

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin I

(Schwerpunkt: Gastroenterologie, Gastrointestinale Onkologie,  
Hepatologie, Infektiologie und Geriatrie)

**Effekt des topischen Hämostatikums Hemospray auf die  
Ulkusheilung im Gastrointestinaltrakt**

-

**Eine Pilotstudie am Schweinemodell**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Brücklmeier, Lena Valerie**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler  
1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Götz  
2. Berichterstatter: Professor Dr. C. P. Berg

Tag der Disputation: 26.02.2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
<b>1.1</b>	<b>Gastroduodenale Ulzera</b>	<b>9</b>
1.1.1	Ätiologie und Pathogenese	10
1.1.2	Klinik	12
1.1.3	Diagnostik	12
1.1.4	Therapie	13
<b>1.2</b>	<b>Kolorektale Ulzera</b>	<b>13</b>
1.2.1	Ätiologie und Pathogenese	13
1.2.2	Klinik	14
1.2.3	Diagnostik	14
1.2.4	Therapie	15
<b>1.3</b>	<b>Mukosale Heilung</b>	<b>16</b>
1.3.1	Definition der Mukosalen Heilung	16
1.3.2	Endoskopisches Assessment	18
1.3.3	Mukosale Barriere und ihre Verletzung	19
1.3.4	Mechanismen der Mukosalen Heilung	21
<b>1.4</b>	<b>Förderung der Mukosaheilung</b>	<b>23</b>
1.4.1	Topisch	23
1.4.2	Systemisch	24
<b>1.5</b>	<b>Blutungskomplikationen</b>	<b>25</b>
<b>1.6</b>	<b>Hemospray</b>	<b>26</b>
1.6.1	Anwendung	26
1.6.2	Wirkweise	27
<b>1.7</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Aufbau der Pilotstudie</b>	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>Versuchsdurchführung</b>	<b>31</b>
2.2.1	Anästhesie	31
2.2.2	Induktion der Ulzera und Hemospray-Anwendung an Tag 0	32
2.2.3	Kontrolle und Biopsieentnahme an Tag 2	36
2.2.4	Kontrolle und Tötung an Tag 7	36
<b>2.3</b>	<b>Messung des Hämoglobinwerts</b>	<b>38</b>

<b>2.4</b>	<b>Messung der Ulkusgröße</b>	<b>39</b>
<b>2.5</b>	<b>Histologische Untersuchungen</b>	<b>40</b>
2.5.1	Herstellung der Präparate	40
2.5.2	Digitalisierung der Schnitte	40
2.5.3	Auswertung der Anti-ERG-Antikörper-Färbung	40
2.5.4	Auswertung der Kollagenfärbungen	43
<b>2.6</b>	<b>Statistik</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Endoskopische Prozedur</b>	<b>46</b>
3.1.1	Unterspritzung	46
3.1.2	Schlingenabtragung	47
3.1.3	Dauer der Ulkusinduktion	47
3.1.4	Ulkusgröße nach Induktion	48
3.1.5	Komplikationen	49
3.1.6	Hämoglobin	50
<b>3.2</b>	<b>Mukosaheilung</b>	<b>51</b>
3.2.1	Flächenveränderung der Ulzera	51
3.2.2	Vergleich der endoskopischen und direkten Flächenmessung an Tag 7	55
3.2.3	Angiogenese	57
3.2.4	Kollagenfaserdicke	60
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methoden</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>88</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abb. 2-1</b> Versuchsablauf der Pilotstudie .....	30
<b>Abb. 2-2</b> Unterspritzung der Mukosa im Kolon mit Adrenalin bei Tier 4.....	34
<b>Abb. 2-3</b> Umfassung der unterspritzten Mukosa mit einer Diathermieschlinge	34
<b>Abb. 2-4</b> neu induziertes Kolonulcus .....	34
<b>Abb. 2-5</b> Fotodokumentation der Vermessung des Ulkus mittels eines Zentimeter-Drahts. Der Abstand zwischen den beiden grauen Markierungen beträgt 1 cm. ....	35
<b>Abb. 2-6</b> Einführen und Platzieren des Sprühkatheters über dem Ulkus .....	35
<b>Abb. 2-7</b> Auftragen von Hemospray auf das neu induzierte Kolonulcus .....	35
<b>Abb. 2-8</b> frisch induziertes Magenulkus an Tag 0 bei Tier 4 .....	37
<b>Abb. 2-9</b> Magenulkus an Tag 2 bei Tier 4 .....	37
<b>Abb. 2-10</b> Magenulkus an Tag 7 bei Tier 4 .....	38
<b>Abb. 2-11</b> Magenulkus an Tag 7 bei Tier 4 nach Explantation des Magens ....	38
<b>Abb. 2-12</b> Magenulkus an Tag 2, schematisierte Darstellung der angenäherten Ulkusfläche mittels Ellipse, Tier 4.....	39
<b>Abb. 2-13</b> Ausschnitt aus einem histologischen Präparat in 20facher Vergrößerung (ein ROI), Anfärbung der Endothelzellkerne mit Anti-ERG-Antikörpern, Ulcusgrund eines Magenulkus, Tier 2 .....	41
<b>Abb. 2-14</b> Markierung der angefärbten Endothelzellkerne des Präparats von <b>Abb. 2-13</b> mit ImageJ als Grundlage für die elektronische Zählung, Ulcusgrund eines Magenulkus, Tier 2 .....	42

<b>Abb. 2-15</b> Übereinandergelegter histologischer Ausschnitt mit Anti-ERG-Antikörper-Färbung ( <b>Abb. 2-13</b> ) und durch ImageJ markierte Endothelzellkerne ( <b>Abb. 2-14</b> ) als Kontrolle der Übereinstimmung, Ulkusgrund eines Magenulkus, Tier 2 .....	42
<b>Abb. 2-16</b> Ausschnitt aus einem histologischen Schnitt in 20facher Vergrößerung mit Masson-Trichrom-Färbung, Ulkusrand 1, Magenulkus, Tier 5. Der weiße Pfeil markiert die Dicke der Kollagenfaserschicht vom Grund der letzten Krypte bis zur Tunica muscularis. ....	44
<b>Abb. 2-17</b> Ausschnitt aus einem histologischen Schnitt in 20facher Vergrößerung mit Masson-Trichrom-Färbung, Ulkusgrund, Magenulkus, Tier 5. Der weiße Pfeil markiert die Dicke der Kollagenfaserschicht von der Oberfläche bis zur Tunica muscularis. ....	44
<b>Abb. 2-18</b> Ausschnitt aus einem histologischen Schnitt in 20facher Vergrößerung mit Masson-Trichrom-Färbung, Ulkusrand 2, Magenulkus, Tier 5. Der weiße Pfeil markiert die Dicke der Kollagenfaserschicht vom Grund der letzten Krypte bis zur Tunica muscularis. ....	45
<b>Abb. 3-1</b> Anzahl der durchgeführten Schlingenabtragungen zur Induktion eines ausreichend großen Ulkus in Magen oder Kolon.....	47
<b>Abb. 3-2</b> mittlere Hämoglobinwerte der Tiere in g/dl im zeitlichen Verlauf klassifiziert nach Hemospray-Anwendung.....	50
<b>Abb. 3-3</b> Flächenveränderung der Ulzera im Magen in % der Ausgangsfläche im zeitlichen Verlauf klassifiziert nach Hemospray-Anwendung.....	51
<b>Abb. 3-4</b> Flächenveränderung der Ulzera im Kolon in % der Ausgangsfläche im zeitlichen Verlauf klassifiziert nach Hemospray-Anwendung .....	53
<b>Abb. 3-5</b> Differenz zwischen endoskopisch und nach der Explantation gemessener Ulkusfläche für jedes Magenulkus in mm <sup>2</sup> .....	55

<b>Abb. 3-6</b> Differenz zwischen endoskopisch und nach der Explantation gemessener Ulkusfläche für jedes Kolonulkus in mm <sup>2</sup> .....	56
<b>Abb. 3-7</b> Anzahl der Endothelzellkerne pro ROI (region of interest, entspricht einem Mikroskopierfeld in 200facher Vergrößerung) klassifiziert in Magen und Kolon und Hemospray-Anwendung .....	57
<b>Abb. 3-8</b> Endothelzellkerndichte der Magen-Ulzera an Ulkusrand und Ulkusgrund .....	58
<b>Abb. 3-9</b> Endothelzellkerndichte der Kolon-Ulzera an Ulkusrand und Ulkusgrund .....	59
<b>Abb. 3-10</b> Kollagenfaserdicke in µm in Magen und Kolon .....	60
<b>Abb. 3-11</b> Kollagenfaserdicke in µm der Magen-Ulzera am Ulkusrand und Ulkusgrund .....	61
<b>Abb. 3-12</b> Kollagenfaserdicke in µm der Kolon-Ulzera am Ulkusrand und Ulkusgrund .....	63

<b>Tabelle 3-1</b> Menge des zur Unterspritzung der Mukosa verwendeten, mit NaCl verdünnten Adrenalins in ml (Standardabweichung) klassifiziert nach Hemospray-Anwendung.....	46
<b>Tabelle 3-2</b> Dauer der Ulkusinduktion von Beginn der Unterspritzung bis zur vollständigen Abtragung der Mukosa in Minuten (Standardabweichung) klassifiziert nach Hemospray-Anwendung.....	48
<b>Tabelle 3-3</b> mittlere Ulkusgröße der neu induzierten Ulzera an Tag 0 in mm <sup>2</sup> (Standardabweichung) klassifiziert nach Hemospray-Anwendung.....	49
<b>Tabelle 3-4</b> Komplikationen der endoskopischen Prozeduren bei der Induktion aller 40 Ulzera (%-Angabe), davon jeweils 20 Ulzera in der Kontrollgruppe und 20 Ulzera in der Hemospray-Gruppe.....	49
<b>Tabelle 3-5</b> absolute Ulkusgröße im Magen in mm <sup>2</sup> (Standardabweichung) an Tag 0, Tag 2 und Tag 7, klassifiziert nach Hemospray-Anwendung .....	53
<b>Tabelle 3-6</b> absolute Ulkusgröße im Kolon in mm <sup>2</sup> (Standardabweichung) an Tag 0, Tag 2 und Tag 7, klassifiziert nach Hemospray-Anwendung .....	54



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ASCA	Anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörper
BGA	Blutgasanalyse
CED	Chronisch-Entzündliche Darmerkrankungen
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
EGF-R	epidermal growth factor receptor
EMR	Endoskopische Mukosaresektion
ERG	ETS-related gene
ESD	Endoskopische Submukosa-Dissektion
H. pylori	Helicobacter pylori
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
KG	Körpergewicht
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
p.o.	per os
pANCA	Perinukleäre Anti-Neutrophile Zytoplasmatische Antikörper
PVK	peripherer Venenkatheter
ROI	region of interest
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor $\alpha$

TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
VEGF	vascular endothelial growth factor

# 1 Einleitung

Gastrointestinale Ulzera sind eine weit verbreitete Erkrankung, unter der viele verschiedene Patientengruppen leiden. Während gastroduodenale Ulzera vor allem bei Patienten mit einer Infektion durch *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) oder bei der Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) auftreten, sind von kolorektalen Ulzera vor allem Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) betroffen.

Die Inzidenz von gastroduodenalen Ulzera liegt bei ungefähr 150 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr [1]. Bis zu 10 % der Menschen erkranken im Laufe ihres Lebens an einem peptischen Ulkus [2]. Auch wenn Inzidenz und Prävalenz in den letzten Jahrzehnten ständig gesunken sind, bleiben gastroduodenale Ulzera weiterhin eine häufige Ursache für eine Hospitalisierung von Patienten. Gleichzeitig stellen sie die häufigste Ursache für obere gastrointestinale Blutungen mit einer nicht unerheblichen Mortalitätsrate von 5,8 % dar [3]. Zudem treten auch nach einer Therapie häufig Blutungsrezidive auf [4].

Kolorektale Ulzera hingegen treten vor allem bei Patienten auf, die an den CED Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa leiden. Je nach Erkrankung zeigt sich ein unterschiedliches Ulkus- und Befallsmuster.

## 1.1 Gastroduodenale Ulzera

Ein gastroduodenales Ulkus beschreibt einen Defekt der Magen- oder Darmmukosa, der bis zur Submukosa reicht. Unterschieden wird hier in *Ulcus ventriculi* als Schleimhautdefekt des Magens und in *Ulcus duodeni* als Schleimhautdefekt des Zwölffingerdarms.

### 1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der Ulzera ist vielfältig. Die häufigsten Ursachen sind eine chronische Infektion mit *H. pylori* oder die Einnahme von NSAR, wobei die Kombination aus beidem das Risiko für die Entstehung eines Ulkus um fast das Vierfache erhöht [5].

Ein gastroduodenales Ulkus entsteht, wenn durch ein Ungleichgewicht zwischen protektiven und schädigenden Faktoren die Schleimhaut im Gastrointestinaltrakt angreifbar wird. Dabei wirken vor allem die Regulation der Magensäurebildung und die Ausschüttung von Prostaglandinen protektiv auf die Schleimhaut. Eine erhöhte Säuresekretion führt jedoch zur Schädigung der mukosalen Barriere und begünstigt damit die Entstehung von Schleimhauterosionen und Ulzera.

*H. pylori* produziert das Enzym Urease und bildet damit ein alkalisches Milieu, wodurch das Bakterium bei einem pH-Wert von ungefähr 1,5 im Magen überleben kann. Außerdem exprimiert das Bakterium Adhäsine, die eine Anheftung an die Mukosa im Magen ermöglichen. Der Pathomechanismus einer Infektion mit *H. pylori* ist jedoch nicht vollständig verstanden.

Eine Infektion mit *H. pylori* kann sowohl zu einer Hypo- als auch zu einer Hyperchlorhydrie im Magen führen. Je nach Auswirkung auf die Säureproduktion zeigt sich bei den Patienten eine differierende Klinik. Während es bei einer Hypochlorhydrie zu einer Pangastritis und gastralen Ulzera kommt, zeigen sich bei einer durch *H. pylori* ausgelösten Hyperchlorhydrie eine antral betonte Gastritis sowie duodenale Ulzera [2].

Eine Hypochlorhydrie entsteht sowohl direkt durch eine Hemmung der Parietalzellen als auch indirekt durch die Aktivierung von Neuronen in der Magenwand, welche wiederum eine Stimulation der Somatostatin- und eine Hemmung der Histamin-Sekretion bewirken [6]. In 10-15 % der Fälle führt die Infektion jedoch auch zu einer Hyperchlorhydrie. Diese wird ausgelöst durch eine Hypergastrinämie und reduzierte Somatostatinausschüttung [7].

Für die Pathogenität ist nicht nur die genetische Ausstattung des Bakteriums, sondern auch die genetische Variation des Wirts verantwortlich. So konnte gezeigt werden, dass die Menge des ausgeschütteten Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), einem Zytokin, das maßgeblich an der Entzündungsreaktion im Rahmen einer Helicobacter-Infektion beteiligt ist, abhängig von genetischen Polymorphismen des IL-1 $\beta$ -Gens ist [8]. Daraus lässt sich ein Zusammenhang zwischen diesen genetischen Polymorphismen und der Reaktion des Wirts auf die Infektion vermuten [9]. Die Art des Polymorphismus kann dann Einfluss auf die Säuresekretion und Entzündungsreaktion des Wirts auf *H. pylori* haben. Zudem sind Frauen häufiger von gastrointestinalen Ulzera betroffen als Männer [10].

*H. pylori*-negative Magenulzera werden meist durch die Einnahme von NSAR verursacht. Dabei wird durch eine Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) die lokale Prostaglandinsynthese gestört. Dies bewirkt eine Reduktion des Magenschleims und der Bikarbonatkonzentration ebenso wie einen Abfall der Mukosadurchblutung im Magen. Damit wird die Schleimhaut angreifbarer. Bei selektiven Cyclooxygenase-2-Hemmern (COX-2) wie Coxiben ist das Risiko für gastrointestinale Komplikationen geringer [11]. Auch eine Therapie mit oralen Antikoagulantien und oralen Antidiabetika sowie ein Nikotinabusus erhöhen das Risiko, ein gastroduodenales Ulkus zu entwickeln [12]. Die Kombination aus NSAR und der Einnahme von Kortikosteroiden erhöht das Risiko ein Ulkus zu entwickeln um das Vier- bis Sechsfache [10]. Eine kurzzeitige Einnahme von ausschließlich Kortikosteroiden stellt kein erhöhtes Risiko dar [13]. Jedoch kann sich das Risiko erhöhen, wenn die Steroid-Therapie länger als einen Monat andauert oder die Gesamtmenge die Dosis von 1000 mg überschreitet [14].

Jedes fünfte Ulkus lässt sich nicht durch eine Helicobacter-Infektion oder Medikamenten-Einnahme erklären [15]. Wenn eine falsch-negative Testung ausgeschlossen wurde, gibt es weitere Ursachen, die in Betracht gezogen werden müssen. Stress kann sowohl im Sinne von physischem Stress bei Patienten mit Polytrauma als auch in Form von psychischer Belastung ursächlich sein. So konnten Yamanaka et al. 2013 nach der großen Erdbeben-

Katastrophe 2011 im Osten Japans einen signifikanten Anstieg der gastrointestinalen Blutungen auf dem Boden Helicobacter-negativer gastroduodenaler Ulzera nachweisen [16].

Auch seltene Ursachen wie ein Zollinger-Ellison-Syndrom (Hypergastrinämie) oder ein Hyperparathyreoidismus sollten abgeklärt werden.

### **1.1.2 Klinik**

Klinisch stellen sich Patienten, die unter der gastroduodenalen Ulkuskrankheit leiden, mit epigastrischen Schmerzen vor, deren zeitliches Auftreten oftmals Rückschlüsse über die Lokalisation des Ulkus zulässt. Zudem berichten Patienten über fehlenden Appetit und Gewichtsverlust [17]. Trotzdem sind viele Fälle zunächst asymptomatisch und werden erst nach dem Auftreten von Komplikationen entdeckt und behandelt [18].

Die Komplikationen sind vielfältig. Ein gastroduodenales Ulkus ist die häufigste Ursache für eine obere gastrointestinale Blutung [4]. Eine Perforation oder Magenausgangsstenose als Folge einer akuten Schleimhautschwellung sind selten, aber schwerwiegend.

### **1.1.3 Diagnostik**

Patienten, bei denen der Verdacht auf eine gastrointestinale Ulkuskrankheit besteht, sollten einer genauen Anamnese unterzogen werden, um mögliche Risikofaktoren zu eruieren. Hierzu gehört eine ausführliche Medikamenten- und Suchtmittelanamnese. Eine genaue Schmerzanamnese lässt teilweise Rückschlüsse auf die Lokalisation eines Ulkus zu. So zeigt sich bei Patienten mit Duodenalulkus oft eine Besserung der Schmerzen nach Nahrungsmiteleinnahe, bei Magenulzera tritt der Schmerz hingegen oft direkt nach dem Essen oder unabhängig davon auf.

Goldstandard zur Diagnosestellung der gastrointestinalen Ulkuskrankheit ist die Gastroduodenoskopie. Hierbei sollte in jedem Falle eine Biopsie des Antrums und Corpus, bei morphologischen Auffälligkeiten auch des Ulkus erfolgen.

Einerseits kann durch die Biopsie ein malignes Geschehen ausgeschlossen werden und andererseits kann somit histologisch eine mögliche H.-pylori-Infektion verifiziert werden.

Im Fall einer akuten Komplikation, z.B. einer Blutung, ist eine Endoskopie sowohl diagnostisch als auch therapeutisch Mittel der Wahl.

#### **1.1.4 Therapie**

Therapeutische Zielsetzung ist die Behebung der Ursache der gastrointestinalen Ulkuskrankheit und die Verhinderung von Komplikationen.

Im Fall einer Helicobacter-Infektion wird die Eradikationstherapie empfohlen. Damit kann die Abheilung der Ulzera verbessert und einer erneuten Entstehung vorgebeugt werden [19]. Zusätzlich ist H. pylori als Risikofaktor für das Magenkarzinom bekannt. Zur Verfügung stehen hierfür verschiedene Triple-Therapien, dabei kann beispielsweise für 7 Tage per os (p.o.) Clarithromycin, Amoxicillin und ein Protonenpumpeninhibitor gegeben werden (Französisches Tripleschema). Im Verlauf erfolgt eine Therapiekontrolle mittels Gastroskopie oder nicht-invasiver Verfahren, wie z.B. dem <sup>13</sup>C-Atemtest.

Medikamentös steht eine Hemmung der Säureproduktion des Magens mit Protonenpumpeninhibitoren oder seltener Histaminrezeptorantagonisten im Vordergrund.

Eine chirurgische Therapie ist nur bei Ulkuskomplikationen wie unstillbaren Blutungen, Malignomen oder einer Perforation notwendig.

## **1.2 Kolorektale Ulzera**

### **1.2.1 Ätiologie und Pathogenese**

Die mit Abstand häufigste Ursache für kolorektale Ulzera sind die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.

Auch im Kolorektum können NSAR Auslöser für ulzeröse Schleimhautveränderungen sein. Die Häufigkeit dieser Ursache wird meist unterschätzt. Sowohl die orale als auch die topische Anwendung von NSAR, wie zum Beispiel im Rahmen von Analfissuren, können die mukosale Barriere schädigen.

Ulzera im Rektalbereich können zudem auch durch mechanische Einwirkung entstehen. Bei Patienten mit einem Rektumprolaps kann es im Verlauf ebenfalls zu ulzerösen Veränderungen kommen.

Auch infektiöse Ursachen wie sexuell übertragbare Erkrankungen wie Syphilis können die Ursache von rektalen Ulzera sein. Darüber hinaus kommen andere, seltene Ursachen wie eine CMV- oder HIV-Infektion in Betracht [20, 21].

### **1.2.2 Klinik**

Die klinischen Beschwerden bei ulzerativen Erkrankungen des Kolorektums sind vor allem durch blutige Diarrhöen gekennzeichnet. Zudem berichten die Patienten über diffuse abdominelle Beschwerden, aber auch rektale Schmerzen oder Tenesmen.

### **1.2.3 Diagnostik**

Mit Hilfe einer ausführlichen Anamnese werden Hinweise auf die Ätiologie der Beschwerden oder auf eine mögliche Grunderkrankung gewonnen.

Diagnostisches Mittel der Wahl ist eine Kolo- oder Rektoskopie, um das Ulkus darzustellen und eine Klärung der Genese zu ermöglichen. Hierbei werden Biopsien zur histologischen Untersuchung des Ulkus entnommen. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen einem Malignom und einer entzündlichen Ursache.

Als nicht-invasive Maßnahmen vor der Koloskopie können auch eine Abdomensonografie, eine Stuhluntersuchung auf pathogene Keime oder eine Serologie auf spezifische Antikörper nützlich sein. Hierzu zählt zum Beispiel die



Bestimmung von perinukleären Anti-Neutrophilen Zytoplasmatischen Antikörpern (pANCA), die bei CED erhöht sein können. Zudem kann ein Hinweis auf die Art der CED erfolgen. pANCA sind vor allem bei Colitis ulcerosa erhöht, jedoch weniger bei Morbus Crohn [22]. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei Morbus Crohn bei 60-70 % der Patienten erhöhte Werte von Anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörpern (ASCA), jedoch nur bei 10-15% der Patienten, die an Colitis ulcerosa leiden [23, 24].

Zudem kann auch die Bestimmung von Calprotectin im Stuhl einen Hinweis auf eine CED geben. Eine Metaanalyse von Van Rheenen et al. zeigte hier eine Sensitivität von 93 % und eine Spezifität von 96% bei Erwachsenen für das Vorliegen einer CED [25]. Auch ein Lactoferrin-Nachweis im Stuhl kann ein Hinweis auf das Vorliegen einer CED sein und auch zur Unterscheidung von CED und Reizdarmsyndrom dienen [26].

#### **1.2.4 Therapie**

Eine zielgerichtete Therapie hängt primär von der zugrunde liegenden Erkrankung ab.

