

Auswirkungen von DIBI, einem neuartigen Eisenchelator, auf Leukozytenadhäsion,
funktionelle Kapillardichte und Zytokinexpression in einem murinen Modell der
Interstitiellen Cystitis

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dr. med. univ. Georg Hagn

aus Wien

Gießen, 2020

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
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: 19. April 2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Interstitielle Cystitis/Bladder Pain Syndrom	3
2.1.1	Definition und Epidemiologie	3
2.1.2	Symptome und Pathogenese	3
2.1.3	Diagnostik	6
2.1.4	Therapie.....	7
2.2	Eisen.....	14
2.2.1	Physiologie des Eisens	14
2.2.2	Eisenchelatoren	16
2.3	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	18
2.3.1	Reaktive Sauerstoffradikale.....	18
2.3.2	Oxidativer Stress.....	19
2.4	Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	20
2.4.1	Temporär interagierende Leukozyten.....	20
2.4.2	Feste Leukozyten-Adhärenz.....	21
2.4.3	Leukozyten Diapedese und Migration	21
3	Fragestellung.....	23
4	Material und Methoden	24
4.1	Material	24
4.1.1	Versuchstiere	24
4.1.2	Substanzen	25
4.2	Gruppeneinteilung.....	26
4.3	Versuchsablauf	26
4.3.1	Vorbereitung, Anästhesie und Monitoring.....	26
4.3.2	Chirurgische Präparation und Katheterisierung	27
4.4	Intravitalmikroskopie.....	28
4.4.1	Technik	28

4.4.2	Durchführung der Intravitalmikroskopie	29
4.4.3	Versuchsauswertung.....	30
4.5	Probengewinnung	32
4.6	Mediatoranalyse.....	33
4.7	Statistische Analyse	34
5	Ergebnisse.....	35
5.1	Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	35
5.1.1	Feste Leukozyten-Adhärenz.....	35
5.1.2	Temporär interagierende Leukozyten.....	36
5.2	Funktionelle Kapillardichte.....	37
5.3	Mediatoranalyse.....	37
5.3.1	Interleukin-4	38
5.3.2	Interleukin-6	38
5.3.3	P-Selectin.....	39
5.3.4	ICAM-1.....	39
6	Diskussion	40
6.1	Diskussion der Methoden	40
6.1.1	Versuchsmodell.....	40
6.1.2	Intravitalmikroskopie	41
6.1.3	Mediatoranalyse.....	42
6.2	Diskussion der Ergebnisse	43
6.2.1	Leukozyten-Endothel-Interaktionen.....	43
6.2.2	Funktionelle Kapillardichte (FCD).....	46
6.2.3	Mediatorenanalyse.....	46
6.3	Limitationen und Ausblick.....	49
7	Schlussfolgerungen	52
8	Zusammenfassung	53
8.1	Deutsche Zusammenfassung.....	53
8.2	Abstract.....	54

9	Abkürzungsverzeichnis.....	55
10	Literaturverzeichnis.....	58
11	Publikationsverzeichnis.....	82
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	84
13	Danksagung	85
14	Curriculum Vitae	86

1 Einleitung

Interstitielle Cystitis (engl.: *interstitial cystitis* - IC) ist eine chronische Entzündung der Blase, die von der *Society for Urodynamics and Female Urology* (SUFU) als „ein unangenehmes Gefühl (Schmerz, Druck, Unbehagen), das in Verbindung steht mit der Harnblase und assoziiert ist mit Symptomen der unteren Harnwege von mehr als sechs Wochen Dauer und Fehlen einer Infektion oder anderer erkennbarer Ursache“ definiert.⁷⁵ Zu den Kardinalsymptomen zählen chronische Schmerzen im Bereich der Blase sowie Harndrang und erhöhte Miktionshäufigkeit (Pollakisurie).¹⁴² Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Prävalenz als auch die Inzidenz der IC bei Frauen im Verhältnis 5:1 höher ist als bei Männern.³² Obwohl diese Erkrankung die Lebensqualität der Patientinnen und Patienten in hohem Maße beeinträchtigt,¹⁴³ konnte bislang keine konkrete Pathogenese oder Ätiologie identifiziert werden. In Folge dessen, konnte kein kurativer Therapieansatz gefunden werden. Nichtsdestotrotz werden in der aktuellen Literatur am häufigsten Blasenurothelstörungen, neurogene Inflammation und neuropathischer Schmerz als die wahrscheinlichsten Auslöser der IC angenommen.^{20,238}

Da es, aufgrund der ungeklärten Pathophysiologie der IC, keine kausalen Therapieansätze gibt, zielen die aktuellen Therapieregime auf eine Reduktion der Inflammation sowie Schmerzstillung ab. An der ersten Stelle der Therapie stehen konservative Maßnahmen wie die Patientenaufklärung, Blasentraining oder Ernährungsumstellung. Versagen diese, wird, neben Physiotherapie, eine medikamentöse Behandlung eingeleitet. Zu den häufigsten Therapieansätzen zählen die orale Medikation oder eine Instillation des Medikaments in die Blase. Die gebräuchlichsten oralen Medikamente sind Pentosanpolysulfat (PPS) und trizyklische Antidepressiva, die sich bei der Linderung der Symptome als vorteilhaft erwiesen haben.⁷² Für die intravesikale Instillation kommen Substanzen wie Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) zum Einsatz, deren antiinflammatorische und schmerzstillende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten.^{44,181} Unglücklicherweise zeigten Studien gehäuft ein Therapieversagen bei intravesikaler DMSO-Therapie, insbesondere bei schweren Fällen der IC.^{89,125} Auch die Therapie mit trizyklischen Antidepressiva und oral eingenommenem PPS weisen ernüchternde Studienergebnisse auf: so konnte in einer Studie belegt werden, dass der gewünschte Therapieeffekt einer PPS-Therapie bei nur 32 % der Patienten Wirkung zeigt.¹⁶² Im letzten therapeutischen Schritt bleibt Patienten als Ultima Ratio die operative Entfernung der Blase. Bis zum heutigen Tag konnte gezeigt werden, dass keines der gebräuchlichen Medikamente vollständig Schmerzen lindert und die Entzündung der Blase reduziert. Die unerfüllte Notwendigkeit einer

wirksamen einer IC-Therapie erfordert neuartige Ansätze zur Behandlung dieser lebensbeschränkende Erkrankung.

Das Spurenelement Eisen spielt nicht nur bei physiologischen Prozessen im menschlichen Körper eine wichtige Rolle, sondern dient auch als entscheidender Cofaktor in der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (engl.: *reactive oxygen species* - ROS). Diese Radikale werden durch die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen gebildet und führen, bei zu hohen Konzentrationen, zu vermehrtem oxidativem Stress und Entzündung. Durch effektive Bindung, und somit Reduktion, von Wirtseisen mit Hilfe von Eisenchelatoren soll so die Bildung von ROS und Entzündung reduziert werden, sodass dieses nicht mehr zur Bildung von ROS beitragen kann. Der in dieser Studie verwendete Eisenchelator DIBI gehört zur Klasse der synthetischen Hydroxypyridinon-Chelatoren. Um eine systemisch unerwünschte Arzneimittelwirkung zu vermeiden und lokal hohe Konzentrationen des Wirkstoffs zu erzielen, zeigte sich die intravesikale Instillation als optimale Darreichungsform zur Therapie der IC.

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung des therapeutischen Potenzials von Eisenchelatoren zur Verringerung von Entzündungen bei experimenteller IC unter Verwendung von DIBI, einem neuartigen Eisenchelator. Die experimentelle IC wurde durch lokale (intravesikale) Instillation eines Lipopolysaccharids (LPS) induziert und anschließend mit DIBI therapiert. Die Ergebnisse dieser Studie sollen Rückschlüsse auf die Pathophysiologie der IC sowie die Kompetenz dieses Wirkstoffs für eine potenzielle Therapie der IC geben.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Interstitielle Cystitis/Bladder Pain Syndrom

Der Begriff der IC wurde erstmals 1887 von Skene als „eine Entzündung, die die Schleimhaut teilweise oder ganz zerstört und sich auf die muskulären Anteile ausbreitet“²⁰⁴ definiert. Über die Jahre etablierte sich parallel zur IC eine weitere Terminologie (Bladder Pain Syndrome - BPS), die erstmals die Symptomatik dieser Erkrankung in den Vordergrund stellte. 2003 erfolgte durch die *Internationale Continence Society* eine Zusammenführung dieser beiden Begrifflichkeiten zum heute Vereinheitlichten Begriff der IC.^{1, 76}

2.1.1 Definition und Epidemiologie

Die IC beschreibt eine chronische Entzündung der Blase ohne Vorliegen einer Infektion.⁴² Die *European Society for the Study of Interstitial Cystitis* (ESSIC) definierte das Vorliegen einer IC nach folgenden Kriterien:¹⁴²

- Schmerzen oder persistierendes Druckgefühl in Begleitung von mindestens einem weiteren urologischen Symptom wie beispielsweise Pollakisurie oder Harndrang
- Chronische Blasen- oder Unterleibschmerzen von einer Dauer von mindestens sechs Monaten
- Ausschluss von Differenzialdiagnosen

Trotz der schwierigen epidemiologischen Datenlage treffen die Diagnosekriterien einer IC bei etwa 2,7 % – 6,5 % aller Frauen in den Vereinigten Staaten zu.¹⁰⁸ Häufige Krankenhausaufenthalte und Arztbesuche führen zu einem großen sozioökonomischen Einfluss auf das Gesundheitssystem.²¹⁹ So konnte alleine ein Kostenanstieg von 481 Mio. US-Dollar im Jahr 1994 auf 750 Mio. US-Dollar im Jahr 2002 verzeichnet werden.^{167,182}

2.1.2 Symptome und Pathogenese

Als Leitsymptom dieser heterogenen Erkrankung der Blase zählen in erster Linie Schmerzen. Diese äußern sich typischerweise nicht nur als suprapubischer Schmerz über der Blase die mit zunehmender Blasenfüllung einhergehen, sondern können auch generalisiert im Becken im Bereich der Vulva, Vagina, der Urethra oder des Rektums sowie extragenital im Rückenbereich auftreten.^{54,224} Des Weiteren sind Symptome wie

Harndrang (84 %), Pollakisurie (92 %) und Nykturie im Zusammenhang mit der IC beschrieben.^{24,217} Diese Symptomatik führt oft zu einer signifikanten Abnahme der Lebensqualität und kann Ursache für sexuelle Dysfunktion bei Frauen sein.^{143,212,218} Studien haben gezeigt, dass Nahrungsmittel wie Zitrusfrüchte, Tomaten, Alkohol, Coffein oder scharfe Gewürze die Symptomatik verschlechtern können.⁶¹

Die häufigsten Komorbiditäten der IC bei Frauen sind Gastritis (OR 12,2), Fibromyalgie (OR 3,0), Angststörungen (OR 2,8), Kopfschmerzen (OR 2,5), gastro-ösophagealer Reflux (OR 2,2) und Depression (OR 2,0).³³ Es konnte zudem ein Zusammenhang zwischen sexuellem Missbrauch und der IC beobachtet werden.^{38,213} Obwohl es sich bei der IC um eine nicht-infektiöse Inflammation der Blase handelt, können rezidivierende Harnwegsinfekte einen Trigger darstellen.²²⁵

Bis heute ist die Pathogenese der IC unklar, wobei angenommen wird, dass unterschiedliche Faktoren und Pathomechanismen bei der Entstehung der IC eine Rolle spielen könnten. Dieser Umstand erschwert die Therapiefindung enorm, sodass aktuell keine kausale Therapie zur Behandlung der IC vorliegt.

Studien zeigten, dass reaktive Sauerstoffradikale (ROS) eine wichtige Rolle in der Pathogenese der IC spielen könnten. So konnte gezeigt werden, dass eine Dysregulation der ROS-Produktion eine mögliche Ursache für die Krankheitsentstehung spielt.⁴⁶ Andere Forschungsgruppen konnten zeigen, dass eine Hemmung bzw. Verringerung des oxidativen Stresses durch Antioxidantien bei einem Rattenmodell der IC die Inflammation reduzierten.^{16,135}

In den folgenden Unterkapiteln wird auf die Faktoren, die einen Einfluss auf die Entstehung der IC haben, näher eingegangen.

2.1.2.1 Urotheldysfunktion und Störung der GAG-Schicht

Die Urothelschicht kleidet die Blase als innerste Schicht aus und schützt die subepithelialen Zellen mit Hilfe von Glykosaminoglykanen (GAG) gegen äußere Reize und Toxinen. Zu den GAGs zählen zum Beispiel die Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat oder Heparinsulfat. Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion der GAGs bei Patienten mit IC vermindert ist, sodass es zu einer erhöhten Permeabilität für Toxine und gelöste Stoffe im Urin kommt, die eine subepitheliale Inflammationsreaktion hervorrufen können.^{138,179,205} Diese Inflammation bewirkt in weiterer Folge Schäden am Urothel die wiederum zu einer Erhöhung der Permeabilität führen. Es kommt zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur, Hypersensibilität und neurogenen Entzündung, die Schmerzen verursachen.

2.1.2.2 Tamm-Horsfall-Protein

Beim Tamm-Horsfall-Protein (THP) handelt es sich um ein Glykoprotein, das von renalen Epithelien sezerniert wird mit der Aufgabe der Immunmodulation im distalen Nephron.⁸⁷ Dort trägt es, neben seinen zytoprotektiven Eigenschaften gegen potentiell toxische Substanzen im Urin, maßgeblich zur Permeabilität des Urothels bei.²⁰⁸ Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an THP im Urothel bei Patienten mit IC vermindert ist und so zu einer erhöhten Permeabilität führt.^{59,164} Obwohl ersichtlich wurde, dass die Messung eines THP-Antikörper im Serum als nicht-invasives Diagnostikum helfen könnte,¹⁵² kann trotz Nachweis von pathologischen Konzentrationen des THP im Urothel dieses aktuell nicht als Marker der IC zur Diagnostik herangezogen werden.²⁰⁹

2.1.2.3 Autoimmunität

Studien gaben Hinweise darauf, dass Urothel-Anomalien verursacht durch autoimmune Reaktionen zu einer Veränderung der Blasenepithelexpression von spezifischen Antigenen, der Glykosaminoglykan-Schicht (GAG) oder einem veränderten Zytokeratinprofil führten.^{68,205} Des Weiteren wurden Autoantikörper des IgG-Typs gefunden, die mit der IC in Zusammenhang gebracht wurden.¹⁵⁸ Liebert et. al.¹²⁴ konnte zeigen, dass die IC mit einer ungewöhnlichen Zellaktivierung je nach Stadium der Erkrankung einhergeht.

2.1.2.4 Genetische Faktoren

In Bezug auf genetische Faktoren der IC wird angenommen, dass eine 17-fach höhere Prävalenz der Erkrankung bei weiblichen Verwandten ersten Grades besteht.²²⁶ Des Weiteren konnte eine größere Übereinstimmung bei monozygoten Zwillingen im Vergleich zu dizygoten Zwillingen festgestellt werden.²²⁷ Diese Ergebnisse liefern Rückschlüsse auf eine mögliche genetische Anfälligkeit dieser Erkrankung.

2.1.2.5 Mastzellaktivierung und Inflammation

Mastzellen spielen eine zentrale Rolle im Pathomechanismus der IC. So setzen diese potente Entzündungsmediatoren wie Histamin, Leukotriene und Serotonin frei, die mit Immunglobulin E (IgE) Antikörpern, anderen Entzündungszellen oder dem Nervensystem interagieren.^{83,169} Obwohl eine Mastozytose im Urothel nicht pathognomonisch für eine IC ist, können diese bei Aktivierung zu einer Vasodilatation und Schäden an der Blasenmukosa führen.¹⁹³ Studien konnten zeigen, dass Patienten mit IC eine 6- bis 8-fach erhöhte Konzentration von Mastzellen im M. detrusor aufweisen.^{117,214}

2.1.3 Diagnostik

Aufgrund des breiten Spektrums an Symptomen und klinischem Erscheinungsbild erweist sich die Diagnosestellung der IC als schwierig und wird als Ausschlussdiagnose getroffen. Erschwerend führen uneinheitliche Guidelines sowie die unbekannte Pathophysiologie dieser heterogenen Erkrankung zu einer erheblichen Unterdiagnostizierung, verspäteter Diagnosestellung oder gar Fehldiagnosen sowie einer hohen Dunkelziffer der erkrankten Personen.⁹⁹ So gaben nur 9,7 % der weiblichen IC-Population der Vereinigten Staaten von Amerika an, mit einer IC diagnostiziert worden zu sein.²²

Die im Folgenden beschriebenen diagnostischen Maßnahmen entstammen der aktuellen S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der IC (IC/BPS) der Deutschen Gesellschaft für Urologie.²⁶

2.1.3.1 Anamnese

Am Anfang jeglicher diagnostischen Maßnahmen steht in erster Linie eine ausführliche Patientenanamnese. Inhalt dieser sollen aktuelle Symptome und das Beschwerdebild, chronische Erkrankungen, vorangegangenen Operationen, Therapieversuche und die aktuelle Medikamenteneinnahme erfragen. Des Weiteren können Aussagen zu Substanzmissbrauch, psychischen Vorerkrankungen, Misshandlung oder Missbrauch wichtige Hinweise geben.

2.1.3.2 Differenzialdiagnosen

Laut Definition der IC gemäß der ESSIC müssen sämtliche Differenzialdiagnosen vor der Diagnosestellung ausgeschlossen werden.¹⁴² Diese können einer Vielzahl an Organsystemen, beispielsweise Erkrankungen des Muskel-/Skelettsystems oder Gastrointestinaltraktes entstammen, anderweitige gynäkologische Befunde sein, neurogene Ursachen haben, auf psychische Störungen zurückzuführen sein oder anderweitigen urologischen Erkrankungen angehören.

2.1.3.3 Fragebögen

Zur Erfassung von Schmerzcharakteristika können standardisierte Fragebögen wie der „O’Leary-Sant Interstitial Cystitis Problem and Symptom Indices“ (ICPI/ICSI)²³⁶, der Pelvic Pain and „Urgency/Frequency Patient Symptom Scale“ (PUF)¹⁴⁵ oder der „Bladder Pain/IC Symptom Score“ (BPIC-SS)¹² helfen.

2.1.3.4 Biomarker

Aktuell steht aufgrund der komplexen Pathogenese kein anerkannter Biomarker der IC im Urin zur Verfügung.¹⁶⁵ Nichts desto trotz konnte die abnormale Expression vieler potenzieller epithelialer Marker wie Mastzellzahl, Proliferationsfaktoren, Zellmembranprotein, Neurotransmitter oder Zytokine bei der IC nachgewiesen werden.¹²⁸ Zu ihnen zählen weiterhin der Antiproliferative Faktor (APF) im Urin oder der Heparin-bindende epidermale Wachstumsfaktor (HB-EGF) die beide wieder nach Hydrodistension der Blase Normalwerte erreichten.^{48,102} Zu weiteren potenziellen Biomarkern zählen Stickstoffmonoxid, Histamin, Methylhistamin oder Interleukin 6.^{86,116}

2.1.3.5 Körperliche Untersuchung

Auch eine körperliche Untersuchung bildet die Basis einer Diagnosestellung. Hier ist vor allem die Untersuchung des Genitals inklusive digital-rektaler Untersuchung wichtig.

2.1.3.6 Kaliumchlorid-Test (KCl-Test)

Die Durchführung eines KCl-Tests kann erwogen werden und gibt Aufschluss über ein erhöhtes Schmerzempfinden. Die Grundlage dieser Testung liegt in einer erhöhten Permeabilität des Harnblasenepithels bei dem Kalium in die Blasenwand eindringt und zu einer Depolarisation von Nerven führt, die als Schmerzen wahrgenommen werden. Studien haben gezeigt, dass die Gabe von 40 ml 0,4 molaren KCl-Lösung bei an IC erkrankten Patienten eine Spezifität von 81,6 % und eine Sensitivität von 85,5 % hat.⁹⁸ Diese Testung kann in weiterer Folge Rückschlüsse auf einen möglichen Erfolg oder Misserfolg einer geplanten GAG-Therapie geben.¹⁸³

2.1.3.7 Biopsie der Blasenwand

Eine Biopsie der Blasenwand sowie des M. detrusor kann bei Bedarf durchgeführt werden. Diese kann Hinweise auf Hunner'sche Läsionen geben, stellt jedoch kein essentielles Diagnostikum in der Bestimmung einer IC dar. Das Präparat kann in weiterer Folge zur Zählung der Mastzellzahl oder für immunhistochemische Untersuchungen herangezogen werden.

2.1.4 Therapie

Das heterogene Erkrankungsbild mit steigenden Fallzahlen bei fast gänzlich unklarer Pathogenese erhöht den Druck zur Findung einer kausalen Therapie der IC. Aktuell steht den Patienten, je nach Symptomatik und Phänotyp der Erkrankung, nur eine

symptomorientierte Therapie mit multimodalem Ansatz zur Verfügung. Diese setzt sich aus konservativen Maßnahmen, oraler bzw. intravesikaler Medikation sowie weiterführenden Behandlungen wie Neuromodulation oder gar operativen Maßnahmen zusammen.^{74,141} Anhand eines Stufenschemas beginnend bei konservativen Maßnahmen als Basis, kann bei persistierenden Beschwerden die Therapie bis hin zur operativen Entfernung der Blase eskaliert werden. Viele der Medikamente, die aktuell zur Therapie der IC eingesetzt werden, erfolgen als off-label Gabe. Lediglich Pentosanpolysulfat (PPS) und Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) sind zur Therapie der IC zugelassen.^{36,74} Das Hauptziel der Behandlung sollte darin bestehen, durch Symptomkontrolle die Lebensqualität der Betroffenen zu maximieren und gleichzeitig unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Behandlungskomplikationen zu vermeiden. Jedoch sei zu berücksichtigen, dass es aktuell keine kurative Therapie der IC gibt.

Die nachfolgenden Unterkapitel zeigen das aktuelle Therapiespektrum der IC anhand der zuletzt erschienenen Guidelines der *Canadian Urological Association* (CUA)³⁷ sowie der aktuellen deutschen S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der IC (IC/BPS) aus dem Jahr 2018.²⁶

Diese Empfehlungen werden nach Graden von A bis D eingeteilt, wobei Grad A einem starken Konsens entspricht und durchgeführt werden sollte und Grad D erwogen werden kann und nicht zwingend durchzuführen ist. Die Grad-Bezeichnungen werden im Folgenden in Klammer nach der jeweiligen Therapie angeführt.

2.1.4.1 Konservative Maßnahmen

Als Grundlage der IC-Therapie stehen konservative Maßnahmen, die in jedem Fall einer medikamentösen Therapie vorangestellt werden sollen.

Patientenaufklärung und Lebensstilveränderung [A]: An erster Stelle der IC-Therapie steht die Patientenaufklärung. Diese umfasst, neben der Aufklärung über mögliche auftretende Schmerzexazerbationen oder sexueller Aufklärung auch Blasentraining mit kontinuierlicher Flüssigkeitsaufnahme.

Ernährung [A]: Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Nahrungsmittel nach dem Verzehr zu vermehrten Schmerzen geführt haben. Zu ihnen zählen etwa Zitrusfrüchte, Tomaten, Meerrettich, Essig, Pfeffer, Glutamat, künstlichen Süßstoffe, Tee, Kaffee, kohlenensäure- oder alkoholhaltigen Getränken sowie scharfe Gewürzmittel.⁶¹ Diese sollten mittels Ausschlussdiät vermieden werden.

Psychotherapie und Stressmanagement [B]: Mit einer Odds Ratio von 2,0³³ zählt die Depression, neben der Angststörung, zu den häufigsten psychischen Komorbiditäten der IC.¹⁷⁸ Das Vorliegen einer chronischen Erkrankung ohne kausale Therapie sowie die Abnahme der Lebensqualität führen oft zu einer großen psychischen Belastung und können durch Psychotherapie sowie stressreduzierende Aktivitäten behandelt werden.

Physiotherapie [A]: Vor allem Patienten mit Funktionsstörungen des Beckenbodens profitieren von Physiotherapie sowie Massagen. Hier konnten bei 50 – 62 % eine Verbesserung des Beschwerdebildes gezeigt werden.⁵⁵

2.1.4.2 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie der IC kann in eine orale und eine intravesikale Gabe unterteilt werden. Lediglich das intravesikal verabreichte DMSO und das orale Medikament PPS sind von der *U. S. Food and Drug Administration* (FDA) und *Health Canada* zur Therapie der IC zugelassen.^{37,181} Seit 2017 ist PPS als einziger Wirkstoff zur Behandlung der IC in Europa zugelassen. Die Verabreichung anderer Medikamente erfolgt *off-label* ohne Zulassung zur IC-Therapie.

Orale Medikamente

Pentosanpolysulfat (PPS) [D]: Die Wirksamkeit einer oralen Therapie mit PPS wird aktuell sehr kontrovers diskutiert. So spricht die aktuelle deutsche S2K-Leitlinie eine starke Empfehlung zur Therapie mit PPS aus, während die CAU die Therapie lediglich mit Grad D klassifiziert. Nichtsdestotrotz zählt PPS zu dem am häufigsten untersuchten Wirkstoff in der Behandlung von IC. PPS wird nach der oralen Einnahme renal ausgeschieden und soll an seinem Wirkungsort, der Blase, zu einer Reparatur der GAG-Schicht führen.

Der Wirkeintritt von PPS liegt zwischen drei und sechs Monaten, sodass ein früher Therapiebeginn günstig ist. Des Weiteren liegt die Rate der unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf Placebo-Niveau, sodass dieser Wirkstoff oft zum Einsatz kommt.

