoch zu schwerwiegenden Verläufen, die entweder durch einen steroidabhängigen oder steroidrefraktären Verlauf gekennzeichnet sind [Bourreille, 2004; Michetti et al., 2005; Scholmerich, 2004]. Im ersten Fall bedarf die Behandlung der Erkrankung einer kontinuierlich hohen Steroidgabe mit entsprechend gravierenden Langzeitnebenwirkungen. Reduziert man die Steroiddosis kommt es erneut zu Krankheitsschüben. Bei einem steroidrefraktären Verlauf bleibt das Ansprechen auf topische oder systemische Kortisonpräparate gänzlich aus. Bei einer dritten Gruppe von Patienten kommt aufgrund von Nebenwirkungen eine Steroidgabe oder antiphlogistische Therapie von Beginn an nicht in Betracht.

Bei all diesen Patienten muss dann ein alternativer immunsuppressiver Behandlungsversuch erfolgen. Bewährt hat sich vor allem Azathioprin oder sein Metabolit, das 6-Mercaptopurin. Weiterhin stehen unter anderem Methotrexat, Cyclosporin A und Takrolimus zu Verfügung, Medikamente die vor allem in der Transplantationsmedizin erprobt sind

[Dubinsky, 2004; McDonald et al., 2005; Neurath et al., 2001; Sandborn, 2004; Vogt et al., 2005].

Seit mehreren Jahren sind Antikörper gegen TNF- $\alpha$  Gegenstand vieler Untersuchungen bei Patienten mit CED. Durch die Neutralisierung dieses Zytokins kommt es zu einer deutlichen Hemmung der Entzündungsreaktion [Comerford et al., 2004; Ghosh 2004; Luger et al., 2001; Nielsen et al., 1993]. Im klinischen Einsatz ist derzeit ein Antikörper mit einem humanen und murinen Anteil, der bei einem Teil der Patienten mit schwerwiegendem Verlauf eines Morbus Crohn zu Krankheitsremissionen führen kann [Present et al., 1999; Rutgeerts et al., 1999; Sandborn, 2004]. Dieser systemisch wirksame, intravenös zu applizierende Antikörper ist jedoch mit teilweise erheblichen akuten und chronischen Nebenwirkungen verbunden [Bickston et al., 1999; Comerford et al., 2004]. Derzeit sind eine Vielzahl weiterer gegen TNF- $\alpha$  gerichteter Substanzen in Erprobung [Ghosh, 2004; Sandborn, 2004; Stack et al., 1997; Targan et al., 1997; Watkins et al., 1995].

Die in dieser Arbeit untersuchte Substanz RDP58 ist ein Peptid, welches zur Inhibition von TNF- $\alpha$  führt, wobei der genaue Wirkmechanismus nicht genau bekannt ist [Holtmann, 2003]. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass RDP58 Entzündungen im Magen-Darm-Trakt und anderen Organsystemen bei verschiedenen Spezies positiv beeinflusst [Iyer et al., 2000; Iyer et al., 2003]. RDP58 ist ein Protease-resistentes Peptid, welches verschiedenen HLA-Peptiden ähnelt und immunsuppressive Eigenschaften aufweist. Insbesondere führt es zur Hemmung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, in erster Linie zu einer Inhibition von TNF- $\alpha$ . Diese Inhibition wird unter anderem durch eine Hemmung der pathologisch erhöhten Transkription von TNF- $\alpha$  und anderen Zytokinen bei Entzündungsprozessen vermittelt [Holtmann, 2003; Iyer et al. 2002].

Im Vergleich zu anderen Anti-TNF-Therapien kann RDP58 aufgrund der Stabilität gegenüber Proteasen unverändert den Magen-Darm-Trakt passieren und somit oral appliziert werden. Der Wirkstoff passiert den gesamten Magen-Darm-Trakt und wird mit dem Stuhl unverändert ausgeschieden [Iyer et al., 2002]. Die Substanz kann somit lokal an der intestinalen Schleimhaut wirken. Ebenfalls im Gegensatz zu anderen

Substanzen konnte RDP58 nicht systemisch im Blut oder anderen Geweben nachgewiesen werden, sodass es sich hierbei um eine rein topische Therapie handelt [Holtmann, 2003]. Systemische Nebenwirkungen sind somit nicht zu erwarten und bisher auch nicht beschrieben [Murdock et al., 2003; Travis et al., 2005].

Die in diesen Untersuchungen im Tierversuch induzierte Kolitis ist ein langjährig etabliertes Entzündungsmodell, welches intestinale Läsionen und Veränderungen zeigt, die denen eines Morbus Crohn ähnlich sind. So kommt es zu tiefen Ulzerationen der intestinalen Schleimhaut mit Epitheloidzellgranulomen. Das Ausmaß der Entzündung ist bei den meisten Tieren ähnlich und dosisabhängig [Morris et al., 1989].