Bei den am häufigsten ursächlichen CED gibt es multiple Therapieschemata, die sich nach der Intensität der Entzündungsaktivität, nach dem Befallsmuster und nach dem Allgemeinzustand des Patienten richten. Unterschieden wird zudem die Therapie des akuten Schubs von einer remissionserhaltenden Therapie [27]. Grundlage ist jedoch immer eine Reduktion der Aktivität des Immunsystems.

Bei Morbus Crohn steht im Fokus der Therapie zunächst die systemische Gabe von Glukokortikoiden. Alternativ kommt hier auch Methotrexat zum Einsatz. Eskalierend kann dann die Gabe von TNF- $\alpha$ -Antagonisten wie Infliximab oder alternativ auch Azathioprin oder 6-Mercaptopurin erfolgen. Zum Remissionserhalt dienen vor allem Azathioprin, 6-Mercaptopurin oder, falls hiermit eine erfolgreiche Schubtherapie erfolgte, auch TNF- $\alpha$ -Antagonisten [28].

Bei der Colitis ulcerosa gibt es inzwischen eine Vielzahl medikamentöser Therapiemöglichkeiten. Während Steroide nur im akuten Schub und nicht als dauerhafte Therapie eingesetzt werden, wird Azathioprin ausschließlich zur Remissionserhaltung genutzt. Fast alle weiteren Präparate können sowohl im akuten Schub als auch zur Remissionserhaltung eingesetzt werden. Auch bei der Colitis ulcerosa kommen Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Antagonisten (TNF- $\alpha$ ) zum Einsatz. Zudem haben auch Integrin-Antagonisten wie Vedolizumab und Calcineurin-Inhibitoren wie Ciclosporin A in speziellen Fällen ihre Berechtigung [29].

## **1.3 Mukosale Heilung**

### **1.3.1 Definition der Mukosalen Heilung**

Das bislang gültige Therapieprinzip zur Behandlung von CED basierte auf klinischen Parametern, wie der Besserung der Schmerzen und der Verminderung von Durchfällen, als Marker für das Outcome der Patienten. In den letzten Jahren entwickelte sich jedoch ein neues Konzept, dessen Grundlage eine vollständige mukosale Abheilung der ulzerösen Veränderungen ist [30]. In einer Metaanalyse konnten Reinink et al. 2016 zeigen, dass die Mukosale Heilung einen hohen Vorhersagewert hinsichtlich der Häufigkeit von Operationen und Hospitalisierungen sowie der Langzeit-Remission besitzt [31].

Die Definition der Mukosalen Heilung lässt sich durch die Literatur aktuell nicht eindeutig festlegen. So zeigt sich, dass eine rein klinische Definition der Remission anhand der Reduktion von Durchfällen oder Blutungen keine aussagekräftige Vorhersage über den Status der intestinalen Mukosa und damit den weiteren Krankheitsverlauf treffen kann [32]. Oft scheinen sich die klinischen Beschwerden erst einige Zeit nach dem ersten Auftreten der mukosalen Schäden zu zeigen. In bisher durchgeführten Studien wird der Begriff der Mukosalen Heilung je nach Grunderkrankung oft differierend definiert.

So liegt bei der Colitis ulcerosa, aufgrund der Pathophysiologie der Erkrankung als eine die Mukosa betreffende Entzündung, der Fokus der mukosalen Integrität auf der Abwesenheit von Blutungen, Brüchigkeit, Erosionen und Ulzerationen sowie auf der Wiederherstellung eines normalen Vaskularisierungsmusters [33].

Beim Morbus Crohn hingegen, wo eine transmurale Entzündung aller Wandschichten charakteristisch ist, ist die Definition schwieriger und vor allem auf die Abwesenheit von Ulzera beschränkt [34].

Dulai et al. empfehlen aus praktischen Gründen daher die Definition der Mukosalen Heilung unabhängig von der Grunderkrankung als Abwesenheit von Vulnerabilität, Ulzera und Erosionen der Mukosa [32].

Seit einigen Jahren gibt es zudem Untersuchungen über die Relevanz einer über die endoskopisch sichtbare Mukosale Heilung hinausgehende, histologisch nachweisbare Heilung für die Prognose der Patienten. Bryant et al. konnten 2016 in einer prospektiven Studie zeigen, dass bei Patienten, die unter einer Colitis ulcerosa litten, der Nachweis einer histologisch gesicherten Abheilung der Mukosa eine noch höhere Vorhersagekraft bezüglich der Hospitalisierungsrate hatte als die ausschließlich endoskopisch sichtbare Heilung [35].

Unterstützt wird diese Einschätzung durch eine Studie von Yzet et al., in der sowohl eine endoskopische als auch eine histologische Remission mit einem signifikant geringeren Risiko der Krankheitsprogression bei Morbus Crohn einhergehen [36]. Auch für die Colitis ulcerosa konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer histologischen Remission deutlich seltener eine Hospitalisierung oder Therapieanpassung notwendig war [37].

### 1.3.2 Endoskopisches Assessment

Die Endoskopie ist die wichtigste diagnostische Methode, um Defekte der Mukosa im Gastrointestinaltrakt zu erkennen und hat den größten Vorhersagewert bezüglich der klinischen Remission.

Auch hier gibt es unterschiedliche Bewertungssysteme. Diese beziehen sich vor allem auf die CED. Dabei wird wiederum zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn unterschieden.

Bei Morbus Crohn werden vor allem der Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (CDEIS) von Mary et Modigliani [38] und der Simple Endoscopic Score in Crohn's Disease (SES-CD) von Daperno et al. [39] als primär endoskopischer Score von Experten präferiert [40]. Beiden gemeinsam ist unter anderem die Größe der Ulkusfläche als Parameter.

Bei Patienten mit Colitis ulcerosa hingegen wird oftmals zur Beurteilung der Mukosalen Heilung der von Schroeder et al. 1987 entwickelte Mayo Score herangezogen [41]. So wurde von den Autoren der SUCCESS-Studie zum Vergleich der Therapieregime bei Colitis ulcerosa (Azathioprin-Monotherapie versus Infliximab-Monotherapie versus Kombinationstherapie) ein Mayo-Score von 0 bis 1 als Mukosale Heilung definiert [42]. In anderen Studien wurde hingegen sogar ein Mayo-Score von 0 als Endpunkt definiert [43]. Der Mayo-Score beinhaltet eine vierstufige Skala, die den Schweregrad der mukosalen Schädigung angibt [41]. Die Skala beinhaltet die Stuhlfrequenz, das Auftreten von rektalen Blutabgängen, den endoskopischen Befund und die allgemeine Einschätzung des behandelnden Arztes. Ein weiterer gebräuchlicher Score ist der Ulcerative Colitis endoscopic Index of Severity (UCEIS), der von Travis et al. 2012 entwickelt wurde [44]. Hier werden endoskopisch die Gefäßzeichnung, Hinweise auf eine Blutung und das Vorhandensein von Ulzera und Erosionen beurteilt. Vor kurzem wurde zudem der PiCASSO-Score zur genaueren Definition insbesondere von Veränderungen bei geringer Entzündungsaktivität prospektiv evaluiert [45]. Hierbei wird mit virtueller Chromoendoskopie das

Ausmaß mukosaler und vaskulärer Veränderungen bei der Colitis ulcerosa bestimmt.

Zudem stellt sich die Frage nach der Notwendigkeit regelmäßiger Endoskopien zur Therapiekontrolle und deren Zeitpunkt. Verschiedene Studien konnten hierbei zeigen, dass die Patienten davon profitieren, wenn nach einer im Verlauf durchgeführten Kontrollendoskopie eine befundgerechte Anpassung der Medikation erfolgte [43]. Der optimale Zeitpunkt für eine Kontrolle liegt zwischen 24 und 26 Wochen nach der Primärendoskopie [43, 46].

### **1.3.3 Mukosale Barriere und ihre Verletzung**

Eine intakte mukosale Barriere mit all ihren Bestandteilen ist die Grundlage für die Integrität der Schleimhaut. Die Mukosa im Gastrointestinaltrakt ist ständigen Angriffen durch Bakterien sowie physikalischen und chemischen Prozessen durch die Nahrung ausgesetzt. Entsteht ein Ulkus, so resultiert dieses aus einem Ungleichgewicht zwischen den protektiven und schädigenden Faktoren oder aus einer beeinträchtigten mukosalen Barriere.

Präepithelial befindet sich die Mukusschicht, die mit den unter anderem enthaltenen antibakteriellen Defensinen eine Schutzschicht für das Epithel bildet [47]. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Dicke des Mukus bei Colitis ulcerosa vermindert ist [48] und bei Morbus Crohn die Schutzfunktion des Mukus durch verminderte Defensinbildung eingeschränkt ist, was in der Folge dazu führt, dass die Bakterien direkt mit dem Epithel in Kontakt treten [49, 50]. Auch bei einer *H. pylori*-Infektion sind die Bakterien mit Hilfe der Urease und ihrer Flagellen in der Lage, den Mukus zu durchbrechen und in direkte Interaktion mit dem Oberflächenepithel zu treten [51].

Das Oberflächenepithel selbst bildet mit Hilfe seiner tight-junctions und der Zellmembran zunächst eine mechanische Barriere. Durch die Sekretion von Muzinen und Bikarbonat und der Bildung von Prostaglandinen, Hitzeschockproteinen und Defensinen sorgen die Zellen auch für biologische Schutzfaktoren [52].

Zudem trägt eine intakte Regulierung der Sekretion zum Schutz der Barriere bei. Durch Gastrin, Sekretin, Prostaglandin E2 und die parasympathische Aktivität werden die Zellen stimuliert. Vor allem die Wirkung der Prostaglandine ist essenziell für eine intakte Mukosa.

Auch die Durchblutung in der Lamina propria sowie in der Submukosa stellt einen Schutzmechanismus dar. Eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung und der Abtransport von toxischen Stoffen werden so gewährleistet.

Wichtig für die Aufrechterhaltung der Schutzfunktion ist zudem die kontinuierliche Zellerneuerung aller beteiligten Zellen. Nur so ist eine dauerhafte strukturelle Integrität gewährleistet. Die Zellen des Oberflächenepithels haben eine Lebenszeit von 3-7 Tagen, anschließend werden sie durch Zellen, die sich aus multipotenten Stammzellen differenzieren, ersetzt. Die Proliferation der Epithelzellen bei Verletzungen wird unter anderem durch die Expression des epidermal growth factor receptor (EGF-R) und über die Bindung von transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) an diesen Rezeptor vermittelt [53].

Eine Verletzung der Mukosa entsteht aus dem Zusammenwirken von exogenen sowie endogenen Faktoren, die sich gegenseitig beeinflussen. Bakterien, Viren und aufgenommene Noxen sind die wichtigsten exogenen Einflüsse auf eine intakte Mukosa. Als Reaktion entstehen anschließend zudem endogene Reaktionen des Körpers, die Schäden verschlimmern oder die Heilung behindern können. Die Vermittlung dieser Entzündungsreaktion ist nicht vollständig verstanden, jedoch ist eine Vielzahl an Transmitter-Molekülen beteiligt [54]. Verschiedenen Studien konnten differierende Effekte von TNF- $\alpha$  bei mukosalen Schäden darstellen. Es zeigte sich einerseits im Mausmodell, dass TNF- $\alpha$  die Apoptose von intestinalen Epithelzellen induziert sowie eine Inflammation in der Mukosa verursacht [55]. Andererseits konnten Akazawa et al. 2002 zeigen, dass TNF- $\alpha$  zwar mit der Entzündungsaktivität bei M. Crohn, aber nicht mit den endoskopisch sichtbaren Schäden der Mukosa korreliert [56].

Weitere Faktoren, wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies und Matrix-Metalloproteinasen, induzieren und erhalten mukosale Schäden [57, 58].

Bis es schließlich zu einem makroskopisch sichtbaren Ulkus kommt, ist bereits eine Vielzahl an mikroskopischen Schäden der Mukosa entstanden und aufrechterhalten worden.

#### **1.3.4 Mechanismen der Mukosalen Heilung**

Tritt ein Defekt der Mukosa auf, so setzen diverse Mechanismen mit dem Ziel einer vollständigen Wiederherstellung der Barriere ein.

Entscheidend für die in Aktion tretenden Mechanismen ist die Frage, ob die Basalmembran der Mukosa intakt oder ebenfalls geschädigt ist. Bei kleinen Verletzungen des Oberflächenepithels im Bereich von wenigen Zellen sind vor allem die Veränderung der Nachbarzellen und Ausbildung von neuen Zell-zu-Zell-Kontakten die wichtigsten Mechanismen.

Die Zellen des Oberflächenepithels sind in der Lage, Zellausläufer auszubilden und innerhalb von wenigen Minuten Epithelverletzungen von mehreren Zellen durch Zellmigration zu bedecken [59]. Zudem können Veränderungen des Zytoskeletts der Zellen ein Zusammenziehen der umgebenden Zellen und damit einen Verschluss der Schleimhautverletzung verursachen [60].

Erst wenn diese Mechanismen nicht mehr ausreichen, beginnt eine Zellproliferation und die Differenzierung von Vorläuferzellen am Kryptengrund.

Vermittelt werden alle diese Aktivitäten durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren, wie EGF-R, TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  [61, 62]. Diese aktivieren wiederum intrazelluläre Signalkaskaden.

An diesem Punkt spielt auch das Mikrobiom eine entscheidende Rolle. Der Einfluss von *H. pylori* auf Schleimhautverletzungen ist gut erforscht, so wird durch eine Interaktion mit dem Immunsystem des Wirts eine Reihe an Zytokinen ausgeschüttet, die die Heilung des Epithels beeinflussen. Auch das

intestinale Mikrobiom beeinflusst sowohl die Proliferation von intestinalen Stammzellen direkt als auch das Immunsystem des Wirts, wodurch sich indirekt ebenfalls ein Einfluss auf die Intaktheit des Epithels ergibt [63].

Sobald jedoch die Submukosa geschädigt ist, müssen deutlich weitreichendere Mechanismen aktiviert werden. Die Submukosa sichert die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der epithelialen Zellen vor allem durch die dort vorhandene Blutversorgung. Einerseits werden bei einem Schaden narbengewebebildende Fibroblasten aktiviert, andererseits werden endotheliale Vorläuferzellen aktiviert und damit die Grundlage für eine Angiogenese geschaffen. Die Angiogenese bei dieser Art von Verletzungen erfolgt aus endothelialen Vorläuferzellen des Wundgrunds und -rands [52]. Wichtigster Vermittler ist hierbei der vascular endothelial growth factor (VEGF) [64].

Auch die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  durch Monozyten, Granulozyten und weiteren Immunzellen aktiviert die Schleimhautheilung. Bei andauernder Ausschüttung ist jedoch auch eine schädigende Wirkung auf die Mukosa bekannt. Dies kann bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beobachtet werden [65]. Abhängig ist die zunächst gegensätzlich scheinende Wirkung von der Art des Rezeptors, an den TNF- $\alpha$  bindet. Eine Aktivierung des Tumornekrosefaktor-Rezeptor-1 (TNFR1) unterstützt die Entzündung und die Degeneration des Gewebes, während die Aktivierung von Tumornekrosefaktor-Rezeptor-2 (TNFR2) mit TNF- $\alpha$  als Ligand eher die Zellregeneration fördert [66].

Zudem treten auch zentrale Mechanismen in Kraft. Durch Versuche mit einem murinen Modell zur H. pylori-Infektion ist bekannt, dass auch die Aktivierung von neuronalen Signalwegen durch die Ausschüttung von Somatostatin und Histamin Einfluss auf die Abheilung von Verletzungen des intestinalen Epithels hat [6].

Im weiteren Verlauf wandern mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ein, die sich erst im Wundgewebe differenzieren [65]. Als Abgrenzung zur Angiogenese aus lokalen, endothelialen Vorläuferzellen wurde



hierfür der Begriff der Vaskulogenese geprägt. Das Ausmaß der Beeinflussung durch Stammzellen aus dem Knochenmark ist aktuell noch nicht vollständig geklärt. Jedoch konnten Versuche von Hayashi et al. zeigen, dass lokal applizierte mesenchymale Stammzellen einen positiven Einfluss auf die Wundheilung bei gastralen Ulzera hatten [67].

## **1.4 Förderung der Mukosaheilung**

Grundlage der verbesserten Mukosaheilung ist eine Optimierung des umgebenden Milieus. Dazu gehört im gastroduodenalen Bereich die Modifikation des Mikrobioms im Sinne der Behandlung einer H. pylori-Infektion. Grundlage der Ulkusabheilung und Komplikationsreduktion ist hier die medikamentöse Eradikationstherapie. Ebenso kann durch Faktoren wie Stressreduktion und Alkoholkarenz eine Optimierung des pH-Wertes erfolgen. Daneben gibt es zudem die Möglichkeit einer Anwendung von gezielten Agenzien, die die Heilung der Mukosa fördern. Diese werden im Folgenden kurz beschrieben.

### **1.4.1 Topisch**

Um der mit der Einnahme von NSAR einhergehenden Prostaglandin-Reduktion entgegen zu wirken, führten Silverstein et al. schon 1995 Versuche mit oral angewendetem Misoprostol durch. Hierbei konnte eine deutliche Reduktion der durch NSAR hervorgerufenen gastrointestinalen Komplikationen gezeigt werden [68]. Jedoch beschrieben die Autoren auch vermehrt Therapieabbrüche aufgrund der durch Misoprostol hervorgerufenen gastrointestinalen Nebenwirkungen wie Diarrhö.

Bei Versuchen an Ratten von Tovey et al. konnte 2015 gezeigt werden, dass eine Ernährung mit Phospholipiden und Phytosterol protektiv gegen gastrointestinale Ulzera wirken kann [69].

Nachgewiesen ist auch, dass die topische Anwendung von Kortikosteroiden die Mukosale Heilung bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen begünstigt [70]. Hierauf wird bei der Therapie von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn schon seit Jahrzehnten zurückgegriffen. Zur topischen Anwendung kommt hier vor allem Budesonid zum Einsatz. Durch den hohen First-Pass-Metabolismus in der Leber sind die systemischen Nebenwirkungen deutlich geringer als bei anderen Präparaten wie Prednisolon [71]. Analog hierzu konnte auch an der Haut die Wirkung von topischen Kortikosteroiden zur Unterstützung der Wundheilung nachgewiesen werden. So beschrieben Hofmann et al. eine verbesserte Abheilung von chronischen Ulzera am Fuß [72].

#### **1.4.2 Systemisch**

Die systemische Anwendung von Kortikosteroiden zur Mukosaheilung muss differenziert betrachtet werden. Die Ausschüttung von endogenen Kortikosteroiden scheint eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der mukosalen Barriere zu haben. Die längerfristige Anwendung von systemischen Kortikosteroiden hingegen kann die Abheilung von Ulzera und Erosionen im Magen verzögern und eine Mukosale Heilung sogar hemmen [73].

Die Wirkweise von systemischen Kortikosteroiden bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beinhaltet eine Suppression des Transkriptionsfaktors Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B), von dem in der entzündlich veränderten Mukosa erhöhte Konzentrationen nachgewiesen werden können [74]. In der gesunden Mukosa zeigt sich dieser Transkriptionsfaktor nicht erhöht. Hier scheinen die negativen Effekte einer systemischen Kortikosteroidanwendung bei der Mukosalen Heilung zu überwiegen.

Die Anwendung von Mesalazin als Aminosalicylat ist vor allem aus der Therapie der CED bekannt. Bekannt ist eine Wirkung auf Transkriptionsfaktoren in Makrophagen und damit die Reduktion der mukosalen Entzündungsreaktion. Zudem konnten Baumgart et al. nachweisen, dass Mesalazin einen direkten Einfluss auf die Zellmigration und die Proliferation von Epithelzellen hat und somit die Wundheilung positiv beeinflussen kann [75].

Azathioprin als Immunmodulator wird ebenfalls schon seit langer Zeit als Therapeutikum bei CED angewendet. Die Wirkung beruht hierbei auf einer Reduktion der entzündlichen Infiltrate in der Mukosa sowie einer Hemmung der Proliferation von Lymphozyten [76]. Dieser Effekt ist jedoch nur bei Mukosadefekten, denen eine Erkrankung mit überschießender Immunreaktion zugrunde liegt, von Vorteil. Bei Versuchen am Mausmodell konnte nämlich für Azathioprin ein negativer Effekt auf die Wundheilung mit länger andauernder Entzündungsreaktion und erhöhter Kollagenablagerung im Reparaturgewebe nachgewiesen werden [77].

In der EXTEND-Studie konnte gezeigt werden, dass Morbus-Crohn-Patienten, die mit Adalimumab, einem monoklonalen Antikörper gegen TNF- $\alpha$ , behandelt wurden, nach 12 Wochen eine signifikant höhere Rate an Mukosaler Heilung zeigten als die Kontrollgruppe [78]. Dieser Effekt beruht auf der Hemmung verschiedener Signalwege, die normalerweise durch TNF- $\alpha$  aktiviert werden können. Es werden sowohl Zelltod, Zellmigration und Zellproliferation als auch die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen gesteuert und beeinflusst [79]. Trotz der nachgewiesenen Wirkung von Anti-TNF- $\alpha$ -Medikamenten bei CED scheint die Anwesenheit von TNF- $\alpha$  in einigen murinen Modellen durchaus auch einen positiven Effekt auf die Wundheilung zu haben [80].

## **1.5 Blutungskomplikationen**

Bei einer akuten gastrointestinalen Blutung sollte der Patient nach einer Bestimmung der Vitalparameter und einer Kreislaufstabilisierung möglichst zügig einer endoskopischen Untersuchung zur Lokalisation und Therapie der Blutungsquelle zugeführt werden.

Ist die Ursache für die Blutung ein gastrointestinales Ulkus in Magen oder Kolon, so gibt es vielfache Therapiemöglichkeiten.

Die primäre endoskopische Blutstillung erfolgt zunächst mittels Injektion von zumeist adrenalinhaltiger Kochsalzlösung. Diese Injektion wird in den meisten Fällen mit einem thermischen oder mechanischen Verfahren kombiniert, um eine Rezidivprophylaxe zu gewährleisten [81]. Hierbei kommen Sonden sowohl zur elektrischen Koagulation als auch zur Argon-Plasma-Koagulation zum Einsatz. Zur mechanischen Blutstillung werden Metallclips eingesetzt. Auch die Anwendung von Fibrinkleber mittels Injektion ist möglich.

In Fällen, bei denen sich die Blutstillung durch oben genannte Methoden nicht gewährleisten lässt, kann die Anwendung von speziellen Clips oder topischen Hämostasesprays erfolgen. Sogenannte over-the-scopes-Clips sind vor allem bei Risikopatienten und komplexen Ulzera eine gute Alternative [82].

Die Idee, vor allem flächige kutane Blutungen mit einem topischen Medikament zu behandeln, gibt es schon seit einiger Zeit im militärischen Bereich. Hier finden sich Substanzen wie Kaolin, Zeolit oder Chitosan [83]. Einige dieser Substanzen werden inzwischen auch im zivilen medizinischen Bereich als Hämostatika bei verschiedenen Wundarten eingesetzt. Hemospray ist ein für die Anwendung im gastrointestinalen Bereich entwickeltes Pulver zur Blutstillung [84].

## **1.6 Hemospray**

### **1.6.1 Anwendung**

Hemospray ist ein mineralisches Pulver, das als Alternative zu den herkömmlichen Blutstillungsverfahren topisch auf die Blutung aufgebracht wird. Der wissenschaftliche Name der Substanz lautet TC-325.

Zugelassen ist dieses Medikament seit April 2013, allerdings nur für den Gebrauch im oberen Gastrointestinaltrakt. Bei Blutungen des unteren Gastrointestinaltrakts wird in begründeten Fällen ein off-label-use durchgeführt [85].

Zur Anwendung des topischen Hämostatikums bei einer Gastro- oder Koloskopie wird nach dem Aufsuchen der Blutungsquelle ein Katheter (7 oder 10 French) über den Arbeitskanal durch das Endoskop eingeführt. Anschließend wird das Pulver ohne direkten Kontakt mittels einer CO<sub>2</sub>-Kartusche auf die Blutungsquelle aufgesprüht, bis diese vollständig mit Pulver bedeckt und keine Blutung mehr zu erkennen ist. Anschließend wird der Katheter entfernt und die Endoskopie beendet.