Eine Metaanalyse mit Daten von 448 Patienten konnte in 50 % der Fälle einen signifikanten Therapieerfolg im Vergleich zu Placebo mit Verbesserung der Symptomatik zeigen.⁹⁰ Daten von Langzeitstudien geben ein gemischtes Bild. So zeigte eine Studie eine Verbesserung der Symptomatik in >50 % der Fälle über einen Zeitraum von 18 Monaten,⁴ während eine andere Studie in nur 6,2 – 18,7 % einen Benefit zeigte.⁹⁶

Amitriptylin [B]: Das trizyklische Antidepressivum Amitriptylin soll durch die Hemmung der Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahme zu einer Blockade der Schmerzweiterleitung führen. Zusätzlich führt es zu einer Inhibition der Mastzelldegranulation durch Bindung an den H1-Rezeptor und somit Histaminfreisetzung. Studien konnten hier einen moderaten Therapieerfolg mit Verbesserung der Symptomatik zeigen.⁵⁷

Cimetidin [B]: Bei Cimetidin handelt es sich um einen Histamin-2-Rezeptorantagonisten der erstmals 1994 zur IC-Therapie herangezogen wurde.²⁰¹ Analysen von Blasenwandpräparaten konnten eine vermehrte Expression von H1 sowie H2 Rezeptoren bei IC-Patienten feststellen, welche durch Cimetidin blockiert werden.¹⁵⁴ Das günstige Nebenwirkungsprofil sowie eine rasch eintretenden Wirkung konnten auch in Studien bestätigt werden. Hier zeigten sich eine signifikante Verbesserung der Symptomatik im Vergleich zur Placebogruppe.²¹⁵

Hydroxyzin [C]: Das Antihistaminikum der 1. Generation, Hydroxyzin, wirkt indem es die Aktivierung und Histaminausschüttung von Mastzellen hemmt. Studien zeigten jedoch, dass die Wirksamkeit dieses Medikaments bei der Therapie der IC nicht ausreichend vorhanden war.¹⁹²

Immunsuppressiva [C]: Immunsuppressiva wie Cyclosporin A, Azathioprin oder Methotrexat können in der Behandlung der IC zum Einsatz kommen. Kleine Kohortenstudien konnten einen positiven Therapieeffekt von Cyclosporin A zeigen, wobei kein Langzeiteffekt beobachtet wurde.^{56,190} Zusätzlich zeigten sich häufig unerwünschte Arzneinebenwirkungen, die ein intensives Monitoring der Patienten erforderlich machen.

Antikonvulsiva [C]: Pregabalin und Gabapentin kommen bei der Behandlung von neuropathischen Schmerzen zum Einsatz. Die Studienlage beider Wirkstoffe zur Therapie der IC ist sehr beschränkt und fordert eine weitere Abklärung dieser.

Intravesikale Medikamente

Heparin [C]: Das als GAG-Analogon wirksame Heparin führt bei intravesikaler Instillation zu einer Rekonstruktion der Integrität der Blasenmukosa. Studien konnten zeigen, dass > 50 % der Patienten nach der Heparininstillations-Therapie über eine signifikante Verbesserung der Symptome berichteten. Dieser Effekt konnte selbst ein Jahr nach Therapieende noch beschrieben werden.¹⁶³ Häufig kommt Heparin als Bestandteil einer Kombitherapie mit beispielsweise Lidocain, Bicarbonat oder Natriumhydrogenkarbonat zum Einsatz.²²⁹

Hyaluronsäure [C] / Chondroitinsulfat [D]: Sowohl die Instillation von Hyaluronsäure als auch Chondroitinsulfat dienen der Wiederherstellung der GAG-Schicht der Blasenwand. Die Studienlage beider GAG-Analoga ist kontrovers: so zeigte eine Therapie mit Hyaluronsäure zwar eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität, jedoch konnte nur ein moderater Langzeiteffekt nachgewiesen werden.^{47,184} Chondroitinsulfat konnte in einer multizentrischen Studie eine signifikante Verbesserung der Symptomatik zeigen.¹⁵⁶

Die Wirksamkeit einer Kombinationstherapie beider Wirkstoffe konnte, in Bezug auf Schmerzsymptomatik und Lebensqualität, in Studien beschrieben werden.^{29,176}

Lidocain [B]: Das Lokalanästhetikum Lidocain führt bei Instillation zu einer kurzzeitigen Blockierung von sensorischen Nervenfasern in der Blasenwand und kommt häufig zur Durchbruchstherapie bei akuten Schmerzzuständen zum Einsatz. Positiv ist der schnelle Wirkungseintritt, der jedoch auf maximal 12 Stunden beschränkt ist.⁸⁰

PPS [C]: Die intravesikale Applikation von PPS stellt eine weitere Option der Wirkstoffverabreichung dar. Da lediglich 1 – 3 % der oral verabreichten PPS-Dosis das Blasenurothel erreichen, hat diese Form der Verabreichung klare Vorteile gegenüber der oralen Medikation. Es konnte gezeigt werden, dass > 40 % der Patienten einen signifikanten Unterschied in der Symptomatik im Vergleich zum Placebo beschrieben, inklusive einem günstigen Nebenwirkungsprofil.¹⁵

Aktuell ist die intravesikale Instillation von PPS auf dem europäischen Markt nicht mehr verfügbar.

Dimethylsulfoxid (DMSO) [B]: DMSO ist, neben der oralen Medikation von PPS, der zweite Wirkstoff, der von der FDA zur primären Therapie der IC zugelassen ist. Trotz ungeklärtem Wirkmechanismus konnten die antiinflammatorische, analgetische sowie muskelrelaxierende und kollagenolytische Eigenschaften in Studien bestätigt werden.⁷² Tiermodelle weisen darauf hin, dass die antiinflammatorischen Eigenschaften von DMSO auf einer Inhibition von IL-8, NF-κB sowie eine Prostglandin-E₂-Aktivierung beruhen.^{181,194} Obwohl manche Studien einen Therapieerfolg bei > 80 % der Betroffenen beschreiben,¹⁸⁸ konnten andere Studien keine Überlegenheit von DMSO gegenüber intravesikal instillierten GSGs (Hyaluronsäure/Chondroitinsulfat) bei einem ungünstigerem Nebenwirkungsprofil nachweisen.^{30,220} Des Weiteren kann ein Therapieversagen bei schwerer IC nicht ausgeschlossen werden.^{89,125} Follow-up Studien für Langzeitdaten erstrecken sich über maximal zwei Jahre und können ein Therapieversagen in der Zukunft nicht ausschließen.^{58,170}

Die aktuelle deutsche S2K-Leitlinie rät von einer intravesikalen DMSO-Therapie ab.²⁶

2.1.4.3 Transurethrale Verfahren und operative Therapie

Transurethrale Verfahren

Botulinumtoxin A (BTXa) [C]: Die intramuskuläre oder submuköse Injektion von BTXa in und um den M. detrusor stellt eine weitere Therapieoption in der Behandlung der IC dar. Kuo et al. konnten in einer multizentrischen Studie eine Erfolgsrate von 63 % in der BTXa-Gruppe gegenüber 15 % in der Placebo-Gruppe nachweisen.¹¹⁵ Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion von Schmerzen bei zunehmender Blasenkapazität. Im Mittel hält der Therapieeffekt 5,2 Monate an und kann bei Wiedereintreten von Symptomen wiederholt werden, jedoch konnte ab einem Jahr keine Besserung der Symptomatik mehr beobachtet werden.⁷⁷ Es konnte gezeigt werden, dass eine BTXa-Therapie selbst bei therapierefraktärer IC Wirkung zeigt.²²² Die Kombination der Hydrodistension der Blase mit anschließender BTXa-Therapie erbrachte eine Verbesserung der Wirksamkeit der Injektion.³

Hydrodistension [C]: Bei der Hydrodistension handelt es sich um eine forcierte Füllung und Distension der Blase bis zur anatomischen Maximalkapazität. Obwohl aktuell kein standardisiertes Vorgehen über Dauer und Druck vorliegt, stellt die Hydrodistension eine häufig eingesetzte Therapieform dar.¹⁸⁷ Studien konnten einen Therapieerfolg von 71% nach einem Monat zeigen.² Aufgrund der mechanischen Manipulation der Blase wird eine Komplikationsrate von 20 % beschrieben.⁵¹

Operative Therapie

Transurethrale Resektion von Hunner-Läsionen [B]: Die transurethrale Resektion von Hunner'schen Läsionen mittels Schleifenkauter konnte in mehreren Studien eine Erfolgsrate von bis zu 90 % aufzeigen, wobei ein Anhalten des Therapieerfolgs von mehr als drei Monaten bei 40 % der IC-Patienten beschrieben wurde.^{82,168} Voraussetzung ist ein Vorliegen von Hunner'schen Läsionen.

Sakrale Neuromodulation (SNM) [C]: Bei der SNM kommt es durch eine perkutan eingeführte Elektrode zu einer permanenten Stimulation des S3-Sakralnervs. Unter der Therapie konnte eine Verminderung von Schmerzen sowie eine Unterdrückung des M. detrusor beobachtet werden. Langzeit-Follow-up Daten zeigen eine gute Wirksamkeit dieser Therapiemethode mit gutem Therapieansprechen in der Testphase.²⁰⁷

Radikale Operation [C]: Die letzte Therapiestufe beinhaltet operative Verfahren der Blase. Hier kann es, bei therapierefraktären Patienten mit hohem Leidensdruck, zu einer Augmentation der Blase oder, als Ultima Ratio, zur radikalen Cystektomie mit orthotopen

Blasenersatz mit kontinenter oder inkontinenter Harnableitung kommen. Eine Verbesserung der Symptome sowie der Lebensqualität waren sichtbar.^{7,185}

Abbildung 1 zeigt das individuelle Stufenschema zu Therapie der IC.

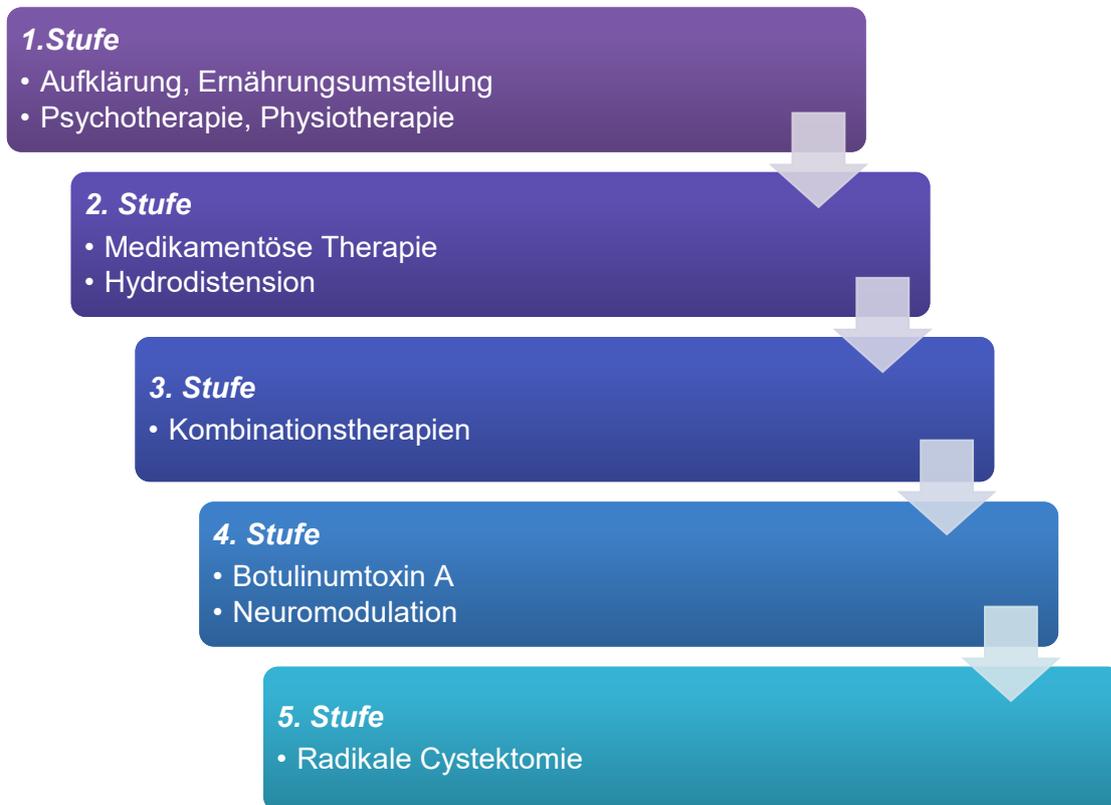


Abbildung 1: Stufenschema zur Therapie der IC nach der S2K-Leitlinie „Diagnostik und Therapie der Interstitiellen Cystitis (IC/BPS)“ der Deutsche Gesellschaft für Urologie.²⁶

2.2 Eisen

Das im menschlichen Körper als Spurenelement vorhandene Eisen gilt als das am häufigsten vorkommende chemische Element auf der Erde.⁶ Aus diesem Grund überrascht es wenig, dass Eisen sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Organismen für beispielsweise den Sauerstofftransport, die Zellatmung, die Nukleinsäurenreplikation bzw. -reparatur, Signalübertragung sowie Immunabwehr einen bedeutenden Faktor darstellt.^{40,175}

2.2.1 Physiologie des Eisens

Generell kann Eisen ein Teil von Enzymkomplexen sein (z. B. DNA-Primase, Myeloperoxidase (MPO), Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH) oder Stickstoffmonoxid-Synthetase (NOS)), sowie in Proteine eingebaut werden (z. B. Hämoglobin und Myoglobin)³⁹ oder zur Energieübertragung und Elektronentransfer in Mitochondrien beitragen (z.B. Komplexe I-III der Atmungskette, Coenzym Q10).^{50,66}

In seiner Rolle als Übergangsmetall kann Eisen, dank der Fähigkeit Elektronen aufzunehmen oder abzugeben, die Grundlage wichtiger Redox-Reaktionen bilden.¹⁹¹ Eisen kann so, entweder in einer reduzierten bzw. oxidierten Form als Fe^{2+} oder Fe^{3+} vorliegen und muss, aufgrund seiner hohen Reaktionsbereitschaft durch Chaperone oder Chelatoren geschützt werden.¹⁰⁷ Mit einer Gesamtmenge von 3 g bis 4 g, kommt Eisen im menschlichen Körper zu einem Großteil (etwa 2 g) an Hämoglobin gebunden vor. Erythrozyten bewerkstelligen die lebenswichtige Bindung von Sauerstoff mit Hilfe von Hämoglobin und werden durch Erythrophagozytose vom retikuloendothelialen System in Makrophagen der Leber und Milz recycelt.^{65,160} Der natürlich auftretende Verlust von ca. 1 mg bis 2 mg Eisen pro Tag durch epitheliale Desquamation der Darmwand oder Blutungen kann durch eine suffiziente Absorption von Nahrungs-Eisen im Duodenum ausgeglichen werden. Diese erfolgt hauptsächlich durch die Aufnahme von Fe^{3+} -Ionen, die mittels Ferrireduktasen zu Fe^{2+} reduziert werden und so, mittels des Divalent-Metallionen-Transporter 1 (DMT 1), durch die apikale Membran des Duodenums transportiert werden.¹⁴⁰ Dort wird es bis zur weiteren Verwendung in Form von Ferritin gespeichert und bei Bedarf über den Transporter und Gatekeeper Ferroportin über die basolaterale Membran in die Blutbahn geschleust.⁴³ Zum weiteren Transport im Blutstrom wird Eisen an Transporter, wie zum Beispiel Transferrin, Haptoglobin oder Hämopectin, gebunden, um im Anschluss von Zellen über den Transferrin-Rezeptor 1 (TFR 1) aufgenommen zu werden.¹⁶⁰ Eisen, das nicht an Transporter gebunden im Plasma vorliegt (Non-Transferrin-bound Iron; NTBI) kann zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen beitragen. In der Zelle angelangt, findet die

Regulation der Eisenhomöostase über das Eisen-regulatorische-Protein System (IRP-System)⁸ oder Hypoxie-induzierte Faktoren (HIF)⁹ statt, wobei besonders HIF_{2α} zu einer Hochregulation der DMT 1 sowie Ferroportin bei Eisenmangel führt.²⁰² Stabile Plasmaspiegel werden durch Eisenspeicher in Hepatozyten und retikuloendothelialen Makrophagen in der Milz erzielt.

Ein stabiler Eisenspiegel wird durch das, von der Leber exprimierte und durch das Hamp-Gen kodierte Enzym Heparin erzielt, welches bei erhöhten Plasmaspiegel zu einem Abbau von Ferroportin und so zu einer verminderten Aufnahme von Eisen ins Blut führt.¹²⁹ Niedrige Plasmaeisenspiegel hingegen führen zu einer verminderten Transkription des Hamp-Gens, wodurch es zu einer vermehrten Aufnahme von Eisen ins Blut über Ferroportin und Freisetzung von Speichereisen aus Leber- und Milzmakrophagen kommt.^{64,66} Bestehende Eisenspeicher werden von sinusoiden Endothelzellen in der Leber gemessen, die wiederum das Knochenmorphogene-Protein 6 (BMP 6), einen wichtigen endogenen Regulator für die Heparin-Synthese, exprimieren.¹⁰⁷ Des Weiteren kann der Plasmaeisenspiegel auch bei Inflammationszuständen durch Heparin reguliert werden. Das proinflammatorische Zytokin Interleukin 6 (IL-6) führt hierbei über einen Janus-Kinase-Signaltransduktor (JAK) und den Transkriptionsfaktor STAT3 zu einer vermehrten Expression von Heparin, welches zu einer Verringerung der Eisenspiegel beiträgt.^{67,233} Dieser physiologische Mechanismus spielt eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen (Verringerung der Eisenverfügbarkeit hemmt das Wachstum von Bakterien) und stellt somit einen wichtigen Schritt in der Immunabwehr dar („hypoferremic response“).^{66,144} Langanhaltende Infektionen und Entzündungszustände können so zu einer verminderten Hämatopoese und Anämien führen, die als Anämie durch chronische Erkrankung (ACD) bekannt ist.^{19,28,104,153} Zu dieser Anämie-Entität führen u.a. Krebserkrankungen²⁰³, Rheumatoide Arthritis¹⁵⁹, entzündliche Darmerkrankungen¹⁵⁰, Sepsis¹⁰³ sowie chronische Nierenerkrankungen.²⁷ Intrazellulär konnte eine Eisen-abhängige Aktivierung des nukleären Faktors κB (NF-κB) beobachtet werden, welcher proinflammatorisch zu einer vermehrten Expression von Zytokinen führt.^{234,235}

Abbildung 2 zeigt den schematischen Regulationsmechanismus der Eisenhomöostase durch das Schlüsselenzym Heparin.

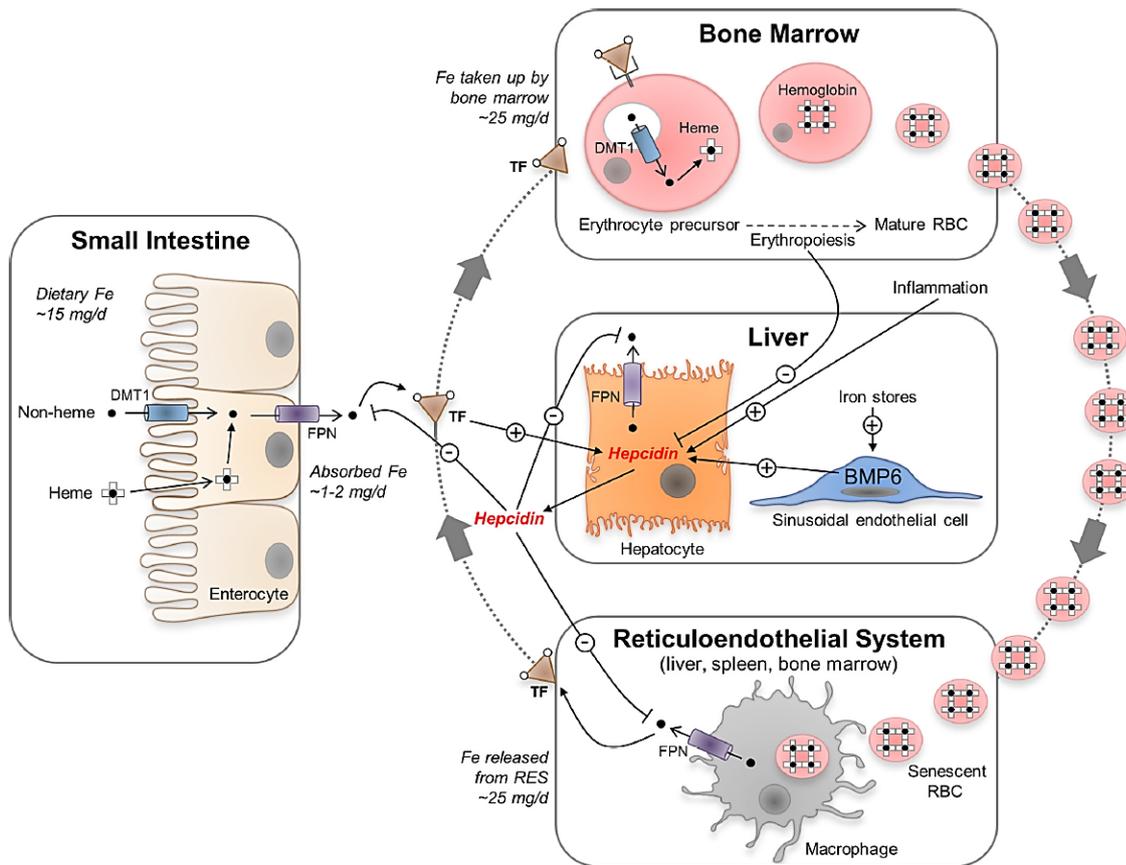


Abbildung 2: Schematischer Regulationsmechanismus der Eisenhomöostase durch das Enzym Hepcidin nach Knutson M.¹⁰⁷

DMT1 - Divalent-Metallionen-Transporter 1, FPN – ferroportin, RBC – Erythrozyten, TF – Transferrin, BMP6 - Knochenmorphogene-Protein 6.

2.2.2 Eisenchelatoren

Eisen stellt nicht nur beim Menschen eine essentielle Komponente für eine Vielzahl an Molekülen und Reaktionen dar, sondern ist auch für Bakterien ein wichtiger Nährstoff für Wachstum und Entwicklung. So verwundert es wenig, dass die ersten kommerziell verfügbaren Eisenchelatoren zur Rekrutierung von freiem Eisen von Bakterien selbst abstammten (z.B. *E. coli*¹⁹⁹, *Staphylococcus* spp.¹⁵¹, *Klebsiella* spp.⁸⁴, *N. meningitidis*¹¹²) und so als bedeutender Virulenzfaktor vieler Bakterien angesehen werden kann.^{45,105} Eisenchelatoren bakteriellen Ursprunges werden Siderophore oder Xenosiderophore genannt und dienen der Sequestrierung von Wirtseisen als Nährstoff für Wachstum und Entwicklung (z.B. Staphyloferrin A, Pyochelin oder Enterobactin).

Im Allgemeinen bezeichnen Eisenchelatoren Verbindungen mit freien Elektronen, die zwei- oder dreivalente Eisenionen (Fe^{2+} - oder Fe^{3+} -Ionen) in einen stabilen Ringkomplex binden können. Diese können therapeutisch zur Behandlung von Hämochromatose oder

Hämosiderose eingesetzt werden, oder um erhöhte Plasmaeisenspiegel nach Behandlung (häufige Bluttransfusionen) von Erkrankungen wie Thalassämien¹⁰¹, Sichelzellanämie³⁴ oder bei Transfusions-induzierter Hyperferriämie⁹⁵ zu reduzieren. Es konnte gezeigt werden, dass Eisenchelatoren einen positiven Effekt bei der Therapie von entzündlichen Erkrankungen wie Atherosklerose⁹², Colitis¹⁴⁶, Uveitis¹³, Vaginitis¹⁹⁵, Sepsis⁹³ oder Multipler Sklerose²²⁸ haben.

