

Einfluss von  $\beta$ -Caryophyllen auf lokale Leukozytenadhäsion, funktionelle  
Kapillardichte und systemische Zytokinspiegel bei experimenteller Interstitieller  
Cystitis

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dr. med. univ. Robert Westhofen  
aus Solingen

Gießen, 2020

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

(betreut durch Herrn Apl. Prof. Dr. med. Axel Junger).

Die experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden

an der Dalhousie University in Halifax, Kanada

im Laboratorium von Prof. Dr. med. Christian Lehmann

(Department of Anesthesia, Pain Management and Perioperative Medicine)

durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. med. Axel Junger

Gutachter: Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner

Tag der Disputation: 24.08.2020

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Physiologie des Endocannabinoid-Systems .....	1
1.2 Cannabinoid-Rezeptoren .....	2
1.3 Immunmodulation des ECS .....	3
1.4 $\beta$ -Caryophyllen .....	4
1.5 Epidemiologie der Interstitiellen Cystitis .....	4
1.6 Anatomie der Blase .....	5
1.7 Hypothesen zur Pathogenese der IC .....	5
1.7.1 Tamm-Horsfall-Protein .....	5
1.7.2 Genetische Faktoren und Autoimmunität .....	6
1.7.3 Urotheldysfunktion und Störung der GAG-Schicht.....	6
1.7.4 Mastzellaktivierung und Inflammation .....	6
1.8 Definition der IC.....	7
1.9 Therapie der IC .....	7
1.9.1 Konservative Therapie .....	7
1.9.2 Orale Medikation.....	8
1.9.3 Intravesikale Medikation .....	9
1.9.4 Neuromodulation.....	10
1.9.5 Operative Therapie .....	10
1.9.6 Therapieschema der IC.....	11
1.10 Fragestellungen.....	12
2. Material und Methoden .....	13
2.1 Versuchstiere .....	13
2.2 Gruppeneinteilung .....	14
2.3 Versuchsablauf .....	14
2.4 Sondenfütterung.....	14

2.5 Anästhesie und Präparation .....	16
2.6 Katheterisierung.....	16
2.7 Intravitalmikroskopie.....	17
2.8 Probengewinnung .....	18
2.9 Auswertung der Videosequenzen .....	19
2.9.1 Leukozytenadhäsion.....	19
2.9.2 Messung der funktionellen Kapillardichte (FCD).....	20
2.10 Mediatoranalyse.....	22
2.11 Statistik .....	23
3. Ergebnisse .....	24
3.1 IVM - Leukozytenadhäsion .....	24
3.2 IVM - Rolling .....	25
3.3 IVM - FCD .....	26
3.4 Mediatorenanalyse .....	27
3.4.1 ICAM-1 .....	27
3.4.2 Interleukin-4 .....	28
3.4.3 P-Selektin .....	28
3.4.4 Interleukin-6 .....	29
4. Diskussion .....	31
4.1 Methodendiskussion .....	31
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	33
4.2.1 IVM .....	33
4.2.2 Mediatorenanalyse .....	35
5. Schlussfolgerungen .....	38
6. Zusammenfassung.....	39
6.1 Zusammenfassung .....	39
6.2 Abstract.....	40

7. Literaturverzeichnis.....	41
8. Publikationen der vorliegenden Arbeit .....	53
9. Erklärung zur Dissertation .....	55
10. Danksagung.....	56
11. Tabellarischer Lebenslauf .....	57

# 1. Einleitung

## 1.1 Physiologie des Endocannabinoid-Systems

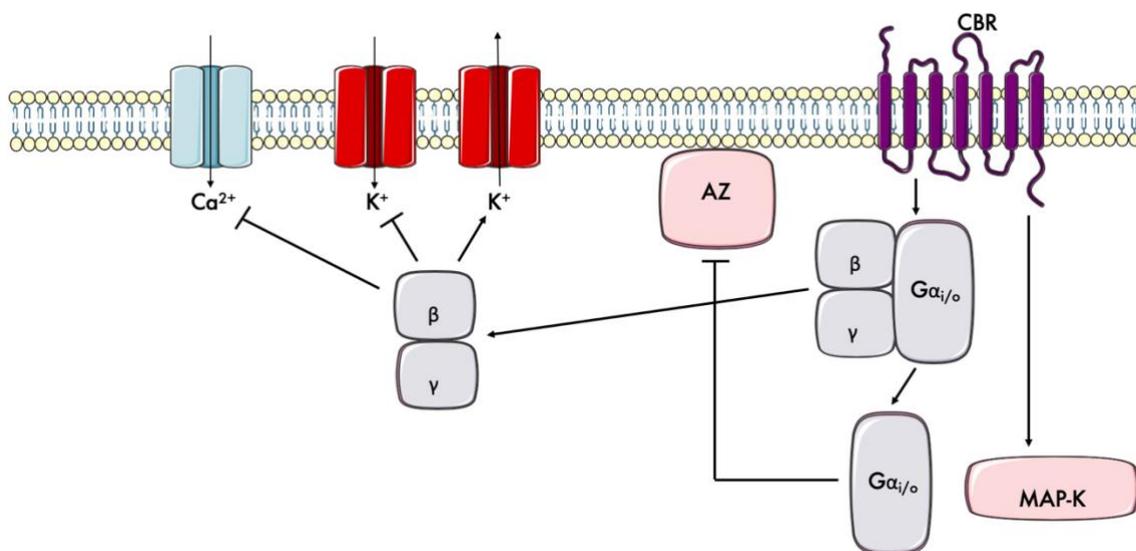
*Cannabis sativa* nimmt seit jeher eine besondere Rolle im spirituellen, religiösen und medizinischen Leben der Menschheit ein und wird als „eine der ältesten Heilpflanzen der Welt bezeichnet“.<sup>27</sup> In etwa 2500 Jahren alten Grabbeigaben chinesischer Adelige fand sich beispielsweise getrocknetes *Cannabis sativa*.<sup>34</sup> Zwar konsumieren Menschen diese Droge schon seit tausenden Jahren, allerdings wurde erst im 20. Jahrhundert begonnen, diese Pflanze intensiv zu erforschen. *Cannabis sativa* liefert, begleitet von großen emotionalen Debatten, vielversprechende Therapieansätze für eine Vielzahl von verschiedenen Erkrankungen.

Der Hauptwirkstoff von *Cannabis sativa*, (-)- $\Delta^9$ -trans-Tetrahydrocannabinol (THC), wurde erst im Jahre 1964 von israelischen Wissenschaftlern des Weizmann-Institutes isoliert.<sup>24</sup> Erst 1990 konnte der erste Cannabinoid-Rezeptor (CB<sub>1</sub>R) und 1993 der CB<sub>2</sub>R identifiziert werden. Die Entdeckung der endogenen Liganden *N*-arachidonylethanolamine (Anandamide) und *2*-arachidonoylglycerol (2-AG), auch Endocannabinoide genannt, folgte einige Jahre später.<sup>17,33,81</sup> Wie der Name vermuten lässt, leiten sich Endocannabinoide von der Arachidonsäure ab, es sind somit lipophile Substanzen, die vom Körper bei Bedarf synthetisiert werden können. Der Abbau der Endocannabinoide erfolgt dann über die Enzyme fatty acid amid hydrolase (FAAH) und monoacylglycerol lipase (MAGL). Dieser Regelkreis aus Endocannabinoiden, Cannabinoidrezeptoren und Enzymen, die diese synthetisieren und wieder abbauen, wurde in den vergangenen Jahren Endocannabinoid-System (ECS) getauft.<sup>62,66</sup>

Zwar steht die ECS-Forschung noch am Anfang, jedoch ist eine ECS-Beteiligung an vielen physiologischen Funktionen bereits belegt. Beispielhaft sind hier das Lang- und Kurzzeitgedächtnis,<sup>28</sup> Essverhalten,<sup>38</sup> Thermoregulation,<sup>69</sup> Analgesie,<sup>18</sup> Schlafverhalten<sup>56</sup> und - für diese Dissertation von besonderer Wichtigkeit - der immunmodulatorische Einfluss zu nennen. Die genauere Erläuterung der Immunmodulation findet im Kapitel 1.3 detaillierter statt.

## 1.2 Cannabinoid-Rezeptoren

Der CB<sub>1</sub>R und der CB<sub>2</sub>R sind G<sub>i/o</sub>-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Dadurch haben sie einen hemmenden Einfluss auf die Adenylatzyklase, was zu einer Verringerung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Außerdem wirken sie stimulierend auf die MAP-Kinase. Es wurde außerdem eine direkte Kopplung der Rezeptoren an bestimmte Ionenkanäle beobachtet. Hier sind der nach außen gerichtete A-Typ Kaliumkanal, der nach Innen gerichtete D-Typ Kaliumkanal und P-, Q- und N-Typ Kalziumkanäle zu nennen. Hauptsächlich entfalten die Cannabinoid-Rezeptoren also inhibitorische Wirkungen. In Abbildung 1 sind diese Kanäle schematisch dargestellt.<sup>33</sup>



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der CBR-Signalkaskade (AZ=Adenylatzyklase, MAP-K= MAP-Kinase,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ = Untereinheiten des G-Proteins).<sup>96</sup>

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es Hinweise für weitere potentielle Cannabinoid-Rezeptoren. So wurden in jüngster Vergangenheit Wirkungen von Cannabinoiden an drei weiteren GPCR - GPR18, GPR 119 und GPR55 - beschrieben. Es gibt allerdings andere – stärkere - endogene Liganden für diese Rezeptoren, so dass ein „CB<sub>3</sub>R“ derzeit nicht bestätigt werden kann.<sup>4,53</sup>

Im Jahre 1990 wurde der CB<sub>1</sub>-Rezeptor als erster Cannabinoid-Rezeptor entdeckt. Er ist hauptverantwortlich für die psychotrope Wirkung von *Cannabis sativa* und ist nach

heutigem Kenntnisstand der zahlenmäßig häufigste Rezeptor im Säugetiergehirn, wurde aber auch in anderen peripheren Geweben identifiziert.<sup>52,63,101</sup> Die Bindung eines Agonisten an den CB<sub>1</sub>R führt zu einer Hemmung der Neurotransmitterausschüttung – der Rezeptor befindet sich vorwiegend an präsynaptischen Axonen.<sup>8</sup>

1993 wurde dann der CB<sub>2</sub>R als zweiter Cannabinoid-Rezeptor identifiziert. Im Gegensatz zum CB<sub>1</sub>R führt die Bindung eines Agonisten an den CB<sub>2</sub>R zu keiner psychoaktiven Wirkung. Die Aufgabe des CB<sub>2</sub>R besteht in der Immunmodulation - der Rezeptor ist am häufigsten auf Immunzellen wie zum Beispiel neutrophilen Granulozyten, T-Lymphozyten oder Plasmazellen aufzufinden.<sup>86</sup> Nach Bindung eines Liganden an den CB<sub>2</sub>R kommt es zu verminderter Leukozytenextravasation und zu verminderter Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. CB<sub>2</sub>R-Aktivierung ist somit anti-inflammatorisch.<sup>5,20</sup>

### **1.3 Immunmodulation des ECS**

Wie in Kapitel 1.2 bereits angesprochen, besitzt das ECS durch den CB<sub>2</sub>R einen potenten Einfluss auf das Immunsystem. Eine Expression des CB<sub>2</sub>R wurde bislang auf B- und T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, Thrombozyten und dendritischen Zellen beschrieben.<sup>67</sup>

Durch Studien an Versuchstieren konnte gezeigt werden, dass die Endocannabinoidplasmaspiegel bei Vorliegen einer systemischen Infektion signifikant erhöht sind. Dadurch wurde nachgewiesen, dass das ECS an der systemischen Entzündungsreaktion beteiligt ist.<sup>60,89</sup>

Dass Endocannabinoide zu einer Verminderung der proinflammatorischen Zytokin-Spiegel führen, konnte bereits durch mehrere *in vitro* Studien belegt werden. Insbesondere die Freisetzungsraten von Interleukin 1 $\beta$ , Interleukin 6, Interleukin 2 und TNF- $\alpha$  sinken signifikant unter Endocannabinoideinfluss ab.<sup>19,23,61</sup> In einem murinen Modell wurde im Rahmen einer Lipopolysaccharid-induzierte Inflammationsreaktion der Gehalt an 2-AG und Anandamid gemessen. Die Administration eines FAAH-Inhibitors (URB597) führte darüber hinaus zu einem weiteren Anstieg der 2-AG- und Anandamid-Spiegel im Serum und damit konsekutiv zu einer weiteren Reduktion der Spiegel proinflammatorischer Zytokine.<sup>82</sup>

Das ECS ist also im Stande, einen potenten Einfluss auf die Inflammationsreaktion auszuüben, indem es mittels Endocannabinoid-initiiertes Aktivierung von CB<sub>2</sub>R-Rezeptoren zu einer Attenuierung der Inflammationskaskade führt.

#### **1.4 β-Caryophyllen**

β-Caryophyllen (BCP) ist ein bicyklisches Sesquiterpen und kommt in Form von ätherischen Ölen insbesondere in schwarzem Pfeffer, Oregano und Nelkenöl vor. Zudem ist es eines der häufigsten Terpene in *Cannabis sativa*. Seit dem Jahre 2008 weiß man, dass BCP ein selektiver CB<sub>2</sub>R-Agonist ist und somit keinerlei psychotrope Wirkungen entfaltet, dafür aber immunmodulatorisch und entzündungshemmend wirkt.<sup>25</sup>

Der Einfluss von BCP auf das Immunsystem wird aktuell auf breiter Basis untersucht. In murinen Modellen wurde bereits ein positiver Einfluss des BCP auf Erkrankungen wie alkoholische Steatohepatitis, Apoplex oder Morbus Parkinson nachgewiesen. In einem weiteren murinen Modell wurde ein signifikanter Einfluss von BCP auf das Suchtverhalten beobachtet.<sup>9,50,59,90</sup>

Zwar hat die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) BCP bei fehlender Toxizität bereits als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen, allerdings gibt es bis zum heutigen Tage keine kontrollierten Studien an Patienten.<sup>79</sup> Um einen potentiellen Effekt auf den Menschen zu ermitteln, wäre dies in Zukunft erstrebenswert.

Unsere Arbeitsgruppe wählte aus oben genannten Gründen BCP als Testsubstanz für die geplante Versuchsreihe.

#### **1.5 Epidemiologie der Interstitiellen Cystitis**

Als Interstitielle Cystitis (IC) bezeichnet man die chronische Inflammation der Blase ohne Zeichen einer Infektion. Diagnose und Therapie dieser Erkrankung stellen wegen unzureichend bekannter Pathophysiologie, unterschiedlicher Diagnosekriterien und fehlender klinischer Parameter eine besondere Herausforderung dar.<sup>15,30</sup>

Einschätzungen bezüglich genauer epidemiologischer Daten gestalten sich schwierig, da die aktuelle Datenlage aus wenigen populationsbezogenen Studien stammt. Nach Hochrechnungen leiden weltweit 2,7-6,5% der Frauen an einer IC.<sup>39</sup> Durch die unklare Datenlage weist auch die Prävalenz eine hohe Streuung von 18-510 pro 100.000 Einwohner auf.<sup>30,54</sup> Bemerkenswert ist allerdings die deutliche Bevorzugung des weiblichen Geschlechts mit einem Verhältnis von circa 10:1.<sup>11,13</sup>

## **1.6 Anatomie der Blase**

Die Blase ist ein im kleinen Becken liegendes, muskuläres Hohlorgan und dient der Zwischenspeicherung des Sekundärharns bis zur Entleerung der Blase.