Die Vorteile der Anwendung von Hemospray als Pulver sind vielfältig. Zunächst ist kein direkter Kontakt mit der Oberfläche notwendig. Dies ist vor allem bei vulnerablen Oberflächen wie Tumoren im Gastrointestinaltrakt von Bedeutung [86]. Zudem kann das Pulver großflächig aufgetragen werden. Bei Tumorblutungen oder Sickerblutungen nach einer ausgedehnten Schleimhautresektion wird die Therapie im Vergleich zur punktuellen Applikation eines Clips deutlich vereinfacht. Das gilt ebenfalls für Ulkusblutungen bei CED oder NSAR-induzierten Schleimhautverletzungen [87].

Ebenso ist eine genaue Identifikation der Blutungsquelle nicht erforderlich, dies ist vor allem bei endoskopisch unübersichtlichen Lokalisationen wie im Duodenum von Vorteil. Mit dem Pulver wird zudem eine Barriere zwischen dem Lumen des Gastrointestinaltrakts und der Wundfläche gebildet, wodurch die Abheilung optimiert werden kann.

### **1.6.2 Wirkweise**

Die Struktur von TC-325 ist nicht öffentlich bekannt. Studien konnten aber zeigen, dass Hemospray zu einer verkürzten clotting time führt, dies wurde ebenfalls schon früher für Kaolin gezeigt. Kaolin ist ein negativ geladenes Mineral, das die intrinsische Gerinnungskaskade aktiviert. Eine ähnliche Wirkung konnte für Hemospray nachgewiesen werden, die Prothrombinzeit verkürzte sich durch die Anwendung des Pulvers [88]. Zudem zeigte sich, dass Hemospray die Thrombusbildung verstärken kann. Bei der Anwendung in vivo konnte im elektronenmikroskopischen Bild dargestellt werden, dass Hemospray in Kontakt mit Blut eine konfluierende Masse bildet, indem die Flüssigkeit durch

das Pulver absorbiert wird [88]. Dies könnte möglicherweise die Agglutination von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten, die zur Thrombusbildung notwendig sind, vereinfachen.

## **1.7 Fragestellung**

Die Anwendung von Hemospray als Verfahren zur endoskopischen Blutstillung der oberen gastrointestinalen Blutung ist mittlerweile etabliert und findet sich auch in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten als Therapiemöglichkeit bei Ulkusblutungen, Malignomen und anderen Indikationen [81]. In einem Fallbericht aus dem Jahr 2014 wurden multiple Diclofenac-induzierte Ulzera mit akuter Blutung im rechten Hemikolon und Coecum aufgrund der diffusen Blutungslokalisation mit Hemospray behandelt. Nach der primären Anwendung von Hemospray wurde der Befund zwei Tage darauf erneut koloskopisch dargestellt und es waren deutlich fibrin-belegte, vergleichsweise gut abgeheilte Ulzera zu sehen [85]. Diese und weitere klinische Erfahrungen, unter anderem bei diffuser Kolonblutung bei CED, bildeten die Grundlage für Überlegungen zur Untersuchung des Einflusses von Hemospray auf die Heilung der Mukosa im Gastrointestinaltrakt. Ziel unserer Pilotstudie war eine unter kontrollierten Bedingungen durchgeführte Untersuchung der Anwendung von Hemospray auf künstlich induzierte Ulzera. Dabei lag der Fokus nicht wie bei vorhergehenden Untersuchungen auf der Frage nach der Effektivität der Blutstillung, sondern darauf, die Heilungstendenzen der Ulzera zu eruieren. Ein möglicher positiver Einfluss auf die Schleimhautheilung könnte so zu einer Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten von Hemospray führen. Es ist zum Beispiel an eine mögliche Anwendung von Hemospray auch bei nicht-blutenden Ulzera im Rahmen einer peptischen Ulkuskrankheit oder CED zu denken, bei denen eine beschleunigte oder unterstützte Abheilung die Komplikationsrate reduzieren könnte.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Aufbau der Pilotstudie**

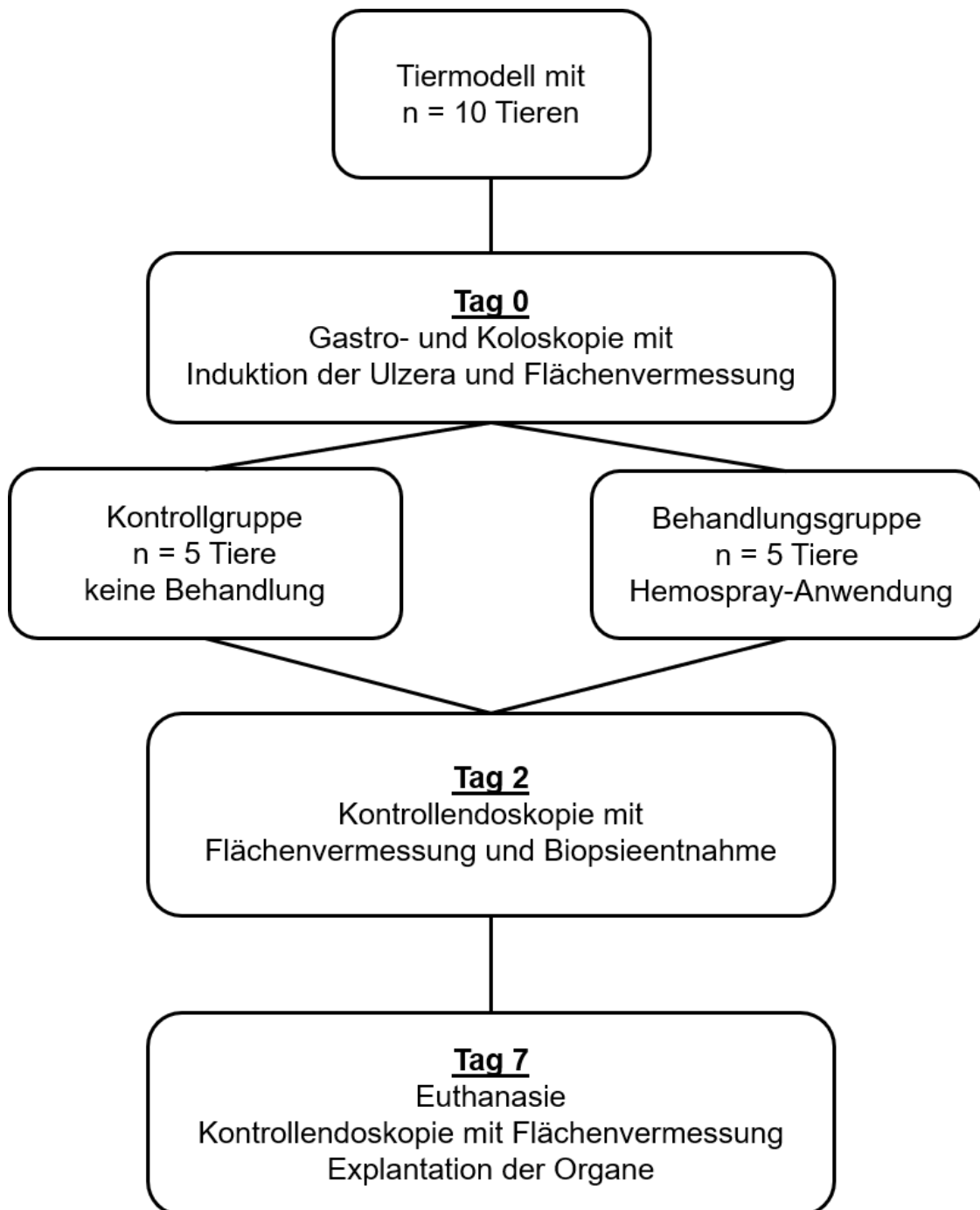
Die Wirkung von Hemospray auf die Mukosa wurde in einem Versuch an 10 Tieren überprüft.

Für die Versuche wurden 10 Schweine der Deutschen Landrasse ausgewählt. Es handelte sich hierbei um landwirtschaftliche Nutztiere, die bislang nicht in einem Versuchsvorhaben verwendet wurden. Alle Tiere stammten aus einem nach SPF-System (spezifisch-pathogen-frei) anerkanntem Zuchtbetrieb (Benz GbR, Bingen, Deutschland). Die Tiere wogen im Mittel 40,94 kg und waren alle weiblich.

Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Regierungspräsidium Tübingen unter der Nummer 35/9185.81-2/TV-Nr. M 10/15. Die Haltung der Tiere erfolgte gemäß der geltenden EU-Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Alle Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer engmaschig überwacht, zweimal täglich veterinärmedizinisch visitiert und klinisch beurteilt.

Die Tiere wurden für die Durchführung der Studie in zwei gleich große Versuchsgruppen von jeweils fünf Tieren aufgeteilt. Bei allen Tieren wurden an Tag 0 jeweils zwei Ulzera im Magen und zwei im Kolorektum gesetzt. Bei der Behandlungsgruppe wurden alle Ulzera direkt nach der Induktion einmalig mit Hemospray behandelt, bei der Kontrollgruppe erfolgte keine Behandlung. Im weiteren Verlauf wurde die Heilung der Schleimhautdefekte in den beiden Versuchsgruppen beobachtet und quantifiziert. Hierzu wurden zum einen an Tag 2 und an Tag 7 Kontrollendoskopien durchgeführt, um die Flächenveränderung der Ulzera zu bestimmen und Biopsien zu entnehmen. Zum anderen erfolgte nach Euthanasie der Tiere an Tag 7 die Entnahme der Organe und eine anschließende histologische Aufarbeitung.

Der Versuchsablauf ist in folgender Graphik (**Abb. 2-1** Versuchsablauf der Pilotstudie) veranschaulicht:



**Abb. 2-1** Versuchsablauf der Pilotstudie



## **2.2 Versuchsdurchführung**

### **2.2.1 Anästhesie**

Die Tiere wurden präoperativ drei Tage lang mit hochkalorischer Flüssignahrung (Fresubin® Original Drink, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) versorgt, direkt vor den Interventionen erfolgte eine 12-stündige Nahrungskarenz, Wasser ad libitum.

Die Prämedikation der Tiere erfolgte intramuskulär (i.m.) mittels Atropin 0,05 mg/kg KG i.m. (Atropinsulfat, Braun, Melsungen, Deutschland) und Azaperon 4,0 mg/kg KG i.m. (Stresnil®, Elanco Tiergesundheit AG, Basel, Schweiz). Die Einleitung der Narkose erfolgte anschließend mit Midazolam 1,0 mg/kg KG i.m. (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) und Ketamin 14 mg/kg KG i.m. (Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland).

Anschließend erfolgte eine Blutentnahme aus einem über eine Ohrvene eingelegten, großlumigen peripheren Venenkatheter (PVK) (Vasofix®, Braun, Melsungen, Deutschland). Mit dem Blut wurde einerseits eine venöse Blutgasanalyse (BGA) durchgeführt, andererseits eine Serumprobe für eventuelle weitere laborchemische Untersuchungen aufbewahrt. In der BGA wurde unter anderem der Hämoglobin-Wert ermittelt.

Die Intubation erfolgte mittels eines endotracheal eingelegten Tubus (Größe 6,5 mm, Hi-Contour, Mallinckrodt™ Covidien, Dublin, Irland). Während der Narkose erfolgte eine lungenprotektive Beatmung mit dem Anästhesiegerät Zeus® (Drägerwerk AG & Co. KgaA, Lübeck, Deutschland).

Die Vertiefung der Anästhesie erfolgte im Sinne einer balancierten Anästhesie über das volatile Anästhetikum Isofluran 2,0 Vol% (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) und intravenös über Propofol 2 mg/kg KG. (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland). Eine ausreichende Analgesie wurde durch Fentanyl (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) intravenös gewährleistet, initial als Bolusgabe 20-150 µg/kg KG i.v., intraoperativ kontinuierlich 100-300 µg/kg KG pro Stunde intravenös.

Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgte ebenfalls mittels Isofluran 0,8-1,4 Vol% (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) und Propofol 4 mg/kg KG pro Stunde.

Alle Tiere erhielten bei Induktion der Ulzera 40 mg Protonenpumpeninhibitor (Pantoprazol, Hexal®, Holzkirchen) i.v., anschließend außerdem zweimal täglich 40 mg Protonenpumpeninhibitor (Pantoprazol, Hexal®, Holzkirchen) per os.

Zusätzlich erhielt jedes Tier eine einmalige, intramuskuläre Antibiotika-Prophylaxe mit Amoxicillin (15 mg/kg KG, Duphamox® LA, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin).

### **2.2.2 Induktion der Ulzera und Hemospray-Anwendung an Tag 0**

Jedes Tier wurde nach Einleitung der Narkose zuerst einer Gastroskopie und direkt im Anschluss einer Koloskopie unterzogen. Vor der Koloskopie wurde das Rektum der Tiere mittels eines Wasser-Einlaufs gesäubert.

Zur Endoskopie wurde das Endoskop 13801PKS-X (Karl Storz SE & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) verwendet.

Das Vorgehen zur Induktion der Ulzera war in Magen und Darm grundsätzlich gleich. Zunächst wurde eine endoskopisch gut zugängliche Schleimhautlokalisation gewählt. Anschließend wurde die Mukosa an dieser Stelle mit verdünntem Adrenalin (Adrenalin 1:100000 verdünnt mit Natriumchlorid-Lösung, gefärbt mit Toluidinblau, Universitätsapotheke Tübingen, Deutschland) unterspritzt, um ein Abheben der Tunica mucosa von der Tela submucosa zu erreichen (**Abb. 2-2**). Zur Unterspritzung wurde eine Injektionsnadel (Medwork GmbH, Höchststadt/Aisch, Deutschland) mit dem Durchmesser 0,7 mm (23 Gauge) und einer Länge von 5 mm verwendet. Entsprechend einer endoskopischen Mukosaresektion wurde nun ein Schleimhautareal entfernt. Dazu wurde eine ovale Polypektomieschlinge (Polypectomy snare oval loop, Endo-Flex GmbH, Voerge, Deutschland) mit einem Durchmesser von 35 mm verwendet, mit der die Schleimhaut umfasst

(**Abb. 2-3**) und dann mittels Koagulation und anschließender Stromanwendung entfernt wurde (**Abb. 2-4**). Zur Koagulation und zum elektrischen Schneiden wurde das Elektrochirurgiegerät VIO® 300D (Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen, Deutschland) verwendet. Koaguliert wurde mit dem Modus Forced Coag (Upmax: 1100 Vp, Max. 60 Watt), geschnitten mit dem Modus EndoCut Q (Upmax: 770 Vp).

Das abgesetzte Mukosaresektat wurde mit Hilfe einer Polypenfalle (Polyp Trap, Endo-Flex GmbH, Voerge, Deutschland) gesichert und in Formaldehyd-Lösung 4% neutral gepuffert (Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken) fixiert.

Die Schlingenabtragung geschah an jeweils zwei Lokalisationen in Magen und Darm. So entstanden pro Tier insgesamt vier Schleimhautdefekte. Die Größe der Ulzera wurde mittels eines Zentimeter-Drahtes zur endoskopischen Größenmessung (Acrobat™ calibrated tip wire guide, Wilson-Cook Medical Inc., Winston-Salem NC, USA) mit einer Spitzenlänge von 5 cm bestimmt, der Befund und eventuell aufgetretene Komplikationen dokumentiert (**Abb. 2-5**).

Bei der Hälfte der Tiere, die als Kontrollgruppe diente, war der Eingriff hiermit beendet. Die Ulzera der anderen fünf Tiere wurden nach ihrer Induktion mit Hemospray (Cook Medical, North Carolina, USA) behandelt. Dazu wurde ein spezieller Sprühkatheter (Kathetergröße 7 French) durch den Arbeitskanal des Endoskops eingeführt (**Abb. 2-6**). Mittels einer CO<sub>2</sub>-Patrone konnte nun jedes Ulkus gezielt mit dem Pulver bedeckt werden (**Abb. 2-7**). Hiermit war auch der Eingriff bei der Behandlungsgruppe beendet.

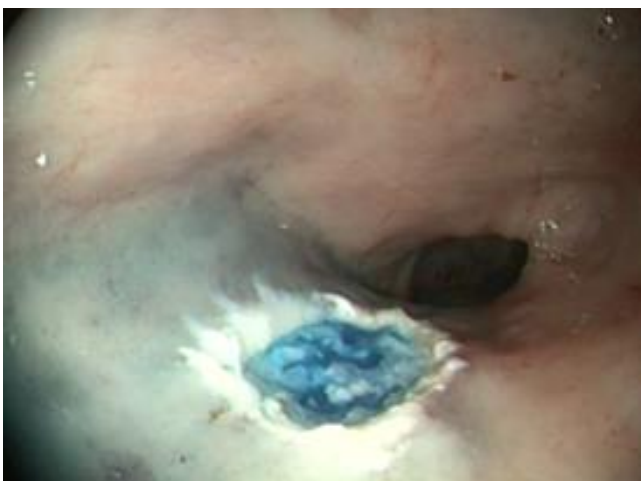
Im Folgenden sind die Abbildungen entsprechend dem zeitlichen Ablauf der Ulkusinduktion dargestellt:



**Abb. 2-2** Unterspritzung der Mukosa im Kolon mit Adrenalin bei Tier 4



**Abb. 2-3** Umfassung der unterspritzten Mukosa mit einer Diathermieschlinge



**Abb. 2-4** neu induziertes Kolonulcus



**Abb. 2-5** Fotodokumentation der Vermessung des Ulkus mittels eines Zentimeter-Drahts. Der Abstand zwischen den beiden grauen Markierungen beträgt 1 cm.



**Abb. 2-6** Einführen und Platzieren des Sprühkatheters über dem Ulkus



**Abb. 2-7** Auftragen von Hemospray auf das neu induzierte Kolonulkus

### 2.2.3 Kontrolle und Biopsieentnahme an Tag 2

Die erste Kontrolle der Ulzera erfolgte an Tag 2, 48 Stunden nach der Induktion der Ulzera (**Abb. 2-8**). Die Narkose erfolgte analog zum ersten Eingriff. Vor der Gastro- und Koloskopie wurden mittels PVK erneut eine Blutentnahme und eine BGA durchgeführt.

Im Verlauf der endoskopischen Untersuchung wurden die Ulzera dokumentiert (**Abb. 2-9**) und erneut vermessen. Mit Hilfe einer 2,2 mm großen Biopsiezange (Radial Jaw™ 4, Boston Scientific Corporation, Natick, USA) wurden vier Biopsien aus jedem Ulkus entnommen, zwei davon vom Ulkusgrund und zwei vom Ulkusrand. Diese wurden für die histologische Aufarbeitung in Formaldehyd-Lösung konserviert.

### 2.2.4 Kontrolle und Tötung an Tag 7

Prämedikation und Narkoseeinleitung erfolgten an Tag 7 wie an den vergangenen Versuchstagen. Den Tieren wurde erneut ein großlumiger PVK gelegt, um eine dritte Blutentnahme und BGA zu ermöglichen. Daraufhin erfolgte die Euthanasie der Tiere mit einer Dosis von 4-6 ml/50kg KG T61 (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) intravenös. T61 ist ein Kombinationspräparat aus Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid und Embutramid und wird in Deutschland zur Euthanasie bei zuvor narkotisierten Tieren eingesetzt.

Sofort im Anschluss erfolgte die Gastro- und Koloskopie. Dabei wurden alle Ulzera endoskopisch vermessen und dokumentiert (**Abb. 2-10**).

Anschließend wurde eine mediane Längslaparotomie durchgeführt, bei dieser wurden Magen und Rektum der Tiere entnommen. Dadurch konnten die Ulkusgrößen nach Öffnung des Magens und Umstülpen des Rektums mit einem Zentimetermaß direkt bestimmt werden (**Abb. 2-11**).

Die Organe wurden für die histologische Aufarbeitung in Formaldehyd-Lösung konserviert. Um eine Zuordnung der Ulzera vornehmen zu können, wurden diese mittels einer schwarzen Fadenmarkierung gekennzeichnet.

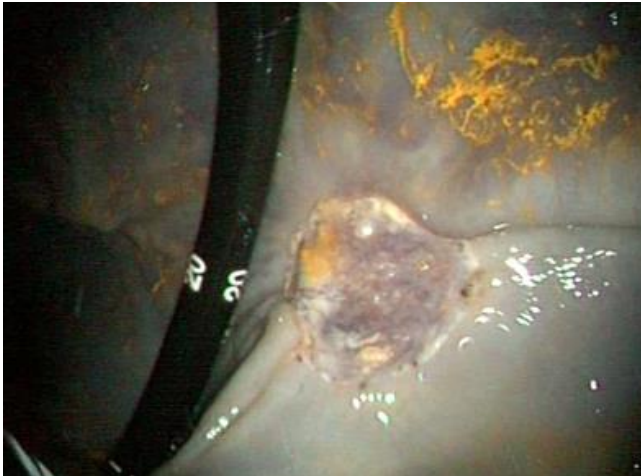
Im Folgenden ist die Abheilung eines Magenulkus im zeitlichen Verlauf dargestellt:



**Abb. 2-8** frisch induziertes Magenulkus an Tag 0 bei Tier 4



**Abb. 2-9** Magenulkus an Tag 2 bei Tier 4



**Abb. 2-10** Magenulkus an Tag 7 bei Tier 4



**Abb. 2-11** Magenulkus an Tag 7 bei Tier 4 nach Explantation des Magens

### **2.3 Messung des Hämoglobinwerts**

Bei allen Tieren wurde an Tag 0, 2 und 7 vor den endoskopischen Eingriffen eine venöse BGA entnommen. Es wurde der aktuelle Hämoglobinwert bestimmt. Die Änderung des Hämoglobinwerts im zeitlichen Verlauf wurde ausgewertet.



## 2.4 Messung der Ulkusgröße

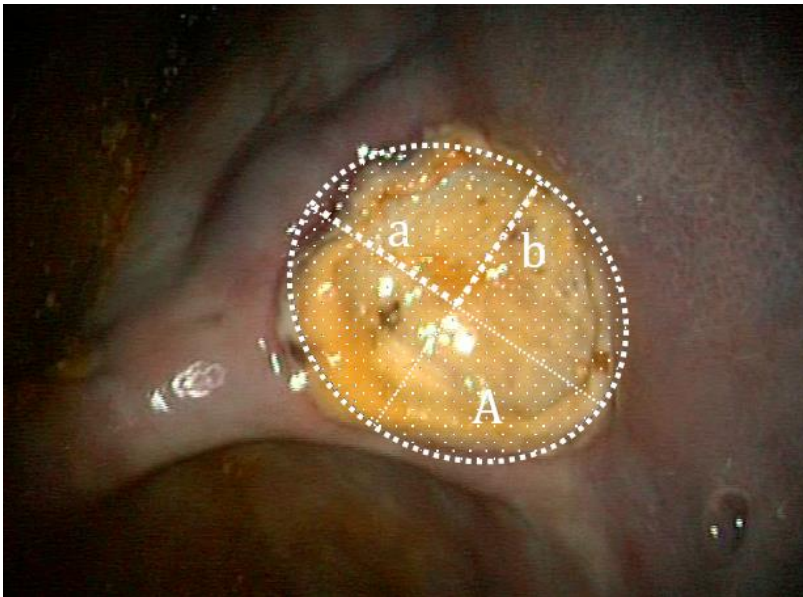
Nach Abschluss der Interventionen wurde die Größe der Ulzera anhand der endoskopischen Videodokumentation erneut bestimmt. Dazu wurden alle Ulzera anonymisiert und von zwei Personen unabhängig voneinander gesichtet. Notiert wurde dann die größte Länge des Ulkus und die darauf senkrecht stehende größte Breite (**Abb. 2-12**). Die Werte beider Personen wurden gemittelt, um möglichst realitätsgetreue Maße der Ulzera zu erhalten. Um die Fläche des Ulkus unter Annahme einer elliptischen Form näherungsweise zu errechnen, wurde folgende Formel angewendet:

$$A = \pi \times a \times b$$

*A = Fläche der Ellipse*

*a = große Halbachse*

*b = kleine Halbachse*



**Abb. 2-12** Magenulkus an Tag 2, schematisierte Darstellung der angenäherten Ulkusfläche mittels Ellipse, Tier 4

Mit dieser näherungsweisen Bestimmung der Ulkusflächen sollte die Größenveränderung des Ulkus im Verlauf der 7 Tage dokumentiert und verglichen werden.