Die Auswertung der Versuche erfolgt durch eine semi-quantitative Erfassung der Schleimhautfläche, die makroskopisch erkennbare und mikroskopische Veränderungen in Form von Ulzerationen zeigt. Diese Art der Quantifizierung ist identisch in vorangegangenen Untersuchungen beschrieben und Grundlage zahlreicher Publikationen mit dem identischen Entzündungsmodell [Armstrong et al., 2001; Elson et al., 1995; Elson et al., 2001; Hoshino et al., 1992; Morris et al., 1989; Neurath et al., 2000].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen tragen zur Klärung der Frage bei, ob eine topische anti-TNF-Behandlung den Verlauf einer Kolitis positiv beeinflussen kann. Hierbei wurde wie bei früheren Arbeiten mit anderen Zytokinen oder Wachstumsfaktoren [Zeeh et al., 1996; 2001] untersucht, ob durch eine alleinige prophylaktische Behandlung mit RDP58 vor Induktion der Kolitis der Verlauf der Erkrankung abgemildert werden kann. Ferner wurde der rein therapeutische Effekt durch eine Behandlung nach Induktion der Kolitis und schließlich die Kombination einer Behandlung vor und nach Induktion der Kolitis untersucht. Diese unterschiedlichen Betrachtungen können erste Hinweise geben ob die Substanz alleine zur Therapie nach Auftreten der Erkrankung geeignet sein könnte, oder ob damit ein Beitrag zur Remissionserhaltung geliefert werden könnte. Bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist dies von Interesse, da in der klinischen Behandlung zwischen einer remissionserzielenden und einer remissionserhaltenden Therapie unterschieden werden muss. Die jeweils dafür geeigneten Pharmaka unterscheiden sich zum Teil erheblich hinsichtlich ihrer Potenz oder

hinsichtlich Ihres Nebenwirkungsspektrums. Für RDP58 wurden Untersuchungen hinsichtlich des Potentials zur Remissionserhaltung nicht durchgeführt.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung zeigen, dass eine alleinige Behandlung der Tiere vor Induktion der Kolitis zu keinem milderen Verlauf der Entzündung am Kolon führt, was für RDP58 bislang nicht beschrieben war. Unterschiede waren weder makroskopisch noch mikroskopisch erfassbar. Somit könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass RDP58 keine isoliert protektive Wirkung in diesem Entzündungsmodell zeigt. Dies ist bisher auch bei keiner anderen gegen TNF gerichteten antiinflammatorischen Therapie bekannt. Auch in anderen früheren Untersuchungen, die teilweise am gleichen Tiermodell unter Verwendung anderer Substanzen, darunter verschiedene Wachstumsfaktoren durchgeführt wurden, konnten solche protektiven Effekte nicht beschrieben werden [Armstrong et al., 2001; Elson et al., 1995; Hoshino et al., 1992].

Der rein therapeutische Einsatz einer anti-TNF-Behandlung ist mittlerweile in vielen verschiedenen Spezies durchgeführt worden. Hier zeigte in erster Linie das Infliximab, ein neutralisierender Antikörper, eine ausgeprägte Wirkung [Comerford et al., 2004; Ghosh, 2005]. Beim Menschen ist eine solche Therapie mittlerweile in schweren Fällen eines Morbus Crohn und einer Colitis ulcerosa gerechtfertigt [Domenech, 2006]. Neben dem Infliximab sind viele andere gegen TNF- $\alpha$  gerichtete ähnliche Antikörper derzeit in Erprobung [Sandborn et al., 2004].

Die hier durchgeführten Untersuchungen mit RDP58 zeigten ebenfalls eine deutliche, hochsignifikante Besserung der Mukosaschäden im Vergleich zu den mit Plazebo behandelten Tieren. Allerdings zeigte die alleinige RDP58 Behandlung der Tiere nach dem Auslösen der Kolitis nur einen Trend zur Besserung, jedoch keine eindeutig signifikanten Ergebnisse. Erst die kombinierte Behandlung vor und nach Auslösen der Kolitis zeigte einen eindeutigen Effekt. Die Erklärung dafür kann derzeit nicht ausreichend erbracht werden. Möglicherweise kann durch eine Erhöhung der RDP58-Dosis der beschriebene Trend zu einem signifikanten Ergebnis gebracht werden. Allerdings kann ohne einen solchen Nachweis eine rein therapeutische Wirkung nicht postuliert

werden. Hier müssen noch weitere Untersuchungen zur Klärung dieser offenen Frage folgen.

Der beschriebene mildere Verlauf der Kolitis unter einer RDP58 Behandlung war nur im Rahmen der mikroskopischen Auswertung zu erfassen. Das Ausmaß der makroskopisch beschriebenen Läsionen war nicht signifikant geringer. Diese Tatsache ist am ehesten damit zu erklären, dass die makroskopische Erfassung der Läsionen nicht ausreichend subtil und standardisiert erfolgen kann. Auch in anderen Untersuchungen mit dem gleichen Kolitismodell sind unterschiedliche Ausmaße der Gewebeläsionen meist ebenso nur durch eine Besserung des Ausmaßes der mikroskopisch beschriebenen Läsionen erfassbar geworden [Zeeh et al., 1996; Zeeh et al., 2001].