Histologisch sind mehrere Schichten erkennbar. Luminal ist die Blase mit einem mehrschichtigen Epithel, dem sogenannten Urothel ausgekleidet. Urothel findet sich als spezielles Epithel in allen Abschnitten der ableitenden Harnwege. Dem Urothel liegt eine protektive Schicht aus Glycosaminoglykanen (GAG) auf. Als GAG werden Substanzen wie Hyaluronsäure, Heparansulfat oder Chondroitinsulfat bezeichnet, die eine hohe Wasserbindungskapazität aufweisen. Die GAG wirken zusammen mit dem Urothel als Barriere zu dem sauren, hypertonen Urin und potentiell toxischen Urinsoluten. Eine weitere Besonderheit des Urothels ist seine Adaptation an verschiedene Füllungszustände der Blase. Basal des Urothels folgt die Submukosa, die sich ebenfalls an verschiedene Füllungszustände der Blase anpassen kann und außerdem die Elimination von toxischen Soluten des Urins wahrnimmt und die Nähr- und Sauerstoffversorgung des Gewebes gewährleistet.

Basal der Submukosa liegt die Tunica muscularis, die auch als M. detrusor bezeichnet wird. Sie besteht aus glatten Muskelfasern, deren Kontraktion eine Entleerung der Blase (Miktion) herbeiführt. Die Adventitia folgt basal der Tunica muscularis und dient als Bindeglied zwischen umliegenden Strukturen und Blase und enthält außerdem viele Nervenbündel.<sup>16</sup>

## **1.7 Hypothesen zur Pathogenese der IC**

Es existieren einige Hypothesen zur Pathogenese der IC, da die genaue Ätiologie und Pathogenese zum aktuellen Zeitpunkt noch unverstanden sind.

### **1.7.1 Tamm-Horsfall-Protein**

Das Tamm-Horsfall-Protein (THP) ist ein in der Henle-Schleife der Niere gebildetes Protein und entfaltet immunmodulatorische Wirkungen im ableitenden Harntrakt. Durch seine Bindung von Immunglobulinen, Interleukinen, Komplementfaktoren und Interferonen schützt es das Urothel vor potentiellen Immunreaktionen dieser Stoffe.

Studien zeigen, dass bei Patienten mit IC der Gehalt an THP signifikant vermindert ist und es somit zu pathologischen Wirkungen der oben genannten Stoffe am Urothel kommen kann.<sup>83,98</sup>

### **1.7.2 Genetische Faktoren und Autoimmunität**

Eine 17-fach erhöhte Prävalenz der IC konnte in einer Studie gezeigt werden, die erstgradige weibliche Verwandte mit der Normalbevölkerung verglich. Außerdem wurde eine erhöhte Konkordanz von IC bei monozygoten Zwillingen im Vergleich mit dizygoten Zwillingen festgestellt. In einigen Studien konnte außerdem eine erhöhte Anzahl an CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, Plasmazellen, Immunglobulinen und Autoantikörpern ermittelt werden.<sup>37,47,58,95</sup>

Diese Erkenntnisse belegen, dass es einen genetischen Einfluss dieser Erkrankung gibt und dass autoimmune Faktoren ebenfalls eine maßgebliche Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankung spielen könnten.

### **1.7.3 Urotheldysfunktion und Störung der GAG-Schicht**

Wie bereits erwähnt liegen GAG dem Urothel apikal auf und sind anionische, hydrophile Moleküle. Durch die Bindung von Wasser kommt es zur Bildung einer impermeablen Schicht zwischen Urin und Urothel. Dadurch wird die Bindung von toxischen Substanzen und Uropathogenen an das Urothel verhindert.<sup>83</sup>

Eine Störung dieser Schicht könnte zur Penetration von Noxen in das Urothel und die Submukosa führen. Die verminderte Anzahl an tight junctions resultiert in einer erhöhten Permeabilität des Urothels. Dies könnte einen Einstrom von Kalium in die Submukosa verursachen und die konsekutive Depolarisation von Nervenfasern herbeiführen. Das könnte die chronische Schmerzsymptomatik von Patienten mit IC verursachen.<sup>15</sup>

### **1.7.4 Mastzellaktivierung und Inflammation**

Durch körpereigene Inflammationsreaktionen kann es zu einer erhöhten Permeabilität des Urothels kommen. Dies könnte Stimulus für die Degranulation von Mastzellen und die Produktion von anti-proliferativem Faktor (APF) sein.<sup>36</sup> Lokale Neuropathie mit Schmerzsymptomatik und Miktionsbeschwerden könnten die Folge sein. Diese Theorie wird von Studien gestützt, die eine erhöhte Anzahl an Mastzellen in histologischen Präparaten von Patienten mit IC aufweisen. Klinisch histologisch wird sogar eine Auszählung der Mastzellen als Surrogatparameter für eine IC benutzt.<sup>94</sup> Das Freisetzen von Substanz P durch Mastzellen sorgt für eine zunehmende Extravasation von Leukozyten. Durch die Degranulation der Leukozyten kommt es zur Freisetzung von Leukotrienen und Histamin. Dies bedingt die verminderte Expression der Neurokinin (NK)1 und NK2 Rezeptoren bei Patienten mit IC.<sup>91</sup>

## **1.8 Definition der IC**

Die hohe Variabilität der Symptome und die unverstandene Pathogenese führen nicht nur zu erheblicher Unterdiagnostizierung und verspäteter Diagnose, sondern stellen auch ein großes Hindernis für einheitliche und exakte Diagnosekriterien dar.<sup>13,54</sup>

Nach Definition der European Society for the Study of Interstitial Cystitis (ESSIC) handelt es sich um eine Interstitielle Cystitis, wenn folgende Kriterien vorliegen:

1. Chronische Unterleibs- oder Blasenschmerzen von mindestens sechs Monaten Dauer.
2. Persistierendes Druckgefühl oder Schmerz in Begleitung von mindestens einem weiteren urologischen Symptom wie beispielsweise Pollakisurie oder Harndrang.
3. Ähnliche Erkrankungen sollen vorher ausgeschlossen werden.

## **1.9 Therapie der IC**

Gemäß aktuellen Leitlinien kann die Therapie der IC in konservative Maßnahmen, orale Medikation, intravesikale Medikation, Neuromodulation und operative Maßnahmen gegliedert werden.

Konservative Maßnahmen sollen allen anderen Maßnahmen vorangehen und eine Therapieeskalation auf orale oder intravesikale Medikation nur bei inadäquater Symptomkontrolle erfolgen. Operative Therapien stellen die ultima ratio dar und sollen erst nach Ausschöpfen aller anderen Therapien erfolgen. Zum aktuellen Zeitpunkt sind Dimethylsulfoxid (DMSO) und Pentosan Polysulfat (PPS) die einzigen beiden Medikamente, die eine explizite FDA-Zulassung besitzen. Alle anderen Therapien erfolgen größtenteils off-label.<sup>12,29</sup> Genauere Informationen zu den beiden oben genannten Medikamenten sind in Kapitel 1.9.2 (PPS) und 1.9.3 (DMSO) zu finden.

### **1.9.1 Konservative Therapie**

Die konservative Therapie steht am Anfang jeder Therapie der IC und soll immer durchgeführt werden. Zu den konservativen Maßnahmen zählen:

1. Physiotherapie: Hierzu gehören Biofeedback und Massagen. Dies soll zu einer Entspannung des Beckenbodens führen.<sup>45</sup>
2. Verhaltenstherapie: Sie zeigt Erfolge bei Patienten mit Pollakisurie und Harndrang. Zur Verhaltenstherapie werden Maßnahmen wie kontrollierte

Flüssigkeitszufuhr, Beckenbodentraining und zeitlich festgelegte Miktion gezählt. Allerdings ist die Evidenz für Verhaltenstherapie sehr gering.<sup>7</sup>

3. **Stressreduktion:** Man erhofft sich durch die Reduktion des allgemeinen Stresses eine verbesserte Lebensqualität.
4. **Diätetische Maßnahmen:** Scharfe oder saure Lebensmittel, Kaffee und Alkohol können die Symptome der IC aggravieren.<sup>97</sup> Bei retrospektiven Datenbankanalysen wurde herausgefunden, dass es sich bei diätetischen Modifikationen um eine der fünf am häufigsten verordneten Therapien bei IC handelt. Allerdings gibt es keinen bis sehr geringen wissenschaftlichen Hintergrund für diese Modifikationen.<sup>71</sup>

### **1.9.2 Orale Medikation**

Die Studienlage zu oraler Medikation bei IC ist sehr schlecht, allerdings gibt es eine Vielzahl an Medikamenten, die eingesetzt werden. Folgende Medikamente sind oft nach Evidenzstärke der American Urological Association (AUA) gereiht. Die Wertung erfolgt von einer Grad A Empfehlung (high quality evidence), über eine Grad B Empfehlung (moderate quality evidence) bis hin zu einer Grad C Empfehlung (low quality evidence).

**Amitriptylin:** Das trizyklische Antidepressivum liefert in einigen Studien vielversprechende Ergebnisse.<sup>22,32</sup> Durch seine Blockade der H1-Rezeptoren in der Blase verhindert es Mastzelldegranulierung und damit eine Ödembildung in der Blasenwand. Außerdem verhindert Amitriptylin die zentrale Nozizeption durch Hemmung der Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin.<sup>85</sup> Die AUA wertet Amitriptylin mit einer Grad B Empfehlung.<sup>12</sup>

**Cimetidin:** Cimetidin ist ein oraler H2-Antagonist und wurde im Zusammenhang mit IC untersucht. Die Wirksamkeit ist in mehreren Studien belegt und es wird seitens der AUA ebenfalls mit einer Grad B Empfehlung bewertet.<sup>12,77,84</sup>

**Gabapentin:** Sasaki et al. zeigten in einer Studie, dass Gabapentin in der Lage ist, bei refraktärer urologischer Schmerzsymptomatik eine signifikante Besserung herbeizuführen. Normalerweise wird das Medikament als Antiepileptikum oder bei chronischen neuropathischen Schmerzen eingesetzt.<sup>75</sup>

**Cyclosporin:** Die AUA vergibt für Cyclosporin lediglich eine Grad C Empfehlung.<sup>12</sup> Es wurde in einer kontrollierten Studie an elf Patienten eingesetzt, bei zehn Patienten führte

es zu einer kurzfristigen Besserung der Schmerzsymptomatik. Allerdings kamen die Schmerzen bei allen Patienten nach unterschiedlicher Zeit wieder.<sup>21</sup>

**PPS:** PPS ist ein umstrittenes Medikament zur Behandlung der IC. Es ist ein synthetisches Polysaccharid und gelangt nach oraler Aufnahme über die renale Clearance in den Urin. Im ableitenden Harnsystem soll es dann zu einer Reparatur der beschädigten GAG-Schicht führen und den Einstrom des Kaliums in die Blasenwand reduzieren, um damit die chronische Schmerzsymptomatik zu verbessern. Die AUA wertet PPS mit einer Grad B Empfehlung.<sup>12,65</sup> Das günstige Nebenwirkungsprofil von PPS macht es für viele Patienten dennoch zum präferierten Arzneimittel. Die Studienlage ist allerdings gemischt. In einer großangelegten Studie aus dem Jahr 2015 von Nickel et al. konnte keinerlei Behandlungserfolg von PPS gegenüber Placebo ermittelt werden.<sup>57</sup>

### **1.9.3 Intravesikale Medikation**

Die intravesikale Instillation von Medikamenten kommt nach der oralen Medikation und konservativen Maßnahmen zum Einsatz. Zur Instillation stehen folgende Medikamente zur Verfügung:

Heparin und andere GAG: Ähnlich wie bei PPS soll eine intravesikale Instillation von GAG erreichen, dass die defekte GAG-Schicht über dem Urothel wiederhergestellt wird.<sup>12</sup> Im Gegensatz zu PPS bietet die intravesikale Instillation folgende Vorteile: Es kann eine hohe lokale Konzentration des GAG erreicht werden und es unterliegt nicht dem First-pass-Metabolismus. Eventuell entfaltet Heparin antiinflammatorische Wirkungen bei gleichzeitiger Hemmung der Proliferation der glatten Muskulatur und der Fibroblasten.<sup>43</sup> Die aktuelle Studienlage zeigt eine signifikante Überlegenheit für die intravesikale Instillation von GAG im Vergleich zu DMSO bei zusätzlich günstigerem Nebenwirkungsprofil.<sup>87</sup>

**DMSO:** Der genaue Wirkmechanismus von DMSO ist bislang nicht geklärt. Trotzdem ist es das am häufigsten eingesetzte Medikament zur intravesikalen Instillation. Es wird vermutet, dass DMSO analgetische und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt und zu einer Relaxierung des M. detrusor führt.<sup>12</sup> Zusätzlich kann DMSO zu einer vorübergehenden Schädigung des Urothels führen und damit das Eindringen von anderen Medikamenten in das Urothel und die Submukosa erleichtern. In aktuellen Studien wird die Wirksamkeit von DMSO gegenüber Placebo erneut bewiesen, allerdings war

gegenüber GAG keine Überlegenheit ersichtlich.<sup>14,87</sup> Die AUA gibt DMSO lediglich eine Grad C Empfehlung.<sup>12</sup>

**Lidocain:** Lidocain hat wegen seiner lokalanästhetischen Wirkungen einen hohen Stellenwert bei vielen Schmerzsyndromen. Die Anwendung von Lidocain bei IC zeigt gute Ergebnisse, allerdings hat es nur eine kurze Wirkdauer. Außerdem existieren keine Daten zu optimaler Dosierung des Medikaments.<sup>31</sup> Die AUA bewertet Lidocain mit einer Grad B Empfehlung.<sup>12</sup>

#### **1.9.4 Neuromodulation**

Als Neuromodulation wird die transkutane Stimulation der S3-Wurzel des Rückenmarks bezeichnet. Aktuelle Metaanalysen zeigen vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung der Schmerzsymptomatik und des Dranggefühls. Trotzdem gibt es bislang noch keine offizielle Zulassung für die IC.<sup>92</sup>

#### **1.9.5 Operative Therapie**

Die operative Therapie kommt nur für Patienten in Frage, bei denen vorher alle anderen Therapieoptionen ausgeschöpft wurden. Sie stellt also die ultima ratio dar und beinhaltet verschiedene invasive Maßnahmen:

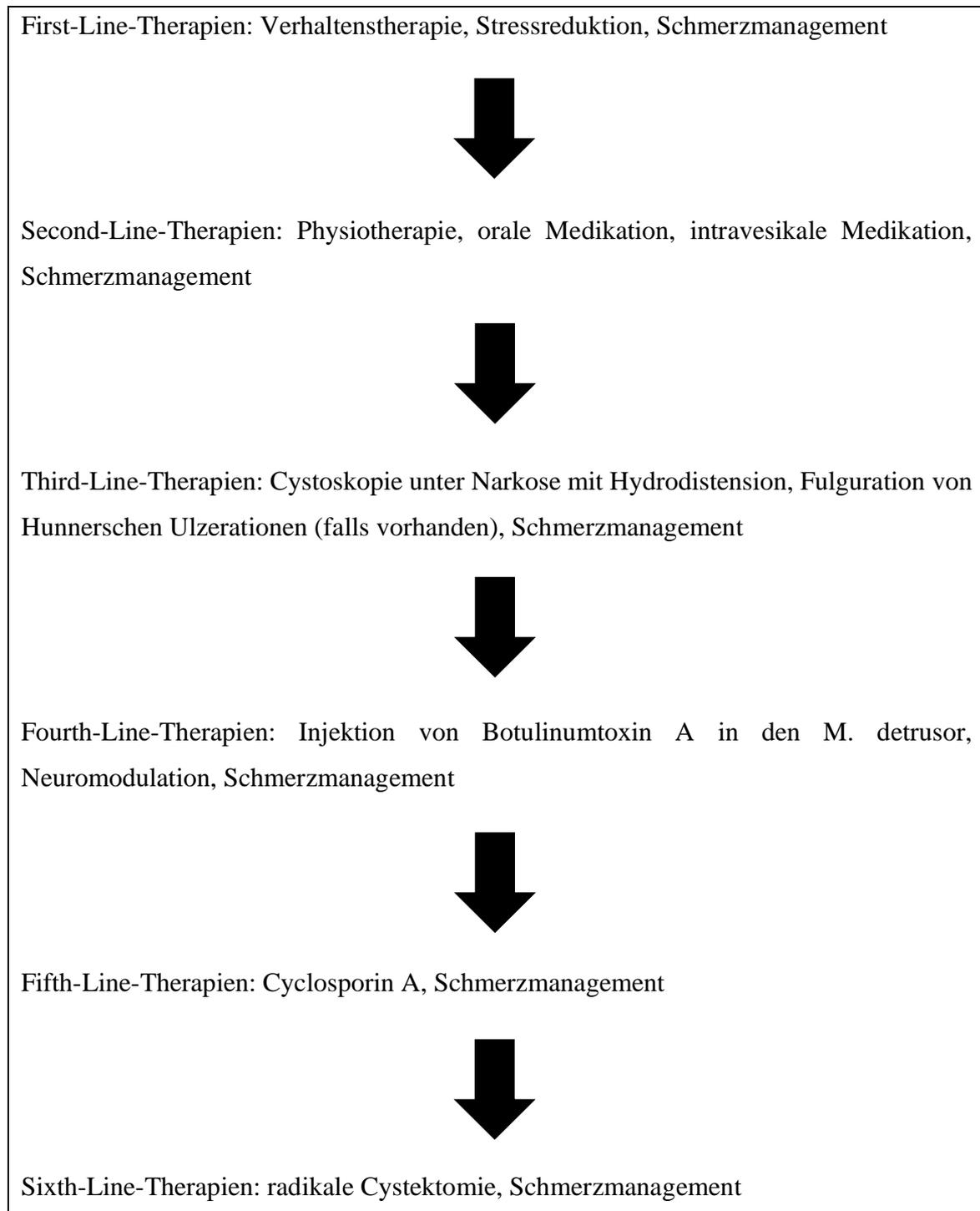
**Botulinumtoxin:** Zur Behandlung der IC kann Botulinumtoxin A in den M. detrusor injiziert werden. Studien belegen deutliche Besserungen bezüglich Schmerzsymptomatik und Dranggefühl. Trotzdem sind weiterführende Studien nötig, da die Datenlage bislang lückenhaft ist.<sup>93</sup>

**Hydrodistension und Fulguration:** Eine weitere Methode zur Behandlung der IC ist die Hydrodistension der Blase mit Wasser unter Narkose bis zur anatomischen Kapazität. Lange Zeit galten Hunnersche Ulzerationen als Kardinalsymptom, diese können bei diesem Eingriff beurteilt und anschließend fulguriert werden. Bislang ist der Wirkmechanismus dieser Therapie nicht geklärt, jedoch stellt alleine die Hydrodistension eine wirksame Therapie dar und sorgt bei vielen Patienten für eine deutliche Besserung der Schmerzsymptomatik für bis zu sechs Monate.<sup>35</sup>

**Cystektomie:** Die absolute ultima ratio stellt die radikale Cystektomie dar. Sie wird nur bei Therapieversagen aller anderen Therapieoptionen durchgeführt. Im Anschluss erfolgt eine kontinente oder inkontinente Harnableitung.<sup>12</sup>

### 1.9.6 Therapieschema der IC

In Abbildung 2 ist die Therapie der IC schematisch dargestellt.



**Abbildung 2:** Therapie der IC (adaptiert von Colaco et al., 2015).<sup>12,96</sup>

## 1.10 Fragestellungen

Die Suche nach einem geeigneten Medikament zur Behandlung der IC gestaltet sich äußerst schwierig, nicht zuletzt wegen der nahezu gänzlich unverständenen Pathophysiologie. Bei steigender Prävalenz dieser Erkrankung ist eine wirksame Therapie dieser Erkrankung allerdings von großer Dringlichkeit.

In meiner Diplomarbeit an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Nürnberg konnte ich zeigen, dass eine enterale Vorbehandlung mit BCP zu einer signifikanten Verbesserung des klinischen Krankheitsverlaufes nach experimenteller IC-Induktion führt, da BCP in der Lage war, die Schmerzsensitivität - gemessen mittels von Frey-Ästhesiometrie - signifikant zu reduzieren. Die hier präsentierten Daten stammen aus weiteren Untersuchungen an der Dalhousie University in Halifax, NS, Kanada.

Unsere Arbeitsgruppe verfolgt die Theorie der inflammatorischen Genese der IC. Daher postulierten wir, dass die Therapie mit einem CB<sub>2</sub>R-Agonisten zu einer Verminderung der Inflammationsreaktion führt. Die Evaluation dieser Fragestellung erfolgte durch folgende drei Methoden: Messung der Leukozytenadhäsion in der Blasenwand, Messung der lokalen funktionellen Kapillardichte (FCD) und der Analyse systemischer Zytokinspiegel.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Kann die orale Gabe von BCP die Leukozytenadhäsion in der Blase nach experimenteller IC-Induktion reduzieren?
- Kann die orale Gabe von BCP die FCD in der Blase nach experimenteller IC-Induktion beeinflussen?
- Hat die orale Gabe von BCP einen Einfluss auf die Produktion von inflammatorischen Zytokinen?

## **2. Material und Methoden**

Die Erhebung der experimentellen Daten erfolgte im Microcirculation Laboratory (Leitung: Prof. Dr. med. Christian Lehmann) an der Dalhousie University in Halifax, NS, Kanada im Zeitraum von 07/2018-10/2018. Der Forschungsaufenthalt diente auch der Generierung von Daten zum Verfassen meiner Diplomarbeit an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Nürnberg. Die Daten in dieser Promotionsarbeit sind klar von den Daten der Diplomarbeit abzugrenzen.

Teile der Methodik und des Versuchsaufbaus wurden gemeinsam mit Herrn Dr. med. univ. Georg Hagn entwickelt, der in seiner Dissertation den Einfluss von Eisenchelatoren auf eine experimentelle IC untersuchte.

Es handelt sich um ein experimentelles Tiermodell. Für diese Arbeit lag eine Genehmigung des University Committee for Laboratory Animals (UCLA) der Dalhousie University, Halifax, Kanada vor. Alle Versuche wurden nach den Richtlinien des Canadian Council on Animal Care (CCAC) durchgeführt.

### **2.1 Versuchstiere**

Es wurden insgesamt 20 weibliche BALB/c-Mäuse (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, US) in einem Alter zwischen sechs und acht Wochen mit einem Gewicht von  $20 \pm 3$ g verwendet.

Während der einwöchigen Akklimatisierung in ihren Käfigen lebten die Tiere in Fünfer-Gruppen zusammen. Es herrschten konstante Umgebungsbedingungen von 22°C, einer Luftfeuchtigkeit von 55-60%, und einem zwölfstündigen Tag-/Nachtrhythmus. Futter und steriles Trinkwasser standen den Mäusen ad libitum zur Verfügung.

## 2.2 Gruppeneinteilung

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen zu je fünf Tieren eingeteilt (Tabelle 1).

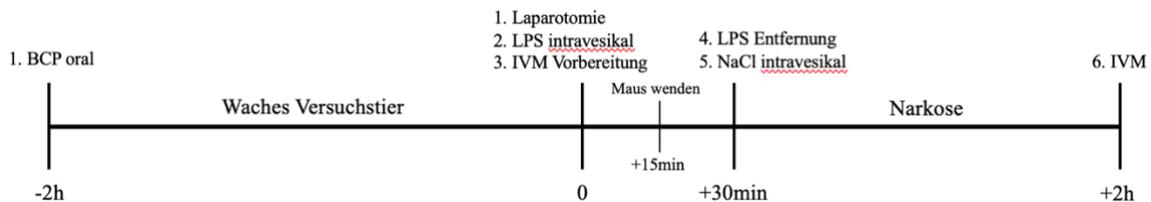
**Tabelle 1:** Gruppeneinteilung

		<b>Intravesikale Instillation</b>	<b>Orale Gabe per Sondenfütterung</b>
<b>CON</b>	Kontrolle	NaCl	Olivenöl
<b>CYS</b>	IC	LPS	Olivenöl
<b>CYS+TX</b>	IC + Therapie	LPS	BCP/Olivenöl
<b>TX</b>	Therapie	NaCl	BCP/Olivenöl

BCP =  $\beta$ -Caryophyllen, NaCl = Natriumchlorid, LPS = Lipopolysaccharid

## 2.3 Versuchsablauf

Abbildung 3 zeigt den zeitlichen Ablauf der Intravitalmikroskopie (IVM).



**Abbildung 3:** Zeitachse des Versuchsablaufs.

## 2.4 Sondenfütterung

Nach Erhalt der Tiere wurden diese zu Beginn jedes Experiments gewogen. Gemäß ihrer Gruppeneinteilung erfolgte dann die Zwangsfütterung (Gavage) mit 50 $\mu$ l Olivenöl (Sigma-Aldrich, Ontario, Kanada) oder Olivenöl und  $\beta$ -Caryophyllen (100 mg/kg; Sigma-Aldrich, Ontario, Kanada). Für die zwei unterschiedlichen Therapien standen separate Sonden zur Verfügung.

Nach Fixierung des Kopfes zwischen Daumen und Zeigefinger wurde die Maus auf Augenhöhe hochgehoben. Dabei wurde auf eine senkrechte Position der Maus geachtet, damit der Ösophagus nicht zu einer Seite abwich.

Danach wurde die Sonde horizontal in das Maul der Maus eingeführt. Bei Erreichen der Rachenwand erfolgte eine vertikale Ausrichtung der Sonde und damit auch des Mauskopfes. Nun wurde die Sonde vorsichtig an der hinteren Rachenwand entlang nach kaudal eingeführt. Bei korrekter Lage im Ösophagus ließ sich die Sonde ohne Widerstand bis auf circa 7/8 der Länge vorschieben.

Dann erfolgte die langsame Instillation der Substanz. Bei korrekter Lage begann die Maus mit Kaubewegungen. Nach kompletter Instillation wurde die Sonde langsam zurückgezogen. Die Maus wurde dann zurück im Käfig platziert und während der nächsten Schritte kontinuierlich beobachtet.



**Abbildung 4:** Zwangsfütterung einer Maus.<sup>88</sup>

## **2.5 Anästhesie und Präparation**

Circa 15 Minuten vor Beginn der Laparotomie wurde die Anästhesie mit einer intraperitonealen Gabe von Pentobarbital (90mg/kg; Ceva Sante Animale, Montreal, Quebec, Kanada) begonnen.

Die adäquate Tiefe der Narkose wurde anhand von Schmerzstimuli ermittelt. Dabei wurde beobachtet, ob die Maus bei schmerzvoller Stimulation beider Hinterpfoten in Rückenlage eine Reaktion zeigt. Um einer Hypothermie vorzubeugen, wurde die Maus mit einer Wärmematte beheizt und die Körperkerntemperatur kontinuierlich mit einer rektalen Sonde überwacht.

Bei geeigneter Narkosetiefe erfolgte nach gründlicher Desinfektion die mediane Laparotomie. Dabei wurde zunächst das abdominale Fell entfernt. Danach erfolgt die scharfe Trennung der Haut und dann der Bauchmuskeln entlang der Linea alba. Nach Entfernen eines circa 3mm x 3mm großen Areals der Bauchwand wurde nun mit Hilfe von befeuchteten Wattestäbchen die Blase visualisiert. Die Austrocknung des Gewebes wurde durch Applikation von vorgewärmter NaCl-Lösung verhindert.

## **2.6 Katheterisierung**

Nach Handschuhwechsel erfolgte durch vorsichtigen Druck vom Apex vesicae in Richtung des Cervix vesicae das Entleeren der Blase. Danach wurde der urethrale Meatus mit einer Pinzette ventral fixiert. Mit einer anderen Pinzette wurde nun ein dünner Katheter behutsam in die Urethra eingeführt. Nach einem Vorschub von ca. zwei Zentimetern wurde nun mit der Pinzette, die die Urethra fixierte, der urethrale Meatus zugeklemt. Dann erfolgte die Instillation von entweder 50µl Natriumchlorid-Lösung oder 50µl Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* (5 mg/kg; Endotoxinaktivität 3.000.000 IU; Sigma-Aldrich, Ontario, Kanada) zur IC-Induktion. Danach wurde der Katheter langsam entfernt. Um Austrocknung zu vermeiden, wurde die Blase mit Abdominalfett bedeckt und zurück in den Bauchraum verlagert. Danach wurde das Operationsgebiet mit einem feuchten Tupfer abgedeckt und kontinuierlich feucht gehalten.

Nach 15 Minuten erfolgte die Umlagerung von Rückenlage in Bauchlage, damit die instillierte Substanz sowohl die ventrale als auch die dorsale Wand zu gleichen Teilen erreicht. Nach weiteren 15 Minuten wurde die Maus dann wieder zurück in Rückenlage gedreht.

Nun wurde die Blase vorsichtig entleert, erneut katheterisiert und mit 50µl NaCl-Lösung gefüllt. Danach wurde das Operationsgebiet erneut befeuchtet und mit feuchten Tupfern abgedeckt. Während der Prozedur erfolgte alle 15 Minuten eine Überprüfung der Narkosetiefe durch Stimulation der Hinterpfoten. Bei Bedarf erfolgte die Vertiefung der Narkose mit i.p.-Pentobarbital.

## **2.7 Intravitalmikroskopie**

Intravitalmikroskopie (IVM; Abbildung 5) bezeichnet ein Verfahren zur Mikroskopie lebender Organismen. Es dient der Visualisierung von Vorgängen, die nicht an unbelebten Objekten oder Präparaten durchgeführt werden können. In dieser Arbeit wurde die IVM benutzt, um verschiedene Stadien der Leukozytenadhäsion zu untersuchen und die FCD zu visualisieren.

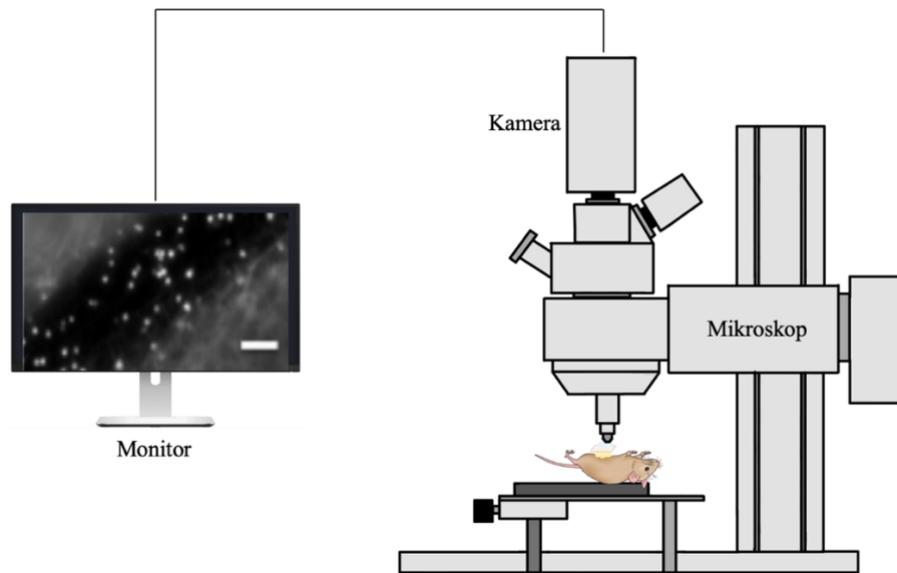
Zehn Minuten vor der Intravitalmikroskopie erfolgte die intravenöse Injektion von Rhodamin 6G (1,5 ml/kg; Sigma-Aldrich, Ontario, Kanada) und Fluorescein isothiocyanat (FITC)-Albumin (1ml/kg; Sigma-Aldrich, Ontario, Kanada) in eine Schwanzvene der Maus.

Rhodamin 6G färbt Mitochondrien an, daher färbt es vornehmlich Leukozyten im Blut. FITC-Albumin visualisiert den Blutfluss in den Gefäßen durch Kontrastbildung.

