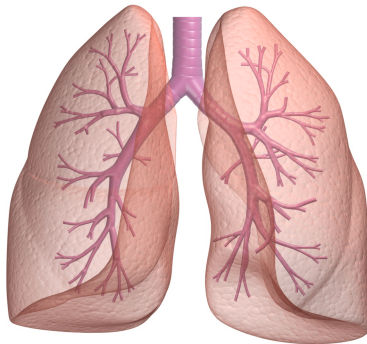


n-3- versus n-6-Fettsäure-reiche Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung:

Einfluss von SMOFlipid® und Lipovenös® 20%
auf die akute respiratorische Insuffizienz im Mausmodell

Matthias Andreas Rose



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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2018

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**n-3- versus n-6-Fettsäure-reiche Lipidemulsionen
in der parenteralen Ernährung:**

**Einfluss von SMOFlipid[®] und Lipovenös[®] 20%
auf die akute respiratorische Insuffizienz im Mausmodell**

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

vorgelegt von

Matthias Andreas Rose
aus Höxter / Nordrhein-Westfalen

Gießen 2017

Aus der Medizinischen Klinik II
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. med. Konstantin Mayer

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Schemuly

Tag der Disputation: 17.11.2017

*Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit*

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Akute respiratorische Insuffizienz / ARDS.....	1
1.1.1 Entwicklung der Definition „ARDS“.....	2
1.1.2 Ätiologie der akuten respiratorischen Insuffizienz	5
1.1.3 Pathogenese der akuten respiratorischen Insuffizienz	6
1.1.4 Entzündungsreaktion im Rahmen der akuten respiratorischen Insuffizienz	10
1.1.4.1 LPS-vermittelte Signalkaskade	11
1.1.4.2 Leukozyten-Rekrutierung.....	14
1.1.4.3 Myeloperoxidase (MPO) als Marker der Neutrophileninvasion im Gewebe.....	18
1.1.4.4 Permeabilität der Lungengefäße und Entstehung des pulmonalen Ödems.....	18
1.1.4.5 Zytokine in der Entzündungsreaktion	20
1.2 Fettsäuren in der Pathogenese der Entzündung.....	25
1.2.1 Arachidonsäure.....	26
1.2.2 Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure.....	31
1.2.3 Immunmodulatorischer Einfluss der n-3-Fettsäuren.....	34
1.3 Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung.....	35
1.3.1 Ernährung kritisch kranker Patienten	35
1.3.2 Lipidemulsionen in der intensivmedizinischen Ernährung.....	37
1.3.3 Mögliche Vorteile von n-3-Fettsäuren als Bestandteil von Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung kritisch kranker Patienten	38
1.4 Fragestellung	40
2. Material und Methoden	41
2.1 Versuchstiere und Tierhaltung	41
2.2 Geräte und Materialien.....	41
2.2.1 Tierhaltung	41
2.2.2 <i>in-vivo</i> -Eingriffe	42
2.2.3 <i>in-vitro</i> -Bestimmungen	45
2.3 <i>in-vivo</i> -Eingriffe	49

2.3.1 Analgesie, Prämedikation, Narkose	49
2.3.2 Katheter-Implantation	49
2.3.3 Infusion.....	51
2.3.4 Intratracheale LPS-Instillation	52
2.3.5 Broncho-alveoläre Lavage (BAL).....	53
2.3.6 Organ-Entnahme	53
2.4 <i>in-vitro</i> -Bestimmungen	53
2.4.1 Leukozyten-Anzahl in der broncho-alveolären Lavage	53
2.4.2 Leukozyten-Differenzierung in der broncho-alveolären Lavage	54
2.4.3 Bestimmung der TNF- α - und MIP-2-Konzentration in der broncho- alveolären Lavage	54
2.4.4 Bestimmung der Protein-Konzentration in der broncho-alveolären Lavage	55
2.4.5 Myeloperoxidase (MPO)-Aktivitäts-Assay.....	56
2.5 Versuchsprotokoll	56
2.5.1 Gruppeneinteilung.....	56
2.5.2 Zeitlicher Ablauf der Experimente.....	57
2.6 Statistik.....	58
3. Ergebnisse	59
3.1 Anzahl der Versuchstiere	59
3.2 Allgemeine, äußerlich sichtbare Entzündungszeichen.....	59
3.3 Leukozyten-Rekrutierung in die Lunge	59
3.3.1 Leukozyten in den Alveolen der Lunge	59
3.3.1.1 Leukozyten	59
3.3.1.2 Leukozyten-Differenzierung	62
3.3.2 Neutrophile Granulozyten im Interstitium der Lunge.....	71
3.4 Permeabilität der Lungengefäße und alveoläre Protein-Konzentration	74
3.5 Alveoläre Konzentration proinflammatorischer Zytokine	77
3.5.1 Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α).....	77
3.5.2 Makrophagen Inflammatorisches Protein-2 (MIP-2).....	80
4. Diskussion	82
4.1 Akute respiratorische Insuffizienz im Mausmodell	82
4.1.1 Charakterisierung des Mausmodells	82

4.1.2 Ergebnisse der LPS-induzierten akuten respiratorischen Insuffizienz unter NaCl-Infusion	84
4.2 Einfluss von Lipidemulsionen auf die akute respiratorische Insuffizienz im Mausmodell	89
4.2.1 Ergebnisse der LPS-induzierten akuten respiratorischen Insuffizienz unter verschiedenen Lipidemulsionen	89
4.2.1.1 Alveoläre Zytokin-Konzentration	89
4.2.1.2 Leukozyten-Rekrutierung in die Lunge	94
4.2.1.3 Alveoläre Protein-Konzentration	96
4.2.2 Immunmodulation durch Lipidemulsionen: aktuelle Studienlage und praktische Anwendbarkeit.....	98
5. Zusammenfassung.....	104
6. Abkürzungsverzeichnis	106
7. Abbildungsverzeichnis	111
8. Tabellenverzeichnis.....	113
9. Literaturverzeichnis.....	114
10. Erklärung	122
11. Danksagung	123

1. Einleitung

1.1 Akute respiratorische Insuffizienz / ARDS

Die akute respiratorische Insuffizienz [*acute respiratory distress syndrome* (ARDS)] ist eine akut auftretende, diffus entzündliche Lungenschädigung, die mit prädisponierenden Risikofaktoren assoziiert ist und zu einer gesteigerten Permeabilität der pulmonalen Blutgefäße sowie zum Verlust belüfteter Lungenareale führt [2]. Klinische Kennzeichen dieses Syndroms sind refraktäre arterielle Hypoxämie und bilaterale Verschattungen in der Röntgenthoraxaufnahme oder in der Computertomographie. Außerdem kommt es zu physiologischen Störungen wie gesteigertem intrapulmonalem Shuntfluss, vermehrter pulmonaler Totraumventilation oder verminderter Dehnbarkeit (*Compliance*) des Lungengewebes [2]. Das histo-morphologische Kennzeichen der akuten Phase stellt sich als diffuser alveolärer Schaden in Form von alveolärem proteinreichem Ödem, Inflammation, Ausbildung hyaliner Membranen über die Alveolen sowie Hämorrhagien dar [2]. Im Verlauf des ARDS kann es infolge von Hyperkapnie, Mikrothrombosierung und pulmonaler Vasokonstriktion zur Entwicklung einer akuten pulmonalen Hypertonie mit daraus resultierender Rechtsherzinsuffizienz kommen, wodurch wiederum die Entstehung weiterer Organdysfunktionen begünstigt wird [1-3].

Die akute respiratorische Insuffizienz hat einen bedeutenden Einfluss auf Morbidität und Mortalität von Patienten auf der Intensivstation und stellt einen kostenintensiven Faktor im Gesundheitswesen dar [4, 5]. Die Inzidenz dieses Krankheitsbildes ist nur schwer abschätzbar, was sich zum einen durch die anfänglich uneinheitliche ARDS-Definition, zum anderen durch ätiologische, geographische und genetische Unterschiede begründen lässt. Des Weiteren spielen Differenzen bezüglich des Versorgungsstandards von Krankenhäusern und Intensivstationen eine Rolle. Je nach Studienlage schwankt die berichtete Inzidenz somit zwischen 1,5 und 88,6 Neuerkrankungen / 100.000 Einwohner / Jahr [3, 5, 6]. Die Mortalität des ARDS lag initial bei 50-70%. Besseres Verständnis über die Pathogenese des Krankheitsbildes und Fortschritte in der Intensivmedizin führten zu einer deutlichen Prognoseverbesserung. So liegt die Mortalität heutzutage bei etwa 35-45% [3, 7, 8]. Unter Verwendung der aktuellen Schweregrad-Einteilung des ARDS nach der Berlin-Definition von 2012, lassen sich unterschiedliche Mortalitätswerte aufzeigen, die beim milden ARDS 27%, beim moderaten Grad 32% und beim schweren ARDS 45% betragen [1]. Als

Haupttodesursache wird das Multiorganversagen aufgeführt. Risikofaktoren für einen fatalen Ausgang stellen fortgeschrittenes Alter, nicht-pulmonale Organdysfunktion, Leberzirrhose, Tumorerkrankungen und septischer Schock dar, wohingegen junge Traumapatienten die besten Überlebenschancen haben [3, 7].

1.1.1 Entwicklung der Definition „ARDS“

Die Erstbeschreibung der akuten respiratorischen Insuffizienz stammt aus dem Jahr 1967 von Ashbough et al., die während einer Verlaufsbeobachtung von insgesamt 272 beatmungspflichtigen Patienten 12 Patienten entdeckten, die bezüglich ihrer klinischen, röntgenologischen und pathologischen Befunde ein ähnliches Muster aufwiesen, sich aber vom Rest des Patientenkollektivs unterschieden [9]. Charakterisiert waren diese anamnestisch zuvor lungengesunden Patienten durch akut einsetzende und schwere Dyspnoe, Tachypnoe, Sauerstoff-refraktäre Zyanose, Verlust der pulmonalen *Compliance* und diffuse alveoläre Infiltrate in der Röntgenthoraxaufnahme. In der Obduktion zeigte sich eine ausgedehnte pulmonale Inflammation mit Hyperämie, Atelektasen, interstitielle und alveoläre Hämorrhagien und Ödeme sowie hyaline Membranen [2, 9].

Aufgrund von Homologien zum Atemnotsyndrom des Neugeborenen (*Infantile Respiratory Distress Syndrome*, IRDS), wurde dieses Krankheitsbild von Ashbough et al. zunächst als *Adult Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) bezeichnet [10].

In den folgenden 25 Jahren wurden verschiedene Definitionen mit modifizierten Kriterien entwickelt [11-14]. Es existierte jedoch keine einheitliche ARDS-Definition, die allgemein anerkannt oder genutzt wurde [2]. Erst im Rahmen der amerikanisch-europäischen Konsensuskonferenz (AECC) 1994 konnte eine weltweit einheitliche Definition des ARDS eingeführt werden (siehe **Tabelle 1**) [2, 15]. Die Konsensuskonferenz definierte das ARDS als akut einsetzende refraktäre Hypoxämie mit bilateralen Infiltraten in der Röntgenthoraxaufnahme bei gleichzeitigem Ausschluss einer Linksherzinsuffizienz [pulmonalarterieller Verschlussdruck (PAWP) < 18mmHg oder alternatives Verfahren zum Ausschluss einer Linksherzinsuffizienz] [15]. Des Weiteren wurde der Begriff „ALI“ (*acute lung injury*) eingeführt und die Bezeichnung „*Adult*“ durch „*Acute*“ ersetzt, da dieses Krankheitsbild auch im Kindesalter auftreten kann [15]. Der Unterschied zwischen ALI und der schwereren Form des akuten Lungenversagens, ARDS, wird über den Oxygenierungsindex (P_aO_2/F_iO_2) definiert. Dieser zeigt das Verhältnis von arteriellem Sauerstoffpartialdruck (P_aO_2) zu

inspiratorischer Sauerstoffkonzentration (F_iO_2). Bei einem Oxygenierungsindex < 300 mmHg handelt es sich um ein ALI, bei einem Index < 200 mmHg um ein ARDS [2, 15, 16].

AECC-Definition des ARDS 1994		
Zeitlicher Verlauf	Akuter Beginn	
Röntgen-Thorax	Bilaterale Infiltrate	
Ursache des Lungenödems	PAWP < 18 mmHg oder alternatives Verfahren zum Ausschluss einer Linksherzinsuffizienz	
Oxygenierung	ALI	$P_aO_2/F_iO_2 < 300$ mmHg
	ARDS	$P_aO_2/F_iO_2 < 200$ mmHg

Tab. 1 AECC-Definition des ARDS (1994) modifiziert nach [1]

AECC= amerikanisch-europäische Konsensuskonferenz; PAWP= pulmonalarterieller Verschlussdruck; ALI= acute lung injury; ARDS= acute respiratory distress syndrome; P_aO_2 = arterieller Sauerstoffpartialdruck; F_iO_2 = inspiratorische Sauerstoffkonzentration; P_aO_2/F_iO_2 = Oxygenierungsindex

Seit der Einführung der AECC-Kriterien zum ARDS im Jahr 1994 sind diesbezüglich einige Kritikpunkte aufgetreten, wie z.B. der nicht klar definierte Begriff „akuter Beginn“ oder der PAWP, der zur Diagnosefindung einen Wert von unter 18 mmHg betragen muss, obwohl mittlerweile bekannt war, dass auch höhere Werte gemeinsam mit dem ARDS auftreten können [1, 2, 17]. So forderten unter anderem Phua et al. 2008, dass es an der Zeit sei, die ARDS-Kriterien neu zu definieren [17].

Um die neuen medizinischen Erkenntnisse und die Kritikpunkte an der alten AECC-Definition zu berücksichtigen, wurde 2011 ein internationales Experten-Gremium zusammengestellt. Diese *ARDS Definition Task Force* erarbeitete eine vorläufige Definition, deren Kriterien, Anwendbarkeit und prädiktive Validität im Anschluss mithilfe einer Datenbankanalyse aus 7 internationalen Zentren getestet wurden. Auf dieser Grundlage präsentierte die *ARDS Definition Task Force* 2012 die neuen Kriterien und die Klassifikation des ARDS, die Berlin-Definition (siehe **Tabelle 2**) [1, 16].

So wurde das Kriterium „akuter Beginn“ nun als Zeitspanne von einer Woche oder

weniger definiert, die radiologischen Befunde sind präzisiert worden, der Begriff „ALI“ wurde ersatzlos gestrichen und dem PAWP wurden aufgrund nachlassender Relevanz für die Diagnosefindung neue, alternative Verfahren zur Seite gestellt. Die Ursache des Lungenödems sollte aber auch weiterhin nicht überwiegend durch Linksherzinsuffizienz oder Volumenbelastung erklärbar sein. Außerdem wurde eine neue Schweregradeinteilung des ARDS eingeführt (mildes, moderates, schweres ARDS), die über den Oxygenierungsindex in Kombination mit dem applizierten PEEP (positiver endexpiratorischer Druck) definiert wird. Diese erlaubt in Zukunft z.B. eine schweregrad-adaptierte Therapie [1, 16].

Berlin-Definition des ARDS 2012		
Zeitlicher Verlauf	Beginn innerhalb 1 Woche bei bekannter Ursache oder neuer oder verschlimmelter Symptome	
Röntgen-Thorax	Bilaterale Infiltrate, die sich nicht vollständig durch Pleuraergüsse, Atelektasen oder Rundherde erklären lassen	
Ursache des Lungenödems	Respiratorisches Versagen nicht ausschließlich über Herzversagen oder Volumenüberschuss erklärbar; weitere Untersuchungen zum Ausschluss eines hydrostatischen Ödems sind notwendig, falls kein Risikofaktor vorhanden (z.B. Echokardiographie)	
Oxygenierung	mildes ARDS	$200 \text{ mmHg} < P_aO_2/F_iO_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ mit PEEP oder CPAP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
	moderates ARDS	$100 \text{ mmHg} < P_aO_2/F_iO_2 \leq 200 \text{ mmHg}$ mit PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
	schweres ARDS	$P_aO_2/F_iO_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ mit PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$

Tab. 2 Berlin-Definition des ARDS (2012) modifiziert nach [1]

ARDS= acute respiratory distress syndrome; P_aO_2 = arterieller Sauerstoffpartialdruck; F_iO_2 = inspiratorische Sauerstoffkonzentration; P_aO_2/F_iO_2 = Oxygenierungsindex; PEEP= positiver endexpiratorischer Druck; CPAP= kontinuierlicher positiver Atemwegsdruck

1.1.2 Ätiologie der akuten respiratorischen Insuffizienz

Die akute respiratorische Insuffizienz kann durch verschiedene Ursachen ausgelöst werden. So unterteilte die AECC-Definition die ätiologischen Risikofaktoren in 2 Pathomechanismen, den direkten und den indirekten Lungenschaden. Der direkte Schaden, verursacht z.B. durch Pneumonie, Aspiration von Mageninhalt oder Lungenkontusion, betrifft das Lungenparenchym direkt. Bei einem indirekten Schaden liegt die Ursache jedoch extrapulmonal. So können z.B. Sepsis, Pankreatitis oder Massentransfusion ein ARDS auslösen [3, 15]. Da sich die Kategorien „direkt“ und „indirekt“ hinsichtlich der entzündlichen Antwort und der radiologischen Muster zu einem großen Grad überlappen, entschied die *ARDS Definition Task Force* 2012, diese Entitäten nicht in die Berlin-Definition mit aufzunehmen (siehe **Tabelle 3**) [2].

Häufige Risikofaktoren des ARDS
<ul style="list-style-type: none"> • Pneumonie (bakteriell, viral) • Schwere Sepsis • Aspiration von Mageninhalt • Polytrauma / Operationen • Lungenkontusion • Pankreatitis • Inhalationstrauma • Schwere Verbrennungen • Nicht-kardiogener Schock • Medikamente (Opiate), Drogenintoxikation • Massentransfusion / Transfusions- assoziiertes akutes Lungenversagen (TRALI) • Pulmonale Vaskulitis • Beinaheertrinken

Tab. 3 Häufige ätiologische Risikofaktoren des ARDS modifiziert nach [2]

Von den oben genannten Risikofaktoren ist die Sepsis mit 41% am häufigsten mit dem ARDS assoziiert, gefolgt von Massentransfusionen mit 36% und Aspirationspneumonie mit 22% [3]. Seit den 1970er Jahren weiß man, dass auch eine maschinelle Beatmung mit hohen Spitzendrücken und Tidalvolumina die Lunge schädigen kann. Diese Sonderform des akuten Lungenversagens wird als *ventilator-induced lung injury* (VILI) bezeichnet [3]. Anfängliche Theorien erklären dieses Phänomen zum einen durch die beatmungsinduzierte Überdehnung der Alveolarwand, die zu diffusen Alveolarschäden führt, zum anderen durch auftretende Scherkräfte, die durch das wiederholte Öffnen und Schließen von kollabierten Lungenabschnitten entstehen. Neuere Erkenntnisse

offenbaren, dass es infolge der oben genannten mechanischen Beanspruchung auch zur Induktion einer Entzündungskaskade mit nachfolgender Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren kommt [3, 18].

1.1.3 Pathogenese der akuten respiratorischen Insuffizienz

Die akute respiratorische Insuffizienz ist ein heterogenes Syndrom mit komplexen pathophysiologischen Mechanismen. Obwohl diesem Krankheitsbild viele verschiedene Ursachen zugrunde liegen können, existiert eine gemeinsame Endstrecke, die über eine Aktivierung von Entzündungs- und Gerinnungskaskaden letztlich in einer weitgehend einheitlichen Schädigung der Lunge mündet [3]:

Das pathogenetische Kennzeichen der akuten exsudativen Phase des ARDS ist die Entwicklung eines Permeabilitätsödems infolge einer Schädigung der alveolokapillären Barriere, die aus dem pulmonalvaskulären Endothel und dem alveolären Epithel besteht [3, 18, 19]. Vor allem bei einer direkten Lungenschädigung, z.B. im Rahmen einer Pneumonie, wird das alveoläre Epithel angegriffen [3]. Dieses besteht zu 90% aus den für den Gasaustausch verantwortlichen Typ-I-Zellen und zu 10% aus den Typ-II-Zellen, die ihrerseits für Surfactant-Bildung, Ionentransport und Typ-I-Zell-Regeneration von Bedeutung sind [18, 19]. Dieser Epithelschaden führt zu einem eingeschränkten aktiven und passiven Transport von Flüssigkeit aus den Alveolen sowie zu einer verminderten Surfactant-Produktion [3, 18, 19]. Des Weiteren sind Reparationsphase und damit die Abheilung des ARDS beeinträchtigt [19]. Das pulmonalvaskuläre Endothel wird insbesondere beim indirekten Lungenschaden z.B. im Rahmen der Sepsis angegriffen [3]. Die Barriestörung führt zu vermehrtem Einstrom von Flüssigkeit in den Alveolarraum. Außerdem werden die Endothelzellen und infolge dessen auch deren Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmoleküle aktiviert, wodurch es zu einer vermehrten Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten kommt [3, 18, 19]. Nach Akkumulation in der pulmonalen Strombahn, im Lungeninterstitium und schließlich in den Alveolen, produzieren sie proinflammatorische Mediatoren, Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme. Ursprünglich als körpereigene Abwehrmaßnahme gegenüber Pathogenen gedacht, wird die Lunge hierdurch im weiteren Verlauf zunehmend geschädigt. Somit spielen Neutrophile in der Pathogenese des ARDS ebenfalls eine entscheidende Rolle [3, 18, 19]. Eine weitere wichtige Folge der gestörten alveolokapillären Barriere besteht darin, dass Bakterien, z.B. im Rahmen

einer bakteriellen Pneumonie, nun einfacher in den systemischen Kreislauf gelangen und dort mitunter einen septischen Schock auslösen können [19].

Zusammenfassend kommt es in dieser akuten Phase infolge der Barriestörung zum Einstrom einer protein- und mediatorreichen Flüssigkeit in die Alveolen, wodurch entzündliche Prozesse einsetzen sowie ein Lungenödem entsteht. Infolge dieses Permeabilitätsödems ist die Dehnbarkeit der Lunge vermindert [3, 18]. Endotheliale Schädigung und Aktivierung führen zu Mikrothrombosierung und Vasokonstriktion, was wiederum in einer Obstruktion der pulmonalen Kapillaren mündet. Die eingeschränkte Surfactant-Produktion und die infolge des alveolären Ödems bedingte Neutralisation des Surfactant führen über eine Erhöhung der alveolären Oberflächenspannung zu Alveolarkollaps und nachfolgend zu Atelektasenbildung [3, 18]. Letztlich münden die genannten Prozesse in einem Missverhältnis zwischen Perfusion und Ventilation (*V/Q-mismatch*). Dieses Missverhältnis äußert sich in Form eines intrapulmonalen Shuntflusses (Perfusion ohne Ventilation) sowie einer Totraumventilation (Ventilation ohne Perfusion) [3]. Anhand der aufgeführten pathophysiologischen Mechanismen lässt sich das klinische Erscheinungsbild dieser akuten exsudativen Phase erklären. So präsentiert es sich als akut einsetzende Dyspnoe und arterielle Hypoxämie in Kombination mit bilateralen Infiltraten. Histologisch zeigt sich ein diffuser alveolärer Schaden mit proteinreichem Ödem, in dem Neutrophile, Makrophagen und Erythrozyten vorkommen. Fibrinreiche hyaline Membranen sind der Basalmembran angelagert (siehe **Abbildung 1**) [3, 18-20].

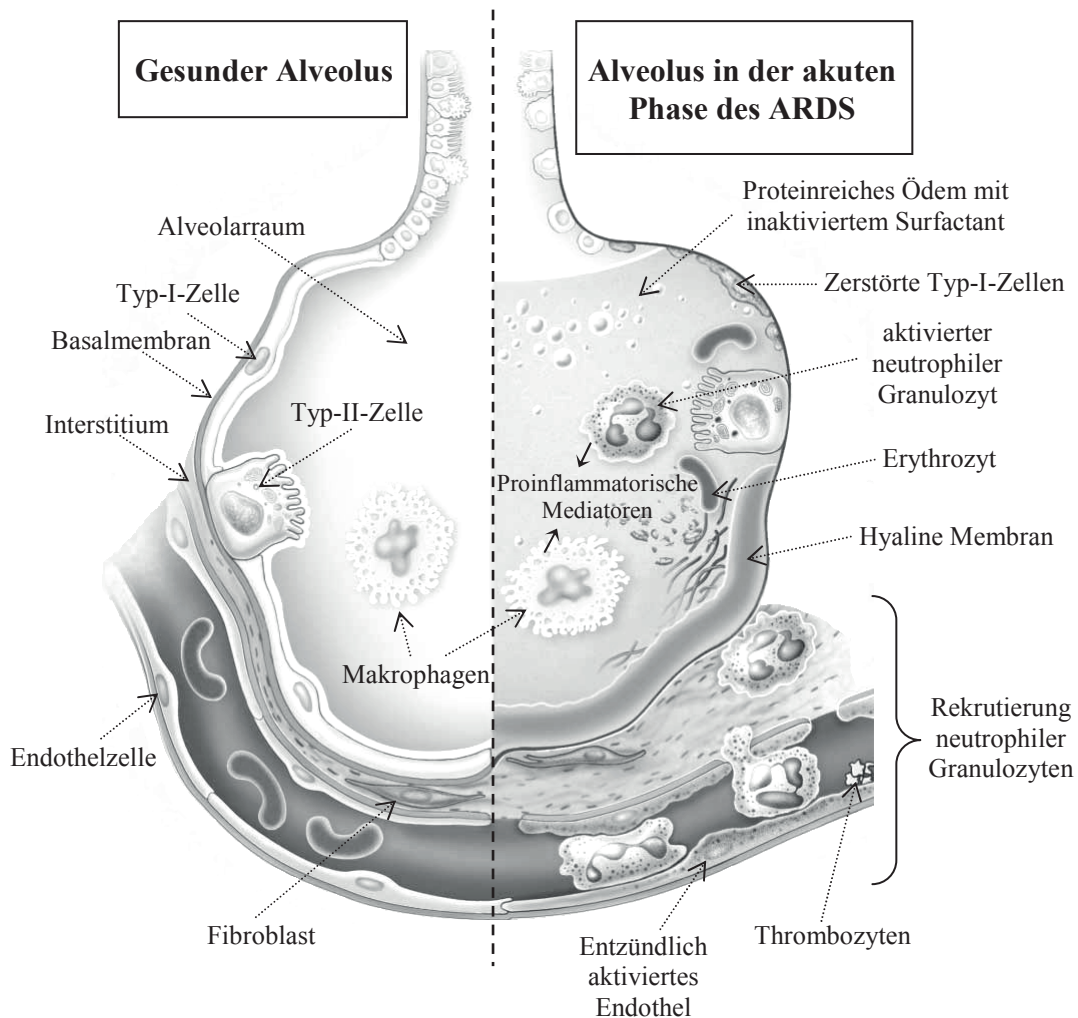


Abb. 1 Kennzeichen des ARDS modifiziert nach [19]

Gesunder Alveolus links, Alveolus in der akuten Phase des ARDS rechts. Die akute Phase des ARDS ist gekennzeichnet durch einen diffusen alveolären Schaden mit proteinreichem Ödem, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten sowie fibrinreichen hyalinen Membranen. Durch Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren und inflammationsbedingte Aktivierung des Endothels werden neutrophile Granulozyten in das Interstitium und in die Alveolen rekrutiert. Abbildung adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Ware, L.B. und M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med*, 2000. **342**(18): p. 1334-49, Copyright Massachusetts Medical Society. Reproduced with permission from Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med*, 2000. **342**(18): p. 1334-49, Copyright Massachusetts Medical Society.

Im Anschluss an die akute Phase erfolgt die Abheilung. Durch aktiven Transport von Natrium und Chlorid und passiven Transport von Wasser durch Aquaporine, wird das alveoläre Ödem aus den Alveolen ins Interstitium entfernt [18]. Um die normale Alveolarstruktur wiederherzustellen, werden alveoläre Typ-II-Zellen in Typ-I-Zellen

umgewandelt. Dieser Vorgang wird durch verschiedene epitheliale Wachstumsfaktoren kontrolliert [18]. Der Ablauf der Endothelheilung ist noch nicht genau bekannt. Endothelzellmigration und Proliferation sowie zirkulierende endotheliale Progenitorzellen scheinen hier eine Rolle zu spielen [18]. Unter anderem mithilfe von regulatorischen T-Lymphozyten und Resolvinen wird vermutlich die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten beendet [3, 21-25]. Makrophagen beseitigen den Zelldetritus. Im Rahmen der Heilungsvorgänge kommt es bei einem Teil der Patienten zu einem unkomplizierten Verlauf mit schneller Regeneration. Ein anderer Teil entwickelt jedoch einen protrahierten Verlauf im Sinne eines fibrotischen Lungenschadens [18]. Diese fibrosierende Alveolitis wird als überschießende fibroproliferative Antwort auf die Lungenschädigung angesehen. Myofibroblasten, Fibroblasten, Entzündungszellen, Epithelzellen sowie Zytokine und Wachstumsfaktoren scheinen hier von Bedeutung zu sein [18]. Mesenchymale Zellen füllen gemeinsam mit proliferierenden Fibroblasten und neu gebildeten Blutgefäßen die Alveolen aus. Dieses fibrotische Krankheitsbild, das klinisch durch Hypoxämie und verminderte *Compliance* gekennzeichnet ist, kann mit der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie und konsekutiver Rechtsherzinsuffizienz einen komplizierten Verlauf nehmen [18]. **Abbildung 2** gibt einen Überblick über die Pathogenese des ARDS.

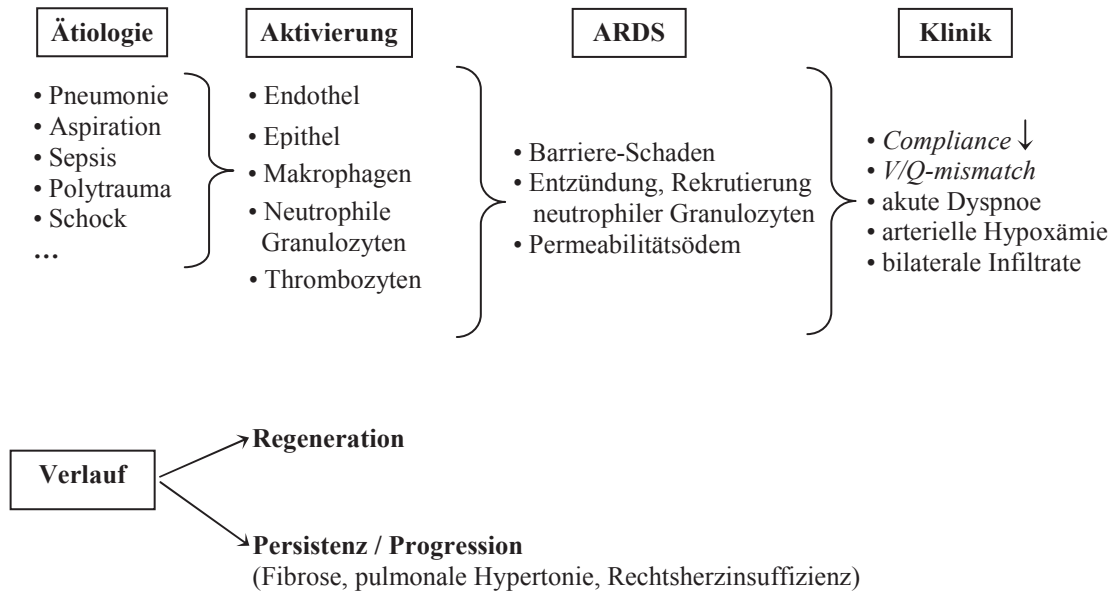


Abb. 2 Überblick über die Pathogenese des ARDS modifiziert nach [20]

Verschiedenste Ursachen führen über Effektorzellen und Mediatoren zu einer Dysregulation von Entzündungs- und Gerinnungskaskaden. Kennzeichen des ARDS sind alveolokapillärer Barrierschaden, Entzündung mit Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sowie Permeabilitätsödem. Folglich imponieren verminderte *Compliance*, *V/Q-mismatch* sowie klinisch akute Dyspnoe, Hypoxämie und bilaterale Infiltrate. Im Anschluss kommt es entweder zur restlosen Abheilung, oder aber es entwickelt sich ein fibrotisches Krankheitsbild bis hin zur Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie mit konsekutiver Rechtsherzinsuffizienz. *V/Q-mismatch*= Missverhältnis zwischen Ventilation (V) und Perfusion (Q).

1.1.4 Entzündungsreaktion im Rahmen der akuten respiratorischen Insuffizienz

Ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese des ARDS (z.B. im Rahmen einer bakteriellen Pneumonie) ist die Entzündungsreaktion, deren wichtigste Schritte in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden. Wie im Kapitel 1.1.3 erwähnt, werden über komplexe Mechanismen unter anderem Endothelzellen und Leukozyten (insbesondere neutrophile Granulozyten) aktiviert und proinflammatorische Zytokine und Lipidmediatoren (Eicosanoide) gebildet [3, 18, 19]. Aktivierte Leukozyten können aufgrund reduzierter Verformbarkeit die pulmonale Strombahn nicht mehr passieren, sodass es zu einer vermehrten Akkumulation von Leukozyten im kapillären Gefäßsystem der Lunge kommt [26]. Im Rahmen der Entzündungsreaktion führt die zunehmende Rekrutierung von Leukozyten aus dem pulmonalen Gefäßbett letztlich zum Einstrom dieser Zellen in das Interstitium und nachfolgend in die Alveolen der Lunge. Hier können sie proinflammatorische Mediatoren, Sauerstoffradikale und

proteolytische Enzyme sezernieren und dadurch die inflammatorischen Reaktionen verstärken. Resultat der vor allem Zytokin- und Eicosanoid-vermittelten inflammatorischen Signalkaskade ist letztlich eine Schädigung der Alveolen, die in Kombination mit der entzündlich erhöhten Gefäßpermeabilität zur Bildung eines proteinreichen alveolären Ödems als Kennzeichen des ARDS führt [3, 18, 19].

1.1.4.1 LPS-vermittelte Signalkaskade

Lipopolysaccharid (LPS) induziert eine komplexe Signalkaskade. Einen Überblick liefert **Abbildung 3**. LPS ist ein Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und wird als Endotoxin bezeichnet. Es besteht aus einer hydrophilen Komponente, den Polysaccharid-Seitenketten, und einer hydrophoben Komponente, dem Lipid A. Diese Lipid-A-Struktur ist verantwortlich für die immunologische Antwort und wird von Immunzellen als pathogen-assoziiertes Molekül erkannt [27, 28].

Das erste in der LPS-Signalkaskade involvierte Protein ist das LPS-bindende Protein (LBP) [27]. Es ist ein 60 kD großes Glykoprotein, das von den Hepatozyten der Leber als Akute-Phase-Protein synthetisiert wird. Das im Blutkreislauf zirkulierende LBP erkennt das als freies Molekül oder an Bakterien gebunden vorliegende LPS und bildet einen hoch-affinen Komplex mit dessen Lipid-A-Struktur. Die Funktion des LBP besteht darin, die Bindung des LPS an dessen Rezeptor-Komplex zu erleichtern. Dazu bindet LBP zunächst das LPS und bildet danach gemeinsam mit CD14 einen Dreier-Komplex [27, 29, 30]. CD14 ist ein 55 kD großes Protein, das in 2 Formen vorliegen kann [27, 31]. Als lösliches CD14 (sCD14) befindet es sich im Blutplasma und unterstützt die LPS-vermittelte Immunantwort in solchen Zellen, die kein membrangebundenes CD14 besitzen, vornehmlich Endothel- und Epithelzellen sowie glatte Muskelzellen. In der anderen Form liegt es als membrangebundenes CD14 (mCD14) vor, welches über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten verbunden ist [27, 31]. Ursprünglich wurde angenommen, dass CD14 der lange Zeit gesuchte LPS-Rezeptor sei. Nachfolgend wurde jedoch der *Toll-like-Receptor-4* (TLR4) als eigentlicher LPS-Rezeptor identifiziert [27]. Die Bedeutung des CD14 liegt nun darin, LPS in Form des LBP/LPS-Komplexes zu binden und dieses anschließend dem eigentlichen, dominanten LPS-Rezeptor, dem Toll-like-Rezeptor-4, zu präsentieren [27, 31, 32]. Der TLR4 ist mit einem weiteren Glykoprotein, dem extrazellulären

Adapterprotein MD-2, assoziiert. LPS bindet nun in Form des LBP-LPS-CD14-Komplexes an MD-2, wodurch der TLR4 aktiviert und die weitere Signalkaskade ausgelöst wird [27]. Diese Kaskade beinhaltet verschiedene Adapterproteine. Eine prominente Rolle spielen hierbei *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), *MyD88-adapter-like-protein* (Mal), *TIR-containing-adapter-molecule* (TRIF) und *TRIF-related-adapter-molecule* (TRAM) [27]. Die durch LPS ausgelöste und durch TLR4 vermittelte Signalkaskade kann sich nun intrazellulär in zwei Wege aufteilen, den MyD88-abhängigen und den MyD88-unabhängigen Weg [27]. Der MyD88-abhängige Weg, der in einer frühen Aktivierung des „Nukleären Faktor- κ B“ (NF- κ B) mündet, beginnt mit den Adapterproteinen MyD88 und Mal [27]. Nach deren Aktivierung werden verschiedene Kinasen phosphoryliert. Von entscheidender Bedeutung sind hierbei die „Interleukin-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen“ (IRAK). Im Rahmen der Kaskade werden verschiedene solcher IRAKs aktiviert. Dies mündet schließlich in der Aktivierung des „Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 6“ (TRAF6), was wiederum die „transforming-growth-factor- β -aktivierte Kinase 1“ (TAK1) induziert. Diese TAK1 kann nun den proinflammatorisch wirkenden NF- κ B aktivieren [27]. Dies beginnt mit der Bildung eines hochmolekularen Komplexes, der aus den Proteinen *inhibitory-binding-protein- κ B-Kinase* (IKK α und IKK β) und einem Proteingerüst, dem IKK γ , zusammengesetzt ist. Nachfolgend kommt es zur Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors [*inhibitory-binding-protein- κ B* (I κ B)]. Der Inhibitor wird daraufhin abgespalten, wodurch es zur Aktivierung des proinflammatorischen NF- κ B kommt. Dieser kann nun aus dem Zytosol in den Zellkern translozieren, wo die Transkription der Zielgene erfolgt. NF- κ B spielt hierbei eine entscheidende Rolle in der Genexpression proinflammatorischer Mediatoren, wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) oder Interleukin-8 (IL-8) [27, 33, 34]. Der MyD88-unabhängige Weg führt über eine spätere Aktivierung des NF- κ B zu einer verzögerten Immunantwort [27]. Er beginnt mit den Adapterproteinen TRIF und TRAM. TRIF bindet an TRAF6, was zur Aktivierung des NF- κ B über die oben genannten Mechanismen führt. Bei diesem Weg spielt ein weiterer Faktor eine Rolle, der sogenannte *interferon-response-factor-3* (IRF3). Obwohl dieser Faktor auch über den MyD88-abhängigen Weg zu einer frühen Immunantwort führen kann, ist er insbesondere bei diesem MyD88-unabhängigen Weg von Bedeutung [27]. Durch Bildung eines Komplexes aus IRF3, *TANK-binding-protein-1* (TBK1) und TRIF, kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung des IRF3, der nun in den Zellkern

translozieren kann. Hier bindet er an das *interferon-sensitive-response-element* (ISRE), was wiederum eine Reihe von Zielgenen mit nachfolgender Bildung proinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. IFN- β , induziert [27].