Ob eine Reduktion der Konzentration des entzündungsauslösenden TNBS die Signifikanz des therapeutischen Erfolges beeinflusst, kann anhand der hier beschriebenen Untersuchungen nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Dazu wurde in dieser Arbeit nur ein Versuch durchgeführt, der diese Theorie jedoch stützt. Nach Induktion der Kolitis mit verdünntem TNBS zeigte die RDP58 Behandlung einen ausgeprägteren Effekt. Dabei kam es neben einer Besserung der mikroskopischen Schleimhautschäden auch zu einem Unterschied bei den makroskopisch erfassbaren Läsionen, die in allen anderen Untersuchungsgruppen sich nicht signifikant unterschieden. Dies ist am ehesten damit zu erklären, dass durch mildere Gewebeläsionen die Wirkungen von RDP58 deutlicher werden. Entsprechend schwerere Läsionen könnten umgekehrt zu einer Maskierung der Wirkung führen. Hier besteht die Möglichkeit dass durch eine Erhöhung der RDP58 Dosis eine bessere Wirkung erzielt werden könnte. Auch dies muss anhand weiterführender Studien untersucht werden.

Vergleichbare Studien, in denen RDP58 an der DSS-Kolitis der Maus untersucht wurde [Boismenu et al., 2002], zeigten eine mikroskopisch und makroskopisch erfassbare hochsignifikante Reduktion der Schleimhautschäden. Murthy et al. [2002] beschrieben ebenfalls eine signifikante Effektivität von RDP58 5 -10 mg/kg KG in Vergleich zu 5-ASA 50 mg/kg KG in der DSS Kolitis der Maus. Bourreille et al. [2003] testeten 5 mg/kg RDP58 für 8 Tage in niedrig konzentrierter TNBS-Kolitis in der

Ratte (25 mg/kg TNBS). Die histologische und makroskopische Evaluation zeigte eine hochsignifikante Verbesserung ( $p < 0,001$ ). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, dass RDP58 eine verbesserte Wirksamkeit in der experimentellen Kolitis zeigt, wenn die TNBS Konzentration niedriger ist. Insgesamt konnte anhand der vorgelegten Ergebnisse ein deutlicher Effekt des oral applizierbaren, topisch wirksamen TNF- $\alpha$  Inhibitors RDP58 auf die experimentell induzierte Kolitis der Ratte nachgewiesen werden. Mittlerweile wurden in ersten Pilotstudien die Wirksamkeit von RDP58 bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa beschrieben [Travis et al., 2005] und die Ergebnisse aus den Tierversuchen bestätigt. Somit kann RDP58 eine mögliche Therapieoption bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen darstellen. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da es sich hier um eine rein topische Therapie handelt, die das Ausmaß der systemischen Nebenwirkungen einer Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie drastisch reduzieren könnte. RDP58 käme aufgrund dessen auch potentiell zur Remissionserhaltung bei M. Crohn in Frage. In der vorliegenden Arbeit konnte eine prophylaktische Therapie jedoch keine Wirkung zeigen. Entsprechende Untersuchungen am Menschen wurden noch nicht durchgeführt.

Anhand der hier beschriebenen Untersuchungen kann gefolgert werden, dass RDP58 den Verlauf einer experimentellen Kolitis positiv beeinflussen kann. Dies wurde mittlerweile in ersten Untersuchungen am Menschen bestätigt. Darüber hinaus könnte aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass RDP58 keine prophylaktische Wirkung zeigt und somit möglicherweise eine Therapie zur Remissionserhaltung bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen keine Wirkung zeigt. Hierzu fehlen bislang weiterführende tierexperimentelle Studien oder Untersuchungen am Menschen.