Das Versuchstier wurde auf der Wärmematte unter dem Objektiv des Mikroskops platziert, die Blase wird dargestellt und dorsal in Abdominalfett gebettet. Um eine optimale Videoqualität zu gewährleisten, wurden die Videos mittels Wasserimmersionsobjektiv aufgenommen.

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe folgender Geräte generiert:

- Mikroskop: Leica, Deutschland
- Objektiv: 20 x Vergrößerung
- Okular: HC PLAN10x/22 M, Leica, Deutschland
- Filter: FITC 520nm, Rhodamin 590nm
- Lichtquelle: HBO-Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe, OSRAM GmbH, Deutschland
- Monitor: LMD-1410 SC LCD, Sony, Japan
- Software: IC-Capture



**Abbildung 5:** Versuchsanordnung bei der Intravitalmikroskopie (IVM).

Es wurde zunächst die Kapillarperfusion in sechs verschiedenen Gesichtsfeldern für jeweils 30 Sekunden mittels der Software aufgezeichnet. Danach folgte die Aufnahme der Leukozytenadhäsion. Hier wurden ebenfalls sechs Videos aus verschiedenen Gesichtsfeldern mit einer Länge von 30 Sekunden aufgezeichnet. Es wurde darauf geachtet, möglichst die gesamte Blase in den Videos abzubilden. Die Gesamtdauer der Intravitalmikroskopie belief sich auf 15-20 Minuten.

## **2.8 Probengewinnung**

Im Anschluss an die Intravitalmikroskopie erfolgte die Gewinnung der Proben zur histopathologischen Analyse.

Zur Euthanasie des Versuchstieres und gleichzeitigen Gewinnung des Blutplasmas wurde die mediane Laparotomie nach kranial ausgeweitet und der Thorax des Tieres ventral eröffnet. Dann erfolgte die Exsanguination des Tieres durch kardiale Punktion.

Durch vorheriges Anbringen einer Klemme am urethralen Meatus wurde ein Entleeren der Blase beim Tod des Tieres verhindert. Aus der gefüllten Blase entnahmen wir nun mittels einer 26G-Kanüle den gesamten Inhalt der Blase. Im Anschluss wurde die Blase am Cervix vesicae abgetrennt und transversal in zwei Teile getrennt. Der Apex der Blase

wurde zur histopathologischen Verwertung für 48 Stunden in Formalin 10% gelagert und danach zur Lagerung in 70% Ethylalkohol überführt.

## **2.9 Auswertung der Videosequenzen**

Die Auswertung der Videosequenzen erfolgte offline an einem Monitor mit dem Open Source Programm FIJI.

### **2.9.1 Leukozytenadhäsion**

Die Messung der Leukozytenadhäsion erfolgte im Hinblick auf zwei Parameter. Zum einen wurde die feste Adhäsion der Leukozyten gemessen. Außerdem wurde die temporäre Adhäsion der Leukozyten, das sogenannte Rollen quantifiziert.

Temporär mit dem Endothel interagierende Leukozyten (Roller):

Zur Quantifizierung der rollenden Leukozyten wurde eine möglichst gerade verlaufende Venole identifiziert. Mittels Software wurde dann eine Linie rechtwinklig zur Gefäßwand durch das Gefäß gezogen. Die Geschwindigkeit der rollenden Leukozyten liegt normalerweise bei circa  $50\mu\text{m/s}$ .<sup>46</sup> Mit einem Zellozähler wurde jede die Linie passierende, rollende Zelle während der gesamten Videosequenz gezählt. Im Anschluss wurde die Anzahl der Zellen verdoppelt, um die Anzahl der rollenden Zellen pro Minute zu erhalten.

#### **Roller-Flow = Zellen/min**

Das Rollen der Leukozyten entlang der Gefäßwand ist Ausdruck einer frühen leukozytären Aktivierung und lässt auf das Vorliegen einer Inflammationsreaktion schließen.<sup>46</sup>

Adhärente Leukozyten:

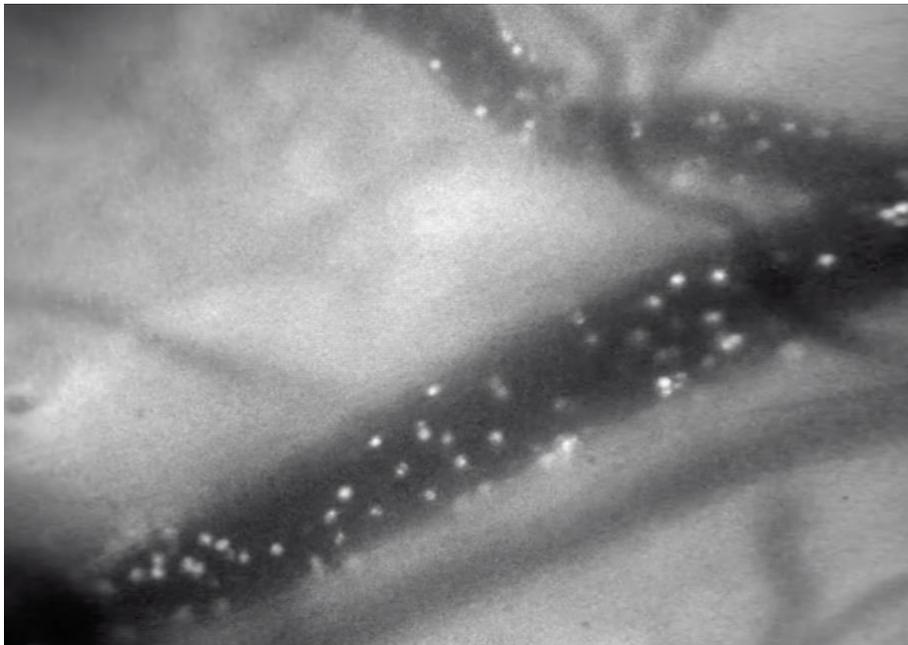
Die feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel ist Ausdruck einer schwereren Inflammationsreaktion. Für das Gefäß, in dem vorher der Roller-Flow gemessen wurde, wurde nun eine möglichst große Querschnittsfläche markiert und per Software vermessen. Unter Annahme einer zylindrischen Form des Gefäßes, wurde die Fläche des Gefäßes anhand folgender Formeln berechnet:

- Zylinderfläche  $F = l \times U$
- $U = \text{Zylinderumfang} = \pi \times d$
- $d = \text{Gefäßdurchmesser}$

- $l$  = Länge des Gefäßes
- Leukozytenadhäsion = Zellen/Fläche [ $n/mm^2$ ]

Durch das vorherige Eichen des Programms konnte nun eine maßstabsgetreue Flächen- und Längenbestimmung der Gefäße erfolgen. Die am Endothel für 30 Sekunden haftenden Leukozyten wurden markiert und ausgezählt.

Abbildung 6 zeigt beispielhaft eine Kapillare der Blase mit adhärennten und rollenden Leukozyten. Das Lumen der Kapillare erscheint schwarz, während die Leukozyten als weiße Punkte identifizierbar sind. Eine Unterscheidung zwischen Adhäsion und Rolling ist in diesem statischen Bild allerdings nicht möglich, hierfür ist die Videoanalyse nötig.



**Abbildung 6:** Mit Rhodamin-6G markierte Leukozyten während der Intravitalmikroskopie (IVM).

### 2.9.2 Messung der funktionellen Kapillardichte (FCD)

Die FCD bezeichnet das Verhältnis aus der Länge der perfundierten Kapillaren zu einer umschriebenen Fläche. Das FITC-Albumin diente der Visualisierung des Blutflusses, indem es während der Mikroskopie beim Durchströmen eines Gefäßes hell leuchtete.

Die Auswertung der Perfusion erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Funktionslose Kapillare: Eine Kapillare ohne sichtbaren Blutfluss oder Pendelfluss während der Sequenz von 30 Sekunden.
- Funktionstüchtige Kapillare: Dauerhafte Perfusion der Kapillare über die komplette Sequenzlänge von 30 Sekunden.

Zur Auswertung der FCD wurde ebenfalls das Open Source Programm FIJI benutzt. Zu Beginn erfolgte zuerst wieder die digitale Eichung mittels des Mikrometermaßstabes. Daran schloss sich die digitale Markierung eines gut sichtbaren Bereichs und die visuelle Identifikation von funktionslosen und funktionstüchtigen Kapillaren an. Die Länge jeder einzelnen Kapillare wurde notiert und die Gesamtlänge der perfundierten Kapillaren in Relation zur Fläche gesetzt.

In Abbildung 7 ist exemplarisch das Kapillarnetz der murinen Blase zur Auswertung der FCD dargestellt. Die feinen schwarzen Linien sind die Kapillaren der Blase. Aussagen zur FCD lassen sich allerdings nur aus der Videoanalyse ableiten. In der Videosequenz würde das FITC-Albumin als heller Strom durch die Kapillaren fließen. Dadurch erfolgt dann die Identifikation von funktionellen und funktionslosen Kapillaren.



**Abbildung 7:** Kapillarnetz der murinen Blase während der Intravitalmikroskopie (IVM) zur Quantifizierung der funktionellen Kapillardichte (FCD).

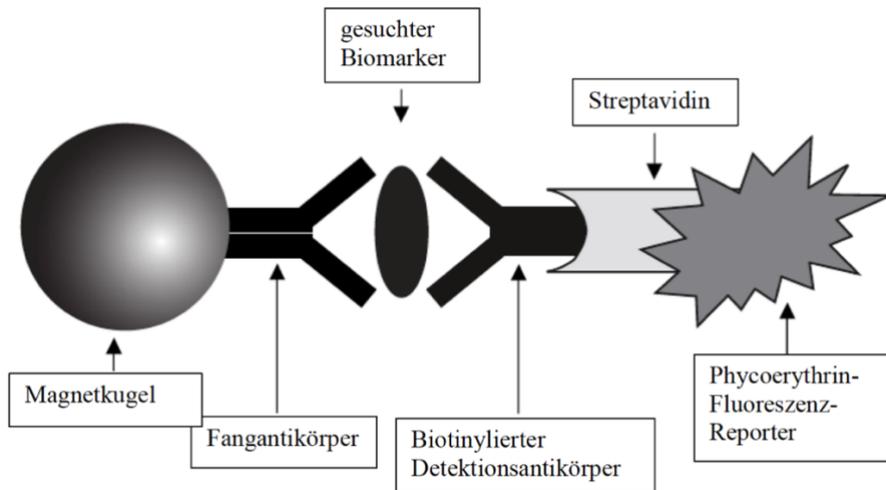
## 2.10 Mediatoranalyse

Die Analyse der inflammatorischen Mediatoren im Plasma wurde mit dem Luminex®-System durchgeführt. Es wurde ein 12-plex Bio-Plex Pro™ Mouse Assay (Bio-Rad, Mississauga, ON, Kanada) verwendet. Abbildung 8 zeigt schematisch die Funktionsweise dieser Methode. Folgende Mediatoren wurden bestimmt: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p70, IL-17A, lösliches P-Selektin und lösliches ICAM-1.

Die Durchführung dieser Analyse erfolgte gemäß der Herstellerangabe. Alle Proben wurden mittels Bio-Plex™ Verdünnung dreifach verdünnt. Jede Probe wurde doppelt bestimmt und der Mittelwert beider Werte als tatsächlicher Wert angenommen. Außerdem wurde zur Qualitätssicherung eine Standardkurve zu jedem getesteten Parameter ermittelt. Vor der Analyse wurde das Luminex-System gemäß Herstellerangaben kalibriert und die Vorrichtung zum Waschen der 96-well plate vorbereitet.

Zuerst wurden 50 $\mu$ l der magnetischen Detektionsantikörper-Kugeln in jede der Vertiefungen der 96-well plate pipettiert und mit Pufferlösung in der Bio-Plex™ Pro Waschvorrichtung ausgewaschen. Zur Kontrolle wurden die mitgelieferten Referenzlösungen in die ersten Vertiefungen der Platte pipettiert. Danach folgte das Hinzufügen des Plasmas.

Die 96-well plate wurde danach im Dunkeln eine Stunde mit einem Mikrotiterplatten-Shaker bei 300 rpm durchmischt und im Anschluss dreifach ausgewaschen. Bio-Plex™ Detektionsantikörper wurden in jede Vertiefung der Platte pipettiert. Folgend wurde die Platte wieder für 30 Minuten im Dunkeln bei 300 rpm durchmischt. Im Anschluss erfolgte erneut die dreifache Auswaschung der Platte mit Pufferlösung. Nachfolgend wurde das Streptavidin-Phycoerythrin (Streptavidin-PE) in die Vertiefungen pipettiert mit erneuter Inkubationzeit von 10 Minuten bei 300rpm im Shaker. Nach den 10 Minuten erfolgte die letzte dreimalige Auswaschung der Platte. Im Anschluss wurde das Bio-Rad 200 Luminometer und die Bio-Plex™ Manager Software benutzt, um die Ergebnisse auszulesen.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Bio-Plex™ Sandwich Immunoassay.

## 2.11 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit GraphPad Prism 6 für MacOS X (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 USA).

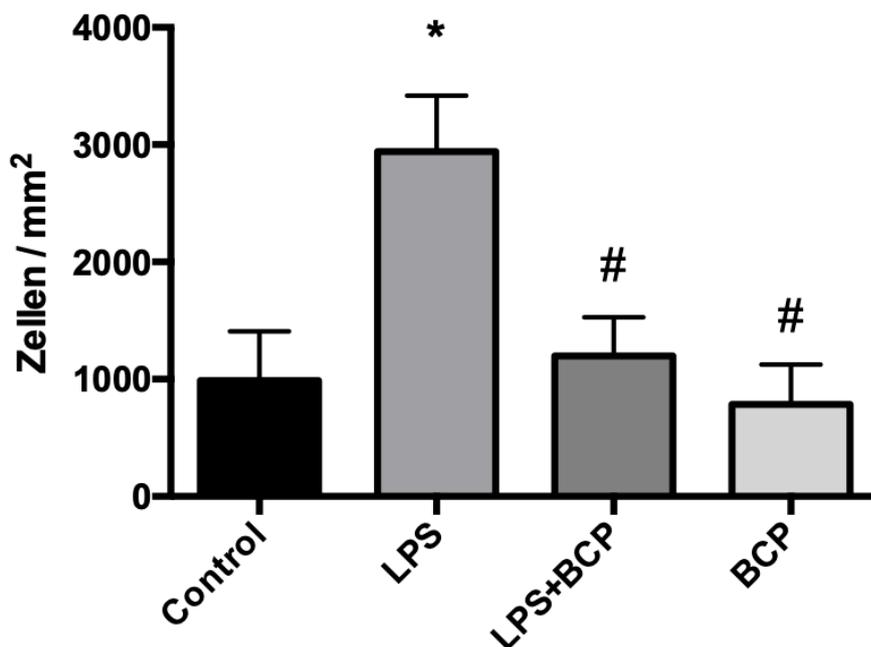
Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mittels des *Kolmogorov-Smirnov-Tests*. Bei Normalverteilung wurde auf signifikante Unterschiede mittels einer Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) getestet. Bei Auftreten einer Signifikanz erfolgte die post-hoc-Testung mit einem *Bonferroni* korrigierten *t-Test*. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt. Die Darstellung der Daten erfolgt als Grafik mit entsprechenden Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 IVM - Leukozytenadhäsion

In der Kontrollgruppe wurden im Mittel 987 Zellen/mm<sup>2</sup> Endotheloberfläche in den Venolen der Blasenwand gezählt. Nach Instillation des LPS in die Blase zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Anzahl adhärenter Leukozyten auf einen Mittelwert von 2942 Zellen/mm<sup>2</sup> (unbehandelte LPS-Gruppe). Vorbehandlung mit BCP reduzierte die LPS-induzierte Leukozytenadhäsion signifikant auf einen Mittelwert von 1197 Zellen/mm<sup>2</sup> (Abbildung 9). Die BCP-Kontrollgruppe zeigte ähnliche Werte wie die unbehandelte Kontrollgruppe.

LPS verursacht eine signifikant erhöhte Leukozytenadhäsion, unter Vorbehandlung mit BCP sinkt diese signifikant ab.