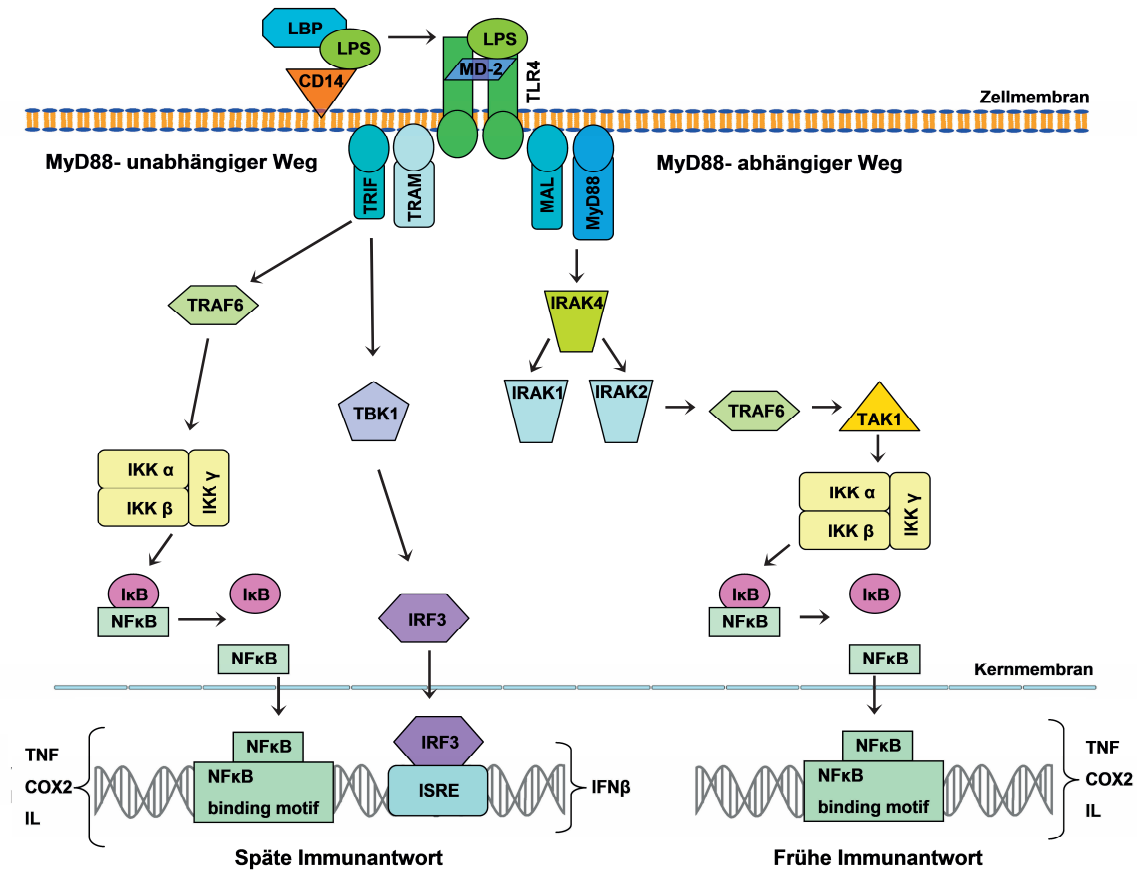


Abb. 3 Vereinfachtes Modell der LPS-vermittelten Signalkaskade modifiziert nach [27]

Im Plasma zirkulierendes LBP bindet LPS und überträgt es auf CD14. Dieser Komplex überträgt das LPS wiederum auf den LPS-Rezeptor-Komplex, bestehend aus TLR4 und MD-2. Die nachfolgenden Signalwege können unterteilt werden in einen MyD88-abhängigen (siehe in der Abb. rechts) und einen MyD88-unabhängigen (siehe in der Abb. links) Weg. Der MyD88-abhängige Weg läuft über die Aktivierung verschiedener Adapterproteine (IRAK, TRAF6, TAK1) und mündet letztlich in der frühen Aktivierung des proinflammatorischen NF- κ B mit nachfolgender Bildung v.a. proinflammatorischer Mediatoren. Der MyD88-unabhängige Weg führt über Aktivierung der Adapterproteine TRIF, TRAM, TRAF6 und TBK1 zur späteren Aktivierung des NF- κ B und des IRF3, was wiederum in der Synthese proinflammatorischer Mediatoren mündet. LBP= LPS-bindendes Protein; LPS= Lipopolysaccharid; CD14= *Cluster of differentiation 14*; TLR4= *Toll-like-receptor 4*; MyD88= *myeloid differentiation factor 88*; IRAK= *Interkeukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinasen*; TRAF6= *Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6*; TAK1= *transforming-growth-factor- β -aktivierte Kinase 1*; NF- κ B= *Nukleärer Faktor- κ B*; TRIF= *TIR-containing-adapter-molecule*; TRAM= *TRIF-related-adapter-molecule*; TBK1= *TANK-binding-protein-1*; IRF3= *interferon-response-factor-3*; TNF= *Tumor-Nekrose-Faktor*; IL= *Interleukin*; IFN= *Interferon*; COX2= *Cyclooxygenase2*; ISRE= *interferon-sensitive-response-element*

1.1.4.2 Leukozyten-Rekrutierung

Die Leukozyten-Rekrutierung, d.h. die Migration von Leukozyten aus dem Gefäßbett in das entzündete Gewebe, ist ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der Entzündung. Sie spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunantwort auf pathogene Keime und ist generell ein bedeutender Faktor bei entzündlichen sowie autoimmunen Störungen [35]. Dieser Vorgang der Extravasation der Leukozyten wird durch eine streng regulierte Kaskade aus adhäsiven Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen erzielt [35]. Das ursprüngliche Modell der Leukozyten-Adhäsionskaskade umfasst die drei Schritte *Rollen, Aktivierung und Adhäsion* mit anschließender *Auswanderung* der Leukozyten in das Gewebe. Nachfolgend wurde dieses Modell durch die Schritte *langsames Rollen, Adhäsions-Stabilisierung, intraluminales Kriechen, parazelluläre und transzelluläre Migration und Migration durch die Basalmembran* ergänzt [35-37]. **Abbildung 4** gibt einen Überblick über die wichtigsten Abläufe in der Adhäsionskaskade im Rahmen der Leukozyten-Rekrutierung.

Der initiale Kontakt zwischen den Leukozyten und dem Endothel entsteht dadurch, dass die im Blut zirkulierenden Leukozyten an der Oberfläche der Endothelzellen entlangrollen [38]. Dieser als „Rollen“ bezeichnete erste Schritt der Kaskade wird durch eine bestimmte Gruppe von Adhäsionsmolekülen ermöglicht, den sogenannten Selektinen. Von diesen existieren die drei Untergruppen L-, E- und P-Selektine. L-Selektin wird auf der Oberfläche von Leukozyten exprimiert. E-Selektin hingegen wird von aktivierten Endothelzellen und P-Selektin von aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten gebildet [37, 38].

Der Kontakt zwischen Leukozyten und Endothel kommt nun insbesondere dadurch zustande, dass die auf der Oberfläche von entzündlich aktivierten Endothelzellen exprimierten P- und E-Selektine an den leukozytären Glykoprotein-Liganden binden. Dies ist vornehmlich der „P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1“ (PSGL1). Diese Interaktion ermöglicht es den Leukozyten, an der Gefäßwand entlangzurollen. Nachfolgend wird die Geschwindigkeit des Rollens verringert. Dieser Schritt der Adhäsions-Kaskade wird „langsames Rollen“ genannt. Hier spielt zusätzlich zu den Selektinen eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen eine Rolle, die Integrine. Ein wichtiger Vertreter dieser Molekülfamilie ist z.B. das *very late antigen 4* (VLA4, auch $\alpha_4\beta_1$ -Integrin genannt) [36-38].

Der nächste wichtige Schritt in der Kaskade ist die feste Bindung der Leukozyten an die Endothel-Oberfläche. Dieser Vorgang der sogenannten *firm adhesion* wird über die schon oben erwähnten leukozytären Integrine ausgeführt. Dies sind vor allem VLA4, *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA1/ $\alpha_1\beta_2$ -Integrin), oder *macrophage-1-antigen* (MAC1). Diese auf der Oberfläche der Leukozyten befindlichen Integrine binden an entsprechende Liganden der Endothelzell-Oberfläche. Letztere stellen Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie dar und sind insbesondere das *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und das *intercellular adhesion molecule-1/-2* (ICAM-1/ ICAM-2) [36-38]. Voraussetzung für die Leukozyten-Adhäsion ist die Aktivierung der leukozytären Integrine während des Rollens: Im Rahmen einer Entzündungsreaktion werden Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine aktiviert, woraufhin diese vermehrt Adhäsionsmoleküle und Chemokine bilden. Diese auf der Oberfläche der Endothelien befindlichen Chemokine induzieren nun über eine komplexe Signaltransduktion (*inside-out-signalling*) die Leukozyten- bzw. Integrin-Aktivierung [37, 38]. Über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Phospholipase C, GTPase (= Guanosintriphosphat-hydrolysierendes Enzym) und Calciumeinstrom kommt es letztlich zur Induktion einer passageren Änderung der Integrin-Struktur. Dies bewirkt eine Affinitätssteigerung, wodurch die Integrine ihre korrespondierenden Liganden stärker binden können. Die genannten Vorgänge münden in einer festen Adhäsion der Leukozyten an den Endothelzellen [36-38].

Im Anschluss an die *firm adhesion* kommt es zu einer integrin-vermittelten Kaskade aus SRC (Tyrosin)-Kinasen, PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und VAV-Molekülen (GTP-Austausch-Faktoren). Diese Post-Adhäsionsphase soll eine blutflussbedingte Ablösung der Leukozyten von den Endothelien verhindern und somit die Adhäsion der Leukozyten stabilisieren [37, 38].

Bevor nun der finale Schritt der Rekrutierungskaskade, die Leukozyten-Transmigration, erfolgen kann, vollziehen die adhärennten Leukozyten langsame Bewegungen, indem sie an der luminalen Oberfläche der Endothelzellen „entlangkriechen“. Auf diese Weise soll eine möglichst passende Stelle zum Auswandern „gefunden“ werden. Dieser als *Crawling* bezeichnete Schritt wird vor allem über die Adhäsionsmoleküle MAC1 und ICAM1 ausgeführt [36-38]. Getriggert durch die Bindung von leukozytärem MAC1 an endotheliales ICAM1, bilden die Leukozyten Fortsätze aus, mit denen sie sich in den Endothelzell-Körper und in den Bereich der Zell-Zell-Kontakte vorwölben [37]. Nachfolgend kommt es über Calcium-Einstrom und Aktivierung diverser Enzyme

(*mitogen-activated protein kinase*, GTPase, Myosin-Leichtketten-Kinase) letztendlich zur Kontraktion der Endothelzelle. Dies bewirkt ein Öffnen der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte, was wiederum die Leukozyten-Migration ermöglicht [37]. Dieser Vorgang wird als parazelluläre Migration bezeichnet und kommt durch ein komplexes Zusammenspiel aus Adhäsionsmolekülen zustande. Von besonderer Bedeutung sind hierbei *platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1* (PECAM1), *junctional adhesion molecules* (JAMs) sowie *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) und CD-99 [37]. Die Transmigration erfolgt meist über diesen parazellulären Weg. Nur ein kleiner Teil der Leukozyten migriert direkt durch die Endothelzelle hindurch, was mithilfe des endothelialen Zytoskeletts erfolgt (transzelluläre Migration) [37, 38].

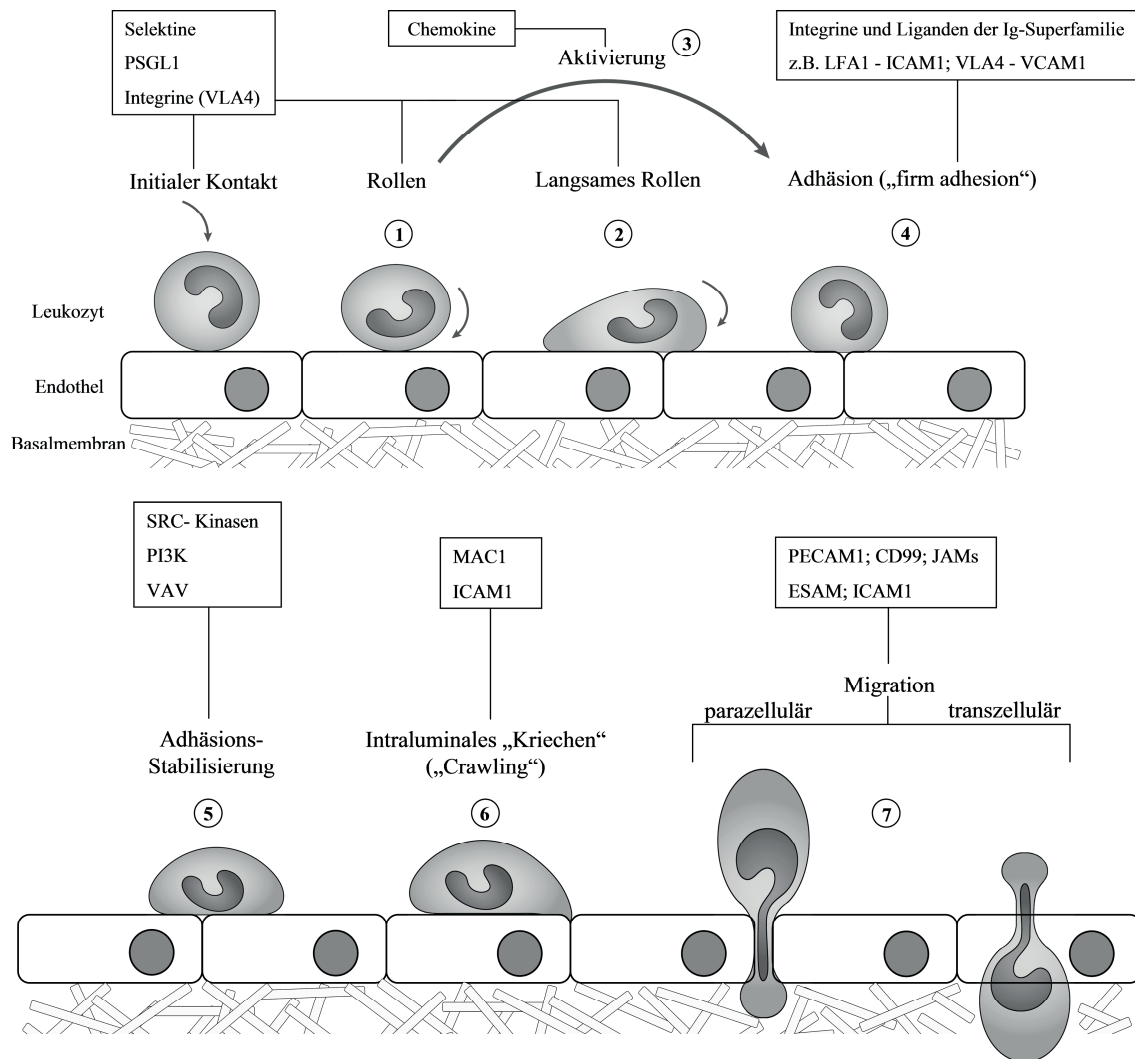


Abb. 4 Kaskade der Leukozyten-Rekrutierung modifiziert nach [37]

Die Migration der Leukozyten aus dem Gefäßbett in das entzündete Gewebe umfasst die 7 Schritte Rollen, langsames Rollen, Aktivierung, Adhäsion, Stabilisierung, intraluminales Kriechen (*Crawling*) und Migration (parazelluläre und transzelluläre Migration sowie Migration durch die Basalmembran). Die entscheidenden Schlüssel-Moleküle sind in den Kästchen angegeben. PSGL1= *P-selectin glycoprotein ligand 1*; VLA4= *very late antigen 4*; LFA1= *lymphocyte function-associated antigen 1*; ICAM= *intercellular adhesion molecule*; VCAM= *vascular cell-adhesion molecule*; SRC-Kinasen= Tyrosin-Kinasen; PI3K= Phosphoinositid-3-Kinase; VAV= GTP-Austausch-Faktoren; MAC1= *macrophage antigen 1*; PECAM1= *platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1*; JAMs= *junctional adhesion molecule*; ESAM= *endothelial cell-selective adhesion molecule*. Abbildung adaptiert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(9): p. 678-89. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*, copyright 2007. Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(9): p. 678-89. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*, copyright 2007.

1.1.4.3 Myeloperoxidase (MPO) als Marker der Neutrophileninvasion im Gewebe

Myeloperoxidase (MPO) ist ein 140-kD großes, Häm-tragendes Enzym. Es liegt als Homodimer vor, bei dem jedes Monomer aus einer schweren und einer leichten Untereinheit zusammengesetzt ist [39]. Die MPO wird vorwiegend von neutrophilen Granulozyten, aber auch von Monozyten und Gewebs-Makrophagen gebildet. In Neutrophilen und Monozyten wird sie in Form azurophiler Granula gespeichert. Obwohl Makrophagen die Fähigkeit verloren haben, MPO zu synthetisieren, können sie dieses Protein dennoch nutzen, indem sie es endozytieren [39]. Dieses Enzym spielt eine bedeutende Rolle bei der Eliminierung von Mikroorganismen im Rahmen der primären Funktion neutrophiler Granulozyten. Phagozytierte Mikroorganismen werden intrazellulär in den sogenannten Phagosomen mithilfe eines antimikrobiellen Systems aus MPO, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und verschiedenen Cofaktoren eliminiert. Die entscheidende Reaktion in den Phagosomen ist die MPO-katalysierte Oxidation von Chlorid durch H_2O_2 . Die dadurch initial entstehende Hypochlorsäure (HOCl) gehört zu den potentesten von Neutrophilen gebildeten antimikrobiellen Oxidantien [39, 40]. Nachfolgend werden Chlor, Chloramine, Wasserstoff-Radikale und Ozon gebildet. Diese toxischen Agenzien dienen ebenfalls der Zerstörung von Mikroorganismen, können jedoch auch nach extrazellulär gelangen, wo sie das Gewebe schädigen und somit an der Pathogenese von Erkrankungen beteiligt sein können [39-41].

Die Myeloperoxidase ist ein wichtiges, im Rahmen einer Entzündungsreaktion von neutrophilen Granulozyten gebildetes Enzym. Daher lassen sich anhand der MPO-Aktivität Rückschlüsse auf das Vorliegen der Neutrophilen in entzündetem Gewebe ziehen. So wird die MPO-Aktivität in der Lunge als biochemischer Marker für die Rekrutierung bzw. Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe genutzt [26, 42].

1.1.4.4 Permeabilität der Lungengefäße und Entstehung des pulmonalen Ödems

In der Lunge wird der Austausch von Flüssigkeiten und gelösten Substanzen zwischen Blutgefäßsystem, Interstitium und Lymphsystem über transvaskuläre hydrostatische und kolloidosmotische Druckgradienten reguliert. Flüssigkeit wird aus dem Gefäßsystem in das Interstitium filtriert und nachfolgend über das Lymphsystem drainiert. Physiologischerweise unterliegen diese Vorgänge einem Gleichgewicht [43, 44]. Zusätzlich zu den Druckgradienten ist das pulmonale Endothel als semipermeable Barriere eine entscheidende Struktur für die Regulierung des Flüssigkeitsaustausches

zwischen dem vaskulären Kompartiment und dem Interstitium. Angetrieben durch den transvaskulären hydrostatischen Druckgradienten, erfolgt der Austausch durch passiven Transport zwischen benachbarten Endothelzellen hindurch (= parazellulärer Weg). Albumin und andere Makromoleküle werden aktiv durch die Zellen transportiert (= transzellulärer Weg). Unter physiologischen Bedingungen wird somit eine kleine Menge an Flüssigkeit über das Endothel, limitiert durch die endothelialen Barriereigenschaften, in das Interstitium abfiltriert und von dort über das Lymphsystem entfernt [45]. Diese streng regulierten Vorgänge können durch eine Imbalance zwischen Flüssigkeitseinstrom (in das Interstitium) und Flüssigkeits-Elimination (über das Lymphsystem) gestört werden. Dies führt letztlich zu vermehrtem Einstrom von Flüssigkeit und Makromolekülen in das Interstitium und nachfolgend in die Alveolen. Hieraus resultiert die Entwicklung eines proteinreichen pulmonalen Ödems (= Permeabilitätsödem) als pathophysiologisches Kennzeichen einer akuten respiratorischen Insuffizienz [18, 43-46]. In die Entstehung des Ödems sind komplexe Mechanismen involviert:

Das pulmonale Endothel als Bestandteil der alveolo-kapillären Barriere wird infolge direkter Schädigung und aufgrund inflammatorischer zytokin-vermittelter Aktivierung durchlässiger für Flüssigkeit und Makromoleküle im Sinne einer gesteigerten Gefäß-Permeabilität. Mitverantwortlich hierfür ist das endotheliale Zytoskelett, indem es über Zell-Kontraktionen zur interendothelialen Lücken-Bildung führt [45, 47]. Entscheidenden Einfluss haben hierbei auch verschiedenste Mediatoren und Substanzen. Dies sind unter anderem bei der Entzündungsreaktion insbesondere von rekrutierten, aktivierten Leukozyten ausgeschüttete proinflammatorische Zytokine (z.B. $\text{TNF-}\alpha$, IL-8), durch aktivierte Neutrophile und Endothelzellen gebildete *reactive oxygen species* (ROS) und *reactive nitrogen species* (RNS) sowie proteolytische Enzyme und *platelet-activating factor* (PAF). Des Weiteren sind vasoaktive Substanzen wie Thrombin, Histamin, Bradykinin und vor allem Arachidonsäure-abgeleitete Eicosanoide (insbesondere Thromboxan A_2 , Prostaglandin I_2 und Leukotriene) von entscheidender Bedeutung [18, 45, 48, 49]. Die Balance zwischen Vasodilatoren und Vasokonstriktoren ist beim ARDS gestört. Resultat ist ein erhöhter pulmonal-vaskulärer Widerstand mit der Entwicklung einer akuten pulmonalen Hypertonie [45].

Der andere entscheidende Bestandteil der alveolo-kapillären Barriere ist das alveoläre Epithel. Eine Schädigung dieser Struktur im Rahmen des ARDS führt zum Verlust der epithelialen Integrität. Resultat der Barriestörung ist der Einstrom von Flüssigkeit in

die Alveolen. Im Rahmen der Schädigung kommt es außerdem zum Verlust von Epithelzellen. Wie bereits im Kapitel 1.1.3 erläutert, besteht das Epithel u.a. aus den Typ-I- und Typ-II-Zellen. Die Typ-II-Zellen verfügen über eine Na^+/K^+ -ATPase, worüber sie Natrium von der apikalen zur basalen Zelloberfläche aktiv transportieren können. Damit sind sie wesentlich an der Entfernung von Flüssigkeit aus den Alveolen beteiligt [50, 51]. Infolge der Störung der epithelialen Integrität und der Funktion der Typ-II-Zellen wird somit die alveoläre Kapazität vermindert, Flüssigkeit aus den Alveolen in das Interstitium zu transportieren [18].

Zusammenfassend führt die Vielzahl der involvierten Mechanismen infolge eines erhöhten transkapillären Filtrationsdruckes und einer gesteigerten Kapillar-Permeabilität im Sinne einer endothelialen Barriervedysfunktion zur Entwicklung eines proteinreichen, interstitiellen und alveolären Ödems [18, 43, 52].

1.1.4.5 Zytokine in der Entzündungsreaktion

Allgemeines

Zytokine sind Proteine, die im menschlichen Organismus von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen produziert und sezerniert werden. Insbesondere sind hier die Entzündungszellen zu nennen, wobei Makrophagen die Hauptproduzenten darstellen [53]. Vor allem in den Alveolen der Lunge befindliche Makrophagen (= Alveolarmakrophagen), im Blutstrom zirkulierende Monozyten und neutrophile Granulozyten, aber auch Epithelzellen, Endothelzellen und mesenchymale Zellen sind an der Produktion und Sekretion dieser Substanzen beteiligt [53]. Als autokrin, parakrin oder endokrin fungierende Botenstoffe sind sie entscheidend in der Regulation von Immunität und Entzündung involviert. So spielen sie auch bei entzündlichen Erkrankungen der Lunge, z.B. beim ARDS, eine wichtige Rolle [53]. Zu den Zytokinen gehören mehrere Substanzgruppen, vornehmlich die Tumornekrosefaktoren, Interleukine, Interferone und Koloniestimulierende Faktoren. Es existieren pro- und antiinflammatorisch wirkende Zytokine [53]. Zu den proinflammatorischen Substanzen zählen vor allem Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha ($\text{TNF-}\alpha$), Interleukin (IL)- 1β , IL-6, IL-8 und Interferon (IFN)- γ . Sie stimulieren die Antigen-Präsentation, die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endothel-Oberfläche und damit die Leukozyten-Rekrutierung sowie die Aktivität der Entzündungszellen [53, 54]. Zu den wichtigsten antiinflammatorischen Zytokinen gehören unter anderem IL-10 und *Transforming-Growth-Factor* (TGF)- β , wodurch die Entzündungsaktivität herabreguliert wird [53].

Eine wichtige Untergruppe der Zytokine bilden die Chemokine. Diese wirken chemotaktisch, lösen also eine Migration von Immunzellen aus. Die Zellen wandern aus dem Gefäßsystem entlang des Chemokinkonzentrationsgradienten in das entzündete Gewebe, dem Ort der höchsten Chemokin-Konzentration. Somit sind die Chemokine entscheidend an der Rekrutierung von Leukozyten beteiligt [53, 54].

Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α)

TNF- α stellt eines der wichtigsten Zytokine in der akuten Entzündungsreaktion und im Rahmen des ARDS dar. Deshalb soll dieser Mediator nachfolgend ausführlicher dargestellt werden:

Der Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α) wurde ursprünglich als Zytokin mit anti-tumorösen Eigenschaften identifiziert [54]. Er ist bedeutend für Zell-Proliferation, -Differenzierung und -Apoptose sowie für Zytotoxizität, Inflammation und Immunität und spielt eine wichtige Rolle im Rahmen verschiedener entzündlicher und autoimmuner Krankheitsbilder, wie z.B. ARDS, Sepsis oder Rheumatoide Arthritis [54-61]. Er wird vor allem von aktivierten Makrophagen, aber auch von Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten, Endothelzellen, Mastzellen und Fibroblasten sezerniert. Der Hauptstimulus für die Synthese und Sekretion von TNF- α ist das LPS [62]. Neben diesem können auch andere Substanzen, einschließlich TNF- α selbst, dessen Produktion induzieren [49, 54, 55, 60-66]. TNF- α wird zunächst als 26 kD großes Typ-II-Transmembran-Protein gebildet (= memTNF). Nachfolgend wird dieses mithilfe der Metalloprotease *TNF-activating converting enzyme* (TACE) proteolytisch von der Membran abgespalten. Es entsteht ein 17 kD großes Protein, von dem drei Moleküle zu einem homotrimeren Komplex verknüpft werden. Dadurch entsteht das lösliche TNF-Homotrimer (= solTNF). Beide Zytokin-Typen, memTNF und solTNF, sind biologisch aktiv [55, 61, 62, 64]. TNF- α vermittelt seine Wirkung über zwei verschiedene Oberflächen-Rezeptoren, TNF-Rezeptor I (TNF-R1) und TNF-Rezeptor II (TNF-R2). TNF-R1 wird konstitutiv von den meisten Geweben im Organismus produziert und kann sowohl von memTNF als auch von solTNF aktiviert werden. TNF-R2 hingegen wird selektiv von Endothel- und Immunzellen exprimiert und wird insbesondere vom memTNF aktiviert. Allgemein bindet TNF- α an beide Rezeptoren mit vergleichbarer Affinität, wobei die meisten seiner Effekte über TNF-R1 vermittelt werden [54, 58, 60-62, 64]. Die Bindung von TNF- α an den TNF-Rezeptor induziert verschiedene intrazelluläre Vorgänge (siehe **Abbildung 5**). Diese führen letztlich zu Apoptose,

Enzyminduktion und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und c-Jun. Sie sind verantwortlich für die Expression wichtiger Gene im Rahmen verschiedenster zellulärer Funktionen, einschließlich Zell-Wachstum, -Differenzierung und Apoptose sowie Onkogenese, Immunität und Inflammation. Die proinflammatorischen Effekte von TNF- α , vor allem bezüglich des ARDS, werden insbesondere durch die Aktivierung von NF- κ B erzielt. Dieses führt zur Expression einer Vielzahl von inflammatorischen Genen. Dazu zählen z.B. Cyclooxygenase-2 (COX-2), Lipoxygenase-2 (LOX-2), Zell-Adhäsionsmoleküle sowie proinflammatorische Zytokine und Chemokine [58, 61].

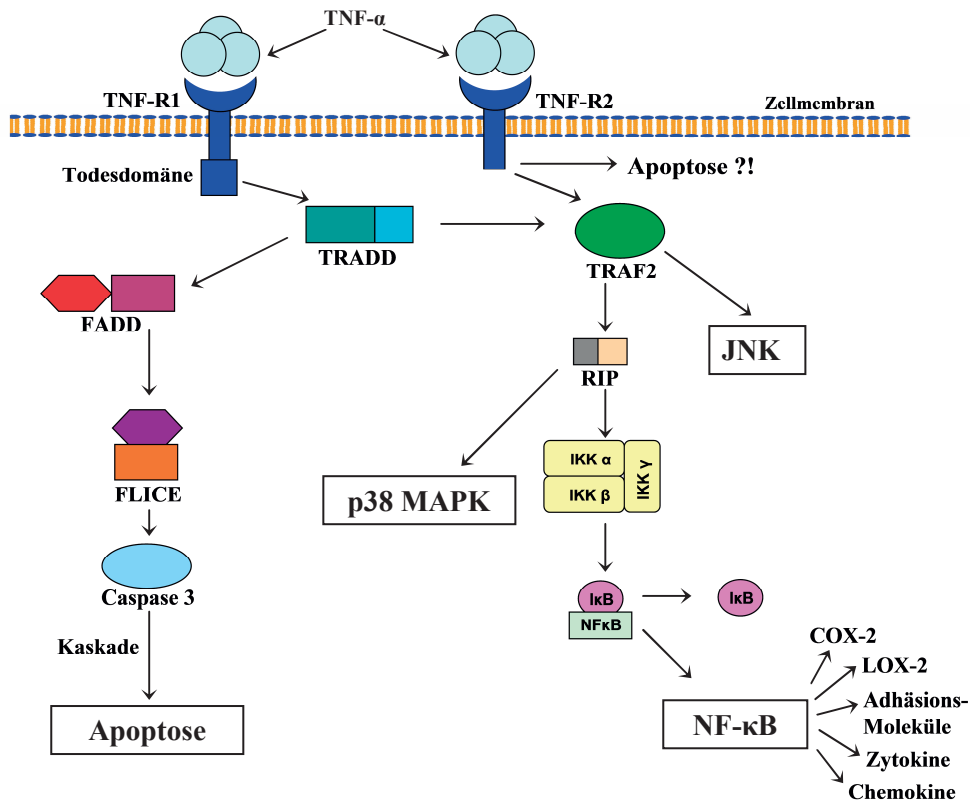


Abb. 5 Vereinfachtes Schema des TNF- α -Signalweges modifiziert nach [61]

Der TNF-R1 ist verantwortlich für die meisten TNF- α -Effekte. Dessen cytoplasmatische „Todesdomäne“ rekrutiert die Adapterproteine TRADD, FADD und FLICE. Deren Induktion führt zur Aktivierung der Caspase 3, die über eine Caspasen-Kaskade die Apoptose induziert. Ein weiterer Signalweg erfolgt über TRADD-vermittelte Induktion des TRAF2. Dieses führt über Induktion von RIP und IKK-Komplex zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Über TRAF-2 werden auch verschiedene Enzyme induziert, einschließlich p38MAPK und JNK (eine Kinase, die c-Jun phosphoryliert und damit dessen transkriptionale Aktivität erhöht). Der TNF-R2 kann ebenfalls die oben genannten Effekte erzielen. Dieser besitzt jedoch keine Todesdomäne und bindet direkt TRAF1 und TRAF2. Dadurch können ebenfalls NF- κ B, JNK und p38 MAPK aktiviert werden. TNF- α = Tumor-Nekrose-Faktor- α ; TNF-R1/2= Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor1/2; TRADD= *TNF-receptor-associated-death-domain*; FADD= *Fas-associated-death-domain*; FLICE= *FADD-like-interleukin-1 β -converting-enzyme*= Caspase 8; TRAF2= *TNF-receptor-associated-factor2*; JNK= c-jun-NH₂-terminale-Kinase; RIP= *receptor-interacting-protein*; IKK= *inhibitory-binding-protein- κ B-Kinase*; p38MAPK= *mitogen-activated-protein-kinases*; NF- κ B= Nukleärer-Faktor- κ B; COX-2= Cyclooxygenase-2; LOX-2= Lipoxxygenase-2

TNF- α im Entzündungsgeschehen des ARDS

Alveolarmakrophagen als mononukleäre phagozytierende Zellen stellen die erste Verteidigungslinie gegenüber aerogen aufgenommenem Material (z.B. Bakterien) dar [67]. Getriggert durch einen entzündlichen Stimulus (z.B. LPS) sezernieren sie gemeinsam mit alveolären Epithelzellen Zytokine, vor allem TNF- α und IL-1 β . Dadurch werden benachbarte Alveolarzellen aktiviert, Chemokine zu produzieren. Außerdem fördert TNF- α die Produktion zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren, wie Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8) und Eicosanoide. Diese Substanzen aktivieren Neutrophile und Endothelzellen, die dadurch vermehrt Adhäsionsmoleküle, insbesondere VCAM-1 und ICAM-1, auf ihrer Oberfläche exprimieren. Resultat ist eine gesteigerte Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Gefäßbett in das Interstitium und in die Alveolen [54, 59, 60, 64, 67-70]. TNF- α sowie im Rahmen der zytokin-vermittelten Leukozyten-Rekrutierung und -Aktivierung freigesetzte Substanzen (z.B. Proteasen, Leukotriene, ROS), tragen zur Störung der alveolokapillären Barriere bei und verursachen dadurch eine erhöhte pulmonalvaskuläre Permeabilität. Hierdurch ist TNF- α an der Entstehung des pulmonalen Ödems als Kennzeichen des ARDS beteiligt [49, 54, 68, 71].

Des Weiteren ist TNF- α verantwortlich für die Symptome einer Bakteriämie oder Endotoxämie. So führt die Injektion von rekombinantem TNF- α zu Symptomen, die auch durch LPS im Rahmen des septischen Schocks verursacht werden. Dadurch wird deutlich, dass TNF- α einen der wichtigsten von LPS induzierten Mediatoren darstellt [49, 55, 64, 68, 71, 72].

Makrophagen Inflammatorisches Protein 2 (MIP-2)

Ein wichtiger Vertreter der Chemokine ist das murine „Makrophagen Inflammatorische Protein 2“ (MIP-2). Es gehört zur Familie der CXC-Chemokine [73]. Deren Vertreter weisen an ihrem N-terminalen Ende zwei Cysteinreste auf, die durch eine Aminosäure voneinander getrennt werden. Murines MIP-2 ist funktionell analog zum humanen IL-8 [73]. Endotoxin-vermittelt und insbesondere durch TNF- α induziert, wird es vor allem von aktivierten Makrophagen sezerniert. MIP-2 ist eine potente, chemotaktisch wirkende Substanz für neutrophile Granulozyten und damit entscheidend an deren Rekrutierung und Aktivierung beteiligt [73-77].

1.2 Fettsäuren in der Pathogenese der Entzündung

Fettsäuren sind natürliche Nahrungsbestandteile und erfüllen im Organismus verschiedenste Aufgaben. Neben ihrer Funktion als Hauptenergielieferanten sind sie struktureller Hauptbestandteil von Zellmembranen und an der Regulation von Enzymaktivität und Genexpression beteiligt. Als Ausgangssubstrat bioaktiver Signalmoleküle in Form der Eicosanoide sind sie entscheidend in die Pathogenese der Entzündung involviert. Je nach Struktur besitzen sie proinflammatorische oder antiinflammatorische Eigenschaften, mit denen sie immunmodulatorischen Einfluss ausüben können [78, 79].

Fettsäuren sind Monocarbonsäuren, die aus meist unverzweigten Kohlenwasserstoffketten mit einer Länge von zwei bis 30 Kohlenstoff-(C-)Atomen bestehen. Nach ihrer Kettenlänge werden kurzkettige (< 8 C-Atome), mittelkettige (8-10 C-Atome), intermediärkettige (12-14 C-Atome) und langkettige (≥ 16 C-Atome) Fettsäuren unterschieden. In Form des Triacylglycerins, die Hauptaufnahmeform von Fettsäuren über die Nahrung, bilden sie das Grundgerüst von Fetten und Ölen. Fettsäuren, die keine Doppelbindung in ihrer Kohlenwasserstoffkette enthalten, werden als „gesättigt“ bezeichnet. Besitzen sie jedoch Doppelbindungen, werden sie „ungesättigte“ Fettsäuren genannt. Dabei sind Fettsäuren mit *einer* Doppelbindung „einfach-ungesättigte“ und solche mit *zwei* oder *mehr* Doppelbindungen „vielfach-ungesättigte“ Fettsäuren. Letztere sind die sogenannten PUFA (*polyunsaturated fatty acids*) [78]. Bei dieser Gruppe existieren zwei Hauptfamilien, die n-6-Fettsäuren und die n-3-Fettsäuren, wobei das „n-x“ die erste, vom Methyl („omega“)-Ende entfernte Doppelbindung darstellt. Die einfachsten Mitglieder dieser beiden Familien, die Linolsäure als n-6-Fettsäure und die α -Linolensäure als n-3-Fettsäure, können als essentielle Fettsäuren von den Säugetieren nicht synthetisiert werden [78]. Sie müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Hauptquelle für Linolsäure sind dabei vor allem Pflanzenöle, insbesondere Sojaöl, Distelöl und Sonnenblumenöl [78]. Die α -Linolensäure stammt insbesondere aus Grünpflanzen, Rapsöl, Nüssen und Leinsamen [78]. Diese beiden Fettsäuren repräsentieren mehr als 95% der PUFA, die in der westlichen Zivilisation über die Nahrung zugeführt werden. Hierbei wird die Linolsäure in fünf- bis 20fach größerer Menge aufgenommen als α -Linolensäure, weshalb die Linolsäure die Haupt-PUFA der westlichen Ernährungsform darstellt [78, 79]. Obwohl der Organismus selbst nicht in der Lage ist, Linolsäure und α -Linolensäure zu

synthetisieren, können diese beiden Fettsäuren zu anderen Fettsäuren metabolisiert werden. So entstehen durch Einfügen weiterer Doppelbindungen und Kettenverlängerung über verschiedene Zwischenprodukte letztendlich die Arachidonsäure als n-6-Fettsäure sowie Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure als n-3-Fettsäuren [78, 79].