## 5. Zusammenfassung

*Einführung:* Bei therapierefraktären Verläufen des Morbus Crohn stellt eine Anti-Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  Therapie eine Behandlungsoption dar. Rational Designed Peptid (RDP) 58 hemmt die stressinduzierte Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , Interferon (IFN)- $\gamma$ , Interleukin (IL)-2 und IL-12. Es wird oral verabreicht, wirkt topisch an der Schleimhaut und zeigt keine systemischen Effekte. Es wurde die Wirksamkeit von RDP58 auf die experimentelle Kolitis der Ratte untersucht. *Methoden:* Bei Ratten (n=200) wurde mit Trinitrobenzenesulfonsäure (TNBS)/Ethanol eine Kolitis induziert. Gruppe I-IV (I-IV) erhielten 50 mg TNBS/kg, Gruppe V (V) erhielt 25 mg/kg. I (n=20) wurde 3 Tage vor Induktion der Kolitis mit RDP58 (5 mg/kg) täglich behandelt. II (n=20) erhielt nach der Kolitisinduktion täglich eine 7tägige Behandlung mit 5mg RDP58/kg. III (n=20) wurde nach Kolitisinduktion 7 Tage lang mit 10 mg RDP58/kg behandelt. IV (n=20) wurde mit 5 mg RDP58/kg 3 Tage vor und 7 Tage nach Induktion der Kolitis behandelt. V (n= 20) erhielt eine 3tägige Vorbehandlung und 7tägige Nachbehandlung mit 10 mg RDP58/kg. Zu jeder Gruppe gab es eine gleichgroße Kontrollgruppe, die nach dem gleichen Schema das Vehikel erhielt. 7 Tage nach Kolitisinduktion wurde das Kolon auf makroskopische und mikroskopische Gewebeschäden untersucht. *Ergebnisse:* I zeigte nach RDP58 Behandlung 77% makroskopische Läsionen und 69% mikroskopische, versus (vs) 84% und 65% bei Tieren der Kontrollgruppe. II zeigte nach RDP58 Behandlung 59% makroskopischen Läsionen und 55% mikroskopische Läsionen, vs 70% und 78%. III zeigte durch RDP58 Behandlung 52% makroskopische Schäden und 31% mikroskopische Schäden, vs 63% und 53%. IV zeigte 34% makroskopische und 34% mikroskopische Schädigung der RDP58-behandelten Tiere, vs 64% und 58% ( $p<0,05$ ). V zeigte 33% makroskopische und 18% mikroskopische Schädigung der RDP58 behandelten Tieren, vs 64% und 66% ( $p<0,05$ ). *Schlussfolgerung:* RDP58 zeigte nur durch Kombination einer Vor- und Nachbehandlung eine signifikante therapeutische Wirkung. Der Effekt ist abhängig von der RDP58 Dosis und der Konzentration der TNBS-Lösung.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Armstrong, A., Foulkes, R., Jennings, G., Gannon, C., Kirk, S., Gardiner, K.(2001):  
Tumour necrosis factor inhibitors reduce the acute-phase response in hapten-induced colitis.  
Bri. J. Surg. 88, 235 - 240.
2. Baker, D. (2001):  
Budesonide modified-release capsules.  
Rev. Gastroenterol. Disord. 1, 147 – 155.
3. Baumgart, D., Wiedenmann, B., Dignass, A. (2003):  
Biologische Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankung.  
Z. Gastroenterologie 41, 1017 – 1032.
4. Bickston, S.J., Comerford, L., Cominelli, F. (2003):  
Future Therapies for Inflammatory Bowel Disease.  
Curr. Gastroenterol. Reports 5, 518 – 523.
5. Bickston, S.J., Lichtenstein, G.R., Arsenau, K.O., Cohen, R.B., Cominelli, F. (1999):  
The relationship between infliximab treatment and lymphoma in Crohns Disease.  
Gastroenterology 117, 1433 - 1437.
6. Boismenu, R., Chen, Y., Chou, K., El-Sheikh, A., Buelow, R. (2002):  
Orally administered RDP58 reduces the severity of DSS induced colitis.  
Ann. Rheum. Dis. 61 Suppl. 2, 19 – 24.
7. Bourreille, A. (2004) :  
From corticosteroids to anti-Tumor-Nekrose-Faktor treatments, when dependence takes over.

- Gastroenterol. Clin. Biol. 28(8 - 9), 696 – 698.
8. Bourreille, A., Doubremelle, M., de la Bletiere, D., Segain, J., Toquet, C., Buelow, R., Galmiche, J. (2003) :  
RDP58, a novel immunomodulatory peptide with anti-inflammatory effects. A pharmacological study in TNBS colitis and Crohns Disease.  
Scand. J. Gastroenterol. 38: 526 – 532.
9. Comerford, L., Bickston, S. (2004):  
Treatment of luminal and fistulizing Crohn's disease with Infliximab.  
Gastroenterol. Clin. North. Am. 33, 387 – 406.
10. Domenech, E. (2006):  
Inflammatory bowel disease: current therapeutic options.  
Digestion 73: 67 – 76.
11. Dubinsky, M. (2004):  
Azathioprine, 6-mercaptopurine in Inflammatory Bowel Disease:  
pharmacology, efficacy and safety.  
Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2(9), 731 – 743.
12. Edsbacker, S., Andersson, T. (2004):  
Pharmacokinetics of Budesonide capsules for Crohn's disease.  
Clin. Pharmacokinet. 43(12), 803 – 821.
13. Effendy, I., Loffler, H., Maibach, H.I. (2000):  
Epidermal cytokines in murine cutaneous irritant responses.  
J. Appl. Toxicol. 20, 335 - 341.
14. Egger, B., Chai, N., Wang, L., French, S., Buchler, W., Eysselein, V. (2001):  
TGF-alpha is not needed for malignant transformation in experimental colitis.  
Scand. J. Gastroenterol. 36, 276 – 282.

15. Elmore, D., Anderson, J., Hird, D., Sanders, K., Lerche, N. (1992):  
Diarrhea rates and risk factors for developing chronic diarrhea in infant and juvenile rhesus monkeys.  
Lab. Anim. Sci. 42, 356 - 359.
  
16. Elson, C., Cong, Y., Iqbal, N., McGhee, J., Weaver, C. (2001):  
Are lessons from experimental models relevant for human IBD?  
In: Rachmilewitz, D., Modigliani, R., Podolsky, D., Sachar, D., Tozun, N. (Eds.): VI International Symposium on IBD. 1. Aufl., S. 31 – 38.
  
17. Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S., Riddell, R.H. (1995):  
Experimental Models of Inflammatory Bowel Disease.  
Gastroenterology 109, 1344 - 1367.
  
18. Fuss, I., Neurath, M., Biorivant, M. (1996):  
Disparate CD4 lamina propria lymphokine secretion profiles in IBD. CD LP cells manifest increased secretion of IFN- $\gamma$ , whereas UC LP cells manifest increased secretion of IL-5.  
J. Immunol. 157, 1261 – 70.
  