Die aktuell zur Therapie zugelassenen Eisenchelatoren unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, Eisen zu binden, durch ihre Metallionenaffinität, Zellpermeabilität und ihr Molekulargewicht. Nachfolgende Eisenchelatoren werden aktuell therapeutisch eingesetzt.¹⁵⁷

2.2.2.1 Desferrioxamin (DFO):

In den letzten 30 Jahren ist DFO der am häufigsten zum Einsatz gekommene Eisenchelator bei der Therapie der Hyperferriämie. Im Gegensatz zu synthetisch hergestellten Chelatoren stammt dieser vom Siderophor des Bakteriums *Streptomyces pilosus* ab und besitzt aufgrund seiner Struktur die Fähigkeit selektiv Fe³⁺-Ionen zu binden.¹⁴⁹ Strukturell handelt es sich bei DFO um ein Derivat der *tris*-Hydroxaminsäure und bindet Eisen zu Ferrioxamin-Komplexen.¹³⁰ Zu seinen Eigenschaften zählen, neben einem hohen Molekulargewicht von mehr als 500 g/mol, das eine orale Einnahme wirkungslos macht, auch seine hydrophile Eigenschaft, die eine schnelle renale Exkretion begünstigt.¹⁷⁴ So zeigt DFO eine Plasmahalbwertszeit von etwa 5 bis 10 Minuten und erfordert so eine kontinuierliche subkutane oder intravenöse Gabe.^{171,211} Die aktuelle Dosierungsempfehlung liegt bei 10 – 60 mg/kg/Tag.¹¹⁰

2.2.2.2 Deferipron (DFP):

Im Gegensatz zu DFO, stellt DFP den ersten oralen Eisenchelator zur Behandlung von erhöhtem Plasmaeisenspiegel dar. Begünstigt durch ein Molekulargewicht von 139,152 g/mol kann dieser erfolgreich aus dem Gastrointestinal-Trakt aufgenommen werden und aufgrund seiner Hydrophilie renal ausgeschieden werden.¹¹¹ DFP bindet Plasmaeisen zu den drei Komplexen [FeL]²⁺, [FeL₂]⁺ sowie [FeL₃] und besitzt eine Plasmahalbwertszeit von 47 bis 134 Minuten. Dadurch genügt eine zwei- bis dreimalige orale Gabe täglich von insgesamt 10 – 100 mg/kg/Tag.¹¹⁰ Als unerwünschte Arzneinebenwirkung kann es unter der DFP-Therapie zu Agranulozytose kommen.³⁵

2.2.2.3 Deferasirox (DFX):

DFX stellt neben DFP den zweiten weltweit zugelassenen Eisenchelator zur oralen Hyperferriämie-Therapie dar. Dieser Chelator besitzt ein Molekulargewicht von 373,36 g/mol und führt aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften zu einer Ausscheidung von Eisenkomplexen über den Stuhl. Diese Eigenschaft kann in weiterer Folge zur Bildung von Metallkomplexen (vor allem polymere Zinkkomplexe)⁸¹ führen, die zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Leber- oder Nierenschäden, Agranulozytose, Hautausschläge oder gastroenterale Nebenwirkungen beitragen.¹¹⁰ Bei einer Plasmahalbwertszeit von $19 \pm 6,5$ Stunden genügt eine einmalige orale Gabe von 20 – 40 mg/kg/Tag.⁶³

2.3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

2.3.1 Reaktive Sauerstoffradikale

Reaktive Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species; ROS*) beschreiben eine Gruppe von Molekülen oder einzelnen Atomen mit einem oder mehreren freien Elektronen. Zu diesen zählen neben Sauerstoffradikalen wie das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) auch andere oxidierte Moleküle wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO).⁵² Als Hauptbildungsort von ROS werden Leukozyten (v.a. neutrophile Granulozyten und Monozyten) angesehen, die durch eine bakterielle Aktivierung der NADPH-Oxidase die Katalyse von ROS starten und so entscheidend zur Wirtsabwehr beitragen.¹⁵⁵ Hier kommt es im ersten Schritt zur Reduktion von Sauerstoff zum Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), welches bei der Zerstörung von Bakterien mitwirkt. In einem weiteren Schritt erfolgt eine Umwandlung des Superoxid-Anions mit Hilfe der Superoxiddismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2).^{25,134} Sowohl das Superoxid-Anion als auch Wasserstoffperoxid besitzen beide nur eine sehr geringe antibakterielle Wirkung und können beispielsweise durch das Enzym Myeloperoxidase mit Chlor-Ionen weiter zur hochpotenten hypochlorigen Säure ($HOCl$) katalysiert werden.¹⁰⁶ Einen weiteren Weg stellt die Folgereaktion von Superoxid-Anion und Wasserstoffperoxid mit Hilfe von freiem Eisen zum hoch reaktiven Hydroxylradikal dar (OH^{\cdot}). Diese Haber-Weiss-Redoxreaktionen beschreiben die Rolle des Übergangmetalls Eisen bei der Katalyse von ROS.¹²⁷

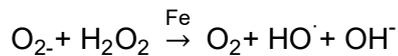
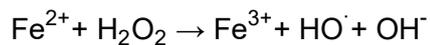
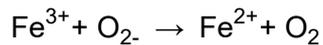


Abbildung 3 stellt die Bildung von ROS durch Leukozyten dar.

Im Rahmen der angeborenen Immunabwehr kommt es nach der Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) durch Trigger wie Endotoxin, Interleukine (IL) oder Tumornekrosefaktor- α (TNF α), zu einer vermehrten Aktivierung der NADPH-Oxidase und Bildung von ROS. Im Zuge dessen, führt eine erhöhte Konzentration von ROS zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und zur Bildung proinflammatorischer Zytokine die wiederum eine Aktivierung der NADPH-Oxidase triggern.^{31,198} ROS tragen nicht nur zur angeborenen Immunabwehr bei, sondern können bei physiologischen Konzentrationen extrazellulär auch regulatorische Aufgaben, beispielsweise als Signalmoleküle,^{53,196} einnehmen. Um eine Dysbalance der ROS abzufangen, liegen diese unter physiologischen Bedingungen ausgeglichen mit Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Tocopherol oder Glutathion von.¹⁷²

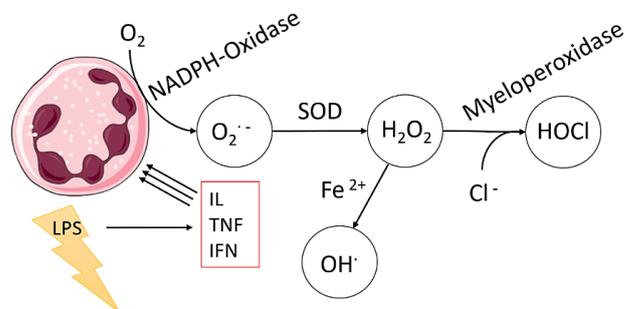


Abbildung 3: Bildung von ROS durch Leukozyten.

O₂ – Sauerstoff, O₂^{•-} – Superoxid-Anion, SOD – Superoxiddismutase, H₂O₂ – Wasserstoffperoxid, Cl⁻ – Chlorid-Ion, HOCl – hypochlore Säure, Fe²⁺ – Eisen-II-Ion, OH[•] – Hydroxyl-Radikal, IL – Interleukine, TNF – Tumornekrosefaktor- α , IFN – Interferon- γ .

2.3.2 Oxidativer Stress

Übersteigt die Konzentration der ROS die der puffernden Antioxidantien, entsteht oxidativer Stress, der zu Schäden an körpereigenen Zellen führen kann. Am häufigsten kommt es zur Destruktion von Lipiden, Proteinen oder Nukleinsäuren, die mit Chromosomenbrüchen und Schäden an der DNA einhergehen.^{94,148} Langanhaltender

oxidativer Stress kann der Auslöser vieler Krankheiten sein, wie beispielsweise dem Metabolischen Syndrom¹⁸⁰, chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn⁹¹ oder Rheumatoider Arthritis¹⁷⁷ und kann kanzerogene Wirkung auf Zellen haben.⁷¹

2.4 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Im Rahmen einer Inflammationsreaktion auf eine Infektion kommt es auf zellulärer Ebene zu einer mediatorvermittelten Aktivierung von Leukozyten im Blutstrom, die in weiterer Folge mit dem Gefäßendothel von Venolen interagieren, um anschließend zur Entzündungsquelle zu migrieren. Basis dieser Leukozyten-Endothel-Interaktion bilden eine Abfolge von Vorgängen, welche sich über die Expression von unterschiedlichen Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Leukozyten sowie des Gefäßendothels vollziehen. Diese Vorgänge beginnen mit der Annäherung von Leukozyten aus der Blutstrommitte und ziehen sich über eine temporäre sowie feste Leukozyten-Endothel-Interaktion, die anschließend zu einer extravasalen Migration der Leukozyten aus dem Gefäß zum Ort der Entzündung führt.¹²⁰ Abbildung 4 zeigt den schematischen Ablauf der Leukozyten-Adhärenz an das Gefäßendothel und anschließende Migration.

2.4.1 Temporär interagierende Leukozyten

Nach einer Annäherung der Leukozyten aus dem Blutstrom kommt es zur temporären Adhäsion der Leukozyten mit dem Gefäßendothel. Diese wird hauptsächlich durch die Interaktion dreier Adhäsionsrezeptoren aus der Familie der Selectine (P-, E- und L-Selectin) mit ihren Liganden vermittelt. Hierbei handelt es sich um Glykoproteine, die durch Stimuli auf der Endothel- oder Leukozytenoberfläche exprimiert werden. Durch die konsekutive Bindung der Selectine an ihre Liganden entsteht eine temporäre Bindung, die jedoch die Leukozyten aufgrund größerer Scherkräfte des Blutstroms in eine rollende Bewegung entlang des Endothels versetzt (Leukozyten-Rolling).¹²¹

2.4.1.1 P-Selectin

Die Expression des P-Selectins (Syn.: GMP-140) auf der Endotheloberfläche tritt in der Frühphase der Leukozytenadhäsion auf und wird durch die Anwesenheit von LPS oder TNF- α stimuliert. Als Ursprung dieses Selectins werden Weibel-Palade-Körperchen der menschlichen Epithelzellen angesehen.¹³⁹ Als Ligand dient das auf der Leukozytenoberfläche exprimierte Glykoprotein Sialyl-Lewis^X.¹²⁰

2.4.1.2 E-Selectin

Das Adhäsionsmolekül E-Selectin (Syn.: ELAM-1) tritt ausschließlich durch eine Zytokin- bzw. Endotoxin-vermittelte Aktivierung auf der Endotheloberfläche auf (v.a. IL-1 und TNF- α). Im Gegensatz zum P-Selectin, welches sofort nach der Stimulation exprimiert wird, zeigt das E-Selectin sein Expressionsmaximum erst nach vier Stunden auf.²³ Auch hier dient Sialyl-Lewis^x als Ligand auf der Leukozytenoberfläche.¹²⁰

2.4.1.3 L-Selectin

Das auf der Leukozytenoberfläche exprimierte Glykoprotein L-Selectin beschreibt das letzte der drei Adhäsionsrezeptoren und tritt ohne externen Stimulus auf der Oberfläche von Leukozyten auf. Sein Gegenspieler auf der Endotheloberfläche ist das Glykoprotein GlyCAM-1.¹²¹

2.4.2 Feste Leukozyten-Adhärenz

Im nächsten Schritt kommt es zu einer festen Adhäsion der Leukozyten, bei der das Rollen entlang des Gefäßendothels sistiert. Die feste Adhäsion wird durch die Bindung von Integrinen an deren Liganden auf der Endotheloberfläche vermittelt.¹²⁰

2.4.2.1 ICAM-1

Der endotheliale Ligand ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) stellt den ersten von zwei Liganden zur Integrin-Bindung dar. Dieser wird, nach Stimulation durch Zytokine wie IL-1 oder TNF- α auf der Endotheloberfläche exprimiert und bindet an die Integrine LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*; CD11a/18) auf Lymphozyten oder Mac-1 (*macrophage-1 antigen*; CD11b/18) auf Granulozyten und Monozyten.¹²⁰

2.4.2.2 VCAM-1

Der zweite vaskuläre Ligand, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) bindet an das leukozytäre Integrin VLA-4 (*very late antigen 4*) und zeigt eine ähnliche Expressions-Kinetik wie ICAM-1 auf.¹²⁰

2.4.3 Leukozyten Diapedese und Migration

Bevor Leukozyten durch das Gefäßendothel in das Interstitium treten können (Leukodiapedese), kommt es zur Bindung des Moleküls PECAM-1 (*platelet-endothelial*

cell adhesion molecule 1), das sowohl auf Leukozyten sowie dem Gefäßendothel exprimiert wird.¹²⁰

Im Interstitium erfolgt die Leukozytenbewegung (Migration) auf Basis des vorherrschenden Chemokingradienten, der vom Inflammationsfokus ausgeht.

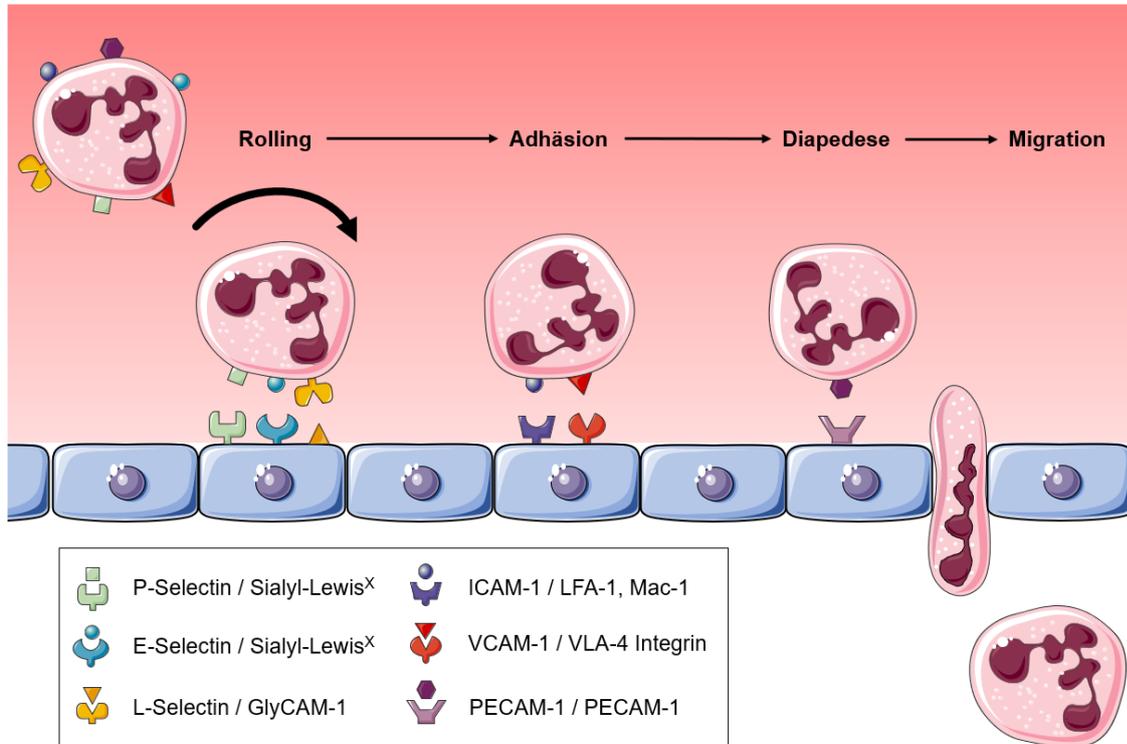


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Leukozyten-Adhärenz an das Gefäßendothel mit anschließender Diapedese und Migration ins Interstitium nach Hagn.

ICAM-1 - intercellular adhesion molecule 1, LFA-1 - lymphocyte function-associated antigen 1, Mac-1 - macrophage-1 antigen, VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule 1, VLA-4 - very late antigen 4, PECAM-1 - platelet-endothelial cell adhesion molecule 1.

3 Fragestellung

Steigende Patientenzahlen und eine unzureichend verstandene Pathogenese erhöhen den Druck, eine dringend benötigte, wirksame Therapie der IC zu finden.

Die vorhergehende, vom Autor durchgeführte Studie zum Thema „Auswirkungen von DIBI, einem neuartigen Eisenchelator, auf Schmerzempfinden und Krankheitsverhalten in einem murinen Modell der Interstitiellen Cystitis“⁷³ zeigte den positiven Einfluss der hier verwendeten Testsubstanz, DIBI, auf das Krankheitsverhalten und die Schmerzsensibilität in einem Mausmodell der IC. Es konnte beobachtet werden, dass unter Therapie mit DIBI das krankheitsbedingte Verhalten von BALB/c Mäusen signifikant beeinflusst und der Schwellwert für das Schmerzempfinden kranker Tiere nach einer Therapie ebenfalls signifikant verbessert wurde. Als nächster Schritt soll nun eine weitere Testung von DIBI wichtige mechanistische Aufschlüsse über die antiinflammatorische Wirkung dieser Substanz geben.

Es wird postuliert, dass eine Therapie mit DIBI zu einer Reduktion der Inflammationsreaktion bei experimenteller IC führt. Die Evaluation erfolgte durch die intravitale Untersuchung aktivierter Leukozyten und des kapillären Blutflusses in der Mikrozirkulation der Blasenwand sowie die Bestimmung der Plasmaspiegel inflammatorischer Mediatoren in einem tierexperimentellen IC-Modell (Maus).

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Arbeit behandelt:

1. Kann die intravesikale Gabe von DIBI, einem neuartigen Eisenchelator, die Zahl der fest adhärierenden Leukozyten in den Venolen der Blasenwand, in einem experimentellen Mausmodell von IC reduzieren?
2. Kann die intravesikale Gabe von DIBI die Zahl der temporär adhärierenden Leukozyten reduzieren, sowie die funktionelle Kapillardichte in der Blasenwand in einem experimentellen Mausmodell von IC verbessern?
3. Führt die intravesikale Gabe von DIBI zu einer Verbesserung der Kapillarperfusion der Blasenwand in einem experimentellen Mausmodell von IC?
4. Hat die intravesikale Gabe von DIBI einen Einfluss auf die Plasmaspiegel inflammatorischer Mediatoren in einem experimentellen Mausmodell von IC?

4 Material und Methoden

Die Versuchsdurchführung erfolgte im Mikrozirkulationslabor der Dalhousie University in Halifax, Kanada an der Abteilung für Anästhesie, Schmerzmanagement und perioperative Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Christian Lehmann. Der Zeitraum des Forschungsaufenthalts erstreckte sich von Juni 2018 bis Oktober 2018. Im Rahmen des Experiments konnten Daten zu unterschiedlichen Fragestellungen gesammelt werden. Ein Teil dieser Daten wurde zur Erstellung einer Diplomarbeit an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität herangezogen. Diese Daten finden sich nicht in dieser Arbeit wieder und sind klar von den verwendeten Daten dieser Arbeit abzugrenzen.

In diesem experimentellen Tiermodell wurde eine randomisierte kontrollierte Studie als Studiendesign gewählt. Tiere, bei denen eine IC induziert wurde und die eine Behandlung mit DIBI erhielten, wurden mit einer gleichwertig erkrankten, unbehandelten Kontrollgruppe verglichen (weitere Kontrollgruppen s.u.).

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden gemäß den Richtlinien des *Canadian Council of Animal Care* (CCAC) durchgeführt und vom *University Committee of Laboratory Animals* (UCLA) der Dalhousie University Halifax, Kanada genehmigt. Als Voraussetzung und Qualifikationsnachweis diente eine zuvor erfolgreich abgelegte theoretisch-praktische Prüfung durch die *Carleton Animal Care Facility*.

Zeitgleich wurden von Herrn Dr. med. univ. Robert Westhofen im selben Labor Daten für seine Dissertationsschrift erhoben. Unter ähnlichen methodischen Bedingungen beschäftigte Herr Dr. med. univ. Westhofen sich mit der Erforschung von Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten auf die Inflammationsreaktion bei IC. Teile der Methodik und des Versuchsaufbaus wurden von uns gemeinsam etabliert und angewendet.

4.1 Material

4.1.1 Versuchstiere

Für die Versuchsdurchführung wurden 20 sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse (Charles River Laboratories International Inc., Wilmington, MA, USA) mit einem Körpergewicht zwischen 17 g und 21 g herangezogen.

Die Versuchstiere wurden in Gruppen (n = 5 / Gruppe) in temperaturkontrollierten und klimatisierten Käfigen (22 °C, 55 % - 60 % Luftfeuchtigkeit) mit Wasser und Trockennahrung ad libitum in einem 12-stündigen Tag- / Nachtrhythmus in der *Carleton*

Animal Care Facility der Dalhousie University für mindestens eine Woche akklimatisiert, bevor sie für die weitere Versuchsdurchführung verwendet wurden.

4.1.2 Substanzen

Bei der verwendeten Testsubstanz, DIBI, handelt es sich um einen neuartigen 3-hydroxypyridin-4-one Eisenchelator der Firma Chelation Partners Inc. (Halifax, NS, Kanada). Als Chelatormotive dienen aromatische Hydroxypyridinon-Ringe (HPO), die auf einem Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Grundgerüst zu eisenbindenden Polymeren verbunden wurden (Abbildung 5). Diese Struktur befähigt DIBI selektiv an trivalente Eisen-Ionen (Fe^{3+}) in Form von *tris*-Chelaten zu binden. Des Weiteren weist die Testsubstanz eine hohe Wasserlöslichkeit sowie ein niedriges Molekulargewicht auf.¹¹ Größenbedingt beschränkt sich der Wirkungsort von DIBI auf den extrazellulären Raum.

Studien konnten eine antiinflammatorische,^{13,93,216} antibakterielle^{11,161,195} sowie antikanzerogene^{70,173} Wirkung von DIBI bereits nachweisen.

Zur Versuchsdurchführung wurde das in Pulverform zur Verfügung gestellte DIBI zunächst mit 0,9 %iger Kochsalzlösung (Baxter, Mississauga, ON, Kanada) in Lösung gebracht. Für den weiteren Versuchsablauf wurde mit einer Konzentration von 80 mg/kg Körpergewicht (KG) gearbeitet.

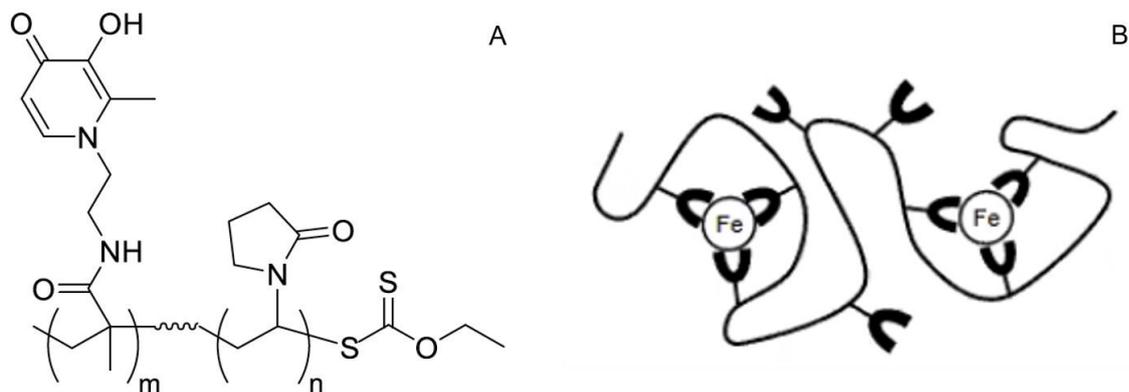


Abbildung 5: Strukturformel von DIBI (A); schematische Darstellung der Bindung von Eisen an DIBI (B)

4.2 Gruppeneinteilung

Die 20 Versuchstiere wurden in vier Gruppen (n = 5 / Gruppe) randomisiert:

- Kontrollgruppe (CON) ohne IC/ohne Therapie
- Endotoxingruppe (LPS) ohne Therapie
- Therapiegruppe (LPS+DIBI)
- Behandlungsgruppe (DIBI) ohne IC

4.3 Versuchsablauf

In diesem Versuchsaufbau wurde auf ein experimentelles Mausmodell zurückgegriffen, bei der mittels intravesikaler Gabe eines Endotoxins (Lipopolysaccharid – LPS von *Escherichia coli* (*E. coli*), Serotyp O26:B6, Potenz 3.000.000 IU) eine IC induziert wurde. Die nachfolgende Abbildung 6 zeigt den schematischen Versuchsablauf.

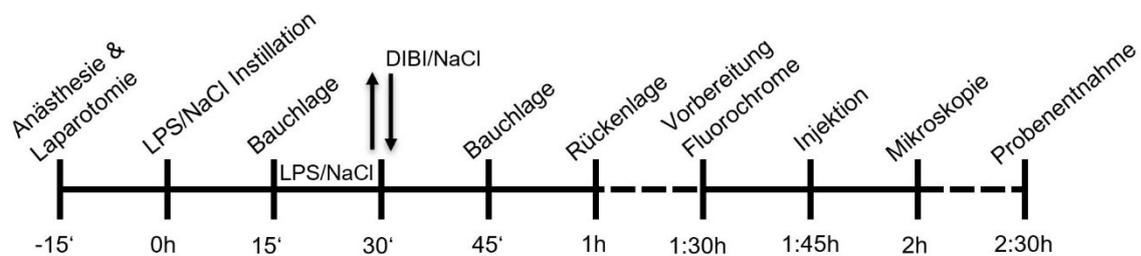


Abbildung 6: Schematischer Versuchsablauf

4.3.1 Vorbereitung, Anästhesie und Monitoring

Am Beginn der Versuche wurde das Körpergewicht der Versuchstiere mittels elektronischer Waage ermittelt. Des Weiteren wurden die Versuchstiere auf äußere Verletzungen wie Biss- oder Kratzwunden untersucht sowie auf Verhaltensauffälligkeiten vor Beginn der Versuche geachtet und gegebenenfalls dokumentiert.

Zu Versuchsbeginn erfolgte die Einleitung der Allgemeinanästhesie mittels intraperitonealer Injektion von Natrium-Pentobarbital 90 mg/kg (Ceva Animal Health Inc., Cambridge, ON, Kanada). Nach Eintreten der Wirkung wurden die Mäuse in Rückenlage auf einer vorgeheizten Wärmematte positioniert um eine Hypothermie zu verhindern. Für den weiteren Versuchsablauf wurde eine rektale Temperatursonde zur kontinuierlichen Messung der Körperkerntemperatur eingeführt. Mittels eines Feedback-Systems (Kent Scientific Corporation, Torrington, USA) wurde diese konstant auf $37 \pm 0,5$ °C gehalten.

Das Erreichen einer suffizienten Narkosetiefe wurde durch das Fehlen einer Reaktion auf Schmerzstimuli im Bereich der Hinterpfoten (Zehen-Quetsch-Reflex) bestätigt. Die Narkosetiefe wurde während des gesamten Versuchsverlaufs regelmäßig überprüft und bei Bedarf wurde die Narkose mit repetitiven Gaben Pentobarbital vertieft.