## **2.5 Histologische Untersuchungen**

### **2.5.1 Herstellung der Präparate**

Die während der Versuche an Tag 7 entnommenen, formalinfixierten Präparate wurden durch das Pathologische Institut der Universität Tübingen (Leitung Prof. F. Fend, Ansprechpartner Prof. B. Sipos) in Paraffin eingebettet und in 5 µm dicke Präparatschnitte geschnitten. Anschließend wurden folgende histologische Färbungen durchgeführt: eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) sowie zur Kollagenfaserdarstellung eine Elastica-van-Gieson-Färbung oder eine Masson-Trichrom-Färbung. Eine immunhistochemische Färbung wurde mit einem Anti-ETS-related gene-Antikörper (ERG-Antikörper) durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden mittels eines Fotomikroskops digitalisiert und anschließend ausgewertet.

Die Biopsien von Tag 2 wurden aufgrund der hauptsächlich vorherrschenden Nekrose und dem damit einhergehenden fehlenden Erkenntnisgewinn nicht weiter ausgewertet.

### **2.5.2 Digitalisierung der Schnitte**

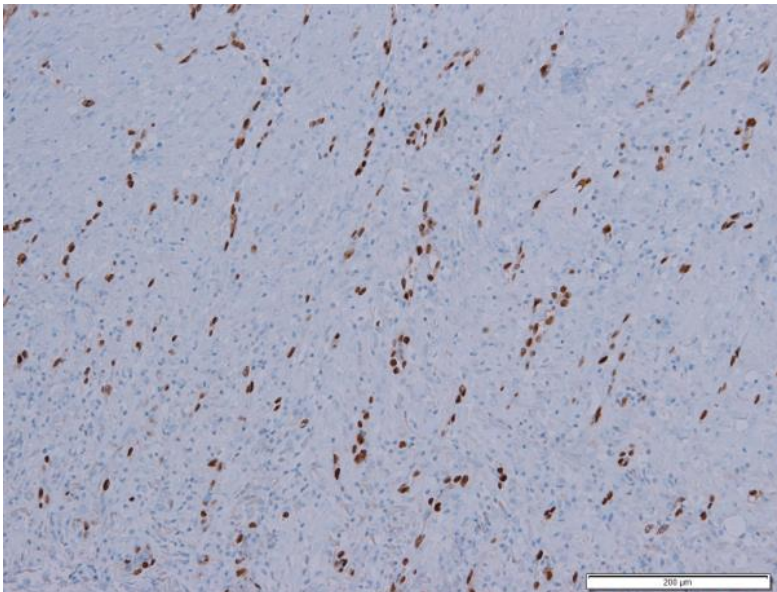
Die Schnitte wurden an einem invertierten Lichtmikroskop (Olympus CKX41, Olympus, Tokio, Japan), das mit einer digitalen Kamera (Olympus DP20, Olympus, Tokio, Japan) verbunden war, fotografiert und gesichert. Anhand dieser Bilder erfolgte die Auswertung der ERG- sowie der Kollagenfaserfärbungen. Die Präparate der ersten 4 Tiere wurden für eine grobe Orientierung zusätzlich HE-gefärbt.

### **2.5.3 Auswertung der Anti-ERG-Antikörper-Färbung**

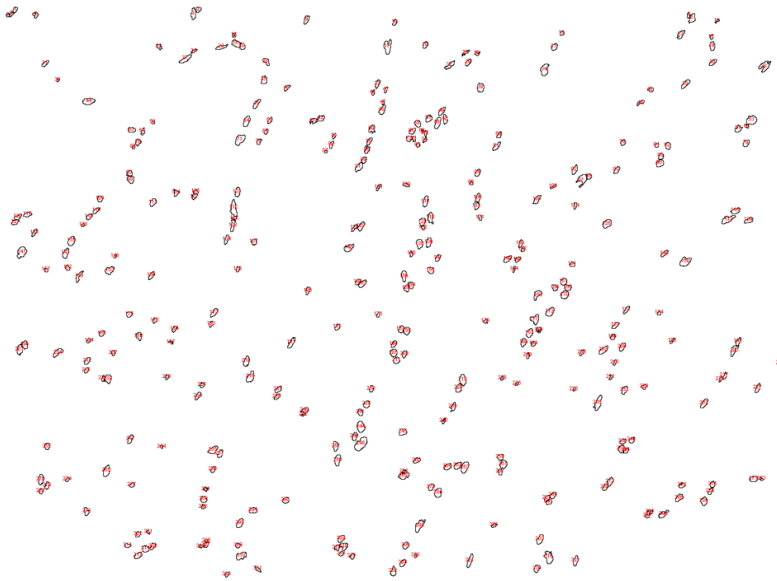
Um die Angiogenese darzustellen und zu quantifizieren, wurden die Endothelzellkerne mittels einer immunhistochemischen Färbung mit einem Antikörper gegen das Produkt des ETS-related gene (ERG) (Klon ERP3864, Abcam PLC, Cambridge, Großbritannien) sichtbar gemacht. ERG ist ein Teil der Erythroblastosevirus E26 transformierenden Sequenz (ETS) und codiert für

einen Transkriptionsfaktor, der ebenfalls ERG genannt wird. Dieses Protein wird vor allem in Endothelzellen exprimiert, daher dient der Anti-ERG-Antikörper in immunhistochemischen Färbungen vor allem dem Nachweis vaskulärer Tumoren. Zur Anwendung beim Menschen steht ein monoklonaler Anti-ERG-Antikörper vom Kaninchen zur Verfügung. Dieser Antikörper färbte in unseren zuvor durchgeführten Tests auch die porcinen ERG-Proteine an. In unseren Versuchen nutzen wir diese Anfärbung zum Nachweis der Anzahl der Endothelzellkerne und damit indirekt der Angiogenese.

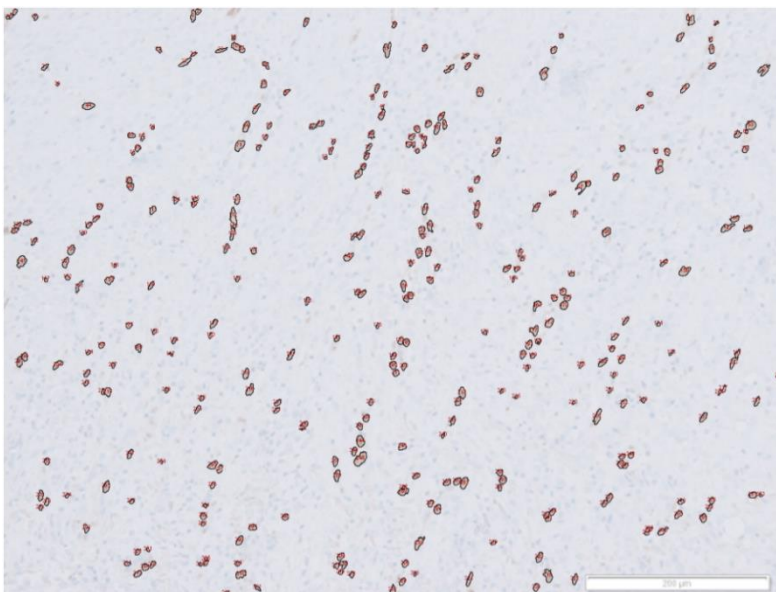
Die Bilder der ERG-gefärbten Schnitte wurden digitalisiert (**Abb. 2-13**) und mittels des Programms ImageJ (Version 1.50i, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) die Anzahl der Endothelzellkerne elektronisch ermittelt (**Abb. 2-14** und **Abb. 2-15**).



**Abb. 2-13** Ausschnitt aus einem histologischen Präparat in 20facher Vergrößerung (ein ROI), Anfärbung der Endothelzellkerne mit Anti-ERG-Antikörpern, Ulkusgrund eines Magenulkus, Tier 2



**Abb. 2-14** Markierung der angefärbten Endothelzellkerne des Präparats von **Abb. 2-13** mit ImageJ als Grundlage für die elektronische Zählung, Ulkusgrund eines Magenulkus, Tier 2



**Abb. 2-15** Übereinandergelegter histologischer Ausschnitt mit Anti-ERG-Antikörper-Färbung (**Abb. 2-13**) und durch ImageJ markierte Endothelzellkerne (**Abb. 2-14**) als Kontrolle der Übereinstimmung, Ulkusgrund eines Magenulkus, Tier 2

Für jedes Ulkus wurden zwei histologische Schnitte ausgewählt. Bei jedem Schnitt wurden je zwei region of interest (ROI) am Ulkusrand und am Ulkusgrund ausgewählt. Ein ROI entspricht einem Bildausschnitt in 20facher

Vergrößerung. Gezählt wurden die Kerne also in der Tela submucosa auf beiden Seiten des Ulkus auf Höhe der letzten intakten Krypte (Ulkusrand) und an zwei Stellen in der Mitte des Ulkus (Ulkusgrund).

Aus diesen Werten wurde jeweils ein Mittelwert für die Kerne am Rand und ein Mittelwert für die Kerne am Grund eines jeden Ulkus berechnet, welche dann statistisch verglichen wurden.

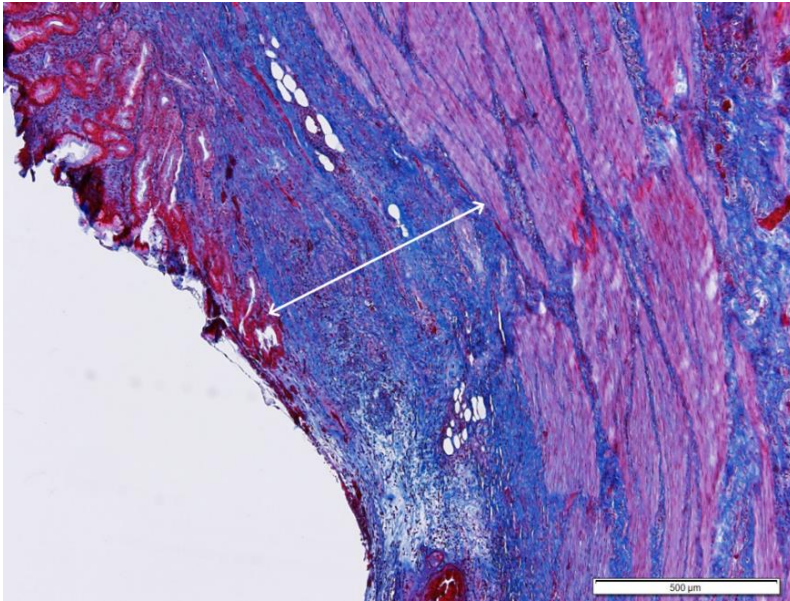
#### **2.5.4 Auswertung der Kollagenfärbungen**

Zur Darstellung der Kollagenfasern erfolgte bei den ersten vier Tieren eine Elastica-van-Gieson-Färbung. Bei den anderen 6 Tieren wurden die Schnitte nach Masson-Trichrom angefärbt. Beide Färbungen sind etabliert, um Kollagenfasern darzustellen.

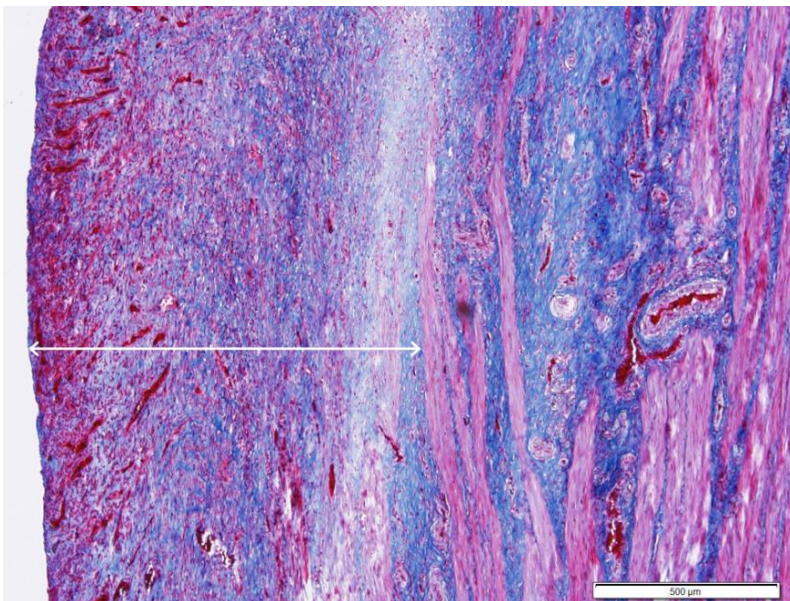
Die Auswertung der Kollagenfärbungen erfolgte durch Dickenmessung der Kollagenfaserschicht an drei festgelegten Punkten des Ulkus. Dazu wurden für jedes Ulkus zwei histologische Schnitte ausgewählt. Anschließend wurde bei jedem Schnitt mit ImageJ die Dicke der Kollagenfaserschicht an beiden angeschnittenen Ulkusrändern und in der Mitte des Ulkus vermessen. Der Messpunkt am Rand des Ulkus wurde wieder anhand der letzten Krypte des intakten Epithels definiert, gemessen wurde hier vom Grund der Krypte (**Abb. 2-16** und **Abb. 2-18**). Als Messpunkt für den Ulkusgrund wurde die Mitte zwischen beiden Ulkusrändern definiert. In die Tiefe wurde die Messgrenze als Beginn der Tunica muscularis festgelegt und die Messung senkrecht zu dieser durchgeführt (**Abb. 2-17**).

Die Dicke der Kollagenfaserschicht wurde vermessen und anschließend wurde für jedes Ulkus jeweils ein Mittelwert für Ulkusrand und Ulkusgrund errechnet.

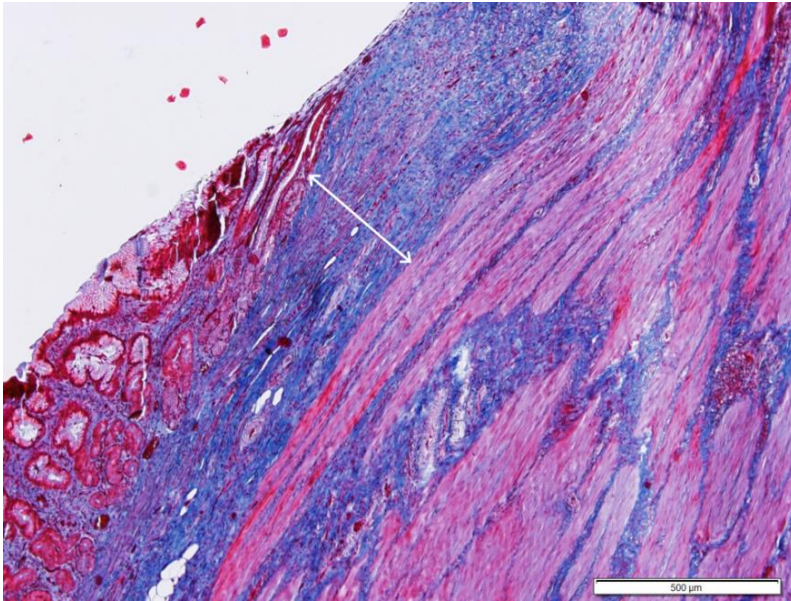




**Abb. 2-16** Ausschnitt aus einem histologischen Schnitt in 20facher Vergrößerung mit Masson-Trichrom-Färbung, Ulkusrand 1, Magenulkus, Tier 5. Der weiße Pfeil markiert die Dicke der Kollagenfaserschicht vom Grund der letzten Krypte bis zur Tunica muscularis.



**Abb. 2-17** Ausschnitt aus einem histologischen Schnitt in 20facher Vergrößerung mit Masson-Trichrom-Färbung, Ulkusgrund, Magenulkus, Tier 5. Der weiße Pfeil markiert die Dicke der Kollagenfaserschicht von der Oberfläche bis zur Tunica muscularis.



**Abb. 2-18** Ausschnitt aus einem histologischen Schnitt in 20facher Vergrößerung mit Masson-Trichrom-Färbung, Ulkusrand 2, Magenulkus, Tier 5. Der weiße Pfeil markiert die Dicke der Kollagenfaserschicht vom Grund der letzten Krypte bis zur Tunica muscularis.

## 2.6 Statistik

Die statistischen Berechnungen und die Erstellung der Grafiken erfolgten mit der Statistiksoftware SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Die Ergebnisse wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Aufgrund der geringen Fallzahl und der fehlenden Normalverteilung wurden nicht-parametrische Methoden zur Signifikanztestung genutzt. Bei verbundenen Stichproben wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet, bei unverbundenen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test. Beim Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurden die Ergebnisse als asymptotische Signifikanz angegeben. Beim Mann-Whitney-U-Test wurde aufgrund der Fallzahl von jeweils 20 Ulzera in Magen und Kolon die exakte Signifikanz angegeben. Als signifikant gilt ein p-Wert  $<0,05$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Endoskopische Prozedur

Die endoskopische Prozedur erfolgte in verschiedenen Schritten. Vor dem Eingriff wurde der Hämoglobin-Wert bestimmt. Im Rahmen der Endoskopie wurde die Mukosa zunächst unterspritzt, abgetragen und das entstandene Ulkus vermessen.

##### 3.1.1 Unterspritzung

Zur Unterspritzung der Mukosa wurde ein Gemisch aus Adrenalin, Toluidinblau zur Färbung und Natriumchlorid (NaCl) zur Verdünnung verwendet, um anschließend eine elektrische Schlingenabtragung zu ermöglichen. Dazu wurde die Mukosa im Magen mit durchschnittlich 7 ml (Min. 2, Max. 20) des Gemisches unterspritzt. Bei der Kontrollgruppe wurden 7,7 ml (Min. 2, Max. 20) benötigt, um ein ausreichendes Abheben der Mukosa zu erreichen, bei der Hemospray-Gruppe waren es 6,2 ml (Min. 2, Max. 15).

Im Vergleich zum Magen unterschied sich die Menge im Kolon nur wenig, hier wurden im Mittel 6,5 ml (Min. 2, Max. 18) benötigt. Bei der Kontrollgruppe wurde eine mittlere Menge von 6,6 ml (Min. 2, Max. 13) verwendet, während bei den Hemospray-Tieren 6,3 ml (Min. 2, Max. 18) benötigt wurden.

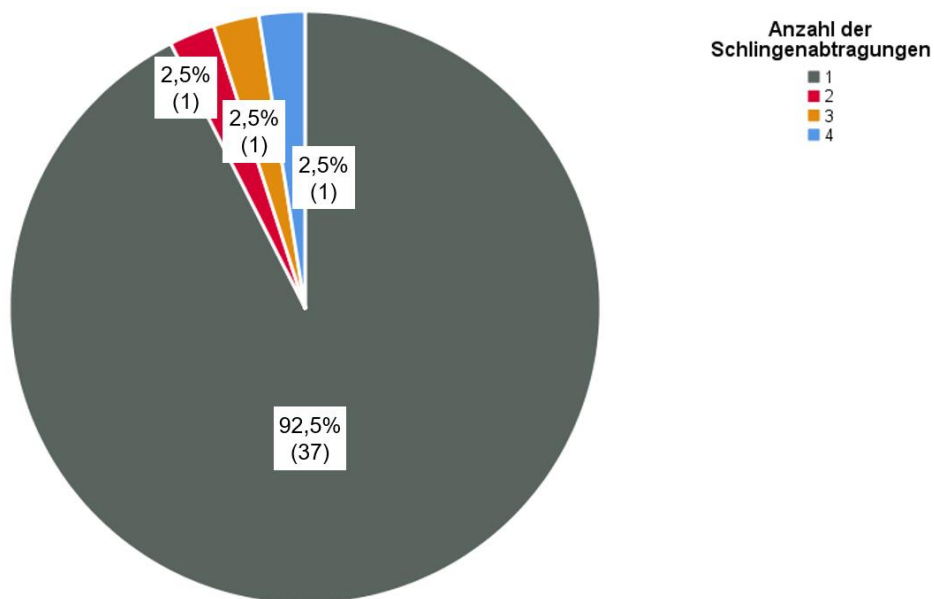
**Tabelle 3-1** Menge des zur Unterspritzung der Mukosa verwendeten, mit NaCl verdünnten Adrenalins in ml (Standardabweichung) klassifiziert nach Hemospray-Anwendung

	Adrenalin in ml	
	Magen	Kolon
<b>Kontrollgruppe</b>	7,7 (6,8)	6,6 (3,8)
<b>Hemospray-Gruppe</b>	6,2 (5,0)	6,3 (5,7)
<b>Gesamt</b>	7,0 (5,8)	6,5 (4,8)



### 3.1.2 Schlingenabtragung

Zur Induktion eines ausreichend großen Ulkus genügte bei 37 von 40 Ulzera eine einmalige Schlingenabtragung. Bei einem Ulkus waren 2 Schlingenabtragungen notwendig. Bei einem weiteren Ulkus waren 3 und bei einem dritten Ulkus insgesamt 4 Schlingenabtragungen erforderlich. Alle drei Ulzera, bei denen eine mehrfache Abtragung durchgeführt werden musste, befanden sich im Magen von Tieren der Kontrollgruppe.



**Abb. 3-1** Anzahl der durchgeführten Schlingenabtragungen zur Induktion eines ausreichend großen Ulkus in Magen oder Kolon

### 3.1.3 Dauer der Ulkusinduktion

Die Eingriffsdauer, die benötigt wurde, um ein Ulkus zu induzieren, errechnete sich von Beginn der Unterspritzung bis zur Abtragung der Mukosa (**Tabelle 3-2**). Die mittlere Dauer betrug im Magen 13 Minuten und 30 Sekunden (Min. 2, Max. 80). Bei der Unterscheidung in Kontrollgruppe und Hemospray-Gruppe ergab sich folgende Dauer: Kontrollgruppe 17 Minuten und 6 Sekunden (Min. 2, Max. 80), Hemospray-Gruppe 9 Minuten und 48 Sekunden (Min. 2, Max. 59). Im Kolon ergab sich eine insgesamt deutlich geringere mittlere Dauer von 3 Minuten und 30 Sekunden (Min. 1, Max. 11). Im Mittel wurden 3 Minuten und 36

Sekunden bei der Kontrollgruppe (Min. 1, Max. 11) und 3 Minuten und 20 Sekunden bei der Hemospray-Gruppe (Min. 1, Max. 7) benötigt.

**Tabelle 3-2** Dauer der Ulkusinduktion von Beginn der Unterspritzung bis zur vollständigen Abtragung der Mukosa in Minuten (Standardabweichung) klassifiziert nach Hemospray-Anwendung

	Dauer der Ulkusinduktion in Minuten	
	Magen	Kolon
<b>Kontrollgruppe</b>	17,1 (25,8)	3,6 (3,1)
<b>Hemospray-Gruppe</b>	9,8 (17,5)	3,3 (2,1)
<b>Gesamt</b>	13,5 (21,8)	3,5 (2,6)

### 3.1.4 Ulkusgröße nach Induktion

Nach der Schlingenabtragung der Mukosa am Tag der Induktion wurde die Größe des neu entstandenen Schleimhautdefektes mit einem Zentimeter-Draht vermessen, um Ausgangswerte für die Flächenveränderung im zeitlichen Verlauf zu ermitteln (**Tabelle 3-3**).

Die mittlere Fläche der an Tag 0 neu induzierten Ulzera lag im Magen bei 494,5 mm<sup>2</sup> (Min. 137,4, Max. 1328,9), bei der Kontrollgruppe bei 383,9 mm<sup>2</sup> (Min. 137,4, Max. 832,5), bei der Hemospray-Gruppe bei 605,2 mm<sup>2</sup> (Min. 219,9, Max. 1328,9).