19. Gaginella, S.M., Walsh, R.E. (1992):  
Sulfasalazine: multiplicity of action.  
Dig. Dis. Sci. 37, 810-812.
  
20. Ghosh, S. (2004):  
Anti-TNF therapy in Crohn's disease.  
Novartis Found Symp. 263, 193 – 205; discussion 205 – 218. Review.
  
21. Gibson, P., Iser, J. (2005):  
Inflammatory bowel disease.  
Aust. Fam. Physician 34(4): 233 – 237.
  
22. Greenfield, S.M., Punchard, N.A., Teare, J.P., Thompson, R.P.H. (1993):  
The mode of action of the aminosaliclates in IBD.

Aliment. Pharmacol. Ther. 7, 369 - 383.

23. Han, J., Brown, T., Beutler, B. (1990):

Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level.

J. Exp. Med. 171, 465 - 475.

24. Hanauer, S. (2004):

Review article: aminosalicylates in inflammatory bowel disease.

Aliment. Pharmacol. Ther. 20, 60 – 65.

25. Hawthorne, A.B., Hawkey, C.J. (1989):

Immunosuppressive Drugs in inflammatory bowel disease: a review of their mechanisms of efficacy and place in therapy.

Drugs 38, 267 - 288.

26. Herrlinger, K., Stange, E. (2004):

Chronic inflammatory bowel disease.

Dtsch. Med. Wochenschr. 129, 2241 – 2250.

27. Hoffmann, P., Zeeh, J., Lakshmanan, J., Wu, J., Procaccino, F., Reinshagen, M., McRoberts, J., Eysselein, V. (1997):

Increased expression of TGF-alpha precursors in acute experimental colitis in rats.

Gut 41, 195 – 202.

28. Hollander, D., Vadheim, C., Brettholtz, E. (1986):

Increased intestinal permeability in Crohns patients and their relatives: an etiological factor?

Ann. Intern. Med. 105, 883 – 891.

29. Holtmann, M.M. (2003):

RDP-58.

IDrugs 6, 1188 – 1194.

30. Hoshino, H., Sugiyama, S., Ohara, A., Goto, H., Tsukamoto, Y., Ozaira, T. (1992):  
Mechanism and prevention of chronic colonic inflammation with trinitrobenzene sulfonic acid in rats.  
Exp. Pharmacol. Physiol. 19, 717 - 722.
31. Hugot, J., Chamallard, P., Zouall, H., Lesage, S., Cezard, J.-P. (2001):  
Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohns Disease.  
Nature 411, 599 – 602.
32. Ireland, R. (2005):  
RDP58: a promising oral therapy for ulcerative colitis.  
Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatolog. 2, 440 – 441.
33. Iyer, S., Kontoyiannis, D., Chevrier, D., Woo, J., Mori, N., Cornejo, M., Kollias, G., Buelow, R. (2000):  
Inhibition of tumor necrosis factor m RNA translation by a rationally designed immunomodulatory peptide.  
J. Biol. Chem. 275, 17051 - 17057.
34. Iyer, S., Lahana, R., Buelow, R. (2002):  
Rational design and development of RDP58.  
Curr. Pharm. Des. 8, 2217 – 2229.
35. Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizzaro, T.T., Cominelli, F., Kollias, G. (1999):  
Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies.  
Immunity 10, 387 - 398.
36. Kruys, V., Thompson, P., Beutler, B. (1993):  
Extinction of the TNF-locus, and genes encoding the LPS signalling pathway.

- J. Exp. Med. 177, 1383 - 1390.
37. Li, X., Commane, M., Jiang, Z., Stark G.R. (2001) :  
Il-1 induces NFκB and JNK activation diverge at IRAK.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 4461 – 4465.
38. Lockhart-Mummery, H.E., Morson, B.C. (1960):  
CD (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from UC.  
Gut 1, 87 - 105.
39. Lockhart-Mummery, H.E., Morson, B.C. (1964):  
Crohn's Disease of the large intestine.  
Gut 5, 493 - 509.
40. Lorusso, D., Leo, S., Lacitignola, S., Tarantino, S. (1989):  
Chronic inflammatory bowel disease of the intestine. Extra-intestinal  
manifestations and perianal complications.  
Minerva Dietol. Gastroenterol. 35(1), 17 – 21.
41. Lugerling, A., Schmidt, M., Lugerling, N., Pauels, H.G., Domschke, W.,  
Kucharzik, T. (2001):  
Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic  
active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway.  
Gastroenterology 121, 1145 - 1157.
42. Martin, B. (2004):  
Preliminary Results of Sangstat's Phase II Studies.  
Online-Publikation;  
[www.prnewswire.com/cgi-bin/stories.pl](http://www.prnewswire.com/cgi-bin/stories.pl)
43. McDonald, J., Feagan, B., Jewell, D., Brynskov, J., Stange, E.,  
Macdonald, J. (2005):  
Cyclosporine for induction of remission in Crohn's disease.  
Cochrane Database Syst. Rev. 18, 297. Review.