1.2.1 Arachidonsäure

Arachidonsäure (AA; 20:4n-6) ist eine vielfach-ungesättigte Fettsäure, die aus 20 Kohlenstoffatomen und vier Doppelbindungen besteht – daher auch die Bezeichnung 20:4. Die erste Doppelbindung befindet sich am sechsten, vom Methyl-Ende entfernten Kohlenstoffatom. Damit gehört diese Fettsäure zu den n-6-Fettsäuren. AA wird unter anderem direkt mit der Nahrung, insbesondere über Fleischprodukte, aufgenommen. Der Hauptanteil dieser Fettsäure wird jedoch aus der essentiellen Linolsäure (18:2n-6) synthetisiert (siehe **Abbildung 6a**) [78]. AA ist die Ausgangssubstanz für die Bildung der Eicosanoide. Zu diesen zählen die Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene sowie weitere oxydierte Metaboliten [78]. Diese bilden eine Gruppe von Lipid-Signalmolekülen, die verschiedene biologische Funktionen ausüben, insbesondere Modulation von Gefäßmuskeltonus, Gefäßpermeabilität, Schmerz, Fieber und Thrombozyten-Aggregation. So spielen diese parakrin oder autokrin wirkenden Mediatoren unter anderem eine wichtige Rolle in der Entzündungsreaktion und somit auch bei verschiedenen entzündlichen Krankheitsbildern, wie ARDS und Sepsis [78, 80, 81]. So wird eine Dominanz der insbesondere proinflammatorischen AA-Metaboliten für die gestörte Permeabilität und Vasoregulation im Rahmen des ARDS mitverantwortlich gemacht [82].

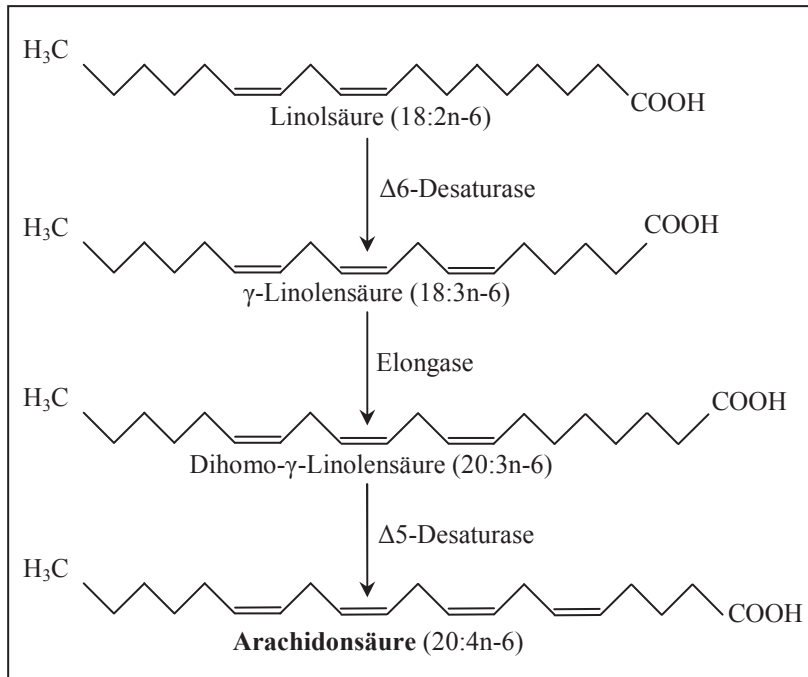


Abb. 6a Synthese der Arachidonsäure modifiziert nach [78]

Die Synthese der Arachidonsäure aus der essentiellen Linolsäure erfolgt über verschiedene Enzyme ($\Delta 6$ -Desaturase, Elongase, $\Delta 5$ -Desaturase) und Zwischenprodukte (γ -Linolensäure, Dihomo- γ -Linolensäure).

Metabolisierung der Arachidonsäure (siehe **Abbildung 6b**)

In unstimulierten Zellen liegt AA hauptsächlich in veresterter Form als Glycerophospholipid-Bestandteil von Zellmembranen vor. Für die Metabolisierung zu Eicosanoiden muss AA jedoch in freier Form vorhanden sein. Die Herauslösung aus der Zellmembran erfolgt durch das Enzym Phospholipase A_2 (PLA_2), eine Superfamilie aus mehr als 30 Enzymen, welche die Spaltung der mittleren Esterbindung der Membranphospholipide in C2-Position katalysiert [80, 83]. Durch Aktivierung der Zellen, z.B. durch LPS, Zytokine, Chemokine (wie IL-8), Leukotriene, PAF und Komplement-Faktoren, wird die PLA_2 induziert, sodass mehr AA aus der Zellmembran herausgelöst als eingebaut wird. Auf diese Weise wird freie AA gebildet [80, 84]. Nach stimulationsbedingter Freisetzung von AA kann diese Fettsäure über vier verschiedene Wege zu den Eicosanoiden metabolisiert werden. Diese sind der Cyclooxygenase (COX)-, Lipoxygenase (LOX)-, Cytochrom-P450- und der Sauerstoff-Spezies (ROS)-getriggerte Weg. Dadurch entstehen neben weiteren Metaboliten vor allem Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene, sowie Epoxyeicosatriensäuren und Isoprostane [80].

Die COX führt zur Bildung von Prostaglandinen (PG) und Thromboxan (TX), welche auch als Prostanoiden bezeichnet werden [80]. Deren Produktion ist abhängig von der Aktivität zweier COX-Isoenzyme, COX-1 und COX-2. COX-1 wird von den meisten Zellen konstitutiv gebildet und ist für die basale Prostanoid-Synthese verantwortlich. Neben konstitutiver Expression durch einige Zelltypen (z.B. Endothel und respiratorisches Epithel), wird COX-2 vor allem erst nach Stimulation (vor allem über Zytokine, Hormone, LPS) insbesondere von Immunzellen gebildet und ist dementsprechend insbesondere für die verstärkte Prostanoid-Synthese im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen verantwortlich [84, 85]. Die COX bildet über Einbau molekularen Sauerstoffs das PGG₂. Dieses wird nachfolgend zu PGH₂ reduziert, welches wiederum die Ausgangssubstanz für verschiedene Prostaglandine und für Thromboxan darstellt. Auf diese Weise entstehen die Prostanoiden der 2er-Serie (PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF₂α und TXA₂), die vor allem proinflammatorische Eigenschaften besitzen. Dabei spielen insbesondere PGE₂ und TXA₂ eine wichtige Rolle. PGE₂ induziert Fieber, fördert Gefäßpermeabilität und -dilatation sowie die IL-6-Produktion und ist darüber hinaus an der Schmerz-Entstehung beteiligt. TXA₂ fördert ebenfalls die Gefäßpermeabilität und führt zu Thrombozytenaggregation, Leukozyten-Aktivierung und Adhäsion, sowie zu Vaso- und Bronchokonstriktion [80, 81, 84, 86, 87].

Das Enzym LOX führt vor allem zur Bildung von Leukotrienen (LT), Hydroperoxyeicosatetraensäuren (HPETE) und Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE). 5-LOX liegt im Gegensatz zur COX vor allem in ruhenden Zellen in inaktiver Form vor und muss über einen Stimulus aktiviert werden [80, 84]. Durch Oxygenierung bildet dieses Enzym das Hydroperoxid 5-HPETE, das weiter zu 5-HETE und LTA₄ metabolisiert wird. LTA₄ wiederum wird aufgrund seiner Instabilität schnell zu LTB₄ oder zu den Cysteinyl-Leukotrienen der 4er-Serie (z.B. LTC₄, LTD₄ und LTE₄) umgewandelt [80, 84]. Insbesondere durch Entzündungszellen (Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen) gebildet, besitzen Leukotriene ebenfalls proinflammatorische Wirkungen. Dabei nimmt LTB₄ eine zentrale Stellung ein, da es viele entzündungsfördernde Eigenschaften besitzt. So führt es zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und des lokalen Blutflusses und ist als potente chemotaktisch wirkende Substanz an der Aktivierung und Migration von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten beteiligt. Infolgedessen fördert es die Freisetzung von ROS und Proteasen (z.B. Elastase) sowie die Synthese von Zytokinen (TNF, IL-1 und IL-6) und weiterer Lipidmediatoren [80, 81, 84, 86, 87]. Neben diesen

proinflammatorischen Substanzen werden über den LOX-Weg auch die Lipoxine (z.B. LXA₄ und LXB₄) gebildet, die antiinflammatorische Wirkungen besitzen und bei der Auflösung einer Entzündung beteiligt sind [84]. Der Cytochrom P450-Weg führt unter anderem zur Bildung der Epoxyeicosatriensäuren (EET), die beispielsweise antiinflammatorische Eigenschaften im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen besitzen. Der vierte Weg der Eicosanoid-Metabolisierung ist die Reaktion von AA mit ROS über nicht-enzymatische Oxidation. Hierbei entstehen Substanzen, die Prostaglandin-ähnliche Moleküle bilden und als Isoprostane bezeichnet werden [80].

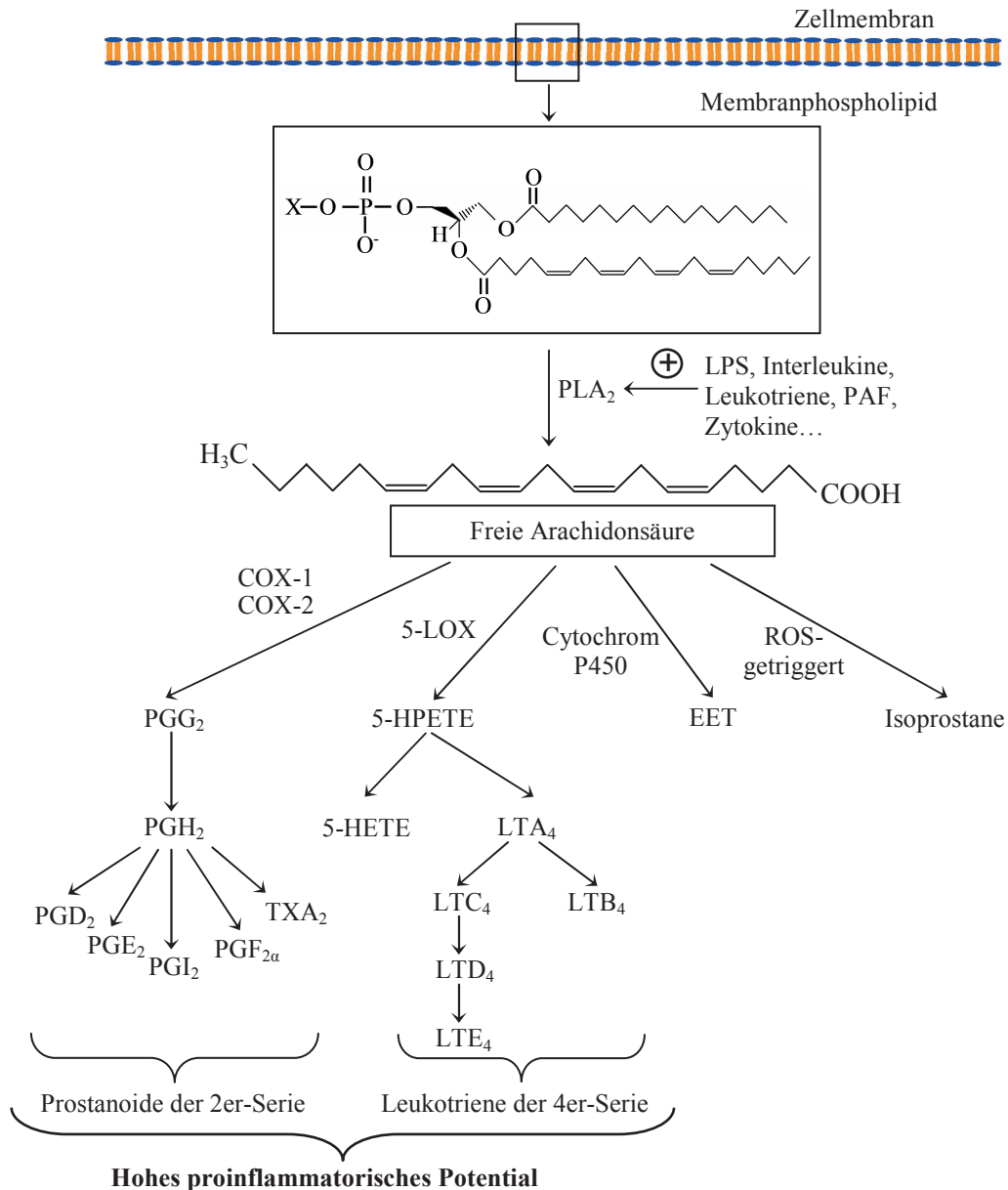


Abb. 6b Metabolisierung der Arachidonsäure zu Eicosanoiden modifiziert nach [78, 88] Nach Freisetzung der Arachidonsäure aus der Zellmembran durch das Enzym PLA₂ kann diese über vier verschiedene Wege, den COX-, LOX-, Cytochrom-P450- und den ROS-getriggerten Weg, zu den Eicosanoiden metabolisiert werden. Die COX führt zur Bildung der Prostaglandine und Thromboxan, die LOX zur Bildung der Leukotriene der 4er-Serie, der Cytochrom-P450-Weg u.a. zur Synthese von EET und der ROS-getriggerte Weg zur Bildung der Isoprostane. PLA₂= Phospholipase A₂; LPS= Lipopolysaccharid; PAF= *Platelet activating factor*; COX= Cyclooxygenase; LOX= Lipoxygenase; ROS= *reactive-oxygen-species*; PG= Prostaglandin; TX= Thromboxan; HPETE= Hydroperoxyeicosatetraensäuren; HETE= Hydroxyeicosatetraensäuren; LT= Leukotrien; EET= Epoxyeicosatriensäuren

1.2.2 Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure

Eicosapentaensäure (EPA; 20:5n-3) und Docosahexaensäure (DHA; 22:6n-3) sind ebenfalls vielfach-ungesättigte Fettsäuren. Ihre erste Doppelbindung befindet sich am dritten, vom Methyl-Ende entfernten Kohlenstoffatom. Damit gehören diese Fettsäuren zu den n-3-Fettsäuren. EPA besteht aus 20 Kohlenstoffatomen und fünf Doppelbindungen. DHA hingegen besitzt 22 Kohlenstoffatome und sechs Doppelbindungen. Hauptquelle von EPA und DHA ist vor allem Fischöl, bzw. „ölicher“ Fisch (z.B. Thunfisch, Lachs oder Sardinen). Außerdem können sie aus der essentiellen α -Linolensäure (18:3n-3) synthetisiert werden (siehe **Abbildung 7a**). Auch diese beiden n-3-Fettsäuren sind Vorstufen für die Synthese von Eicosanoiden [78, 87].

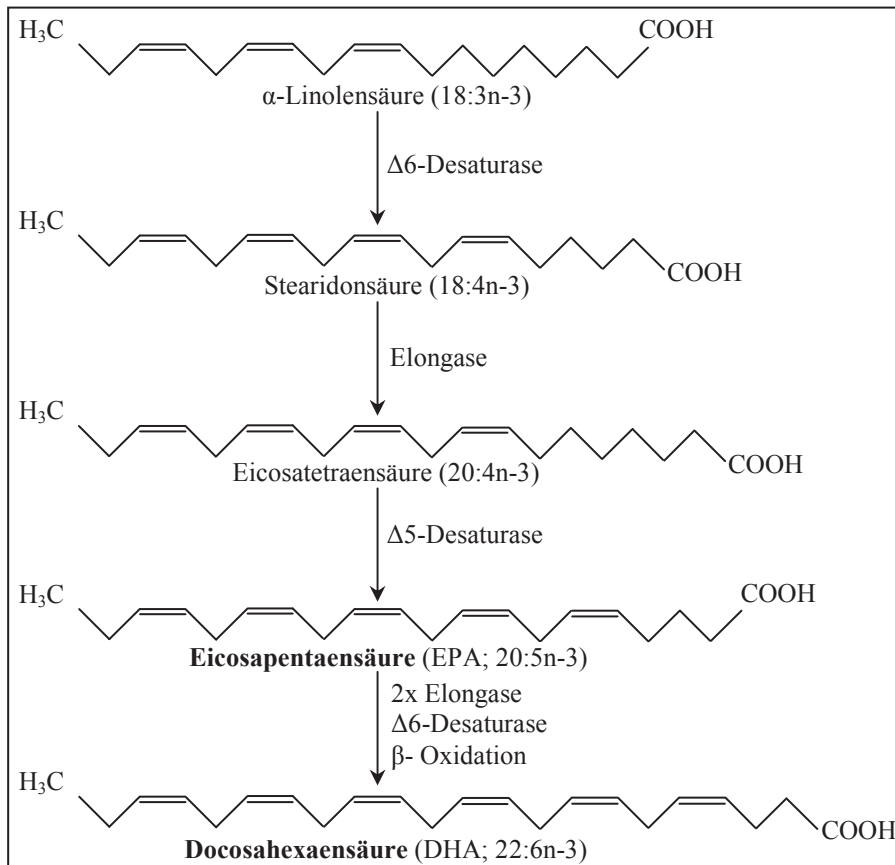


Abb. 7a Synthese von Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure modifiziert nach [78] Aus der essentiellen α -Linolensäure entstehen über verschiedene Enzyme (Δ 6-Desaturase, Elongase, Δ 5-Desaturase) und Zwischenschritte (Stearidonsäure, Eicosatetraensäure) die Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA).

Metabolisierung von Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure

(siehe **Abbildung 7b**)

EPA und DHA liegen ebenfalls als Phospholipid-Bestandteil von Zellmembranen vor und müssen für die Metabolisierung in freier Form zur Verfügung stehen. Die Freisetzung von EPA aus der Membran erfolgt dabei analog zur AA durch das Enzym PLA₂. EPA besitzt als vielfach-ungesättigte Fettsäure mit 20 Kohlenstoffatomen strukturelle Ähnlichkeiten zur n-6-Fettsäure AA. Aus diesem Grund kann freie EPA im Gegensatz zur DHA über die gleichen Enzymsysteme wie AA zu Eicosanoiden metabolisiert werden. Auf diese Weise entstehen ebenfalls vor allem Prostaglandine (PG), Thromboxan (TX) und Leukotriene (LT) [79, 89, 90]. Die COX führt über das Zwischenprodukt PGG₃ nachfolgend zur Bildung von PGH₃. Dieses ist die Ausgangssubstanz für die Synthese der Prostanoiden der 3er-Serie (PGD₃, PGE₃, PGI₃, PGF_{3 α} , TXA₃). Analog zur AA bildet die 5-LOX durch Oxygenierung das Hydroperoxid 5-Hydroperoxyeicosapentaensäure (5-HPEPE), das anschließend zu 5-Hydroxyeicosapentaensäure (5-HEPE) und zum instabilen LTA₅ metabolisiert wird. Letzteres wird schließlich zu LTB₅ oder zu den Cysteinyl-Leukotrienen der 5er-Serie (LTC₅, LTD₅, LTE₅) umgewandelt [78, 86]. Die aus EPA gebildeten Eicosanoid-Lipidmediatoren unterscheiden sich in Struktur und biologischer Wirkung von den AA-Metaboliten. So besitzen die EPA-Eicosanoide, verglichen mit den AA-Derivaten, ein signifikant niedrigeres inflammatorisches Potential. Eine Ursache für diese geringere biologische Aktivität ist die niedrigere Affinität von Eicosanoid-Rezeptoren zu den EPA-Eicosanoiden. So besitzt z.B. PGE₃ eine 50-80% geringere Potenz als PGE₂ und LTB₅ ist hinsichtlich der chemotaktischen Wirkung auf Neutrophile zehn- bis 100-mal weniger potent als LTB₄. Abgesehen von der weniger proinflammatorischen Wirkung, besitzen einige EPA-Eicosanoide auch antagonistische Wirkungen zu AA-Metaboliten (z.B. PGD₃ versus PGD₂) [79, 89, 90]. Neben den genannten Eicosanoiden existiert eine weitere wichtige Gruppe von Lipidmediatoren, die aus den n-3-Fettsäuren synthetisiert wird, die Resolvine und Protektine. Diese werden ebenfalls über den COX- und LOX-Weg metabolisiert. Dabei entstehen aus EPA die Resolvine der E-Serie, aus DHA die Resolvine der D-Serie und die Protektine. Diese Metaboliten besitzen antiinflammatorische Eigenschaften und sind in der Resolution der Entzündung involviert, indem sie z.B. die Migration von Leukozyten und die Zytokin-Produktion (IL-1 β und TNF- α) hemmen [79, 86, 89].

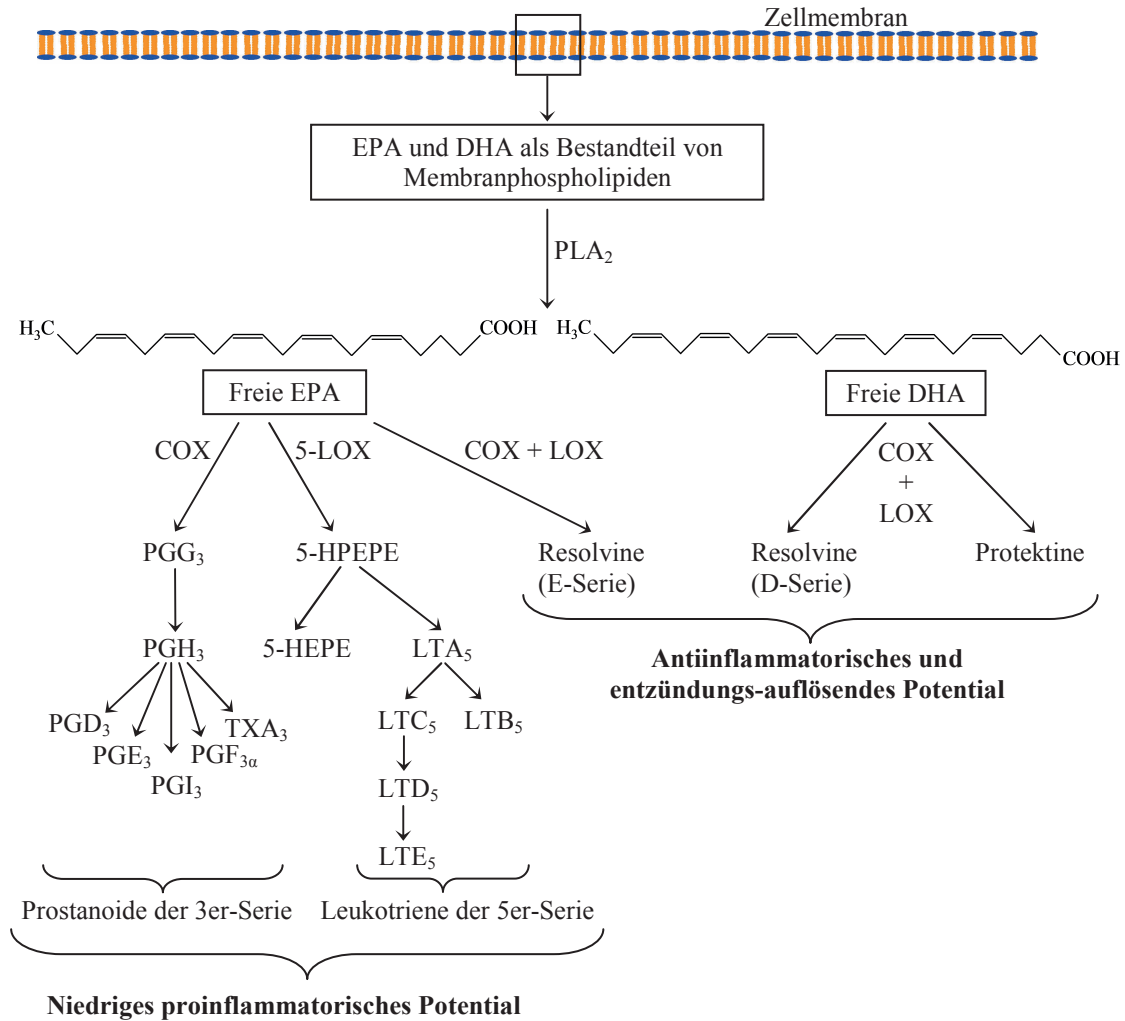


Abb. 7b *Metabolisierung von EPA und DHA zu Eicosanoiden modifiziert nach [78, 79, 86]* Nach Freisetzung von EPA und DHA aus der Zellmembran durch das Enzym PLA₂ können diese über den COX- und LOX-Weg zu Eicosanoiden metabolisiert werden. EPA wird über den COX-Weg zu Prostanoiden der 3er-Serie (Prostaglandine und Thromboxan), über den LOX-Weg u.a. zu Leukotrienen der 5er-Serie und durch COX und LOX zu Resolvinen der E-Serie metabolisiert. DHA wird durch COX und LOX zu Resolvinen der D-Serie und zu Protektinen umgewandelt. EPA= Eicosapentaensäure; DHA= Docosahexaensäure; PLA₂= Phospholipase A₂; COX= Cyclooxygenase; LOX= Lipoxygenase; PG= Prostaglandin; TX= Thromboxan; HPEPE= Hydroperoxyeicosapentaensäure; HEPE= Hydroxyeicosapentaensäure; LT= Leukotrien

1.2.3 Immunmodulatorischer Einfluss der n-3-Fettsäuren

EPA und DHA als n-3-PUFA können die Entzündungsreaktion auf unterschiedlichen Stufen über verschiedene Mechanismen hemmen und auf diese Weise immunmodulatorische Wirkungen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen, wie ARDS, Sepsis und Rheumatoide Arthritis, entfalten. Entscheidend dabei ist die Zusammensetzung des Phospholipid-Pools der Zellmembranen: PUFA sind struktureller und funktioneller Hauptbestandteil der Phospholipide aller Zellmembranen und somit auch der Membranen von Entzündungszellen (Neutrophile, Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass deren Phospholipide bei „normaler“, westlicher Ernährung einen hohen Gehalt an AA, aber nur geringe Mengen EPA und DHA besitzen [78, 79]. Aus diesem Grund ist das vorherrschende Substrat für die Eicosanoid-Synthese die AA, weshalb vor allem proinflammatorische Metaboliten (Prostanoide der 2er-Serie und Leukotriene der 4er-Serie) entstehen [78, 79]. Diese „normale“ Fettsäure-Zusammensetzung kann durch eine veränderte Fettsäure-Aufnahme über die Nahrung modifiziert werden. So konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die vermehrte orale Aufnahme von EPA und DHA zu einem gesteigerten Einbau dieser PUFA in die Zellmembranen der Entzündungszellen führt. Dieser Prozess erfolgt dosisabhängig über eine Dauer von Tagen bis Wochen und mündet letztlich in einer Verringerung des AA-Anteils in der Membran [78, 79]. Außerdem konkurrieren die n-3-Fettsäuren und AA um das gleiche Enzymsystem zur Metabolisierung (COX und LOX). Dies führt nun dazu, dass der AA-Metabolismus gehemmt wird und vermehrt andere Substrate für die Eicosanoid-Synthese zur Verfügung stehen. Auf diese Weise werden einerseits weniger AA-Metaboliten mit proinflammatorischer Wirkung und andererseits vermehrt EPA-Eicosanoide (Prostanoide der 3er-Serie und Leukotriene der 5er-Serie) sowie Resolvine und Protektine mit antiinflammatorischen Eigenschaften gebildet [78, 79, 87, 89, 90]. Die veränderte Fettsäure-Zusammensetzung der Zellmembranen von Entzündungszellen wirkt sich auch auf die Membran-Fluidität und damit vor allem auf funktionelle Mikrodomänen aus [79, 87]. Diese *lipid rafts* sind rigide Strukturen innerhalb der Zellmembran und beinhalten verschiedene Rezeptoren, Proteine und Enzyme. Als Signalplattformen sind sie an der Signaltransduktion, Aktivierung und Proliferation von Entzündungszellen beteiligt. Durch vermehrten Einbau der ungesättigten Fettsäuren EPA und DHA wird die Membran-Fluidität erhöht, was sich wiederum auf Stabilität, Struktur und Funktion der *lipid rafts* auswirkt. Dadurch kann letztlich die Funktion der

Immunzellen (vor allem T-Lymphozyten) bezüglich Signaltransduktion und Entzündungsaktivität beeinträchtigt werden [79, 89]. Neben den genannten Mechanismen können n-3-Fettsäuren die Entzündungsreaktion auf weiteren Stufen abschwächen. So konnte nachgewiesen werden, dass sie über ein vermindertes Angebot an chemotaktisch wirkenden AA-Metaboliten (z.B. LTB₄) und über reduzierte Expression von Rezeptoren die Chemotaxis von Leukozyten vermindern [79]. Außerdem führen sie zu einer verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Entzündungs- und Endothelzellen, was nachfolgend in einer verminderten Adhäsion und Migration von Leukozyten mündet [79]. Des Weiteren hemmen n-3-Fettsäuren die Endotoxin-stimulierte Synthese proinflammatorischer Zytokine (wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) und fördern die Produktion von antiinflammatorischen Molekülen wie IL-10. Dabei scheinen einige Mechanismen auf Ebene der Genexpression abzulaufen. Über Aktivierung des antiinflammatorischen Transkriptionsfaktors *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR- γ) und über Bindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR120 auf der Oberfläche von Immunzellen, können n-3-Fettsäuren die Phosphorylierung des I κ B und damit die Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B hemmen. Dadurch wird die Synthese proinflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmoleküle und COX vermindert [78, 79, 87, 89, 90].

1.3 Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung

1.3.1 Ernährung kritisch kranker Patienten

Die Ernährung kritisch kranker Patienten, z.B. mit ARDS oder Sepsis, sollte die Grundkomponenten Kohlenhydrate (Glukose), Proteine und Lipide enthalten [82]. Um die Energiezufuhr glukoseabhängiger lebenswichtiger Gewebe (z.B. Centrales Nervensystem) sicherstellen zu können, ist der Stoffwechsel kritisch kranker Patienten initial im Rahmen der katabolen Aggressionsphase durch gesteigerte Glukoneogenese, Lipolyse und Proteolyse und folglich erhöhte endogene Produktion und Mobilisation von Substraten charakterisiert. Es resultieren Hyperglykämie und ein erheblicher Verlust an Muskelmasse [91]. Dieser Zustand ist wegen fehlender metabolischer Rückkopplung über exogene Nährstoffgabe kaum zu beeinflussen. Daher besteht bezüglich der intensivmedizinischen Ernährung in dieser akuten Phase die Gefahr einer Substratüberladung im Sinne einer Hyperalimentation. Dies wiederum kann vor allem

hinsichtlich Hyperglykämien zu vermehrten Komplikationen führen (z.B. Infektionen, hyperosmolares Koma, Organversagen, erhöhte Mortalität) [91, 92]. Dementsprechend sollte durch Zufuhr geringerer Substratmengen eine initiale Hyperalimentation verhindert werden (geschätzter Kalorienbedarf: 10-15-20 kcal/kg/Tag) [82, 91]. Diese Phase darf allerdings nicht zu lange andauern, denn mit zunehmender Erholung des Organismus folgen Postaggressions- und Rekonstitutionsphase. Hier besteht bereits ein deutliches Energiedefizit, da die Reserven während der katabolen Phase zum größten Teil verbraucht wurden. Ein solches Energiedefizit ist ebenfalls mit infektiösen Komplikationen, längeren Beatmungs- und Liegezeiten sowie erhöhter Mortalität und einer daher insgesamt schlechteren Prognose assoziiert [91, 93]. So muss in dieser Phase eine Hypoalimentation vermieden werden. Empfohlen wird eine Steigerung der Energiezufuhr auf etwa 25 kcal/kg/Tag (in manchen Fällen bis 30 kcal/kg/Tag) [82]. Die Ernährung kritisch kranker Patienten auf der Intensivstation muss also in Form einer stoffwechseladaptierten Ernährung erfolgen, um Hyper- oder Hypoalimentation und damit eine schlechtere Prognose zu vermeiden. Hierbei ist bekannt, dass Patienten mit intaktem Gastrointestinaltrakt von einer frühzeitigen, möglichst innerhalb von 24 Stunden nach Aufnahme begonnenen, enteralen Ernährung bezüglich Infektionsrate, Krankenhausverweildauer und Mortalität profitieren. Grund hierfür ist vor allem die Vermeidung einer Zottenatrophie, wodurch die Darmintegrität erhalten und auf diese Weise eine Verschleppung von Bakterien und Toxinen aus dem Darmlumen in die Blutgefäße reduziert werden kann [82, 91]. Bei Kontraindikationen für eine enterale Ernährung oder bei Patienten, die voraussichtlich auch nach drei bis fünf Tagen nicht adäquat über den enteralen Weg ernährt werden können und somit von Mangelernährung, Energiedefizit und Prognoseverschlechterung bedroht sind, wird eine supplementierende parenterale Ernährung, z.B. in Form der „dualen Ernährungsstrategie“ zusammen mit enteraler Ernährung empfohlen [82, 91]. Die Ernährung von Intensivpatienten umfasste ursprünglich vor allem die Gabe hoher Konzentrationen an Glukose und Aminosäuren, um eine ausreichende Energiezufuhr zu gewährleisten sowie Proteinverlust und negative Stickstoffbilanz zu verhindern. Dies hatte jedoch nachteilige Effekte. So führten sie unter anderem zu einem Mangel an essentiellen Fettsäuren, zu Hyperglykämien mit assoziierten Komplikationen und über gesteigerte Lipogenese zur Ausbildung einer Fettleber (hepatische Steatose) [92]. Diese negativen Effekte konnten minimiert werden, indem Lipide in die Ernährung mit einbezogen wurden. Bezüglich intensivmedizinischer Ernährung haben sie einige

günstige Eigenschaften. So können sie den Bedarf an essentiellen Fettsäuren decken und stellen aufgrund ihrer hohen Energiedichte adäquate Energieträger in der akuten katabolen Aggressionsphase dar. Dadurch kann die Gabe von Glukose als Energielieferant reduziert und folglich das Risiko für Hyperglykämien, hepatische Lipogenese und Fettleber vermindert werden [82, 91, 92, 94]. Je nach Krankheitsbild sollten die zugeführten Lipide 30-50% der Nicht-Protein-Energie betragen, was je nach Quellenangabe einer Menge von etwa 0,5-1g/kg/Tag [91] bzw. 1-1,2g/kg/Tag entspricht [82]. An dieser Stelle ist anzumerken, dass bei der parenteralen Gabe von Lipiden auf eine langsame Infusionsgeschwindigkeit (mindestens über 12 Stunden) geachtet werden muss, da eine zu schnelle Infusion zu einer Überlastung der Clearing-Funktion führen kann. Dies kann sich wiederum z.B. in Form einer pulmonalen Verschlechterung äußern [82].

1.3.2 Lipidemulsionen in der intensivmedizinischen Ernährung

In der intensivmedizinischen Ernährung werden Lipide in Form von Lipidemulsionen (LE) appliziert. Dies sind Mischungen aus Lipiden, Wasser und einem Emulgator, welcher für das feindisperse Gleichgewicht dieser Lipid-Wasser-Emulsion verantwortlich ist. Die ersten sicheren und seit 1961 für die breite klinische Anwendung über lange Zeit standardmäßig genutzten LE sind Sojabohnenöl (SO)-basierte LE. Sie sind reich an n-6-langkettigen Triglyceriden (*n-6 long chain triglycerides*; LCT), u.a. in Form der Linolsäure, enthalten somit hohe Konzentrationen an vielfach-ungesättigten n-6-Fettsäuren [21, 89, 92, 94]. Trotz jahrelanger Nutzung dieser LE, zeigen verschiedene Studien ungünstige immunologische und pathophysiologische Effekte, wie z.B. erhöhte Infektionsraten und erhöhte Lipid-Peroxidation mit folglich gesteigertem oxidativem Stress [21, 89, 92]. Die Gabe von reinen SO-LE wird daher nicht mehr empfohlen. Vielmehr sollten die zugeführten Lipide einen verminderten Anteil an SO enthalten [91, 94].

Um den SO-Gehalt und damit den negativen Einfluss zu reduzieren, wurden Mischungen aus SO, mittelkettigen Triglyceriden (*medium chain triglycerides*; MCT; aus Kokosöl) und Olivenöl (OO) entwickelt. MCT dienen als schnelle Energielieferanten, da sie im Vergleich zu LCT unabhängig von Carnitin in die Mitochondrien aufgenommen und daher schneller oxidiert werden können. Zudem erfolgt hier keine Metabolisierung zu proinflammatorischen AA-Metaboliten. OO zeigt einen hohen Gehalt an Ölsäure, welche eine einfach ungesättigte n-9-Fettsäure mit

wahrscheinlich immunneutralen Eigenschaften darstellt [89, 92, 94]. Nachfolgend wurde Fischöl (FO) als vierte Komponente in die Mischemulsionen eingefügt. Als Hauptquelle von n-3-Fettsäuren (v.a. EPA und DHA) hat diese Komponente vor allem immunmodulierende, antiinflammatorische Effekte, indem z.B. die Leukozyten-Aktivität und die Synthese von Zytokinen und Lipidmediatoren beeinflusst werden. Hierbei muss jedoch zusätzlich biologisch aktives Vitamin E (α -Tocopherol) als Antioxidanz zugeführt werden, da n-3-Fettsäuren anfälliger gegenüber Lipid-Peroxidation sind. Hier reagieren reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) mit den Doppelbindungen der Fettsäuren und führen zur Bildung von Sauerstoffradikalen und instabilen Lipidperoxidationsprodukten, welche wiederum proinflammatorisch wirken. Vitamin E wird hinzugegeben, um diese nachteiligen Effekte zu vermeiden. Aktuell existieren zwei kommerziell erhältliche Misch-LE, die FO enthalten. Eine besteht aus SO, MCT und FO (MSF-LE), die andere enthält zusätzlich OO (SMOF-LE) [21, 89, 91, 92, 94].