Im Kolon war der Mukosadefekt mit einer Fläche von 178,5 mm<sup>2</sup> (Min. 60,5, Max. 377) im Mittel deutlich kleiner. Bei der Kontrollgruppe lag die Fläche bei 206,3 mm<sup>2</sup> (Min. 60,5, Max. 254,5), bei der Hemospray-Gruppe bei 150,7 mm<sup>2</sup> (Min. 86,4, Max. 377).

**Tabelle 3-3** mittlere Ulkusgröße der neu induzierten Ulzera an Tag 0 in mm<sup>2</sup> (Standardabweichung) klassifiziert nach Hemospray-Anwendung

	<b>Ulkusgröße nach Induktion an Tag 0</b>	
	Magen	Kolon
<b>Kontrollgruppe</b>	383,9 (251,5)	206,3 (68,7)
<b>Hemospray-Gruppe</b>	605,2 (330,6)	150,7 (101,8)
<b>Gesamt</b>	494,5 (307,6)	178,5 (89,2)

### 3.1.5 Komplikationen

Zu den wichtigsten Komplikationen eines endoskopischen Eingriffs mit Abtragung der Mukosa gehören Blutungen und die Perforation von Magen oder Darm. Bei der Induktion der insgesamt 40 Ulzera bei 10 Tieren in unseren Versuchen kam es in keinem Fall zu einer Perforation. Bei zwei Interventionen trat eine vermehrte Blutung bei der Schlingenabtragung der Mukosa auf. In beiden Fällen wurden jeweils zwei Clips (Resolution™ Clip, Boston Scientific Corporation, Natick, USA) zur Blutstillung verwendet. Diese befanden sich bei der Organexplantation immer noch in loco.

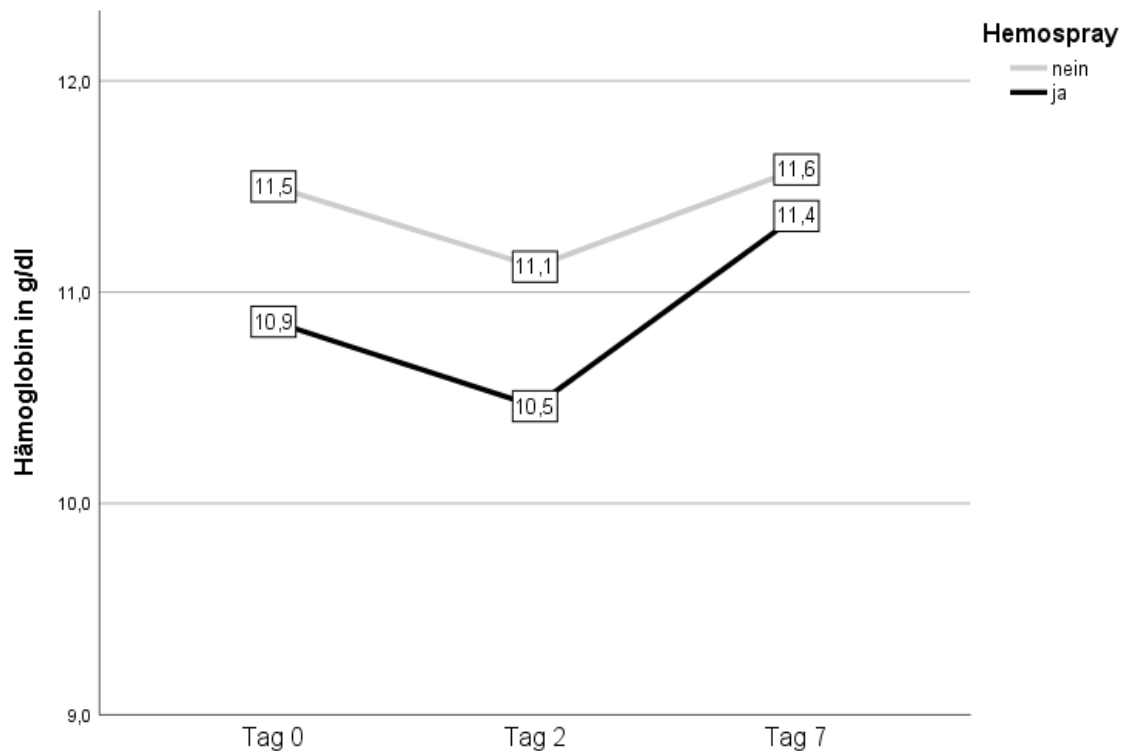
Die beobachteten Komplikationen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

**Tabelle 3-4** Komplikationen der endoskopischen Prozeduren bei der Induktion aller 40 Ulzera (%-Angabe), davon jeweils 20 Ulzera in der Kontrollgruppe und 20 Ulzera in der Hemospray-Gruppe

<b>Komplikationen</b>	<b>Kontrollgruppe</b>	<b>Hemospray-Gruppe</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Blutung</b>	0 (0%)	2 (10%)	2 (5%)
<b>Perforation</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

### 3.1.6 Hämoglobin

Bei allen Tieren wurde mittels einer venösen BGA direkt vor jedem endoskopischen Eingriff der Hämoglobin-Wert im Blut bestimmt. So ergaben sich Verlaufswerte von Tag 0, Tag 2 und Tag 7.



**Abb. 3-2** mittlere Hämoglobinwerte der Tiere in g/dl im zeitlichen Verlauf klassifiziert nach Hemospray-Anwendung

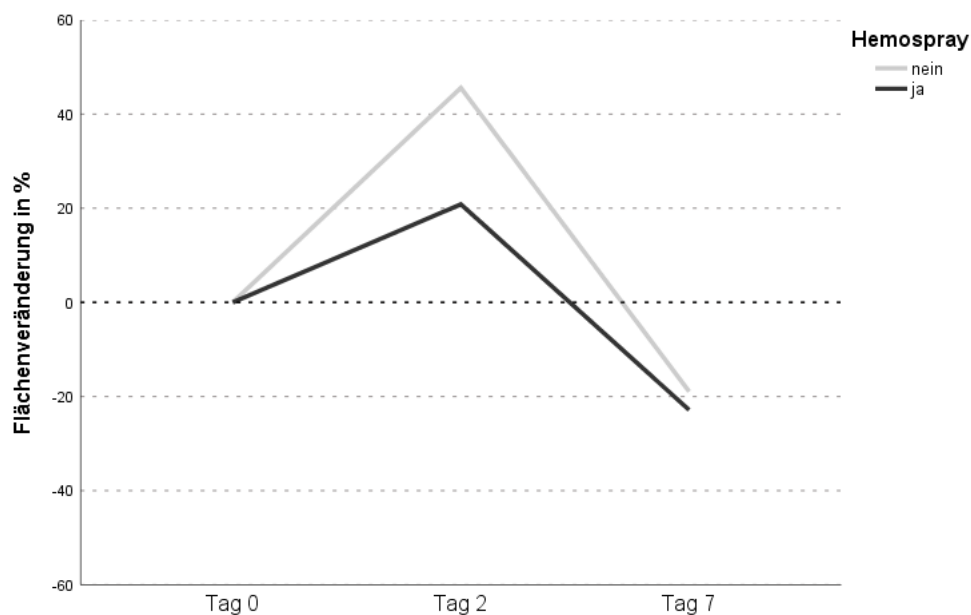
Im Mittel fielen die Hämoglobinwerte bei beiden Gruppen von Tag 0, dem Zeitpunkt der Ulkusinduktion, zu Tag 2, dem Zeitpunkt der ersten Kontrollendoskopie, um 0,4 g/dl ab. In beiden Gruppen stieg der Hämoglobin-Gehalt im Blut im Verlauf von Tag 2 auf Tag 7 wieder an, bei der Kontrollgruppe um 0,5 g/dl, bei der Hemospray-Gruppe sogar um 0,9 g/dl. Der unterschiedliche Anstieg beider Gruppen von Tag 2 auf Tag 7 ist jedoch nicht signifikant (exakte Signifikanz  $p=0,548$ ).

## 3.2 Mukosaheilung

### 3.2.1 Flächenveränderung der Ulzera

#### Magen

Um einen Einfluss des Hemosprays auf die Abheilung der Ulzera darzustellen, wurde auch die Flächenveränderung der Ulzera im zeitlichen Verlauf als Parameter genutzt. Hierzu wurde die Größe des Ulkus am Tag der Induktion als 100%-Wert gesetzt und die prozentuale Flächenvergrößerung oder -verkleinerung berechnet. Hierbei ergab sich im Magen ein im Vergleich zum Kolon differierendes Bild:



**Abb. 3-3** Flächenveränderung der Ulzera im Magen in % der Ausgangsfläche im zeitlichen Verlauf klassifiziert nach Hemospray-Anwendung

Als Ausgangswert der Flächenveränderung dienten die bei der Induktion der Ulzera an Tag 0 gemessenen Werte. Die Flächen der neu induzierten Ulzera hatten eine Größe zwischen mindestens 60,5 mm<sup>2</sup> und höchstens 1328,9 mm<sup>2</sup>. Um die Abheilung der Mukosa besser zu vergleichen, wurde die Veränderung

der Ulkusfläche im Laufe der Zeit als Parameter herangezogen. Es wird eine relative Größenzunahme oder -abnahme des Ulkus dargestellt.

An Tag 2 zeigte sich in der Kontrollendoskopie bei beiden Gruppen ein deutlicher Anstieg der Ulkusfläche. Bei den unbehandelten Tieren stieg die Fläche um im Mittel  $45,6 \% \pm 93,0 \%$  (Min.  $-46,7$ , Max.  $260,6$ ) an, bei den behandelten Tieren um  $20,8 \% \pm 30,9 \%$  (Min.  $-28,9$ , Max.  $68,8$ ).

Die Flächenvergrößerung vom Tag der Induktion bis zur Kontrollendoskopie an Tag 2 war bei der Gruppe der unbehandelten Tiere nicht signifikant (asymptotische Signifikanz  $p=0,241$ ), während sich die Zunahme bei der Hemospray-Gruppe als signifikant herausstellte (asymptotische Signifikanz  $p=0,037$ ).

An Tag 7 ließ sich schließlich in beiden Gruppen eine signifikant kleinere Ulkusfläche als zum Zeitpunkt der vorherigen Kontrolle an Tag 2 feststellen (asymptotische Signifikanz Kontrollgruppe  $p=0,008$ , Hemospray-Gruppe  $p=0,037$ ). Bei den unbehandelten Tieren verkleinerte sich die Fläche um  $-19,0 \% \pm 69,1 \%$  (Min.  $-76,0$ , Max.  $136,8$ ) im Vergleich zur Ausgangsfläche von Tag 0. Bei der Hemospray-Gruppe zeigte sich ein Abfall um  $-22,8 \% \pm 47,6 \%$  (Min.  $-67,1$ , Max.  $79,7$ ).

Weder an Tag 2 (exakte Signifikanz  $p=0,971$ ) noch an Tag 7 (exakte Signifikanz  $p=0,684$ ) war der Unterschied beider Gruppen bei der Flächenveränderung der Magenzulzera signifikant.

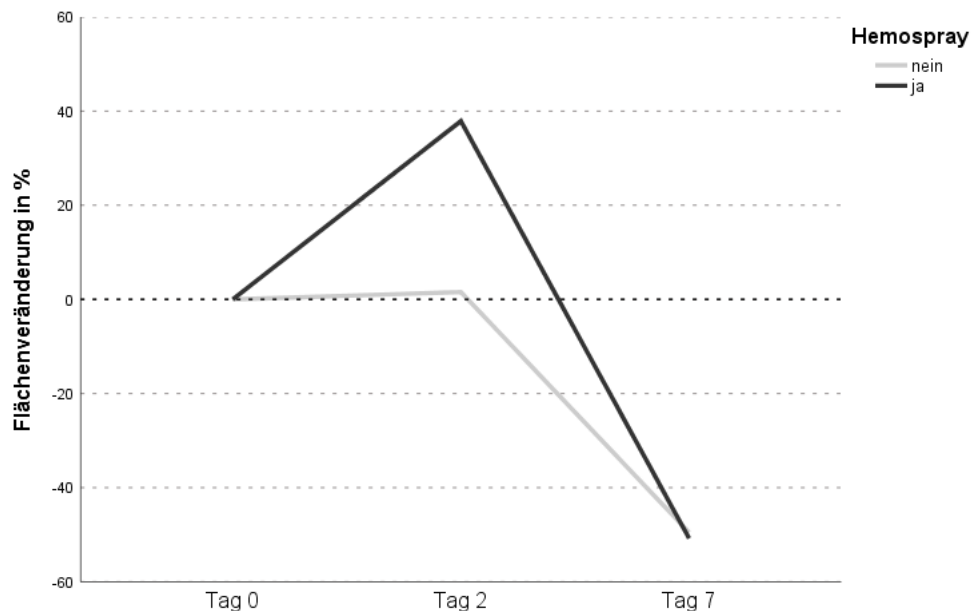
Folgende Tabelle zeigt die absoluten Ulkusgrößen im Magen an Tag 2 und Tag 7:

**Tabelle 3-5** absolute Ulkusgröße im Magen in mm<sup>2</sup> (Standardabweichung) an Tag 0, Tag 2 und Tag 7, klassifiziert nach Hemospray-Anwendung

	Ulkusgröße im Magen					
	Tag 0		Tag 2		Tag 7	
<b>Kontrollgruppe</b>	383,9 (251,5)	Min. 137,4 Max. 832,5	440,8 (198,5)	Min. 219,9 Max. 706,9	254,0 (199,9)	Min. 82,9 Max. 706,9
<b>Hemospray-Gruppe</b>	605,2 (330,6)	Min. 219,9 Max. 1328,9	695,8 (349,6)	Min. 290,6 Max. 1335,2	498,5 (459,9)	Min. 86,4 Max. 1605,8

## Kolon

Auch im Kolon wurde die Fläche der Ulzera im zeitlichen Verlauf gemessen und die Veränderung als Parameter herangezogen. Dabei ergab sich folgende graphische Darstellung:



**Abb. 3-4** Flächenveränderung der Ulzera im Kolon in % der Ausgangsfläche im zeitlichen Verlauf klassifiziert nach Hemospray-Anwendung

Beide Gruppen zeigten bei der ersten Kontrollendoskopie eine Größenzunahme der Ulzera, wobei diese bei den unbehandelten Tieren nur bei 1,54 % ± 89,1 % (Min. -67,8, Max. 240,9), bei den behandelten Tieren jedoch bei 37,9 % ± 79,7 % (Min. -56,6, Max. 205,4) des Ausgangswertes an Tag 0 lag.

Im weiteren Verlauf bis Tag 7 nach der Induktion verkleinerte sich die Ulkusfläche: Die Fläche der unbehandelten Tiere im Mittel um -49,5 % ± 38,4 % (Min. -90,9, Max. 42,9) und die der Hemospray-Gruppe um -50,8 % ± 39,4 % (Min. -91,2, Max. 47,3).

Die an Tag 7 festgestellte Ulkusgröße war, wie auch im Magen, in beiden Gruppen signifikant kleiner als an Tag 2 (asymptotische Signifikanz Kontrollgruppe p=0,017, Hemospray-Gruppe p=0,005).

Der Unterschied beider Gruppen war weder an Tag 2 (exakte Signifikanz p=0,165) noch an Tag 7 (exakte Signifikanz p=0,796) signifikant.

Bei der Flächenzunahme vom Tag der Induktion zu Tag 2, dem Tag der ersten Messung, zeigte sich keine Signifikanz in beiden Gruppen (asymptotische Signifikanz Kontrollgruppe p=0,203, Hemospray-Gruppe p=0,241).

Die absoluten Größen der Ulkusflächen im Kolon zeigt folgende Tabelle:

**Tabelle 3-6** absolute Ulkusgröße im Kolon in mm<sup>2</sup> (Standardabweichung) an Tag 0, Tag 2 und Tag 7, klassifiziert nach Hemospray-Anwendung

	Ulkusgröße im Kolon					
	Tag 0		Tag 2		Tag 7	
<b>Kontrollgruppe</b>	206,3 (68,7)	Min. 60,5, Max. 254,5	127,2 (67,2)	Min. 31,4 Max. 246,2	61,9 (30,1)	Min. 16,1 Max. 106,8
<b>Hemospray-Gruppe</b>	150,7 (101,8)	Min. 86,4, Max. 377	242,1 (113,6)	Min. 84,8 Max. 461,4	83,6 (48,7)	Min. 16,1 Max. 176,3

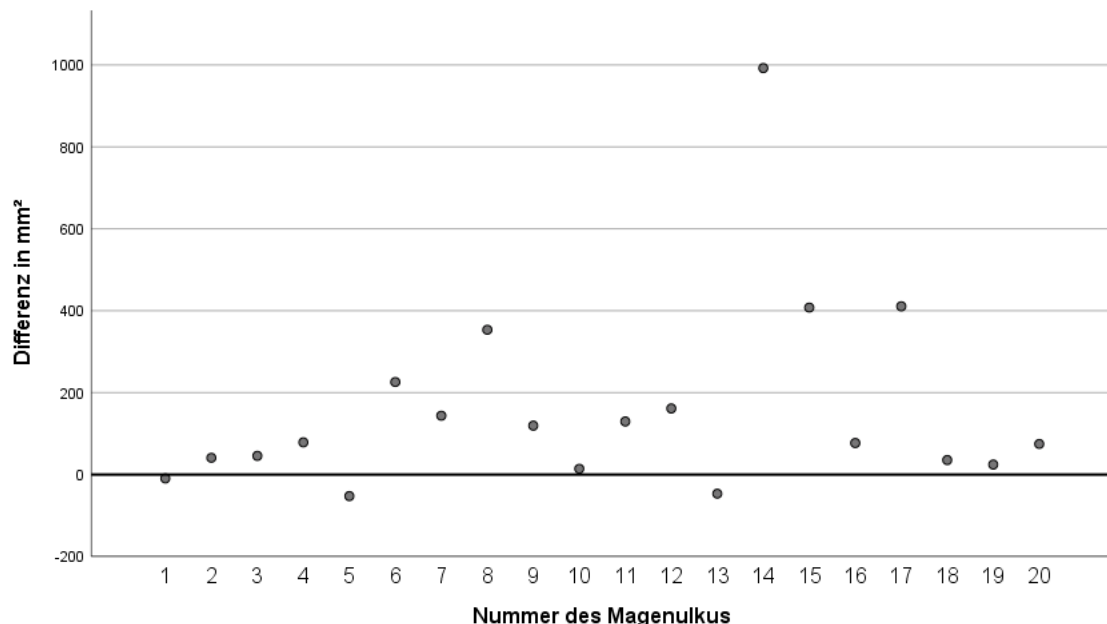


### 3.2.2 Vergleich der endoskopischen und direkten Flächenmessung an Tag 7

An Tag 7 der Versuche wurden die Tiere erneut endoskopiert und die Ulzera vermessen. Direkt danach erfolgte die Explantation der Organe und die direkte Messung der Ulkusgrößen an den eröffneten Organen. Die beiden so ermittelten Werte wurden verglichen. Zur Darstellung der Messunterschiede wurden die Differenzen beider Werte berechnet.

#### Magen

Im Magen ergab sich daraus folgende Graphik:

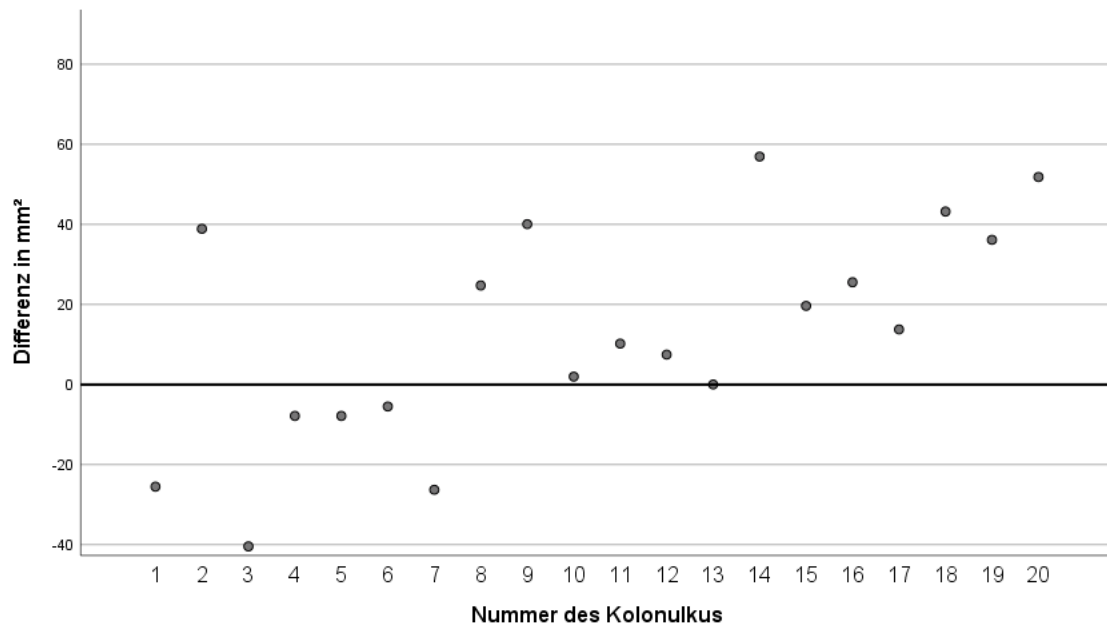


**Abb. 3-5** Differenz zwischen endoskopisch und nach der Explantation gemessener Ulkusfläche für jedes Magenulkus in mm<sup>2</sup>

Die Differenzen für jedes Magenulkus wurden in einem Streudiagramm aufgetragen. Ein Wert  $>0$  zeigte hierbei an, dass die endoskopische Messung größere Werte als die anschließende direkte Messung am Präparat ergab. Im Magen war die endoskopische Messung in 85% (17 von 20 Ulzera) der Fälle größer als die Messung nach der Explantation, in 15% (3 von 20 Ulzera) der Fälle wurde das Ulkus nach der Explantation größer gemessen.

## Kolon

Im Kolon zeigte sich hingegen ein geringerer Anteil an endoskopisch größer gemessenen Ulzera als im Magen:



**Abb. 3-6** Differenz zwischen endoskopisch und nach der Explantation gemessener Ulkusfläche für jedes Kolonulkus in mm<sup>2</sup>

Hier war die endoskopische Messung in 65% (13 von 20 Ulzera) der Fälle größer als die direkte Messung, die wiederum in 30% (6 von 20 Ulzera) der Fälle größer war. Bei einem Ulkus (5%) waren die während der Endoskopie und die anschließend gemessene Größe identisch.

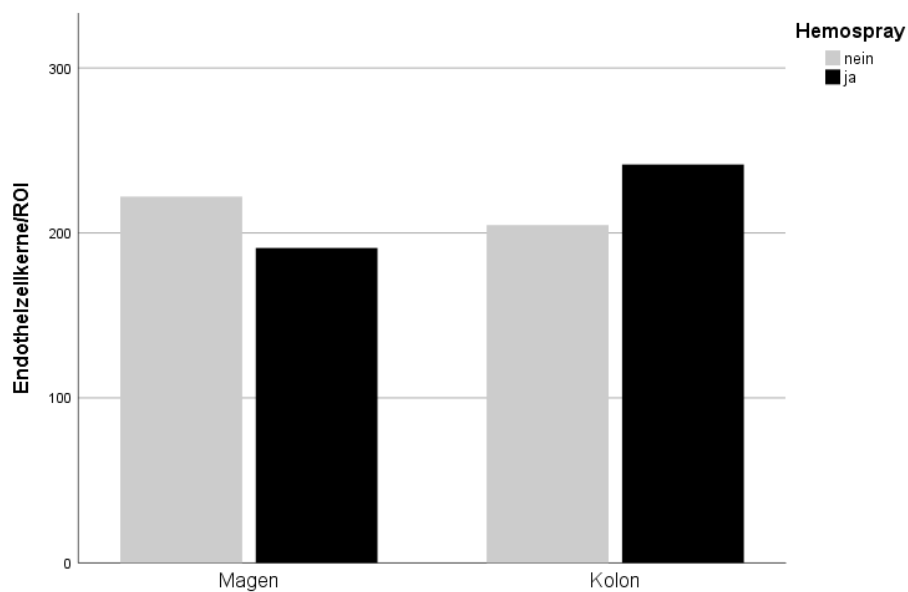
Auf eine ausführliche statistische Analyse des Unterschiedes beider Messmethoden mittels Bland-Altman-Plot wurde auch aufgrund der geringen Fallzahl verzichtet.