44. McKeage, K., Goa, K. (2002):  
Budesonide: a review of its therapeutic use in the management of active CD in adults.  
Drugs 62(15), 2263 – 2282.
45. Michetti, P., Juillerat, P., Mottet, C., Gonvers, J., Burnand, B., Vader, J., Froehlich, F., Felley, C. (2005):  
Therapy of mild to moderate luminal Crohn's disease.  
Digestion 71(1), 13 – 18.
46. Michetti, P., Mottet, C., Juillerat, P., Felley, C., Vader, J., Burnand, B., Gonvers, J., Froehlich, F. (2005):  
Severe and steroid-resistant Crohn's disease.  
Digestion 71(1), 19 – 25.
47. Monteleone, G., Biancone, L., Marasco, R. (1997):  
IL-12 is expressed and actively released by CD intestinal LPMC.  
Gastroenterology 112, 1169 – 78.
48. Morris, GP., Beck, PL., Herridge, MS., Depew, WT., Szewczuk, MR., Wallace, JL. (1989):  
Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon.  
Gastroenterology 96, 795 - 803.
49. Müller, M. (1997):  
Chirurgie für Studium und Praxis. 1998/99.  
Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste.;  
s. bes. S. 199 – 202.
50. Mullin, G., Lazenby, A., Harris, M., Bayless, T., James, S. (1992):  
Increased IL-2 mRNA in the intestinal mucosal lesions of CD but not UC.  
Gastroenterology 102, 1620 – 1627.



51. Murdock, R., Tesi, T., Fong, T., Travis, S. (2003):  
RDP58, a novel therapeutic.  
R&D-Day2003, Online-Publikation;  
[www.sangstat.com/products/RDP58](http://www.sangstat.com/products/RDP58)
52. Murdock, R., Tesi, T., Fong, T., Travis, S. (2003):  
RDP58, a rationally designed peptide.  
R&D-Day2003, Online-Publikation;  
[www.sangstat.com/products/RDP58](http://www.sangstat.com/products/RDP58)
53. Murdock, R., Tesi, T., Fong, T., Travis, S. (2003):  
RDP58 clinical development: where are we...what is next.  
R&D-Day2003, Online-Publikation;  
[www.sangstat.com/products/RDP58](http://www.sangstat.com/products/RDP58)
54. Murthy, S., Flanigan, A., Coppola, D., Buelow, R. (2002):  
RDP58, a locally active TNF inhibitor, is effective in DSS induced colitis.  
Inflamm. Res. 51, 522 – 531.
55. Nayar, M., Rhodes, J. (2004):  
Management of inflammatory bowel disease.  
Postgrad. Med. J. 33(2), 206 – 213.
56. Neurath, M.F. (1997):  
Mycophenolate mofetil, cortison versus azathioprine.  
Gut 41, 224.
57. Neurath, M., Becker, C., Mudter, J., Atreya, R., Hildner, K., Wirtz, S., Finotto, S. (2001):  
Immuntherapeutic approaches in inflammatory bowel diseases.  
In: Rogler, G., Rutgeerts, P., Sartor, R., Schölmerich, J. (Eds.): IBD at the End of its First Century. 1. Aufl., S. 62 – 65.
58. Neurath, M., Fuss, J., Strober, W. (2000):

TNBS-Colitis.

Intern. Rev. Immunol. 19, 51 - 62.

59. Nielsen, O., Brynskov, J., Bendtzen, K. (1993):  
Circulating and mucosal concentrations of tumor necrosis factor and inhibitor(s) in chronic inflammatory bowel disease.  
Dan. Med. Bull. 40, 247 – 249.
60. Oberyshyn, T.M., Robertson, F.M., Tober, K.L., Ross, M.S., Parrett, M.L., Wilgus, T.A., Iyer, S., Woo, J., Buelow, R. (2001):  
Inhibition of cutaneous UV light-induced TNF-alpha protein production by Allotrap 1258, a novel immunomodulatory peptide.  
Photochem. Photobiol. 73, 184 - 190.
61. Pizarro, T., Arseneau, K., Bamias, G., Cominelli, F. (2003):  
Mouse models for the study of Crohn's disease.  
Mol. Med. 9, 218 – 222.
62. Present, D.H., Rutgeerts, P., Targan, S., Hanauer, S.B., Mayer, L. (1999):  
Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease.  
N. Engl. J. Med. 340, 1398 – 1405.
63. Procaccino, F., Reinshagen, M., Hoffmann, P., Zeeh, J., Lakshmanan, J., Roberts, J., Patel, A., Eysselein, V. (1994):  
Protective Effect of EGF in an experimental model of colitis in rats.  
Gastroenterology 107, 12-17.
64. Reinshagen, M., Adler, G., Eysselein, V. (1995):  
Substance P gene expression in acute experimental colitis.  
Regul. Pept. 22, 53 – 58.
65. Ribbons, K., Zhang, X., Thompson J., Greenberg, S., Moore, W., Kornmeier, C., Currie, M., Lerche, N., Blanchard, J., Clark, D. (1995):

Potential role of nitric oxide in a model of chronic colitis in rhesus macaques.

Gastroenterology 108, 705 - 711.

66. Ribbons, K., Currie, M., Connor, J., Manning, P., Allen, P., Didier, P., Ratterree, M., Clark, D., Miller, M. (1997):

The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase on chronic colitis in the rhesus monkey.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 280, 1008 - 1015.

67. Rogler, G., Andus, T. (1998):

Cytokines in inflammatory bowel disease.