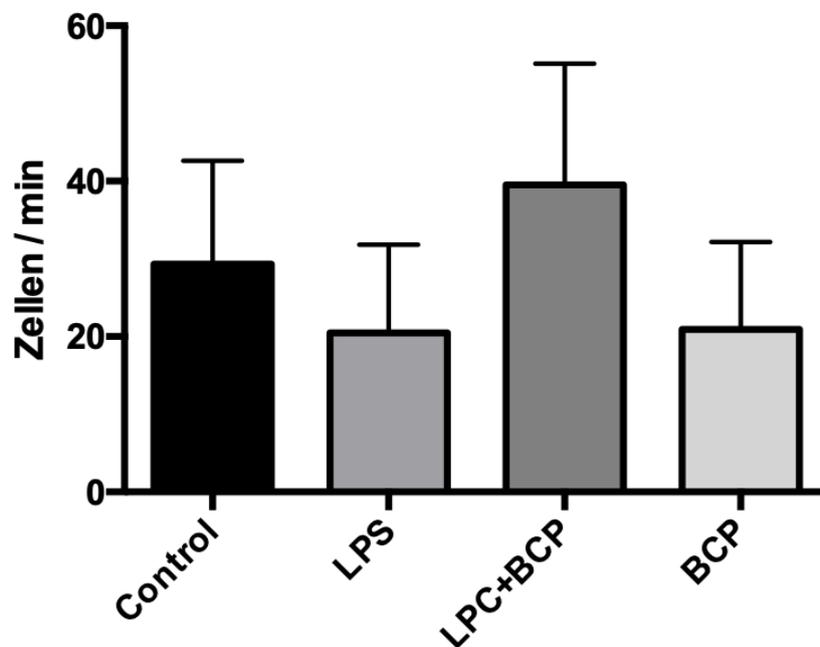


**Abbildung 9:** Leukozytenadhäsion (n = 5/Gruppe, Mittelwert + SD, \* = signifikanter Unterschied zu Control, # = signifikanter Unterschied zu LPS, p<0,05, LPS = Lipopolysaccharid, BCP =  $\beta$ -Caryophyllen).

### 3.2 IVM - Rolling

Zwischen den Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Allerdings war die individuelle Schwankungsbreite (SD) relativ hoch.

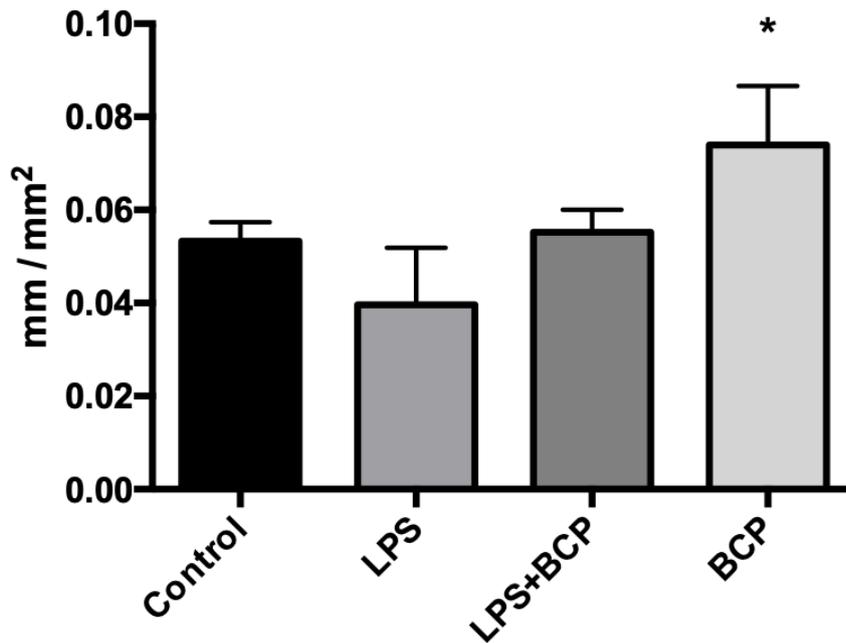
Die Kontrollgruppe wies einen mittleren Roller-Flow von 29 Zellen/min auf, die unbehandelte LPS-Gruppe einen Mittelwert von 20 Zellen/min. Unter oraler Vorbehandlung mit BCP konnten wir einen Roller-Flow von 40 Zellen/min beobachten. Die BCP-Kontrollgruppe wies ein mittleres Rolling von 21 Zellen/min auf (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Roller-Flow (n = 5/Gruppe, Mittelwert + SD,  $p < 0,05$ , LPS = Lipopolysaccharid, BCP =  $\beta$ -Caryophyllen).

### 3.3 IVM - FCD

Abbildung 11 zeigt die FCD der verschiedenen Gruppen. Nur in der BCP-Kontrollgruppe ohne LPS konnte ein signifikant höhere FCD gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Alle anderen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede der FCD im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Funktionelle Kapillardichte (n = 5/Gruppe, Mittelwert + SD, \* = signifikanter Unterschied zu Control, p<0,05, LPS = Lipopolysaccharid, BCP =  $\beta$ -Caryophyllen).

### 3.4 Mediatorenanalyse

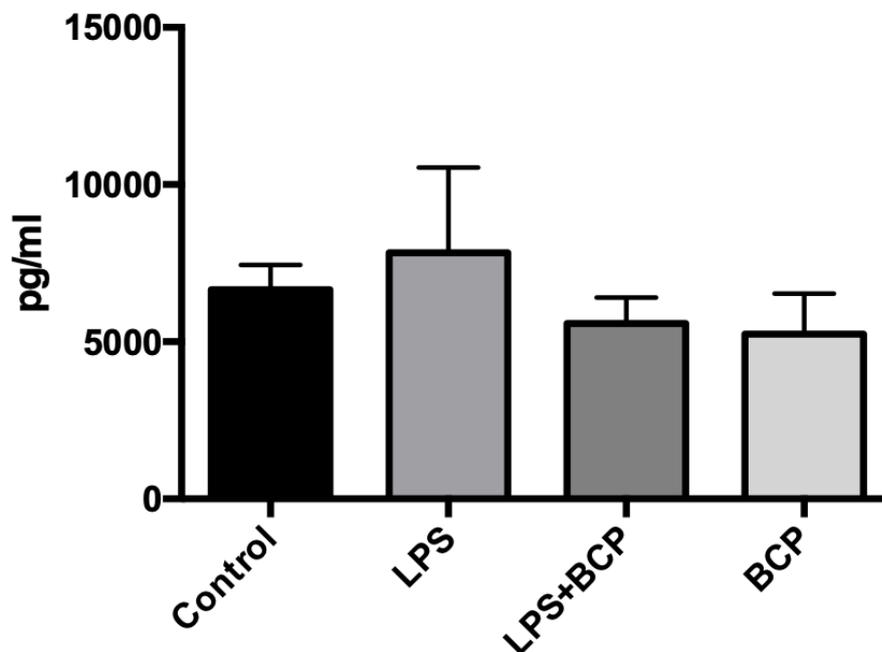
Keiner der 11 quantifizierten inflammatorischen Mediatoren zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied der Plasmaspiegel der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Folgenden werden nur die Ergebnisse der vier Mediatoren ICAM-1, IL-4, P-Selektin und IL-6 graphisch dargestellt. Die restlichen Mediatoren waren unterhalb der Nachweisgrenze und somit nicht zu quantifizieren.

#### 3.4.1 ICAM-1

ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) wird insbesondere von Endothelzellen als Zelladhäsionsmolekül exprimiert. Die Bindung eines Liganden an ICAM-1 ist Bestandteil der Leukozytendiapedese bei inflammatorischen Prozessen.

In Abbildung 12 wird die Expression von ICAM-1 im Plasma der vier verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Keine der Versuchsgruppen zeigt einen statistischen Unterschied der Plasmaspiegel zur Kontrollgruppe.

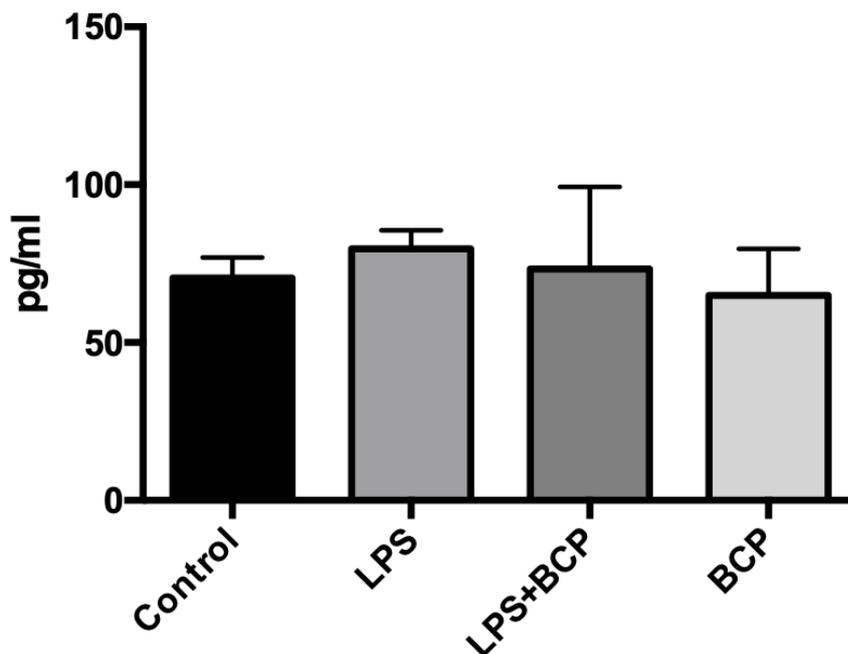


**Abbildung 12:** ICAM-1-Plasmaspiegel (n = 5/Gruppe, Mittelwert + SD, p<0,05, LPS = Lipopolysaccharid, BCP =  $\beta$ -Caryophyllen).

### 3.4.2 Interleukin-4

Interleukin-4 (IL-4) ist ein antiinflammatorisches Zytokin und führt zu einer Hemmung der Makrophagenfunktion und zu diversen Differenzierungs- und Proliferationsreizen bei T- und B-Zellen.

Auch bei diesem Zytokin konnten zwischen den verschiedenen Gruppen keine signifikanten Unterschiede bestimmt werden (Abbildung 13).

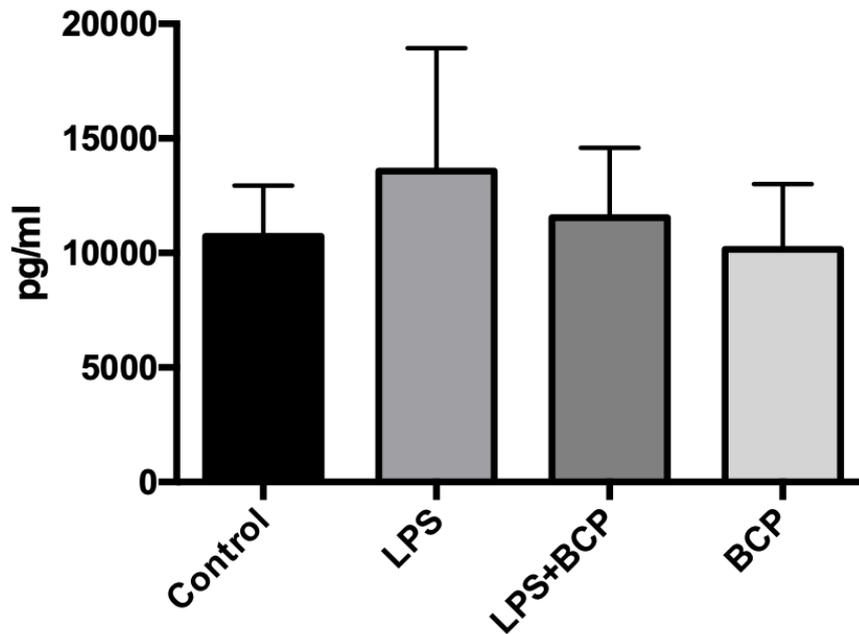


**Abbildung 13:** IL-4-Plasmaspiegel (n = 5/Gruppe, Mittelwert + SD, p<0,05, LPS = Lipopolysaccharid, BCP =  $\beta$ -Caryophyllen).

### 3.4.3 P-Selektin

P-Selektin ist ebenso wie ICAM-1 ein Zelladhäsionsmolekül und findet sich hauptsächlich auf Thrombozyten und Endothelzellen. Selektine führen durch eine Bindung von Liganden auf der Leukozytenoberfläche zu einer Abnahme der Rollgeschwindigkeit des Leukozyts innerhalb eines Gefäßes.

Abbildung 14 stellt den Gehalt an P-Selektin im Plasma der Versuchstiere innerhalb der vier verschiedenen Gruppen dar. In keiner der Gruppen konnte ein statistisch signifikantes Ergebnis ermittelt werden.

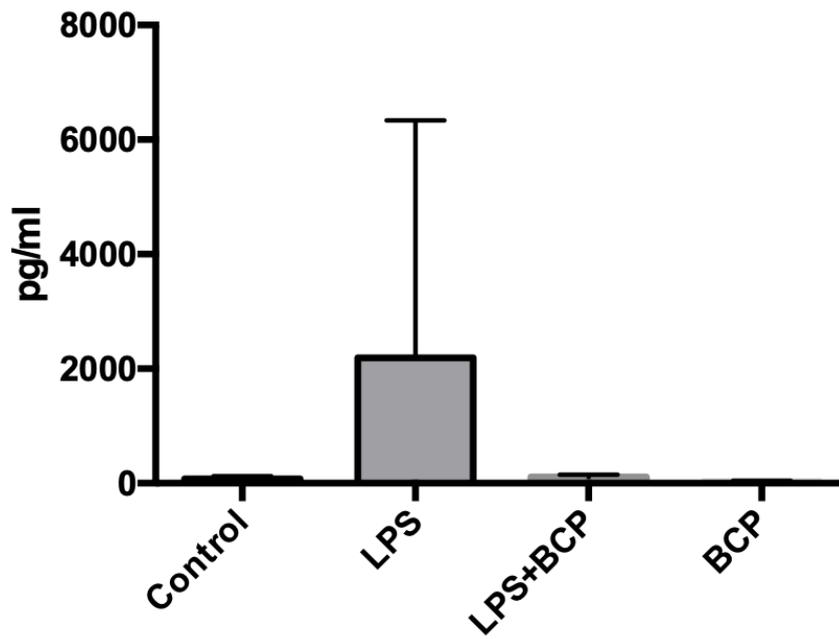


**Abbildung 14:** P-Selektin-Plasmaspiegel (n = 5/Gruppe, Mittelwert + SD,  $p < 0,05$ , LPS = Lipopolysaccharid, BCP =  $\beta$ -Caryophyllen).

#### 3.4.4 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein proinflammatorisches Zytokin und wird hauptsächlich durch Leukozyten, Mastzellen und Endothelzellen produziert. Durch die Bindung von IL-6 an Hepatozyten und Leukozyten kommt es zur Einleitung der Inflammationsantwort und zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen.

Die IL-6-Plasmaspiegeldifferenzen erreichten ebenfalls keine statistische Signifikanz. Die hohe SD innerhalb der LPS-Gruppe ist durch einen Outlier innerhalb der Gruppe zu erklären (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** IL-6-Plasmaspiegel (n = 5/Gruppe, Mittelwert + SD,  $p < 0,05$ , LPS = Lipopolysaccharid, BCP =  $\beta$ -Caryophyllen).

## **4. Diskussion**

Ziel dieser Forschungsarbeit war die Untersuchung der Effektivität einer Therapie mit dem enteral verabreichten CB<sub>2</sub>R-Agonisten BCP in Bezug auf Leukozytenadhäsion und FCD in der Blasenwand sowie Plasmaspiegel inflammatorischer Mediatoren bei experimenteller IC.