1.3.3 Mögliche Vorteile von n-3-Fettsäuren als Bestandteil von Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung kritisch kranker Patienten

Fischöl-angereicherte LE verfügen über positive immunmodulatorische Eigenschaften. Deren Gabe führt zu einem Anstieg der Plasmakonzentration der n-3-Fettsäuren EPA und DHA. Diese können, wie im Kapitel 1.2.3 erläutert, die Entzündungsreaktion auf unterschiedlichen Stufen abschwächen [21, 79, 89, 91, 95]. In diesem Zusammenhang ist der Applikationsweg der Fettsäuren wichtig. Lipide können oral, enteral oder unter bestimmten Umständen parenteral appliziert werden. Insbesondere die intravenöse Infusion der n-3-Fettsäuren stellt sich bei kritisch Kranken als vorteilhaft heraus: Unter Umgehung des Gastrointestinaltraktes gelangen die applizierten Fettsäuren direkt in das Blutssystem, sodass keine Verluste während der Verdauung und Absorption entstehen, im Gegensatz zu oraler oder enteraler Gabe. Ein weiterer Vorteil der parenteralen Applikation ist die Aktivierung der endothelialen Lipoproteinlipase, indem dieses Enzym durch die infundierten Fetttröpfchen von der Membran in das Gefäßsystem transloziert wird. Die aktivierte Lipoproteinlipase kann nun die infundierten Triglyceride spalten, sodass freie Fettsäuren entstehen. Zusätzlich führen Stressantwort der Patienten und Medikamentengabe (z.B. Heparin) ebenfalls zu einer Erhöhung der Fettsäuren-Konzentration. Auf diese Weise bewirkt die parenterale Infusion von LE hohe Fettsäure-Konzentrationen im Plasma, die bei oraler oder enteraler Aufnahme so

nicht möglich wären [21, 95]. Die freien n-3-Fettsäuren im Blutplasma können nun von den Zellen aufgenommen und rasch in die Zellmembranen eingebaut werden, wo sie für die weitere Metabolisierung zur Verfügung stehen [89]. Bezüglich der immunmodulatorischen Wirkung der FO-LE ist die vermehrte Synthese von EPA-Eicosanoiden, Resolvinen und Protektinen mit antiinflammatorischen und entzündungsauflösenden Eigenschaften bei gleichzeitig verminderter Produktion von proinflammatorischen AA-Metaboliten entscheidend. Außerdem führen n-3-Fettsäuren zu verminderter Leukozyten-Rekrutierung sowie zu reduzierter Synthese proinflammatorischer Zytokine [79, 89, 91, 95]. Der Nutzen einer enteralen Ernährung mit immunmodulierenden Produkten, einschließlich n-3-Lipiden, wird vor allem bei chirurgischen Patienten bezüglich verminderter Infektionsraten und reduzierter Krankenhaus-Verweildauer bestätigt [96, 97]. Im Rahmen der genannten immunmodulierenden, antiinflammatorischen Eigenschaften, könnten parenteral applizierte n-3-Fettsäuren bei Patienten mit ARDS nützlich sein. Die experimentelle und klinische Datenlage hierzu ist aktuell jedoch noch unklar und kaum vorhanden. Entscheidend dabei erscheint die Rolle von Lipidmediatoren, insbesondere in Form der Eicosanoide. Die n-3-Fettsäuren EPA und DHA könnten über die oben genannten Mechanismen letztlich zu einer abgeschwächten Immunantwort mit verminderter Leukozyten-Rekrutierung in die Lungen-Alveolen und zu reduzierter Gefäßpermeabilität führen. Hierdurch könnten nachfolgend die entzündlichen Vorgänge, die akute pulmonal-vaskuläre Widerstandserhöhung und die Ödembildung in der Lunge abgeschwächt werden, was sich wiederum klinisch in Form einer verbesserten Oxygenierung äußern würde [21, 98-101]. Bezüglich enteraler und parenteraler Ernährung mit n-3-Fettsäuren existieren erste Hinweise für eine verbesserte Beatmungszeit von Patienten mit ARDS [102] und für eine reduzierte Mortalität bei septischen Patienten [21, 103]. Somit wird unter anderem die enterale Applikation von n-3-Fettsäuren bei Patienten mit ARDS empfohlen [91], wobei eine kürzlich publizierte Studie (OMEGA-Studie des ARDS-Netzwerks) die positiven Effekte des Fischöls nicht bestätigen konnte. Jedoch wird das Studiendesign kontrovers diskutiert, sodass weitere Studien zu diesem Thema notwendig sind [91, 104].

Zusammenfassend könnten n-3-Fettsäuren als Fischöl-Bestandteil von Lipidemulsionen eine Kombination aus parenteraler Ernährung und immunmodulatorischem Therapieansatz bei Patienten mit ARDS darstellen.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit die zwei unterschiedlichen Lipidemulsionen „Lipovenös® 20%“ und „SMOFlipid®“ im Mausmodell der akuten respiratorischen Insuffizienz miteinander verglichen.

Lipovenös® 20% (= LCT 20) ist eine Emulsion, welche zu 100% aus Lipiden besteht, die aus Sojabohnen-Öl gewonnen werden. Sie ist somit reich an n-6-langkettigen Triglyceriden (*n-6 long chain triglycerides*; LCT), u.a. in Form der Linolsäure, welche im Organismus zu Arachidonsäure metabolisiert werden kann. Das Verhältnis aus n-3-Fettsäuren zu n-6-Fettsäuren liegt bei 1:6,4.

SMOFlipid® (= SMOFlipid 20%) ist eine Mischemulsion aus vier Komponenten. Sie besteht zu 30% aus Sojabohnenöl, zu 30% aus mittelkettigen Triglyceriden (MCT), zu 25% aus Olivenöl (OO) und zu 15% aus Fischöl (FO). Der Fischöl-Anteil aus Kaltwasserfischen liefert hierbei die n-3-Fettsäuren EPA und DHA. Das Verhältnis aus n-3-Fettsäuren zu n-6-Fettsäuren liegt bei 1:2,3.

1.4 Fragestellung

Vor dem Hintergrund der dargestellten Zusammenhänge zwischen dem Krankheitsbild der akuten respiratorischen Insuffizienz (ARDS) und der Rolle von Fettsäuren und Lipidemulsionen, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit den Auswirkungen verschiedener Lipidemulsionen auf ein akutes Lungenversagen im Mausmodell. Dabei soll folgende Fragestellung untersucht werden:

- Welche Effekte besitzt eine in der parenteralen Ernährung alternativ eingesetzte n-3-Fettsäure-angereicherte Lipidemulsion im Vergleich zu einer klinisch üblicherweise eingesetzten n-6-Fettsäure-basierten Lipidemulsion im Mausmodell der akuten respiratorischen Insuffizienz?
- Dies soll anhand folgender Parameter untersucht werden:
 - alveoläre und interstitielle Leukozyteninvasion
 - Proteinextravasation (Gefäßpermeabilität)
 - Synthese proinflammatorischer Mediatoren (TNF- α und MIP-2)

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden männliche C57BL/6NCrl Wildtyp-Mäuse (Tierversuchsgenehmigung V54-19c2015h01GI20/10 Nr. 120/2014) verwendet, die bei Charles River, Sulzfeld, Deutschland, bestellt wurden. Deren Aufzucht und Haltung erfolgte tierschutzgerecht in transparenten Polycarbonatkäfigen unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20-22°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Futter (ssniff R/M-H) und Wasser standen ihnen jederzeit zur freien Verfügung. Im Alter von vier Wochen wurden die Jungtiere abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und in Gruppen zu maximal vier Mäusen unter den oben genannten Bedingungen aufgezogen.

Mit einem Gewicht von ca. 22-25g und einem Alter von 70-90 Tagen standen die Mäuse für die Experimente zur Verfügung.

2.2 Geräte und Materialien

2.2.1 Tierhaltung

Für die Tierhaltung wurden folgende Materialien verwendet:

Produkt	Hersteller
<i>Mäuse:</i> C57BL/6NCrl	Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland
<i>Käfige:</i> IVC Käfige, Eurostandard Typ II long	Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland
Altromin Tiereinstreu-Granulat	Altromin GmbH + Co. KG, Lage-Lippe, Deutschland
Ssniff R/M-H, Alleinfuttermittel für Ratten- und Mäuse-Haltung	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland

Tab. 4 *Materialien für die Tierhaltung*

2.2.2 *in-vivo*-Eingriffe

Für die *in-vivo*-Eingriffe wurden folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet:

Produkt	Hersteller
<p><i>Intravenöser Katheter:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Katheter F. Certofix-Mono • Tube silicone platinumium 	<p>B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland Fisher Bioblock Scientific, Schwerte, Deutschland</p>
<p>ALZET Osmotische Pumpe, Modell 2004</p>	<p>Durect Corporation, Cupertino, USA</p>
<p><i>Operationsbesteck:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Scheren • Pinzetten • Klemmen • Nadelhalter 	<p>Rebstock Instruments GmbH, Dürbheim, Deutschland</p>
<p><i>Operationsmikroskop:</i> Stereolupe Leica MS 5</p>	<p>Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland</p>
<p><i>Infusionssystem:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • HARVARD Apparatus Precision Syringe Pumps PHD 2000 Infusion (10 Multi-Rack) • Stativ mit ausgeglichenem Hebelarm • Drehgelenk (single channel stainless steel swivel) • Silikonschlauch 	<p>Harvard Apparatus, Massachusetts, USA Instech Laboratories, Inc. Plymouth Meeting, PA USA Instech Laboratories, Inc. Instech Laboratories, Inc.</p>
<p><i>Lichtquelle:</i> LED-Lichtquelle (Schwanenhals)</p>	<p>Photonic Optische Geräte GmbH & Co KG, Wien, Österreich</p>

Tab. 5 Geräte für *in-vivo*-Eingriffe

Produkt	Hersteller
<p><i>Lipidemulsionen:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Lipovenös® 20% 100ml (LCT20) 1 Liter enthält: <ul style="list-style-type: none"> - Sojabohnenöl 200g - Glycerol 25g - Phospholipide aus Ei 12g • SMOFlipid® 200mg/ml 1 Liter enthält: <ul style="list-style-type: none"> - raffiniertes Sojaöl 60g - Mittelkettige Triglyceride 60g - Raffiniertes Olivenöl 50g - Fischöl 30g 	<p>Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland</p> <p>Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland</p>
<p><i>Infusionslösungen:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Isotonische Natriumchlorid-Lösung DeltaSelect • Glucose 10 Braun • Heparin-Natrium Braun 25000 IE/5ml - zur subcutan-Injektion: 10 IE/200µl 	<p>DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland</p> <p>B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland</p> <p>B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland</p>
<p><i>Analgesie:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Tramal® 2,5mg/100ml Trinkwasser • Lidocain 1% Injektions-Lösung 	<p>Grünenthal Pharma AG, Aachen, Deutschland</p> <p>B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland</p>
<p><i>Prämedikation OP:</i></p> <p>Atropin® 0,5mg/ml Injektions-Lösung</p>	<p>B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland</p>
<p><i>Injektionsnarkose:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Xylazin 2% • Ketamin 10% • Domitor® (1mg/ml) 	<p>CEVA Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland</p> <p>bela-pharm GmbH & Co. KG., Vechta, Deutschland</p> <p>Elanco, Bad Homburg, Deutschland</p>
<p><i>Antagonisierung der Narkose:</i></p> <p>Antisedan® (5mg/ml)</p>	<p>Zoetis, Berlin, Deutschland</p>

Tab. 6 Verbrauchsmaterialien für in-vivo-Eingriffe

Produkt	Hersteller
<i>Inflammatorischer Stimulus:</i> Lipopolysaccharid von E. coli (Serotyp 0111:B4)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
<i>Desinfektion:</i> Braunoderm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<i>Augensalbe:</i> Bepanthen Augen- und Nasensalbe 5g	Roche, Eppstein-Bremthal, Deutschland
<i>Nahtmaterial:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Ethicon Ethibond Excel 5-0, Polyester beschichtete Fäden ohne Nadel • Ethicon Prolene 6-0, monofil mit atraumatischer Nadel 	Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien
Schlinggazetupfer, Tupfer	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Injekt® Solo (1ml, 5ml) (zweiteilige Einmalspritzen)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<i>verschieden-lumige Kanülen:</i> <ul style="list-style-type: none"> • BD Microlance™ 3, 26G ½“ • BD Microlance™ 3, 24G 1“ 	BD, Drogheda, Ireland
Vasocan Braunüle 22G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Tab. 6 (Fortsetzung) Verbrauchsmaterialien für in-vivo-Eingriffe

2.2.3 *in-vitro*-Bestimmungen

Für die *in-vitro*-Bestimmungen wurden folgende Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien verwendet:

Produkt	Hersteller
<i>Zentrifugen:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Hettich Rotanta/AP • Cytospin 3 	Hettich, Tuttlingen, Deutschland Shandon, Frankfurt a.M., Deutschland
Neubauer Zählkammer	Labor Optik, Friedrichsdorf, Deutschland
<i>Leukozytendifferenzierung:</i> <ul style="list-style-type: none"> • May-Grünwald Färbelösung • Giemsa Stammlösung 	Merck, Darmstadt, Deutschland Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Dialux Mikroskop	Olympus, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Homogenisator: Ultra-Turrax T8 (Dispergierwerkzeug klein, Durchmesser 5mm)	Ika-Werke GmbH + Co. KG, Staufen, Deutschland
ELISA-Reader	SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland
Pinzetten, Scheren	Rebstock Instruments GmbH, Dürbheim, Deutschland

Tab. 7 Geräte für *in-vitro*-Bestimmungen

Produkt	Hersteller
BD Microlance™ 3, 26G ½“	BD, Drogheda, Ireland
Vasocan Braunüle, 20G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Objektträger mit Rand	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
96-well Mikrotiterplatte	Nunc, Roskilde, Dänemark
Röhrchen 13ml, Polysterol	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schlinggazetupfer	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Injekt® Solo (1ml) (zweiteilige Einmalspritzen)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Eppendorf-Cups und Pipetten	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

Tab. 8 Verbrauchsmaterialien für *in-vitro*-Bestimmungen

Produkt	Hersteller
<p><i>BAL-Lösung:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • 400 ml PBS <ul style="list-style-type: none"> - Pufferlösung aus NaCl, KCl, Na₂HPO₄xH₂O, KH₂PO₄, Aqua dest. • plus 100ml EDTA 1%; 	<p>Biochrom AG, Berlin, Deutschland</p>
<p><i>ELISA:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • TNF-α DuoSet (DY410) • MIP-2 DuoSet (DY452) • Waschpuffer: <ul style="list-style-type: none"> - 1000ml Aqua dest. - 2,4g TRIS - 0,5ml Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaureate) - pH: 7,3 	<p>R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Blockpuffer: 100ml PBS 1x <ul style="list-style-type: none"> - 1g Bovine Serum Albumin - 5g Saccharose - 0,05g NaN₃ 	<p>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Verdünnungsreagenz: <ul style="list-style-type: none"> - 200ml Aqua dest. - 0,2g BSA - 0,1ml Tween 20 - 0,48g TRIS Base - 1,75g NaCl - pH: 7,3 	<p>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Streptavidin-HRP • H₂SO₄ (1 M) 	<p>Zymed, San Francisco, USA Merck, Darmstadt, Deutschland</p>

Tab. 9 Chemikalien für in-vitro-Bestimmungen

2.3 *in-vivo*-Eingriffe

Die *in-vivo*-Eingriffe (intraperitoneale und subkutane Injektionen, Implantation des zentralen Venenkatheters unter Injektionsnarkose, intratracheale LPS-Instillation, Euthanasie) erfolgten durch Frau Dr. Juliane Ott, wissenschaftliche Mitarbeiterin der AG Mayer.

2.3.1 Analgesie, Prämedikation, Narkose

Für die *in-vivo*-Eingriffe erfolgten die präoperative (mindestens 12 Stunden vor OP-Beginn) sowie die postoperative Analgesie (bis drei Tage *post operationem*) über das Trinkwasser mittels Tramal[®]. Intraoperativ (vor dem Einbringen des Katheters in die Jugularvene) erfolgte zudem eine Lokalanästhesie mittels Lidocain 1% im Bereich der freipräparierten Jugularvene. Zur Prämedikation vor der OP wurde Atropin[®] subkutan (s.c.) injiziert. Für die Implantation des zentralen Venenkatheters wurden die Mäuse mittels intraperitonealer (i.p.) Injektionsnarkose anästhesiert. Dazu wurden Xylazin 2% mit Ketamin 10% gemischt und injiziert. Für die intratracheale LPS-Instillation wurde ebenfalls eine intraperitoneale Injektionsnarkose durchgeführt.

2.3.2 Katheter-Implantation

Den Mäusen wurde ein zentraler Venenkatheter (ZVK) in die Vena (V.) jugularis implantiert, um hierüber Lipidemulsionen, bzw. NaCl-Lösung (als Kontrolle) infundieren zu können. Dazu musste zunächst ein entsprechender Katheter hergestellt werden. Als Ausgangsmaterial dienten ein 1,3cm langes Stück eines Katheters (Katheter F. Certofix-Mono, B. Braun) und ein 5cm langer Silikonschlauch (Tube silicone platinum, Fisher Bioblock Scientific). Der Katheter wurde in den Silikonschlauch eingeführt und bei 0,5cm Länge fixiert. Der ZVK wurde anschließend in Schleifen-Form festgeknotet (siehe **Abbildung 8**).

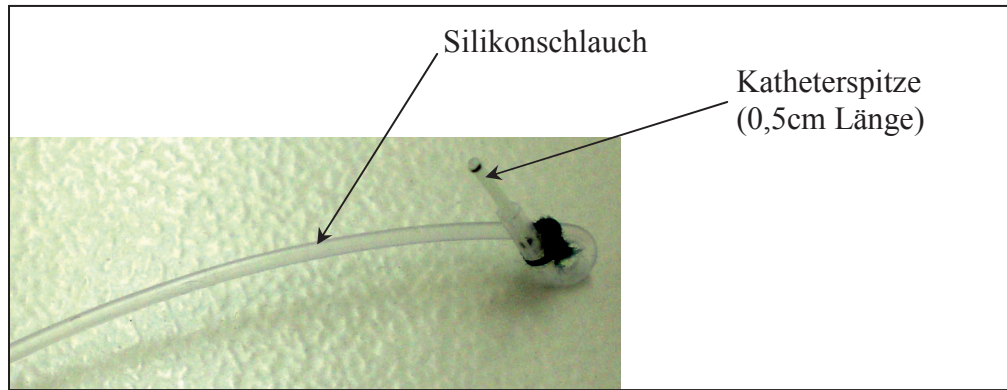


Abb. 8 Zentraler Venenkatheter für die Operation

Die Maus konnte nun narkotisiert sowie im OP-Bereich rasiert und desinfiziert werden. Anschließend erfolgte ein Hautschnitt auf der linken ventralen Hals-Seite paramedian, worüber die linke V. jugularis stumpf freipräpariert wurde. Über einen weiteren Hautschnitt dorsal im Nacken konnte der vorbereitete Katheter hindurchgezogen werden, sodass die Katheterspitze auf der Ventralseite und das Silikonschlauch-Ende auf der Dorsalseite der Maus zum Liegen kam. Um eine zusätzliche lokale Betäubung im OP-Gebiet zu erzielen, wurde Lidocain (1%) im Bereich der Jugularvene appliziert. Der Katheter wurde nun über eine kleine Inzision in die V. jugularis eingeschoben und mithilfe mehrerer Ligaturen fixiert (siehe **Abbildung 9**). Die Hautwunde wurde mittels nicht-resorbierbaren Fadens (Stärke 6-0) genäht.

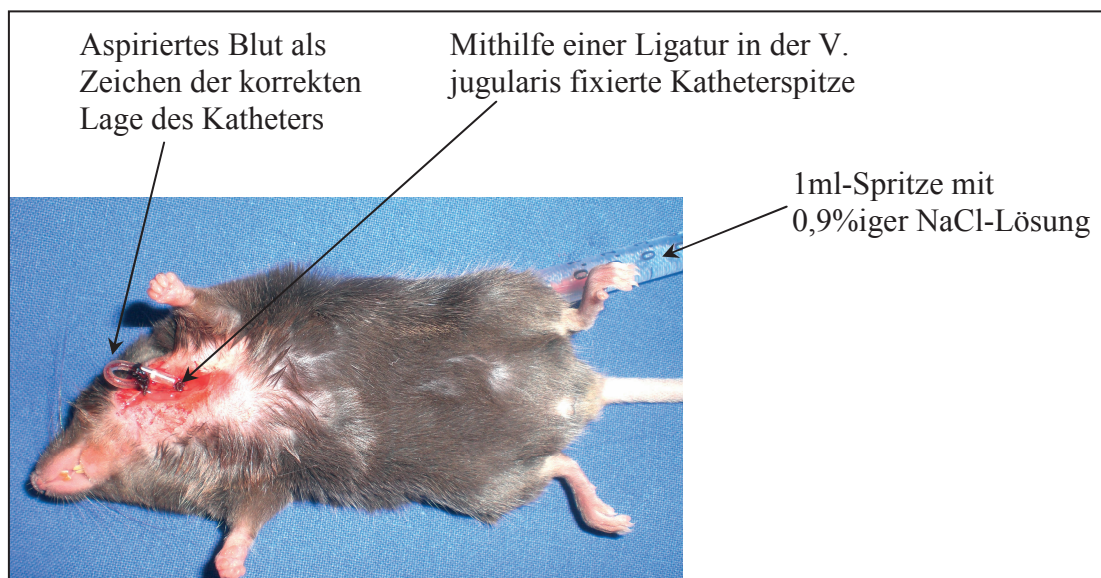


Abb. 9 In der Vena jugularis einliegender Katheter

Das dorsal liegende Ende des Silikonschlauches wurde mit einer mini-osmotischen Pumpe (ALZET Osmotische Pumpe, Durect Corporation; Gewicht 1,1g) verbunden, die auf dem Rücken der Maus befestigt werden konnte. Hierüber wurde der Katheter während der postoperativen einwöchigen Heilungsphase mit einer NaCl-Lösung (0,9%) durchspült (Infusion von 0,25µl / Stunde) und auf diese Weise durchgängig gehalten. Nun konnte die Maus zum Aufwachen in ihren Käfig gelegt werden.

2.3.3 Infusion

Nach einer einwöchigen Einheilungsphase konnte die Maus in den Versuch eingebracht werden. Über den implantierten zentralen Venenkatheter wurde sie mit einem Infusionssystem verbunden, worüber entweder Lipidemulsionen oder NaCl-Lösung als Kontrolle infundiert werden konnten. Dieses Infusionssystem bestand aus einem Perfusor, einem Stativgerüst mit frei schwenkbaren Armen (damit sich die Maus während der Infusion frei in ihrem Käfig bewegen konnte), sowie aus Silikonschläuchen, über welche die jeweiligen Infusionen appliziert wurden (siehe **Abbildung 10**). Für die Infusion wurde die Lipidemulsion oder die NaCl-Lösung in eine 1ml-Spritze überführt, mit welcher nachfolgend der Silikonschlauch des Infusionssystems befüllt wurde. Anschließend konnte die Spritze in das Perfusor-System eingespannt werden. Nun wurde die auf dem Rücken der Maus fixierte mini-osmotische Pumpe entfernt und der Schlauch des Infusionssystems mit dem ZVK verbunden. Auf diese Weise konnten die Mäuse mit Lipidemulsion oder NaCl-Lösung (als Kontrolle) mit einem Gesamtvolumen von je 200µl pro Tag infundiert werden.

Während der intravenösen Infusion erhielten die Mäuse zusätzlich eine tägliche subkutane Injektion von 3 IE Heparin (= 120 IE Heparin / kg KG), gelöst in 200µl NaCl 0,9% (Kanülengröße: 26G). Eine solche „prophylaktische“ Heparinmenge wird bei Intensivpatienten zur Verhinderung von Thrombosen appliziert, in den vorliegenden Versuchen soll außerdem ein Verschluss des implantierten Katheters verhindert werden. Zudem aktiviert Heparin die Lipoproteinlipase, sodass aus den infundierten Lipidemulsionen freie Fettsäuren entstehen können [105].

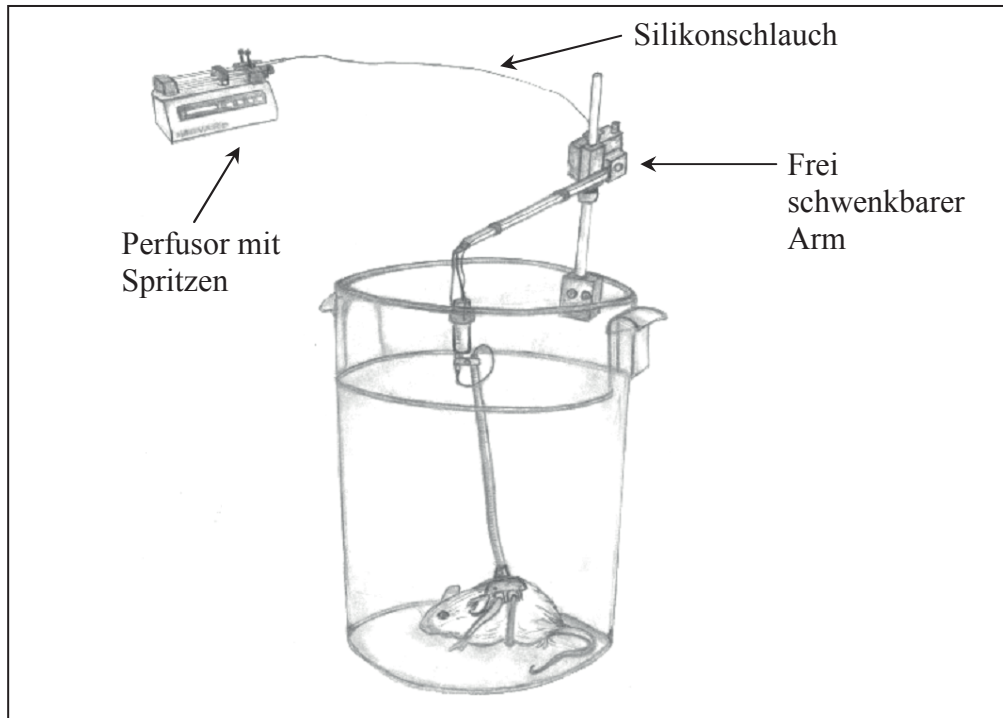


Abb. 10 Schematisch dargestelltes Infusionsprinzip

Abbildung adaptiert mit freundlicher Genehmigung von *Instech Laboratories, Inc* (www.instechlabs.com)

2.3.4 Intratracheale LPS-Instillation

Zur Induktion einer inflammatorischen Reaktion der Lunge im Sinne einer akuten respiratorischen Insuffizienz, wurde ein Endotoxin in die Lunge eingebracht. Als solches diente hier das von *Escherichia (E.) coli* stammende LPS. Für diesen Vorgang musste die Maus mittels i.p. Injektionsnarkose anästhesiert werden. Unter Sichtkontrolle mithilfe eines Mikroskops wurde ein „Tubus“ (Vasocan Braunüle, 22G) über die Mundhöhle in die Trachea eingeführt. Darüber erfolgte nun die intratracheale Instillation von 10µg Endotoxin, gelöst in steriler NaCl-Lösung (0,9%) mit einem Applikationsvolumen von insgesamt 50µl, welches langsam in drei Portionen (10µl-20µl-20µl) in die Lunge eingegeben wurde. Nach LPS-Instillation erfolgte eine Antagonisierung der Narkose mittels s.c. Injektion von Antisedan[®].

Nach Beendigung der Versuche wurde die Maus unter finaler Injektionsnarkose mittels Blutentzug (entnommen aus der Vena cava caudalis nach Eröffnen der Bauchdecke und Verlagerung des Darmes) euthanasiert und für verschiedene Untersuchungen genutzt. Diese werden im Folgenden aufgeführt:

2.3.5 Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Im Rahmen der akuten respiratorischen Insuffizienz werden vermehrt Leukozyten in die Alveolen der Lunge rekrutiert. Des Weiteren führen entzündliche Vorgänge sowie gesteigerte Gefäßpermeabilität zum Anstieg der Zytokin- und Protein-Konzentration in den Alveolen. Um diese Faktoren analysieren zu können, wurde eine broncho-alveoläre Lavage (BAL) gewonnen:

Bei der euthanasierten Maus wurde eine etwa zwei cm lange Haut-Inzision in der medianen, ventralen Halsregion vorgenommen. Die beiden in diesem Bereich subkutan liegenden Speicheldrüsen wurden in der Mitte mithilfe zweier Pinzetten stumpf freipräpariert und jeweils nach lateral verlagert. Um freie Sicht auf die Trachea zu erhalten, musste im Anschluss der Musculus trachealis durchtrennt werden. Nun konnte die Trachea mittels zweier Pinzetten untertunnelt und eine Ligatur vorbereitet werden. Zwischen zwei knorpeligen Trachealspangen wurde nachfolgend ein kleiner Schnitt gesetzt, worüber ein Katheter (Vasocan Braunüle, 20G) in die Trachea eingeführt werden konnte. Der Katheter wurde mittels der vorbereiteten Ligatur eingebunden und auf diese Weise fest in Position gehalten. Die Lunge konnte nun mit einem eiskalten Gemisch aus PBS und EDTA lavagiert werden. Zur Vordehnung der Lunge wurde initial ein Volumen von 200µl appliziert. Anschließend konnte mit ca. 350µl weitergespült werden. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis ein Eppendorf-Cup (1,5ml) mit Lavage-Flüssigkeit gefüllt war. Dieses wurde schließlich mit 1200 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und für spätere Untersuchungen bei -20°C eingefroren. Das Zell-Pellet wurde für die anschließende Leukozyten-Zählung weiterverwertet.

2.3.6 Organ-Entnahme

Nach Gewinnung der broncho-alveolären Lavage wurde die Lunge entnommen und bis zur weiteren Verwendung entsprechend den Versuchen aufbewahrt.

2.4 *in-vitro*-Bestimmungen

2.4.1 Leukozyten-Anzahl in der broncho-alveolären Lavage

Um die Leukozytenzahl in der BAL und damit auch in den Lungen-Alveolen ermitteln zu können, wurde das Zell-Pellet in 1ml einer 10% FCS-Lösung (fetales Kälber-Serum) resuspendiert. Nachfolgend wurden 10µl dieser Lösung auf eine Neubauer-Zählkammer

überführt. Der Rest der Lösung wurde bis zur weiteren Analyse auf Eis gestellt. Nun konnten die Leukozyten unter dem Mikroskop gezählt werden.

Für die Gesamtzellzahl wurden je zwei Großquadrate ausgezählt und deren Mittelwert bestimmt. Um nun die Gesamtzahl an Leukozyten in der BAL und somit auch in den Lungen-Alveolen zu ermitteln, wurde der errechnete Mittelwert mit dem Faktor 10.000 multipliziert.

2.4.2 Leukozyten-Differenzierung in der broncho-alveolären Lavage

Um einen Überblick über die unterschiedlichen Leukozyten-Populationen (neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) in den Lungen-Alveolen zu erhalten, wurden die Leukozyten (aus 100µl Leukozyten-FCS-Lösung) mithilfe einer Zentrifuge (Cytospin 3, 5000 rpm, 5 Minuten) auf einen Objektträger aufgebracht. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald und Giemsa) angefärbt, um schließlich unter dem Mikroskop ausgezählt zu werden. Hieraus konnte man nun einen prozentualen Überblick über die verschiedenen Leukozyten-Populationen der BAL und damit rückschliessend auch der Lungen-Alveolen gewinnen.

2.4.3 Bestimmung der TNF- α - und MIP-2-Konzentration in der broncho-alveolären Lavage

Die entzündlichen Prozesse in der Lunge führen zum Anstieg der alveolären Zytokin-Konzentration, z.B. von TNF- α und MIP-2. Diese lassen sich aus der gewonnenen BAL mithilfe der ELISA-Technik (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ermitteln, bei der eine Antigen-Antikörper-Reaktion mittels enzymatischem Farbumschlag nachgewiesen werden kann. Dazu musste der bei -20°C tiefgefrorene BAL-Überstand aufgetaut werden. Zu Beginn wurde die ELISA-Platte (96-well-Mikrotiterplatte) mit einem, in PBS verdünnten, *Capture Antibody* (Erstantikörper) vorbeschichtet. Für die TNF- α -Bestimmung verwendete man hierbei *goat anti-mouse TNF- α* , für die Bestimmung von MIP-2 *rat anti-mouse Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2)*. Die präparierten Platten ruhten über Nacht bei Raumtemperatur. Am folgenden Tag wurden diese dann dreimalig mit Waschpuffer gewaschen sowie unspezifische Bindungen mittels Blockpuffer mindestens über eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Zwischenzeitlich wurde eine Standard-Verdünnungsreihe mit rekombinantem *mouse TNF- α* bzw. *mouse MIP-2* angesetzt. Nach der Inkubation konnte der Blockpuffer abgewaschen und die Standardreihe sowie die einzelnen Proben des BAL-Überstandes

in die Wells gegeben werden. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur, damit das Antigen (Standard bzw. BAL-Proben) an den entsprechenden immobilisierten Antikörper (*Capture*-Antikörper) binden konnte. Anschließend wurde überschüssiges, ungebundenes Antigen durch dreimaliges Waschen mit dem Waschpuffer entfernt. Nun wurde ein verdünnter Biotin-gekoppelter *Detection Antibody* (Zweitantikörper) auf die Platte pipettiert. Hierfür wurde je nach Zytokin-Bestimmung entweder *biotinylated goat antimouse TNF- α* oder *biotinylated goat anti-mouse MIP-2* verwendet. Es folgte wiederum eine Inkubation über zwei Stunden bei Raumtemperatur. In dieser Zeit konnten die Zweitantikörper an das fixierte Antigen binden. Auf diese Weise entstanden Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach Entfernung ungebundener Antikörper, wurde verdünntes Streptavidin-HRP (Streptavidin konjugiert mit *horseradish peroxidase*) hinzugegeben. Streptavidin ist ein Protein mit hoher Affinität zu Biotin, die Peroxidase ist ein Enzym, welches die Reduktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) katalysiert. Unter Abdunkelung wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der dreimalige Waschvorgang wiederholt. Nun konnte die Substrat-Lösung [1:1-Gemisch aus Farb-Reagenz A (H_2O_2) und Farb-Reagenz B (Tetramethylbenzidin)] hinzugegeben werden. Die ebenfalls unter Abdunkelung stattgefundene Reaktion wurde nach 20 Minuten mittels einmolarer Schwefelsäure gestoppt. Das an Biotin gebundene Streptavidin-HRP bewirkte bei seinem Substrat einen Farbumschlag. Somit konnte letztlich die Antigen-Konzentration anhand der Fluoreszenzintensität mittels ELISA-Reader bei 450nm gemessen werden.

2.4.4 Bestimmung der Protein-Konzentration in der broncho-alveolären Lavage

Entzündlich gesteigerte Gefäßpermeabilität der Lungen-Kapillaren und gestörte alveolo-kapilläre Barrierefunktion führen zu vermehrtem Einstrom von Proteinen und Flüssigkeit in die Alveolen. Die erhöhte alveoläre Protein-Konzentration konnte in der BAL gemessen werden. Dazu musste zunächst der bei $-20^{\circ}C$ tiefgefrorene BAL-Überstand aufgetaut werden. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach dem BIORAD-Protokoll (*DC Protein Assay; Microplate Assay Protocol*). Für die Standard-Verdünnungsreihe wurde Bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. Es wurden nun $5\mu l$ der Standardlösung und $5\mu l$ der Proben (BAL-Überstand) in die Wells einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und schließlich $25\mu l$ des Reagenz A' ($A' = 1ml$ Reagenz A + $20\mu l$ Reagenz S) zu jedem Well hinzugefügt. Nachfolgend wurden $200\mu l$ Reagenz B auf

Proben und Standard gegeben, um den gewünschten Farbumschlag zu erhalten. Die auf diese Weise präparierte Mikrotiterplatte wurde unter Abdunkelung für drei Minuten gerüttelt und anschließend durch den ELISA-Reader bei 630nm gemessen.

2.4.5 Myeloperoxidase (MPO)-Aktivitäts-Assay

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein wichtiges, im Rahmen einer Entzündungsreaktion von neutrophilen Granulozyten gebildetes Enzym. Daher wird die MPO-Aktivität in der Lunge als biochemischer Marker für die Rekrutierung bzw. Akkumulation von Neutrophilen im Lungengewebe genutzt. Hierfür mussten zunächst die bei -20°C tiefgefrorenen Lungen auf Eis aufgetaut werden. Anschließend wurde ihr jeweiliges Gewicht ermittelt und zu je 50mg Lungengewebe 1ml HTAB-Puffer gegeben. Nun musste die Lunge etwa 15 Sekunden lang mit einem Homogenisator zerkleinert werden. Das Homogenisat wurde mithilfe einer Pipette vermischt. Im Anschluss wurde hiervon 1ml in ein Eppendorf-Cup überführt und mit 5000 rpm bei 4°C für vier Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und für die weitere Testdurchführung in ein Cup überführt. Es wurden 200µl o-Dianisidin-Lösung zusammen mit 7µl der jeweiligen Probe in ein Well einer 96-well-Mikrotiterplatte gegeben. Die Reaktion führte zu einem Farbumschlag, welcher mittels kinetischer Messung bei 450nm ermittelt wurde. Der gemessene mOD-Wert/min. wurde mit dem Faktor 0,2528 multipliziert, um so die MPO-Werte/mg Gewebe zu erhalten. Zum Schluss wurden die Ergebnisse in MPO-Units/g Gewebe umgerechnet [26, 42].

2.5 Versuchsprotokoll

2.5.1 Gruppeneinteilung

Für die Implantation des zentralen Venenkatheters wurden Mäuse (Wildtyp, C57BL/6NCrl) im Alter von 70-90 Tagen mit einem Gewicht von 22-25g verwendet. Über den Katheter wurden die Lipidemulsionen „Lipovenös® 20%“ (reich an n-6-Fettsäuren, nachfolgend abgekürzt mit LCT20) oder „SMOFlipid®“ (reich an n-3-Fettsäuren, nachfolgend abgekürzt mit SMOF) infundiert. Als Kontrolle diente die Infusion mit Natriumchlorid (0,9% NaCl)-Lösung.

C57BL/6NCrI (WT):

- | | |
|-------------------|--|
| 1. Gruppe: | NaCl-Infusion mit |
| | <ul style="list-style-type: none"> • unstimuliert • 10µg LPS i.t. / 24h stimuliert • 10µg LPS i.t. / 72h stimuliert |
| 2. Gruppe: | LCT20-Infusion mit |
| | <ul style="list-style-type: none"> • unstimuliert • 10µg LPS i.t. / 24h stimuliert • 10µg LPS i.t. / 72h stimuliert |
| 3. Gruppe: | SMOF-Infusion mit |
| | <ul style="list-style-type: none"> • unstimuliert • 10µg LPS i.t. / 24h stimuliert • 10µg LPS i.t. / 72h stimuliert |

Tab. 10 Gruppeneinteilung

i.t.= intratracheal

2.5.2 Zeitlicher Ablauf der Experimente

Am Tag 0 wurde der Maus ein zentraler Venenkatheter (ZVK) implantiert. Es folgte eine siebentägige Einheil- und Erholungsphase. Am 7. postoperativen Tag wurde die Maus über den ZVK mit einem Infusionssystem verbunden. Hierüber wurden 2 Tage lang entweder NaCl (Kontrollgruppe), Lipovenös® 20% (LCT20) oder SMOFlipid® (SMOF) mit einem Gesamtvolumen von je 200µl pro Tag infundiert. Während der intravenösen Infusion erhielten die Mäuse zusätzlich eine tägliche subkutane Injektion von 3 IE Heparin (= 120 IE Heparin / kg KG), gelöst in 200µl NaCl 0,9%. Zur Auslösung einer akuten respiratorischen Insuffizienz wurde die Maus nach 2-tägiger Infusion vom Infusionssystem abgehängt und durch einmalige intratracheale Endotoxin (LPS)-Applikation stimuliert. Nach 24 bzw. 72 Stunden (je nach Gruppe) folgte das Versuchsende mit Auswertung (Blutentnahme, BAL, Lungen-Entnahme, *in-*

in vitro-Bestimmungen). Für die unstimulierte Kontrollgruppe erfolgte das Versuchsende mit Auswertung bereits nach der 2-tägigen Infusion.