World. J. Surg. 22, 382 - 389.

68. Rutgeerts, P., D'Haens, G., Targan, S.R., Hanauer, S.B., van Deventer, S.J.H., Mayer, L., Present, D., Braakman, T., DeWoody, K.L., Schaible, T.F. (1999):

Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease.

Gastroenterology 117, 761 - 769.

69. Sandborn, W. (2004):

How future tumor necrosis factor antagonists and other compounds will meet the remaining challenges in Crohn's disease.

Rev. Gastroenterol. Disord. Suppl.3, 25 – 33.

70. Scholmerich, J. (2004):

Review article: systemic and topical steroids in inflammatory bowel disease.

Aliment. Pharmacol. Ther. 20 Suppl. 4, 66 – 74.

71. Seibold, F., Wagner, A.C.C., Göke, B. (2000):

Medikamentöse Behandlung CED: aktueller Stand und Ausblick.

Schweiz. Med. Wochenschr. 130, 222 - 232.

72. Shanahan, F. (2000):  
Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents.  
Am. J. Physiol. 278, 191 - 196.
73. Shanahan, F. (2002):  
Crohn's disease.  
The Lancet 359, 62 – 69.
74. Shorter, RG., Huizenga, KA., Spencer, RJ. (1972):  
A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific  
inflammatory bowel disease.  
Am. J. Dig. Dis. 17, 1024 - 1032.
75. Stack, W.A., Mann, S.D., Roy, A.J., Heath, P., Sopwith M., Freeman,  
J. (1997):  
Randomised controlled trial of CDP571 antibody to TNF- $\alpha$  in CD.  
Lancet 349, 521 - 524.
76. Stange, E. F. (2002):  
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen – Neue Therapien:  
TNF-Antikörper und Cytokine.  
Chronisch entzündliche Darmerkrankung 40, 90 – 91.
77. Targan, S.R., Hanauer, S.B., van Deventer, S.J.H., Mayer, L., Present,  
D., Braakman, T., DeWoody, K.L., Schaible, T.F., Rutgeerts, P.J.  
(1997):  
A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor  
necrosis factor alpha for Crohn's disease.  
N. Engl. J. Med. 337, 1029 - 1035.
78. Teahon, K., Smethurst, P., Levi, A. (1992):  
Intestinal permeability in patients with CD and their first degree  
relatives.  
Gut 33, 320 -328.

79. Travis, S., Yap, L., Hawkey, C., Warren, B., Lazarow, M., Fong, T., Tesi, R., RDP investigators study group (2005):  
RDP58 is a novel and potentially effective oral therapy for ulcerative colitis.  
Inflamm. Bowel Dis. 11, 713 – 719.
80. Tice, D., Bruch, D., Buelow, R., Squieres, E. (1997):  
Survival of rat small bowel allografts treated with allotrap 07R.  
J. Surg. Res. 72, 78 – 83.
81. Vogt, W. (2005):  
IBD – diagnosis and therapy.  
Schweiz. Rundsch. Med. Prax. 94(5): 145 – 150.
82. Ward, M (1977):  
The pathogenesis of Crohn's disease.  
Lancet 1977, 903-905.
83. Watkins, P.E., Foulkes, R., Stephens, S., Ward, P., Warren, B.F. (1995):  
Treatment of IBD using anti-TNF- $\alpha$  antibody.  
Br. J. Surg. 82, 693 - 694.
84. Wesche, H., Henzel, W., Shillinglaw, W., Li, S., Cao, Z. (1997):  
MyD88: an adaptor that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex.  
Immunity 7, 837 – 847.
85. Yoshikawa, T., Streilein, J.W. (1991):  
Tumor necrosis factor-alpha and ultraviolet B light have similar effects on contact hypersensitivity in mice.  
Reg. Immunol. 3, 139–144.
86. Zeeh, J., Zorlu, I., Riley, N., Goebell, H., Gerken, G., Dignass, A. (2001):

MMF reduces tissue damage and inflammation in an experimental model of colitis in rats.

Scand. J. Gastroenterol. 36, 66 – 70.

87. Zeeh, J., Procaccino, F., Hoffmann, P., Aukerman, S., McRoberts, J., Soltani, S., Pierce, G., Lakshmanan, J., Lacey, D., Eysselein, V. (1996):

KGF ameliorates mucosal injury in an experimental model of colitis in rats.

Gastroenterology 110, 1077 – 1083.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha
Abb.	Abbildung
ad us. vet.	ad usum veterinarium
AK	Antikörper
Arg	Arginin
bzw.	beziehungsweise
°C	Celsius (in Graden)
ca.	zirka
CDAI	Crohn's Disease activity index
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
cm	Zentimeter
CO <sup>2</sup>	Kohlendioxid
Con A	Concavalin A
CU	Colitis ulcerosa
DNS	Deoxy-Nuklein-Säure
ds-RNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DSS	Dextransodiumsulfat
et al.	et alii (und Mitarbeiter)
$\gamma$	gamma
GIT	Gastrointestinaltrakt
Gly	Glycin
GVHD	Graft versus Host Disease
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
IGF	Insuline-like-growth-factor
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRAK	IL-1 Rezeptor-assoziiertes Komplex
kg	Kilogramm