4.3.2 Chirurgische Präparation und Katheterisierung

Im ersten Schritt wurde der suprapubische Bereich mittels Alkoholtupfer gründlich desinfiziert. Anschließend erfolgte mit Hilfe einer Präparierschere und einer anatomischen Pinzette das Entfernen der suprapubischen Haut mit Fell auf einer Fläche von etwa 5 x 5 mm. Im nächsten Schritt erfolgte die mediane Laparotomie. Entlang der Linea alba wurde zunächst durch scharfe Trennung bei minimalem Blutverlust ein Zugang zum suprapubischen Bereich geschaffen, ehe dieser stumpf auf die gewünschte Größe erweitert wurde. Im Anschluss konnte die Blase mit Hilfe befeuchteter Wattestäbchen frei präpariert, dargestellt und mobilisiert werden.

Im darauffolgenden Schritt erfolgte die Entleerung des Harnes in der Blase und anschließende Katheterisierung. Dafür wurde die Blase unter leichtem Druck zwischen Daumen und Zeigefinger manuell vom Apex der Blase zum Blasen Hals entleert. Der Urin wurde mit Hilfe eines Tupfers aufgefangen und verworfen. Nach der Reposition der Blase in die Bauchhöhle erfolgte mittels anatomischer Pinzette die Darstellung und Fixierung des urethralen Ostiums. Ein 30-G-Katheter konnte anschließend vorsichtig in die Blase vorgeschoben werden, bis eine sichere Lage in der Blase gewährleistet war. Dabei wurde auf etwaige Resistenzen geachtet, um keine Verletzungen an der Urethra zu setzen. Nach behutsamem Abklemmen des urethralen Ostiums wurden gruppenabhängig gewichtsadaptiert 0,9 %ige Kochsalzlösung (Baxter, Mississauga, ON, Kanada) oder 0,375 mg/kg LPS (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Kanada) zu Induktion der experimentellen Cystitis instilliert. Um einen vesiko-urethralen Reflux zu vermeiden, wurde der Katheter im Anschluss langsam zurück gezogen, die gefüllte Blase mit vorgewärmter Kochsalzlösung befeuchtet und mit abdominellem Fett sowie einem feuchten Tupfer bedeckt um eine Austrocknung des Operationsgebietes zu verhindern.

Die Versuchstiere wurden für 15 Minuten in der Rückenlage und anschließend 15 Minuten in der Bauchlage gelagert um eine Benetzung aller Blasenwände mit der instillierten Substanz zu gewährleisten.

Nach Ablauf der 30-minütigen Wartezeit erfolgte erneut eine manuelle Entleerung und Katheterisierung der Blase wie oben beschrieben. Diesmal wurde gruppenabhängig gewichtsadaptiert 0,9 %ige Kochsalzlösung oder 80 mg/kg/KG DIBI in die Blase

instilliert. Wie zuvor wurden die Versuchstiere 15 Minuten in Rückenlage und anschließend 15 Minuten in Bauchlage positioniert.

4.4 Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie (IVM) stellt ein Verfahren zur Untersuchung mikroskopischer Prozesse in lebenden Organismen dar. Für diese Studie wurde mit Fluoreszenz-Video-Mikroskopie gearbeitet, bei der Fluorochrome wie Rhodamin-6G oder Fluorescein Isothiocyanat Albumin (FITC) zum Einsatz kommen, um vitalen Strukturen Fluoreszenz zu verleihen. Rhodamin-6G diente als Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung von Mitochondrien; daher wurden vorwiegend Leukozyten im Blut gefärbt. FITC-Albumin hingegen half durch die resultierende Kontrastanhebung des Plasmas bei der Visualisierung des Blutflusses im Kapillarbett. Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnten unterschiedliche Stadien der Leukozytenadhäsion sowie die Kapillarperfusion (funktionelle Kapillardichte - FCD) der Blasenwand dargestellt werden.

Abbildung sieben zeigt den schematischen Versuchsaufbau der Intravitalmikroskopie.

4.4.1 Technik

Die Intravitalmikroskopie erfolgte mit folgender technischer Ausstattung:

- Epifluoreszenzmikroskop (Leica DM LM; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland)
- Objektiv: (20 x 0,5; Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Filtersatz (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
 - Nr. 10 für Beobachtungen mit FITC-Albumin (Anregung: BP 450 – 490; Frequenzteiler: 510; Emission: 515 - 565)
 - Nr. 20 für Beobachtungen mit Rhodamin-G6 (Anregung: BP 546/12; Frequenzteiler: 560; Emission: 575 - 640)
- Lichtquelle HBO 50 (Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe; OSRAM GmbH, München, Deutschland)
- Videokamera (BC-71; AVT Horn, Aalen, Deutschland)
- Videokarte IC-Capture (The Imaging Source Europe GmbH, Bremen, Deutschland), PC Computer-System
- Monitor Toshiba LCD Monitor (Toshiba America Information Systems, USA)

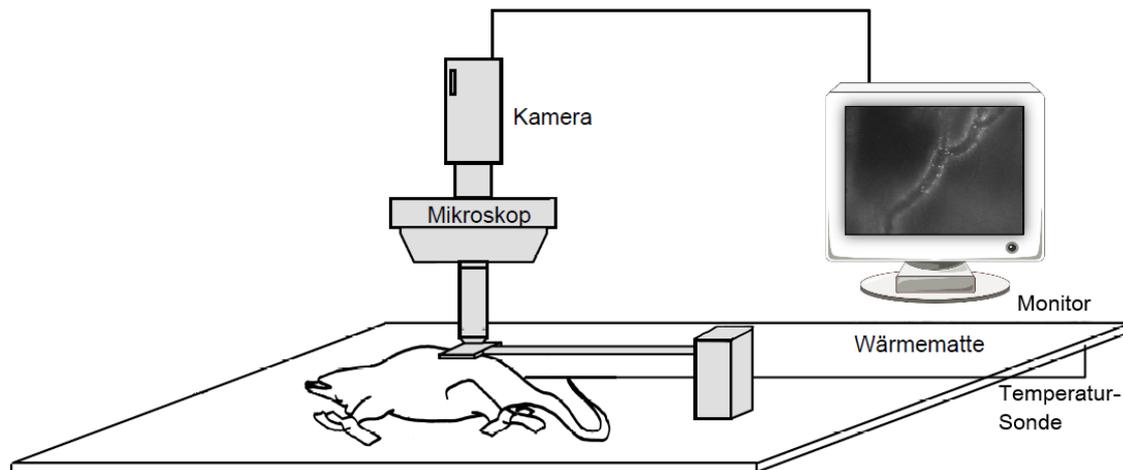


Abbildung 7: Versuchsaufbau der Intravitalmikroskopie. Modifiziert aus Lehmann C. ¹¹⁹

4.4.2 Durchführung der Intravitalmikroskopie

Nachdem die Maus wieder in Rückenlage positioniert wurde, begann nach einer weiteren halben Stunde, in der das Operationsfeld kontinuierlich mit feuchten Tupfern bedeckt wurde, die Vorbereitung der Fluorochromgabe. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei möglichst abgedunkelten Lichtverhältnissen, um einem Ausbleichen der Fluoreszenz entgegen zu wirken.

Fünfzehn Minuten vor Beginn der Intravitalmikroskopie erfolgte die intravenöse Gabe von 0,05 %igem Rhodamin-6G (1.5 ml/kg; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Kanada; Lösungsmittel: NaCl 0,9 %) in eine Schwanzvene. Danach erfolgte die intravenöse Injektion von 5 %iger FITC-Albumin-Lösung (1 ml/kg; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Kanada; Lösungsmittel: NaCl 0,9 %).

Unmittelbar vor der Mikroskopie wurde die Blase des Versuchstieres erneut mit feuchten Wattestäbchen leicht aus der Bauchhöhle luxiert, mit vorgewärmter Kochsalzlösung angefeuchtet und an der zu untersuchenden Stelle ein Deckglas positioniert. Die Untersuchung der Blase sowie die darauffolgende Aufnahme der Videosequenzen erfolgte an unterschiedlichen Stellen, um einen Gesamteindruck der Blase zu erhalten.

Zunächst wurden mittels Fokussierung am Mikroskop geeignete Gesichtsfelder der Blasenwand eingestellt. Nach Wahl des Filtersatzes Nr. 10 wurden sechs Gesichtsfelder mit unverzweigten Venolen aufgesucht und für 30 Sekunden aufgezeichnet. Danach erfolgte, nach Wechsel auf den Filtersatzes Nr. 20, erneut Aufnahmen von sechs

Gesichtsfeldern über einen Zeitraum von jeweils 30 Sekunden zur Evaluierung der Kapillarperfusion. Die Gesamtdauer der Mikroskopie und Videoaufnahme betrug etwa 20 Minuten.

4.4.3 Versuchsauswertung

Die Auswertung der aufgenommenen Videosequenzen erfolgte nach Beendigung des Versuchsablaufes. Diese wurde in einem dunklen Raum an einem separaten Monitor mit der Bildverarbeitungssoftware Fiji (ImageJ; NIH, US)¹⁹⁷ durchgeführt.

Mit Hilfe eines Objektmikrometers konnten bei der Auswertung am Monitor maßstabsgerechte Größen- und Längenbestimmungen der Gefäße bzw. Kapillaren vorgenommen werden. Vor Beginn der Analysen wurde das Messinstrument mittels Mikrometereichmaßstab geeicht.

4.4.3.1 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Es wurden sechs unverzweigte Venolen unterschiedlicher Blasenwandabschnitte mittels folgender zwei Parameter ausgewertet:

Feste Leukozyten-Adhärenz

Dieser Parameter wurde definiert als die Anzahl von Leukozyten auf einer umschriebenen (zylindrischen) Endotheloberfläche, die über den Beobachtungszeitraum von mindestens 30 Sekunden fest an der Gefäßwand hafteten. Hierzu wurde ein polygonaler Gefäßabschnitt zur Flächenbestimmung auf den Videobildern markiert und die darin enthaltenen Leukozyten gezählt. Die permanente Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand ist Zeichen einer fortgeschrittenen Inflammationsreaktion.

$$N = \text{Zellen [n]} / \text{Fläche [mm}^2\text{]}$$

Temporär mit dem Endothel interagierende Leukozyten

Dieser Parameter wurde definiert als die Anzahl an Leukozyten, die in einem Zeitraum von 30 Sekunden einen bestimmten Gefäßdurchmesser rollend passieren. Zur Analyse wurde an einer geeigneten Stelle im Video durch eine Venole eine Linie gezeichnet und die die Linie passierenden Leukozyten gezählt. Leukozyten, die keine rollende Interaktion mit dem Gefäßendothel vollziehen, können aufgrund ihrer hohen Geschwindigkeit in der Regel visuell nicht detektiert werden. Typischerweise liegt die

Geschwindigkeit rollender Leukozyten bei etwa $50 \mu\text{m/s}^{120}$. Das Rollen von Leukozyten entlang der Endotheloberfläche ist Zeichen einer beginnenden Aktivierung der Leukozyten und schließt auf den Beginn einer Inflamationsreaktion.

$$\text{Roller-Fluss} = \text{Zellen [n]} / \text{Minute}$$

Abbildung 8 zeigt das Standbild einer IVM. Zu sehen ist eine Venole der Blasenwand mit rollenden und adhärenen Leukozyten. Durch die Lumineszenz von Rhodamin-6G können diese als helle Punkte identifiziert werden.

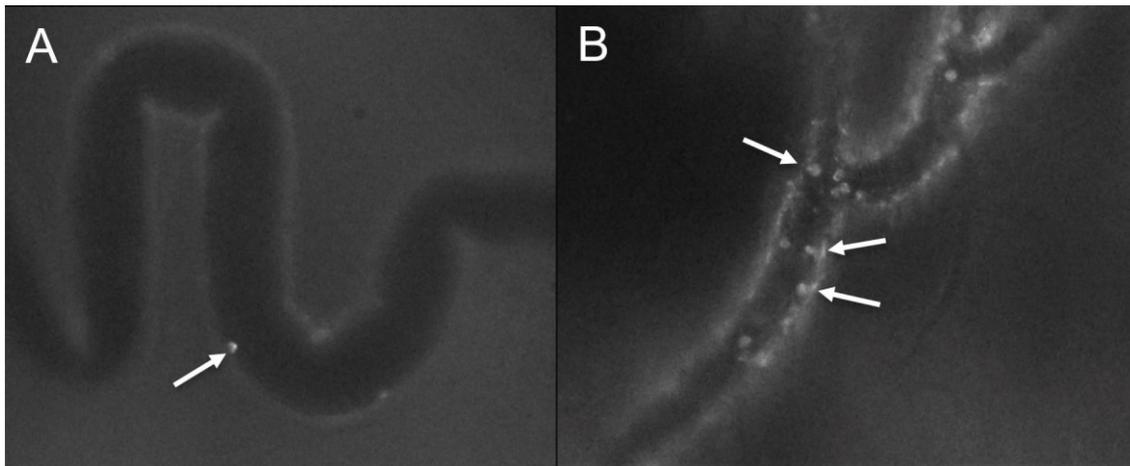


Abbildung 8: Standbilder von Venolen während der IVM einer muriner Blasen (Vergrößerung = 200x). (A) Versuchstier der Kontrollgruppe. (B) Versuchstier mit IC. Weiße Pfeile markieren Leukozyten, die mit dem Gefäßendothelium interagieren.

4.4.3.2 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte (FCD) errechnet sich aus der Gesamtlänge aller mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren im Verhältnis zu einer umschriebenen Fläche. Die Färbung mit FITC-Albumin ermöglicht eine Kontrastbildung zwischen hellem, FITC-markiertem Plasma, und den darin enthaltenen dunklen Erythrozyten. Daraus folgend wurden zwei verschiedene Zustände der Kapillarperfusion unterschieden:

- Funktionslose Kapillaren: Kapillaren ohne sichtbare Perfusion bzw. Kapillaren mit sichtbar unbeweglichen oder pendelnden Erythrozyten während eines Zeitraumes von mindestens 30 Sekunden.
- Funktionelle Kapillaren: Sichtbare Perfusion bzw. Kapillardurchblutung über einen Zeitraum von mindestens 30 Sekunden.

Im ersten Schritt der Videoanalyse wurde ein passender Bereich gewählt, dessen Fläche anschließend markiert und vermessen wurde. Innerhalb des markierten Bereiches

konnte so über den gesamten Aufzeichnungszeitraum von 30 Sekunden die Länge aller sichtbar perfundierter Kapillaren gemessen werden. Das Verhältnis dieser beiden Größen bildet die FCD.

$$\text{FCD} = \text{Länge der perf. Kapillaren [mm]} / \text{Fläche [mm}^2\text{]} = [\text{mm}^{-1}]$$

Abbildung 9 zeigt ein Standbild einer IVM. Zu sehen ist das Kapillarnetz einer murinen Blasenwand wie es für die Versuchsauswertung für die FCD gewählt und aufgezeichnet wurde. Die Evaluierung der Perfusion erfolgte durch Betrachtung der aufgenommenen Videosequenz.

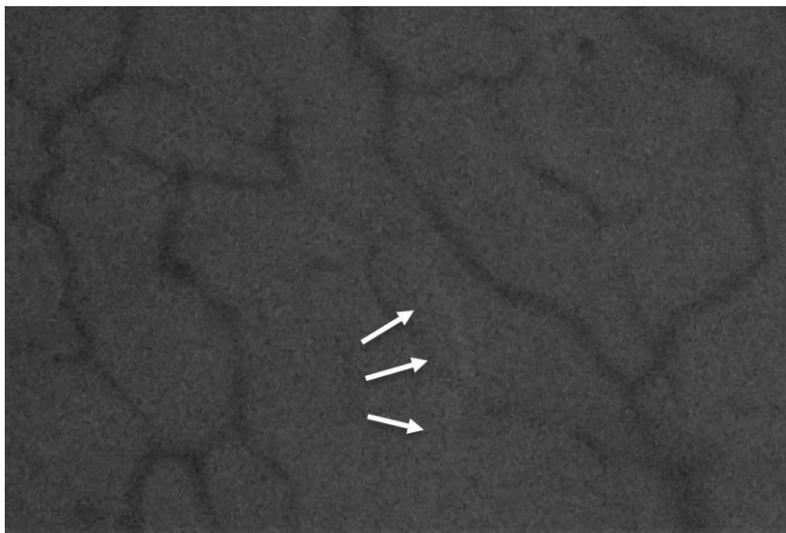


Abbildung 9: Standbild eines Kapillarnetzes während der IVM einer murinen Blase (Vergrößerung = 200x). Die weißen Pfeile zeigen eine Kapillare ohne sichtbaren Durchtritt von Erythrozyten. Diese wurde als funktionslose Kapillare gewertet.

4.5 Probengewinnung

Nach Beendigung der IVM und Aufnahme der Videosequenzen erfolgte die Gewinnung von Probenmaterial.

Dazu wurde die bestehende mediane Laparotomie mit Hilfe einer chirurgischen Schere nach kranial erweitert und der Thorax lateral des Sternums geöffnet. Unter Zuhilfenahme zweier Klemmen wurden die Rippen beiseite gehalten um gute Sicht auf das Herz zu erhalten. Anschließend erfolgte die kardiale Punktion mit einer zuvor mit 10 µl Heparin (1000 Einheiten / ml; Sandoz Canada, Boucherville, QC, Kanada) vorgefüllten Spritze mit einer 25G x 5/8 Kanüle zur Entnahme kardialen Blutes. Die Exsanguination, und damit Euthanasie des Versuchstieres, bildete das Ende des Versuchsablaufes. Durchschnittlich konnten etwa 0,5 ml kardiales Blut gewonnen werden.

Im Anschluss wurde das gewonnene Blut mit Hilfe einer Mikropipette (Eppendorf Canada Ltd., Mississauga, ON, Kanada) in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und bei 7000 rpm zentrifugiert (SciLogex D1008; Montreal Biotech Inc., Kirkland, QC, Kanada). Das daraus entstandene Blutplasma wurde wiederum mittels Mikropipette in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende Lagerung bis zur Durchführung der Mediatoranalyse, erfolgte in einem Gefrierschrank bei -80 °C (Thermo Fisher Scientific, Marietta, OH, USA).

4.6 Mediatoranalyse

Die Bestimmung der Plasماzytokin- sowie Adhäsionsmolekülspiegel erfolgte mit Hilfe eines individuell zusammengestellten 12-plex Bio-Plex Pro™ Immunoassay zur Messung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren von Mäusen (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Kanada). Dieses Assay verwendet ein Sandwich-ELISA als Grundlage für die Biomarker-Detektion (Abbildung 10).

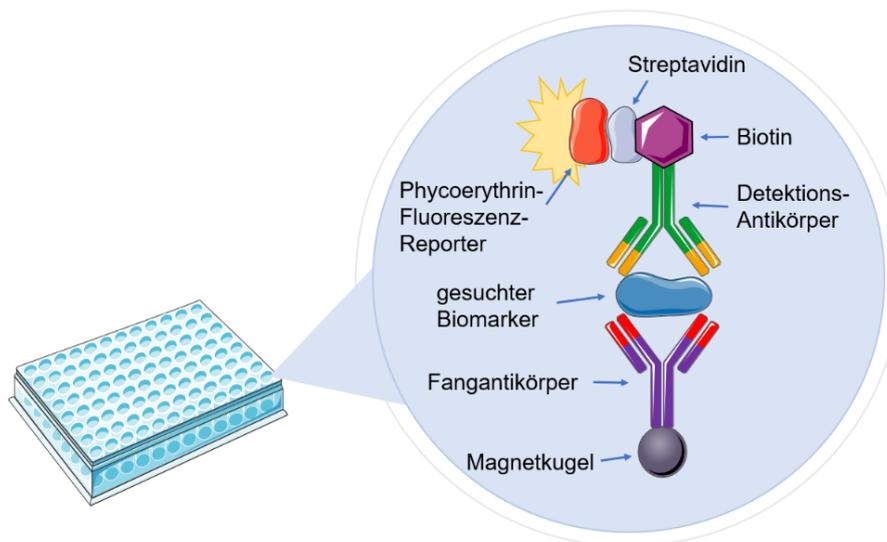


Abbildung 10: Sandwich - ELISA als Grundlage des Bio-Plex™ Immunoassays.

Die Plasmaspiegel folgender Zytokine sowie Adhäsionsmoleküle wurden gemessen: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , P-Selectin und ICAM-1.

Die Kalibrierung und Eichung des Luminex-Systems, sowie die Durchführung der Analysen erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Sämtliche Plasmaproben wurden

doppelt gemessen und Standardkurven aufgenommen. Die Analyte wurden mit Hilfe der Bio-Plex™ Verdünnung dreifach verdünnt und aufbereitet.

Zu Beginn wurden 50 µl der Fangantikörper mit Magnetkugelbesatz in jede Vertiefung der 96-Well Mikroplatte pipettiert, bevor anschließend die Platte unter Zuhilfenahme der Bio-Plex™ Waschstation mit Pufferlösung gespült wurde. Im nächsten Schritt wurden zuerst Referenzlösungen, anschließend die dreifach verdünnten Plasmalösungen in die Vertiefungen pipettiert. Die Mikroplatte wurde danach für eine Stunde in einer Dunkelkammer bei 300 rpm bewegt, um anschließend erneut dreimalig ausgewaschen zu werden. Darauffolgend wurden die biotinylierten Detektionsantikörper in die Vertiefungen hinzugefügt und erneut im Dunkelraum für 30 Minuten inkubiert, ehe diese dreifach mit Pufferlösung gespült wurden. Im darauffolgenden Schritt wurde Streptavidin-Phycoerythrin (Streptavidin-PE) in die Vertiefungen pipettiert und im Dunklen unter kontinuierlicher Bewegung für 10 Minuten inkubiert. Nach erneuter dreifacher Spülung der Mikroplatte wurde diese in das Bio-Plex® 200 System (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Kanada) eingelegt und ausgewertet.

4.7 Statistische Analyse

Sowohl die statistische Auswertung als auch die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 7.0 für Microsoft Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Der notwendige Umfang der Stichproben wurde vor den Versuchen mittels Power-Kalkulation für den primären Endpunkt der Studie (feste Leukozytenadhäsion) berechnet. Die Normalverteilung der erhobenen Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test nachgewiesen. Die Testung von Varianzhomogenität erfolgte mit Hilfe des Brown-Forsythe-Tests.

Waren alle Voraussetzungen gegeben, erfolgte eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA). Lagen Signifikanzen vor, erfolgte post-hoc ein nach Bonferroni korrigierter *t*-Test. Konnte keine Normalverteilung der Daten festgestellt werden, wurde eine nichtparametrische Varianzanalyse (Kruskal-Wallis) mit post-hoc Vergleich nach Dunn vorgenommen.

Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Leukozyten-Endothel-Interaktion

5.1.1 Feste Leukozyten-Adhärenz

Versuchstiere mit IC und anschließender Therapie mit DIBI (LPS + DIBI) zeigten eine signifikant geringere Zahl an fest adhätierenden Leukozyten im Vergleich zu Tieren der unbehandelten IC-Gruppe (LPS; $p = 0,003$). Tiere der LPS-Gruppe hatten einen signifikanten Anstieg der Anzahl an adhätierenden Leukozyten um die 3,24-fache Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe. Es konnte kein Unterschied zwischen Tieren der Behandlungsgruppe (DIBI) und der Kontrollgruppe gezeigt werden (Abbildung 11).

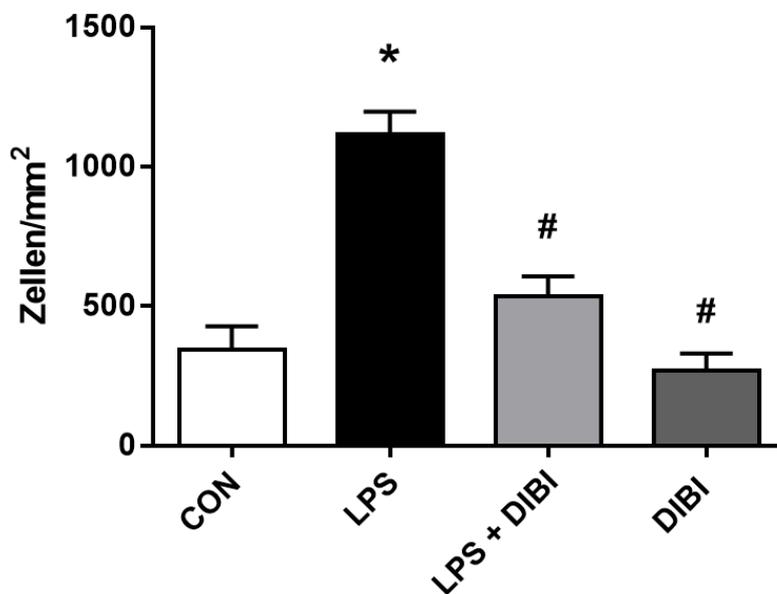


Abbildung 11: Adhätente Leukozyten in submukosalen Blasenvenen von weiblichen BALB/c Mäusen mit folgenden Gruppen: Kontrollgruppe (CON; $n=5$); Endotoxingruppe ohne Therapie (LPS; $n=5$) [0,375mg/kg]; Therapiegruppe (LPS+DIBI; $n=5$) [80mg/kg]; Behandlungsgruppe (DIBI; $n=5$). Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM). * $p \leq 0,05$ versus CON, # $p \leq 0,05$ versus LPS.

5.1.2 Temporär interagierende Leukozyten

Bei temporär interagierenden Leukozyten konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Abbildung 12). Tiere der Kontrollgruppe zeigten hier einen mittleren Fluss von etwa 96 Zellen/min wo hingegen erkrankte Tiere der LPS-Gruppe einen Fluss von 54 Zellen/min aufzeigten. Kranke Tiere nach intravesikaler Therapie mit DIBI hatten einen Roller-Fluss von 76 Zellen/min; gesunde Tiere in der Behandlungsgruppe 89 Zellen/min.