Nach experimenteller Induktion der IC nahm die Leukozytenadhäsion signifikant zu, während das Rolling und die FCD ohne signifikante Änderungen blieb. Unter oraler Vorbehandlung mit BCP kam es zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenadhäsion bei weiterhin unveränderter FCD und unverändertem Rolling.

Die Plasmaspiegel von ICAM-1, IL-4, P-Selektin und IL-6 wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. Weitere sieben inflammatorische Mediatoren blieben unterhalb der Nachweisgrenze.

### **4.1 Methodendiskussion**

Die intravesikale LPS-Instillation stellt in der Literatur eine etablierte Methode zur experimentellen IC-Induktion dar.<sup>1,72,100</sup> Allerdings ist die klinische Vergleichbarkeit wahrscheinlich eingeschränkt, da die IC-Pathogenese weiterhin weitestgehend unbekannt ist. Zur Induktion eines IC-Phänotyps ist LPS allerdings geeignet und das Modell kann zur Untersuchung möglicher Behandlungsstrategien genutzt werden. Nach Bindung des LPS an den Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4) kommt es über NF-κB zur Produktion von proinflammatorischen Mediatoren wie beispielsweise Interleukin-1β.

Die Katheterisierung der Versuchstiere für die LPS-Gabe stellt einen praktikablen Weg zur Induktion einer IC dar. Unklar ist die notwendige LPS-Dosis, da es in der Literatur keine einheitliche Empfehlung zur Induktion einer IC gibt. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine standardisierte Dosis von 5mg/kg Körpergewicht zur Induktion einer IC verwendet.

Diese Studie wurde als Pilotstudie konzipiert. Eine Studie mit enteral appliziertem BCP, Intravitalmikroskopie der Blase und Mediatorenanalyse wurde bislang in dieser Form noch nicht durchgeführt. Auch nach intensiver Literaturrecherche konnte keine vergleichbare Publikation gefunden werden. Daher ist ein direkter Vergleich mit der Literatur nicht möglich.

Bei Patienten mit IC kommt es erst nach (oft langwieriger) Diagnostik zur Einleitung einer adäquaten Therapie. In dieser Studie wurde das Therapeutikum bereits vor Induktion der Inflammation verabreicht, um ausreichend hohe Gewebespiegel zu gewährleisten. Es ist daher nicht ohne weiteres ableitbar, dass BCP auch nach IC-Induktion effektiv wäre. Weiterhin bleibt auch nach intensiver Recherche unklar, wie hoch die orale Bioverfügbarkeit von enteral verabreichtem BCP im murinen Modell ist.

Die Therapie mit BCP sollte über die Aktivierung des anti-inflammatorischen CB<sub>2</sub>R die inflammatorischen Prozesse bei IC abschwächen. Zwar konnten in der Mediatorenanalyse keine erhöhten Plasmaspiegel der von uns untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle beobachtet werden, trotzdem führte eine Vorbehandlung mit BCP zu einer signifikanten Reduktion der lokalen Leukozytenadhäsion in der Blase.

Die IVM wird nur von wenigen Arbeitsgruppen weltweit angewendet. Das Erlernen dieser Technik setzt Zeit und handwerkliches Geschick voraus und ist zudem mit hohen Kosten verbunden. Die IVM erlaubt einzigartige Einblicke in physiologische und pathophysiologische Prozesse durch die Analyse am lebenden Organismus.<sup>51,76</sup> Die Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe in die Schwanzvene der Mäuse stellt den schwierigsten Teil dieser Methode dar. Für die Analyse der Daten wurden nur Tiere mit einer erfolgreichen intravenösen Injektion benutzt. Bei initial nicht erfolgreicher Injektion wurde die Injektion bis zum Erfolg wiederholt oder der Datensatz verworfen. Dadurch ist eine hohe Qualität und eine hohe Aussagekraft der Videosequenzen gewährleistet. Die Methode der IVM stellt somit die ideale Methode zur Evaluierung der in Kapitel 1.10 formulierten Fragestellungen dar.

Die Multiplexmethode stellt seit Jahren ein etabliertes Verfahren zur Quantifizierung von inflammatorischen Mediatoren im Plasma dar und wird weltweit praktiziert.<sup>40,55</sup> In dieser Arbeit wurden die Mediatoren aus kardialer Punktion bestimmt, es handelte sich also um eine komplette Exsanguination des Tieres. Die Entnahme des Blutes zur Analyse bot mehrere Vorteile aus rein praktischer Sicht für diese Arbeit. Die bereits laparotomierte und narkotisierte Maus konnte einfach exsanguiniert werden, da die Laparotomie nur nach kranial erweitert werden musste. Außerdem forderte das UCLA der Dalhousie University eine sichere Euthanasie des Tieres entweder durch kardiale Punktion oder durch Dislokation der Halswirbelsäule. Somit konnten alle Vorgaben eingehalten und gleichzeitig Proben für die weitere Analyse gesammelt werden. Diese Methode wurde in

dieser Untersuchung gewählt, da die Wirkung von BCP als CB<sub>2</sub>R-Agonist auf einer Reduktion der inflammatorischen Antwort beruht. Wir erhofften uns, durch die Analyse von Plasmamarkern, diese These untermauern zu können. Durch die Ergebnisse ist das aktuell nicht möglich. Dass nur vier der elf untersuchten inflammatorischen Mediatoren ausgewertet werden konnten, lag aller Voraussicht nach an der lokal begrenzten Entzündung, welche sich lediglich auf die Blase beschränkte und daran, dass einige der untersuchten Mediatoren mehr Zeit zur Expression benötigen.<sup>73</sup> In Kapitel 4.2.4 wird dieser Umstand genauer diskutiert.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 IVM**

Die Kontrollgruppe wies mit durchschnittlich 987 Zellen/mm<sup>2</sup> eine relative hohe Baseline-Leukozytenadhäsion in den Venolen der Blasenwand auf. Dies verwundert, da beispielsweise in Venolen der Darmsubmukosa eine Adhäsion von unter 100 Zellen/mm<sup>2</sup> gemessen wird.<sup>6</sup> Seitens unserer Arbeitsgruppe wurden eventuelle Fehlerquellen durch zahlreiche Versuche ausgeschlossen. Es wurden Mäuse aus verschiedenen Lieferungen ohne jegliche experimentelle Behandlung per IVM untersucht, alle zeigten in etwa die gleichen Werte. Daher wurde die oben genannte Leukozytenadhäsion von 987 Zellen/mm<sup>2</sup> als validier Wert für die Kontrollgruppe angenommen. Im Gegensatz zur IVM an Ratten stellt die IVM der murinen Blase noch ein relativ neues Verfahren in der Cystitis-Forschung dar, daher gibt es nur begrenzte Vorerfahrungen.<sup>41</sup> Durch die Stimulation mit intravesikal verabreichtem LPS stieg die Anzahl der adhären Leukozyten signifikant an. Dieser Anstieg wird durch die LPS-induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle erklärt. Dadurch wird die Rekrutierung der Leukozyten signifikant erhöht.<sup>64</sup> Wie in Kapitel 4.2.4 erläutert, konnte die erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen im systemischen Plasma durch unsere Arbeitsgruppe allerdings nicht nachgewiesen werden. Trotzdem ist die gesteigerte lokale Leukozytenadhäsion ein direkter Marker für eine signifikante Inflammationsantwort in der Blase.

Durch die enterale Therapie mit BCP sank das Ausmaß der Leukozytenadhäsion bis auf das Niveau der gesunden Kontrollgruppe ab. Wir führen die signifikant niedrigere Adhäsion direkt auf die CB<sub>2</sub>R-Aktivierung zurück. Dadurch kommt es durch eine verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zu einer Reduktion der Inflammationsreaktion und somit auch zu einer Reduktion der Leukozytenadhäsion.<sup>44</sup> Die

BCP-Kontrollgruppe wies eine mittlere Adhäsion von 785 Zellen/mm<sup>2</sup> auf. Somit lag die Adhäsion in dieser Gruppe sogar unter der Kontrollgruppe. Denkbar wäre, dass dies auf eine vorbestehende subklinische Cystitis der Versuchstiere – möglicherweise durch die experimentelle Manipulation der Blase - zurückzuführen ist. Auch Kowalewska et al. zeigten in ihrer Studie aus dem Jahr 2011, dass intravesikale LPS-Gabe zu einer erhöhten Leukozytenadhäsion in der Blase führt. Ihre Kontrollgruppe wies allerdings eine sehr geringe Leukozytenadhärenz auf.<sup>41</sup> Dies könnte ein weiteres Indiz für eine subklinische Cystitis unserer Kontrollgruppe sein.

Bezüglich des Leukozytenrollings konnten keine Gruppenunterschiede in unserer Studie beobachtet werden. Vergleichbare Studien zu diesem Modell sind sehr begrenzt. Kowalewska et al. applizierten den Mäusen LPS-Dosen von 5 mg/kg bis 7 mg/kg und warteten vier Stunden bis zur IVM und konnten dadurch signifikante Unterschiede im Rolling beobachten.<sup>41</sup> Unsere Arbeitsgruppe benutzte ebenfalls 5 mg/kg LPS, allerdings wurde unsere IVM zwei Stunden nach Instillation des LPS durchgeführt. Dies lag an den Vorgaben der UCLA der Dalhousie University. Möglicherweise ist die Zeitspanne von zwei Stunden zu kurz, um signifikante Änderungen herbeizuführen. Saban et al. konnten in einer Studie beweisen, dass die Transkription von NF-κB assoziierten Genen vier Stunden nach den Instillation von LPS ihr Maximum erreicht.<sup>73</sup> Diese Erkenntnis stützt die These, dass die Dauer nach Instillation des LPS zu kurz war, um signifikante Änderungen zu beobachten. Um dies zu untersuchen, wäre es sinnvoll unsere Versuche erneut mit einer Zeit von vier bis sechs Stunden nach LPS-Gabe zu wiederholen. Idealerweise sollte dies mit Versuchstieren aus einem anderen Labor und mit einer höheren Anzahl von Tieren pro Gruppe durchgeführt werden. Unter diesen Versuchsbedingungen fällt eine Auswertung des Rollings schwer. Daher sollte das Modell wie oben beschrieben geändert und erneut durchgeführt werden. Möglicherweise können nach diesen Änderungen signifikante Beobachtungen durch Optimieren dieses Modells festgestellt werden. Um die Möglichkeit einer subklinischen Cystitis zu minimieren, könnte das Modell um eine gewichtsadaptierte Gabe von Fosfomycin-Trometanol p.o. einige Tage vor Beginn der IVM ergänzt werden. Die Analyse der FCD zeigte nur in der BCP-Gruppe einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. In dieser Gruppe lag die FCD höher. Intensive Recherche der Literatur ergab keine vergleichbaren Studien, die die drei Parameter Therapie mit Cannabinoiden (BCP), Cystitis (IC) und Mikrozirkulation (IVM) miteinander kombinierten. Bemerkenswert ist,

dass die BCP-Gruppe eine signifikant höhere FCD als die Kontrollgruppe aufweist. In einer Studie aus dem Jahr 2002 von Bajory et al. konnte gezeigt werden, dass die FCD bei einer ischämisch induzierten Cystitis signifikant sinkt.<sup>2</sup> In unserem Versuchsmodell könnte der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der BCP-Gruppe durch die bereits vorher angesprochene subklinische Cystitis der Versuchstiere bedingt sein. Es wäre möglich, dass die Steigerung der FCD in der BCP-Gruppe durch die antiinflammatorischen Eigenschaften des BCP ausgelöst wird, während die vermeintlich gesunden Kontrolltiere keine Behandlung bekamen und trotzdem subklinisch an einer Cystitis erkrankt sind. Daher sollte das Modell mit einer erhöhten Anzahl an Tieren pro Gruppe und mit Versuchstieren aus anderen Laboratorien wiederholt werden. Bei einer höheren FCD unserer Kontrollgruppe durch Elimination einer Cystitis, wäre also ein signifikanter Unterschied zu LPS denkbar. Dies müsste allerdings wie oben bereits beschrieben reevaluiert werden.

#### **4.2.2 Mediatorenanalyse**

Mittels Multiplextechnologie konnten elf inflammatorische Mediatoren im Plasma untersucht werden. Jedoch lagen sieben Mediatoren unterhalb der Nachweisgrenze und nur die Mediatoren ICAM-1, IL-4, P-Selektin und IL-6 konnten ausgewertet werden. Diese vier Mediatoren verhielten sich jedoch nicht unterschiedlich zwischen den Versuchsgruppen – möglicherweise ist dies frühestens nach vier Stunden feststellbar.<sup>73</sup>

ICAM-1 gehört zu der Gruppe der Integrine und wird kontinuierlich in geringen Mengen auf der Zelloberfläche von Endothelzellen und Leukozyten exprimiert. ICAM-1 ist der Ligand für den Rezeptor LFA-1 auf Leukozyten. Eine Bindung an diesen führt zur Transmigration der Leukozyten durch das Gefäß.<sup>70</sup> Bei Inflammationsreaktionen steigt die Expression von ICAM-1 an.<sup>99</sup> Unlängst wurde lösliches (shedded – s) ICAM-1 als potenzieller Marker für das Vorliegen einer IC vorgeschlagen, da bei Patienten mit IC ein erhöhter Spiegel an ICAM-1 vorliegt.<sup>49</sup> In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen mit experimenteller autoimmuner Cystitis (EAC) die Expression von ICAM-1 signifikant erhöht war. Allerdings wurde die Blase dieser Versuchstiere erst nach vier Wochen kontinuierlicher Therapie immunhistochemisch und histologisch untersucht.<sup>48</sup> In unserem Modell fand die Analyse des Plasmas aus den oben genannten Gründen zwei Stunden nach Induktion der IC mittels LPS statt. Daher ist es am wahrscheinlichsten, dass unsere Ergebnisse die basale Expression von ICAM-1 im murinen Plasma widerspiegeln. Bei Patienten mit IC handelt es sich um eine chronische

Inflammationsreaktion, ICAM-1 steigt also nicht binnen zwei Stunden, sondern über Monate bis Jahre an. Um mehr Erkenntnis zu gewinnen, wäre es also nötig die Bestimmung mehrere Stunden bis Tage aufzuschieben.

IL-4 ist ein immunmodulatorisches, antiinflammatorisches Zytokin und nimmt Einfluss auf die humorale und zelluläre Immunantwort. Durch die Stimulation mit IL-4 differenzieren sich B-Zellen zu Plasmazellen und Th0-Zellen zu Th2-Zellen. Diese Th2-Zellen produzieren dann erneut höhere Mengen an IL-4 im Sinne einer positiven Selbstverstärkung. Die Zelle, die als erstes IL-4 produziert ist bis dato nicht eindeutig identifiziert, obwohl neuere Studien vermuten lassen, dass es sich um basophile Granulozyten handelt.<sup>78</sup> In Zusammenhang mit einer Ifosfamid-induzierten Cystitis wurden die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-4 untersucht. Es zeigte sich, dass exogen zugeführtes IL-4 zu einer signifikanten Reduktion von TNF- $\alpha$ , IL-1, iNOS und COX-2 führte. In dieser Studie wurden die Blasen der Versuchstiere 12h nach der ersten intraperitonealen Injektion von Ifosfamid entnommen. In Konkordanz mit der bereits mehrfach zitierten Studie von Saban et al. führte die zwölfstündige Zeit zwischen Injektion und Entnahme des Organs zu einem signifikanten Unterschied, der bei unserer Studie aufgrund der zu kurzen Zeit zwischen Instillation des LPS und IVM nicht zu beobachten war.<sup>73</sup> Bei Patienten mit IC wurden häufiger bestimmte Polymorphismen im IL-4-Genlocus identifiziert.<sup>80</sup> Dadurch könnte die Analyse von IL-4 in einer abgeänderten Form dieses Versuchsmodells neue Erkenntnisse hervorbringen. Um signifikante Unterschiede in der Expression von IL-4 zu detektieren ist es also nötig, mehr Zeit zwischen Instillation des LPS und der IVM vergehen zu lassen.