---

KG	Körpergewicht
KGF	Keratinocyten Growth Factor
LPMNC	Lamina propria mononuclear cells
LPS	Lipopolysaccharide
makroskop.	makroskopisch
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MC	M. Crohn, Morbus Crohn
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
mikroskop.	mikroskopisch
mm	Millimeter
MMF	Mycophenolat Mofetil
m-RNA	messenger-Ribonukleotidsäure
µm	Mikrometer
nm	Nannometer
n	number (Fallzahl)
Nle	Norleucin
NO	Stickstoffmonoxid
O <sup>2</sup>	Sauerstoffmolekül
p	Signifikanzbereich
pH	potentia hydrogenii (Wasserstoffexponent)
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RDP	Rational Designed Peptid
®	eingetragene Marke
resp.	respektive, beziehungsweise
S	Seite
SAE	serious adverse event
SSCAI	simple clinical colitis activity index
stat. sig.	statistische Signifikanz
Tab.	Tabelle
TH-Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNBS	Trinitrobenzenesulfonsäure
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAK	TNF-Rezeptor assoziierter Komplex



Tyr	Tyrosin
u.a.	unter anderem
UV	ultra violett
V.a.	Verdacht auf
v.a.	vor allem
vs.	versus (im Vergleich zu)
ZTL	Zentrales Tierlabor
%	Prozent

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

1	Zytokinmuster und Zellinteraktion in der Pathogenese des MC .....	6
2	Inhibition der Zytokinsynthese durch RDP58 .....	10
3	Applikationsschema der Vorbehandlung.....	19
4	Applikationsschema der Nachbehandlung (5 mg RDP58/kg KG) .....	19
5	Applikationsschema der Nachbehandlung (10 mg RDP58/kg KG) .....	20
6	Applikationsschema Vor- und Nachbehandlung (5 mg RDP/kg KG).....	20
7	Applikationsschema Vor- und Nachbehandlung (10 mg RDP58/kg KG). 21	
8	Aufarbeitung des Kolons.....	21
9	Fertiges histologisches Präparat (HE) .....	23
10	Kolonschleimhaut (HE) einer RDP58 behandelten Ratte der Gruppe V . 24	
11	Kolonschleimhaut (HE) einer unbehandelten Ratte der Gruppe IV.....	25
12	Makroskop. und mikroskop. Ergebnisse der 3tägigen Vorbehandlung ...	26
13	Makroskop. und mikroskop. Ergebnisse der 7tägigen Behandlung .....	27
14	Makroskop. und mikroskop. Ergebnisse der 7tägigen Behandlung .....	28
15	Makroskop. und mikroskop. Ergebnisse der 10tägigen Behandlung .....	29
16	Makroskop. und mikroskop. Ergebnisse der 10tägigen Behandlung .....	30
17	Makroskop. Ergebnisse im Vergleich.....	33
18	Mikroskop. Ergebnisse im Vergleich .....	34

### **7.3. Tabellenverzeichnis**

1	Extraintestinale Manifestationen des MC.....	7
2	Versuchstiere .....	15
3	Narkose .....	15
4	Übersicht der Versuchszusammenstellung.....	18

## 8. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Priv. - Doz. Dr. med. J. Zeeh möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine Betreuung danken.

Herrn Dr. med. Dirsch, ehemaliger Mitarbeiter des Pathologischen Instituts vom Universitätsklinikums Essen und seinen Mitarbeitern danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Beantwortung meiner Fragen.

Ich danke dem Team der gastroenterologischen Abteilung des Universitätsklinikums und des Labors in der Institutsgruppe, die mir stets behilflich waren.

Ich danke meinen Schwestern Frau Dr. med. vet. Regine Schreiner und Frau Susanne Schönfeld für die Motivation aus der Ferne.

Ich danke dem Mann an meiner Seite Herrn Carsten Padrok, der immer für mich da ist und mich uneingeschränkt unterstützt.

Ich danke meiner Mutter und meinem Vater.

Für die stete Förderung meiner Pläne und Vorhaben.

Diese Arbeit widme ich ihnen.

## Lebenslauf

Name: Dorothee Verena Schönfeld  
Geburtsdatum: 16.03.1976  
Geburtsort: Köln  
Wohnort: Köln

### Schulbildung

1983-1987 Grundschule in Bensberg  
1987-1996 "Albertus-Magnus-Gymnasium" in Bensberg  
Mai 1996 Abitur

### Studium

1996 - 1998 Vorklinischer Studienabschnitt an der "Semmelweis-Universität für medizinische Wissenschaften" in Budapest  
August 1998 Physikum  
1998 – 1999 1. klinischer Studienabschnitt an der „Carl-Gustav-Carus-Universität“ in Dresden  
August 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
1999 - 2002 2. klinischer Studienabschnitt an der Universität GH Essen  
April 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2002 – 2003 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Essen  
Wahlfach: Kinder - und Jugendpsychiatrie  
Juni 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Ärztliche Tätigkeit

2003 - 2006 Assistenzärztin im psychiatrischen Krankenhaus „Tagesklinik Alteburger Straße gGmbH“ in Köln.

seit September 2006 tätig als Assistenzärztin für Innere Medizin im CURA Krankenhaus Königswinter