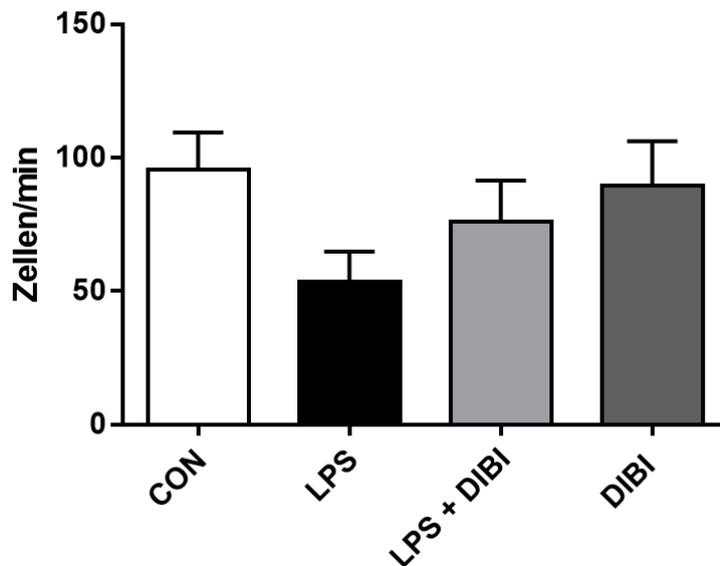


Abbildung 12: Temporär interagierende Leukozyten in submukosalen Blasenvenolen von weiblichen BALB/c Mäusen mit folgenden Gruppen: Kontrollgruppe (CON; n=5); Endotoxingruppe ohne Therapie (LPS; n=5) [0,375mg/kg]; Therapiegruppe (LPS+DIBI; n=5) [80mg/kg]; Behandlungsgruppe (DIBI; n=5). Mittelwerte ± Standardfehler (SEM).

5.2 Funktionelle Kapillardichte

Die Auswertung der FCD konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigen. Im Mittel waren bei Tieren der Kontrollgruppe $0,023 \pm 0,003 \text{ mm/mm}^2$ perfundiert, bei Tieren der Endotoxingruppe (LPS) $0,015 \pm 0,008 \text{ mm/mm}^2$. Kranke Tiere mit DIBI Therapie zeigten eine Kapillarperfusion von $0,023 \pm 0,003 \text{ mm/mm}^2$ und gesunde Tiere der Behandlungsgruppe $0,023 \pm 0,002 \text{ mm/mm}^2$ (Abbildung 13).

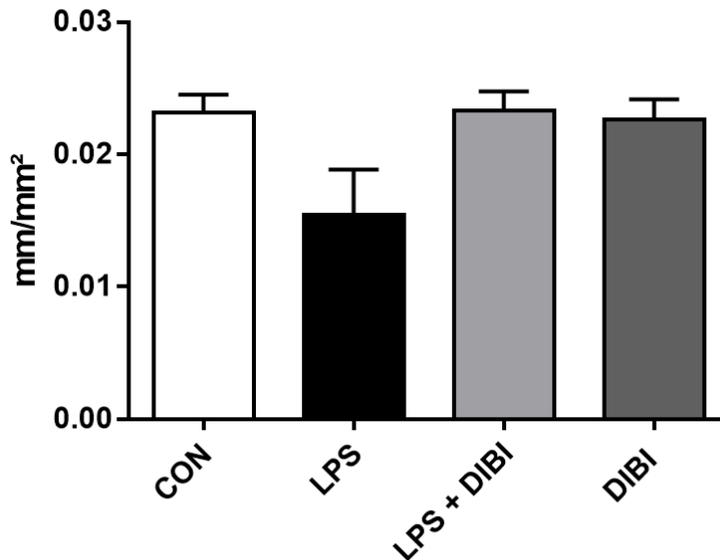


Abbildung 13: Kapilläre Perfusion quantifiziert als funktionelle Kapillardichte (FCD) in Mäuseblasen von weiblichen BALB/c Mäusen mit folgenden Gruppen: Kontrollgruppe (CON; n=5); Endotoxingruppe ohne Therapie (LPS; n=5) [0,375mg/kg]; Therapiegruppe (LPS+DIBI; n=5) [80mg/kg]; Behandlungsgruppe (DIBI; n=5). Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM).

5.3 Mediatoranalyse

Für die Mediatoranalyse wurden die Plasmaspiegel folgender Zytokine: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , und der Adhäsionsmoleküle P-Selectin und ICAM-1 analysiert.

Es konnten lediglich Plasmaspiegel für die Zytokine IL-4, IL-6 sowie der Adhäsionsmoleküle P-Selectin und ICAM-1 gemessen werden. Die Spiegel der anderen Mediatoren lagen unterhalb der Nachweisgrenze und konnten nicht zur Auswertung herangezogen werden.

5.3.1 Interleukin-4

Bei den Plasmaspiegeln des Zytokins IL-4 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden (Abbildung 14).

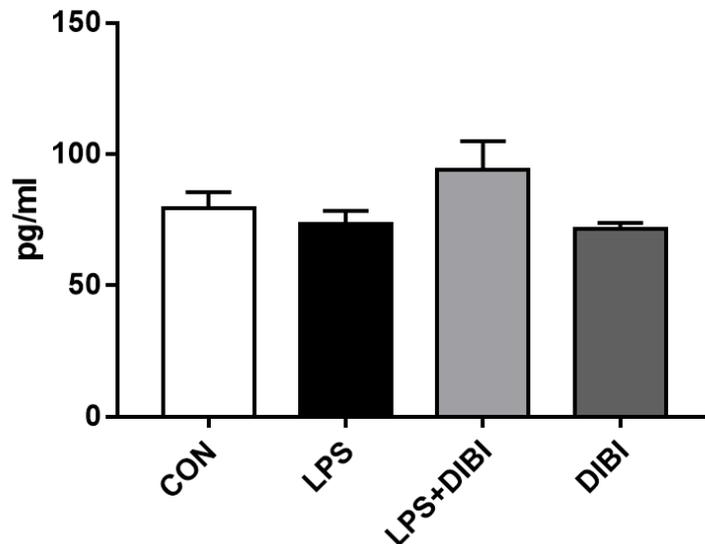


Abbildung 14: Plasmalevel des Zytokins IL-4 weiblicher BALB/c Mäusen mit folgenden Gruppen: Kontrollgruppe (CON; n=5); Endotoxingruppe ohne Therapie (LPS; n=4) [0,375mg/kg]; Therapiegruppe (LPS+DIBI; n=5) [80mg/kg]; Behandlungsgruppe (DIBI; n=4). Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM).

5.3.2 Interleukin-6

Der Vergleich der IL-6 Plasmalevel konnte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen zeigen (Abbildung 15).

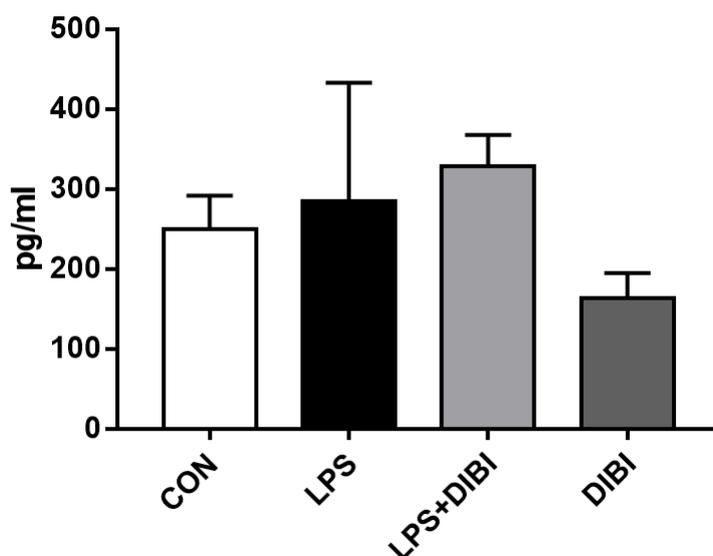


Abbildung 15: Plasmalevel des Zytokins IL-6 weiblicher BALB/c Mäusen mit folgenden Gruppen: Kontrollgruppe (CON; n=5); Endotoxingruppe ohne Therapie (LPS; n=4) [0,375mg/kg]; Therapiegruppe (LPS+DIBI; n=5) [80mg/kg]; Behandlungsgruppe (DIBI; n=4). Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM).

5.3.3 P-Selectin

Für die P-Selectinspiegel in Plasma konnten innerhalb der Gruppen die Signifikanzgrenze nicht erreicht werden (Abbildung 16).

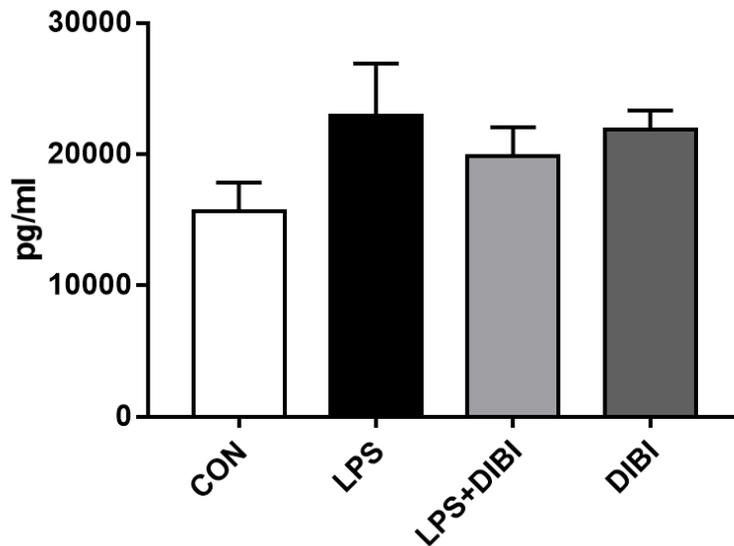


Abbildung 16: Plasmalevel des Adhäsionsmoleküls P-Selectin weiblicher BALB/c Mäusen mit folgenden Gruppen: Kontrollgruppe (CON; n=5); Endotoxingruppe ohne Therapie (LPS; n=4) [0,375mg/kg]; Therapiegruppe (LPS+DIBI; n=5) [80mg/kg]; Behandlungsgruppe (DIBI; n=4). Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM).

5.3.4 ICAM-1

Abbildung 17 zeigt die Plasmaspiegel von ICAM-1. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden.

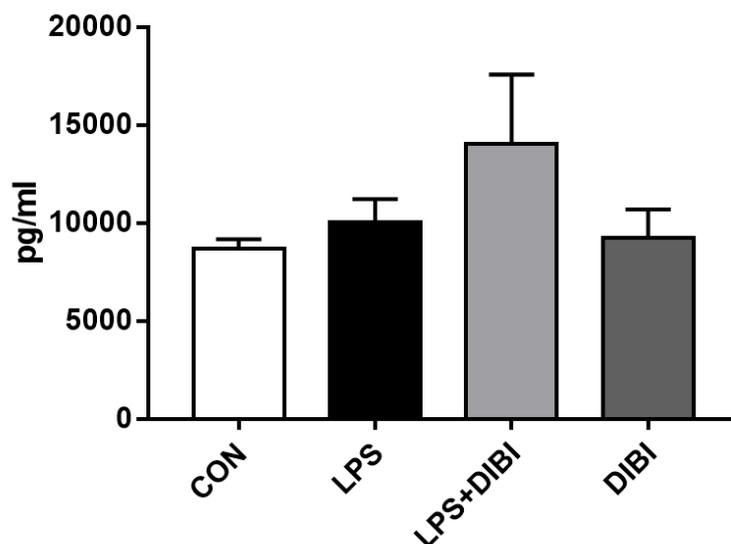


Abbildung 17: Plasmalevel des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 weiblicher BALB/c Mäusen mit folgenden Gruppen: Kontrollgruppe (CON; n=5); Endotoxingruppe ohne Therapie (LPS; n=4) [0,375mg/kg]; Therapiegruppe (LPS+DIBI; n=5) [80mg/kg]; Behandlungsgruppe (DIBI; n=4). Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM).

6 Diskussion

Im Zuge dieser Dissertationsarbeit wurde erstmals ein möglicher Therapieeffekt von DIBI, einem neuartigen Eisenchelator, bei der Behandlung von LPS-induzierter IC in Bezug auf Leukozyten-Endothel-Interaktionen, Kapillarperfusion sowie Spiegel inflammatorischer Mediatoren untersucht. Die Evaluierung erfolgte mittels Intravitalmikroskopie (IVM) für die Leukozyten-Endothel-Interaktionen und Kapillarperfusion; die Messung der Mediatorspiegel erfolgte mittels 12-plex Bio-Plex Pro™ Immunoassay.

Nach Induktion der experimentellen IC mittels LPS konnte bei der Zahl der fest adhätierenden Leukozyten ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Des Weiteren konnte bei Tieren mit DIBI-Therapie eine signifikante Abnahme der fest adhätierenden Leukozyten im Vergleich zu unbehandelten Tieren mit IC gezeigt werden. Sowohl der Fluss der temporär interagierenden Leukozyten sowie der FCD konnten diesen Effekt nicht replizieren. Bei der Messung von 12 inflammatorischen Mediatoren im Blutplasma lagen lediglich vier (IL-4, IL-6, P-Selectin, ICAM-1) oberhalb der Nachweisgrenze und konnten für die weiteren Analysen herangezogen werden. Keiner der Mediatoren zeigte einen signifikanten Unterschied nach einer Therapie mit DIBI im Vergleich zu unbehandelten Tieren mit IC.

6.1 Diskussion der Methoden

6.1.1 Versuchsmodell

Für die Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit von DIBI wurde auf ein experimentelles, LPS-induziertes IC-Mausmodell zurückgegriffen.²³¹ Die Verwendung von Mäusen gilt als eine der üblichen Modell-Spezies, jedoch werden in der Literatur auch oft Ratten oder Katzen, aufgrund ihrer natürlich erhöhten Inzidenz für IC, als Alternativen herangezogen.^{78,118,133}

Da der genaue Pathomechanismus der Entstehung von IC aktuell unbekannt ist, kommen mehrere Methoden zur Induktion einer experimentellen IC in Frage. Das Einbringen von spezifischen Zellwandbestandteilen von gramnegativen Bakterien (LPS) zur Induktion stellt eine etablierte Methode in der Literatur dar.²⁰⁶ Jerde et. al konnte zeigen, dass eine intravesikale Instillation eines LPS von *E. coli* im murinen Modell zu einer Inflammation der Blase führt.⁹⁷ Vergleicht man die vorhandene Literatur, kommen jedoch auch andere Substanzen wie Cyclophosphamid oder Wasserstoffperoxid zum Einsatz.^{62,88,147} Andere Forschungsgruppen wiederum verwendeten Endotoxine des Bakteriums *P. aeruginosa*.¹¹⁴ Eine Cystitis-Induktion mit Hilfe dieser Substanzen könnte

zu anderen Ergebnissen dieser Arbeit führen. Nachdem LPS an TLR4 bindet, kommt es zu einer Aktivierung von NF- κ B, was wiederum zu einer erhöhten Synthese proinflammatorischer Zytokine, einer Aktivierung von Entzündungszellen sowie einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen führt und, in weiterer Folge, eine Entzündungsreaktion hervorruft.²²³ Entsprechend den einheitlichen Empfehlungen zu intravesikaler Induktion einer IC wurde in dieser Studie mit einer LPS Konzentration von 5 mg/kg/KG gearbeitet. Vorrangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten bereits wichtige Rückschlüsse auf die zu wählende LPS-Konzentration zur Induktion der experimentellen Cystitis liefern.^{73,230}

Die intravesikale Instillation stellt eine gängige Methode der Induktion der experimentellen IC dar.^{97,189} Da auch die IC-Therapie beim Patienten intravesikale Wirkstoffinstillationen mit beispielsweise DMSO vorsieht, erscheint dies bei der Testsubstanz DIBI ebenfalls als realistisch.¹⁴¹ Bei der Verwendung eines Eisenchelators sollen so systemische Nebeneffekte der Eisenchelation vermieden werden und hohe Wirkstoffkonzentrationen am Ort der Inflammation erreicht werden.

In der Vergangenheit konnten Studien die antiinflammatorische Wirksamkeit von Eisenchelatoren belegen. So konnten Li & Frei zeigen, dass der Eisenchelator Deferoxamin antiinflammatorische Wirksamkeit hat und zu einer Inhibition von LPS-induziertem oxidativem Stress sowie Aktivierung von NF- κ B in einem murinen Modell führt.¹²³ Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Lin et al., die zeigen konnten, dass eine Therapie mit dem lipophilen Eisenchelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one eine LPS-induzierte Aktivierung von NF- κ B (und somit Produktion von IL-6 und TNF- α) in Leber-Makrophagen unterdrückt.¹²⁶

6.1.2 Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie (IVM) stellt ein Mikroskopieverfahren dar, bei der mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) vitale Strukturen wie Leukozyten gefärbt und anschließend beim lebenden Organismus dargestellt werden können. Im Allgemeinen findet die IVM nur bei wenigen Arbeitsgruppen Verwendung, da diese Methodik mit hohen Kosten verbunden ist.^{136,200} Sie bietet allerdings den Vorteil, mit Hilfe von Videosequenzen unterschiedliche Aktivierungsstadien vitaler Zellen beobachten und quantifizieren zu können. Darauf basierend kann eine Unterscheidung zwischen rollenden und bereits fest adhärierenden Leukozyten an dem Gefäßendothel getroffen werden und stellt so eine optimale Methode zur Evaluation der bearbeiteten Fragestellungen dar. Obwohl gut beschriebene Maus-Modelle, die mittels IVM

untersucht wurden, zur Verfügung stehen, liefert die aktuelle Datenlage nur bedingt Informationen zur Mikroskopie der murinen Blase.^{14,18,60}

Die IVM nach intravenöser Injektion der Fluorochrome in eine der beiden Schwanzvenen erfolgte zwei Stunden nach IC Induktion bzw. 90 Min. nach Therapiebeginn. Diese Zeitintervalle stellten unsere Standardwerte dar, die auf Erfahrungswerten vorangegangener Versuchsaufbauten eines LPS-induzierten Mausmodells unter Anwendung der IVM basierten.^{21,216} Ein Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen konnte ebenfalls ähnliche Zeitintervalle zwischen der LPS Gabe und Beginn der IVM zeigen.^{5,10} Kowalewska et al. konnten positive Studienergebnisse für Leukozyten-Endothel-Interaktionen bei einer LPS-Instillation der Blase mit anschließender Evaluierung mittels IVM bei Mäusen zeigen.¹¹⁴

6.1.3 Mediatoranalyse

Die Analyse proinflammatorischer Zytokine sowie von Adhäsionsmolekülen erfolgte mit Hilfe eines Multiplex-Assays der Firma Bio-Rad. Diese Methode stellt ein Standardverfahren in der Analyse von Zytokine dar.¹⁰⁹ Die Bestimmung der Analyten erfolgte aus Blutplasma, das im Anschluss an die IVM gewonnen und bis zur Durchführung des Assays bei -80 °C gelagert wurden.

Der verwendete 12-plex Bio-Plex Pro™ Immunoassay diente zur Messung unterschiedlicher inflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle, die eine bedeutende Rolle in Leukozyten-Endothel-Interaktionen spielten. Zu diesen zählten: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , P-Selectin und ICAM-1. Bei lediglich vier der genannten Analyten (IL-4, IL-6, P-Selectin und ICAM-1) konnten Werte oberhalb der Nachweisgrenze gemessen werden, sodass diese für eine Ergebnisauswertung herangezogen werden konnten. Diese Tatsache sei dem zeitlichen Versuchsablauf der Studie geschuldet, bei der etwa 2,5 Stunden nach LPS-Gabe die Probengewinnung stattfand. Kritisch sei zu erwähnen, dass die Cystitis-Stimulation mittels LPS für einen Zeitraum von lediglich 30 Minuten erfolgte, ehe dieses gegen DIBI oder eine Kochsalzlösung ausgetauscht wurde. Untersuchungen von Saban et al. zum zeitlichen Ablauf von Zytokin-Expression bei LPS-induzierter genitourealer Entzündungen konnten zeigen, dass die Expression bestimmter Zytokine erst nach einem bestimmten Zeitintervall auftrat.¹⁸⁹ Die Erkenntnisse der Arbeit von Saban et al. zeigten einen zeitabhängigen ein- bis zweipfligen Anstieg der Blasengenexpression bestimmter Zytokine. Die direkte LPS-Wirkung in einem Zeitraum von 30 Minuten bis vier Stunden sorgt hier für eine erste Erhöhung der Plasmaspiegel. Ein erneuter Anstieg ist, je nach Zytokin, erst nach 24 Stunden zu erwarten. Hier konnte in weiterer Folge von

Saban et al. beobachtet werden, dass die untersuchten Interleukine 1 β , 4, 6, 10 und 12 ihr Expressionsmaximum nach einer Stunde zeigen, im Anschluss jedoch wieder sinken. Sowohl IFN- γ , TNF- α als auch ICAM-1 zeigen ihren Expressionsgipfel nach vier Stunden, das Adhäsionsmolekül P-Selectin nach 30 Minuten sowie 24 Stunden nach LPS-Stimulation. So scheint es wenig verwunderlich, dass eine Vielzahl der hier getesteten Mediatoren 2,5 Stunden nach LPS-Stimulation ihr Expressionsmaximum bereits erreicht hatten bzw. dieses noch bevorstand. Trotz dieser Tatsache konnten die Interleukine 4 und 6 sowie P-Selectin und ICAM-1 die Nachweisgrenze erreichen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass inflammatorische Mediatoren in der Studie von Saban et al. in Clustern analysiert wurden und keine Analyse der einzelnen Sub-Zytokine vorgenommen wurde. Um präzisere Ergebnisse aller getesteten inflammatorischer Mediatoren zu erhalten, sollte in zukünftigen Studien eine zeitlich gestaffelte Bestimmung der einzelnen Analyten vorgenommen werden bzw. die Kontaktzeit des LPS oder deren Konzentration erhöht werden.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Leukozyten-Endothel-Interaktionen

Im Rahmen einer Entzündung kommt es zu einer primären, Zytokin-vermittelten Abwehrreaktion, die mit einer Aktivierung von Leukozyten einhergeht. Nach einer Annäherung aus der Blutstrommitte kommt es zunächst zu einer temporären Interaktion der Leukozyten mit dem Gefäßendothel, in weiterer Folge zu einer festen Adhäsion und schließlich zur Migration der Zellen aus den Gefäßen hin zur Entzündungsquelle.²³²

6.2.1.1 Feste Leukozyten-Adhärenz

Feste Leukozyten-Adhärenz beschreibt eine Integrin-vermittelte, feste Bindung der Leukozyten an das Gefäßendothel vor der Migration in das umliegende Gewebe. Eine erhöhte Zahl an adhärierenden Leukozyten deutet auf einer Inflammationsreaktion hin. Dieser Parameter stellte den primären Endpunkt der Studie dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Endotoxinen (LPS) zu einer signifikanten Zunahme an adhärenenten Leukozyten an das Gefäßendothel führt.^{41,114}

In der Kontrollgruppe ohne IC bzw. Therapie konnte eine Baseline-Leukozyten-Adhäsion von durchschnittlich 344 Zellen pro mm² gezählt werden. Dieser erhöhte Wert lässt sich mit einer leichten Inflammationsreaktion infolge von Gewebstrauma durch chirurgische Präparation und Manipulation der Blase begründen. Exogene Einschleppungen von

Verunreinigungen und Induktoren wurden durch Reinigung und Desinfektion der Instrumente zu jeder Zeit vermieden. Durch Verwendung unterschiedlicher Chargen konnte eine Infektion inklusive subklinischer Entzündung der Blase minimiert werden. Die Tiere aller Gruppe zeigen zudem vergleichbare Standardabweichungen von 134,8 bis 187,2 Zellen/mm². Vergleicht man die vorhandene Literatur, so zeigte eine Studie von Berger et al. ähnliche Werte für die Baseline-Leukozytenadhäsion nach LPS-induzierter IC mit IVM, sodass der gemessene Wert durchwegs plausibel erscheint.²¹ Im Gegensatz dazu, konnten Kowalewska et al. eine Basis-Adhäsion von 15 – 20 fest adhätierenden Zellen pro Sichtfenster, bei einer LPS Konzentration von 5 mg/kg/KG beschreiben.¹¹⁴ Dieser enorme Unterschied könnte, trotz Verwendung unterschiedlicher Chargen und Hygienemaßnahmen, auf das Vorliegen einer subklinischen Cystitis hinweisen. Kowalewska et al. therapierte alle Versuchstiere vor der Versuchsdurchführung (Applikation von LPS mittels Katheter) antibiotisch mit Enrofloxacin, um das Vorliegen von Blasenentzündungen vor Beginn der Studie auszuschließen. Eine antibiotische Vortherapie der Versuchstiere könnte bei zukünftigen Studien angedacht werden, um eine bessere Vergleichbarkeit mit der Literatur zu gewährleisten.