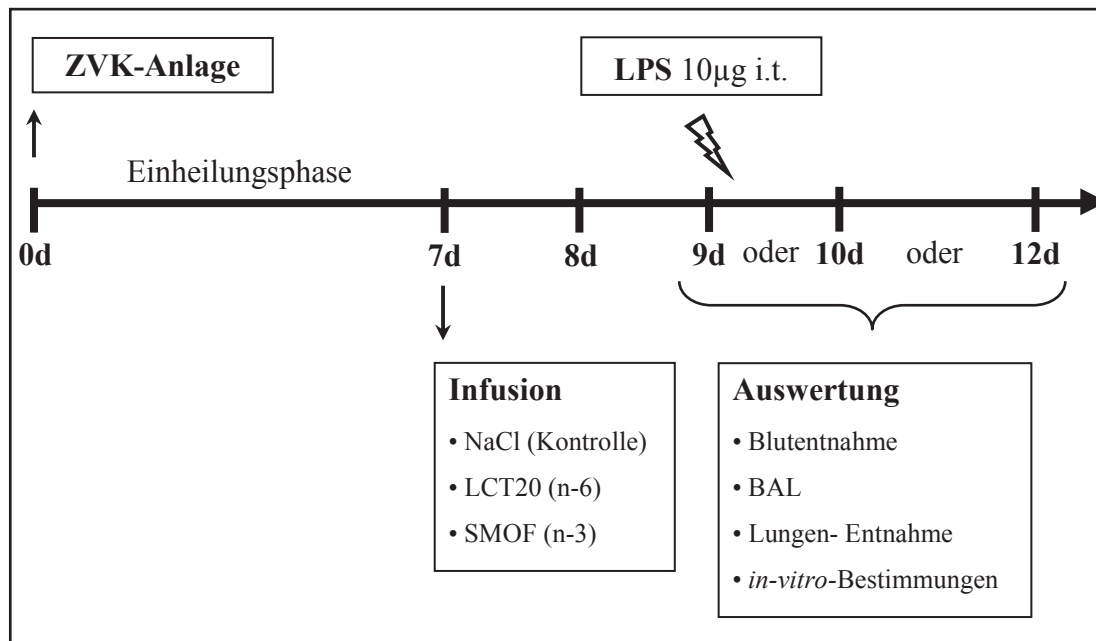


Abb. 11 Zeitlicher Ablauf der Experimente in Tagen [d]

ZVK= Zentraler Venenkatheter; NaCl= Natriumchlorid; LCT20= Lipovenös® 20% (reich an n-6-Fettsäuren); SMOF= SMOFlipid® (reich an n-3-Fettsäuren); LPS= Lipopolysaccharid; i.t.= intratracheal; BAL= broncho-alveoläre Lavage

2.6 Statistik

Für die statistische Analyse wurden bei den einzelnen Tiergruppen Mittelwerte sowie Standardabweichungen errechnet. Die Auswertung erfolgte mithilfe des kommerziell erhältlichen Statistik-Programms *SigmaStat 3.5*. Als Varianzanalyse wurde eine zweifaktorielle ANOVA benutzt, um zu erfahren, ob sich die einzelnen Infusions-Gruppen unterscheiden. Waren die Werte nicht linear-normalverteilt, erfolgte eine logarithmische Transformation (logarithmisch normalverteilt waren die Daten von Leukozytenzahl, Monozyten, Lymphozyten, Protein, TNF- α und MIP-2). Die Student-Newman-Keuls-Methode wurde anschließend als *post hoc* Test durchgeführt, um zu testen, welche Gruppen sich voneinander unterscheiden. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Die Ergebnisse wurden durch Bildung homogener Gruppen und in Form von Säulendiagrammen dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Anzahl der Versuchstiere

Die Daten von 45 Mäusen (C57BL/6NCrl) bildeten die Grundlage für die vorliegende Arbeit.

3.2 Allgemeine, äußerlich sichtbare Entzündungszeichen

Nach intratrachealer Endotoxin (LPS)-Applikation zur Auslösung einer akuten respiratorischen Insuffizienz, zeigten die Mäuse bereits äußerlich sichtbare entzündungs- bzw. krankheitstypische Verhaltensauffälligkeiten. So präsentierten sich die Versuchstiere, unter anderem bezüglich motorischer Aktivität und Putzverhalten, in deutlich reduziertem Allgemeinzustand [106, 107].

3.3 Leukozyten-Rekrutierung in die Lunge

Bei den vorliegenden Versuchen wurde zur Induktion einer inflammatorischen Reaktion der Lunge ein Endotoxin über intratracheale Applikation in die Lunge eingebracht. Als solches diente hier das von *E. coli* (Serotyp 0111:B4) stammende LPS. Im Rahmen der akuten Lungenentzündung kommt es unter anderem zu einer vermehrten Akkumulation von Leukozyten im pulmonalen Gefäßsystem und schließlich zur zunehmenden Rekrutierung von Leukozyten aus dem pulmonalen Gefäßbett in das Interstitium und nachfolgend in die Alveolen der Lunge.

3.3.1 Leukozyten in den Alveolen der Lunge

3.3.1.1 Leukozyten

Die im Rahmen der akuten Lungenentzündung in die Alveolen der Lunge eingewanderten Leukozyten konnten in den verschiedenen Tierversuchsgruppen mithilfe der broncho-alveolären Lavage (BAL) bestimmt werden:

Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder aber mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. Daraufhin erfolgte bei einem Teil der Versuchstiere die Stimulation über intratracheale Endotoxin-Instillation von 10 μ g LPS. 24 oder 72 Stunden nach Stimulation wurde eine broncho-alveoläre Lavage (BAL) durchgeführt.

Bei der Kontrollgruppe wurden in der unstimulierten Lunge $0,06 \pm 0,01 \times 10^6$ Leukozyten in der broncho-alveolären Lavage gefunden (n=7). Bei den mit $10\mu\text{g}$ LPS stimulierten Kontrollmäusen, bei denen die BAL nach 24-stündiger Stimulation durchgeführt wurde, kam es zum signifikanten Anstieg der Leukozytenzahl auf $2,63 \pm 0,13 \times 10^6$ (n=7; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation fanden sich in der NaCl-Gruppe $2,59 \pm 0,21 \times 10^6$ Zellen (n=7). Diese zeigten sich im Vergleich zur unstimulierten Gruppe ebenfalls signifikant erhöht ($p < 0,05$).

In der unstimulierten Versuchsgruppe mit LCT20 als infundierte Lipidemulsion konnten $0,19 \pm 0,04 \times 10^6$ (n=4) Leukozyten detektiert werden. Nach Instillation von $10\mu\text{g}$ LPS und 24-stündiger Stimulation, stieg die Zellzahl signifikant auf $2,97 \pm 0,21 \times 10^6$ (n=5; $p < 0,05$). Versuchstiere, welche mit LCT20 infundiert und 72 Stunden lang stimuliert wurden, zeigten eine Leukozytenzahl in der BAL von $2,58 \pm 0,29 \times 10^6$ (n=4), welche verglichen mit der unstimulierten Versuchsgruppe signifikant erhöht waren ($p < 0,05$).

Bei Mäusen, die mit SMOF infundiert wurden, fanden sich in der unstimulierten Gruppe $0,10 \pm 0,01 \times 10^6$ Leukozyten (n=4). Bei solchen, die 24 Stunden nach LPS-Stimulation lavagiert wurden, stieg die Anzahl der Leukozyten signifikant auf $2,06 \pm 0,29 \times 10^6$ (n=4; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation lag die Leukozytenzahl bei $1,64 \pm 0,15 \times 10^6$ (n=3). Auch diese Zellzahl war im Vergleich zur unstimulierten Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Bei den unstimulierten Versuchstieren zeigten alle Infusionsgruppen statistisch signifikante Unterschiede zueinander. Die Kontroll-Mäuse, welche mit NaCl infundiert wurden, zeigten die niedrigste Zellzahl in der BAL. Bei Tieren, die mit LCT20 infundiert wurden, fanden sich demgegenüber signifikant erhöhte Zellzahlen ($p < 0,05$). Mit SMOF infundierte Tiere präsentierten im Vergleich zur LCT20-Gruppe signifikant verringerte und im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Leukozytenzahlen (jeweils $p < 0,05$).

In der Versuchsgruppe mit Instillation von $10\mu\text{g}$ LPS und 24-stündiger Stimulation, konnte im Vergleich zur LCT20-Gruppe eine signifikant erniedrigte Leukozytenzellzahl in der SMOF-Gruppe gefunden werden ($p < 0,05$).

Mäuse, welche mit $10\mu\text{g}$ LPS stimuliert und nach 72 Stunden lavagiert worden sind, zeigten, verglichen mit den Kontrolltieren, signifikant verringerte Leukozytenzahlen in der SMOF-Gruppe ($p < 0,05$).

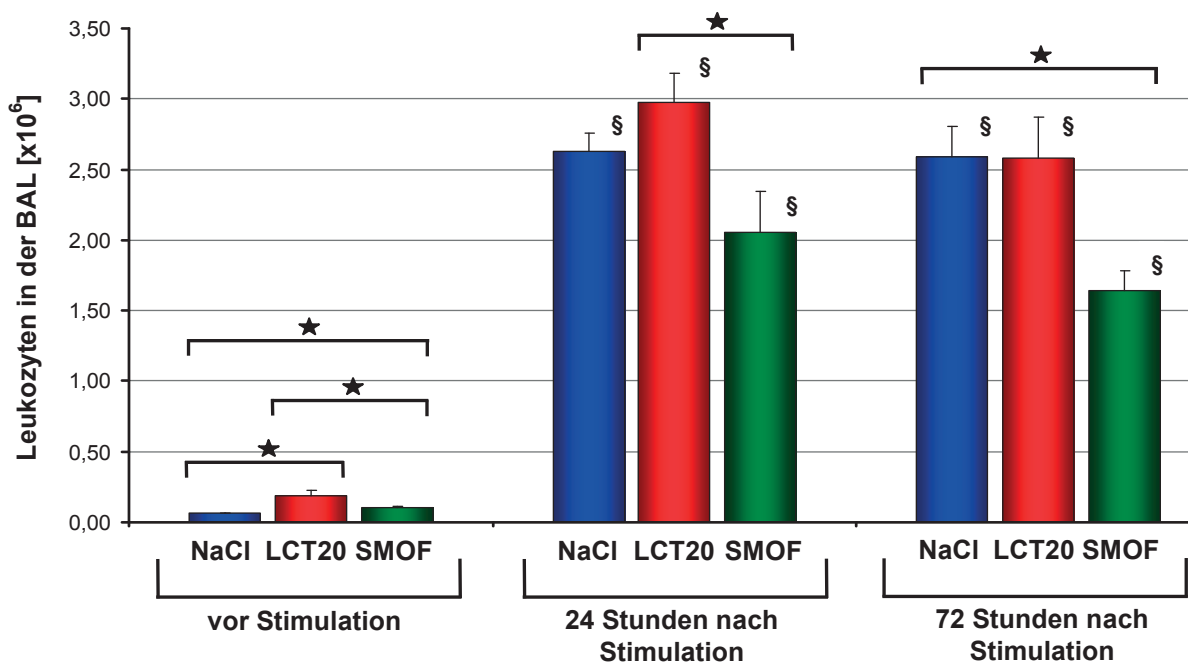


Abb. 12 Leukozytenzahl in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für die Leukozytenzahl [$\times 10^6$] in der BAL. Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder aber mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. In der unstimulierten Gruppe wurde kein LPS intratracheal appliziert, sondern es wurde ohne Stimulation eine BAL durchgeführt. In den anderen Gruppen wurden die Mäuse mit 10 μ g LPS i.t. stimuliert. 24 oder 72 Stunden später wurde die BAL durchgeführt. Nach LPS-Stimulation steigt die Leukozytenzahl deutlich an. Gegenüber der jeweils unstimulierten Gruppe zeigt sich die Leukozytenzahl in den Gruppen mit 24- und 72-stündiger Stimulation jeweils signifikant erhöht (§; $p < 0,05$). Innerhalb der unstimulierten Gruppe unterscheiden sich die einzelnen Infusionsgruppen signifikant. Die BAL der Kontroll-Mäuse enthält die niedrigste Leukozytenzahl, in der LCT20-Gruppe finden sich demgegenüber signifikant erhöhte Zellzahlen. Die SMOF-Gruppe präsentiert im Vergleich zur LCT20-Gruppe signifikant verringerte und im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Leukozytenzahlen (★; $p < 0,05$). In den Gruppen nach 24-stündiger Stimulation mit 10 μ g LPS zeigt sich im Vergleich zur LCT20-Gruppe eine signifikant erniedrigte Zellzahl in der SMOF-Gruppe (★; $p < 0,05$). In der Gruppe mit 72-stündiger Stimulation findet sich eine signifikant verringerte Leukozytenzahl in der SMOF-Gruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe (★; $p < 0,05$). Dargestellt sind MW \pm SEM; $n = 3-7$; Kontrollgruppe= NaCl (mit/ohne Stimulation); BAL= Broncho-alveoläre Lavage; NaCl= Natrium-Chlorid-Lösung; LCT20= Lipovenös® 20%; SMOF= SMOFlipid®; LPS= Lipopolysaccharid; i.t.= intratracheal; MW= Mittelwert; SEM= Standardabweichung des Mittelwertes.

3.3.1.2 Leukozyten-Differenzierung

Um einen prozentualen Überblick über die verschiedenen Leukozyten-Populationen (Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten) der BAL und damit rückschliessend auch der Lungen-Alveolen zu erhalten, wurden die Leukozyten auf einen Objektträger aufgebracht, angefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

a) *Monozyten / Makrophagen*

In der Kontrollgruppe wurde in der unstimulierten Lunge ein Monozyten-/ Makrophagen-Anteil von $94,6 \pm 0,8$ % in der broncho-alveolären Lavage gefunden (n=7). Bei den Kontrolltieren, welche mit $10\mu\text{g}$ LPS stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert wurden, kam es zum signifikanten Abfall des prozentualen Anteils auf $4,7 \pm 0,3$ % (n=7; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation fand sich in der NaCl-Gruppe ein Monozyten-/ Makrophagen-Anteil von $17,0 \pm 1,5$ % (n=7). Dieser Anteil war im Vergleich zur unstimulierten Gruppe signifikant vermindert, im Vergleich zur Gruppe mit 24-stündiger Stimulation jedoch signifikant erhöht (jeweils $p < 0,05$).

In der unstimulierten Tierversuchsgruppe, welche mit LCT20 infundiert wurde, lag der Monozyten-/ Makrophagen-Anteil bei $92,2 \pm 1,9$ % (n=4). Nach Instillation von $10\mu\text{g}$ LPS und 24-stündiger Stimulation, sank der Anteil signifikant auf $5,7 \pm 0,2$ % (n=5; $p < 0,05$). Mäuse, welche mit LCT20 infundiert und über 72 Stunden stimuliert wurden, zeigten einen Monozyten-/ Makrophagen-Anteil von $25,2 \pm 1,8$ % (n=4), was ebenfalls einem signifikanten Abfall im Vergleich zur unstimulierten Gruppe ($p < 0,05$) und einem signifikanten Anstieg im Vergleich zur Gruppe mit 24-stündiger Stimulation ($p < 0,05$) entsprach.

Bei Mäusen, die mit SMOF als Lipidemulsion infundiert wurden, fanden sich in der unstimulierten Gruppe $94,0 \pm 1,2$ % Monozyten/Makrophagen (n=4). Versuchstiere, denen $10\mu\text{g}$ LPS intratracheal instilliert und welche 24 Stunden später lavagiert wurden, wiesen einen signifikant verminderten Monozyten-/ Makrophagen-Anteil von $6,2 \pm 0,9$ % auf (n=4; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation lag der Anteil bei $23,1 \pm 1,8$ % (n=3). Dieser war im Vergleich zur unstimulierten Gruppe signifikant vermindert, im Vergleich zur Gruppe mit 24-stündiger Stimulation signifikant erhöht (jeweils $p < 0,05$).

Bei den unstimulierten Versuchstieren gab es zwischen den verschiedenen Infusionsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Monozyten-/ Makrophagen-Anteils.

Auch in der Versuchsgruppe mit Instillation von 10µg LPS und 24-stündiger Stimulation, gab es keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Infusionsgruppen.

Bei den Versuchstieren, welche mit 10µg LPS stimuliert und nach 72 Stunden lavagiert worden sind, zeigte die Kontrollgruppe mit NaCl-Infusion den niedrigsten Monozyten-/ Makrophagen-Anteil. Demgegenüber war der Monozyten-/ Makrophagen-Anteil bei den mit LCT20 und bei den mit SMOF infundierten Mäusen jeweils signifikant erhöht (jeweils $p < 0,05$).

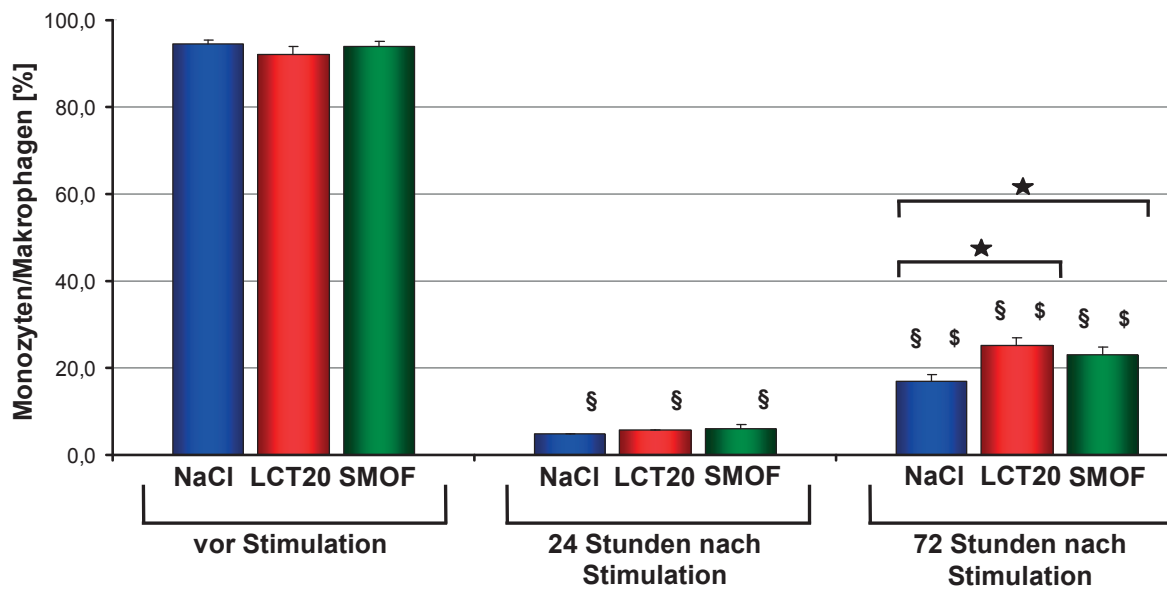


Abb. 13 Anteil der Monozyten/Makrophagen in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit $10\mu\text{g}$ LPS

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für den Monozyten-/Makrophagen-Anteil [in %] in der BAL. Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder aber mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. In der unstimulierten Gruppe wurde kein LPS intratracheal appliziert, sondern es wurde ohne Stimulation eine BAL durchgeführt. In den anderen Gruppen wurden die Mäuse mit $10\mu\text{g}$ LPS i.t. stimuliert. 24 oder 72 Stunden später wurde die BAL durchgeführt. Nach LPS-Stimulation sinkt der Anteil an Monozyten/Makrophagen. Gegenüber der jeweils unstimulierten Gruppe zeigt sich der Anteil in den Gruppen nach 24- und 72-stündiger Stimulation jeweils signifikant vermindert (§; $p < 0,05$). Gegenüber der Gruppe mit 24-stündiger Stimulation ist der Monozyten-/Makrophagen-Anteil in der Gruppe mit 72-stündiger Stimulation jeweils signifikant erhöht (§; $p < 0,05$). In der unstimulierten Gruppe sowie nach 24 Stunden Stimulation finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionsgruppen. In der Gruppe nach 72-stündiger Stimulation zeigt die BAL der Kontrollgruppe den niedrigsten Monozyten-/Makrophagen-Anteil. Demgegenüber ist der Anteil in der LCT20- und in der SMOF-Gruppe jeweils signifikant erhöht (★; $p < 0,05$). Dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$; $n = 3-7$; Kontrollgruppe = NaCl (mit/ohne Stimulation); BAL = Broncho-alveoläre Lavage; NaCl = Natrium-Chlorid-Lösung; LCT20 = Lipovenös® 20%; SMOF = SMOFlipid®; LPS = Lipopolysaccharid; i.t. = intratracheal; MW = Mittelwert; SEM = Standardabweichung des Mittelwertes.

b) Neutrophile Granulozyten

Bei den Kontrolltieren, welche mit NaCl infundiert wurden, fanden sich in der unstimulierten Gruppe keine neutrophilen Granulozyten (n=7). Mäuse, die mit 10µg LPS stimuliert und nach 24 Stunden lavagiert wurden, zeigten einen signifikant erhöhten Granulozyten-Anteil von $93,4 \pm 0,4$ % (n=7; $p < 0,05$). Nach 72 Stunden Stimulation fand sich in der Kontrollgruppe ein Anteil von $76,7 \pm 1,7$ % (n=7). Dieser prozentuale Anteil war im Vergleich zur unstimulierten Gruppe signifikant erhöht, im Vergleich zur Gruppe mit 24-stündiger Stimulation jedoch signifikant vermindert (jeweils $p < 0,05$).

Mäuse, welche mit LCT20 infundiert wurden, zeigten in der unstimulierten Lunge keine neutrophilen Granulozyten (n=4). Nach 24-stündiger Stimulation mit 10µg LPS stieg dieser signifikant auf $92,0 \pm 0,4$ % (n=5; $p < 0,05$). Tiere, die mit LCT20 infundiert und über 72 Stunden stimuliert wurden, zeigten einen Granulozyten-Anteil von $63,2 \pm 2,2$ % (n=4). Dieser war im Vergleich zur unstimulierten Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$), im Vergleich zur Gruppe mit 24 Stunden Stimulation signifikant vermindert ($p < 0,05$).

In der Tierversuchsgruppe, welche mit SMOF infundiert wurde, fanden sich bei den unstimulierten Mäusen keine neutrophilen Granulozyten (n=4). Nach Instillation von 10µg LPS und 24 Stunden Stimulation, stieg der Anteil signifikant auf $92,0 \pm 1,1$ % (n=4; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation lag der Anteil bei $67,1 \pm 1,8$ % (n=3) und war somit im Vergleich zur unstimulierten Gruppe signifikant erhöht und im Vergleich zur Gruppe mit 24-stündiger Stimulation signifikant vermindert (jeweils $p < 0,05$).

Bei den unstimulierten Versuchstieren gab es zwischen den verschiedenen Infusionsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Anteils an neutrophilen Granulozyten.

Auch in der Versuchsgruppe mit intratrachealer Instillation von 10µg LPS und 24 Stunden Stimulation, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Infusionsgruppen.

Bei den Mäusen, die mit 10µg LPS stimuliert und nach 72 Stunden lavagiert worden sind, zeigte die Kontrollgruppe den höchsten Granulozyten-Anteil. Demgegenüber war der Anteil bei den mit LCT20 und bei den mit SMOF infundierten Mäusen jeweils signifikant vermindert (jeweils $p < 0,05$).

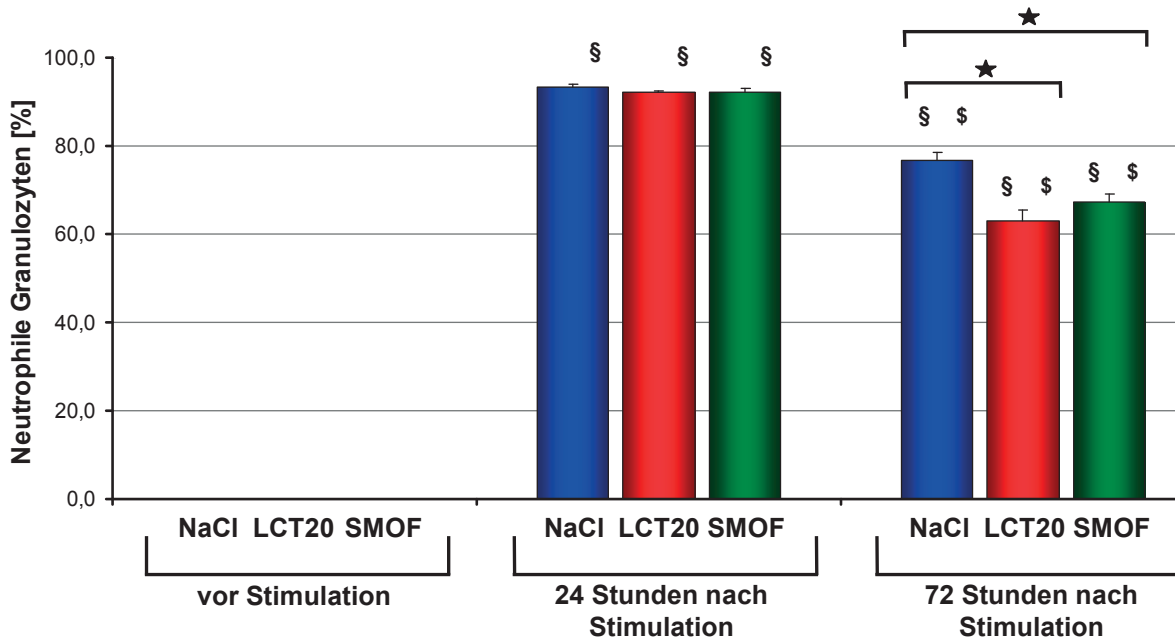


Abb. 14 Anteil der neutrophilen Granulozyten in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit $10\mu\text{g}$ LPS

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für den Anteil an neutrophilen Granulozyten [in %] in der BAL. Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder aber mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. In der unstimulierten Gruppe wurde kein LPS intratracheal appliziert, sondern es wurde ohne Stimulation eine BAL durchgeführt. In den anderen Gruppen wurden die Mäuse mit $10\mu\text{g}$ LPS i.t. stimuliert. 24 oder 72 Stunden später wurde die BAL durchgeführt. Nach LPS-Stimulation steigt der Anteil an neutrophilen Granulozyten. Gegenüber der jeweils unstimulierten Gruppe zeigt sich der Anteil in den Gruppen nach 24- und 72-stündiger Stimulation jeweils signifikant erhöht (§; $p < 0,05$). Gegenüber der Gruppe mit 24-stündiger Stimulation ist der Neutrophilen-Anteil in der Gruppe mit 72-stündiger Stimulation jeweils signifikant vermindert (§; $p < 0,05$). Innerhalb der unstimulierten Gruppe sowie nach 24 Stunden Stimulation finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionsgruppen. In der Gruppe nach 72-stündiger Stimulation enthält die BAL der Kontrollgruppe den höchsten Granulozyten-Anteil. Demgegenüber ist der Anteil in der LCT20- und in der SMOF-Gruppe jeweils signifikant vermindert (★; $p < 0,05$). Dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$; $n = 3-7$; Kontrollgruppe= NaCl (mit/ohne Stimulation); BAL= Bronchoalveoläre Lavage; NaCl= Natrium-Chlorid-Lösung; LCT20= Lipovenös®20%; SMOF= SMOFlipid®; LPS= Lipopolysaccharid; i.t.= intratracheal; MW= Mittelwert; SEM= Standardabweichung des Mittelwertes.

c) Lymphozyten

Mit NaCl infundierte Kontrolltiere zeigten in der unstimulierten Mausgruppe einen Lymphozyten-Anteil von $5,4 \pm 0,8$ % (n=7). Nach Stimulation mit $10\mu\text{g}$ LPS und Lavage nach 24 Stunden, sank der Anteil signifikant auf $1,9 \pm 0,3$ % (n=7; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation stieg er auf $6,3 \pm 0,6$ % (n=7). Dieser prozentuale Anteil zeigte im Vergleich zur unstimulierten Gruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied. Im Vergleich zur Gruppe mit 24-stündiger Stimulation war der Anteil jedoch signifikant erhöht ($p < 0,05$).

In der mit LCT20 als Lipidemulsion infundierten Mausgruppe fand sich in der unstimulierten Lunge ein Lymphozyten-Anteil von $7,8 \pm 1,9$ % (n=4). Mäuse, die mit $10\mu\text{g}$ LPS 24 Stunden lang stimuliert wurden, zeigten einen Anteil von $2,3 \pm 0,4$ % (n=5), was im Vergleich zur unstimulierten Gruppe signifikant vermindert war ($p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation stieg der Lymphozyten-Anteil auf $11,7 \pm 0,9$ % (n=4). Dieser war sowohl im Vergleich zur unstimulierten Gruppe, als auch im Vergleich zur Gruppe mit 24 Stunden Stimulation signifikant erhöht (jeweils $p < 0,05$).

Mit SMOF infundierte Versuchstiere zeigten in der unstimulierten Lunge einen Lymphozyten-Anteil von $6,0 \pm 1,2$ % (n=4). Nach intratrachealer Gabe von $10\mu\text{g}$ LPS und 24 Stunden Stimulation, sank der prozentuale Anteil signifikant auf $1,8 \pm 0,4$ % (n=4; $p < 0,05$). Nach Gabe von $10\mu\text{g}$ LPS und 72 Stunden Stimulation, stieg der Lymphozyten-Anteil auf $9,7 \pm 0,9$ (n=3) und zeigte im Vergleich zur unstimulierten Gruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied. Im Vergleich zur Gruppe mit 24-stündiger Stimulation war der Anteil jedoch signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Bei den unstimulierten Versuchsmäusen gab es zwischen den verschiedenen Infusionsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Lymphozyten-Anteils.

Auch in den Versuchsgruppen mit Instillation von $10\mu\text{g}$ LPS und 24-stündiger sowie 72-stündiger Stimulation, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Infusionsgruppen.

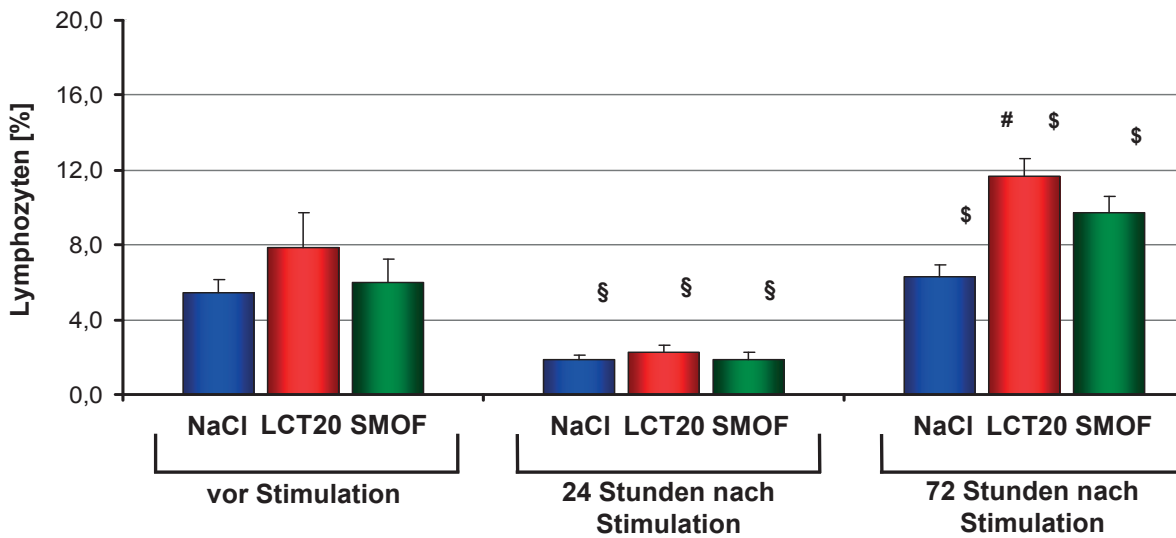


Abb. 15 Anteil der Lymphozyten in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für den Anteil an Lymphozyten [in %] in der BAL. Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder aber mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. In der unstimulierten Gruppe wurde kein LPS intratracheal appliziert, sondern es wurde ohne Stimulation eine BAL durchgeführt. In den anderen Gruppen wurden die Mäuse mit 10 μ g LPS i.t. stimuliert. 24 oder 72 Stunden später wurde die BAL durchgeführt. Gegenüber der jeweils unstimulierten Gruppe zeigt sich der Lymphozyten-Anteil in der Gruppe nach 24-stündiger Stimulation jeweils signifikant vermindert (§; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation steigt der Anteil wieder. Gegenüber der Gruppe mit 24-stündiger Stimulation ist der Lymphozytenanteil in der Gruppe mit 72-stündiger Stimulation jeweils signifikant erhöht (§; $p < 0,05$). Gegenüber der unstimulierten Gruppe zeigt sich der Anteil in der Gruppe nach 72-stündiger Stimulation lediglich unter LCT20-Infusion signifikant erhöht (#; $p < 0,05$). Sowohl in der unstimulierten Gruppe, als auch in den Gruppen mit 24- und 72-stündiger Stimulation finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionsgruppen. Dargestellt sind MW \pm SEM; n= 3-7; Kontrollgruppe= NaCl (mit/ohne Stimulation); BAL= Broncho-alveoläre Lavage; NaCl= Natrium-Chlorid-Lösung; LCT20= Lipovenös[®]20%; SMOF= SMOF[®]lipid[®]; LPS= Lipopolysaccharid; i.t.= intratracheal; MW= Mittelwert; SEM= Standardabweichung des Mittelwertes.

d) Vergleich der Leukozyten-Populationen

Beim Vergleich der verschiedenen Leukozyten-Populationen (Anteil an Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten) innerhalb einer Tierversuchsgruppe fand sich jeweils ein typisches Populations-Verteilungsmuster. Exemplarisch für die Verschiebung des Verteilungsprofils bei unstimulierten und stimulierten Tieren, soll hier die Kontrollgruppe dargestellt werden:

Unstimulierte Kontrollmäuse zeigten in der BAL einen Monozyten-/ Makrophagen-Anteil von $94,6 \pm 0,8$ %, einen Granulozyten-Anteil von $0,0 \pm 0,0$ % und einen Lymphozyten-Anteil von $5,4 \pm 0,8$ %. Nach intratrachealer Instillation von $10\mu\text{g}$ LPS und 24 Stunden Stimulation kam es zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten mit entsprechender Veränderung des Populationsverhältnisses. So fanden sich in der Kontrollgruppe ein Monozyten-/ Makrophagen-Anteil von $4,7 \pm 0,3$ %, ein Granulozyten-Anteil von $93,4 \pm 0,4$ % und ein Lymphozyten-Anteil von $1,9 \pm 0,3$ %. Nach intratrachealer Gabe von $10\mu\text{g}$ LPS und 72-stündiger Stimulation änderte sich das Populationsprofil, indem der Anteil an neutrophilen Granulozyten zugunsten von Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten sank. Es zeigte sich in der Kontrollgruppe ein Monozyten-/ Makrophagen-Anteil von $17,0 \pm 1,5$ %, ein Granulozyten-Anteil von $76,7 \pm 1,7$ % und ein Lymphozyten-Anteil von $6,3 \pm 0,6$ %.

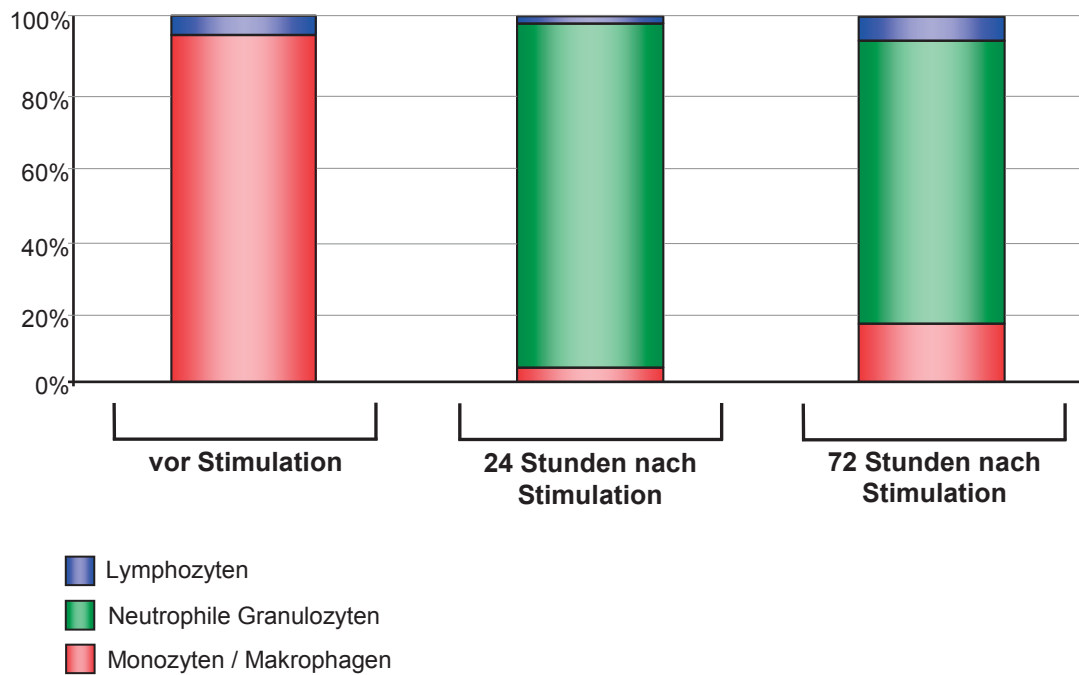


Abb. 16 Leukozyten-Differenzierung in der BAL; NaCl-Gruppe vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Leukozyten-Differenzierung [Anteil an Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten in %] in der Kontrollgruppe in der BAL. Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang mit NaCl-Lösung infundiert. In der unstimulierten Gruppe wurde kein LPS intratracheal appliziert, sondern es wurde ohne Stimulation eine BAL durchgeführt. In den anderen Gruppen wurden die Mäuse mit 10 μ g LPS i.t. stimuliert. 24 oder 72 Stunden später wurde die BAL durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils 7 Lavagen. BAL= broncho-alveoläre Lavage; NaCl= Natrium-Chlorid-Lösung; LPS= Lipopolysaccharid; i.t.= intratracheal.