Diese Tendenzen unterstützen die Entscheidung, für die Auswertung der Flächenveränderung die endoskopisch gemessenen Werte von Tag 7 zu verwenden, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den zuvor an Tag 2 ebenfalls endoskopisch erhobenen Werten zu gewährleisten.

### 3.2.3 Angiogenese

Zur Bestimmung der Angiogenese erfolgte eine immunhistochemische Färbung und Auszählung der Endothelzellkerne in den an Tag 7 explantierten Organen.

Bei der Gesamtauswertung der Endothelzellkerndichte zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse für Magen und Kolon. Eine höhere Endothelzellkerndichte diente als Marker für eine vermehrte Angiogenese.



**Abb. 3-7** Anzahl der Endothelzellkerne pro ROI (region of interest, entspricht einem Mikroskopierfeld in 200facher Vergrößerung) klassifiziert in Magen und Kolon und Hemospray-Anwendung

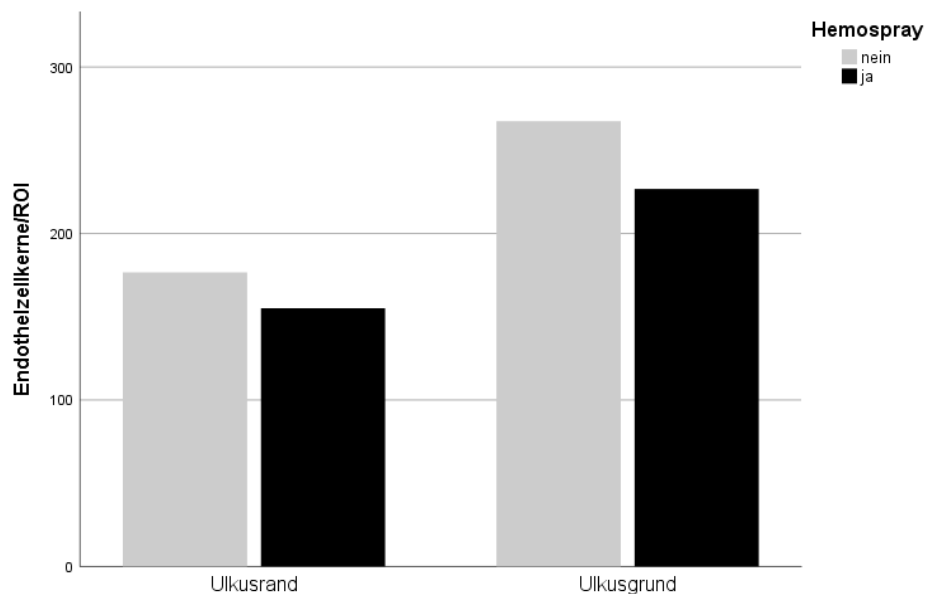
Im Magen fanden wir bei den mit Hemospray behandelten Tieren an Tag 7 die Tendenz zu einer verminderten Vaskularisierung im Sinne einer geringeren Endothelzellkerndichte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei lag der Wert bei der Kontrollgruppe bei durchschnittlich 222 Kernen/ROI (Min. 137,8, Max. 309,1) und bei der Hemospray-Gruppe bei 190,9 Kernen/ROI (Min. 123,7, Max. 283,5).

Im Kolon hingegen konnte man bei den behandelten Ulzera mehr Endothelzellkerne finden. Nach einer Behandlung ergab sich ein Mittelwert von 241,5 Kernen/ROI (Min. 151,4, Max. 326,7), ohne Behandlung ein Wert von 204,8 Kernen/ROI (Min. 161,9, Max. 243,6).

Die Unterschiede der beiden Behandlungsgruppen waren weder im Magen (exakte Signifikanz  $p=0,436$ ) noch im Kolon (exakte Signifikanz  $p=0,123$ ) signifikant.

## Magen

Bei den insgesamt 20 Ulzera im Magen unterschieden wir jeweils in Ulkusrand und Ulkusgrund (**Abb. 3-8**).



**Abb. 3-8** Endothelzellkerndichte der Magen-Ulzera an Ulkusrand und Ulkusgrund

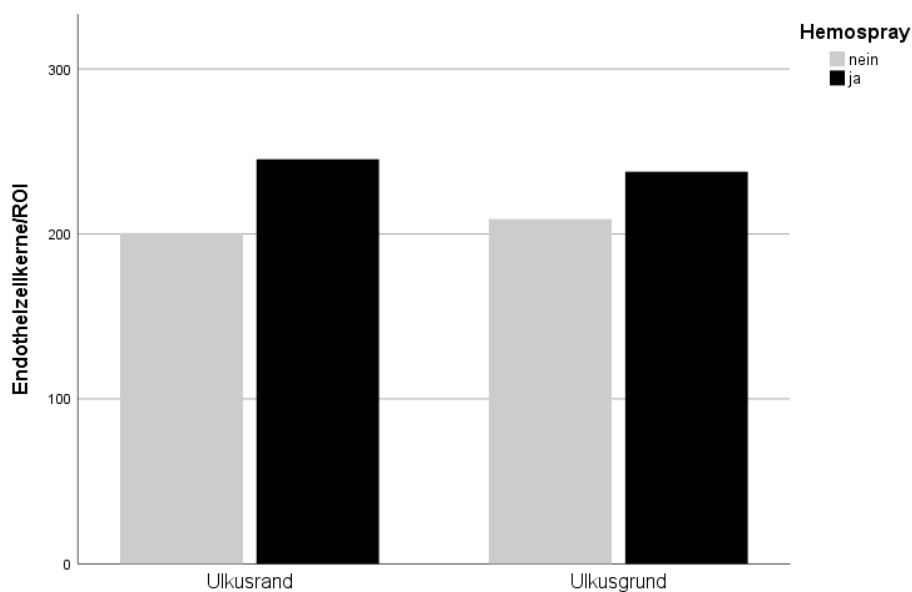
Bei der Kontrollgruppe zeigte sich am Ulkusrand eine mittlere Endothelzellkerndichte von 176,6 Kernen/ROI (Min. 121,5, Max. 236,5), bei der Hemospray-Gruppe dagegen ein Wert von 155,1 Kernen/ROI (Min. 97,9, Max. 250,4).

Am Ulkusgrund stellte sich eine ähnliche Konstellation dar. Bei den unbehandelten Tieren lag der Mittelwert bei 267,4 Kernen/ROI (Min. 154,1 Max. 381,7), nach Hemospray-Anwendung dagegen bei 226,7 Kernen/ROI (Min.136,9 Max. 316,6) und damit etwas niedriger.

Die Signifikanztestung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test und ergab am Ulkusrand eine exakte Signifikanz von  $p=0,165$ , am Ulkusgrund von  $p=0,393$ . Es ergibt sich somit kein signifikanter Unterschied zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe.

### Kolon

Dieselbe Differenzierung in Ulkusrand und -grund erfolgte für die im Kolon induzierten Ulzera. Hier zeigte sich eine entgegengesetzte Tendenz im Vergleich zum Magen (**Abb. 3-9**).



**Abb. 3-9** Endothelzellkerndichte der Kolon-Ulzera an Ulkusrand und Ulkusgrund

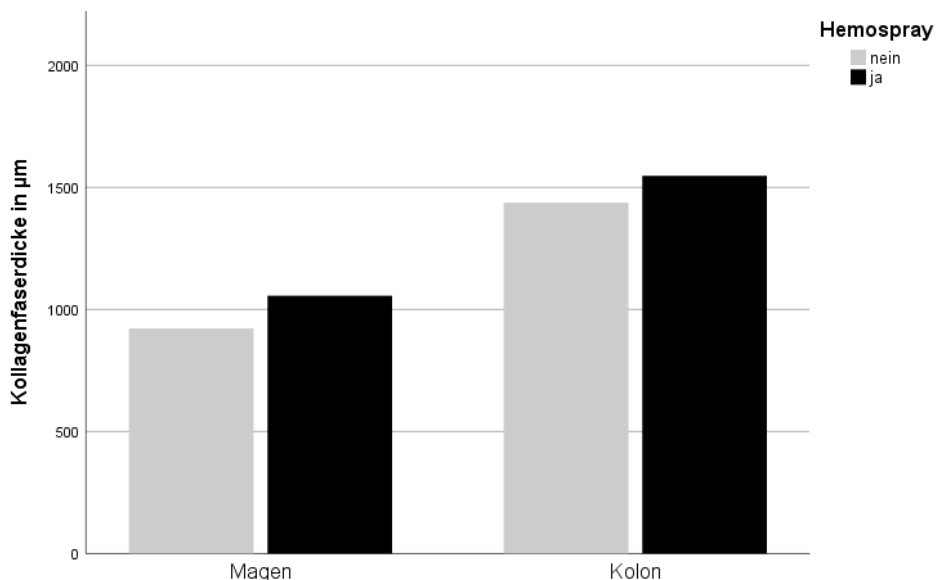
Am Ulkusrand lag die Endothelzellkerndichte im Mittel bei der Kontrollgruppe bei 200,6 Kernen/ROI (Min. 171,5, Max. 249,6) und damit unter dem Wert der Hemospray-Gruppe mit 245,3 Kernen/ROI (Min. 132,3, Max. 324,9).

Auch am Ulkusgrund zeigte sich eine dezente Erhöhung der Endothelzellkerndichte der behandelten Tiere mit durchschnittlich 237,7 Kernen/ROI (Min. 170,5, Max. 328,5) gegenüber den unbehandelten Tieren mit 209 Kernen/ROI (Min. 152,3, Max. 248).

Der Unterschied stellte sich in der Signifikanztestung jedoch auch hier als nicht signifikant dar (exakte Signifikanz  $p=0,247$  für den Ulkusrand,  $p=1,000$  für den Ulkusgrund).

### 3.2.4 Kollagenfaserdicke

Zur Quantifizierung der Neubildung von Kollagenfasern wurde die Dicke der Kollagenfaserschicht in den histologischen Präparaten der 40 Ulzera bestimmt (**Abb. 3-10**).



**Abb. 3-10** Kollagenfaserdicke in µm in Magen und Kolon

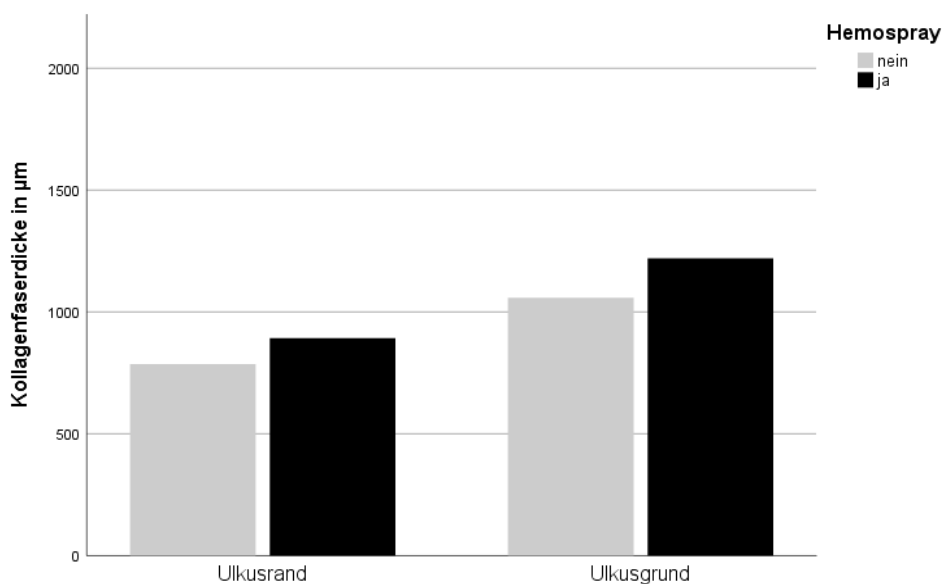
Sowohl im Magen als auch im Kolon war eine minimale Tendenz zu einer größeren Schichtdicke bei den mit Hemospray behandelten Tieren zu erkennen. Außerdem war die gemessene Kollagenfaserdicke bei Kontroll- und Hemospraygruppe im Kolon größer als bei den Magenulzera beider Gruppen.

Im Magen lag der mittlere Wert der Kollagenfaserdicke der histologischen Präparate bei den unbehandelten Tieren bei 921,9  $\mu\text{m}$  (Min. 521, Max. 1448,5), bei den behandelten Tieren hingegen bei 1056,3  $\mu\text{m}$  (Min. 467, Max. 1823,1). Der Unterschied war nicht signifikant (exakte Signifikanz  $p=0,705$ ).

Auch im Kolon war der Unterschied zwischen beiden Gruppen nicht signifikant (exakte Signifikanz  $p=0,496$ ). Im Mittel lagen die Kollagenfaserdicken bei der Kontrollgruppe bei 1437,5  $\mu\text{m}$  (Min. 946,7, Max. 1771,8) und bei der Hemospray-Gruppe bei 1547,6  $\mu\text{m}$  (Min. 1303,3, Max. 1768).

## Magen

Um die Lokalisation der dicksten Kollagenfaserschicht noch genauer zu bestimmen, wurde die Dicke jeweils an Rand und Grund der Ulzera vermessen.



**Abb. 3-11** Kollagenfaserdicke in  $\mu\text{m}$  der Magen-Ulzera am Ulkusrand und Ulkusgrund

Wie **Abb. 3-11** zu entnehmen ist, zeigte sich im Magen sowohl am Ulkusrand als auch am Ulkusgrund eine leichte Tendenz zu einer dickeren Kollagenschicht bei den mit Hemospray behandelten Tieren.

Im Mittel maß die Kollagenfaserschicht am Ulkusrand bei der Kontrollgruppe 785,7  $\mu\text{m}$  (Min. 510,2, Max. 1253,8), bei der Hemospray-Gruppe hingegen 892,3  $\mu\text{m}$  (Min. 402,6, Max. 1539).

Bei den Messungen am Ulkusgrund konnte in beiden Gruppen eine vermehrte Kollagenfaserbildung im Vergleich zum Ulkusrand dargestellt werden. So zeigte sich in der Kontrollgruppe ein Wert von 1058,1  $\mu\text{m}$  (Min. 440,1, Max. 1643,2), in der Hemospray-Gruppe jedoch die Tendenz zu einer noch dickeren Schicht mit im Mittel 1220,2  $\mu\text{m}$  (Min. 528,8, Max. 2355,78).

Bei einer Signifikanztestung ergab sich ein nicht signifikanter Unterschied der beiden Gruppen sowohl bezüglich des Ulkusrands (exakte Signifikanz  $p=0,971$ ) als auch des Ulkusgrunds (exakte Signifikanz  $p=0,853$ ).

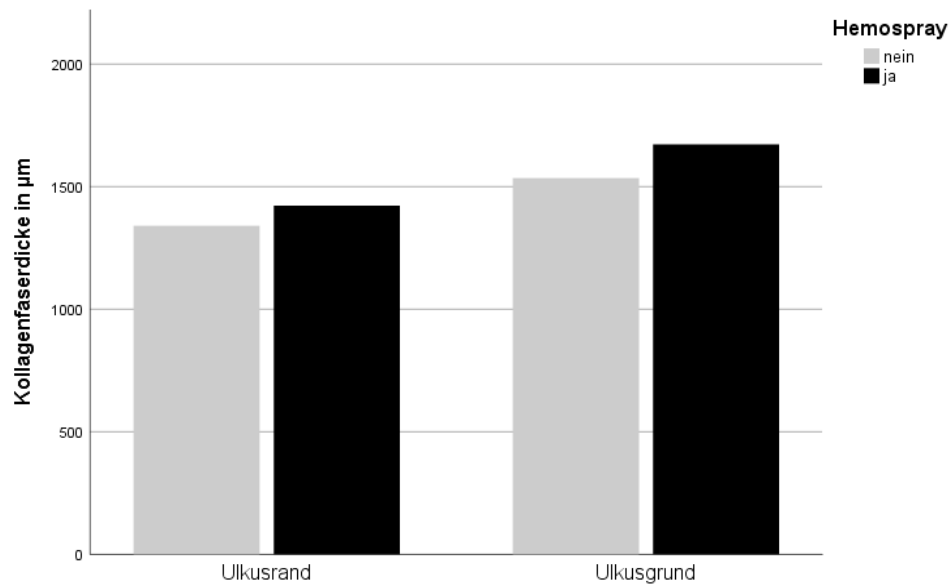
## **Kolon**

Die 20 Ulzera, die im Kolon induziert wurden, zeigten eine ähnliche Tendenz wie im Magen. Die behandelten Tiere wiesen eine leicht erhöhte Dicke der Kollagenfaserschicht auf (**Abb. 3-12** Kollagenfaserdicke in  $\mu\text{m}$  der Kolon-Ulzera am Ulkusrand und Ulkusgrund).

So betrug der Mittelwert der Kollagenfaserdicke der unbehandelten Tiere am Ulkusrand im Kolon 1340,2  $\mu\text{m}$  (Min. 967,1, Max. 1709,9), der behandelten Tiere jedoch 1422,8  $\mu\text{m}$  (Min. 1173,7, Max. 1712,6).

Auch bei den Ulzera im Kolon ließ sich, wie zuvor schon im Magen, bei beiden Gruppen eine dickere Kollagenfaserschicht am Ulkusgrund nachweisen. Die mittlere Dicke in der Kontrollgruppe maß 1534,7  $\mu\text{m}$  (Min. 926,2, Max. 1962,3), die der Hemospray-Tiere 1672,4  $\mu\text{m}$  (Min. 1184, Max. 1966,8).





**Abb. 3-12** Kollagenfaserdicke in µm der Kolon-Ulzera am Ulkusrand und Ulkusgrund

Der Unterschied zwischen den Hemospray-Tieren und den Kontrolltieren war jedoch sowohl am Ulkusrand (exakte Signifikanz  $p=0,278$ ), als auch am Ulkusgrund (exakte Signifikanz  $p=0,780$ ) nicht signifikant.

## 4 Diskussion

In dieser Pilotstudie wurde der Einfluss des topischen Hämostatikums Hemospray auf die Heilung von mukosalen Defekten in Magen und Darm am Schweinemodell untersucht.

### 4.1 Diskussion der Methoden

In einzelnen Fallberichten war im Vorfeld eine vergleichsweise gute Ulkusheilung nach der Anwendung von Hemospray aufgefallen. So nutzten Kratt et al. Hemospray als letzte endoskopische Therapieoption in einem Fall von multiplen NSAR-induzierten Ulzera im Kolon ascendens und Zökum und stellten bei der Kontrollendoskopie nach zwei Tagen eine vergleichsweise bessere Abheilung der behandelten Ulzera fest [85]. Dies war die Grundüberlegung für eine Kontrolle an Tag 2 in unserem Studiendesign.

Auch Beye et al. beschäftigten sich 2016 parallel zu unserer Studie mit dem Einfluss von Hemospray auf Schleimhautdefekte. Sie setzten zirkumferente Schleimhautdefekte im Ösophagus und behandelten diese mit Hemospray, um einen Einfluss auf die Heilung und Stenose-Rate zu identifizieren [89]. In ihrer Studie wurde die zweite Kontrollendoskopie ebenfalls an Tag 2 durchgeführt.

Bei verschiedenen Studien wurde der Zeitpunkt der Kontrolle der Abheilung unterschiedlich festgelegt. So setzten Beye et al. den Endpunkt ihrer Studie an Tag 14 nach Induktion der Ulzera, wobei sie an Tag 2, Tag 4 und Tag 7 Kontrollendoskopien durchführten und hier auch eine erneute Anwendung von Hemospray stattfand [89]. In einer Studie, die den Einfluss von Rebamipid auf die Ulkusheilung untersuchte, fanden die Kontrollen sogar bis zu 4 Wochen nach Induktion statt [90]. In diesem Fall konnte auch eine signifikant höhere Heilungstendenz in der Behandlungsgruppe nach 3 und 4 Wochen dargestellt werden.

Der in unserer Studie gewählte Zeitraum von 7 Tagen war demgegenüber vergleichsweise kurz. Eine längere Beobachtungsdauer hätte möglicherweise zu signifikanten Unterschieden geführt.

Wir entschieden uns zudem zur einmaligen Anwendung von Hemospray, um eine Vergleichbarkeit mit einer im klinischen Alltag möglichst praktikablen Lösung zu simulieren. Eine rezidivierende Anwendung von Hemospray könnte die Abheilung der Ulzera jedoch weiter verbessern, wie die Studie von Beye et al. nahelegt [89].

Zudem war die Größe unserer Kohorte vergleichsweise gering. Aufgrund der aufwändigen Behandlung der Versuchstiere beschränkten wir uns auf 10 Tiere. In vergleichbaren Studien am Schweinmodell wurden teilweise mehr als 20 Tiere untersucht [89]. Eine kleine Kohorte, wie in unserer Studie, lässt nur wenig statistisch valide Aussagen zu. So konnten wir vor allem Tendenzen erkennen und eine Grundlage für mögliche weitere Untersuchungen legen.

Das Schweinmodell für endoskopische Studien ist seit langer Zeit aufgrund einer vergleichbaren Anatomie des porcinen und humanen Magen-Darm-Trakts etabliert. Vor diesem Hintergrund sprach sich 2010 eine Expertengruppe in einem Positionspapier für die Einführung von einheitlichen Trainingsstandards für endoskopisch tätige Mediziner aus, die unter anderem Trainingseinheiten am lebenden Schweinmodell beinhalten sollten [91].

In mehreren weiteren Studien wurde die Ähnlichkeit von porcinen und humanen endoskopischen Bedingungen gezeigt [92, 93]. Trotz einiger anatomischer Unterschiede, wie einer dickeren Mukosa im Ösophagus, einer dickeren Magenwand und einer freieren Beweglichkeit des Magens wegen fehlender Aufhängung, eignet sich dieses Modell aufgrund der bestehenden Gemeinsamkeiten und Ähnlichkeiten. Aus diesem Grund arbeiteten wir mit diesem Modell in unserer Pilotstudie.

Ein Tiermodell kann jedoch nie die exakten Bedingungen am Menschen darstellen. Um eine verbindliche Aussage zur Ulkusheilung am Menschen zu treffen, wären daher weitergehende Studien notwendig.

Zur Induktion der Ulzera gibt es in der Literatur keinen einheitlichen Standard. Schon seit den 1940er Jahren wurde damit begonnen, möglichst realitätsgetreue Schleimhautulzera und ihre Komplikationen im Tiermodell zu induzieren. Im Laufe der Zeit entwickelten sich dafür diverse Ansätze. So versuchte man durch Stress [94], pharmakologische oder chemische Methoden, wie etwa Salicylate [95], oder mechanische Methoden Ulzera zu induzieren. Bekanntestes Beispiel für eine mechanische Methode ist der von Protell et al. 1976 erstbeschriebene „ulcer maker“, durch den Schleimhautgewebe angesogen und anschließend mit einem zylindrischen Messer abgetragen wurde [96].

In unserer Studie wurde die Mukosa mit verdünntem Adrenalin unterspritzt und anschließend mittels einer ovalen Polypektomie-Schlinge abgetragen. Bei den Versuchen von Camus et al. 2012 wurde die Induktion von blutenden Ulzera im oberen Gastrointestinaltrakt mit der sogenannten „grasp-and-snare-Mukosektomie-Technik“ erzeugt [92]. Diese Technik wurde 2008 von Elmunzer et al. entwickelt [97]; hierbei diente sie allerdings zur endoskopischen Vollwandresektion, während Camus et al. 2012 nur die Mukosa mit dieser Technik entfernten. Dabei wurde ein Endoskop mit zwei Arbeitskanälen verwendet. Durch einen Kanal wurde eine symmetrische Polypektomieschlinge eingeführt, durch den anderen eine Biopsiezange, die durch die Schlinge vorgeschoben wurde. Mit der Biopsiezange wurde anschließend die Mukosa gegriffen und in die Schlinge gezogen. Die Schlinge wurde geschlossen und die Biopsiezange entfernt. Danach wurde mittels Schlinge die Mukosa reseziert [92].