Nach der Induktion einer experimentellen IC mittels intravesikaler LPS-Instillation konnte ein signifikanter Anstieg von etwa 70 % der adhätierenden Leukozyten im Vergleich zu der Kontrollgruppe gezeigt werden. Dies lässt auf eine ausreichende Konzentration von LPS (5 mg/kg/KG) zur Induktion der IC schließen. Ein Literaturvergleich zeigt ähnliche Werte bei intraperitoneal-induzierter LPS-Cystitis.²¹

Es konnte gezeigt werden, dass, verglichen mit kranken Tieren ohne Therapie, eine intravesikale Therapie mit DIBI eine signifikante Reduktion der Anzahl der fest adhätierenden Leukozyten bewirken kann. Hier konnte eine Abnahme der Leukozyten-Zahl um etwa 50 % im Vergleich zu kranken Tieren ohne Therapie beobachtet werden. DIBI führt hier offensichtlich durch die Inhibition der extrazellulären Generierung von ROS zu einer Unterdrückung der Inflammationskaskaden und Reduktion der Expression von Zytokinen zur festen Zelladhäsion.¹¹³

Die Behandlungsgruppe (DIBI) konnte, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, keinen signifikanten Unterschied in der festen Leukozytenadhäsion aufzeigen. Bei einer intravesikalen Instillation von DIBI kann somit ein negativer Einfluss der Testsubstanz auf die Versuchstiere ausgeschlossen werden.

6.2.1.2 Temporär interagierende Leukozyten

Die temporäre Adhäsion von Leukozyten (Roller-Fluss) an das Gefäßendothel stellt den ersten Schritt der Kaskade der Leukozytenaktivierung dar. Hier kommt es zu einer Adhäsionsmolekül-vermittelten temporären Bindung der Zellen an Rezeptoren (Selectine), die, aufgrund des Blutflusses und der daraus resultierenden Scherkräfte, die Leukozyten in eine rollende Bewegung entlang der Gefäßwand versetzen.¹²² Dieser Parameter stellt einen sekundären Endpunkt der Studie dar.

Die Betrachtung der Ergebnisse des Roller-Flusses konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigen.

In der Kontrollgruppe konnte ein Basis-Roller-Fluss von etwa 96 Zellen/min beobachtet werden. Aktuelle Studien zeigen im Vergleich dazu ähnliche Werte von etwa 80 Zellen/min auf.¹¹⁴ Generell kann es unter physiologischen Bedingungen zu einem Basis-Roller-Fluss von bis zu 40 % der gesamten Leukozyten im Organismus kommen.¹³⁷ Dieser Basiswert kann als Bereitschaft zur raschen Aktivierung gewertet werden und unterstützt den in dieser Studie gemessenen Wert.

Im Gegensatz zur Arbeit von Kowalewska et al. konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied zwischen kranken Tieren der LPS-Gruppe und kranken Tieren nach DIBI-Therapie gezeigt werden. Ein nicht-signifikanter Trend einer erneuten Zunahme der rollenden Leukozyten von 54 Zellen/min auf 76 Zellen/min war zwar sichtbar, jedoch lassen diese Ergebnisse aufgrund der mangelnden Signifikanz wenig Rückschlüsse auf die therapeutische Wirkung von DIBI zu. Kritisch zu betrachten sei, dass in der oben genannten Studie die Evaluationen mittels IVM erst nach einem Zeitintervall von 4 Stunden, 4,5 Stunden und 5 Stunden nach einer Induktion von 5 mg/kg/KG bzw. 7 mg/kg/KG erfolgten.¹¹⁴ Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zur zeitabhängigen Expression von Zytokinen, die eine temporäre Leukozyten Interaktion mit dem Gefäßendothel induzieren. So tritt das Expressionsmaximum des Adhäsionsmoleküls P-Selectin nach 30 Minuten sowie 24 Stunden nach LPS-Applikation auf. Die Studienergebnisse von Saban et al. könnten die vorliegenden Ergebnisse erklären, da 2 Stunden nach LPS Instillation in diesem Modell wieder eine Abnahme des Zytokins zu einem geringeren Roller-Fluss führen. Eine zukünftige Wiederholung der durchgeführten Studie mit einem längeren Zeitintervall zwischen LPS-Induktion und IVM könnte hier zu anderen Ergebnissen in Bezug auf den Roller-Fluss führen.

Die niedrigen Werte des Roller-Fluss bei kranken Tieren lässt sich mit einer erhöhten Anzahl an bereits fest adhätierenden Leukozyten erklären. So kommt es in

fortgeschrittenen Stadien der Inflammation zu einer vermehrten festen Adhäsion, die zu einem Mangel an temporär interagierenden Leukozyten führt.

6.2.2 Funktionelle Kapillardichte (FCD)

Die Kapillarperfusion der Mikrozirkulation stellt einen wichtigen Parameter in der Beurteilung der Organvitalität dar. Die FCD beschreibt das Verhältnis der vitalen, perfundierten Kapillaren im Verhältnis zur betrachteten Fläche.

Die gewonnenen Daten im Zuge dieser Arbeit konnten keine statistisch signifikante Abnahme der FCD bei kranken Tieren ohne Therapie feststellen. Thorburn et al. konnten eine Reduktion der FCD bei einem murinen Sepsis Modell zwei Stunden nach der Induktion feststellen.²¹⁶ In der zuvor beschriebenen Studie von Thorburn et al. wurde das Endotoxin intravenös appliziert, welches, bei einer Konzentration von 5 mg/kg/KG, zu einer Störung der Mikrozirkulation in der Darm-Mukosa führte. Um vergleichbare Veränderungen an der Blase zeigen zu können, wäre eine Erhöhung der Endotoxin-Konzentration bei lokaler, intravesikaler Instillation eventuell von Vorteil.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen kranken Tieren ohne Therapie und erkrankten Tieren mit DIBI-Therapie festgestellt werden. Hier könnte eine Erhöhung der Gruppengröße bei Wiederholung dieses Studienmodells präzisere Ergebnisse liefern.

Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe (DIBI) beobachtet werden. Somit hat, im Vergleich zu gesunden Tieren, eine intravesikale Instillation von DIBI keinen negativen Effekt auf die Mikrozirkulation.

6.2.3 Mediatorenanalyse

Die Analyse dieser sekundären Studienendpunkte erfolgte mittels Bio-Plex Pro™ Immunoassay aus kardial gewonnenem Blutplasma. Lediglich vier Mediatoren konnten die Nachweisgrenze erreichen und wurden zur Auswertung herangezogen.

Die Verwendung des Eisenchelators DFO konnte durch Inhibition der NF-κB-Aktivierung zu einer Reduktion von LPS-induzierter ROS-Produktion führen.¹²³ Der hier verwendete Eisenchelator, DIBI, besitzt aufgrund seines hohen Molekulargewichts nicht die Möglichkeit Zellmembranen zu passieren, um intrazelluläre Eisenionen zu binden. Hier wird lediglich eine extrazelluläre Reduktion der eisenabhängigen ROS-Produktion durch DIBI erwartet, ohne direkten Einfluss auf die Inhibition einer NF-κB-Aktivierung zu haben. Dies birgt den Vorteil das Risiko eines zytotoxischen Potentials durch intrazelluläre Eisensequestration minimieren zu können.

Die folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse der vier nachgewiesenen inflammatorischen Mediatoren kritisch diskutieren.

6.2.3.1 Interleukin-4 (IL-4)

IL-4 beschreibt ein antiinflammatorisch wirksames Zytokin, welches unter physiologischen Bedingungen immunmodulatorische Eigenschaften besitzt. Hier kommt es zu einer reduzierten Produktion von T-Helferzellen-1 und Makrophagen sowie einer verstärkten Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu T-Helferzellen-2, die wiederum antiinflammatorisches Potenzial besitzen.¹⁶⁶ Zusätzlich stimuliert IL-4 die Proliferation von B- Lymphozyten und kann in weiterer Folge einen Klassenwechsel („class switch“) zu IgE und IgG begünstigen.⁸⁵

Die Ergebnisse dieser Studie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zeigen. In der Analyse unterschiedlicher Zytokine bei intravesikaler LPS-Applikation im murinen Modell konnten Saban et al. beobachten, dass das Expressionsmaximum von IL-4 nach einer Stunde erreicht ist und im Anschluss wieder sinkt.¹⁸⁹ Die Probenentnahme in der hier durchgeführten Studie erfolgte 2,5 Stunden nach der LPS-Induktion und wäre, in Konkordanz mit der oben genannten Studie, bereits in einer abfallenden Periode. Hier könnten in Zukunft, durch Anpassung des Versuchsablaufs durch sequentielle Abnahme von Blut zu verschiedenen Versuchszeitpunkten, andere Ergebnisse beobachtet werden.

Obwohl im Zuge dieser Studie keine signifikanten Unterschiede in der IL-4 Konzentration mit einem Anstieg nach DIBI Therapie beobachtet werden konnten, könnte eine Erweiterung der Gruppengröße eindeutigere Ergebnisse liefern.

Sugaya et al. konnte zeigen, dass Patienten mit IC gehäuft Polymorphismen des IL-4 Gens aufwiesen. Diese Beobachtungen wiesen auf eine erhöhte Prädisposition für die Entstehung der IC hin.²¹⁰

6.2.3.2 Interleukin-6 (IL-6)

Beim IL-6 handelt es sich um ein inflammatorisches Zytokin welches eine Schlüsselrolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen spielt. Das in der Leber und Niere gebildete Zytokin führt nach Aktivierung des Glykoproteins 130 durch die Rezeptoren IL-6R und sIL-6R zu einer vermehrten Expression von Akute-Phase-Proteinen und trägt zur Stimulation von Lymphozyten bei.^{79,100} Nach durchqueren der Blut-Hirn-Schranke kann IL-6 zu einer vermehrten Ausschüttung von Prostaglandin E₂ und zu einem Anstieg der Körpertemperatur führen.¹⁷

Keine der Gruppen konnte das Signifikanzniveau erreichen. Dies ist, wie bei IL-4 beschrieben, auf ein Expressionsmaximum des IL-6 von einer Stunde nach der Cystitis-Induktion zurückzuführen.¹⁸⁹ Auch hier könnte eine zeitliche Adaptation bei künftigen Studien zu eindeutigeren Ergebnissen führen.

Die mit DIBI behandelte Kontrollgruppe (DIBI) konnte keine Erhöhung der IL-6 Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe aufzeigen, sodass von keinem negativen Effekt der intravesikalen Instillation des Wirkstoffs auf das Versuchstier ausgegangen werden kann.

Studien konnten zeigen, dass Patienten, die an IC erkrankt sind, eine erhöhte IL-6 Konzentration aufwiesen.^{131,221} Aus diesem Grund ist es wenig verwunderlich, dass mehrere Forschungsgruppen IL-6 als laborchemischen Marker in der Diagnostik der IC heranziehen wollen.^{49,116} Aufgrund der besonderen Stellung des Zytokins IL-6 in der proinflammatorischen Mediation sollte, bei Wiederholung der Versuche, eine zeitlich angepasste Abnahme des Blutes sowie eine Erhöhung der Gruppengröße angedacht werden.

6.2.3.3 P-Selectin

Wie bereits im Kapitel 2.4.1.1 beschrieben, handelt es sich bei dem P-Selectin um ein Oberflächen-Adhäsionsmolekül, das maßgeblich bei der temporären Leukozytenadhäsion einer Immunreaktion beteiligt ist. Durch Bindung von Sialyl-Lewis^x an P-Selectin kommt es zur Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel bzw. Thrombozyten.¹³²

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Saban et al. konnten einen Maximalspiegel von P-Selectin nach 30 Minuten und erneut 24 Stunden nach intravesikaler LPS-Applikation messen.¹⁸⁹ Auch in der hier durchgeführten Arbeit kann es, aufgrund der Blutabnahme 2,5 Stunden nach LPS-Instillation, zu weniger aussagekräftigen Ergebnissen kommen. Das zusätzliche Ausbleiben signifikanter Unterschiede beim P-Selectin-vermittelten Roller-Fluss unterstützt die These einer zeitlich inadäquaten Probengewinnung.

Green et al. konnten zeigen, dass Patienten, die an IC erkrankt sind eine erhöhte Expression von P-Selectin im Vergleich zu gesunden Probanden aufweisen.⁶⁹ Ähnliche Beobachtungen wären bei einer zeitlich alterierten Blutabnahme sowie Vergrößerung der Gruppengröße bei Replikation dieser Studie möglich.

6.2.3.4 ICAM-1

Das Intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) stellt eines von zwei wichtigen endothelialen Adhäsionsmolekülen in der festen Leukozyten-Adhäsion dar. Die Bindung von ICAM-1 an die Integrine LFA-1 sowie Mac-1 stellt den zweiten Schritt nach der temporären Adhärenz dar, bevor die Leukozyten in das Gewebe zur Entzündungsquelle migrieren können.^{120,186} Es konnte in der Literatur eine vermehrte Expression von ICAM-1 bei Entzündungsreaktionen beobachtet werden.²³⁷ Des Weiteren zeigten Studien eine signifikant höhere Bildung von ICAM-1 bei IC-Patienten im Vergleich zu Gesunden.⁶⁹

In der hier durchgeführten Studie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden. Da ICAM-1 ein Expressionsmaximum erst vier Stunden nach LPS-Instillation aufweist, könnte die fehlende Signifikanz durch die noch bevorstehende maximale Expression von ICAM-1 erklärt werden.¹⁸⁹ Im Kontrast dazu, konnte ein signifikanter Unterschied in der festen, ICAM-1 vermittelten, Leukozyten-Adhärenz gezeigt werden. Obwohl in der Expression von ICAM-1 keine eindeutigen Aussagen zu biochemischen Markern getroffen werden konnten, zeigte die IVM signifikante Unterschiede in der festen Adhäsion von Leukozyten in der Blasenwand. Diese kontroversen Ergebnisse lassen sich einerseits auf eine zu geringe Gruppengröße der Mediatoranalysen zurückführen, andererseits könnte eine adaptierte Plasmagewinnung vier Stunden nach Endotoxin-Applikation zu eindeutigeren Ergebnissen führen.

6.3 Limitationen und Ausblick

In diesem Kapitel werden die Limitationen und Kritikpunkte dieser Studie betrachtet. Die gefundenen Ergebnisse sollen Rückschlüsse auf das therapeutische Potenzial des Eisenchelators DIBI bei experimenteller, Endotoxin-induzierter IC geben.

In der pharmakologischen *in vivo*-Forschung stellt die Verwendung von Versuchstieren eine wichtige Komponente in der Evaluation von Pharmakokinetik und -dynamik dar. In dieser Studie konnten, unter reproduzierbaren Versuchsbedingungen, wichtige Hinweise auf die Wirkung von DIBI im gesamten Organismus beobachtet werden. Ein Mausmodell kann allerdings, durch unterschiedliche Physiologie und spezies-spezifischer metabolischer Prozesse, nur bedingt Rückschlüsse auf den menschlichen Organismus geben.

Das Fehlen einer konkreten Pathogenese der IC gestaltet die Wahl eines passenden Tiermodells schwierig. Im Literaturvergleich erwies sich, neben einer Vielzahl an Induktionsvarianten, die intravesikale Endotoxin-Instillation als etabliertestes Tiermodell in der IC-Forschung. Hier kommt es zu einer abakteriellen Entzündungsstimulation der Blase, ohne eine Auswirkung auf den Gesamtorganismus zu haben. Aufgrund eines gänzlich unbekanntem Pathomechanismus bei der Entstehung der IC kann auch, aufgrund der kurzen Dauer der experimentellen Cystitis mit darauffolgender kurzzeitiger Behandlung, nur limitiert eine Aussage über die gewonnenen Ergebnisse getroffen werden. Das Zusammenspiel von prädisponierenden Faktoren sowie bestimmte langjährige Ernährung- und Lebensweisen der Patienten, zeigen weiters die Grenzen des verwendeten Tiermodells auf.

In Konkordanz mit den von Saban et al. gewonnenen Daten¹⁸⁹ sollte in zukünftigen Studien eine sequenzielle Abnahme von Blut zur Mediatoranalyse erfolgen. Bei der Analyse von 12 inflammatorischen Mediatoren konnten lediglich vier die Nachweisgrenze erreichen. Dies könnte auf eine zu geringe Auswirkung des Wirkstoffs auf die systemische Mediatorexpression zurückzuführen sein. Da keines der analysierten inflammatorischen Mediatoren signifikante Unterschiede aufwies, sollte hier in weiterer Folge eine Analyse von DIBI in Bezug auf die Penetration der Blasenwand bis hin zur systemischen Verstärkung bzw. Unterdrückung von Zytokinen sowie Adhäsionsmolekülen evaluiert werden. Aus Gründen des Tierschutzes musste auf einen zeitlich begrenzten Versuchsablauf von 2,5 Stunden zurückgegriffen werden. Längere Prozedere und Therapieregime könnten hier deutlichere Ergebnisse für die Mediatorexpression aufzeigen.

Die Versuchsdurchführung sowie Auswertung der Daten wurden vom Autor selbst vorgenommen, womit ein Bias nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. In zukünftigen Studien sollten die Versuchsdurchführung sowie Datenanalyse von mehreren Personen (verblindet) durchgeführt werden.

Zur Überprüfung der beobachteten Ergebnisse sollte in zukünftige Studien eine histologische Aufarbeitung der murinen Blasen erfolgen. Des Weiteren können Urinalysen zu Eisengehalt und potenziellen Markern vor und nach der DIBI-Therapie wichtige Erkenntnisse über Eisen-abhängige Prozesse geben. Ein Vergleich zu anderen Eisenchelatoren unterschiedlicher Molekulargröße, sowie unterschiedliche Dosierungen können Hinweise über die potenzielle Wirkung von DIBI bei der IC-Therapie sowie Rückschlüsse auf die Pharmakokinetik liefern. Bei der hier durchgeführten Studie wurde mit einer DIBI Konzentration von 80 mg/kg/KG gearbeitet. Im Vergleich zu Studien der

Sepsis-Forschung, bei denen ähnliche Dosierungen zum Einsatz kamen, könnten weiterführende Studien zu unterschiedlichen Behandlungsintervallen und Dosierungen weitere Erkenntnisse dieses neuartigen Wirkstoffs aufzeigen.

7 Schlussfolgerungen

Eine intravesikale Instillation von DIBI, einem neuartigen Eisenchelator, führt, bei einer Testdosis von 80 mg/kg/KG, zu einer Abnahme der Anzahl fest adhärerender Leukozyten an das Gefäßendothel in einem experimentellen Mausmodell mit Endotoxin-induzierter Cystitis. Dieser Effekt steht im wahrscheinlichen Zusammenhang mit der Bindung von extrazellulärem Eisen, welches zur Generierung von ROS und oxidativem Stress im Rahmen der LPS-induzierten Entzündungsreaktion entzogen wird. Diese Beobachtungen lassen auf einen antiinflammatorischen Effekt der Testsubstanz schließen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede auf temporär adhärerende Leukozyten (Roller-Fluss) sowie auf die funktionelle Kapillardichte (FCD) der Blasenwand beobachtet werden. Ebenso konnte keine Wirkung von DIBI in Bezug auf die Plasmaspiegel von IL-4, IL-6, P-Selectin und ICAM-1 festgestellt werden. Die hier gewonnenen Ergebnisse können erste wichtige Hinweise auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von DIBI geben, allerdings bedarf es weiterführender Studien mit abgeändertem Studiendesign zur weiteren Evaluation dieses Wirkstoffes.

8 Zusammenfassung

8.1 Deutsche Zusammenfassung

HINTERGRUND: Die Interstitielle Cystitis (IC) beschreibt eine chronische Entzündung der Blase, für die, aufgrund des ungeklärten Pathomechanismus, aktuell keine kausalen Therapieoptionen bestehen. Das Spurenelement Eisen stellt einen wichtigen Faktor in der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) dar. In den Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen dient Eisen als Oxidations- bzw. Reduktionsmittel für die Bildung von potentiell schädlichen Radikalen, die bei pathologischen Konzentrationen zu oxidativem Stress und damit Entzündungsreaktionen führen. Dieser Effekt kann durch Bindung von freiem Eisen durch Eisenchelatoren potenziell vermindert werden.

ZIELE: Das Ziel dieser Studie war die Evaluation der Auswirkung von DIBI, einem neuartigen Eisenchelator, auf Leukozytenadhäsion, funktionelle Kapillardichte und Expression inflammatorischer Mediatoren in einem murinen Modell der IC.

METHODEN: Es wurden 20 weibliche BALB/c-Mäuse in vier Gruppen (n = 5 / Gruppe) randomisiert: Kontrollgruppe, IC-Gruppe (IC induziert durch intravesikale Endotoxingabe) ohne Therapie, IC-Gruppe + DIBI-Therapie und Kontrollgruppe + DIBI-Gabe. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie (IVM) wurden die Versuchsgruppen auf Leukozyten-Endothel-Interaktionen (fest adhärente und temporär interagierende Leukozyten) sowie die funktionelle Kapillardichte (FCD) untersucht. Anschließend erfolgte die Messung von inflammatorischen Mediatoren im Plasma mittels 12-plex Bio-Plex Pro™ Immunoassay.

ERGEBNISSE: Die experimentelle intravesikale IC-Therapie mit DIBI zeigte für den primären Parameter der Leukozyten-Adhärenz eine signifikante Abnahme der Anzahl fest adhärrierender Leukozyten im Vergleich zu kranken Tieren ohne Therapie. Die DIBI-Therapie erreichte bei den anderen Parametern das Signifikanzniveau nicht.

SCHLUSSFOLGERUNG: Eine intravesikale Therapie der IC mittels DIBI führt zu einer Abnahme der Anzahl fest adhärrierender Leukozyten an das Gefäßendothel im Vergleich zu unbehandelten Tieren mit IC. Dies deutet auf einen potentiellen antiinflammatorischen Effekt einer Eisenchelatortherapie hin.

8.2 Abstract

BACKGROUND: Interstitial cystitis (IC) describes a chronic inflammatory condition of the urinary bladder. Due to the unexplained pathomechanism, there are currently no causal therapy options. Iron is an important factor in the formation of reactive oxygen species (ROS). In the Fenton and Haber-Weiss reactions, iron serves as an oxidizing or reducing agent in the generation of potentially harmful radicals which, at pathological concentrations, lead to oxidative stress and thus cause inflammatory reactions. This effect can be potentially reduced by the sequestration of free plasma-iron by iron chelators.

OBJECTIVE: The objective of this study was to evaluate the effect of DIBI, a novel iron chelator, on leukocyte adhesion, functional capillary density and cytokine expression in a murine model of IC.

METHODS: Female BALB/c mice were randomized into four groups (n = 5 / group): control group, IC group (IC induced by intravesical endotoxin administration) without therapy, IC group + DIBI therapy and control group + DIBI therapy. The groups were examined using intravital microscopy (IVM) for leukocyte-endothelial interactions (adherent leukocytes, temporarily interacting leukocytes) and functional capillary density (FCD). Subsequently, inflammatory mediators were measured in plasma using a 12-plex Bio-Plex Pro™ immunoassay.

RESULTS: Intravesical therapy of mice with endotoxin-induced IC with DIBI showed a significant decrease in the number of firmly adherent leukocytes compared to IC animals without treatment ($p = < 0.0001$). Changes in secondary parameters due to DIBI treatment did not reach statistical significance.

CONCLUSIONS: Intravesical therapy of IC using DIBI leads to a decrease in the number of firmly adherent leukocytes to vascular endothelium compared to IC animals without therapy. This indicates potential anti-inflammatory effects of iron chelator treatment for IC.

9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
APF	Antiproliferativer Faktor
BMP 6	Bone-morphogenic Protein 6
BPS	Bladder Pain Syndrome
BTXa	Botulinumtoxin A
bzw.	beziehungsweise
CA	Kalifornien
CCAC	Canadian Council of Animal Care
CD	Cluster of Differentiation
Cl	Chlorid-Ion
CON	Kontrollgruppe
CUA	Canadian Urological Association
DFO	Deferrioxamin
DFP	Deferipron
DFX	Deferasirox
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DMT 1	Divalenter Metallionen Transporter 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESSIC	European Society for the Study of Interstitial Cystitis
et al.	et alii/ae
FCD	Funktionelle Kapillardichte
FDA	U.S. Food and Drug Administration
Fe	Eisenion
FITC	Fluorescein Isothiocyanat Albumin
FPN	Ferroportin
G	Gauge
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan

GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
H1-Rezeptor	Histamin-1-Rezeptor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	Heparin-bindender Epidermaler Wachstumsfaktor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HOCl	Hypochlorige Säure
HPO	Hydroxypyridinon
IC	Interstitielle Cystitis
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Inc.	Incorporation
IRP	Iron Regulatory Protein
IU	International Unit
IVM	Intravitalmikroskopie
JAK	Janus-Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
M.	Musculus
MA	Massachusetts
Mac-1	Macrophage-1-Antigen
mg	Milligramm
Min.	Minuten
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MPO	Myeloperoxidase
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid

NF-κB	Nukleärer Faktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
NS	Nova Scotia
NTBI	Non-Transferrin-bound Iron
O ₂	Sauerstoff
OH	Ohio
OH-Radikal	Hydroxyl-Radikal
ON	Ontario
OR	Odds Ratio
p	Signifikanzwert
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1
pg	Pikogramm
PPS	Pentosanpolysulfat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
QC	Quebec
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
rpm	Rotationen pro Minute
s	Sekunde
SEM	Standardfehler
SOD	Superoxiddismutase
spp.	Species pluralis
SUFU	Society for Urodynamics and Female Urology
Syn.	Synonym
TFR 1	Transferrinrezeptor 1
THP	Tamm-Horsfall-Protein
TLR	Toll-like Rezeptor
Tumornekrosefaktor-α	TNF-α
UCLA	University Committee of Laboratory Animals
USA	United States of America
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLA-4	Very Late Antigen 4
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

10 Literaturverzeichnis

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, et al. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: Report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology*. 2003;61(1):37-49. doi:10.1016/S0090-4295(02)02243-4.
2. Aihara K, Hirayama A, Tanaka N, Fujimoto K, Yoshida K, Hirao Y. Hydrodistension under local anesthesia for patients with suspected painful bladder syndrome/interstitial cystitis: Safety, diagnostic potential and therapeutic efficacy. *Int J Urol*. 2009;16(12):947-952. doi:10.1111/j.1442-2042.2009.02396.x.
3. Akiyama Y, Nomiya A, Niimi A, et al. Botulinum toxin type A injection for refractory interstitial cystitis: A randomized comparative study and predictors of treatment response. *Int J Urol*. 2015;22(9):835-841. doi:10.1111/iju.12833.
4. Al-Zahrani AA, Gajewski JB. Long-term efficacy and tolerability of pentosan polysulphate sodium in the treatment of bladder pain syndrome. *J Can Urol Assoc*. 2011;5(2):113-118. doi:10.5489/cuaj.10095.
5. Allcock GH, Allegra M, Flower RJ, Perretti M. Neutrophil accumulation induced by bacterial lipopolysaccharide: Effects of dexamethasone and annexin 1. *Clin Exp Immunol*. 2001;123(1):62-67. doi:10.1046/j.1365-2249.2001.01370.x.
6. Allègre C, Manhès G, Lewin É. Chemical composition of the Earth and the volatility control on planetary genetics. *Earth Planet Sci Lett*. 2001;185(1-2):49-69. doi:10.1016/S0012-821X(00)00359-9.
7. Andersen AV, Granlund P, Schultz A, Talseth T, Hedlund H, Frich L. Long-term experience with surgical treatment of selected patients with bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Scand J Urol Nephrol*. 2012;46(4):284-289. doi:10.3109/00365599.2012.669789.
8. Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2012;1823(9):1468-1483. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.010.
9. Anderson SA, Nizzi CP, Chang YI, et al. The IRP1-HIF-2 α axis coordinates iron and oxygen sensing with erythropoiesis and iron absorption. *Cell Metab*. 2013;17(2):282-290. doi:10.1016/j.cmet.2013.01.007.