Die beschriebene stimulationsbedingte Verschiebung des Verteilungsprofils zwischen Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, war in den verschiedenen Infusionsgruppen (SMOF, LCT20) vergleichbar.

3.3.2 Neutrophile Granulozyten im Interstitium der Lunge

Die im Rahmen der akuten Lungenentzündung aus dem pulmonalen Gefäßbett in das Interstitium der Lunge eingewanderten neutrophilen Granulozyten konnten mithilfe des Myeloperoxidase-Aktivitäts-Assays bestimmt werden. Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein wichtiges, im Rahmen einer Entzündungsreaktion von Neutrophilen gebildetes Enzym. Daher wird die MPO-Aktivität [in Units/g Gewebe = U/g] in der Lunge als Marker für die Rekrutierung bzw. Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe genutzt.

Die Versuchstiere wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrolle, oder mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. Im Anschluss wurden bei einem Teil der Versuchsmäuse 10µg LPS intratracheal appliziert. Nach 24 oder 72 Stunden Stimulation wurde jeweils die MPO-Aktivität bestimmt.

Bei der Kontrollgruppe wurde in der unstimulierten Lunge eine MPO-Aktivität von $1,8 \pm 0,2$ U/g (n=7) gemessen. Bei den mit 10µg LPS stimulierten Kontrollmäusen, bei denen die MPO-Aktivität nach 24-stündiger Stimulation bestimmt wurde, kam es zum signifikanten Anstieg der Aktivität auf $16,6 \pm 1,2$ U/g (n=7; $p < 0,05$). Nach 72 Stunden Stimulation lag der Wert in der NaCl-Gruppe bei $8,8 \pm 0,3$ U/g (n=7) und war somit im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe signifikant erhöht, verglichen mit der Aktivität nach 24-stündiger Stimulation signifikant vermindert (jeweils $p < 0,05$).

In der unstimulierten Versuchsgruppe mit LCT20 als infundierte Lipidemulsion, fand sich eine MPO-Aktivität von $2,9 \pm 0,3$ U/g (n=4). Nach Instillation von 10µg LPS und 24-stündiger Stimulation, stieg die Aktivität signifikant auf $15,9 \pm 1,0$ U/g (n=5; $p < 0,05$). Mäuse, die mit LCT20 infundiert und 72 Stunden lang stimuliert wurden, zeigten einen Wert von $12,3 \pm 0,9$ U/g (n=4). Dieser war im Vergleich zur unstimulierten Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$), im Vergleich zur 24-stündigen Stimulation jedoch signifikant vermindert ($p < 0,05$).

Mit SMOF infundierte Mäuse ergaben in der unstimulierten Gruppe eine Aktivitätsmessung von $2,2 \pm 0,3$ U/g (n=4). Bei solchen, die 24 Stunden nach LPS-Stimulation ausgewertet wurden, stieg die Aktivität signifikant auf $8,6 \pm 1,1$ U/g (n=4; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation lag der Wert bei $7,6 \pm 0,4$ U/g (n=3). Diese Messung war im Vergleich zur unstimulierten SMOF-Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$), mit der Gruppe mit 24-stündiger Stimulation allerdings vergleichbar ohne signifikante Änderung.

Bei den unstimulierten Versuchstieren fanden sich zwischen den verschiedenen Infusionsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der MPO-Aktivität.

In der Versuchsgruppe mit Instillation von 10 μ g LPS und 24-stündiger Stimulation, konnte sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch im Vergleich zur LCT20-Gruppe eine signifikant erniedrigte MPO-Aktivität in der SMOF-Gruppe nachgewiesen werden (jeweils $p < 0,05$).

Mäuse, welche mit 10 μ g LPS stimuliert und nach 72 Stunden Stimulation ausgewertet wurden, zeigten die höchste MPO-Aktivität in der LCT20-Gruppe. Demgegenüber war die Aktivität sowohl in der NaCl-, als auch in der SMOF-Gruppe signifikant vermindert (jeweils $p < 0,05$).

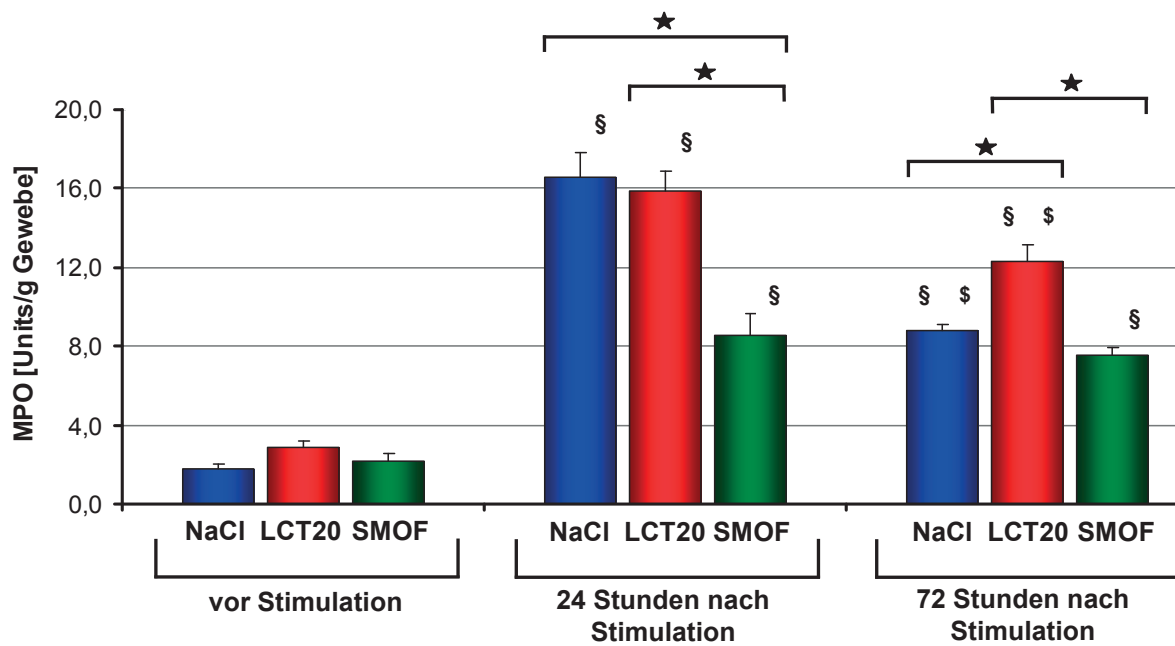


Abb. 17 MPO-Aktivität im Lungeninterstitium vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für die MPO-Aktivität [in Units/g Gewebe] als Marker für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe. Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder aber mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. In der unstimulierten Gruppe wurde kein LPS intratracheal appliziert, sondern es wurde ohne Stimulation die MPO-Aktivität gemessen. In den anderen Gruppen wurden die Mäuse mit 10 μ g LPS i.t. stimuliert. 24 oder 72 Stunden später wurde die MPO-Aktivität gemessen. Nach LPS-Stimulation steigt die MPO-Aktivität an. Gegenüber der jeweils unstimulierten Gruppe zeigt sich die Aktivität in der Gruppe nach 24- und 72-stündiger Stimulation jeweils signifikant erhöht (§; $p < 0,05$). Gegenüber der Gruppe mit 24-stündiger Stimulation zeigt sich die MPO-Aktivität in der Gruppe mit 72-stündiger Stimulation unter NaCl- und LCT20-Infusion signifikant vermindert (§; $p < 0,05$). Innerhalb der unstimulierten Gruppe finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionsgruppen. In der Gruppe nach 24-stündiger Stimulation zeigt sich sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch im Vergleich zur LCT20-Gruppe eine signifikant erniedrigte MPO-Aktivität in der SMOF-Gruppe (★; $p < 0,05$). Innerhalb der Gruppe mit 72-stündiger Stimulation zeigt sich die höchste MPO-Aktivität in der LCT20-Gruppe. Demgegenüber ist die Aktivität in der Kontroll- und in der SMOF-Gruppe jeweils signifikant vermindert (★; $p < 0,05$). Dargestellt sind MW \pm SEM; n= 3-7; Kontrollgruppe= NaCl (mit/ohne Stimulation); MPO= Myeloperoxidase; NaCl= Natrium-Chlorid-Lösung; LCT20= Lipovenös®20%; SMOF= SMOFlipid®; LPS= Lipopolysaccharid; i.t.= intratracheal; MW= Mittelwert; SEM= Standardabweichung des Mittelwertes.

3.4 Permeabilität der Lungengefäße und alveoläre Protein-Konzentration

Entzündlich gesteigerte Gefäßpermeabilität der Lungen-Kapillaren und gestörte alveolo-kapilläre Barrierefunktion führen zu vermehrtem Einstrom von Proteinen und Flüssigkeit in die Alveolen. Die erhöhte alveoläre Protein-Konzentration (in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) konnte in der broncho-alveolären Lavage (BAL) gemessen werden.

Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. Im Anschluss daran wurde ein Teil der Versuchstiere durch intratracheale Applikation von $10\mu\text{g}$ LPS stimuliert. Nach 24- oder 72-stündiger Stimulation wurde die BAL durchgeführt.

Bei Mäusen, welche mit NaCl-Lösung (Kontrollgruppe) infundiert wurden, fand sich in der unstimulierten Gruppe eine alveoläre Protein-Konzentration von $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n=7$). Nach Stimulation mit $10\mu\text{g}$ LPS über 24 Stunden stieg der Wert signifikant auf $0,87 \pm 0,09 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n=7$; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation lag die Konzentration bei $0,50 \pm 0,03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n=7$) und war somit im Vergleich zur unstimulierten Gruppe signifikant erhöht, verglichen mit der 24-stündigen Stimulation jedoch signifikant vermindert (jeweils $p < 0,05$).

Mit der Lipidemulsion LCT20 infundierte Versuchstiere, welche nicht stimuliert wurden, wiesen eine Protein-Konzentration von $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n=4$) auf. Diese stieg nach 24 Stunden Stimulation signifikant auf einen Wert von $0,84 \pm 0,17 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n=5$; $p < 0,05$). Nach 72 Stunden Stimulation mit $10\mu\text{g}$ LPS sank der Wert auf $0,58 \pm 0,03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n=4$) und war verglichen mit der unstimulierten Gruppe weiterhin signifikant erhöht ($p < 0,05$), wohingegen der Unterschied zur Gruppe mit 24-stündlicher Stimulation nicht signifikant war.

Bei den Versuchstieren, die mit SMOF infundiert wurden, konnte in der unstimulierten Gruppe eine alveoläre Protein-Konzentration von $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n=4$) ermittelt werden. Infolge intratrachealer LPS-Instillation stieg die Konzentration nach 24 Stunden Stimulation auf $0,39 \pm 0,07 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n=4$) und nach 72 Stunden Stimulation auf $0,47 \pm 0,03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($n=3$). Diese Werte waren jeweils statistisch signifikant erhöht im Vergleich zur unstimulierten Mausgruppe (jeweils $p < 0,05$), untereinander jedoch vergleichbar ohne signifikante Änderung.

Bei den unstimulierten Versuchstieren fanden sich zwischen den verschiedenen Infusionsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der alveolären Protein-Konzentration.

In der Gruppe mit 24-stündiger Stimulation mit LPS zeigten alle Infusionsgruppen statistisch signifikante Unterschiede zueinander. Die Kontroll-Mäuse, welche mit NaCl infundiert wurden, zeigten die höchste Protein-Konzentration. Bei den mit LCT20 infundierten Tieren fand sich demgegenüber eine signifikant verminderte Konzentration ($p < 0,05$). Die Mäuse aus der SMOF-Gruppe zeigten sowohl im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, als auch im Vergleich zur LCT20-Gruppe eine signifikant verminderte alveoläre Protein-Konzentration (jeweils $p < 0,05$).

Bei den über 72 Stunden stimulierten Versuchstieren fanden sich zwischen den verschiedenen Infusionsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der alveolären Protein-Konzentration.

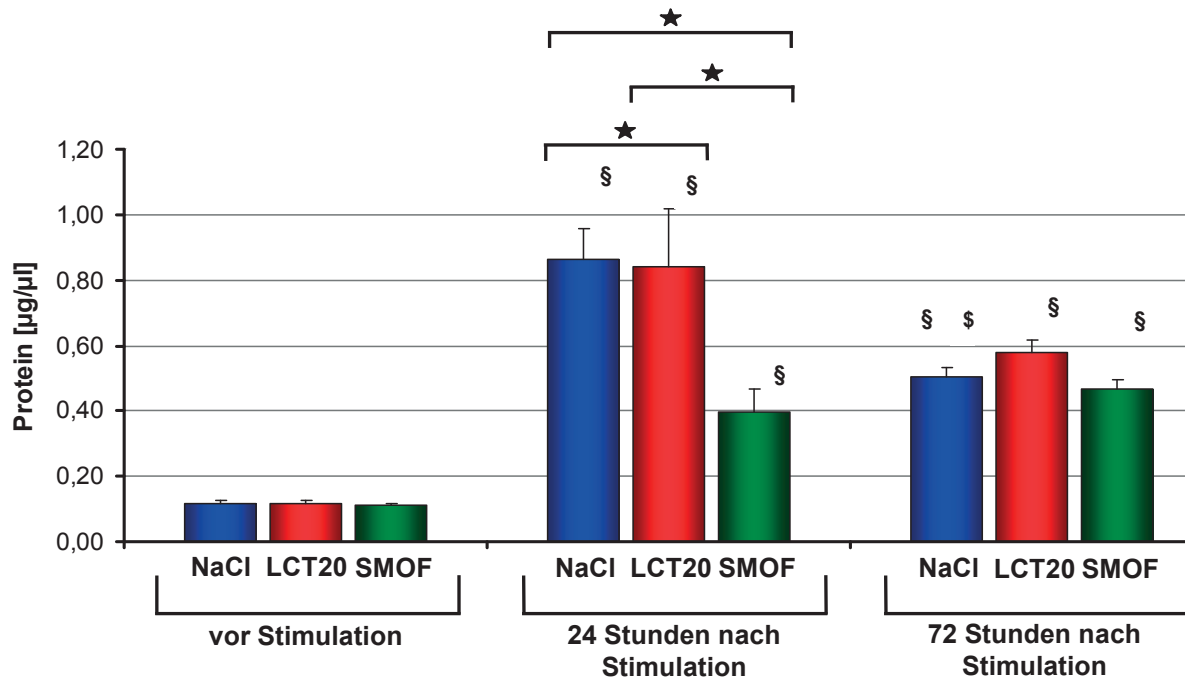


Abb. 18 Protein-Konzentration in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10µg LPS

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für die Protein-Konzentration [in µg/µl] in der BAL als Marker der pulmonalen Gefäßpermeabilität und der alveolo-kapillären Barrierefunktion. Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. In der unstimulierten Gruppe wurde kein LPS intratracheal appliziert, sondern es wurde ohne Stimulation die Protein-Konzentration bestimmt. In den anderen Gruppen wurden die Mäuse mit 10µg LPS i.t. stimuliert. 24 oder 72 Stunden später wurde die Protein-Konzentration ermittelt. Nach LPS-Stimulation kommt es zum Anstieg der Proteinkonzentration. Gegenüber der jeweils unstimulierten Gruppe zeigt sich die Konzentration in der Gruppe mit 24- und 72-stündiger Stimulation jeweils signifikant erhöht (§; $p < 0,05$). Gegenüber der Gruppe nach 24-stündiger Stimulation zeigt sich die Proteinkonzentration in der Gruppe nach 72-stündiger Stimulation unter der NaCl-Infusion signifikant vermindert (§; $p < 0,05$). Innerhalb der unstimulierten Gruppe sowie nach 72 Stunden Stimulation finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionsgruppen. In der Gruppe mit 24-stündiger Stimulation enthält die BAL der Kontrollgruppe die höchste Protein-Konzentration. Demgegenüber präsentiert die LCT20-Gruppe eine signifikant verminderte Konzentration. Die SMOF-Gruppe zeigt im Vergleich zur Kontroll- und LCT20-Gruppe eine signifikant verminderte Protein-Konzentration (★; $p < 0,05$). Dargestellt sind $MW \pm SEM$; $n=3-7$; Kontrollgruppe= NaCl (mit/ohne Stimulation); BAL= broncho-alveoläre Lavage; NaCl= Natrium-Chlorid-Lösung; LCT20= Lipovenös®20%; SMOF= SMOf lipid®; LPS= Lipopolysaccharid; i.t.= intratracheal; MW= Mittelwert; SEM= Standardabweichung des Mittelwertes.

3.5 Alveoläre Konzentration proinflammatorischer Zytokine

Die entzündlichen Prozesse in der Lunge führen zum Anstieg der alveolären Zytokin-Konzentration. In der vorliegenden Arbeit wurden die proinflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α) und Makrophagen Inflammatorisches Protein-2 (MIP-2) bestimmt. Die erhöhte alveoläre Konzentration von TNF- α und MIP-2 (in pg/ml) konnte in der broncho-alveolären Lavage (BAL) gemessen werden. Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder aber mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. Daraufhin erfolgte bei einem Teil der Mäuse die Stimulation über intratracheale Instillation von 10 μ g LPS. Nach 24 oder 72 Stunden Stimulation wurde die BAL durchgeführt.

3.5.1 Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α)

In der NaCl-Gruppe wurde in der unstimulierten Lunge eine TNF- α -Konzentration von 57 ± 8 pg/ml (n=7) in der BAL gefunden. Diese stieg nach 24-stündiger Stimulation mit LPS signifikant auf 374 ± 13 pg/ml (n=7; $p < 0,05$). In der Kontroll-Gruppe, in der die Lavage nach 72 Stunden Stimulation durchgeführt wurde, sank der Gehalt in der BAL, verglichen mit der 24-stündigen Stimulation, signifikant auf 81 ± 15 pg/ml (n=7; $p < 0,05$).

In der Versuchsgruppe, welche mit LCT20 infundiert und nicht stimuliert wurde, lag die alveoläre Konzentration an TNF- α bei 81 ± 16 pg/ml (n=4). Infolge LPS-Applikation und 24-stündiger Stimulation stieg die Konzentration signifikant auf 377 ± 34 pg/ml (n=5; $p < 0,05$). Nach Stimulation über 72 Stunden kam es zum Abfall der TNF- α -Menge auf 31 ± 5 pg/ml (n=4). Dieser Wert war sowohl im Vergleich zur unstimulierten Gruppe, als auch zur Gruppe mit 24-stündiger Stimulation signifikant vermindert (jeweils $p < 0,05$).

Bei Mäusen, die mit SMOF als Lipidemulsion infundiert wurden, fand sich in der unstimulierten Gruppe ein alveolärer TNF- α -Gehalt von 42 ± 7 pg/ml (n=4). Versuchstiere, denen 10 μ g LPS intratracheal instilliert und welche 24 Stunden später lavagiert wurden, wiesen einen signifikant erhöhten Wert von 224 ± 16 pg/ml (n=4; $p < 0,05$) auf. Nach 72-stündiger Stimulation lag der Gehalt bei 19 ± 2 pg/ml (n=3). Verglichen mit der unstimulierten und mit der 24 Stunden stimulierten Gruppe, war diese Konzentration signifikant reduziert (jeweils $p < 0,05$).

Beim Vergleich der verschiedenen Infusionsgruppen untereinander, zeigte sich die TNF- α -Konzentration bei den unstimulierten Versuchsmäusen in der SMOF-Gruppe signifikant vermindert im Vergleich zur LCT20-Gruppe ($p < 0,05$).

Nach Instillation von 10 μ g LPS und 24-stündiger Stimulation war die Zytokinkonzentration in der SMOF-Gruppe signifikant vermindert im Vergleich zur LCT20-Gruppe und auch im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (jeweils $p < 0,05$).

Bei den 72 Stunden lang stimulierten Versuchstieren zeigten alle Infusionsgruppen statistisch signifikante Unterschiede zueinander. Die Kontroll-Mäuse, welche mit NaCl infundiert wurden, zeigten die höchste TNF- α -Konzentration in der BAL. Bei Tieren, die mit LCT20 infundiert wurden, fand sich demgegenüber eine signifikant verminderte Konzentration ($p < 0,05$). Mit SMOF infundierte Tiere präsentierten sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch im Vergleich zur LCT20-Gruppe signifikant verminderte Werte (jeweils $p < 0,05$).

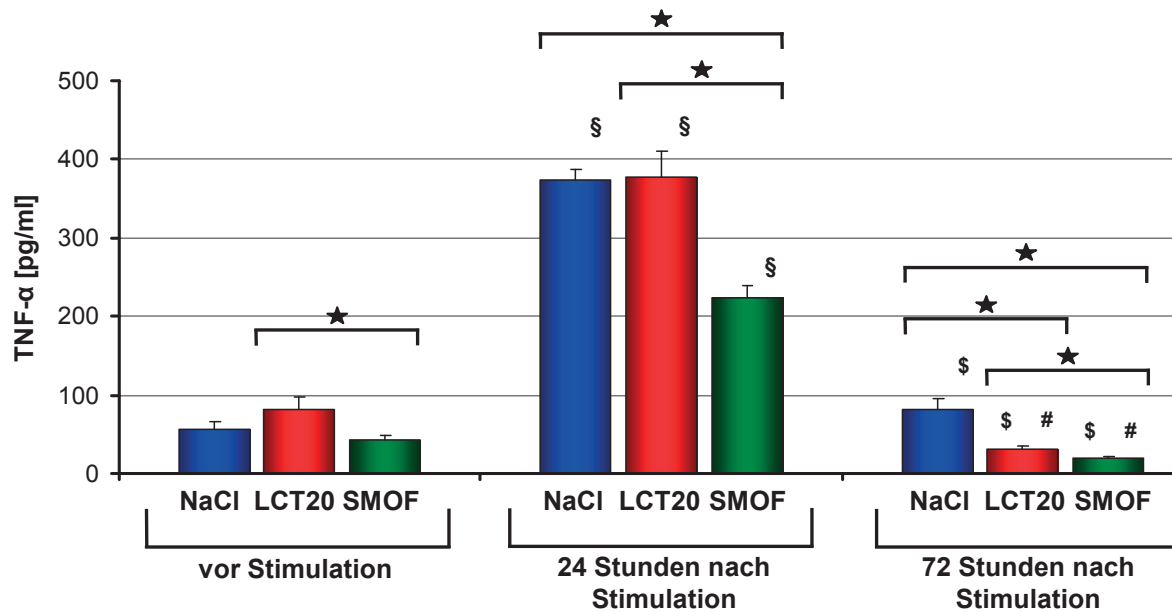


Abb. 19 *TNF- α -Konzentration in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS*

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für die TNF- α -Konzentration [in pg/ml] in der BAL. Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. In der unstimulierten Gruppe wurde kein LPS intratracheal appliziert, sondern es wurde ohne Stimulation die TNF- α -Konzentration bestimmt. In den anderen Gruppen wurden die Mäuse mit 10 μ g LPS i.t. stimuliert. 24 oder 72 Stunden später wurde die TNF- α -Konzentration ermittelt. Gegenüber der jeweils unstimulierten Gruppe zeigt sich die TNF- α -Konzentration in der Gruppe nach 24-stündiger LPS-Stimulation jeweils signifikant erhöht (§; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation sinkt die Konzentration wieder. Gegenüber der Gruppe mit 24-stündiger Stimulation zeigt sich die Konzentration in der Gruppe mit 72-stündiger Stimulation jeweils signifikant vermindert (§; $p < 0,05$). Gegenüber der unstimulierten Gruppe ist die Konzentration in der Gruppe nach 72-stündiger Stimulation unter LCT20- und SMOF-Infusion signifikant vermindert (#; $p < 0,05$). Innerhalb der unstimulierten Gruppe ist die TNF- α -Konzentration in der SMOF-Gruppe signifikant vermindert im Vergleich zur LCT20-Gruppe (★; $p < 0,05$). In der Gruppe mit 24-stündiger Stimulation ist die Konzentration in der SMOF-Gruppe signifikant vermindert im Vergleich zur LCT20- und Kontrollgruppe (★; $p < 0,05$). Innerhalb der Gruppe mit 72-stündiger Stimulation unterscheiden sich die einzelnen Infusionsgruppen signifikant. Die BAL der Kontrollgruppe enthält hier die höchste TNF- α -Konzentration, die LCT20-Gruppe zeigt demgegenüber eine signifikant verminderte Konzentration. Die SMOF-Gruppe präsentiert im Vergleich zur Kontroll- und LCT20-Gruppe signifikant verminderte Werte (★; $p < 0,05$). Dargestellt sind MW \pm SEM; $n = 3-7$; Kontrollgruppe= NaCl (mit/ohne Stimulation); TNF- α = Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha; BAL= broncho-alveoläre Lavage; NaCl= Natrium-Chlorid-Lösung; LCT20= Lipovenös®20%; SMOF= SMOFlipid®; LPS= Lipopolysaccharid; i.t.= intratracheal; MW= Mittelwert; SEM= Standardabweichung des Mittelwertes.

3.5.2 Makrophagen Inflammatorisches Protein-2 (MIP-2)

Die alveoläre MIP-2-Konzentration lag in der unstimulierten Kontrollgruppe bei 31 ± 1 pg/ml (n=7). Nach Stimulation mit LPS über 24 Stunden stieg die Konzentration signifikant auf 170 ± 11 pg/ml (n=7; $p < 0,05$). Kontroll-Mäuse, die 72 Stunden lang stimuliert wurden, zeigten einen alveolären MIP-2-Gehalt von 29 ± 12 pg/ml (n=7), was einer statistisch signifikanten Reduktion im Vergleich zur 24-Stunden-Stimulation entsprach ($p < 0,05$).

Versuchstiere, welche mit LCT20 infundiert wurden, zeigten in der unstimulierten BAL einen MIP-2-Spiegel von 41 ± 5 pg/ml (n=4). Nach intratrachealer LPS-Applikation und 24-stündiger Stimulation stieg die Konzentration signifikant auf 238 ± 17 pg/ml (n=5; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation kam es zu einem Absinken des MIP-2-Wertes auf 26 ± 6 pg/ml (n=4). Dieser war im Verhältnis zum 24-Stunden-Wert signifikant reduziert ($p < 0,05$).

Mit SMOF als Lipidemulsion infundierte Versuchsmäuse ergaben in der unstimulierten Gruppe eine MIP-2-Konzentration von 30 ± 5 pg/ml (n=4). Nach 24 Stunden LPS-Stimulation kam es zum signifikanten Anstieg auf 201 ± 31 pg/ml (n=4; $p < 0,05$). Nach Instillation von $10\mu\text{g}$ LPS und 72 Stunden Stimulation, sank der Zytokingehalt signifikant im Vergleich zur 24-Stunden-Stimulation auf einen Wert von 13 ± 2 pg/ml (n=3; $p < 0,05$).

Beim Vergleich der verschiedenen Infusionsgruppen untereinander, fanden sich bei den unstimulierten Versuchstieren keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Auch in den Versuchsgruppen mit intratrachealer Instillation von $10\mu\text{g}$ LPS und 24-stündiger sowie 72-stündiger Stimulation, gab es hinsichtlich der alveolären MIP-2-Konzentration keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Infusionsgruppen.

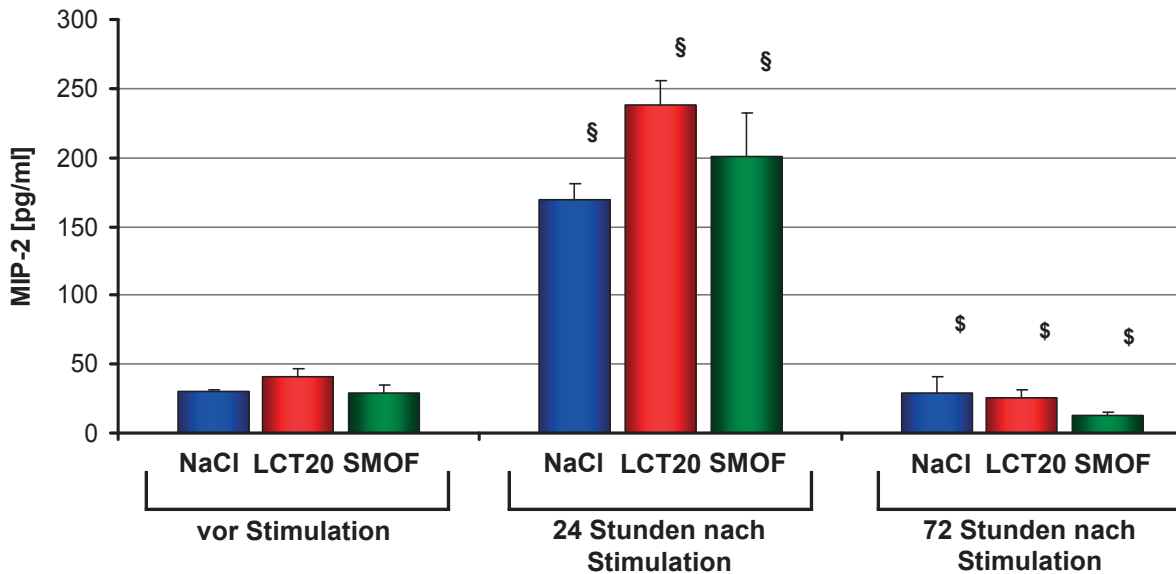


Abb. 20 MIP-2-Konzentration in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse für die MIP-2-Konzentration [in pg/ml] in der BAL. Die Versuchsmäuse wurden zwei Tage lang entweder mit NaCl-Lösung als Kontrollgruppe, oder mit den Lipidemulsionen LCT20 oder SMOF infundiert. In der unstimulierten Gruppe wurde kein LPS intratracheal appliziert, sondern es wurde ohne Stimulation die MIP-2-Konzentration bestimmt. In den anderen Gruppen wurden die Mäuse mit 10 μ g LPS i.t. stimuliert. 24 oder 72 Stunden später wurde die MIP-2-Konzentration ermittelt. Gegenüber der jeweils unstimulierten Gruppe zeigt sich die MIP-2-Konzentration in der Gruppe nach 24-stündiger Stimulation jeweils signifikant erhöht (§; $p < 0,05$). Nach 72-stündiger Stimulation sinkt die Konzentration wieder. Gegenüber der Gruppe mit 24-stündiger Stimulation zeigt sich die Konzentration in der Gruppe mit 72-stündiger LPS-Stimulation jeweils signifikant vermindert (§; $p < 0,05$). Sowohl innerhalb der unstimulierten Gruppe, als auch in den Gruppen nach 24- und 72-stündiger Stimulation finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionsgruppen. Dargestellt sind MW \pm SEM; $n = 3-7$; Kontrollgruppe= NaCl (mit/ohne Stimulation); MIP-2= Makrophagen Inflammatorisches Protein-2; BAL= broncho-alveoläre Lavage; NaCl= Natrium-Chlorid-Lösung; LCT20= Lipovenös®20%; SMOF= SMOFlipid®; LPS= Lipopolysaccharid; MW= Mittelwert; SEM= Standardabweichung des Mittelwertes.

4. Diskussion

4.1 Akute respiratorische Insuffizienz im Mausmodell

4.1.1 Charakterisierung des Mausmodells

Die vorliegende Arbeit basiert auf einem Mausmodell der LPS-induzierten, akuten respiratorischen Insuffizienz, welches von verschiedenen Arbeitsgruppen etabliert wurde. Als auslösender Stimulus der Lungenschädigung hat sich Lipopolysaccharid (LPS) bewährt. Dieses wurde initial meist intravenös oder intraperitoneal appliziert. Szarka et al. verglichen unterschiedliche Applikationswege und Endotoxin-Dosen. Sie zeigten, dass die intranasale Gabe von LPS eine stärkere Lungenschädigung hervorruft als die intravenöse Applikation derselben Dosis. Eine intranasal applizierte LPS-Dosis von 167µg/ml (10µg/Maus) verursachte dabei den maximalen Grad an pulmonaler Schädigung. Sie konnten darlegen, dass infolge intranasaler Gabe von 10µg LPS bereits nach 2-4 Stunden ein akutes Lungenversagen ausgelöst und eine maximale Schädigung nach 24-48 Stunden erreicht wurde. Bei höheren Dosen folgte eine sepsis-ähnliche Immunantwort mit Neutrophilen-Rekrutierung in andere Organe. Szarka et al. verglichen zudem unterschiedliche LPS-Typen und konnten feststellen, dass gereinigtes LPS aus *E. coli* eine stärkere Immunantwort bewirkt als ein vollständiges, jedoch hitzeabgetötetes *E. coli*-Bakterium [108]. Neben der intranasalen Applikation kann LPS auch intratracheal instilliert werden. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die intratracheale LPS-Gabe zur Ausbildung eines akuten Lungenversagens mit vermehrtem Nachweis von Leukozyten, Protein und Zytokinen in der bronchoalveolären Lavage führt [101, 106, 109].

Als weitere Auslöser einer akuten Lungenschädigung im Tiermodell wurden unter anderem Lipoteichonsäure (LTA), Pneumolysin (PLY) oder auch Salzsäure (HCl) beschrieben. LTA als Wandbestandteil gram-positiver Bakterien hatte jedoch im Gegensatz zu LPS keine systemischen und nur geringe lokale Effekte auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion [110]. PLY stellt einen wichtigen Virulenzfaktor von *Streptococcus pneumoniae* als Hauptverursacher der ambulant erworbenen Pneumonie dar. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Toxin entscheidende Charakteristika eines akuten Lungenversagens induziert, einschließlich erhöhter Gefäßpermeabilität und pulmonaler Hypertonie [111]. In Anlehnung an ein durch Aspiration von Magensäure induziertes Lungenversagen, applizierten Nagase et al. in einem Mausmodell

intratracheal HCl. Hierunter entwickelten sich ein akutes Lungenödem und eine akute Lungenschädigung mit vermehrtem Nachweis von Leukozyten und Protein in der broncho-alveolären Lavage, wobei die Überlebenszeit der Mäuse jedoch mit 2-3 Stunden stark eingeschränkt war [112].

Die Arbeitsgruppe um Mayer et al. untersuchte den Einfluss parenteral applizierter Lipidemulsionen auf ein LPS-induziertes, akutes Lungenversagen im Mausmodell in Anlehnung an die intensivmedizinische parenterale Ernährung kritisch Kranker. Durch Implantation eines zentralen Venenkatheters und mithilfe miniosmotischer Pumpen war sie in der Lage, Lipidemulsionen kontinuierlich zu infundieren. Auf diese Weise entwickelten Mayer et al. ein entsprechendes Mausmodell [101, 106, 109]. Als negativen Kritikpunkt ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass es sich bei diesem Tiermodell um ein „single-hit“-Modell handelt und dass lediglich bakterielles Endotoxin und keine Bakterien verwendet wurden. Das Endotoxin einer einzigen Bakterienart wurde nur einmalig appliziert, um eine Entzündungsantwort zu induzieren. Solch ein Modell unterscheidet sich natürlich von der klinischen Realität, da Sepsis und ARDS durch eine Vielzahl unterschiedlicher Bakterien im Sinne einer polymikrobiellen Erkrankung ausgelöst werden können [101, 106].

In der vorliegenden Arbeit wurde das akute Lungenversagen im Mausmodell anhand der alveolären Leukozyteninvasion, Proteinextravasation und Synthese der Zytokine TNF- α und MIP-2 untersucht. Zur Induktion des Lungenversagens wurde LPS als anerkannter Stimulus einmalig intratracheal appliziert, wobei die Dosis 10 μ g/Maus betrug. Die Versuchstiere wurden entweder über 24 Stunden oder über 72 Stunden stimuliert, um den Zeitverlauf der Entzündung zu beurteilen. Über einen implantierten zentralen Venenkatheter wurden die Mäuse mit einem Infusionssystem verbunden. Hierüber wurden die Lipidemulsionen „Lipovenös[®] 20%“ (reich an n-6-Fettsäuren, nachfolgend abgekürzt mit LCT20) oder „SMOFlipid[®]“ (reich an n-3-Fettsäuren, nachfolgend abgekürzt mit SMOF) im Sinne einer kontinuierlichen Infusion infundiert. Als Kontrolle diente die Infusion mit Natriumchlorid (0,9% NaCl)-Lösung. Wie unter anderem bereits von Hecker et al. [109] beschrieben, wurde auch in der vorliegenden Arbeit eine präemptive Strategie gewählt. Die Lipidemulsionen wurden hierbei zwei Tage lang bereits vor Auslösung eines akuten Lungenversagens appliziert. Diese Strategie beruht auf der Überlegung, dass Patienten, die einer parenteralen Ernährung bedürfen und einem erwarteten Trauma (z.B. Operation oder Aspiration) ausgesetzt sind, eine geeignete Lipidemulsion erhalten [109].

4.1.2 Ergebnisse der LPS-induzierten akuten respiratorischen Insuffizienz unter NaCl-Infusion

Die wichtigsten Schritte in der Entzündungskaskade im Rahmen des ARDS wurden ausführlich in den Kapiteln 1.1.3 und 1.1.4 erläutert und lassen sich auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit projizieren. In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die intratracheale Applikation von 10µg LPS ein akutes Lungenversagen auslöst. Dies konnte in der Kontrollgruppe unter NaCl-Infusion, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle, anhand der untersuchten Parameter Leukozyteninvasion, Proteinextravasation und Synthese der Zytokine TNF- α und MIP-2 (siehe **Abbildungen 12-20**) veranschaulicht werden. Die kausalen Zusammenhänge sind auch zeitlich anhand unterschiedlicher Zeitpunkte darstellbar (siehe **Abbildung 21**). So lassen sich hierbei die vorliegenden Ergebnisse mit anderen Studien ergänzen. Schaefer et al. [101] verwendeten die Zeitpunkte 0, 4 und 24 Stunden, Hecker et al. [109] setzten darüber hinaus noch den Zeitpunkt von 48 Stunden ein. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden der in diesem Zusammenhang bisher noch nicht verwendete Endzeitpunkt von 72 Stunden untersucht:

Als erste Verteidigungslinie werden die Alveolarmakrophagen durch LPS stimuliert, gemeinsam mit alveolären Epithelzellen Zytokine, vor allem TNF- α , zu sezernieren. Hierdurch werden wiederum benachbarte Alveolarzellen aktiviert. Insbesondere TNF- α fördert dabei die Produktion zahlreicher weiterer proinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. Zytokine, Chemokine (z.B. MIP-2) und Eicosanoide [54, 64, 67]. Die im Rahmen der entzündlichen Prozesse des ARDS vermehrt in den Alveolen der Lunge synthetisierten und sezernierten proinflammatorischen Zytokine TNF- α (siehe **Abbildung 19**) und MIP-2 (siehe **Abbildung 20**) konnten in der vorliegenden Arbeit in der broncho-alveolären Lavage (BAL) gemessen werden. Sowohl Schaefer et al. [101], als auch Hecker et al. [109] konnten zeigen, dass es nach intratrachealer LPS-Applikation schnell zu einem massiven Anstieg der Zytokine TNF- α und MIP-2 in der BAL kam. Ein Maximum wurde bereits 4 Stunden nach LPS-Gabe erreicht. Es folgte eine kontinuierliche und rasche Abnahme der Zytokinkonzentration in der BAL über 24 und 48 Stunden. Dieser Zeitverlauf war auch mit den vorliegenden Ergebnissen kongruent. Nach intratrachealer Gabe von LPS und 24-stündiger Stimulation stiegen die alveolären Konzentrationen von TNF- α und MIP-2 an. Nach 72 Stunden sank die Zytokin-Konzentration wieder. Zusätzlich wurde ersichtlich, dass die Zytokine nach 72 Stunden wieder die Ausgangskonzentration erreicht haben. Die Ergebnisse

veranschaulichen, dass der entzündliche Stimulus LPS zu einer adäquaten inflammatorischen Reaktion mit vermehrter Synthese proinflammatorischer Mediatoren führt, hier vertreten durch TNF- α und MIP-2.