P-Selektin wird hauptsächlich von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert. Selektine spielen eine wichtige Rolle bei der initialen Rekrutierung von Leukozyten zum Ort der Inflammation. Durch die Freisetzung von Thrombin und Histamin wird das intrazellulär gespeicherte P-Selektin zur apikalen Zellmembran transportiert und dort in die Zellmembran integriert.<sup>10</sup> Obwohl Unterschiede bei ICAM-1 deutliche häufiger vorkommen, zeigen Patienten mit IC deutlich häufiger eine höhere Expression von P-Selektin.<sup>26</sup> Als zelluläres Adhäsionsmolekül unterstreicht das häufigere Vorkommen von ICAM-1 und P-Selektin die inflammatorische Komponente einer IC. In der vorliegenden Versuchsreihe ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den Plasmaspiegeln von löslichem (shedded – s) P-Selektin beobachten. Dies liegt wie bereits oben besprochen daran, dass die Expression von P-Selektin mehr Zeit benötigt.<sup>73</sup> In

diesem Experiment wurden durch Reglementierungen der UCLA zwei Stunden zwischen Instillation des LPS und der IVM gewählt. Diese Zeit müsste auf circa 6-24 h nach Instillation des LPS ausgeweitet werden.

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin und ist hauptsächlich für die Steigerung der Körpertemperatur in der akuten Phase einer Inflammationsreaktion verantwortlich. Es wird durch Myozyten in der Tunica media der Gefäße synthetisiert und kann bei Bedarf von Makrophagen freigesetzt werden. IL-6 ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und induziert im Hypothalamus die Sekretion von Prostaglandinen, insbesondere PGE<sub>2</sub>. Dies resultiert in der Steigerung der Körpertemperatur zur Elimination von temperatursensitiven Mikroorganismen innerhalb des Körpers.<sup>3</sup> In Abwesenheit von klinischen Markern zur Identifikation einer IC wurde IL-6 bereits als potentieller diagnostischer Marker evaluiert. Patienten mit IC weisen eine höhere Expression von IL-6 und Methylhistamin auf.<sup>42</sup> Aktuell ist die intravesikale Instillation von GAG wie beispielsweise Hyaluronsäure zur Behandlung der IC gängige Praxis. In mehreren Studien an Versuchstieren und menschlichen Probanden wurde gezeigt, dass Hyaluronsäure zu einer Reduktion der Expression von IL-6 führt.<sup>68,74</sup> Aus diesem Grund ist die korrekte Analyse von IL-6 von besonderer Bedeutung. In unserem Modell konnte kein signifikanter Unterschied in der Produktion von IL-6 gezeigt werden. Dies begründet sich durch den zu kurzen Abstand zwischen intravesikaler Instillation des LPS und der IVM. Das Modell sollte daher abgeändert werden und die IVM 6-24 h nach Instillation des LPS durchgeführt werden.

## **5. Schlussfolgerungen**

Enteral appliziertes BCP führt zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenadhäsion in der Blasenwand von Tieren mit experimentell induzierter IC. Wir erklären dies durch eine Reduktion der Inflammationsreaktion über die TLR-4-Signalkaskade.

In der BCP-Gruppe kam es zu einer signifikanten Steigerung der FCD im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwischen den drei anderen Gruppen konnten keine Unterschiede gemessen werden. Wir führten dies auf eine subklinische Cystitis unserer Versuchstiere zurück.

Von den elf analysierten inflammatorischen Mediatoren waren nur ICAM-1, IL-4, P-Selektin und IL-6 oberhalb der Nachweisgrenze und waren daher die einzigen, die in dieser Arbeit ausgewertet wurden. Bei keinem dieser Mediatoren beobachteten wir im Rahmen des Experiments signifikante Unterschiede.

Weitere Versuche sollten mit folgenden Modifikationen erfolgen: Die Versuchstiere sollten vor Durchführung der Experimente engmaschig auf das Vorliegen einer Cystitis untersucht werden. Der Beobachtungszeitraum sollte auf mindestens 4 – 6 h post inductionem verlängert werden.

## **6. Zusammenfassung**

### **6.1 Zusammenfassung**

Im Gegensatz zur bakteriellen Cystitis, die mit Antibiotika in der Regel effektiv behandelt werden kann, ist die Interstitielle Cystitis (IC) aufgrund bislang unzulänglich charakterisierter Pathogenese nur unzureichend therapierbar. Man geht davon aus, dass circa 5-6% der weiblichen Bevölkerung von IC betroffen sind. Unzureichende Kenntnisse der Pathophysiologie gestalten die Suche nach neuen Therapeutika schwierig, allerdings zeigt die hohe Prävalenz, dass diese dringend benötigt werden. Ausgehend von einer inflammatorischen Genese der IC, untersuchte unsere Arbeitsgruppe die Effektivität einer enteralen antiinflammatorischen Therapie mittels des CB<sub>2</sub>R-Agonisten  $\beta$ -Caryophyllen (BCP) im kontrollierten Tierexperiment an weiblichen BALB/c-Mäusen.

Die Mäuse wurden in vier verschiedene Gruppen zu je fünf Tieren eingeteilt: 1. Kontrollgruppe, 2. IC-Gruppe, 3. IC+BCP-Gruppe und 4. BCP-Gruppe. Um den therapeutischen Effekt von BCP zu validieren, wurden die Leukozytenadhäsion, das Rolling und die FCD mittels Intravitalmikroskopie (IVM) untersucht. Außerdem wurden elf inflammatorische Mediatoren mittels Multiplextechnologie quantifiziert.

Es konnte in diesem Tiermodell gezeigt werden, dass enteral appliziertes BCP die Leukozytenadhäsion als Marker für das Vorliegen einer Inflammationsreaktion signifikant reduziert. Weiterhin führt BCP zu einem signifikanten Anstieg der FCD in der BCP-Gruppe. Die Mediatorenanalyse im systemischen Plasma ergab keine signifikanten Änderungen. Dies ist auf die zu geringe zeitliche Latenz zwischen Induktion der IC und der Plasmaanalyse zurückzuführen.

## 6.2 Abstract

In contrast to bacterial cystitis, which can be effectively treated with antibiotics, interstitial cystitis (IC) is difficult to treat because of its unknown pathogenesis.

It is estimated that about 5-6% of the female population is affected by IC. Inadequate knowledge of pathophysiology makes the search for new therapeutics difficult, but the high prevalence indicates that there is an unmet need for new treatments. Assuming an inflammatory etiology of IC, our group studied, whether an enteral anti-inflammatory therapy by the CB<sub>2</sub>R agonist,  $\beta$ -Caryophyllen (BCP), is able to achieve therapeutic effects in experimental IC.

The mice were divided into four different groups of five animals each: 1. Control group, 2. IC-group, 3. IC+BCP group, 4. BCP group. To quantify the therapeutic effect of BCP, leukocyte rolling and adhesion, and FCD were studied using intravital microscopy (IVM). Furthermore, plasma levels of eleven inflammatory mediators were analyzed by multiplex assay.

We showed that enterally administered BCP is able to significantly reduce leukocyte adhesion as marker of local bladder wall inflammation. The treatment with BCP also led to a significant increase in FCD in the BCP group. No significant changes could be observed regarding leukocyte rolling and the production of inflammatory mediators – most likely due to the limited observation.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Acevedo-Alvarez M, Yeh J, Alvarez-Lugo L, et al. Mouse urothelial genes associated with voiding behavior changes after ovariectomy and bladder lipopolysaccharide exposure. *Neurourol Urodyn.* 2018;37(8):2398-2405. doi:10.1002/nau.23592.
2. Bajory Z, Hutter J rg, Krombach F, Messmer K. Microcirculation of the urinary bladder in a rat model of ischemia-reperfusion-induced cystitis. *Urology.* 2002;60(6):1136-1140. doi:10.1016/s0090-4295(02)01952-0.
3. Banks WA, Kastin AJ, Gutierrez EG. Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett.* 1994;179(1-2):53-56. doi:10.1016/0304-3940(94)90933-4.
4. Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2009;152(5):567-575. doi:10.1038/sj.bjp.0707481.
5. Cabral GA, Rogers TJ, Lichtman AH. Turning Over a New Leaf: Cannabinoid and Endocannabinoid Modulation of Immune Function. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015;10(2):193-203. doi:10.1007/s11481-015-9615-z.
6. Caldwell A, Morick JN, Jentsch A-M, et al. Impact of insulin on the intestinal microcirculation in a model of sepsis-related hyperglycemia. *Microvasc Res.* 2018;119:117-128. doi:10.1016/J.MVR.2018.05.004.
7. Chaiken DC, Blaivas JG, Blaivas ST. Behavioral therapy for the treatment of refractory interstitial cystitis. *J Urol.* 1993;149(6):1445-1448. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8501784>. Accessed December 4, 2018.
8. Chevaleyre V, Takahashi KA, Castillo PE. ENDOCANNABINOID-MEDIATED SYNAPTIC PLASTICITY IN THE CNS. *Annu Rev Neurosci.* 2006;29(1):37-76. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112834.
9. Choi I-Y, Ju C, Anthony Jalin AMA, Lee DI, Prather PL, Kim W-K. Activation of Cannabinoid CB2 Receptor–Mediated AMPK/CREB Pathway Reduces Cerebral Ischemic Injury. *Am J Pathol.* 2013;182(3):928-939. doi:10.1016/j.ajpath.2012.11.024.

10. Cleator JH, Zhu WQ, Vaughan DE, Hamm HE. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood*. 2006;107(7):2736-2744. doi:10.1182/blood-2004-07-2698.
11. Clemens JQ, Meenan RTT, Rosetti Mco, Gao SY, Calhoun Ea. Prevalence and Incidence in a Managed Care Population. *J Urol*. 2005;173(1):98-102. doi:10.1097/01.JU.0000146114.53828.82.
12. Colaco M, Evans R. Current guidelines in the management of interstitial cystitis. *Transl Androl Urol*. 2015;4(6):677-683. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2015.11.03.
13. Cox A, Golda N, Nadeau G, et al. CUA guideline: Diagnosis and treatment of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Can Urol Assoc J*. 2016;10(5-6):E136-E155. doi:10.5489/cuaj.3786.
14. Davis NF, Brady CM, Creagh T. Interstitial cystitis/painful bladder syndrome: epidemiology, pathophysiology and evidence-based treatment options. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;175:30-37. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.12.041.
15. Davis NF, Brady CM, Creagh T. Interstitial cystitis/painful bladder syndrome: Epidemiology, pathophysiology and evidence-based treatment options. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;175(1):30-37. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.12.041.
16. Deller T, Kummer W, Welsch U 1940-. *Lehrbuch Histologie*. Elsevier, Urban et Fischer; 2014.
17. Devane WA, Hanus L, Breuer A, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 1992;258(5090):1946-1949. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1470919>. Accessed November 30, 2018.
18. Elphick MR, Egertová M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356(1407):381-408. doi:10.1098/rstb.2000.0787.
19. Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A. Cannabinoids

- ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lypopolysaccharide. *Glia*. 2003;41(2):161-168. doi:10.1002/glia.10177.
20. Fernández-Ruiz J, Moro MA, Martínez-Orgado J. Cannabinoids in Neurodegenerative Disorders and Stroke/Brain Trauma: From Preclinical Models to Clinical Applications. *Neurotherapeutics*. 2015;12(4):793-806. doi:10.1007/s13311-015-0381-7.
  21. Forsell T, Ruutu M, Isoniemi H, Ahonen J, Alfthan O. Cyclosporine in severe interstitial cystitis. *J Urol*. 1996;155(5):1591-1593. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627830>. Accessed December 4, 2018.
  22. Foster HE, Hanno PM, Nickel JC, et al. Effect of Amitriptyline on Symptoms in Treatment Naïve Patients With Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome. *J Urol*. 2010;183(5):1853-1858. doi:10.1016/j.juro.2009.12.106.
  23. Gallily R, Breuer A, Mechoulam R. 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages, and in mice. *Eur J Pharmacol*. 2000;406(1):R5-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11011050>. Accessed December 2, 2018.
  24. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*. 1964;86(8):1646-1647. doi:10.1021/ja01062a046.
  25. Gertsch J, Leonti M, Raduner S, et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(26):9099-9104. doi:10.1073/pnas.0803601105.
  26. Green M, Filippou A, Sant G, Theoharides T. Expression of intercellular adhesion molecules in the bladder of patients with interstitial cystitis. *Urology*. 2004;63(4):688-693. doi:10.1016/j.urology.2003.11.022.
  27. Greydanus DE, Hawver EK, Greydanus MM, Merrick J. Marijuana: current concepts(†). *Front public Heal*. 2013;1:42. doi:10.3389/fpubh.2013.00042.
  28. Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sci*. 1999;65(6-7):715-723. doi:10.1016/S0024-3205(99)00294-5.

29. Han E, Nguyen L, Siris L, Peters K. Current best practice management of interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Ther Adv Urol.* 2018;10(7):197-211. doi:10.1177/1756287218761574.
30. Hanno PM. Interstitial cystitis-epidemiology, diagnostic criteria, clinical markers. *Rev Urol.* 2002;4 Suppl 1(Suppl 1):S3-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16986032>. Accessed August 5, 2018.
31. Henry RA, Morales A, Cahill CM. Beyond a Simple Anesthetic Effect: Lidocaine in the Diagnosis and Treatment of Interstitial Cystitis/bladder Pain Syndrome. *Urology.* 2015;85(5):1025-1033. doi:10.1016/j.urology.2015.01.021.
32. Hertle L, van Ophoven A. Long-Term Results of Amitriptyline Treatment for Interstitial Cystitis. *Aktuelle Urol.* 2010;41(S 01):S61-S65. doi:10.1055/s-0029-1224651.
33. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):161-202. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037135>. Accessed November 23, 2018.
34. Jiang H-E, Li X, Zhao Y-X, et al. A new insight into Cannabis sativa (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. *J Ethnopharmacol.* 2006;108(3):414-422. doi:10.1016/J.JEP.2006.05.034.
35. Jiang Y-H, Jhang J-F, Kuo H-C. Revisiting the Role of Potassium Sensitivity Testing and Cystoscopic Hydrodistention for the Diagnosis of Interstitial Cystitis. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151692. doi:10.1371/journal.pone.0151692.
36. Keay S, Seillier-Moiseiwitsch F, Zhang C-O, Chai TC, Zhang J. Changes in human bladder epithelial cell gene expression associated with interstitial cystitis or antiproliferative factor treatment. *Physiol Genomics.* 2003;14(2):107-115. doi:10.1152/physiolgenomics.00055.2003.
37. Keay S, Zhang C-O, Trifillis AL, Hebel JR, Jacobs SC, Warren JW. Urine Autoantibodies in Interstitial Cystitis. *J Urol.* 1997;157(3):1083-1087. doi:10.1016/S0022-5347(01)65146-2.

38. Kirkham T, Tucci S. Endocannabinoids in Appetite Control and the Treatment of Obesity. *CNS Neurol Disord - Drug Targets*. 2006;5(3):275-292. doi:10.2174/187152706777452272.
39. Konkle KS, Berry SH, Elliott MN, et al. Comparison of an interstitial cystitis/bladder pain syndrome clinical cohort with symptomatic community women from the RAND interstitial cystitis epidemiology study. *J Urol*. 2012;187(2):508-512. doi:10.1016/j.juro.2011.10.040.
40. Konstantinou GN. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In: *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. Vol 1592. ; 2017:79-94. doi:10.1007/978-1-4939-6925-8\_7.
41. Kowalewska PM, Burrows LL, Fox-Robichaud AE. Intravital Microscopy of the Murine Urinary Bladder Microcirculation. *Microcirculation*. 2011;18(8):613-622. doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00123.x.
42. Lamale LM, Lutgendorf SK, Zimmerman MB, Kreder KJ. Interleukin-6, histamine, and methylhistamine as diagnostic markers for interstitial cystitis. *Urology*. 2006;68(4):702-706. doi:10.1016/j.urology.2006.04.033.
43. Lane DA, Adams L. Non-Anticoagulant Uses of Heparin. *N Engl J Med*. 1993;329(2):129-130. doi:10.1056/NEJM199307083290212.
44. Lehmann C, Kianian M, Zhou J, et al. Cannabinoid receptor 2 activation reduces intestinal leukocyte recruitment and systemic inflammatory mediator release in acute experimental sepsis. *Crit Care*. 2012;16(2):R47. doi:10.1186/cc11248.
45. Leong FC. Complementary and Alternative Medications for Chronic Pelvic Pain. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2014;41(3):503-510. doi:10.1016/j.ogc.2014.05.001.
46. Ley K. Leukocyte Adhesion to vascular endothelium. *J Reconstr Microsurg*. 1992:495-503.
47. Liebert M, Wedemeyer G, Stein JA, et al. Evidence for Urothelial Cell Activation in Interstitial Cystitis. *J Urol*. 1993;149(3):470-475. doi:10.1016/S0022-5347(17)36121-9.