10. Andonegui G, Bonder CS, Green F, et al. Endothelium-derived toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest*. 2003;111(7):1011-1020. doi:10.1172/JCI16510.
11. Ang MTC, Gumbau-Brisa R, Allan DS, et al. DIBI, a 3-hydroxypyridin-4-one chelator iron-binding polymer with enhanced antimicrobial activity. *Medchemcomm*. 2018;9(7):1206-1212. doi:10.1039/c8md00192h.
12. Arlandis S, Franco A, Mora AM, Rebollo P. Validation of the Spanish version of the Bladder Pain/Interstitial Cystitis-Symptom Score (BPIC-SS) questionnaire. A useful tool for the diagnosis of bladder pain syndrome. *Actas Urológicas Españolas (English Ed)*. 2018;42(7):457-464. doi:10.1016/j.acuroe.2018.06.003.
13. Arora N, Caldwell A, Wafa K, et al. DIBI, a polymeric hydroxypyridinone iron chelator, reduces ocular inflammation in local and systemic endotoxin-induced uveitis. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;69(1-2):153-164. doi:10.3233/CH-189109.
14. Atherton A, Born GVR. Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls. *J Physiol*. 1972;222(2):447-474. doi:10.1113/jphysiol.1972.sp009808.
15. Bade JJ. A placebo-controlled study of intravesical pentosanpolysulphate for the treatment of interstitial cystitis. *Br J Urol*. 1997;79(2):168-171. doi:10.1046/j.1464-410X.1997.03384.x.
16. Bae W-J, Ha U-S, Kim S, et al. Reduction of oxidative stress may play a role in the anti-inflammatory effect of the novel herbal formulation in a rat model of hydrochloric acid-induced cystitis. *Neurol Urodyn*. 2013;34(1):86-91. doi:10.1002/nau.22507.
17. 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.
18. Barker JH, Hammersen F, Galla TJ, et al. Direct monitoring of capillary perfusion following normovolemic hemodilution in an experimental skin-flap model. *Plast Reconstr Surg*. 1990;86(5):946-954. doi:10.1097/00006534-199011000-00018.
19. Beaumier DL, Caldwell MA, Holbein BE. Inflammation triggers hypoferrremia and de novo synthesis of serum transferrin and ceruloplasmin in mice. *Infect Immun*.

- 1984;46(2):489-494. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6437985>. Accessed December 7, 2018.
20. Belknap S, Blalock E, Erickson D. The Challenges of Interstitial Cystitis: Current Status and Future Prospects. *Drugs*. 2015;75(18):2057-2063. doi:10.1007/s40265-015-0504-9.
 21. Berger G, Arora N, Burkovskiy I, Xia Y, Chinnadurai A, Lehmann C. Experimental Cannabinoid 2 Receptor Activation by Phyto-Derived and Synthetic Cannabinoid Ligands in LPS-Induced Interstitial Cystitis in Mice. *Molecules*. 2019;24(23):4239. doi:10.3390/molecules24234239.
 22. Berry SH, Elliott MN, Suttorp M, et al. Prevalence of symptoms of bladder pain syndrome/interstitial cystitis among adult females in the united states. *J Urol*. 2011;186(2):540-544. doi:10.1016/j.juro.2011.03.132.
 23. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science (80-)*. 1989;243(4895):1160-1165. doi:10.1126/science.2466335.
 24. Bogart LM, Berry SH, Clemens JQ. Symptoms of Interstitial Cystitis, Painful Bladder Syndrome and Similar Diseases in Women: A Systematic Review. *J Urol*. 2007;177(2):450-456. doi:10.1016/j.juro.2006.09.032.
 25. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*. 2010;45(7-8):466-472. doi:10.1016/j.exger.2010.01.003.
 26. Bschleipfer T, Doggweiler R, Schultz-Lampel D, et al. Diagnosis and treatment of interstitial cystitis (IC/PBS): S2k guideline of the German Society of Urology. *Urologe*. 2019;58(11):1313-1323. doi:10.1007/s00120-019-01054-2.
 27. Canavesi E, Alfieri C, Pelusi S, Valenti L. Heparin and HFE protein: Iron metabolism as a target for the anemia of chronic kidney disease. *World J Nephrol*. 2012;1(6):166-176. doi:10.5527/wjn.v1.i6.166.
 28. Cappellini MD, Comin-Colet J, de Francisco A, et al. Iron deficiency across chronic inflammatory conditions: International expert opinion on definition, diagnosis, and management. *Am J Hematol*. 2017;92(10):1068-1078. doi:10.1002/ajh.24820.
 29. Cervigni M, Natale F, Nasta L, Padoa A, Voi RL, Porru D. A combined intravesical

- therapy with hyaluronic acid and chondroitin for refractory painful bladder syndrome/interstitial cystitis. *Int Urogynecol J*. 2008;19(7):943-947. doi:10.1007/s00192-008-0572-4.
30. Cervigni M, Sommariva M, Tenaglia R, et al. A randomized, open-label, multicenter study of the efficacy and safety of intravesical hyaluronic acid and chondroitin sulfate versus dimethyl sulfoxide in women with bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Neurourol Urodyn*. 2017;36(4):1178-1186. doi:10.1002/nau.23091.
 31. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of Oxidants in NF- B Activation and TNF- Gene Transcription Induced by Hypoxia and Endotoxin. *J Immunol*. 2000;165(2):1013-1021. doi:10.4049/jimmunol.165.2.1013.
 32. Clemens JQ, Meenan RT, O’Keeffe Rosetti MC, Gao SY, Calhoun EA. Prevalence and incidence of interstitial cystitis in a managed care population. *J Urol*. 2005;173(1):98-102. doi:10.1097/01.ju.0000146114.53828.82.
 33. Clemens JQ, Meenan RT, O’Keeffe Rosetti MC, Kimes TA, Calhoun EA. Case-Control Study of Medical Comorbidities in Women With Interstitial Cystitis. *J Urol*. 2008;179(6):2222-2225. doi:10.1016/j.juro.2008.01.172.
 34. Coates TD, Wood JC. How we manage iron overload in sickle cell patients. *Br J Haematol*. 2017;177(5):703-716. doi:10.1111/bjh.14575.
 35. Cohen AR, Galanello R, Piga A, De Sanctis V, Tricta F. Safety and effectiveness of long-term therapy with the oral iron chelator deferiprone. *Blood*. 2003;102(5):1583-1587. doi:10.1182/blood-2002-10-3280.
 36. 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.
 37. 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.
 38. Curtis Nickel J, Tripp DA, Pontari M, et al. Childhood sexual trauma in women with interstitial cystitis/bladder pain syndrome: A case control study. *J Can Urol Assoc*. 2011;5(6):410-415. doi:10.5489/cuaj.11110.

39. Dailey HA, Dailey TA, Gerdes S, et al. Prokaryotic Heme Biosynthesis: Multiple Pathways to a Common Essential Product. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;81(1):e00048-16. doi:10.1128/MMBR.00048-16.
40. Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodial Int.* 2017;21:S6-S20. doi:10.1111/hdi.12542.
41. Doherty DE, Zagarella L, Henson PM, Worthen GS. Lipopolysaccharide stimulates monocyte adherence by effects on both the monocyte and the endothelial cell. *J Immunol.* 1989;143(11):3673-3679. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2511247>. Accessed March 1, 2020.
42. Domingue GJ, Ghoniem GM, Bost KL, Fermin C, Human LG. Dormant Microbes in Interstitial Cystitis. *J Urol.* 1995;153(4):1321-1326. doi:10.1016/S0022-5347(01)67594-3.
43. Drakesmith H, Nemeth E, Ganz T. Ironing out Ferroportin. *Cell Metab.* 2015;22(5):777-787. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.006.
44. Ek A, Engberg A, Frödin L, Jönsson G. The use of dimethyl-sulfoxide (DMSO) in the treatment of interstitial cystitis. *Scand J Urol Nephrol.* 1978;12(2):129-131. doi:10.3109/00365597809179979.
45. Ellermann M, Arthur JC. Siderophore-mediated iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions. *Free Radic Biol Med.* 2017;105:68-78. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.489.
46. Ener K, Keske M, Aldemir M, et al. Evaluation of oxidative stress status and antioxidant capacity in patients with painful bladder syndrome/interstitial cystitis: preliminary results of a randomised study. *Int Urol Nephrol.* 2015;47(8):1297-1302. doi:10.1007/s11255-015-1021-1.
47. Engelhardt PF, Morakis N, Daha LK, Esterbauer B, Riedl CR. Long-term results of intravesical hyaluronan therapy in bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Int Urogynecol J.* 2011;22(4):401-405. doi:10.1007/s00192-010-1294-y.
48. Erickson DR, Kunselman AR, Bentley CM, et al. Changes in Urine Markers and Symptoms After Bladder Distention for Interstitial Cystitis. *J Urol.* 2007;177(2):556-560. doi:10.1016/j.juro.2006.09.029.
49. Erickson DR, Xie SX, Bhavanandan VP, et al. A comparison of multiple urine

- markers for interstitial cystitis. *J Urol.* 2002;167(6):2461-2469. doi:10.1016/S0022-5347(05)65005-7.
50. Evstatiev R, Gasche C. Iron sensing and signalling. *Gut.* 2012;61(6):933-952. doi:10.1136/gut.2010.214312.
51. Fall M, Oberpenning F, Peeker R. Treatment of Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis 2008: Can We Make Evidence-Based Decisions? *Eur Urol.* 2008;54(1):65-78. doi:10.1016/j.eururo.2008.03.086.
52. Ferrari CKB, Souto PCS, França EL, Honorio-França AC. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: From effective defense to immunity evasion mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2011;59(6):441-448. doi:10.1007/s00005-011-0144-z.
53. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 2011;194(1):7-15. doi:10.1083/jcb.201102095.
54. FitzGerald MP, Koch D, Senka J. Visceral and cutaneous sensory testing in patients with painful bladder syndrome. *NeuroUrol Urodyn.* 2005;24(7):627-632. doi:10.1002/nau.20178.
55. Fitzgerald MP, Payne CK, Lukacz ES, et al. Randomized multicenter clinical trial of myofascial physical therapy in women with interstitial cystitis/painful bladder syndrome and pelvic floor tenderness. *J Urol.* 2012;187(6):2113-2118. doi:10.1016/j.juro.2012.01.123.
56. Forrest JB, Payne CK, Erickson DR. Cyclosporine A for refractory interstitial cystitis/bladder pain syndrome: Experience of 3 tertiary centers. *J Urol.* 2012;188(4):1186-1191. doi:10.1016/j.juro.2012.06.023.
57. 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.
58. Fowler JE. Prospective study of intravesical dimethyl sulfoxide in treatment of suspected early interstitial cystitis. *Urology.* 1981;18(1):21-26. doi:10.1016/0090-4295(81)90489-1.
59. Fowler JE, Lynes WL, Lau JLT, Ghosh L, Mounzer A. Interstitial cystitis is associated with intraurothelial Tamm-Horsfall protein. *J Urol.* 1988;140(6):1385-

1389. doi:10.1016/S0022-5347(17)42051-9.
60. Fox-Robichaud A, Kubes P. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor α -stimulated leukocyte recruitment into the murine hepatic circulation. *Hepatology*. 2000;31(5):1123-1127. doi:10.1053/he.2000.6961.
 61. Friedlander JI, Shorter B, Moldwin RM. Diet and its role in interstitial cystitis/bladder pain syndrome (IC/BPS) and comorbid conditions. *BJU Int*. 2012;109(11):1584-1591. doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10860.x.
 62. Fujita M, Kasai E, Omachi S, Sakaguchi G, Shinohara S. A novel method for assessing bladder-related pain reveals the involvement of nerve growth factor in pain associated with cyclophosphamide-induced chronic cystitis in mice. *Eur J Pain (United Kingdom)*. 2016;20(1):79-91. doi:10.1002/ejp.693.
 63. Galanello R, Origa R. Once-daily oral deferasirox for the treatment of transfusional iron overload. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2008;1(2):231-240. doi:10.1586/17512433.1.2.231.
 64. Ganz T. Heparin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003;102(3):783-788. doi:10.1182/blood-2003-03-0672.
 65. Ganz T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol Rev*. 2013;93(4):1721-1741. doi:10.1152/physrev.00008.2013.
 66. Ganz T, Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(8):500-510. doi:10.1038/nri3863.
 67. Ganz T, Nemeth E. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol*. 2009;46(4):387-393. doi:https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2009.06.001.
 68. Graham E, Chai TC. Dysfunction of bladder urothelium and bladder urothelial cells in interstitial cystitis. *Curr Urol Rep*. 2006;7(6):440-446. doi:10.1007/s11934-006-0051-8.
 69. 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.
 70. Greenshields AL, Power Coombs MR, Fernando W, Holbein BE, Hoskin DW. DIBI, a novel 3-hydroxypyridin-4-one chelator iron-binding polymer, inhibits breast

- cancer cell growth and functions as a chemosensitizer by promoting S-phase DNA damage. *BioMetals*. 2019;32(6):909-921. doi:10.1007/s10534-019-00222-3.
71. Grek CL, Tew KD. Redox metabolism and malignancy. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(4):362-368. doi:10.1016/j.coph.2010.05.003.
 72. Grover S, Srivastava A, Lee R, Tewari AK, Te AE. Role of inflammation in bladder function and interstitial cystitis. *Ther Adv Urol*. 2011;3(1):19-33. doi:10.1177/1756287211398255.
 73. Hagn G. Auswirkungen von DIBI, einem neuartigen Eisenchelator, auf Schmerzempfinden und Krankheitsverhalten in einem murinen Modell der interstitiellen Zystitis. *Diplomarbeit*. 2019.
 74. Han E, Nguyen L, Sirls 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.
 75. Hanno P, Dmochowski R. Status of international consensus on interstitial cystitis/bladder pain syndrome/painful bladder syndrome: 2008 snapshot. *Neurourol Urodyn*. 2009;28(4):274-286. doi:10.1002/nau.20687.
 76. Hanno P, Lin A, Nordling J, et al. Bladder pain syndrome international consultation on incontinence. *Neurourol Urodyn*. 2010;29(1):191-198. doi:10.1002/nau.20847.
 77. Hanno PM, Burks DA, Clemens JQ, et al. Infection / Inflammation AUA Guideline for the Diagnosis and Treatment of Interstitial Cystitis / Bladder Pain Syndrome. *J Urol*. 2011;185(6):2162-2170. doi:10.1016/j.juro.2011.03.064.
 78. Hauser PJ, Vangordon SB, Seavey J, et al. Abnormalities in Expression of Structural, Barrier and Differentiation Related Proteins, and Chondroitin Sulfate in Feline and Human Interstitial Cystitis. *J Urol*. 2015;194(2):571-577. doi:10.1016/j.juro.2015.01.090.
 79. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374(1):1-20. doi:10.1042/BJ20030407.
 80. Henry RA, Patterson L, Nickel C, Morales A. Alkalinized intravesical lidocaine to treat interstitial cystitis: absorption kinetics in normal and interstitial cystitis bladders. *Urology*. 2001;57(6 Suppl 1):119. doi:10.1016/s0090-4295(01)01069-x.

81. Hider RC. Charge States of Deferasirox-Ferric Iron Complexes. *Am J Kidney Dis.* 2010;55(3):614-615. doi:10.1053/j.ajkd.2009.10.065.
82. Hillelsohn JH, Rais-Bahrami S, Friedlander JI, et al. Fulguration for hunner ulcers: Long-term clinical outcomes. *J Urol.* 2012;188(6):2238-2241. doi:10.1016/j.juro.2012.08.013.
83. Hofmeister MA, He F, Ratliff TL, Mahoney T, Becich MJ. Mast cells and nerve fibers in interstitial cystitis (IC): An algorithm for histologic diagnosis via quantitative image analysis and morphometry (QIAM). *Urology.* 1997;49(5 SUPPL.):41-47. doi:10.1016/S0090-4295(99)80330-6.
84. Holden VI, Breen P, Houle S, Dozois CM, Bachman MA. Klebsiella pneumoniae siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1 α stabilization during pneumonia. *MBio.* 2016;7(5). doi:10.1128/mBio.01397-16.
85. Holter W, Majdic O, Kalthoff FS, Knapp W. Regulation of interleukin-4 production in human mononuclear cells. *Eur J Immunol.* 1992;22(10):2765-2767. doi:10.1002/eji.1830221047.
86. Hosseini A, Ehrén I, Wiklund NP. Nitric oxide as an objective marker for evaluation of treatment response in patients with classic interstitial cystitis. *J Urol.* 2004;172(6 I):2261-2265. doi:10.1097/01.ju.0000144761.69398.be.
87. Hoyer JR, Seiler MW. Pathophysiology of Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int.* 1979;16(3):279-289. doi:10.1038/ki.1979.130.
88. Hu VY, Zvara P, Dattilio A, et al. Decrease in bladder overactivity with REN1820 in rats with cyclophosphamide induced cystitis. In: *Journal of Urology.* Vol 173. ; 2005:1016-1021. doi:10.1097/01.ju.0000155170.15023.e5.
89. Hung MJ, Chen YT, Shen PS, Hsu ST, Chen G Den, Ho ESC. Risk factors that affect the treatment of interstitial cystitis using intravesical therapy with a dimethyl sulfoxide cocktail. *Int Urogynecol J.* 2012;23(11):1533-1539. doi:10.1007/s00192-012-1699-x.
90. Hwang P, Auclair B, Beechinor D, Diment M, Einarson TR. Efficacy of pentosan polysulfate in the treatment of interstitial cystitis: A meta-analysis. *Urology.* 1997;50(1):39-43. doi:10.1016/S0090-4295(97)00110-6.
91. Iborra M, Moret I, Rausell F, et al. Different Genetic Expression Profiles of

- Oxidative Stress and Apoptosis-Related Genes in Crohn's Disease. *Digestion*. doi:10.1159/000493726.
92. Ishizaka N, Saito K, Mori I, Matsuzaki G, Ohno M, Nagai R. Iron chelation suppresses ferritin upregulation and attenuates vascular dysfunction in the aorta of angiotensin II-infused rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(11):2282-2288. doi:10.1161/01.ATV.0000181763.57495.2b.
 93. Islam S, Jarosch S, Zhou J, et al. Anti-inflammatory and anti-bacterial effects of iron chelation in experimental sepsis. *J Surg Res*. 2015;200(1):266-273. doi:10.1016/j.jss.2015.07.001.
 94. Jackson JH, Gajewski E, Schraufstatter IU, et al. Damage to the bases in DNA induced in stimulated human neutrophils. *J Clin Invest*. 1989;84(5):1644-1649. doi:10.1172/JCI114342.
 95. Jang JH, Lee JH, Yoon SS, et al. Korean guideline for Iron chelation therapy in transfusion-induced iron overload. *J Korean Med Sci*. 2013;28(11):1563-1572. doi:10.3346/jkms.2013.28.11.1563.
 96. Jepsen J V., Sall M, Rhodes PR, Schmidt D, Messing E, Bruskewitz RC. Long-term experience with pentosanpolysulfate in interstitial cystitis. *Urology*. 1998;51(3):381-387. doi:10.1016/S0090-4295(97)00714-0.
 97. Jerde TJ, Bjorling DE, Steinberg H, Warner T, Saban R. Determination of mouse bladder inflammatory response to E. coli lipopolysaccharide. *Urol Res*. 2000;28(4):269-273. doi:10.1007/s002400000114.
 98. Jiang YH, Jhang JF, Kuo HC. Revisiting the role of potassium sensitivity testing and cystoscopic hydrodistention for the diagnosis of interstitial cystitis. Kim J, ed. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151692. doi:10.1371/journal.pone.0151692.
 99. Johnson JE, Johnson KE. Ambiguous chronic illness in women: A community health nursing concern. *J Community Health Nurs*. 2006;23(3):159-167. doi:10.1207/s15327655jchn2303_3.
 100. Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol*. 2005;175(6):3463-3468. doi:10.4049/jimmunol.175.6.3463.
 101. Karimi M, Cohan N, De Sanctis V, Mallat NS, Taher A. Guidelines for diagnosis and management of beta-thalassemia intermedia. *Pediatr Hematol Oncol*.

- 2014;31(7):583-596. doi:10.3109/08880018.2014.937884.
102. Keay S, Zhang CO, Chai T, et al. Antiproliferative factor, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, and epidermal growth factor in men with interstitial cystitis versus chronic pelvic pain syndrome. *Urology*. 2004;63(1):22-26. doi:10.1016/j.urology.2003.08.024.
 103. Khorramian E, Fung E, Chua K, et al. In a Mouse Model of Sepsis, Hecpudin Ablation Ameliorates Anemia More Effectively than Iron and Erythropoietin Treatment. *Shock*. 2017;48(4):490-497. doi:10.1097/SHK.0000000000000886.
 104. Kim A, Fung E, Parikh SG, et al. A mouse model of anemia of inflammation : complex pathogenesis with partial dependence on hepcidin. 2015;123(8):1129-1137. doi:10.1182/blood-2013-08-521419.A.K.
 105. Kim DH. Bacterial Siderophores Promote Animal Host Iron Acquisition and Growth. *Cell*. 2018;(1966):311-312. doi:10.1016/j.cell.2018.09.020.
 106. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med*. 1980;93(3):480-489. doi:10.7326/0003-4819-93-3-480.
 107. Knutson MD. Iron transport proteins: Gateways of cellular and systemic iron homeostasis. *J Biol Chem*. 2017;292(31):12735-12743. doi:10.1074/jbc.R117.786632.
 108. 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.
 109. 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.
 110. Kontoghiorghe CN, Kontoghiorghes GJ. Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:465-481. doi:10.2147/DDDT.S79458.
 111. Kontoghiorghes GJ, Graham Goddard J, Bardett AN, Sheppard L. Pharmacokinetic studies in humans with the oral iron chelator 1,2-dimethyl-3-

- hydroxypyrid-4-one. *Clin Pharmacol Ther.* 1990;48(3):255-261. doi:10.1038/clpt.1990.147.
112. Kortekaas J, Müller SA, Ringler P, et al. Immunogenicity and structural characterisation of an in vitro folded meningococcal siderophore receptor (FrpB, FetA). *Microbes Infect.* 2006;8(8):2145-2153. doi:10.1016/j.micinf.2006.04.011.
113. Koskenkorva-Frank TS, Weiss G, Koppenol WH, Burckhardt S. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:1174-1194. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.001.
114. 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.
115. Kuo HC, Jiang YH, Tsai YC, Kuo YC. Intravesical botulinum toxin-A injections reduce bladder pain of interstitial cystitis/bladder pain syndrome refractory to conventional treatment – A prospective, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Neurourol Urodyn.* 2016;35(5):609-614. doi:10.1002/nau.22760.
116. 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.
117. LARSEN S, THOMPSON SA, HALD T, et al. Mast Cells in Interstitial Cystitis. *Br J Urol.* 1982;54(3):283-286. doi:10.1111/j.1464-410X.1982.tb06976.x.
118. Lavelle JP, Meyers SA, Ruiz WG, Buffington CAT, Zeidel ML, Apodaca G. Urothelial pathophysiological changes in feline interstitial cystitis: a human model. *Am J Physiol Physiol.* 2000;278(4):F540-F553. doi:10.1152/ajprenal.2000.278.4.F540.
119. Lehmann C. Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation bei Endotoxinämie. *Habilitationsschrift.* 2000:1-189.
120. Ley K. Leukocyte adhesion to vascular endothelium. *J Reconstr Microsurg.* 1992;8(6):495-503. doi:10.1055/s-2007-1006736.

121. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):678-689. doi:10.1038/nri2156.
122. Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol*. 1995;155(2):525-528. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541818>. Accessed March 1, 2020.
123. Li L, Frei B. Iron chelation inhibits NF- κ B-mediated adhesion molecule expression by inhibiting p22phox protein expression and NADPH oxidase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2638-2643. doi:10.1161/01.ATV.0000245820.34238.da.
124. 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.
125. Lim YN, Dwyer P, Murray C, Karmakar D, Rosamilia A, Thomas E. Long-term outcomes of intravesical dimethyl sulfoxide/heparin/hydrocortisone therapy for interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Int Urogynecol J*. 2017;28(7):1085-1089. doi:10.1007/s00192-016-3232-0.
126. Lin M, Rippe RA, Niemelä O, Brittenham G, Tsukamoto H. Role of iron in NF- κ B activation and cytokine gene expression by rat hepatic macrophages. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 1997;272(6 35-6). doi:10.1152/ajpgi.1997.272.6.g1355.
127. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle—70 years later: an alternative view. *Redox Rep*. 2002;7(1):55-57. doi:10.1179/135100002125000190.
128. Liu HT, Kuo HC. Biomarkers for patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Urol Sci*. 2015;26(4):225-229. doi:10.1016/j.urols.2015.02.002.
129. Liu J, Sun B, Yin H, Liu S. Hcpidin: A Promising Therapeutic Target for Iron Disorders. *Med (United States)*. 2016;95(14):e3150. doi:10.1097/MD.00000000000003150.
130. Liu ZD, Hider RC. Design of clinically useful iron(III)-selective chelators. *Med Res Rev*. 2002;22(1):26-64. doi:10.1002/med.1027.
131. Logadottir Y, Delbro D, Fall M, et al. Cytokine expression in patients with bladder

- pain syndrome/interstitial cystitis essic type 3C. *J Urol*. 2014;192(5):1564-1568. doi:10.1016/j.juro.2014.04.099.
132. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, et al. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest*. 1993;92(2):559-570. doi:10.1172/JCI116623.
 133. Luber-Narod J, Austin-Ritchie T, Banner B, et al. Experimental autoimmune cystitis in the Lewis rat: A potential animal model for interstitial cystitis. *Urol Res*. 1996;24(6):367-373. doi:10.1007/BF00389795.
 134. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014;224:164-175. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.016.
 135. Ma L-L, He Y-Q, Zhang W-T, Shi C-H, Wang F-M, Tian X-J. Phloroglucinol Protects the Urinary Bladder Via Inhibition of Oxidative Stress and Inflammation in a Rat Model of Cyclophosphamide-induced Interstitial Cystitis. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(7):956. doi:10.4103/0366-6999.154316.
 136. Marcu L, Hillman EMC. In vivo Optical Imaging / Intravital Microscopy. *J Biophotonics*. 2017;10(6-7):760-761. doi:10.1002/jbio.201770066.
 137. Mayrovitz HN. Leukocyte rolling: A prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 1992;262(1 31-1). doi:10.1152/ajpheart.1992.262.1.h157.
 138. Mcdermott P. Painful bladder syndrome/interstitial cystitis (history, epidemiology, symptoms, diagnosis and treatments). *Int J Urol Nurs*. 2009;3(1):16-23. doi:10.1111/j.1749-771X.2009.01059.x.
 139. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet α -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*. 1989;84(1):92-99. doi:10.1172/JCI114175.
 140. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science (80-)*. 2001;291(5509):1755-1759. doi:10.1126/science.1057206.
 141. Meng E, Hsu YC, Chuang YC. Advances in intravesical therapy for bladder pain syndrome (BPS)/interstitial cystitis (IC). *LUTS Low Urin Tract Symptoms*.

- 2018;10(1):3-11. doi:10.1111/luts.12214.
142. van de Merwe JP, Nordling J, Bouchelouche P, et al. Diagnostic Criteria, Classification, and Nomenclature for Painful Bladder Syndrome/Interstitial Cystitis: An ESSIC Proposal. *Eur Urol.* 2008;53(1):60-67. doi:10.1016/j.eururo.2007.09.019.
 143. Michael YL, Kawachi I, Stampfer MJ, Colditz GA, Curhan GC. Quality of life among women with interstitial cystitis. *J Urol.* 2000;164(2):423-427. doi:10.1016/S0022-5347(05)67376-4.
 144. Michels K, Nemeth E, Ganz T, Mehrad B. Hecpidin and Host Defense against Infectious Diseases. *PLoS Pathog.* 2015;11(8):1-14. doi:10.1371/journal.ppat.1004998.
 145. Minaglia S, Özel B, Nguyen JN, Mishell DR. Validation of Spanish version of Pelvic Pain and Urgency/Frequency (PUF) patient symptom scale. *Urology.* 2005;65(4):664-669. doi:10.1016/j.urology.2004.10.078.
 146. Minaiyan M, Mostaghel E, Mahzouni P. Preventive therapy of experimental colitis with selected iron chelators and anti-oxidants. *Int J Prev Med.* 2012.
 147. Minami A, Tanaka T, Otoshi T, Kuratsukuri K, Nakatani T. Hyperbaric oxygen significantly improves frequent urination, hyperalgesia, and tissue damage in a mouse long-lasting cystitis model induced by an intravesical instillation of hydrogen peroxide. *Neurourology and Urodynamics.* <http://doi.wiley.com/10.1002/nau.23822>. Published January 1, 2018. Accessed January 15, 2019.
 148. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants Redox Signal.* 2014;20(7):1126-1167. doi:10.1089/ars.2012.5149.
 149. Muller G, Raymond KN. Specificity and mechanism of ferrioxamine-mediated iron transport in *Streptomyces pilosus*. *J Bacteriol.* 1984;160(1):304-312.
 150. Murawska N, Fabisiak A, Fichna J. Anemia of Chronic Disease and Iron Deficiency Anemia in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(5):1198-1208. doi:10.1097/MIB.0000000000000648.
 151. Nakaminami H, Chen C, Truong-Bolduc QC, Kim ES, Wang Y, Hooper DC. Efflux

- transporter of siderophore staphyloferrin A in *Staphylococcus aureus* contributes to bacterial fitness in abscesses and epithelial cells. *Infect Immun*. 2017;85(8). doi:10.1128/IAI.00358-17.
152. Neal DE, Dilworth JP, Kaack MB. Tamm-Horsfall autoantibodies in interstitial cystitis. *J Urol*. 1991;145(1):37-39. doi:10.1016/S0022-5347(17)38241-1.
 153. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004;113(9):1271-1276. doi:10.1172/JCI20945.
 154. Neuhaus J, Schulte-Baukloh H, Stolzenburg JU, et al. Individual receptor profiling as a novel tool to support diagnosis of bladder pain syndrome/interstitial cystitis (BPS/IC). *World J Urol*. 2012;30(5):693-700. doi:10.1007/s00345-011-0774-0.
 155. Nguyen GT, Green ER, Meccas J. Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:373. doi:10.3389/fcimb.2017.00373.
 156. Nickel JC, Egerdie B, Downey J, et al. A real-life multicentre clinical practice study to evaluate the efficacy and safety of intravesical chondroitin sulphate for the treatment of interstitial cystitis. *BJU Int*. 2009;103(1):56-60. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08028.x.
 157. Nurchi VM, Crisponi G, Lachowicz JI, Medici S, Peana M, Zoroddu MA. Chemical features of in use and in progress chelators for iron overload. *J Trace Elem Med Biol*. 2016;38:10-18. doi:10.1016/j.jtemb.2016.05.010.
 158. 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.
 159. Papadaki HA, Kritikos HD, Gemetzi C, et al. Bone marrow progenitor cell reserve and function and stromal cell function are defective in rheumatoid arthritis: Evidence for a tumor necrosis factor alpha-mediated effect. *Blood*. 2002;99(5):1610-1619. doi:10.1182/blood.V99.5.1610.
 160. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Systemic iron homeostasis and erythropoiesis. *IUBMB Life*. 2017;69(6):399-413. doi:10.1002/iub.1629.
 161. Parquet M del C, Savage KA, Allan DS, Davidson RJ, Holbein BE. Novel iron-chelator DIBI inhibits *Staphylococcus aureus* growth, suppresses experimental

- MRSA infection in mice and enhances the activities of diverse antibiotics in vitro. *Front Microbiol.* 2018;9(AUG):1-11. doi:10.3389/fmicb.2018.01811.
162. 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. doi:10.1016/S0022-5347(17)35629-X.
163. PARSONS CL, HOUSLEY T, SCHMIDT JD, LEBOW D. Treatment of interstitial cystitis with intravesical heparin. *Br J Urol.* 1994;73(5):504-507. doi:10.1111/j.1464-410X.1994.tb07634.x.
164. Parsons CL, Stein P, Zupkas P, et al. Defective Tamm-Horsfall Protein in Patients With Interstitial Cystitis. *J Urol.* 2007;178(6):2665-2670. doi:10.1016/j.juro.2007.07.125.
165. Patnaik SS, Laganà AS, Vitale SG, et al. Etiology, pathophysiology and biomarkers of interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2017;295(6):1341-1359. doi:10.1007/s00404-017-4364-2.
166. Paul WE. Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood.* 1991;77(9):1859-1870. doi:10.1182/blood.v77.9.1859.bloodjournal7791859.
167. Payne CK, Joyce GF, Wise M, Clemens JQ. Interstitial Cystitis and Painful Bladder Syndrome. *J Urol.* 2007;177(6):2042-2049. doi:10.1016/j.juro.2007.01.124.
168. Peeker R, Aldenborg F, Fall M. Complete transurethral resection of ulcers in classic interstitial cystitis. *Int Urogynecol J.* 2000;11(5):290-295. doi:10.1007/s001920070019.
169. Peeker R, Enerbäck L, Fall M, Aldenborg F. Recruitment, distribution and phenotypes of mast cells in interstitial cystitis. *J Urol.* 2000;163(3):1009-1015. doi:10.1016/S0022-5347(05)67873-1.
170. Perez-Marrero R, Emerson LE, Feltis JT. A controlled study of dimethyl sulfoxide in interstitial cystitis. *J Urol.* 1988;140(1):36-39. doi:10.1016/S0022-5347(17)41478-9.
171. Pippard MJ, Callender ST, Weatherall DJ. Intensive iron-chelation therapy with desferrioxamine in iron-loading anaemias. *Clin Sci Mol Med.* 1978;54(1):99-106.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/620500>. Accessed December 11, 2018.

172. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55-74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
173. Power Coombs MR, Grant T, Greenshields AL, Arsenault DJ, Holbein BE, Hoskin DW. Inhibitory effect of iron withdrawal by chelation on the growth of human and murine mammary carcinoma and fibrosarcoma cells. *Exp Mol Pathol*. 2015;99(2):262-270. doi:10.1016/j.yexmp.2015.07.008.
174. Propper RD, Cooper B, Rufo RR, et al. Continuous subcutaneous administration of deferoxamine in patients with iron overload. *N Engl J Med*. 1977;297(8):418-423. doi:10.1056/NEJM197708252970804.
175. Puig S, Ramos-Alonso L, Romero AM, Martínez-Pastor MT. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics*. 2017;9(11):1483-1500. doi:10.1039/c7mt00116a.
176. Pyo JS, Cho WJ. Systematic Review and Meta-Analysis of Intravesical Hyaluronic Acid and Hyaluronic Acid/Chondroitin Sulfate Instillation for Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome. *Cell Physiol Biochem*. 2016;39(4):1618-1625. doi:10.1159/000447863.
177. Quinonez-Flores CM, Gonzalez-Chavez SA, Del Rio Najera D, Pacheco-Tena C. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6097417. doi:10.1155/2016/6097417.
178. Rabin C, O'Leary A, Neighbors C, Whitmore K. Pain and depression experienced by women with interstitial cystitis. *Women Heal*. 2000;31(4):67-81. doi:10.1300/J013v31n04_05.
179. Rajasekaran M, Stein P, Parsons CL. Toxic factors in human urine that injure urothelium. *Int J Urol*. 2006;13(4):409-414. doi:10.1111/j.1442-2042.2006.01301.x.
180. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci*. 2016;148:183-193. doi:10.1016/j.lfs.2016.02.002.
181. Rawls WF, Cox L, Rovner ES. Dimethyl sulfoxide (DMSO) as intravesical therapy

- for interstitial cystitis/bladder pain syndrome: A review. *NeuroUrol Urodyn*. 2017;36(7):1677-1684. doi:10.1002/nau.23204.
182. Reeves P, Irwin D, Kelleher C, et al. The Current and Future Burden and Cost of Overactive Bladder in Five European Countries. *Eur Urol*. 2006;50(5):1050-1057. doi:10.1016/j.eururo.2006.04.018.
 183. Regauer S, Gamper M, Fehr MK, Viereck V. Sensory Hyperinnervation Distinguishes Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis from Overactive Bladder Syndrome. *J Urol*. 2017;197(1):159-166. doi:10.1016/j.juro.2016.06.089.
 184. Riedl CR, Engelhardt PF, Daha KL, Morakis N, Pflüger H. Hyaluronan treatment of interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Int Urogynecol J*. 2008;19(5):717-721. doi:10.1007/s00192-007-0515-5.
 185. Rössberger J, Fall M, Jonsson O, Pecker R. Long-Term Results of Reconstructive Surgery in Patients with Bladder Pain Syndrome/Interstitial Cystitis: Subtyping Is Imperative. *Urology*. 2007;70(4):638-642. doi:10.1016/j.urology.2007.05.028.
 186. 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.
 187. Rovner E, Propert KJ, Brensinger C, et al. Treatments used in women with interstitial cystitis: The Interstitial Cystitis Data Base (ICDB) study experience. *Urology*. 2000;56(6):940-945. doi:10.1016/S0090-4295(00)00845-1.
 188. Ruiz JL, Alonso M, Moreno B, Server G, Osca JM, Jiménez JF. Dimethyl sulfoxide in the treatment of interstitial cystitis. *Actas Urol Esp*. 15(4):357-360. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1722941>. Accessed January 22, 2020.
 189. Saban MR, Hellmich H, Nguyen NB, Winston J, Hammond TG, Saban R. Time course of LPS-induced gene expression in a mouse model of genitourinary inflammation. *Physiol Genomics*. 2001;2001(5):147-160. doi:10.1152/physiolgenomics.2001.5.3.147.
 190. Sairanen J, Forsell T, Ruutu M. Long-term outcome of patients with interstitial cystitis treated with low dose cyclosporine A. *J Urol*. 2004;171(6 Pt 1):2138-2141. doi:10.1097/01.ju.0000125139.91203.7a.
 191. Sander M, Hofstetter TB, Gorski CA. Electrochemical analyses of redox-active iron minerals: A review of nonmediated and mediated approaches. *Environ Sci*

- Technol.* 2015;49(10):5862-5878. doi:10.1021/acs.est.5b00006.
192. Sant GR, Propert KJ, Hanno PM, et al. A pilot clinical trial of oral pentosan polysulfate and oral hydroxyzine in patients with interstitial cystitis. *J Urol.* 2003;170(3):810-815. doi:10.1097/01.ju.0000083020.06212.3d.
 193. Sant GR, Theoharides TC. The role of the mast cell in interstitial cystitis. *Urol Clin North Am.* 1994;21(1):41-53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8284844>. Accessed February 8, 2019.
 194. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol.* 2003;65(7):1035-1041. doi:10.1016/S0006-2952(03)00002-9.
 195. Savage KA, del Carmen Parquet M, Allan DS, et al. Iron restriction to clinical isolates of candida albicans by the novel chelator dibi inhibits growth and increases sensitivity to azoles in vitro and in vivo in a murine model of experimental vaginitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(8):1-11. doi:10.1128/AAC.02576-17.
 196. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453-R462. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034.
 197. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019.
 198. Schreck R, Rieberl P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *Embo.* 1991;10(8):2247-2258. <https://www.mendeley.com/research/reactive-oxygen-intermediates-apparently-widely-used-messengers-activation-nf?b-transcription-factor/>.
 199. Searle LJ, Méric G, Porcelli I, Sheppard SK, Lucchini S. Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2015;10(3):e0117906. doi:10.1371/journal.pone.0117906.
 200. 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.

201. Seshadri P, Emerson L, Morales A. Cimetidine in the treatment of interstitial cystitis. *Urology*. 1994;44(4):614-616.
202. Shah YM, Matsubara T, Ito S, Yim S-H, Gonzalez FJ. Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency. *Cell Metab*. 2009;9(2):152-164. doi:10.1016/j.cmet.2008.12.012.
203. Shu T, Jing C, Lv Z, Xie Y, Xu J, Wu J. Hepcidin in tumor-related iron deficiency anemia and tumor-related anemia of chronic disease: pathogenic mechanisms and diagnosis. *Eur J Haematol*. 2015;94(1):67-73. doi:10.1111/ejh.12402.
204. Skene AJ. *Diseases of the Bladder and Urethra in Women*. New York: W. Wood; 1887.
205. Slobodov G, Feloney M, Gran C, Kyker KD, Hurst RE, Culkin DJ. Abnormal expression of molecular markers for bladder impermeability and differentiation in the urothelium of patients with interstitial cystitis. *J Urol*. 2004;171(4):1554-1558. doi:10.1097/01.ju.0000118938.09119.a5.
206. Song PH, Chun SY, Chung JW, et al. Comparison of 5 different rat models to establish a standard animal model for research into interstitial cystitis. *Int Neurourol J*. 2017;21(3):163-170. doi:10.5213/inj.1734898.449.
207. Srivastava D. Efficacy of sacral neuromodulation in treating chronic pain related to painful bladder syndrome/interstitial cystitis in adults. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2012;28(4):428-435. doi:10.4103/0970-9185.101890.
208. Stein P, Rajasekaran M, Parsons CL. Tamm-Horsfall protein protects urothelial permeability barrier. *Urology*. 2005;66(4):903-907. doi:10.1016/j.urology.2005.05.021.
209. Stone AR, Vogelsang P, Miller CH, MacDermott JP. Tamm-Horsfall protein as a marker in interstitial cystitis. *J Urol*. 1992;148(5 Pt 1):1406-1408. doi:10.1016/S0022-5347(17)36922-7.
210. 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.

211. Summers MR, Jacobs A, Tudway D, Perera P, Ricketts C. Studies in Desferrioxamine and Ferrioxamine Metabolism in Normal and Iron-Loaded Subjects. *Br J Haematol.* 1979;42(4):547-555. doi:10.1111/j.1365-2141.1979.tb01167.x.
212. Suskind AM, Berry SH, Suttrop MJ, et al. Health-related quality of life in patients with interstitial cystitis/bladder pain syndrome and frequently associated comorbidities. *Qual Life Res.* 2013;22(7):1537-1541. doi:10.1007/s11136-012-0285-5.
213. Teichman JMH, Mayson BE. The relationship between sexual abuse and interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Curr Urol Rep.* 2009;10(6):441-447. doi:10.1007/s11934-009-0070-3.
214. Theoharides TC, Kempuraj D, Sant GR. Mast cell involvement in interstitial cystitis: A review of human and experimental evidence. *Urology.* 2001;57(6 SUPPL. 1):47-55. doi:10.1016/s0090-4295(01)01129-3.
215. Thilagarajah R, O'N Witherow R, 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. doi:10.1046/j.1464-410X.2001.02031.x.
216. Thorburn T, Aali M, Kostek L, et al. Anti-inflammatory effects of a novel iron chelator, DIBI, in experimental sepsis. Jünger M, Krüger-Genge A, Jung F, eds. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2017;67(3-4):241-250. doi:10.3233/CH-179205.
217. Tincello DG, Walker ACH. Interstitial cystitis in the UK: Results of a questionnaire survey of members of the Interstitial Cystitis Support Group. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;118(1):91-95. doi:10.1016/j.ejogrb.2004.06.012.
218. Tonyali S, Yilmaz M. Sexual Dysfunction in Interstitial Cystitis. *Curr Urol.* 2017;11(1):1-3. doi:10.1159/000447186.
219. Tung A, Hepp Z, Bansal A, Devine EB. Characterizing health care utilization, direct costs, and comorbidities associated with interstitial cystitis: A retrospective claims analysis. *J Manag Care Spec Pharm.* 2017;23(4):474-482. doi:10.18553/jmcp.2017.23.4.474.
220. 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.* 2017;43(1):134-141. doi:10.1590/S1677-5538.IBJU.2016.0302.
221. Tyagi P, Killinger K, Tyagi V, Nirmal J, Chancellor M, Peters KM. Urinary chemokines as noninvasive predictors of ulcerative interstitial cystitis. *J Urol.* 2012;187(6):2243-2248. doi:10.1016/j.juro.2012.01.034.
222. 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.
223. Wang XC, Saban R, Kaysen JH, et al. Nuclear factor kappa B mediates lipopolysaccharide-induced inflammation in the urinary bladder. *J Urol.* 2000;163(3):993-998. doi:10.1016/S0022-5347(05)67870-6.
224. Warren JW, Brown J, Tracy JK, Langenberg P, Wesselmann U, Greenberg P. Evidence-Based Criteria for Pain of Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome in Women. *Urology.* 2008;71(3):444-448. doi:10.1016/j.urology.2007.10.062.
225. Warren JW, Brown V, Jacobs S, Horne L, Langenberg P, Greenberg P. Urinary Tract Infection and Inflammation at Onset of Interstitial Cystitis/Painful Bladder Syndrome. *Urology.* 2008;71(6):1085-1090. doi:10.1016/j.urology.2007.12.091.
226. 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.
227. Warren JW, Keay SK, Meyers D, Xu J. Concordance of interstitial cystitis in monozygotic and dizygotic twin pairs. *Urology.* 2001;57(6):22-25. doi:10.1016/S0090-4295(01)01120-7.
228. Weigel KJ, Lynch SG, LeVine SM. Iron Chelation and Multiple Sclerosis. *ASN Neuro.* 2013;6(1):AN20130037. doi:10.1042/AN20130037.
229. Welk BK, Teichman JMH. Dyspareunia Response in Patients with Interstitial Cystitis Treated with Intravesical Lidocaine, Bicarbonate, and Heparin. *Urology.* 2008;71(1):67-70. doi:10.1016/j.urology.2007.09.067.
230. Westhofen R. Einfluss von BCP auf Schmerzsymptomatik und Krankheitsverhalten bei Mäusen mit experimentell induzierter Interstitieller

Cystitis. 2019.

231. Westropp J, Buffington C. In vivo models of interstitial cystitis. *J Urol.* 2002;167(2):694-702. doi:10.1016/S0022-5347(01)69129-8.
232. Wittchen ES. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci.* 2009;14(7):2522-2545. doi:10.2741/3395.
233. Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* 2006;108(9):3204-3209. doi:10.1182/blood-2006-06-027631.
234. Xiong S, She H, Sung CK, Tsukamoto H. Iron-dependent activation of NF- κ B in Kupffer cells: A priming mechanism for alcoholic liver disease. *Alcohol.* 2003;30(2):107-113. doi:10.1016/S0741-8329(03)00100-9.
235. Xiong S, She H, Takeuchi H, et al. Signaling role of intracellular iron in NF- κ B activation. *J Biol Chem.* 2003;278(20):17646-17654. doi:10.1074/jbc.M210905200.
236. Xu L, Zhang P, Zhang N, et al. Efficiency of O'Leary-Sant symptom index and problem index in the diagnosis of interstitial cystitis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2013;93(42):3347-3350. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24418029>. Accessed January 14, 2020.
237. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- α -activated vascular endothelium under flow. *Blood.* 2005;106(2):584-592. doi:10.1182/blood-2004-12-4942.
238. Yoshimura N, Oguchi T, Yokoyama H, et al. Bladder afferent hyperexcitability in bladder pain syndrome/interstitial cystitis. *Int J Urol.* 2014;21(S1):18-25. doi:10.1111/iju.12308.

11 Publikationsverzeichnis

Sämtliche Daten, die dieser Dissertationsschrift zugrunde liegen, wurden an der Dalhousie University in Halifax, Kanada generiert.

Im Rahmen des Forschungsaufenthalts konnten Daten zu unterschiedlichen Fragestellungen gesammelt werden. Ein Teil der Daten wurde zur Erstellung einer Diplomarbeit an der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Nürnberg herangezogen. Diese trägt den Titel „Auswirkungen von DIBI, einem neuartigen Eisenchelator, auf Schmerzempfinden und Krankheitsverhalten in einem murinen Modell der interstitiellen Zystitis“⁷³ und wurde am 15. Februar 2019 nach Einreichung akzeptiert und am 27. Juni 2019 erfolgreich verteidigt. Die in dieser Dissertation behandelten Daten stehen zwar in thematischen Zusammenhang mit der zuvor veröffentlichten Diplomarbeit, sind aber klar von diesen abzugrenzen.

Im Zuge der Dissertationsarbeit entstanden zwei Publikationen sowie zwei Posterpräsentationen. Die erste Originalarbeit (Erstautorenschaft) mit dem Titel „Iron Chelation as Novel Treatment for Interstitial Cystitis“ wurde am 30. Januar 2019 im Journal *Pharmacology* (Karger) publiziert. Die zweite Arbeit (Co-Autorenschaft) zum Thema „Experimental Cannabinoid 2 Receptor Activation by Phyto-Derived and Synthetic Cannabinoid Ligands in LPS-Induced Interstitial Cystitis in Mice“ wurde am 21. November 2019 im Journal *Molecules* veröffentlicht. Die Posterveröffentlichungen erfolgten als Abstract und Poster beim 10. Science Get Together der Paracelsus Paracelsus Medizinischen Privatuniversität am 28. Juni 2019.

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, et al. Experimental Cannabinoid 2 Receptor Activation by Phyto-Derived and Synthetic Cannabinoid Ligands in LPS-Induced Interstitial Cystitis in Mice. *Molecules*. 2019;24(23):4239. doi:10.3390/molecules24234239.
3. 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.

4. 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.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„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.“ †

Ort, Datum

Unterschrift

† Die Erhebung der Daten erfolgte gleichzeitig mit denen von Herrn Dr. med. univ. Robert Westhofen im selben Labor an der Dalhousie University in Halifax, Kanada. 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.

13 Danksagung

14 Curriculum Vitae