Beye et al. führten für ihre Versuche zur Vermeidung von Stenosen nach Mukosaresektion im Ösophagus ebenfalls eine Abtragung der Mukosa durch. Das Vorgehen ähnelte dem unserer Studie. Sie unterspritzten die Mukosa mit

Indigokarmin-gefärbter Kochsalzlösung und führten anschließend eine zirkumferente Submukosa-Dissektion im Ösophagus durch. Dazu verwendeten sie im Gegensatz zu uns keine Polypektomieschlinge, sondern zwei verschiedene Hochfrequenz-Chirurgie-Messer [89].

Wir entschlossen uns demgegenüber zur Unterspritzung mit verdünntem Adrenalin, da unser vorrangiges Ziel nicht die Erzeugung einer Blutung, sondern eines Schleimhautdefekts war. Die Wirkung von Hemospray auf blutende Ulzera ist in der Literatur inzwischen ausreichend belegt [98]. Die meisten anderen Tiermodell-Studien zielen auf die Erstellung von möglichst komplikationsreichen Ulzera (Blutung, Perforation) ab, um Möglichkeiten der Behandlung zu untersuchen oder zu trainieren [99]. Da unsere Pilotstudie auch die Evaluation der Anwendung von TC-325 auf nicht blutende Ulzera und den Einfluss auf die Heilung der Mukosa unabhängig von einer Anwendung bei Blutungen zum Ziel hatte, entschieden wir uns für die Mukosaabtragung mit Unterspritzung und Schlingenabtragung.

Für die Induktion von Kolonulzera liegen hauptsächlich Studien vor, die sich mit der Behandlung von experimentell ausgelöster Kolitis und deren Behandlung beschäftigen. So haben Mourad et al. ebenso wie Vishwakarma et al. in ihren Versuchen die Kolitis bei Ratten durch rektale Instillation von Essigsäure ausgelöst [100, 101]. Hierdurch entstanden dann als Begleitsymptom der Kolitis kolorektale Ulzera. In unseren Versuchen war jedoch das Ziel, einzelne Ulzera gezielt zu induzieren, zu behandeln und zu vermessen, weshalb wir uns auch im Kolon für eine Abtragung, die analog zur Methode im Magen durchgeführt wurde, entschieden.

Die Technik der Abtragung wird vor allem im Kolon schon seit Jahrzehnten im klinischen Alltag eingesetzt, wenn Polypenabtragungen im Kolorektum bei Vorsorgekoloskopien durchgeführt werden. Hierbei werden Polypen nach Unterspritzung mit einer Diathermie-Schlinge abgetragen, sodass wir hier auf eine etablierte Methode zur Mukosaabtragung zurückgreifen konnten [102].

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Für die Unterspritzung der Mukosa zur Abtragung betrug die benötigte Menge an Adrenalin im Magen etwas mehr als im Kolon und lag bei  $7,0 \pm 5,8$  ml (Magen) bzw.  $6,5 \pm 4,8$  ml (Kolon).

In vergleichbaren Untersuchungen wurden etwas höhere Mengen an Unterspritzungsflüssigkeit verwendet, so nutzten Spadaccini et al. zur Induktion von Magenulzera  $11.5 \pm 6.7$  ml einer 0.9%igen NaCl-Lösung mit Methylenblau [103].

Zur suffizienten Induktion eines Ulkus war in unserer Studie bei 92,5 % der Ulzera eine einzige Schlingenabtragung nach Unterspritzung ausreichend. In einer vergleichbaren Studie, bei der die Mukosa ebenfalls zu Beginn unterspritzt wurde, erfolgte die Abtragung dann jedoch mit einem elektrischen Messer. Hier zeigte sich eine Rate von nur 55,6 % en-bloc-Abtragungen der Mukosa in der Kontrollgruppe [103].

Für die Induktion der Ulzera im Magen war eine deutlich längere Zeitspanne als im Kolon nötig; es wurden in unserer Studie durchschnittlich 13 Minuten und 30 Sekunden benötigt. An der hohen Standardabweichung von 21 Minuten und 48 Sekunden zeigt sich aber, dass sich die Einzelzeiten deutlich unterschieden. Fujimoto et al. benötigten 2018 in der Kontrollgruppe  $22,9 \pm 10,8$  Minuten und  $25,3 \pm 10,0$  Minuten in der Behandlungsgruppe. Hier wurde jedoch eine endoskopische Submukosa-Dissektion (ESD) mit dem elektrischen Messer durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine hohe interindividuelle Differenz zwischen den einzelnen Ulkusinduktionen mit Standardabweichungen von 10,8 und 10,0 Minuten [90]. Spadaccini et al. benötigten für die durchgeführte ESD in der Kontrollgruppe  $9,4 \pm 9,6$  Minuten, jedoch beziehen sich diese Daten sowohl auf Magen- als auch auf Kolonulzera [103].

Im Kolon zeigte sich in unserer Studie eine sehr kurze Dauer der Ulkusinduktion von 3,6 Minuten im Durchschnitt. Diese Zeiten sind vergleichbar mit Studien, bei denen die Dauer einer Polypenabtragung im Kolon erhoben wurde. So

haben Yamashina et al. Kolonpolypen per endoskopischer Mukosaresektion abgetragen und dabei eine mediane Prozedurdauer von 175 Sekunden, also 2,9 Minuten, ermittelt [104].

Die deutlich differierenden Zeiten in Magen und Kolon lassen sich unter anderem auch auf die anatomischen Gegebenheiten zurückführen. So ist alleine die Mukosa im Magen ungefähr 1 mm dick, während die Dicke der gesamten Darmwand im Kolon etwa 2 mm beträgt [105]. Dies erklärt einerseits die leicht differierende benötigte Menge an Unterspritzungssubstanz, aber auch die abweichenden Induktionszeiten.

Die Ulkusgröße direkt nach der Induktion an Tag 0 unterschied sich in Magen und Kolon in unserer Studie deutlich. So betrug die mittlere Größe im Magen 494,5 mm<sup>2</sup>, im Kolon jedoch nur 178,5 mm<sup>2</sup>. Die Unterschiede lassen sich vermutlich vor allem auf die anatomischen Unterschiede der Mukosa in Magen und Kolon zurückführen. Durch die dünnere Mukosa im Kolon konnte eine geringere Gewebemenge mit der Schlinge abgetragen werden, sodass hier ein kleinerer Defekt entstand. Dieser Unterschied erklärt auch die geringere benötigte Unterspritzungsmenge im Kolon.

In absoluten Größen waren die Magenulzera der Tiere, die randomisiert der Hemospray-Gruppe zugeteilt wurden, im Durchschnitt größer als die der Tiere in der Kontrollgruppe. Hier zeigte sich eine mittlere Differenz von 221,3 mm<sup>2</sup>. Im Kolon stellten sich die Ulzera der Hemospray-Gruppe im Gegensatz dazu kleiner dar mit einem durchschnittlichen Wert von 150,7 mm<sup>2</sup> gegenüber der Kontrollgruppe mit 206,3 mm<sup>2</sup>. Eine mögliche Erklärung der Größenunterschiede könnte darin liegen, dass auch die absolute Größe der Ulzera Einfluss auf die Abheilungstendenzen hat.

Blutung oder Perforation stellen die häufigsten Komplikationen von gastrointestinalen Ulzera dar. In unserer Pilotstudie kam es in keinem Fall zur Perforation, weder bei Induktion der Ulzera noch im weiteren Verlauf. Für die endoskopische Mukosaresektion (EMR) im Kolon gibt es aussagekräftige Daten einer multizentrischen Studie, die bei über 4000 durchgeführten Polypektomien

eine Perforationsrate von 1,1 % zeigt [106]. Bei EMR, die im Magen durchgeführt werden, liegt die Perforationsrate bei ähnlichen 1,03 % [107]. Bei einer Studie von Chapelle et al. mit 58 ESD, eine der EMR verwandten Methode, kam es zu 3 Perforationen [108], bei 12 durchgeführten ESD in einer Studie von Wang et al. trat keine Perforation auf [93]. Zu beachten ist jedoch, dass die ESD allgemein mit höheren Komplikationsraten assoziiert ist als die EMR [109].

In unserer Studie kam es nur bei 2 von 40 Ulkusinduktionen zu einer kleineren Blutung. Die geringe Blutungsrate im porcinen Tiermodell ist ebenfalls in der Literatur beschrieben. So hatten schon Chen et al. 2008 Schwierigkeiten, eine gewollte Blutung im Schwein durch die endoskopische Abtragung der Mukosa zu generieren. Auch mit Zugabe von intravenösem Heparin konnten sie keine blutenden Schleimhautdefekte induzieren [99].

In einer weiteren Studie trat bei 8 von 44 EMR oder ESD eine Komplikation auf, darunter 6 kleinere Blutungen und 2 Perforationen [103]. Bei Wang et al. zeigte sich in einer Studie zum Training der Durchführung von ESD eine Blutungsrate von 33% [93]. Wir lagen mit einer Blutungsrate von 5 % deutlich unter diesen Werten. Etwas höhere Raten an kleineren Blutungen mit 7,0 % und größeren Blutungen mit 1,6 % publizierten auch Heldwein et al. in ihrer Studie zu Polypektomien mittels EMR im Kolon [106]. Im Magen hingegen zeigte sich bei fast 2000 durchgeführten EMR eine Blutungsrate von 7,09 %, hier wurde jedoch nicht in kleinere und größere Blutungen unterschieden [107].

Als weiteren Parameter untersuchten wir die Veränderung des Hämoglobinwertes im Blut. Schweine gelten allgemein als non-bleeder mit geringer Blutungstendenz, was die Entwicklung verschiedener Methoden zur Blutungskontrolle im Gastrointestinaltrakt im Tiermodell erschwert [89, 110]. Auch in unserer Studie zeigte nur eines von 10 Tieren bei 2 seiner Ulzera eine kleine Blutung. Bei den anderen 38 Ulzera konnte keine Blutung beobachtet werden. In unserer Studie diente die Bestimmung des Hämoglobinwertes einerseits der klinischen Kontrolle von Blutungen nach Induktion der Ulzera und



andererseits der Frage nach einem Einfluss von Hemospray auf die Hämoglobin-Neubildung als systemische Wirkung. Bei beiden Gruppen fiel der Hämoglobinwert von Tag 0 zu Tag 2 leicht ab, um daraufhin zu Tag 7 wieder anzusteigen. Zwischen beiden Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

In den in der Literatur zu findenden Untersuchungen wurde der Hämoglobin-Wert nur als Indikator für eine erfolgreiche Therapie einer akuten Blutung durch die Anwendung von Hemospray genutzt [86]. Eine direkte systemische Wirkung von Hemospray konnte bisher nicht nachgewiesen werden [98]. Auch in unserer Studie ergab sich kein Hinweis auf einen systemischen Einfluss auf die Hämoglobin-Synthese.

Für die Wahl der richtigen Parameter zur adäquaten Beurteilung der Abheilung der Ulzera gibt es in der Literatur kein eindeutiges Scoring-System; die verschiedenen Studien zur Mukosaheilung legen der Bewertung unterschiedliche Messparameter zu Grunde.

Die Flächenveränderung wird in fast allen Studien zur Beurteilung der Abheilung von Ulzera als wichtigster Parameter angesehen. Die Veränderung der Ulkusflächen im zeitlichen Verlauf ist sowohl in Studien zu diabetischen Ulzera am Fuß [111] als auch in diversen Studien zur Ulkusheilung im Gastrointestinaltrakt ein entscheidendes Bewertungskriterium [112, 113]. Deshalb wählten auch wir die Veränderung der Ulkusfläche als Parameter aus.

Ernst et al. verglichen in ihrer Studie zum Einfluss von lokal injiziertem TGF- $\beta$ -Antikörper ebenfalls die Flächen von Magenzulzera bei Ratten nach Tötung der Tiere [114]. Die Euthanasie der Tiere erfolgte entweder an Tag 5 oder an Tag 11. An Tag 5 zeigte sich keine signifikante Größendifferenz zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe, an Tag 11 war jedoch in der Behandlungsgruppe eine signifikant kleinere Ulkusfläche zu beobachten. Möglicherweise hätte also auch in unserer Studie eine längere Beobachtungszeit, vor allem im Magen, weiteren Erkenntnisgewinn gebracht. Zudem zeigte sich in dieser Studie beim Blick auf die Kontrollgruppe eine

deutlichere Flächenabnahme bei den unbehandelten Tieren als in unserer Studie. Bei einer Ausgangsgröße von ca. 28 mm<sup>2</sup> war die Ulkusgröße an Tag 5 bei den unbehandelten Tieren bereits auf ca. 9 mm<sup>2</sup> zurückgegangen, dies entspricht einer Verkleinerung von knapp 70 %. In der von uns durchgeführten Studie zeigte sich in der Kontrollgruppe an Tag 7 lediglich ein Rückgang von 19 % im Vergleich zur Ausgangsfläche von Tag 0. Bei der Beurteilung dieser Differenz sind die unterschiedlichen Versuchstiere, die Induktionsart der Ulzera (chemische Induktion mit Essigsäure vs. mechanische Induktion) und die Unterschiede in der Messmethode zu berücksichtigen. Die Messungen, die in unserer Studie in die Auswertung einfließen, waren endoskopisch durchgeführte Messungen. Die Größenmessungen der Ulzera wurden also immer mit der gleichen Methodik durchgeführt, um den Einfluss der Messmethode auf die Ergebnisse weitgehend auszuschließen. Wir konnten so zudem zeigen, dass im Magen die per endoskopischer Messung ermittelte Fläche in 85% (17 von 20 Ulzera) der Fälle größer als die Messung der Fläche nach der Explantation war. Die in anderen Studien verwendete Kombination der Methoden (bei Induktion eine endoskopische Messung und am Versuchsende eine Messung nach Explantation) kann also zu methodischen Fehlern führen. Dies lässt sich möglicherweise auch durch die Luftinsufflation bei der Gastroskopie und eine damit einhergehende Ausdehnung der Ulkusgröße erklären. Ein ähnlicher, wenn auch nicht ganz so ausgeprägter Effekt, war auch im Kolon zu beobachten. Alternativ ist auch ein Effekt durch den schrägen Aufblick auf den Messdraht bei der Endoskopie gegenüber dem senkrechten Aufblick im Rahmen der post-mortem-Messung möglich.

In einer Studie von Maruoka et al. 2017 zur Wirkung von Vonoprazan, einem neuen oralen kalium-kompetitiven Säureblocker, im Vergleich zu Protonenpumpeninhibitoren auf die Schleimhautabheilung nach ESD, wurde ein Zeitraum von 4 Wochen untersucht [115]. Nach 4 Wochen zeigte sich nun eine Reduktion der Ulkusfläche in der Kontrollgruppe von 95,3 %. In unserer Studie war die letzte Erhebung an Tag 7; hier zeigte sich in der Kontrollgruppe im Magen eine Flächenreduktion von 19 % im Vergleich zu Tag 0. Aufgrund des von uns gewählten kürzeren Zeitraums ist ein Vergleich nicht sinnvoll.

Die Anwendung von Angiogenesemarkern findet sich in der Literatur vornehmlich bei anderen Ulkusarten. Im Gastrointestinaltrakt wird der Fokus bei Ulzera meist auf die Entzündungsaktivität und deren Reduktion gelegt, weniger hingegen auf die Verbesserung der Vaskularisierung im Ulkusbereich. Keine uns bekannte Studie hat bisher versucht, die Angiogenese nach Anwendung von Hemospray an Ulzera im Gastrointestinaltrakt zu quantifizieren.

In unserer Studie zeigte sich für keinen Parameter ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe, jedoch konnten wir Tendenzen erkennen. So war im Magen sowohl am Ulkusrand als auch am Ulkusgrund bei den unbehandelten Tieren eine etwas höhere Endothelzellkerndichte von 176,6 Kernen/ROI (Ulkusrand) bzw. 267,4 Kernen/ROI (Ulkusgrund) als in der Behandlungsgruppe mit 155,1 Kernen/ROI (Ulkusrand) und 226,7 Kernen/ROI (Ulkusgrund) zu erkennen. Im Kolon jedoch zeigten die behandelten Tiere sowohl am Ulkusrand (245,3 Kerne/ROI) als auch am Ulkusgrund (237,7 Kerne/ROI) eine vermehrte Vaskularisierung gegenüber den unbehandelten Tieren mit 200,6 Kernen/ROI (Ulkusrand) und 209 Kernen/ROI (Ulkusgrund).

Dies könnte für eine unterschiedliche Wirkung von Hemospray auf die Mukosa von Magen oder Darm sprechen. Zudem kann auch ein unterschiedlich langer Verbleib des Hemosprays auf den Ulzera in Magen und Kolon Grund für die Differenzen sein. Die Studie von Ernst et al. versuchte ebenfalls, die Angiogenese zu quantifizieren, allerdings durch die Anzahl der Blutgefäße pro Gesichtsfeld, sodass ein Vergleich zu unserer Studie hier ausscheidet [116].

Wir führten in unserer Studie außerdem eine Bestimmung der Dicke der Kollagenfaserschicht der induzierten Ulzera nach 7 Tagen durch. In einer 2018 von Fujimoto et al. publizierten Studie zum Einfluss von Rebamipid, einem Chinolinonderivat, das die Synthese der COX-2 induziert, als Unterspritzungssubstanz bei der ESD im Schweinmodell zeigten sich erst nach 2 Wochen signifikante Unterschiede in der Dicke der Fibroseschicht. Hier konnte bei der Behandlungsgruppe, die nach 4 Wochen eine signifikant bessere

Ulkusheilung im Magen zeigte, eine geringere Fibroseschicht als bei der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Ausgangsmessungen der Kontrollgruppe, die nach einer Woche erfolgten, zeigten jedoch in absoluten Zahlen im Durchschnitt fast dreifach dickere Fibroseschichten als in unserer Studie [90].

In einer anderen Untersuchung, bei der die Heilungstendenz nach Hemospray-Anwendung an Ösophagusläsionen beobachtet wurde, konnten Beye et al. zeigen, dass mit Hemospray behandelte Mukosadefekte an Tag 14 eine signifikant dünnere Fibroseschicht aufwiesen [89]. Bei uns erfolgte die Auswertung an Tag 7. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen, tendenziell war sogar eine größere Fibrosierung bei der Hemospray-Gruppe zu beobachten. Vergleichbare Studien zeigten, dass erste signifikante Unterschiede erst nach frühestens 2 Wochen auftreten. Unsere Studie umfasste dagegen nur einen Beobachtungszeitraum von 7 Tagen.

Im Kolon konnten wir ebenfalls keinen signifikanten Unterschied beider Gruppen feststellen. Insgesamt war im Kolon eine dickere Kollagenfaserschicht zu messen als im Magen. Zudem zeigte sich in beiden Gruppen im Magen und Kolon am Ulkusgrund eine dickere Kollagenfaserschicht als am Ulkusrand.

In einigen Studien zur Heilungstendenz von Ulzera im Magen-Darm-Trakt wurden weitere histopathologische Parameter bestimmt. Hierzu zählten die Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Gewebe [90] oder die Bestimmung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  oder IL-1 $\beta$  im Serum [89]. Eine ergänzende Auswertung dieser Parameter hätte ebenfalls einen weiteren Erkenntnisgewinn bringen können.

Durch unsere Studie konnten wir vielversprechende Tendenzen und Ansatzpunkte für weiterführende Studien aufzeigen. Obwohl wir positive Effekte von Hemospray auf die Mukosaheilung feststellen konnten, waren die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den behandelten Tieren nicht signifikant. Mit der geringen Fallzahl von 10 Versuchstieren ließen sich keine statistisch gesicherten Aussagen ableiten. Wir waren uns der geringen Fallzahl

bewusst, jedoch waren wir Limitationen aufgrund der ethischen Richtlinien unterworfen. Aus diesem Grund wurden bei 10 Tieren 40 Ulzera induziert in dem Wissen, dass diese keine 40 im streng wissenschaftlichen Sinne unabhängigen Ereignisse sind. Um eine Verschleppung des Pulvers vom oberen in den unteren Gastrointestinaltrakt und einen damit einhergehenden Einfluss auf die Ergebnisse zu verhindern, wurden alle Ulzera desselben Tieres entweder mit Hemospray behandelt oder blieben durchweg unbehandelt. Zudem hätte ein längerer Beobachtungszeitraum gegebenenfalls zu einem zusätzlichen Erkenntnisgewinn beitragen können.

## 5 Zusammenfassung

Gastrointestinale Ulzera sind auch heute noch ein sehr häufiges Krankheitsbild, das viele verschiedene Patientengruppen betrifft. Gastroduodenale Ulzera sind am häufigsten auf eine Infektion mit *H. pylori* oder die Einnahme von NSAR zurückzuführen, während kolorektale Ulzera vor allem bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen auftreten. Die bisher bekannten Therapiemaßnahmen zielen vor allem auf eine Verhinderung der Entstehung der Ulzera oder eine Behandlung der Komplikationen ab. Mit unserer Pilotstudie am Schweinemodell untersuchten wir den Einfluss des topischen Hämostatikums Hemospray, das zur Blutstillung inzwischen etabliert ist, auf die Abheilung von bestehenden Ulzera.

Die Anwendung von Hemospray zur Blutungskontrolle zeigte in einzelnen Fallberichten eine vergleichsweise gute Abheilung der Ulzera in der Kontrollendoskopie. Zur Beurteilung dieser Heilungstendenzen und zur Evaluation eines möglicherweise mukosaprotektiven Effekts entwickelten wir einen Studienaufbau am bereits für endoskopische Versuche etablierten porcinen Modell. Es wurden bei 10 Tieren insgesamt 40 Ulzera in Magen und Kolon induziert und bei der Hälfte der Tiere die Ulzera einmalig mit Hemospray behandelt. Im Verlauf erfolgten an Tag 2 und Tag 7 Kontrollendoskopien zur Größenbestimmung der Ulzera und an Tag 7 die histologische Auswertung der entnommenen Präparate. Das Ziel war die Untersuchung verschiedener Heilungsfaktoren, darunter die Angiogenese sowie die Fibrosierung der Ulzera. Zudem wurde die Abheilung anhand der Flächenveränderung der Ulzera im zeitlichen Verlauf beurteilt.

Es zeigte sich, dass sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe die Ulkusfläche vom Zeitpunkt der Induktion zur ersten Kontrollendoskopie an Tag 2 zunächst zunahm. Dies galt sowohl für die Ulzera im Magen als auch im Kolon. An Tag 7 hingegen zeigte sich eine in beiden Gruppen signifikant kleinere Ulkusfläche als am Tag der Induktion. Die Unterschiede beider Gruppen waren jedoch nicht signifikant.

Bei der Beurteilung der Angiogenese zeigte sich ein differierendes Bild je nach Lokalisation des Ulkus. Im Magen konnten für die Kontrollgruppe mehr Endothelzellkerne dargestellt werden als für die Behandlungsgruppe, im Kolon hingegen war die Tendenz umgekehrt. Die Unterschiede waren ebenfalls nicht signifikant.

Bei der Bestimmung der Fibrose in den induzierten Ulzera war sowohl im Magen als auch im Kolon eine minimale Tendenz zu einer größeren Schichtdicke bei den mit Hemospray behandelten Tieren zu erkennen. Außerdem war die gemessene Kollagenfaserdicke bei Kontroll- und Hemospraygruppe im Kolon größer als bei den Magenulzera beider Gruppen. Die Unterschiede waren nicht signifikant. Am Ulkusgrund zeigte sich in allen Fällen eine dickere Fibroseschicht als am Ulkusrand.