48. Liu B-K, Jin X-W, Lu H-Z, Zhang X, Zhao Z-H, Shao Y. The Effects of Neurokinin-1 Receptor Antagonist in an Experimental Autoimmune Cystitis Model Resembling Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis. *Inflammation*. 2019;42(1):246-254. doi:10.1007/s10753-018-0888-2.
49. Magalhaes TF, Baracat EC, Doumouchsis SK, Haddad JM. Biomarkers in the diagnosis and symptom assessment of patients with bladder pain syndrome: a systematic review. *Int Urogynecol J*. August 2019. doi:10.1007/s00192-019-04075-9.
50. Al Mansouri S, Ojha S, Al Maamari E, Al Ameri M, Nurulain SM, Bahi A. The cannabinoid receptor 2 agonist,  $\beta$ -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;124:260-268. doi:10.1016/j.pbb.2014.06.025.
51. Marcu L, Hillman EMC. In vivo Optical Imaging / Intravital Microscopy. *J Biophotonics*. 2017;10(6-7):760-761. doi:10.1002/jbio.201770066.
52. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(5):438-455. doi:10.1038/nrd2553.
53. McHugh D, Hu SS, Rimmerman N, et al. N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci*. 2010;11(1):44. doi:10.1186/1471-2202-11-44.
54. McLennan MT. Interstitial cystitis: Epidemiology, pathophysiology, and clinical presentation. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2014;41(3):385-395. doi:10.1016/j.ogc.2014.05.004.
55. Mucksová J, Chalupský K, Plachý J, et al. Simultaneous detection of chicken cytokines in plasma samples using the Bio-Plex assay. *Poult Sci*. 2018;97(4):1127-1133. doi:10.3382/ps/pex411.
56. Murillo-Rodríguez E, Sánchez-Alavez M, Navarro L, Martínez-González D, Drucker-Colín R, Prospéro-García O. Anandamide modulates sleep and memory in rats. *Brain Res*. 1998;812(1-2):270-274. doi:10.1016/S0006-8993(98)00969-X.

57. Nickel JC, Herschorn S, Whitmore KE, et al. Pentosan Polysulfate Sodium for Treatment of Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome: Insights from a Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Study. *J Urol*. 2015;193(3):857-862. doi:10.1016/j.juro.2014.09.036.
58. Ochs RL, Stein TW, Peebles CL, Gittes RF, Tan EM. Autoantibodies in Interstitial Cystitis. *J Urol*. 1994;151(3):587-592. doi:10.1016/S0022-5347(17)35023-1.
59. Ojha S, Javed H, Azimullah S, Haque ME.  $\beta$ -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. *Mol Cell Biochem*. 2016;418(1-2):59-70. doi:10.1007/s11010-016-2733-y.
60. Orliac ML, Peroni R, Celuch SM, Adler-Graschinsky E. Potentiation of anandamide effects in mesenteric beds isolated from endotoxemic rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304(1):179-184. doi:10.1124/jpet.102.041095.
61. Ouyang Y, Hwang SG, Han SH, Kaminski NE. Suppression of interleukin-2 by the putative endogenous cannabinoid 2-arachidonyl-glycerol is mediated through down-regulation of the nuclear factor of activated T cells. *Mol Pharmacol*. 1998;53(4):676-683. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9547358>. Accessed December 2, 2018.
62. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2006;58(3):389-462. doi:10.1124/pr.58.3.2.
63. Pacher P, Kunos G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease - successes and failures. *FEBS J*. 2013;280(9):1918-1943. doi:10.1111/febs.12260.
64. Park BS, Lee J-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013;45(12):e66-e66. doi:10.1038/emm.2013.97.
65. Parsons CL, Benson G, Childs SJ, Hanno P, Sant GR, Webster G. A quantitatively controlled method to study prospectively interstitial cystitis and demonstrate the efficacy of pentosanpolysulfate. *J Urol*. 1993;150(3):845-848. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7688432>. Accessed December 4, 2018.

66. De Petrocellis L, Di Marzo V. An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(1):1-15. doi:10.1016/j.beem.2008.10.013.
67. Richard Kasten K, Tschop J, Hans Tschop M, Curtis Caldwell C. The Cannabinoid 2 Receptor as a Potential Therapeutic Target for Sepsis. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets.* 2010;10(3):224-234. doi:10.2174/187153010791936874.
68. Rooney P, Srivastava A, Watson L, Quinlan LR, Pandit A. Hyaluronic acid decreases IL-6 and IL-8 secretion and permeability in an inflammatory model of interstitial cystitis. *Acta Biomater.* 2015;19:66-75. doi:10.1016/j.actbio.2015.02.030.
69. Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol.* 2003;140(5):790-801. doi:10.1038/sj.bjp.0705467.
70. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol.* 1986;137(4):1270-1274. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3525675>. Accessed September 1, 2019.
71. Rovner E, Propert KJ, Brensinger C, et al. Treatments used in women with interstitial cystitis: the interstitial cystitis data base (ICDB) study experience. The Interstitial Cystitis Data Base Study Group. *Urology.* 2000;56(6):940-945. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113737>. Accessed December 4, 2018.
72. Ryu C-M, Shin JH, Yu HY, et al. N-acetylcysteine prevents bladder tissue fibrosis in a lipopolysaccharide-induced cystitis rat model. *Sci Rep.* 2019;9(1):8134. doi:10.1038/s41598-019-44631-3.
73. SABAN MR, HELLMICH H, NGUYEN N-B, WINSTON J, HAMMOND TG, SABAN R. Time course of LPS-induced gene expression in a mouse model of genitourinary inflammation. *Physiol Genomics.* 2001;5(3):147-160. doi:10.1152/physiolgenomics.2001.5.3.147.
74. Sairanen J, Hotakainen K, Tammela TLJ, Stenman U-H, Ruutu M. Urinary Epidermal Growth Factor and Interleukin-6 Levels in Patients with Painful Bladder Syndrome/Interstitial Cystitis Treated with Cyclosporine or Pentosan Polysulfate Sodium. *Urology.* 2008;71(4):630-633. doi:10.1016/j.urology.2007.11.055.

75. Sasaki K, Smith CP, Chuang YC, Lee JY, Kim JC, Chancellor MB. Oral gabapentin (neurontin) treatment of refractory genitourinary tract pain. *Tech Urol.* 2001;7(1):47-49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11272678>. Accessed December 4, 2018.
76. Secklehner J, Lo Celso C, Carlin LM. Intravital microscopy in historic and contemporary immunology. *Immunol Cell Biol.* 2017;95(6):506-513. doi:10.1038/icb.2017.25.
77. Seshadri P, Emerson L, Morales A. Cimetidine in the treatment of interstitial cystitis. *Urology.* 1994;44(4):614-616. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7941209>. Accessed December 4, 2018.
78. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol.* 2008;9(3):310-318. doi:10.1038/ni1558.
79. Substances Added to Food, Beta-Caryophyllene. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=FoodSubstances&id=CARYOPHYLLENE>. Accessed April 10, 2019.
80. Sugaya K, Nishijima S, Yamada T, Miyazato M, Hatano T, Ogawa Y. Molecular analysis of adrenergic receptor genes and interleukin-4/interleukin-4 receptor genes in patients with interstitial cystitis. *J Urol.* 2002;168(6):2668-2671. doi:10.1097/01.ju.0000028441.81066.7f.
81. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, et al. 2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;215(1):89-97. doi:10.1006/BBRC.1995.2437.
82. Tham C-S, Whitaker J, Luo L, Webb M. Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. *FEBS Lett.* 2007;581(16):2899-2904. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.037.
83. The Role of the Urinary Epithelium in the Pathogenesis of Interstitial Cystitis/Prostatitis/Urethritis. *Urology.* 2007;69(4):S9-S16. doi:10.1016/J.UROLOGY.2006.03.084.

84. Thilagarajah R, Witherow RO, Walker MM. Oral cimetidine gives effective symptom relief in painful bladder disease: a prospective, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *BJU Int.* 2001;87(3):207-212. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167643>. Accessed December 4, 2018.
85. Tura B, Tura SM. The analgesic effect of tricyclic antidepressants. *Brain Res.* 1990;518(1-2):19-22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2143961>. Accessed December 4, 2018.
86. Turcotte C, Blanchet M-R, Laviolette M, Flamand N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(23):4449-4470. doi:10.1007/s00018-016-2300-4.
87. Tutolo M, Ammirati E, Castagna G, et al. A prospective randomized controlled multicentre trial comparing intravesical DMSO and chondroitin sulphate 2% for painful bladder syndrome/interstitial cystitis. *Int Braz J Urol.* 43(1):134-141. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0302.
88. UBC Animal Care, Kris Andrews SM. *Oral Dosing (Gavage) in Adult Mice and Rats SOP.*; 2015. [https://animalcare.ubc.ca/sites/default/files/documents/ACC-2012-Tech09 Oral Dosing %28Gavage%29 in the Mouse and Rat%29 Updated Feb 2015 final\\_cc%2C ka.pdf](https://animalcare.ubc.ca/sites/default/files/documents/ACC-2012-Tech09%20Oral%20Dosing%20in%20the%20Mouse%20and%20Rat%20Updated%20Feb%202015%20final_cc%20ka.pdf).
89. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J.* 1998;12(11):1035-1044. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9707176>. Accessed December 2, 2018.
90. Varga Z V., Matyas C, Erdelyi K, et al.  $\beta$ -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. *Br J Pharmacol.* 2018;175(2):320-334. doi:10.1111/bph.13722.
91. Vij M, Srikrishna S, Cardozo L. Interstitial cystitis: Diagnosis and management. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;161(1):1-7. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.12.014.
92. Wang J, Chen Y, Chen J, Zhang G, Wu P. Sacral Neuromodulation for Refractory Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis: a Global Systematic Review and

- Meta-analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):11031. doi:10.1038/s41598-017-11062-x.
93. Wang J, Wang Q, Wu Q, Chen Y, Wu P. Intravesical Botulinum Toxin A Injections for Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Studies. *Med Sci Monit*. 2016;22:3257-3267. doi:10.12659/MSM.897350.
  94. Wang X, Liu W, O'Donnell M, et al. Evidence for the Role of Mast Cells in Cystitis-Associated Lower Urinary Tract Dysfunction: A Multidisciplinary Approach to the Study of Chronic Pelvic Pain Research Network Animal Model Study. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168772. doi:10.1371/journal.pone.0168772.
  95. Warren JW, Jackson TL, Langenberg P, Meyers DJ, Xu J. Prevalence of interstitial cystitis in first-degree relatives of patients with interstitial cystitis. *Urology*. 2004;63(1):17-21. doi:10.1016/J.UROLOGY.2003.08.027.
  96. Westhofen R. Einfluss von BCP auf Schmerzsymptomatik und Krankheitsverhalten bei Mäusen mit experimentell induzierter Interstitieller Cystitis. 2019. Diploma Thesis (Paracelsus Medical University, Nuremberg)
  97. Whitmore KE. Self-care regimens for patients with interstitial cystitis. *Urol Clin North Am*. 1994;21(1):121-130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8284835>. Accessed December 4, 2018.
  98. Wu T-H, Li K-J, Yu C-L, Tsai C-Y. Tamm–Horsfall Protein is a Potent Immunomodulatory Molecule and a Disease Biomarker in the Urinary System. *Molecules*. 2018;23(1):200. doi:10.3390/molecules23010200.
  99. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*. 2005;106(2):584-592. doi:10.1182/blood-2004-12-4942.
  100. Zhang X, He H, Lu G, et al. Specific inhibition of ICAM-1 effectively reduces bladder inflammation in a rat model of severe non-bacterial cystitis. *Sci Rep*. 2016;6(1):35672. doi:10.1038/srep35672.
  101. Zou S, Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System:

Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3).  
doi:10.3390/ijms19030833.

## 8. Publikationen der vorliegenden Arbeit

Diese Dissertation beruht auf Experimenten, die an der Dalhousie University (Halifax, Kanada) im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes im Jahr 2018 durchgeführt wurden. Während desselben Forschungsaufenthaltes wurden auch die Daten zum Anfertigen meiner Diplomarbeit an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität in Nürnberg generiert. Am 15.02.2019 wurde die Diplomarbeit zum Thema „Einfluss von BCP auf Schmerzsymptomatik und Krankheitsverhalten bei Mäusen mit experimentell induzierter IC.“ eingereicht und akzeptiert.<sup>96</sup> Die in dieser Diplomarbeit behandelten Ergebnisse stehen in thematischem Zusammenhang mit dieser Dissertation, allerdings ist die Thematik der Diplomarbeit klar von dieser Dissertation abzugrenzen.

In Zusammenhang mit dieser Dissertation stehen zwei Originalarbeiten und zwei Posterveröffentlichungen als Abstract beim Science Get Together 2019 der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität in Nürnberg am 28.06.2019. Die erste Originalarbeit zum Thema „Iron Chelation as a Novel Treatment for Interstitial Cystitis“ (geteilte Erstautorenschaft) wurde am 30.01.2019 im Journal „Pharmacology“ veröffentlicht. Die zweite Originalarbeit (Co-Autorenschaft) behandelt den Einfluss von BCP auf die IC und wurde am 21.11.2019 im Journal *Molecules* veröffentlicht.

1. Hagn G, Westhofen R, Burkovskiy I, et al. Iron Chelation as Novel Treatment for Interstitial Cystitis. *Pharmacology*. 2019;103(3-4):159-162. doi: 10.1159/000496089.
2. Berger G, Arora N, Burkovskiy I, Xia Y, Chinnadurai A, Westhofen R, Hagn G, Cox A, Kelly M, Zhou J, Lehmann C. Experimental Cannabinoid 2 Receptor Activation by Phyto-Derived and Synthetic Cannabinoid Ligands in LPS-Induced Interstitial Cystitis in Mice. *Molecules*. 2019 Nov 21;24(23).
1. Westhofen R, Hagn G, Junger A, Lehmann C, Burkovskiy I, Zhou J. Effectivity of BCP in experimental Interstitial Cystitis. 10. Paracelsus Science Get Together, Abstract Nr.106, ISBN: 978-3-00-056506-9.
2. Hagn G, Westhofen R, Burkovskiy I, Zhou J, Holbein B, Junger A, Lehmann C. Effects of DIBI, a novel iron chelator, on behavior and pain perception in a murine model of interstitial cystitis. 10. Paracelsus Science Get Together, Abstract Nr.107, ISBN: 978-3-00-056506-9.



## 9. Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“<sup>1</sup>

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

---

<sup>1</sup> Die Erhebung der Daten erfolgte gleichzeitig mit denen von Herrn Dr. med. univ. Georg Hagn im selben Labor an der Dalhousie University. Teile der Methodik wurden von uns gemeinsam entwickelt und angewendet. Im selben Zeitraum wurden ebenfalls die Daten für eine im Vorfeld angefertigte österreichische Diplomarbeit an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität, Standort Nürnberg, erhoben.<sup>96</sup>

## **10. Danksagung**

## **11. Tabellarischer Lebenslauf**