Die nach Endotoxin-Stimulus initial rasch synthetisierten Zytokine, insbesondere TNF- α und das chemotaktisch wirkende MIP-2, aktivieren wiederum Leukozyten, vor allem neutrophile Granulozyten, die dadurch vermehrt Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Resultat ist eine Akkumulation von Leukozyten im pulmonalen Gefäßsystem und schließlich die zunehmende Rekrutierung von Leukozyten aus dem pulmonalen Gefäßbett in das Interstitium sowie nachfolgend in die Alveolen der Lunge [26, 54, 59, 67, 69]. Die in die Alveolen der Lunge eingewanderten Leukozyten wurden in dieser Arbeit mithilfe der BAL bestimmt (siehe **Abbildung 12**). Schaefer et al. [101] und Hecker et al. [109] fanden 4 Stunden nach LPS-Gabe, dem Zeitpunkt des Zytokin-*Peaks*, einen leichten Anstieg der alveolären Leukozytenzahl. Ihr Maximum war erst nach 24 Stunden erreicht. Nach 48 Stunden war ein geringer Abfall der Leukozyten in den Alveolen ersichtlich. In den hier vorliegenden Ergebnissen war dieser Zeitverlauf ebenfalls darstellbar. Nachdem das Maximum nach 24 Stunden erreicht wurde, war nach 72-stündiger Stimulation ein tendenzieller Rückgang der Leukozytenzahl zu finden.

Die genannten Vorgänge spiegeln sich auch in der Leukozytendifferenzierung in Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten mit typischem Populations-Verteilungsmuster in den Lungen-Alveolen wider (siehe **Abbildungen 13-16**). Vor Stimulation waren die Monozyten/Makrophagen als erste Verteidigung gegenüber aerogen aufgenommenem Material mit einem Anteil von über 90% die vorherrschende Leukozytensubpopulation. Nach LPS-Gabe kam es zu einer Verschiebung des Populationsverhältnisses zugunsten der neutrophilen Granulozyten. Es wurden zunehmend neutrophile Granulozyten aktiviert und zum Ort der Entzündung rekrutiert, sodass schließlich diese Leukozytenklasse nach 24-stündiger Stimulation mit über 90% den weitaus größten Anteil bildete. Entsprechend kam es zum Abfall des Monozyten-/Makrophagen- und Lymphozyten-Anteils. Nach 72-stündiger Stimulation sank der Granulozyten-Anteil wieder zugunsten der Monozyten-/Makrophagen- und Lymphozyten-Anteile. Insbesondere die nun wieder vermehrt rekrutierten Monozyten/Makrophagen könnten Zeichen der beginnenden Resolution der Entzündung sein, da sie vermehrt Zelldetritus und apoptotische Leukozyten entfernen können [82].

Die Verschiebung der Populationsanteile spiegelt sich auch in der MPO-Aktivität wider, dem Marker der im Rahmen der Entzündung zunehmend in das Interstitium der Lunge rekrutierten neutrophilen Granulozyten (siehe **Abbildung 17**). Schaefer et al. [101] konnten, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle, einen Anstieg der MPO-Aktivität über 24 Stunden im Sinne einer vermehrten Invasion von Neutrophilen in das Lungengewebe aufzeigen. Auch Hecker et al. [109] fanden diesen Anstieg über 24 Stunden Stimulation. Nach 48-stündiger Stimulation mit LPS kam es sogar zu einem weiteren MPO-Anstieg. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit konnten den MPO-Anstieg über 24 Stunden ebenfalls aufzeigen. Wohingegen jedoch bei Hecker et al. nach 48 Stunden ein weiterer MPO-Anstieg nachzuweisen war, kam es hier nach 72-stündiger LPS-Stimulation zum deutlichen Abfall der MPO-Aktivität, verglichen mit der Messung nach 24 Stunden. Möglicherweise ist nach 48 Stunden der *Peak* der MPO-Aktivität und damit der maximalen Neutrophilen-Invasion in das Lungeninterstitium erreicht. Dies würde auch erklären, warum der Neutrophilen-Anteil nach 72-stündiger Stimulation wieder zugunsten der Monozyten-/Makrophagen- und Lymphozyten-Anteile abfällt. Einen ähnlichen MPO-Verlauf konnte auch die Arbeitsgruppe um Mayer et al. [100] aufzeigen. Sie untersuchte im Mausmodell des LPS-induzierten akuten Lungenversagens *fat-1*-Mäuse, welche n-6-Fettsäuren endogen zu n-3-Fettsäuren metabolisieren können. Nach intratrachealer Instillation von LPS wurde nach 0, 4, 24 oder 72 Stunden unter anderem die MPO-Aktivität gemessen. Nach erfolgter Stimulation kam es in der Wildtyp-Gruppe zum Anstieg der MPO-Aktivität mit einem *Peak* nach 24 Stunden und einem Abfall nach 72 Stunden. Die oben genannten Ergebnisse der alveolären Leukozytenzahl, der Leukozytendifferenzierung und der MPO-Aktivität demonstrieren anschaulich die zytokin-induzierte Leukozytenrekrutierung im Rahmen der akuten Lungenschädigung.

TNF- α sowie im Rahmen der zytokin-vermittelten Leukozyten-Rekrutierung und-Aktivierung freigesetzte Substanzen (v.a. proinflammatorische Zytokine, Eicosanoide, vasoaktive Substanzen, Sauerstoffradikale, proteolytische Enzyme) führen über eine Störung der alveolokapillären Barriere zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Neben der direkten Schädigung des pulmonalen Endothels und des alveolären Epithels im Rahmen des ARDS führt insbesondere diese erhöhte Permeabilität zur Bildung des proteinreichen alveolären Ödems als Kennzeichen des ARDS [49, 54, 68, 71]. Die alveoläre Protein-Konzentration als Marker für die entzündlich gesteigerte Gefäßpermeabilität konnte in der vorliegenden Arbeit in der BAL gemessen werden

(siehe **Abbildung 18**). Auch hier fand sich ein typischer Zeitverlauf. Studien zeigten, dass es nach LPS-Gabe infolge Zytokinausschüttung und Leukozytenrekrutierung zu einem kontinuierlichen Anstieg der Protein-Konzentration im Sinne einer gesteigerten Gefäßpermeabilität kam. Nach einem zunächst leichten Anstieg nach 4-stündiger Stimulation wurde das Maximum nach 24 bis 48 Stunden erreicht [101, 106, 109]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten ebenfalls den deutlichen Anstieg über 24 Stunden. Wohingegen bei Hecker et al. [109] nach 48-stündiger Stimulation eine dem 24-Stunden-Wert vergleichbare Proteinkonzentration vorlag, fand sich in der vorliegenden Arbeit in der Messung nach 72 Stunden eine signifikante Abnahme der alveolären Proteinkonzentration als Zeichen einer abnehmenden Gefäßpermeabilität wahrscheinlich infolge sinkender Zytokinspiegel und reduzierter Leukozytenzahlen. Somit könnte sich das Maximum der alveolären Proteinkonzentration und damit der erhöhten Gefäßpermeabilität im Zeitraum zwischen 24- und 48-stündiger Stimulation befinden. Die vorliegenden Ergebnisse der Proteinextravasation spiegeln die Entstehung des proteinreichen alveolären Ödems im Rahmen der akuten respiratorischen Insuffizienz wider.

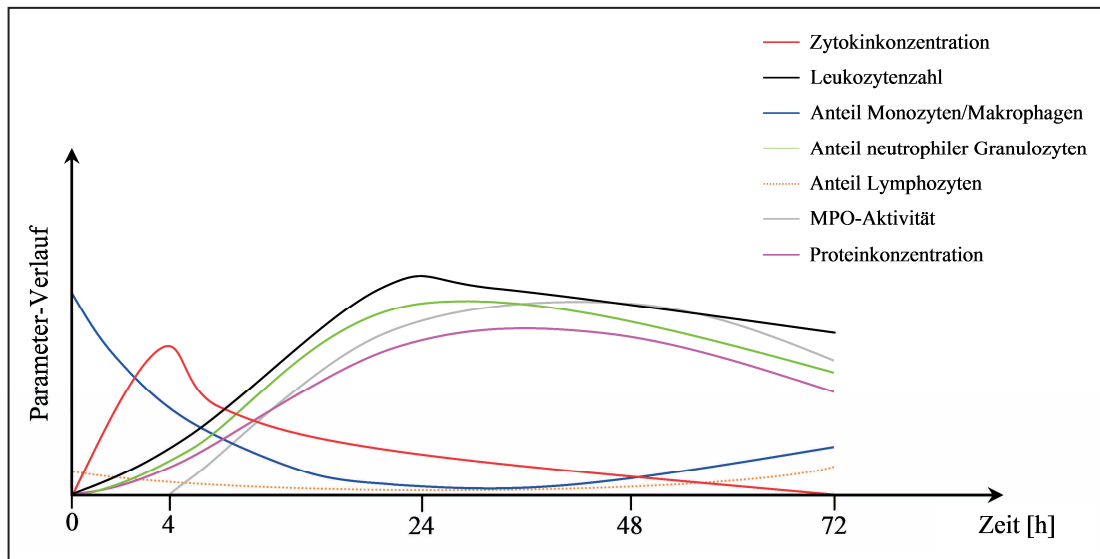


Abb. 21 *Idealisierter Zeitverlauf der Parameter unter NaCl-Infusion nach Stimulation mit 10µg LPS*

Die Abbildung zeigt den idealisierten Zeitverlauf [h] der Parameter [Zytokine (TNF- α und MIP-2) in der BAL, Leukozytenzahl in der BAL, Leukozytendifferenzierung (Anteil an Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten) in der BAL, MPO-Aktivität im Lungeninterstitium, Proteine in der BAL] in der Kontrollgruppe unter NaCl-Infusion nach Gabe von 10µg LPS intratracheal. TNF α = Tumor-Nekrose-Faktor-alpha; MIP-2= Makrophagen Inflammatorisches Protein-2; BAL= bronchoalveoläre Lavage; MPO= Myeloperoxidase; NaCl= Natrium-Chlorid-Lösung; LPS= Lipopolysaccharid. Die Kurven wurden mithilfe weiterer Studiendaten erstellt [101, 106, 109].

Zusammenfassend konnte anhand der dargestellten Ergebnisse sowie der kausalen und zeitlichen Zusammenhänge des ARDS gezeigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit ein akutes Lungenversagen ausgelöst wurde. Mausmodell und zugrundeliegende Ergebnisse sind kongruent mit den bisherigen Daten und können somit als Grundlage für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit verwendet werden.

4.2 Einfluss von Lipidemulsionen auf die akute respiratorische Insuffizienz im Mausmodell

4.2.1 Ergebnisse der LPS-induzierten akuten respiratorischen Insuffizienz unter verschiedenen Lipidemulsionen

Vor dem Hintergrund der in der Einleitung ausführlich erläuterten Zusammenhänge zwischen dem Krankheitsbild des ARDS, der intensivmedizinischen Ernährung kritischer Patienten und dem parenteralen Einsatz von Lipiden, wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen verschiedener Lipidemulsionen auf ein LPS-induziertes akutes Lungenversagen im Mausmodell untersucht. Hierbei wurde eine n-6-Fettsäure-reiche (LCT20) mit einer alternativ eingesetzten n-3-Fettsäure-reichen (SMOF) Lipidemulsion verglichen. Die jeweils infundierte Lipidmenge von 200µl/Tag entspricht einer Tagesdosis von 1,5g Lipid/kg Körpergewicht/Tag. Der Grundumsatz einer Maus ist jedoch etwa dreimal höher als beim Menschen, sodass die applizierte Lipidmenge umgerechnet bei etwa 0,5g/kg/Tag und damit an der unteren Grenze der empfohlenen Lipid-Tagesdosis (ca. 0,5-1g/kg/Tag) [91] liegt. Die untere Grenze wurde gewählt, da den Mäusen zusätzlich zu den Lipidinfusionen weiterhin die reguläre Nahrung zur freien Verfügung stand [106, 109].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die im vorherigen Kapitel anhand der Kontrollgruppe im Rahmen des ARDS dargestellten Parameter (Leukozyteninvasion, Proteinextravasation und Synthese der Zytokine TNF- α und MIP-2) durch die verschiedenen Lipidemulsionen beeinflusst wurden (siehe **Abbildungen 12-20**):

4.2.1.1 Alveoläre Zytokin-Konzentration

Die im Rahmen des ARDS vermehrt synthetisierten und in der vorliegenden Arbeit in der BAL nachgewiesenen proinflammatorischen Zytokine TNF- α und MIP-2 wurden durch die verschiedenen Lipidemulsionen moduliert.

Bezüglich der TNF- α -Konzentration (siehe **Abbildung 19**) fanden sich bereits vor Auslösung eines akuten Lungenversagens Unterschiede zwischen den Lipidemulsionen. So war der Zytokinspiegel in der SMOF-Gruppe signifikant vermindert im Vergleich zur LCT20-Gruppe. Auch wenn kein signifikanter Unterschied bestand, so fand sich zumindest ein tendenziell erhöhter Spiegel in der LCT20-Gruppe im Vergleich zur

NaCl-Kontrolle. Nach Gabe von 10 μ g LPS und 24-stündiger Stimulation fand sich in der Gruppe mit SMOF-Infusion eine signifikant reduzierte TNF- α -Konzentration im Vergleich zur Kontroll- und LCT20-Gruppe. Nach 72-stündiger Stimulation zeigten alle Infusionsgruppen signifikante Unterschiede zueinander. In der Kontrollgruppe mit NaCl fand sich interessanterweise die höchste TNF- α -Konzentration in der BAL, wohingegen die SMOF-Gruppe den niedrigsten Zytokinspiegel präsentierte. Die genannten Ergebnisse lassen sich mit den bereits oben aufgeführten Studien um Schaefer et al. [101] und Hecker et al. [109] ergänzen. Beide Arbeitsgruppen verglichen jeweils eine n-6-Fettsäure-reiche (nachfolgend abgekürzt mit LCT) mit einer alternativ eingesetzten n-3-Fettsäure-haltigen (nachfolgend abgekürzt mit FO) Lipidemulsion. Schaefer et al. lieferten die erste veröffentlichte Studie einer kontinuierlichen Lipidinfusion im Mausmodell des ARDS. Sie konnten demonstrieren, dass der TNF- α -Spiegel nach Gabe von 10 μ g LPS und 4-stündiger Stimulation, dem Zeitpunkt des Zytokin-*Peaks*, in der FO-Gruppe, verglichen mit der NaCl-Kontrolle, um beinahe 25% reduziert war. Die LCT-Infusion führte dagegen zu einem tendenziell höheren Zytokinanstieg als die Kontrolle. Nach 24-stündiger Stimulation fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionsgruppen, im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen. Jedoch konnte mit einer niedrigeren Dosis von 1 μ g LPS ebenfalls belegt werden, dass es nach 24 Stunden Stimulation zu einer reduzierten TNF- α -Konzentration in der FO-Gruppe kommt, verglichen mit LCT- und NaCl-Infusion. Die Arbeitsgruppe um Hecker et al. konnte vergleichbare Ergebnisse liefern. Nach Stimulation über 24 Stunden fand sich in der Gruppe mit FO ein signifikant reduzierter Zytokinspiegel im Vergleich zur LCT- und NaCl-Gruppe. 48 Stunden nach Stimulation zeigte sich der höchste TNF- α -Wert in der Kontrollgruppe mit NaCl, analog zur vorliegenden Arbeit mit 72-stündiger Stimulation. Die genannten Resultate stimmen mit früheren Studien überein. Babcock et al. [113] konnten nachweisen, dass die *in-vitro*-Vorbehandlung einer murinen Makrophagen-Zelllinie mit einer n-3-reichen Lipidemulsion die LPS-stimulierte TNF- α -Produktion der Makrophagen abschwächt, verglichen mit einer n-6-reichen Lipidemulsion. Die Arbeitsgruppe um Mayer et al. [114] untersuchte diese Vorgänge bei septischen Patienten. Diesen wurde entweder eine n-6- oder eine n-3-basierte Lipidemulsion über fünf Tage infundiert. Anschließend wurden die mononukleären Leukozyten isoliert, *in vitro* mit dem Endotoxin von *Salmonella typhimurium* stimuliert und die Zytokinkonzentration gemessen. Hier zeigte sich, dass die Konzentrationen der Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 nach Infusion mit n-6-

reicher Lipidemulsion anstiegen. Im Gegensatz dazu führte die Gabe von n-3-basierten Infusionen zur Reduktion dieser proinflammatorischen Zytokine.

Bezüglich der MIP-2-Konzentration (siehe **Abbildung 20**) fanden sich in der vorliegenden Arbeit zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Infusionsgruppen nach 24- und 72-stündiger Stimulation, die signifikanten TNF- α -Veränderungen spiegelten sich aber zumindest tendenziell auch in den MIP-2-Konzentrationen wider. Im Vergleich dazu konnten Schaefer et al. nach Gabe von 10 μ g LPS und 4-stündiger Stimulation gegenüber der Kontrollgruppe eine leichte MIP-2-Reduktion unter FO-Infusion, aber einen signifikanten Anstieg des MIP-2-Spiegels unter LCT-Infusion nachweisen. Diese Veränderungen waren auch nach 24-stündiger Stimulation darstellbar [101]. Ähnliches konnten Hecker et al. aufzeigen. Noch vor Auslösung eines akuten Lungenversagens führte die LCT-Infusion zu einer erhöhten MIP-2-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 24-stündiger Stimulation war der niedrigste MIP-2-Spiegel in der FO-Gruppe nachweisbar. Ähnlich wie bei der TNF-Konzentration lag nach 48 Stunden Stimulation der höchste Spiegel unter NaCl-Infusion vor [109]. Der Grund dafür, dass in der vorliegenden Arbeit die Unterschiede der MIP-2-Konzentrationen zwischen den einzelnen Infusionsgruppen nicht signifikant sind, ist unklar. Möglicherweise spielt hier die Infusionsdauer eine Rolle. Während Schaefer et al. und Hecker et al. die Infusionen über drei Tage applizierten, wurden diese in der vorliegenden Arbeit nur über zwei Tage infundiert. Somit könnten sich vielleicht die signifikanten Unterschiede zumindest teilweise erst nach drei Tagen Infusion herauskristallisieren.

Zusammenfassend konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse und in Ergänzung mit den oben genannten Studien demonstriert werden, dass die Synthese der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und MIP-2 durch die unterschiedlichen Lipidemulsionen beeinflusst wurde. Dabei führte die n-3-Fettsäure-reiche Lipidemulsion im Gegensatz zur n-6-basierten Emulsion nach Auslösung eines akuten Lungenversagens zu einer reduzierten Zytokinbildung. Dieser Effekt war zumindest im Vergleich zur n-6-reichen Lipidemulsion auch bereits vor Auslösung des Lungenversagens ersichtlich.

Die für die reduzierte Zytokinsynthese verantwortlichen Mechanismen beruhen insbesondere auf den immunmodulatorischen Eigenschaften der n-3-Fettsäuren (siehe auch Kapitel 1.2.3 und 1.3.3):

Die vermehrte Bereitstellung der n-3-Fettsäuren EPA und DHA im Plasma führt zu einem gesteigerten Einbau dieser Fettsäuren in die Phospholipide der Zellmembranen. Dadurch wird die n-6-Fettsäure AA teilweise ersetzt [109]. Außerdem konkurrieren EPA/DHA sowie AA um die gleichen Enzymsysteme zur Metabolisierung [82]. Zudem gibt es Hinweise dafür, dass n-3-Fettsäuren einen hemmenden Einfluss auf das für die Herauslösung von AA aus der Membran verantwortliche Enzym PLA₂ haben [101, 115, 116]. All diese Faktoren führen dazu, dass letztlich weniger AA im Plasma zur Verfügung steht. Auf diese Weise werden einerseits weniger AA-Metaboliten mit proinflammatorischer Wirkung (z.B. TXA₂, TXB₂, PGE₂, LTB₄) und andererseits vermehrt EPA-Eicosanoide mit antiinflammatorischen Eigenschaften (Prostanoide der 3er-Serie und Leukotriene der 5er-Serie, z.B. TXA₃ oder LTB₅) gebildet, wodurch nachfolgend weniger proinflammatorische Zytokine synthetisiert werden [82, 95, 101, 109]. Die n-3-Fettsäure-induzierten Veränderungen in der Membranzusammensetzung der Phospholipide haben wiederum Einfluss auf sekundäre Botenstoffe, die in der Signalkaskade der Entzündung eine wichtige Rolle spielen, wie z.B. Inositolphosphat, Phosphatidylinositol-3-Kinase oder Protein-Kinase C [82, 101, 106, 109]. Die reduzierte Zytokinsynthese hängt dabei insbesondere mit der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB zusammen, der eine zentrale Stellung im Rahmen entzündlicher Prozesse einnimmt. So konnten schon Camandola et al. zeigen, dass n-6-Fettsäuren (wie z.B. AA), nicht aber EPA, den NF-κB aktivieren [109, 117]. Zudem fand man heraus, dass DHA die Freisetzung des NF-κB mindert [118]. Zusammenfassend wird also die NF-κB-Bildung durch die n-3-Fettsäuren herabreguliert, was sich unter anderem in der reduzierten Zytokinsynthese äußert. An dieser Stelle sind zudem die Resolvine als EPA- und DHA-Metaboliten zu erwähnen. Diese neu entdeckte Gruppe von Lipidmediatoren spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Resolution einer Entzündung. Neben der vermuteten Reduktion der Neutrophilen-Migration in die Alveolen [22, 24, 25, 95] und vermehrter Rekrutierung von Monozyten [22, 95, 119], führen sie insbesondere auch zu einer Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF-α [24, 25, 79, 95]. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Resolvin E1 an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor ChemR23 zu einer Herabregulierung des NF-κB und infolgedessen zu einer abgeschwächten Entzündungsantwort führt [95, 120]. Es wird vermutet, dass die Resolvine auch eine Schlüsselrolle im Rahmen des ARDS einnehmen. Dies muss

jedoch in weiteren Studien erforscht werden, da insbesondere der Nachweis von Resolvinen in der BAL sehr schwierig erscheint [100, 109].

Anhand der dargestellten Mechanismen konnte demonstriert werden, dass die reduzierte Zytokinsynthese insbesondere in den immunmodulatorischen Eigenschaften der n-3-Fettsäuren begründet liegt. Darüber hinaus gibt es noch eine weitere Erklärung. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete SMOF-Lipidemulsion beinhaltet neben Sojaöl (LCT) als n-6-Quelle und Fischöl als n-3-Quelle auch mittelkettige Triglyceride (MCT). Durch Einsatz von MCT als schnellen Energielieferanten konnte der Anteil an Sojaöl und damit die Menge an n-6-Fettsäuren in der Lipidemulsion reduziert werden. Die Überlegung war, dass hierdurch weniger AA als Ausgangssubstrat für die Bildung proinflammatorischer Mediatoren zur Verfügung stand (siehe auch Kapitel 1.3.2) [95]. Die immunologische Rolle von MCT wird aktuell jedoch kontrovers diskutiert, mit teils proinflammatorischen und teils antiinflammatorischen Einflüssen [121-125]. Hecker et al. [109] verglichen diesbezüglich eine reine LCT-Lipidemulsion mit einer Mischemulsion aus LCT und MCT im Rahmen des Mausmodells der LPS-induzierten akuten respiratorischen Insuffizienz. Hier konnten sie darlegen, dass die Kombination aus LCT und MCT keinen Vorteil im Vergleich zu LCT erbrachte, obwohl bei der LCT/MCT-Mischemulsion reduzierte AA-Konzentrationen im Plasma vorlagen. Da beide Lipidemulsionen ein Verhältnis von n-3-Fettsäuren zu n-6-Fettsäuren (n-3:n-6-Ratio) von jeweils 1:7 aufwiesen, wurde hierdurch die Hypothese untermauert, dass die immunologische Funktion der Lipidemulsionen zumindest teilweise in der n-3:n-6-Ratio begründet liegt [109]. Dieser Aspekt wird an späterer Stelle nochmals diskutiert. Bezüglich des teilweisen Ersatzes der n-6-Fettsäuren wurde in der vorliegenden SMOF-Infusion neben MCT zusätzlich auch Olivenöl (OO) eingesetzt. Als einfach-ungesättigte n-9-Fettsäure besitzt OO wahrscheinlich immunneutrale Eigenschaften. Wie bereits oben erläutert, könnte auch der OO-Anteil zu einer Reduktion von AA als Vorläufer der proinflammatorischen Mediatoren führen und damit zur verringerten Zytokinsynthese beitragen [95]. Die Arbeitsgruppe um Bi et al. [126] verglich eine LCT-basierte Lipidemulsion mit einer OO-basierten Lipidemulsion im Mausmodell der LPS-induzierten akuten respiratorischen Insuffizienz und konnte den positiven Einfluss des OO-Anteils bestätigen. So zeigte sich u.a. eine erhöhte Mortalität unter LCT-Infusion im Vergleich zur OO-Infusion [126]. Die vorliegende Arbeit liefert somit die ersten Daten der kommerziell erhältlichen SMOF-Infusion mit allen oben genannten Lipidemulsionsanteilen im murinen ARDS-Modell.

4.2.1.2 Leukozyten-Rekrutierung in die Lunge

Die im Rahmen des ARDS vermehrt in die Lunge rekrutierten und in der vorliegenden Arbeit in der BAL und anhand der MPO-Aktivität nachgewiesenen Leukozyten wurden ebenfalls durch die verschiedenen Lipidemulsionen moduliert.

Bezüglich der alveolären Leukozytenzahl (siehe **Abbildung 12**) fanden sich bereits vor Auslösung eines akuten Lungenversagens signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Infusionen. So war die alveoläre Leukozytenzahl unter n-6-reicher Lipidemulsion im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die n-3-basierte Emulsion führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Leukozyten, verglichen mit der n-6-Infusion. 24 Stunden nach Induktion des Lungenversagens konnte die Anzahl der rekrutierten Leukozyten unter SMOF-Lipidemulsion signifikant reduziert werden im Vergleich zur n-6-reichen Infusion, die ihrerseits zumindest tendenziell zu einer vermehrten Rekrutierung im Vergleich zur Kontrolle führte. Nach 72-stündiger Stimulation kam es ebenfalls zu einer signifikanten Leukozytenreduktion unter SMOF-Infusion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der MPO-Aktivität wider (siehe **Abbildung 17**). Nach Stimulation über 24 Stunden kam es unter n-3-reicher Lipidemulsion zu einer signifikanten Abnahme der MPO-Aktivität als Zeichen einer deutlich reduzierten Neutrophilen-Invasion in das Lungengewebe, verglichen mit der Kontroll- und LCT20-Gruppe. Nach 72-stündiger LPS-Stimulation zeigte sich unter LCT20-Infusion eine Steigerung der MPO-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen die SMOF-Emulsion zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität im Vergleich zur n-6-Gruppe führte. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch andere Studien liefern. Nach Auslösung eines Lungenversagens führte die n-6-reiche Lipidemulsion sowohl bei Schaefer et al. [101], als auch bei Hecker et al. [109] zu einer gesteigerten Leukozytenrekrutierung in die Lungenalveolen, wohingegen die n-3-reiche Emulsion eine reduzierte Leukozytenanzahl zur Folge hatte. Ähnliche Effekte zeigten sich auch in der MPO-Aktivität. Bei Schaefer et al. fand sich nach 24-stündiger Stimulation unter n-6-reicher Lipidemulsion eine beinahe zweifach erhöhte MPO-Aktivität im Vergleich zur Kontroll- und n-3-Gruppe. Hecker et al. stellten nach 24 Stunden Stimulation die höchste MPO-Aktivität in der Gruppe mit n-6-reicher Lipidemulsion und nach 48-stündiger Stimulation die niedrigste Aktivität unter n-3-basierter Infusion fest. Bezüglich der Leukozytendifferenzierung in Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten mit jeweils typischem Populationsverteilungsmuster nach 0, 24 und 72 Stunden Stimulation (siehe

Abbildungen 13-16) fanden sich in der vorliegenden Arbeit vor Auslösung des Lungenversagens und 24 Stunden nach LPS-Stimulation jeweils keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Infusionen, was auch von Schaefer et al. [101] und Hecker et al. [109] beschrieben wurde. Auch nach 48-stündiger Stimulation zeigte sich kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Infusionsgruppen [109]. Erst nach 72-stündiger Stimulation konnten signifikante Unterschiede zwischen der NaCl-Kontrolle und den Lipidemulsionen aufgezeigt werden. So sank der Neutrophilen-Anteil sowohl unter der n-6-reichen, als auch unter der n-3-reichen Infusion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Analog dazu stieg der Monozyten/Makrophagen-Anteil unter den Lipidemulsionen an. Dies könnte einen Anhalt dafür liefern, dass es unter Lipidemulsionen zu einer beschleunigten Resolution der Entzündung kommt, da einerseits weniger Neutrophile und andererseits vermehrt Monozyten/Makrophagen rekrutiert werden, die ihrerseits wiederum Detritus und apoptotische Leukozyten entfernen [82]. Warum allerdings zwischen n-3- und n-6-reicher Lipidemulsion kein Unterschied besteht, ist unklar. Die genannten Unterschiede nach 72-stündiger Stimulation müssten durch zusätzliche Studien bestätigt und weiter erforscht werden. Zusammenfassend konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse demonstriert werden, dass die Leukozytenrekrutierung in die Lunge durch die unterschiedlichen Lipidemulsionen beeinflusst wurde. Dabei führte die n-3-reiche Lipidemulsion zu einem Abfall der alveolären Leukozytenzahl im Sinne einer verminderten Rekrutierung von Leukozyten in die Alveolen der Lunge. Analog dazu führte sie ebenso zu einer abgeschwächten MPO-Aktivität als Zeichen einer reduzierten Neutrophileninvasion in das Lungengewebe. Die n-6-reiche Lipidemulsion hatte gegensätzliche Effekte bezüglich Leukozytenzahl und MPO-Aktivität und führte dementsprechend zu einer gesteigerten Leukozytenmigration in die Lunge.

Die für die reduzierte Leukozytenrekrutierung verantwortlichen Mechanismen beruhen vor allem wieder auf den immunmodulatorischen Eigenschaften der n-3-Fettsäuren: Wie unter anderem im Kapitel 4.1.2 beschrieben, kommt es im Rahmen des ARDS insbesondere durch die vermehrt synthetisierten Zytokine (v.a. TNF- α und MIP-2) zur Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten. Über eine Reduktion der Zytokinsynthese führen die n-3-Fettsäuren dementsprechend auch zu einer reduzierten Leukozyten-Aktivierung und -Rekrutierung. Zusätzlich üben sie über ein vermindertes Angebot an chemotaktisch wirkenden AA-Metaboliten (wie z.B. LTB₄) und durch reduzierte Expression von Rezeptoren einen hemmenden Einfluss auf die Chemotaxis

von Leukozyten aus. Durch eine verminderte Präsentation von endothelialen Adhäsionsmolekülen, wie z.B. den Integrinen, führen n-3-Fettsäuren zu einer reduzierten Leukozyten-Adhäsion am Endothel. Dadurch sind auch die nachfolgenden Schritte der Migrationskaskade abgeschwächt, sodass letztlich die Extravasation der Leukozyten durch die endotheliale-epitheliale Barriere reduziert wird [78, 79, 82, 101, 109]. An dieser Stelle sind nochmals die Resolvine als EPA/DHA-Metaboliten zu erwähnen. Indem sie z.B. die Induktion von Adhäsionsmolekülen (z.B. E-Selektin, ICAM, VCAM) hemmen, führen sie zu einer Reduktion der Neutrophilen-Invasion in die Alveolen [22, 24, 25, 95]. Über vermehrte Expression von chemotaktischen Stoffen wird andererseits die Rekrutierung der Monozyten gesteigert. Diese können wiederum Zelldetritus und apoptotische Leukozyten (v.a. neutrophile Granulozyten) phagozytieren [22, 119]. Zum Schluss fördern die Resolvine den Abtransport der Monozyten/Makrophagen über das Lymphgefäßsystem. Somit sind sie ein wichtiges Element in der Beendigung einer Entzündung [22, 82, 95, 119].

4.2.1.3 Alveoläre Protein-Konzentration

Die als Zeichen der gesteigerten Gefäßpermeabilität im ARDS erhöhte und in der vorliegenden Arbeit in der BAL gemessene alveoläre Proteinkonzentration wurde ebenfalls durch die verschiedenen Lipidemulsionen beeinflusst (siehe **Abbildung 18**). Nach Auslösung der akuten Lungenschädigung zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Infusionen. So führte die SMOF-Lipidemulsion nach 24-stündiger Stimulation im Vergleich zur Kontroll- und LCT20-Gruppe zu einer deutlichen Reduktion der alveolären Proteinkonzentration im Sinne einer abgeschwächten Gefäßpermeabilität. Die LCT20-Infusion führte gegensätzlich zu einer erhöhten Proteinkonzentration. Diese Unterschiede waren auch nach 72 Stunden Stimulation zumindest tendenziell noch vorhanden. Die Modulation der Proteinkonzentrationen durch die verschiedenen Lipidemulsionen konnte auch von Schaefer et al. [101] und Hecker et al. [109] beschrieben werden. Zusätzlich fand sich auch nach 48-stündiger LPS-Stimulation der niedrigste Proteinspiegel in der Gruppe mit n-3-Fettsäure-reicher Lipidemulsion [109].

Die für die reduzierte alveoläre Proteinkonzentration verantwortlichen Mechanismen liegen den immunmodulatorischen Eigenschaften der n-3-Fettsäuren zugrunde:

Es wurde unter anderem in den Kapiteln 1.1.4.4 und 4.1.2 erläutert, dass insbesondere TNF- α und im Rahmen der zytokin-vermittelten Leukozytenaktivierung und

-Rekrutierung freigesetzte Substanzen über eine Störung der alveolokapillären Barriere zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität führen. Zu diesen Substanzen zählen neben proinflammatorischen Zytokinen, *reactive oxygen species* (ROS), *reactive nitrogen species* (RNS), proteolytischen Enzymen und *platelet-activating factor* (PAF) vor allem auch Vasoaktiva, wie z.B. Eicosanoide, Thrombin, Histamin und Bradykinin. Über eine Reduktion der Zytokinsynthese und der Leukozytenrekrutierung führen die n-3-Fettsäuren dementsprechend auch zu einer reduzierten Freisetzung der oben genannten Substanzen mit nachfolgend verminderter Gefäßpermeabilität und entsprechend erniedrigter alveolärer Proteinkonzentration. An dieser Stelle sind nochmals die Eicosanoide gesondert zu erwähnen. Dabei spielen die von der n-6-Fettsäure AA abgeleiteten Eicosanoide PGE₂, TXA₂ und LTB₄ eine entscheidende Rolle (siehe auch Kapitel 1.2.1). PGE₂ fördert u.a. Gefäßpermeabilität und -dilatation sowie die Produktion des proinflammatorischen IL-6. TXA₂ fördert ebenfalls u.a. die Gefäßpermeabilität und führt neben Leukozyten-Aktivierung und -Adhäsion insbesondere zu Vasokonstriktion mit nachfolgender Erhöhung des transkapillären Filtrationsdruckes [86, 87]. LTB₄ führt auch zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität und des lokalen Blutflusses und ist als potente, chemotaktisch wirkende Substanz an der Aktivierung und Migration von Leukozyten beteiligt [80, 81, 86, 87]. Letztlich wird eine Dominanz dieser proinflammatorischen AA-Metaboliten für die gestörte Permeabilität und Vasoregulation mit Ausbildung des alveolären Ödems als Kennzeichen des ARDS mitverantwortlich gemacht [82]. Die immunmodulatorische Wirkung der n-3-Fettsäuren besteht nun u.a. darin, dass sie zu einer Reduktion des AA-Anteils führen, sodass letztlich weniger Ausgangssubstrat für die Bildung der genannten proinflammatorischen Eicosanoide zur Verfügung steht. Die Arbeitsgruppe um Hecker et al. [109] untersuchte diesbezüglich den Einfluss der verschiedenen Lipidemulsionen auf die proinflammatorischen AA-Metaboliten TXB₂ und PGE₂ im Mausmodell der akuten respiratorischen Insuffizienz. Sie konnten darlegen, dass die n-3-reiche Lipidemulsion zu einem signifikant reduzierten TXB₂-Spiegel nach 24-stündiger Stimulation und zu einem signifikant reduzierten PGE₂-Spiegel nach 48-stündiger Stimulation im Vergleich zur n-6-Infusion führte. Bei der n-6-reichen Lipidemulsion kam es nach 48-stündiger Stimulation gegensätzlich zur höchsten TXB₂-Konzentration im Vergleich zur Kontroll- und n-3-Gruppe [109].

Darüber hinaus führen die n-3-Fettsäuren außerdem zur Synthese der Prostanoiden der 3er-Serie (z.B. PGE₃, TXA₃) und Leukotriene der 5er-Serie (z.B. LTB₅) (siehe auch

Kapitel 1.2.2 und 1.2.3). Diese Lipidmediatoren besitzen einerseits eine geringere proinflammatorische Wirkung im Vergleich zu den AA-Eicosanoiden, andererseits haben sie vermehrt antiinflammatorische Eigenschaften mit zum Teil antagonistischer Wirkung zu AA-Metaboliten (z.B. PGD₃ versus PGD₂) [79, 89, 90]. Neben den Eicosanoiden müssen auch die Resolvine als EPA/DHA-Abkömmlinge nochmals genannt werden. Über eine Reduktion der Aktivität von Proteasen und ROS minimieren sie den Gewebsschaden und tragen zu einer Abschwächung der alveolokapillären Barriestörung mit nachfolgend reduzierter Ödembildung bei [24]. Zusammenfassend werden somit einerseits weniger AA-Metaboliten mit proinflammatorischer Wirkung und andererseits vermehrt n-3-Eicosanoide sowie Resolvine mit antiinflammatorischen Eigenschaften gebildet.