Durch unsere Studie konnten wir einige Tendenzen für weiterführende Studien aufzeigen. Trotz der leicht positiven Effekte von Hemospray konnten wir keinen signifikanten Unterschied in beiden Gruppen darstellen. Für zukünftige Studien sollten ein längerer Beobachtungszeitraum und eine größere Kohorte gewählt werden, um statistisch verwertbarere Aussagen zu treffen. Es lassen sich also einige Ansatzpunkte für weitere Versuche ableiten, um die Wirkung von Hemospray auf die Abheilung von Ulzera in Gastrointestinaltrakt noch besser zu untersuchen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Sung, J.J., E.J. Kuipers, H.B. El-Serag, *Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2009. **29**(9): S. 938-46.
2. Lanas, A., F.K.L. Chan, *Peptic ulcer disease*. *Lancet*, 2017. **390**(10094): S. 613-624.
3. Lau, J.Y., et al., *Challenges in the management of acute peptic ulcer bleeding*. *Lancet*, 2013. **381**(9882): S. 2033-43.
4. Budimir, I., et al., *Bleeding Peptic Ulcer - Tertiary Center Experience: Epidemiology, Treatment and Prognosis*. *Acta Clin Croat*, 2017. **56**(4): S. 707-714.
5. Huang, J.Q., S. Sridhar, R.H. Hunt, *Role of Helicobacter pylori infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis*. *Lancet*, 2002. **359**(9300): S. 14-22.
6. Zaki, M., et al., *H. pylori acutely inhibits gastric secretion by activating CGRP sensory neurons coupled to stimulation of somatostatin and inhibition of histamine secretion*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2013. **304**(8): S. G715-22.
7. El-Omar, E.M., et al., *Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion*. *Gastroenterology*, 1997. **113**(1): S. 15-24.
8. Guo, T., et al., *Effects of IL-1beta on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and acid secretion from isolated rabbit parietal cells*. *Mol Med Rep*, 2013. **7**(1): S. 299-305.
9. Datta De, D., S. Roychoudhury, *To be or not to be: The host genetic factor and beyond in Helicobacter pylori mediated gastro-duodenal diseases*. *World J Gastroenterol*, 2015. **21**(10): S. 2883-95.
10. Aalykke, C., K. Lauritsen, *Epidemiology of NSAID-related gastroduodenal mucosal injury*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2001. **15**(5): S. 705-22.
11. Bhala, N., et al., *Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials*. *Lancet*, 2013. **382**(9894): S. 769-79.
12. Weil, J., et al., *Peptic ulcer bleeding: accessory risk factors and interactions with non-steroidal anti-inflammatory drugs*. *Gut*, 2000. **46**(1): S. 27-31.
13. Karateev, A.E., E.V. Moroz, *Do glucocorticoids affect the development of ulcers and erosions of the upper gastrointestinal tract in patients taking NSAIDs*. *Ter Arkh*, 2018. **90**(5): S. 50-54.
14. Conn, H.O., B.L. Blitzer, *Nonassociation of adrenocorticosteroid therapy and peptic ulcer*. *N Engl J Med*, 1976. **294**(9): S. 473-9.
15. Charpignon, C., et al., *Peptic ulcer disease: one in five is related to neither Helicobacter pylori nor aspirin/NSAID intake*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013. **38**(8): S. 946-54.
16. Yamanaka, K., et al., *Hemorrhagic gastric and duodenal ulcers after the Great East Japan Earthquake Disaster*. *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(42): S. 7426-32.



17. Ramakrishnan, K., R.C. Salinas, *Peptic ulcer disease*. Am Fam Physician, 2007. **76**(7): S. 1005-12.
18. Lu, C.L., et al., *Silent peptic ulcer disease: frequency, factors leading to "silence," and implications regarding the pathogenesis of visceral symptoms*. Gastrointest Endosc, 2004. **60**(1): S. 34-8.
19. Leodolter, A., et al., *A meta-analysis comparing eradication, healing and relapse rates in patients with Helicobacter pylori-associated gastric or duodenal ulcer*. Aliment Pharmacol Ther, 2001. **15**(12): S. 1949-58.
20. Case, R., Jr., et al., *Solitary ascending colon ulcer diagnosed as gastrointestinal CMV disease*. BMJ Case Rep, 2019. **12**(2).
21. Patita, M., G. Nunes, C. Fonseca, *Idiopathic Rectal Ulcer Associated with Human Immunodeficiency Virus Infection*. J Gastrointest Surg, 2018.
22. Rump, J.A., et al., *A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) in active ulcerative colitis but not in Crohn's disease*. Immunobiology, 1990. **181**(4-5): S. 406-13.
23. Main, J., et al., *Antibody to Saccharomyces cerevisiae (bakers' yeast) in Crohn's disease*. Bmj, 1988. **297**(6656): S. 1105-6.
24. Bossuyt, X., *Serologic markers in inflammatory bowel disease*. Clin Chem, 2006. **52**(2): S. 171-81.
25. van Rheenen, P.F., E. Van de Vijver, V. Fidler, *Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis*. Bmj, 2010. **341**: S. c3369.
26. Schoepfer, A.M., et al., *Discriminating IBD from IBS: comparison of the test performance of fecal markers, blood leukocytes, CRP, and IBD antibodies*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(1): S. 32-9.
27. Preiss, J.C., et al., *[Updated German clinical practice guideline on "Diagnosis and treatment of Crohn's disease" 2014]*. Z Gastroenterol, 2014. **52**(12): S. 1431-84.
28. Torres, J., et al., *Crohn's disease*. Lancet, 2017. **389**(10080): S. 1741-1755.
29. Ungaro, R., et al., *Ulcerative colitis*. Lancet, 2017. **389**(10080): S. 1756-1770.
30. Osterman, M.T., *Mucosal healing in inflammatory bowel disease*. J Clin Gastroenterol, 2013. **47**(3): S. 212-21.
31. Reinink, A.R., T.C. Lee, P.D. Higgins, *Endoscopic Mucosal Healing Predicts Favorable Clinical Outcomes in Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis*. Inflamm Bowel Dis, 2016. **22**(8): S. 1859-69.
32. Dulai, P.S., et al., *Assessment of mucosal healing in inflammatory bowel disease: review*. Gastrointest Endosc, 2015. **82**(2): S. 246-55.
33. D'Haens, G., et al., *A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2007. **132**(2): S. 763-86.
34. D'Haens, G.R., et al., *Endpoints for clinical trials evaluating disease modification and structural damage in adults with Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(10): S. 1599-604.
35. Bryant, R.V., et al., *Beyond endoscopic mucosal healing in UC: histological remission better predicts corticosteroid use and hospitalisation over 6 years of follow-up*. Gut, 2016. **65**(3): S. 408-14.

36. Yzet, C., et al., *OP35 Endoscopic and deep remission at 1 year prevents disease progression in early Crohn's disease: long-term data from CALM*. Journal of Crohn's and Colitis, 2019. **13**(Supplement\_1): S. S024-S025.
37. Wang, H., et al., *DOP68 Histological remission (NANCY index) is superior to endoscopic mucosal healing in predicting relapse-free survival in patients with ulcerative colitis in clinical and endoscopic remission*. Journal of Crohn's and Colitis, 2019. **13**(Supplement\_1): S. S071-S071.
38. Mary, J.Y., R. Modigliani, *Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID)*. Gut, 1989. **30**(7): S. 983-9.
39. Daperno, M., et al., *Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD*. Gastrointest Endosc, 2004. **60**(4): S. 505-12.
40. Khanna, R., et al., *A systematic review of measurement of endoscopic disease activity and mucosal healing in Crohn's disease: recommendations for clinical trial design*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(10): S. 1850-61.
41. Schroeder, K.W., W.J. Tremaine, D.M. Ilstrup, *Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study*. N Engl J Med, 1987. **317**(26): S. 1625-9.
42. Panaccione, R., et al., *Combination therapy with infliximab and azathioprine is superior to monotherapy with either agent in ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2014. **146**(2): S. 392-400.e3.
43. Bouguen, G., et al., *Feasibility of endoscopic assessment and treating to target to achieve mucosal healing in ulcerative colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(2): S. 231-9.
44. Travis, S.P., et al., *Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS)*. Gut, 2012. **61**(4): S. 535-42.
45. Iacucci, M., et al., *Development and reliability of the new endoscopic virtual chromoendoscopy score: the PICaSSO (Paddington International Virtual ChromoendoScopy ScOre) in ulcerative colitis*. Gastrointest Endosc, 2017. **86**(6): S. 1118-1127.e5.
46. Bouguen, G., et al., *Endoscopic assessment and treating to target increase the likelihood of mucosal healing in patients with Crohn's disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2014. **12**(6): S. 978-85.
47. Antoni, L., et al., *Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides*. J Crohns Colitis, 2013. **7**(12): S. e652-64.
48. Pullan, R.D., et al., *Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis*. Gut, 1994. **35**(3): S. 353-9.
49. Darfeuille-Michaud, A., et al., *High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease*. Gastroenterology, 2004. **127**(2): S. 412-21.

50. Hayashi, R., et al., *Reduced Human alpha-defensin 6 in Noninflamed Jejunal Tissue of Patients with Crohn's Disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2016. **22**(5): S. 1119-28.
51. Yoshiyama, H., T. Nakazawa, *Unique mechanism of Helicobacter pylori for colonizing the gastric mucus*. *Microbes Infect*, 2000. **2**(1): S. 55-60.
52. Basson, M.D., *Hierarchies of healing in gut mucosal injury*. *J Physiol Pharmacol*, 2017. **68**(6): S. 789-795.
53. Konturek, P.C., et al., *Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha during ulcer healing. Time sequence study*. *Scand J Gastroenterol*, 1997. **32**(1): S. 6-15.
54. Rieder, F., et al., *Results of the 2nd scientific workshop of the ECCO (III): basic mechanisms of intestinal healing*. *J Crohns Colitis*, 2012. **6**(3): S. 373-85.
55. Nenci, A., et al., *Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation*. *Nature*, 2007. **446**(7135): S. 557-61.
56. Akazawa, A., et al., *Increased expression of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA in the intestinal mucosa of inflammatory bowel disease, particularly in patients with disease in the inactive phase*. *J Gastroenterol*, 2002. **37**(5): S. 345-53.
57. McKenzie, S.J., et al., *Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(1): S. 136-41.
58. von Lampe, B., et al., *Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2000. **47**(1): S. 63-73.
59. Lacy, E.R., S. Ito, *Rapid epithelial restitution of the rat gastric mucosa after ethanol injury*. *Lab Invest*, 1984. **51**(5): S. 573-83.
60. Bement, W.M., P. Forscher, M.S. Mooseker, *A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance*. *J Cell Biol*, 1993. **121**(3): S. 565-78.
61. Klingensmith, N.J., et al., *Epidermal Growth Factor Improves Intestinal Integrity and Survival in Murine Sepsis Following Chronic Alcohol Ingestion*. *Shock*, 2017. **47**(2): S. 184-192.
62. Babyatsky, M.W., G. Rossiter, D.K. Podolsky, *Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1996. **110**(4): S. 975-84.
63. Stedman, A., G. Nigro, P.J. Sansonetti, *[Microbiota-intestinal stem cells dialog: a key element for intestinal regeneration]*. *Med Sci (Paris)*, 2016. **32**(11): S. 983-990.
64. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. *Nature*, 1997. **386**(6626): S. 671-4.
65. Bradford, E.M., et al., *Epithelial TNF Receptor Signaling Promotes Mucosal Repair in Inflammatory Bowel Disease*. *J Immunol*, 2017. **199**(5): S. 1886-1897.
66. Probert, L., *TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects*. *Neuroscience*, 2015. **302**: S. 2-22.

67. Hayashi, Y., et al., *Topical transplantation of mesenchymal stem cells accelerates gastric ulcer healing in rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(3): S. G778-86.
68. Silverstein, F.E., et al., *Misoprostol reduces serious gastrointestinal complications in patients with rheumatoid arthritis receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Ann Intern Med, 1995. **123**(4): S. 241-9.
69. Tovey, F.I., *Role of dietary phospholipids and phytosterols in protection against peptic ulceration as shown by experiments on rats*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(5): S. 1377-84.
70. Naganuma, M., et al., *Complete mucosal healing of distal lesions induced by twice-daily budesonide 2-mg foam promoted clinical remission of mild-to-moderate ulcerative colitis with distal active inflammation: double-blind, randomized study*. J Gastroenterol, 2018. **53**(4): S. 494-506.
71. Kwapisz, L., et al., *Pharmacokinetic drug evaluation of budesonide in the treatment of Crohn's disease*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2017. **13**(7): S. 793-801.
72. Hofman, D., et al., *Use of topical corticosteroids on chronic leg ulcers*. J Wound Care, 2007. **16**(5): S. 227-30.
73. Podvigina, T.T., L.P. Filaretova, *[The Influence of Glucocorticoids on the Healing Processes in the Gastric Mucosa]*. Usp Fiziol Nauk, 2016. **47**(1): S. 3-14.
74. Ardite, E., et al., *Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kappaB in patients with inflammatory bowel disease*. Br J Pharmacol, 1998. **124**(3): S. 431-3.
75. Baumgart, D.C., et al., *Mesalamine promotes intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism*. Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(8): S. 958-64.
76. D'Haens, G., K. Geboes, P. Rutgeerts, *Endoscopic and histologic healing of Crohn's (ileo-) colitis with azathioprine*. Gastrointest Endosc, 1999. **50**(5): S. 667-71.
77. Ginestal, R., et al., *Comparing the influence of two immunosuppressants (fingolimod, azathioprine) on wound healing in a rat model of primary and secondary intention wound closure*. Wound Repair Regen, 2019. **27**(1): S. 59-68.
78. Rutgeerts, P., et al., *Adalimumab induces and maintains mucosal healing in patients with Crohn's disease: data from the EXTEND trial*. Gastroenterology, 2012. **142**(5): S. 1102-1111.e2.
79. Levin, A.D., M.E. Wildenberg, G.R. van den Brink, *Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease*. J Crohns Colitis, 2016. **10**(8): S. 989-97.
80. Noti, M., et al., *TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis*. J Exp Med, 2010. **207**(5): S. 1057-66.
81. Gotz, M., et al., *[S2k Guideline Gastrointestinal Bleeding - Guideline of the German Society of Gastroenterology DGVS]*. Z Gastroenterol, 2017. **55**(9): S. 883-936.

82. Wedi, E., et al., *Use of the over-the-scope-clip (OTSC) in non-variceal upper gastrointestinal bleeding in patients with severe cardiovascular comorbidities: a retrospective study*. *Endosc Int Open*, 2017. **5**(9): S. E875-e882.
83. Boulton, A.J., et al., *Prehospital haemostatic dressings for trauma: a systematic review*. *Emerg Med J*, 2018. **35**(7): S. 449-457.
84. Sung, J.J., et al., *Early clinical experience of the safety and effectiveness of Hemospray in achieving hemostasis in patients with acute peptic ulcer bleeding*. *Endoscopy*, 2011. **43**(4): S. 291-5.
85. Kratt, T., et al., *Successful Hemospray treatment for recurrent diclofenac-induced severe diffuse lower gastrointestinal bleeding avoiding the need for colectomy*. *Endoscopy*, 2014. **46 Suppl 1 UCTN**: S. E173-4.
86. Alzoubaidi, D., et al., *Outcomes from an international multicenter registry of patients with acute gastrointestinal bleeding undergoing endoscopic treatment with Hemospray*. *Dig Endosc*, 2020. **32**(1): S. 96-105.
87. Hussein, M., et al., *Outcomes of Hemospray therapy in the treatment of intraprocedural upper gastrointestinal bleeding post-endoscopic therapy*. *United European Gastroenterol J*, 2020: S. 2050640620938549.
88. Holster, I., et al., *Effects of a hemostatic powder hemospray on coagulation and clot formation*. *Endoscopy*, 2015. **47**(07): S. 638-645.
89. Beye, B., et al., *Topical hemostatic powder promotes reepithelialization and reduces scar formation after extensive esophageal mucosal resection*. *Dis Esophagus*, 2016. **29**(6): S. 520-7.
90. Fujimoto, A., et al., *Rebamipide solution: a novel submucosal injection material to promote healing speed and healing quality of ulcers induced by endoscopic submucosal dissection*. *Gastrointest Endosc*, 2018. **87**(4): S. 1114-1120.
91. Deprez, P.H., et al., *Current practice with endoscopic submucosal dissection in Europe: position statement from a panel of experts*. *Endoscopy*, 2010. **42**(10): S. 853-8.
92. Camus, M., et al., *Validation of a live animal model for training in endoscopic hemostasis of upper gastrointestinal bleeding ulcers*. *Endoscopy*, 2013. **45**(6): S. 451-7.
93. Wang, H.Y., et al., *The feasibility of using simulated targets in the stomachs of live pigs for full endoscopic submucosal dissection training*. *Gut Liver*, 2014. **8**(6): S. 619-24.
94. Harada, N., et al., *Novel role of prostacyclin in stress-induced gastric mucosal lesion formation in rats*. *J Lab Clin Med*, 1997. **129**(6): S. 620-6.
95. Figler, M., I. Szabo, G. Mozsik, *Effects of pectin-induced passive linkage of gastric H<sup>+</sup> on the gastric acid secretion on the development of ethanol- and salicylate-induced gastric mucosal lesions in rats*. *J Physiol Paris*, 1999. **93**(6): S. 495-9.
96. Protell, R.L., et al., *A reproducible animal model of acute bleeding ulcer-the "ulcer maker"*. *Gastroenterology*, 1976. **71**(6): S. 961-4.
97. Elmunzer, B.J., et al., *Endoscopic full-thickness resection of gastric tumors using a novel grasp-and-snare technique: feasibility in ex vivo and in vivo porcine models*. *Endoscopy*, 2008. **40**(11): S. 931-5.

98. Giday, S., et al., *Safety analysis of a hemostatic powder in a porcine model of acute severe gastric bleeding*. Dig Dis Sci, 2013. **58**(12): S. 3422-8.
99. Chen, V.K., et al., *Creation of an effective and reproducible nonsurvival porcine model that simulates actively bleeding peptic ulcers*. Gastrointest Endosc, 2008. **68**(3): S. 548-53.
100. Mourad, F.H., et al., *Experimental colitis in rats induces de novo synthesis of cytokines at distant intestinal sites: role of capsaicin-sensitive primary afferent fibers*. Eur Cytokine Netw, 2016. **27**(2): S. 41-53.
101. Vishwakarma, N., et al., *Mesalazine-probiotics beads for acetic acid experimental colitis: formulation and characterization of a promising new therapeutic strategy for ulcerative colitis*. Drug Deliv, 2015. **22**(1): S. 94-9.
102. Pox, C., et al., *[S3-guideline colorectal cancer version 1.0]*. Z Gastroenterol, 2013. **51**(8): S. 753-854.
103. Spadaccini, M., et al., *Efficacy and safety of SIC-8000 (Eleview(R)) for submucosal injection for endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection in an in vivo porcine model*. Dig Liver Dis, 2018. **50**(3): S. 260-266.
104. Yamashina, T., et al., *Comparison of Underwater vs Conventional Endoscopic Mucosal Resection of Intermediate-Size Colorectal Polyps*. Gastroenterology, 2019. **157**(2): S. 451-461.e2.
105. Luellmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. Vol. 4. Auflage. 2012, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 392- 411.
106. Heldwein, W., et al., *The Munich Polypectomy Study (MUPS): prospective analysis of complications and risk factors in 4000 colonic snare polypectomies*. Endoscopy, 2005. **37**(11): S. 1116-22.
107. Park, Y.M., et al., *The effectiveness and safety of endoscopic submucosal dissection compared with endoscopic mucosal resection for early gastric cancer: a systematic review and metaanalysis*. Surg Endosc, 2011. **25**(8): S. 2666-77.
108. Chapelle, N., et al., *Efficacy of a three-day training course in endoscopic submucosal dissection using a live porcine model: a prospective evaluation*. United European Gastroenterol J, 2018. **6**(9): S. 1410-1416.
109. De Ceglie, A., et al., *Endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection for colorectal lesions: A systematic review*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **104**: S. 138-55.
110. Hu, B., et al., *Developing an animal model of massive ulcer bleeding for assessing endoscopic hemostatic devices*. Endoscopy, 2005. **37**(9): S. 847-51.
111. Stephen, S., M. Agnihotri, S. Kaur, *A Randomized, Controlled Trial to Assess the Effect of Topical Insulin Versus Normal Saline in Pressure Ulcer Healing*. Ostomy Wound Manage, 2016. **62**(6): S. 16-23.
112. Reinisch, W., et al., *Characterisation of Mucosal Healing with Adalimumab Treatment in Patients with Moderately to Severely Active Crohn's Disease: Results from the EXTEND Trial*. J Crohns Colitis, 2017. **11**(4): S. 425-434.

113. Tarnawski, A., et al., *Quality of gastric ulcer healing. Is it influenced by antiulcer drugs?* Scand J Gastroenterol Suppl, 1995. **208**: S. 9-13.
114. Ernst, H., et al., *Acceleration of wound healing in gastric ulcers by local injection of neutralising antibody to transforming growth factor beta 1.* Gut, 1996. **39**(2): S. 172-5.
115. Maruoka, D., et al., *Vonoprazan is superior to proton pump inhibitors in healing artificial ulcers of the stomach post-endoscopic submucosal dissection: A propensity score-matching analysis.* Dig Endosc, 2017. **29**(1): S. 57-64.
116. Ernst, H., et al., *Effect of local injection with basic fibroblast growth factor (BFGF) and neutralizing antibody to BFGF on gastric ulcer healing, gastric secretion, angiogenesis and gastric blood flow.* J Physiol Pharmacol, 2001. **52**(3): S. 377-90.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde an der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. Martin Götz angefertigt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. med. Martin Götz (Leiter der interdisziplinären Endoskopie), Dr. med. Thomas Kratt (Oberarzt der Klinik für Innere Medizin I), Dr. med. Christoph R. Werner (Oberarzt der Klinik für Innere Medizin I) und mich.

Die Versuche wurden von Dr. med. Christoph R. Werner und mir durchgeführt.

Die histologische Aufarbeitung der Präparate erfolgte durch das Pathologische Institut der Universität Tübingen mit Prof. Dr. med. Bence Sipos als Ansprechpartner. Die histologische Auswertung und Dokumentation der Schnitte erfolgten durch mich.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 12.10.2020



## 8 Veröffentlichungen

Teile der Dissertation wurden bereits von mir auf dem Kongress  
Viszeralmedizin der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie,  
Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten und der Deutschen Gesellschaft für  
Allgemein- und Viszeralchirurgie im September 2018 in München als Vortrag  
vorgestellt:

*Effekt des topischen Hämostatikums Hemospray auf die Ulkusheilung im  
GI-Trakt: Eine Pilotstudie am Schweinemodell* (Werner C. R., Brücklmeier L.,  
Kratt T., Malek N. P., Sipos B., Goetz M.)

## 9 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Martin Götz für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Geduld und Unterstützung, die mir entgegengebracht wurden. Die Anregungen und Ratschläge waren immer eine Unterstützung für mich und eine solch gute Betreuung ist keineswegs eine Selbstverständlichkeit. Danke!

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. Christoph Werner, der die endoskopischen Versuche im tierexperimentellen OP mit viel Einsatz und Motivation durchführte und damit die Grundlage für meine Daten und Untersuchungen bildete.

Mein herzlicher Dank gilt ebenfalls dem Team des experimentellen Tier-OP, mit dessen Unterstützung wir die Experimente durchführen konnten. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Bence Sipos und seinen Kollegen des Pathologischen Instituts Tübingen für Anfertigung und Färbung der histologischen Schnitte.

Ich bedanke mich auch bei Ann-Sophie für ihre unermüdliche Unterstützung in allen Bereichen. Mein tiefster Dank gilt Philipp, der mich mit seiner unerschütterlichen Motivation immer weitergebracht hat und auf den ich mich allzeit verlassen kann.

Schlussendlich möchte ich meinen Eltern und Großeltern für ihre Liebe, Unterstützung, Ermutigung und aufbauenden Worte seit Beginn dieser Promotion danken. Das bedeutet mir sehr viel, denn ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.