Anhand der dargestellten Ergebnisse und in Ergänzung mit den genannten Studien, konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass die verschiedenen Lipidemulsionen einen modulierenden Einfluss auf die Parameter einer akuten respiratorischen Insuffizienz im Mausmodell ausüben. Dabei konnte gezeigt werden, dass die parenterale Gabe der n-3-Fettsäure-haltigen SMOF-Emulsion zu einer reduzierten pulmonalen Leukozyteninvasion, Zytokinsynthese und Proteinextravasation als Zeichen einer verminderten Gefäßpermeabilität führte. Unter Infusion der n-6-reichen Lipidemulsion wurden gegensätzliche Effekte aufgezeigt. Damit wird der immunmodulatorische Effekt der alternativ eingesetzten Fischöl-haltigen Lipidemulsionen auf die Entwicklung eines LPS-induzierten akuten Lungenversagens untermauert.

4.2.2 Immunmodulation durch Lipidemulsionen: aktuelle Studienlage und praktische Anwendbarkeit

Lipidemulsionen spielen aufgrund ihrer hohen Energiedichte als Kalorienlieferant und als Quelle essentieller Fettsäuren eine wichtige Rolle in der Ernährung kritisch kranker Patienten. Darüber hinaus besitzen sie immunmodulatorische Eigenschaften. Wie bereits im Kapitel 1.3.2 erläutert, werden hinsichtlich dieser immunmodulatorischen Effekte heutzutage Mischemulsionen mit einem reduzierten Anteil an n-6-Fettsäuren bevorzugt eingesetzt. Hierbei handelt es sich meist um Mischungen aus langkettigen (LCT) und mittelkettigen (MCT) Triglyceriden, die gegebenenfalls durch Fischöl (n-3-Fettsäuren) oder Olivenöl (n-9-Fettsäuren) ergänzt werden (LCT/MCT/FO oder

LCT/MCT/OO) [82]. Die hier untersuchte neueste Generation von Lipidemulsionen enthält alle vier Komponenten (LCT/MCT/OO/FO). Diese SMOF-Lipidemulsion (SMOFlipid[®]) wurde in verschiedenen klinischen Studien evaluiert. So konnten Mertes et al. 2006 nachweisen, dass die parenterale SMOFlipid[®]-Gabe nach elektiven Bauch- und Thoraxeingriffen von chirurgischen Patienten gut toleriert wurde und generell sicher ist. Auch wurden bereits vorteilhafte Einflüsse auf das Outcome der Patienten beschrieben [127, 128]. Auch bei pädiatrischen Patienten konnte das Sicherheitsprofil bestätigt werden [129]. Zudem konnte man nachweisen, dass die SMOF-Infusion zu einem positiven Fettsäure-Profil mit veränderter n3:n6-Ratio und vermehrt antiinflammatorischen Effekten führt [128, 130, 131].

Die vorliegende Arbeit liefert die ersten Daten einer kontinuierlichen Infusion mit der kommerziell erhältlichen SMOF-Lipidemulsion (SMOFlipid[®]) im Mausmodell des ARDS. Diese Daten stimmen mit anderen experimentellen Studien überein. Hecker et al. konnten nachweisen, dass die Infusion einer Mischemulsion aus LCT, MCT und FO (Lipoplus20%[®]) zu einer reduzierten pulmonalen Leukozyteninvasion, Zytokinsynthese und Proteinextravasation im murinen ARDS-Modell im Vergleich zu LCT oder LCT/MCT führte [109]. Die Arbeitsgruppe um Mayer et al. verwendete u.a. *fat-1*-Mäuse, die n-6-Fettsäuren endogen zu n-3-Fettsäuren metabolisieren können und auf diese Weise hohe EPA- und DHA-Spiegel aufweisen. Sie konnten darstellen, dass diese Mauslinie im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ebenfalls reduzierte ARDS-Parameter aufzeigte [100]. Zudem existieren auch klinische Studien, welche die positiven Effekte der parenteral applizierten n-3-Fettsäure-angereicherten Lipidemulsionen untermauern. Heller et al. erstellten eine Datenbankanalyse aus 661 Intensivpatienten, wovon ein Großteil durch chirurgische Patienten (mit Zustand nach großen abdominalen Eingriffen) und Patienten mit Sepsis gebildet wurde. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die Gabe von Fischöl als Bestandteil der parenteralen Ernährung zu einer Reduktion der Verweildauer auf der Intensivstation und zu einem reduzierten Antibiotikaeinsatz führte. Zudem konnte die Mortalität von Patienten signifikant gesenkt werden, wenn Fischöl in einer Dosis von 0,15-0,25 g/kg/Tag appliziert wurde. Als Kritik ist hierbei zu erwähnen, dass die Studie nicht kontrolliert und nicht randomisiert war [103, 109]. Eine randomisierte, kontrollierte Studie um Wang et al. untersuchte den Einfluss von Fischöl-haltigen Lipidemulsionen auf den Verlauf einer schweren akuten Pankreatitis. Die Fischöl-Gruppe zeigte dabei niedrigere CRP-Spiegel, verbesserte Oxygenierungs-Indizes und eine reduzierte Dauer eines notwendigen

Nierenersatzverfahrens [95, 132]. Barbosa et al. konnten in einer kleinen Studie an septischen Patienten nachweisen, dass die Ergänzung der parenteral applizierten Lipidemulsionen mit Fischöl zu veränderten Zytokinkonzentrationen und zu verbessertem pulmonalen Gasaustausch führte. Es gab jedoch keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Infusionsgruppen bezüglich Verweildauer auf der Intensivstation und Mortalität [109, 133]. Verschiedene Studien liefern Hinweise dafür, dass die parenterale Gabe von n-3-haltigen Emulsionen einen positiven Einfluss auf chirurgische Patienten ausübt [95]. So zeigte sich unter anderem eine Reduktion der Mortalität und eine niedrigere Anzahl an beatmungspflichtigen Patienten nach großen Baueingriffen [134]. Auch eine reduzierte Krankenhausverweildauer konnte nachgewiesen werden [135, 136]. Sabater et al. [137] untersuchten in einer prospektiven, randomisierten, doppel-blinden Studie den Einfluss einer parenteralen, n-3-Fettsäure-angereicherten Lipidemulsion auf die Eicosanoid-Synthese bei 16 ARDS-Patienten. Sie konnten zeigen, dass die n-3-haltige Lipidemulsion zu einer vorteilhaften Veränderung des Eicosanoid-Profiles (reduzierte Spiegel von LTB₄, TXB₂, 6-keto-Prostaglandin F_{1α}) führte. Der immunmodulatorische Einfluss von parenteral applizierten Lipidemulsionen auf inflammatorische Prozesse in der Lunge wurde von Hecker et al. [138] in einer 2015 publizierten, randomisiert kontrollierten, einfach-blinden Pilot-Studie an 42 gesunden Probanden untersucht. Hier konnte, im Gegensatz zu einer n-6-Fettsäure-reichen Lipidemulsion, der positive Einfluss einer n-3-Fettsäure-reichen Lipidemulsion auf Monozyten-Adhäsion, alveoläre Konzentration proinflammatorischer Zytokine und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Alveolen nachgewiesen werden. Zusammenfassend liegen einige wenige Studien vor, die den positiven Effekt von parenteral applizierten n-3-Fettsäure-angereicherten Lipidemulsionen bei kritisch kranken, insbesondere septischen und chirurgischen Patienten untermauern. Es existieren jedoch kaum klinische Daten bezüglich des parenteralen Einsatzes von Fischöl-haltigen Lipidemulsionen bei ARDS-Patienten. Im Gegensatz dazu sind hinsichtlich der enteralen Gabe von n-3-Fettsäuren bei ARDS-Patienten mehr Informationen bekannt [109]. Bereits 1999 konnten Gadek et al. die erste multizentrische Studie zu diesem Thema veröffentlichen. Hier wurde der Effekt einer enteralen, Fischöl-haltigen Ernährung in Kombination mit einigen weiteren aktiven Bestandteilen (Gamma-Linolensäure und Antioxidantien= Immunonutrition) auf das klinische Outcome von 146 ARDS-Patienten untersucht. Die Patienten der Fischöl-Gruppe wiesen signifikante Veränderungen auf. So zeigten sie einen

verbesserten Gasaustausch mit reduzierter Dauer der mechanischen Beatmung, eine verminderte Neutrophilen-Rekrutierung in die BAL, eine reduzierte Verweildauer auf der Intensivstation und ein geringeres Auftreten zusätzlicher Organversagen [82, 102, 109]. 2003 konnten Pacht et al. nachweisen, dass es außerdem zu einer Senkung der IL-8- und LTB₄-Spiegel in der BAL sowie zu reduzierter alveolärer Neutrophileninvasion und verminderter Permeabilität kommt [139]. Drei weitere randomisierte, kontrollierte Studien konnten den positiven Einfluss auf Oxygenierung, Dauer der mechanischen Beatmung und Organfunktion bestätigen [109]. Diesbezüglich untersuchten Singer et al. den Einfluss auf ARDS-Patienten [140], wohingegen Pontes-Arruda et al. septische Patienten einschlossen [141, 142]. Die Studien analysierten ausschließlich Patienten mit kontinuierlicher, voll-enteraler Ernährung und verwendeten als Kontrolle eine Ernährung mit einem hohen Anteil an n-6-Fettsäuren [109]. Auf Grundlage einiger dieser genannten Studien wurde 2006 durch die europäischen Fachgesellschaften für ARDS-Patienten die Empfehlung ausgesprochen, enterale Sondennahrung zu applizieren, welche insbesondere mit n-3-Fettsäuren angereichert ist [82]. Die 2011 publizierte OMEGA-Studie [104] ist eine große, multizentrische Phase-III-Studie, die den Effekt einer Bolus-Gabe von n-3-Fettsäuren, Gamma-Linolensäure und Antioxidantien im ARDS testete. Diese wurde vorzeitig gestoppt, da die n-3-Gruppe keinen Vorteil erbrachte und sogar eine höhere Rate an Komplikationen zeigte. Somit wurde hier das Grundkonzept der n-3-Fettsäure-angereicherten Immunonutrition generell in Frage gestellt [82]. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien wurde hier jedoch keine kontinuierliche Ernährung mit Lipiden, sondern eine Bolusapplikation gewählt, was als Kritikpunkt zu erwähnen ist. Die Bolusgabe könnte zu einer gastrointestinalen Malabsorption im Sinne einer veränderten Bioverfügbarkeit der Lipide geführt haben. So fanden sich in der lipidreichen Bolus-Gruppe u.a. signifikant mehr Diarrhöen [82, 109]. Auch der unterschiedliche Proteingehalt zwischen n-3- und Kontrollgruppe wird kontrovers diskutiert. So erhielt die n-3-Gruppe weniger Protein als die Kontrolle und wies eine Proteinmenge auf, die deutlich unter der empfohlenen Tagesdosis von 1-1,5g/kg Körpergewicht lag. Da der Intensivpatient aber massiv Proteinreserven verliert, ist die ausreichende Proteinzufuhr essenziell [82, 109]. Neben der OMEGA-Studie konnte auch die im selben Jahr veröffentlichte Studie um Stapleton et al. ebenfalls keine Vorteile von enteral applizierten Fischöl-Emulsionen im ARDS feststellen [143].

Zusammenfassend ist aufgrund der mangelnden und kontroversen Studienlage eine eindeutige Empfehlung bezüglich der Immunonutrition mit n-3-Fettsäure-haltigen Lipidemulsionen im ARDS nicht möglich. Weitere Studien sind notwendig, insbesondere zum Einsatz von parenteralen Lipidemulsionen. Wichtig in diesem Zusammenhang sind vor allem auch die optimale Dosis der n-3-Fettsäuren (n3:n6-Ratio) und der richtige Zeitpunkt, an dem mit der Immunonutrition begonnen wird [82, 109]. Wie bereits im Kapitel 4.2.1.1 angedeutet, wird vermutet, dass die immunologische Funktion der Lipidemulsionen zumindest teilweise im Verhältnis von n-3-Fettsäuren zu n-6-Fettsäuren (n3:n6-Ratio) begründet liegt [109]. Die Arbeitsgruppe um Grimm et al. [144] analysierte in einem Herztransplantationsmodell bei Ratten den Einfluss verschiedener n-3:n6-Verhältnisse. Sie konnte zeigen, dass eine n3:n6-Ratio von 7,6:1 (Fischöl) und 1:370 (Distelöl) eine massive Immunsuppression auslöste. Eine mehr balancierte n3:n6-Ratio von 1:6,5 (Sojabohnenöl) verursachte eine signifikant geringere Immunsuppression. Das 1:1-Gemisch aus Distelöl und Fischöl mit einer balancierten n3:n6-Ratio von 1:2,1 hatte keinerlei immunsuppressive Auswirkungen [144]. Aktuell wird vermutet, dass eine n3:n6-Ratio von 1:2 bis 1:4 den geringsten Einfluss auf immunologische Funktionen ausübt. Ein solches Verhältnis kann erzielt werden, indem eine standardmäßig eingesetzte n-6-reiche Lipidemulsion mit Fischöl, mittelkettigen Triglyceriden (in Form von Kokosöl) oder Olivenöl angereichert wird [95]. Diesbezüglich wurde in der vorliegenden Arbeit die SMOF-Infusion verwendet. Diese Lipidemulsion besitzt eine balancierte n3:n6-Ratio von 1:2,3 und liegt damit im empfohlenen n-3:n-6-Verhältnis. Im Gegensatz dazu besitzt die verwendete n-6-reiche Lipidemulsion (LCT20) eine Ratio von 1:6,4 [131].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mausmodell der LPS-induzierten akuten respiratorischen Insuffizienz unterscheidet sich natürlich in vielen Punkten sowohl von der klinischen Realität, als auch von klinischen und experimentellen ARDS-Modellen, die durch Bakterien ausgelöst werden. Dennoch konnten die pathophysiologischen Mechanismen und die kausalen sowie zeitlichen Zusammenhänge des ARDS gut untersucht werden. Vor diesem Hintergrund konnte gezeigt werden, dass die parenterale Gabe der alternativ eingesetzten und in der vorliegenden Arbeit erstmalig im murinen ARDS-Modell verwendeten SMOF-Lipidemulsion zu einer reduzierten pulmonalen Leukozyteninvasion, Zytokinsynthese und Proteinextravasation als Zeichen einer verminderten Gefäßpermeabilität führte. Unter Infusion der herkömmlichen, n-6-

reichen LCT20-Emulsion wurden gegensätzliche Effekte aufgezeigt. Die vorliegende Arbeit untermauert somit den positiven immunmodulatorischen Einfluss der n-3-Fettsäure-angereicherten und parenteral applizierten Lipidemulsion im murinen ARDS-Modell. Neben den antiinflammatorischen Eigenschaften der n-3-Fettsäuren in Form des Fischöl-Anteils, sind auch MCT und Olivenöl als SMOF-Bestandteile vorteilhaft, da sie zusammen mit Fischöl den Sojabohnenöl-Anteil reduzieren und auf diese Weise zumindest partiell die nachteiligen Effekte der n-6-Fettsäuren ausgleichen. Die Debatte bezüglich der optimalen Lipidgabe im ARDS besteht aktuell auch weiterhin, insbesondere da kaum klinische Daten zum parenteralen Einsatz von n-3-Lipiden im ARDS existieren. Aus diesem Grund leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum Einsatz parenteral applizierter n-3-Fettsäure-haltiger Lipidemulsionen als Kombination aus parenteraler Ernährung und immunmodulatorischem Therapieansatz bei Patienten mit ARDS.

5. Zusammenfassung

ARDS ist eine akut auftretende, diffus entzündliche Lungenerkrankung, die durch eine alveolo-epitheliale und endotheliale Schädigung charakterisiert ist. Diese führt zu einer gesteigerten pulmonalen Gefäßpermeabilität mit Entwicklung eines proteinreichen alveolären Ödems sowie zu einem Anstieg des pulmonal-arteriellen Druckes. Resultat ist letztlich die Ausbildung eines Lungenversagens. Lipidemulsionen (LE) sind wichtiger Bestandteil der parenteralen Ernährung kritisch kranker Patienten. Neben ihrer Funktion als Kalorienlieferant und Quelle essentieller Fettsäuren (FS) besitzen sie zudem immunmodulatorische Eigenschaften. Sie haben pro- oder antiinflammatorische Wirkungen, indem sie unter anderem Einfluss auf die Synthese von Zytokinen und Lipidmediatoren sowie auf die Funktion von Leukozyten ausüben. Lange Zeit wurden standardmäßig Sojabohnenöl-basierte LE zur parenteralen Ernährung kritisch Kranker eingesetzt. Sie enthalten insbesondere langkettige Triglyceride (LCT) und sind somit reich an n-6-FS. Aufgrund ungünstiger immunologischer und pathophysiologischer Effekte dieser herkömmlichen Infusionen, werden heutzutage Mischemulsionen aus LCT und mittelkettigen Triglyceriden (MCT) eingesetzt, die teils mit Olivenöl (OO; reich an n-9-FS) oder Fischöl (FO; reich an n-3-FS) angereichert sind. Die Wirkung von parenteral applizierten LE bei Patienten mit ARDS ist nur unzureichend erforscht. Die vorliegende Arbeit liefert die ersten Daten einer kontinuierlichen Infusion mit der alternativ eingesetzten SMOF-LE (Kombination aus LCT, MCT, OO und FO) im Mausmodell des LPS-induzierten ARDS, verglichen mit einer standardmäßig verwendeten LCT-Infusion. Die Ergebnisse zeigen, dass die parenterale Gabe der n-3-FS-haltigen SMOF-Infusion zu einer reduzierten pulmonalen Leukozyteninvasion, Zytokinsynthese und Proteinextravasation als Zeichen einer verminderten Gefäßpermeabilität führt. Unter LCT-Infusion finden sich gegensätzliche Effekte. Die vorliegende Arbeit bestätigt somit den positiven immunmodulatorischen Einfluss der n-3-FS-angereicherten LE im murinen ARDS-Modell. Neben den antiinflammatorischen n-3-Eigenschaften sind auch MCT und OO als SMOF-Bestandteile wahrscheinlich vorteilhaft, da sie zusammen mit FO den LCT-Anteil und somit die nachteiligen Effekte der n-6-FS zumindest partiell reduzieren. Daher leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum Einsatz parenteral applizierter, n-3-FS-haltiger LE als Kombination aus parenteraler Ernährung und immunmodulatorischer Therapie bei Patienten mit ARDS.

Summary

ARDS is an acute diffuse inflammatory pulmonary disease characterized by alveolar epithelial and endothelial damage leading to an increased pulmonary permeability with development of protein-rich alveolar edema and elevation of pulmonary artery pressure, finally resulting in respiratory failure. Lipid emulsions are considered as important components of parenteral nutrition regimes applied to critically ill patients. They are source of calories and essential fatty acids and also have immunological properties. Lipid emulsions influence cytokine and lipid mediator generation and function of leukocytes, so they exert pro-inflammatory or anti-inflammatory effects. For a long time, soybean oil-based lipid emulsions were used standardly for parenteral nutrition of critically ill patients. Such emulsions contain a large amount of long-chain triglycerides (LCT), rich in n-6 fatty acids. Because of adverse immunological and pathophysiological effects of these conventional emulsions, today mixed emulsions containing LCT and medium-chain triglycerides (MCT) are used, partly supplemented with olive oil (OO; rich in n-9 fatty acids) or fish oil (FO; rich in n-3 fatty acids). The effect of parenteral administered lipid emulsions in patients with ARDS is investigated insufficiently. The underlying study represents the first published data of continuous infusion of the alternatively used SMOF-lipid emulsion (combination of LCT, MCT, OO and FO) in the murine model of LPS-induced ARDS, in contrast to the standard use of LCT-infusion. Data show that the parenteral administration of n-3 fatty acids containing SMOF-infusion leads to reduced pulmonary invasion of leukocytes, generation of cytokines and protein leakage as a sign of decreased permeability. In contrast, there are contrary effects under infusion of LCT. This study confirms the positive immune modulating effects of lipid emulsions containing n-3 fatty acids in the murine model of ARDS. In addition to the anti-inflammatory properties of n-3 fatty acids, MCT and OO are beneficial too probably. In combination with FO, they reduce the amount of LCT and so they reduce at least partially the adverse effects of the n-6 fatty acids. The underlying data contribute to the application of parenteral administered n-3 fatty acids containing lipid emulsions as combination of parenteral nutrition regime and immune modulating therapy in patients with ARDS.

6. Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
AECC	amerikanisch-europäische Konsensuskonferenz
ALI	acute lung injury
ARDS	acute respiratory distress syndrome = akute respiratorische Insuffizienz
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
C-Atom	Kohlenstoff-Atom
C57BL/6NCrl	Mauslinie
CD	Cluster of Differentiation
COX	Cyclooxygenase
CPAP	kontinuierlicher positiver Atemwegsdruck
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
DHA	Docosahexaensäure
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
E. coli	Escherichia coli
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EET	Epoxyeicosatriensäuren
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPA	Eicosapentaensäure
ESAM	Endothelial cell-selective adhesion molecule
et al.	Et alii
FADD	Fas-associated-death-domain
FCS	fetales Kälber-Serum
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FLICE	FADD-like-interleukin-1 β -converting-enzyme = Caspase 8
FO	Fischöl
FS	Fettsäure

g	Gramm
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GPR120	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 120
°C	Grad Celsius
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPE	Hydroxyeicosapentaensäure
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HOCL	Hypochlorsäure
HPEPE	Hydroperoxyeicosapentaensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HRP	horseradish peroxidase
I.E.	internationale Einheiten
i.t.	intratracheal
ICAM-1/-2	intercellular adhesion molecule-1/-2
IFN	Interferon
IKK	inhibitory-binding-protein-κB-Kinase
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinasen
IRDS	Infantile respiratory distress syndrome
IRF3	interferon-response-factor-3
ISRE	interferon-sensitive-response-element
IκB	inhibitory-binding-protein-κB
JAM	junctional adhesion molecules
JNK	c-jun-NH ₂ -terminale-Kinase
kcal	Kilocalorie
kD	kiloDalton
kg	Kilogramm
LBP	LPS-bindendes Protein
LCT	long-chain-triglycerides
LCT20	Lipovenös® 20%
LE	Lipidemulsionen
LFA1	lymphocyte function associated antigen 1

LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
MAC1	macrophage-1-antigen
Mal	MyD88-adaptor-like-protein
mCD14	membrangebundenes CD14
MCT	medium-chain-triglycerides
memTNF	membrangebundenes TNF
Min.	Minute
Mio.	Million (= $\times 10^6$)
MIP-2	Makrophagen Inflammatorisches Protein 2
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
MyD88	myeloid differentiation factor 88
μ l	Mikroliter
n	Stichprobenumfang
n-3	omega-3
n-6	omega-6
n-9	omega-9
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nukleärer Faktor- κ B
nm	Nanometer
OO	Olivenöl
OP	Operation
p	Signifikanzwert
p38MAPK	mitogen-activated-protein-kinases
PAF	platelet-activating factor
PaO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PaO ₂ /FiO ₂	Oxygenierungsindex
PAWP	pulmonalarterieller Verschlussdruck
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphatpuffer

PECAM1	platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PG	Prostaglandin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPAR- γ	peroxisome proliferator activated receptor gamma
PSGL1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1
PUFA	polyunsaturated fatty acids
®	Registered Trade Mark = registrierte Warenmarke
RIP	receptor-interacting-protein
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
rpm	rotations per minute
sCD14	lösliches CD14
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SMOF	SMOFlipid®
SO	Sojabohnenöl
solTNF	lösliches TNF
Tab.	Tabelle
TACE	TNF-activating converting enzyme
TAK1	transforming-growth-factor- β -aktivierte Kinase 1
TBK1	TANK-binding-protein-1
TGF	Transforming-Growth-Factor
TLR4	Toll-like-Rezeptor-4
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TNF-R1	TNF-Rezeptor I
TNF-R2	TNF-Rezeptor II
TRADD	TNF-receptor-associated-death-domain
TRAF	TNF-receptor-associated-factor
TRALI	Transfusions-assoziiertes akutes Lungenversagen
TRAM	TRIF-related-adaptermolecule
TRIF	TIR-containing-adapter-molecule
TXA ₂	Thromboxan A ₂

u.a.	unter anderem
V.	Vena
v.a.	vor allem
V/Q-mismatch	Missverhältnis zwischen Ventilation (V) und Perfusion (Q)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VILI	ventilator-induced lung injury
VLA4	very late antigen 4
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZVK	zentraler Venenkatheter

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kennzeichen des ARDS.....	8
Abbildung 2: Überblick über die Pathogenese des ARDS.....	10
Abbildung 3: Vereinfachtes Modell der LPS-vermittelten Signalkaskade.....	13
Abbildung 4: Kaskade der Leukozyten-Rekrutierung.....	17
Abbildung 5: Vereinfachtes Schema des TNF- α -Signalweges.....	23
Abbildung 6a: Synthese der Arachidonsäure.....	27
Abbildung 6b: Metabolisierung der Arachidonsäure zu Eicosanoiden.....	30
Abbildung 7a: Synthese von Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure.....	31
Abbildung 7b: Metabolisierung von EPA und DHA zu Eicosanoiden.....	33
Abbildung 8: Zentraler Venenkatheter für die Operation.....	50
Abbildung 9: In der Vena jugularis einliegender Katheter.....	50
Abbildung 10: Schematisch dargestelltes Infusionsprinzip.....	52
Abbildung 11: Zeitlicher Ablauf der Experimente in Tagen.....	58
Abbildung 12: Leukozytenzahl in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS.....	61
Abbildung 13: Anteil der Monozyten / Makrophagen in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS.....	64
Abbildung 14: Anteil der neutrophilen Granulozyten in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS.....	66
Abbildung 15: Anteil der Lymphozyten in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS.....	68
Abbildung 16: Leukozyten-Differenzierung in der BAL; NaCl-Gruppe vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS.....	70
Abbildung 17: MPO-Aktivität im Lungeninterstitium vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS.....	73
Abbildung 18: Protein-Konzentration in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS.....	76
Abbildung 19: TNF- α -Konzentration in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS.....	79
Abbildung 20: MIP-2-Konzentration in der BAL vor Stimulation sowie 24 und 72 Stunden nach Stimulation mit 10 μ g LPS.....	81

Abbildung 21: Idealisierter Zeitverlauf der Parameter unter NaCl-Infusion nach
Stimulation mit 10 μ g LPS..... 88

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: AECC-Definition des ARDS (1994).....	3
Tabelle 2: Berlin-Definition des ARDS (2012)	4
Tabelle 3: Häufige ätiologische Risikofaktoren des ARDS.....	5
Tabelle 4: Materialien für die Tierhaltung	41
Tabelle 5: Geräte für in-vivo-Eingriffe	42
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien für in-vivo-Eingriffe	43
Tabelle 7: Geräte für in-vitro-Bestimmungen.....	45
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien für in-vitro-Bestimmungen	46
Tabelle 9: Chemikalien für in-vitro-Bestimmungen	47
Tabelle 10: Gruppeneinteilung.....	57

9. Literaturverzeichnis

1. Ranieri, V.M., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. JAMA, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
2. Ferguson, N.D., et al., *The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material*. Intensive Care Med, 2012.
3. Hecker, M., M.A. Weigand, and K. Mayer, [*Acute respiratory distress syndrome*]. Internist (Berl), 2012. **53**(5): p. 557-66.
4. Herridge, M.S., et al., *Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2011. **364**(14): p. 1293-304.
5. Frutos-Vivar, F., N.D. Ferguson, and A. Esteban, *Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome*. Semin Respir Crit Care Med, 2006. **27**(4): p. 327-36.
6. Goss, C.H., et al., *Incidence of acute lung injury in the United States*. Crit Care Med, 2003. **31**(6): p. 1607-11.
7. Wheeler, A.P. and G.R. Bernard, *Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review*. Lancet, 2007. **369**(9572): p. 1553-64.
8. Phua, J., et al., *Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(3): p. 220-7.
9. Ashbaugh, D.G., et al., *Acute respiratory distress in adults*. Lancet, 1967. **2**(7511): p. 319-23.
10. Petty, T.L. and D.G. Ashbaugh, *The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management*. Chest, 1971. **60**(3): p. 233-9.
11. Pepe, P.E., et al., *Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome*. Am J Surg, 1982. **144**(1): p. 124-30.
12. Fowler, A.A., et al., *Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions*. Ann Intern Med, 1983. **98**(5 Pt 1): p. 593-7.
13. Bone, R.C., P.B. Francis, and A.K. Pierce, *Intravascular coagulation associated with the adult respiratory distress syndrome*. Am J Med, 1976. **61**(5): p. 585-9.
14. Murray, J.F., et al., *An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome*. Am Rev Respir Dis, 1988. **138**(3): p. 720-3.
15. Bernard, G.R., et al., *The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination*. Am J Respir Crit Care Med, 1994. **149**(3 Pt 1): p. 818-24.
16. Hecker, M., W. Seeger, and K. Mayer, [*The Berlin Definition : Novel criteria and classification of ARDS.*]. Med Klin Intensivmed Notfmed, 2012.
17. Phua, J., T.E. Stewart, and N.D. Ferguson, *Acute respiratory distress syndrome 40 years later: time to revisit its definition*. Crit Care Med, 2008. **36**(10): p. 2912-21.
18. Ware, L.B., *Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. Semin Respir Crit Care Med, 2006. **27**(4): p. 337-49.
19. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
20. Matthay, M.A. and G.A. Zimmerman, *Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(4): p. 319-27.

21. Ott, J., M.B. Schaefer, K. Mayer, *Benefits of n-3 fatty acids in parenteral nutrition*. . Nutritional Therapy Metabolism, 2010. **28**(1): p. p. 12 – 20.
22. Serhan, C.N., N. Chiang, and T.E. Van Dyke, *Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 349-61.
23. D'Alessio, F.R., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ Tregs resolve experimental lung injury in mice and are present in humans with acute lung injury*. J Clin Invest, 2009. **119**(10): p. 2898-913.
24. Hasturk, H., et al., *Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 7021-9.
25. Spite, M., et al., *Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis*. Nature, 2009. **461**(7268): p. 1287-91.
26. Andonegui, G., et al., *Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs*. J Clin Invest, 2003. **111**(7): p. 1011-20.
27. Palsson-McDermott, E.M. and L.A. O'Neill, *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4*. Immunology, 2004. **113**(2): p. 153-62.
28. Wang, X. and P.J. Quinn, *Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification*. Prog Lipid Res, 2010. **49**(2): p. 97-107.
29. Wright, S.D., et al., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
30. Schumann, R.R., et al., *Structure and function of lipopolysaccharide binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1429-31.
31. Hailman, E., et al., *Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14*. J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 269-77.
32. Schumann, R.R., et al., *Lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis*. Biochem Soc Trans, 1994. **22**(1): p. 80-2.
33. Han, S.J., et al., *Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B)*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 44715-21.
34. Poynter, M.E., C.G. Irvin, and Y.M. Janssen-Heininger, *A prominent role for airway epithelial NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 6257-65.
35. Chavakis, E., E.Y. Choi, and T. Chavakis, *Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 191-7.
36. Hajishengallis, G. and T. Chavakis, *Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment*. Trends Immunol, 2012.
37. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
38. Chavakis, T., *Leucocyte recruitment in inflammation and novel endogenous negative regulators thereof*. Eur J Clin Invest, 2012. **42**(6): p. 686-91.
39. Lau, D. and S. Baldus, *Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease*. Pharmacol Ther, 2006. **111**(1): p. 16-26.
40. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase: friend and foe*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(5): p. 598-625.
41. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 383-9.

42. Bauer, P., et al., *Role of endotoxin in the expression of endothelial selectins after cecal ligation and perforation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **278**(5): p. R1140-7.
43. Parker, J.C. and M.I. Townsley, *Evaluation of lung injury in rats and mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(2): p. L231-46.
44. Aukland, K. and R.K. Reed, *Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume*. Physiol Rev, 1993. **73**(1): p. 1-78.
45. Maniatis, N.A., et al., *Endothelial pathomechanisms in acute lung injury*. Vascul Pharmacol, 2008. **49**(4-6): p. 119-33.
46. Dudek, S.M. and J.G. Garcia, *Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability*. J Appl Physiol, 2001. **91**(4): p. 1487-500.
47. Lucas, R., et al., *Regulators of endothelial and epithelial barrier integrity and function in acute lung injury*. Biochem Pharmacol, 2009. **77**(12): p. 1763-72.
48. Boueiz, A. and P.M. Hassoun, *Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species*. Microvasc Res, 2009. **77**(1): p. 26-34.
49. Stephens, K.E., et al., *Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury*. Am Rev Respir Dis, 1988. **137**(6): p. 1364-70.
50. Mason, R.J., et al., *Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(19): p. 6033-7.
51. Matthay, M.A., H.G. Folkesson, and A.S. Verkman, *Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 1): p. L487-503.
52. Seeger, W. and H.G. Lasch, *Septic lung*. Rev Infect Dis, 1987. **9 Suppl 5**: p. S570-9.
53. Moldoveanu, B., et al., *Inflammatory mechanisms in the lung*. J Inflamm Res, 2009. **2**: p. 1-11.
54. Yang, G., et al., *The Dual Role of TNF in Pulmonary Edema*. J Cardiovasc Dis Res, 2010. **1**(1): p. 29-36.
55. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor: an updated review of its biology*. Crit Care Med, 1993. **21**(10 Suppl): p. S415-22.
56. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.
57. Devin, A., et al., *The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation*. Immunity, 2000. **12**(4): p. 419-29.
58. Chen, G. and D.V. Goeddel, *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1634-5.
59. Kim, H., et al., *TNF-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells*. Exp Mol Med, 2008. **40**(2): p. 167-75.
60. Heller, R.A. and M. Kronke, *Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways*. J Cell Biol, 1994. **126**(1): p. 5-9.
61. Aggarwal, B.B., et al., *TNF blockade: an inflammatory issue*. Ernst Schering Res Found Workshop, 2006(56): p. 161-86.
62. Mannel, D.N. and B. Echtenacher, *TNF in the inflammatory response*. Chem Immunol, 2000. **74**: p. 141-61.
63. Armstrong, L., et al., *Increased expression of functionally active membrane-associated tumor necrosis factor in acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **22**(1): p. 68-74.

64. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 45-65.
65. Beutler, B. and V. Kruys, *Lipopolysaccharide signal transduction, regulation of tumor necrosis factor biosynthesis, and signaling by tumor necrosis factor itself*. J Cardiovasc Pharmacol, 1995. **25 Suppl 2**: p. S1-8.
66. Jones, E.Y., D.I. Stuart, and N.P. Walker, *Structure of tumour necrosis factor*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 225-8.
67. Cakarova, L., et al., *Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(6): p. 521-32.
68. Parsons, P.E., et al., *Studies on the role of tumor necrosis factor in adult respiratory distress syndrome*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(3): p. 694-700.
69. Oh, J.H., et al., *A novel cyclin-dependent kinase inhibitor down-regulates tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced expression of cell adhesion molecules by inhibition of NF-kappaB activation in human pulmonary epithelial cells*. Int Immunopharmacol, 2010. **10**(5): p. 572-9.
70. Burke-Gaffney, A. and P.G. Hellewell, *Tumour necrosis factor-alpha-induced ICAM-1 expression in human vascular endothelial and lung epithelial cells: modulation by tyrosine kinase inhibitors*. Br J Pharmacol, 1996. **119**(6): p. 1149-58.
71. Rotundo, R.F., et al., *TNF-alpha disruption of lung endothelial integrity: reduced integrin mediated adhesion to fibronectin*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **282**(2): p. L316-29.
72. Bhatia, M. and S. Moochhala, *Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome*. J Pathol, 2004. **202**(2): p. 145-56.
73. Nakamura, K., et al., *Macrophage inflammatory protein-2 induced by TNF-alpha plays a pivotal role in concanavalin A-induced liver injury in mice*. J Hepatol, 2001. **35**(2): p. 217-24.
74. Wolpe, S.D., et al., *Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(2): p. 612-6.
75. Wolpe, S.D. and A. Cerami, *Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines*. FASEB J, 1989. **3**(14): p. 2565-73.
76. Bozic, C.R., et al., *Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC*. J Immunol, 1995. **154**(11): p. 6048-57.
77. Kawamura, H., et al., *Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration*. Immunology, 2012. **136**(4): p. 448-58.
78. Calder, P.C., *Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma*. Eur J Pharmacol, 2011. **668 Suppl 1**: p. S50-8.
79. Calder, P.C., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: Nutrition or pharmacology?* Br J Clin Pharmacol, 2012.
80. Astudillo, A.M., et al., *Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(2): p. 249-56.
81. Bruegel, M., et al., *Sepsis-associated changes of the arachidonic acid metabolism and their diagnostic potential in septic patients*. Crit Care Med, 2012. **40**(5): p. 1478-86.
82. Hecker, M., T.W. Felbinger, and K. Mayer, *[Nutrition and acute respiratory failure]*. Med Klin Intensivmed Notfmed, 2013. **108**(5): p. 379-83.

83. Balsinde, J., M.V. Winstead, and E.A. Dennis, *Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization*. FEBS Lett, 2002. **531**(1): p. 2-6.
84. Brock, T.G. and M. Peters-Golden, *Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis*. ScientificWorldJournal, 2007. **7**: p. 1273-84.
85. Tilley, S.L., T.M. Coffman, and B.H. Koller, *Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes*. J Clin Invest, 2001. **108**(1): p. 15-23.
86. Calder, P.C., *n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1505S-1519S.
87. Martin, J.M. and R.D. Stapleton, *Omega-3 fatty acids in critical illness*. Nutr Rev, 2010. **68**(9): p. 531-41.
88. Wymann, M.P. and R. Schneiter, *Lipid signalling in disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 162-76.
89. Waitzberg, D.L. and R.S. Torrinhas, *Fish oil lipid emulsions and immune response: what clinicians need to know*. Nutr Clin Pract, 2009. **24**(4): p. 487-99.
90. Calder, P.C., *Long-chain fatty acids and inflammation*. Proc Nutr Soc, 2012. **71**(2): p. 284-9.
91. Hecker, M., T. Felbinger, and K. Mayer, *[Nutrition in intensive care medicine]*. Anaesthesist, 2012. **61**(6): p. 553-64.
92. Calder, P.C., et al., *Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: current thinking and future directions*. Intensive Care Med, 2010. **36**(5): p. 735-49.
93. Mayer, K., M.A. Weigand, and W. Seeger, *[Nutrition in intensive care]*. Dtsch Med Wochenschr, 2011. **136**(22): p. 1180-3.
94. Adolph, M., et al., *Lipid emulsions - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 6*. Ger Med Sci, 2009. **7**: p. Doc22.
95. Ott, J., C. Hiesgen, and K. Mayer, *Lipids in critical care medicine*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2011. **85**(5): p. 267-73.
96. Heyland, D.K., et al., *Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence*. JAMA, 2001. **286**(8): p. 944-53.
97. Heys, S.D., et al., *Enteral nutritional supplementation with key nutrients in patients with critical illness and cancer: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials*. Ann Surg, 1999. **229**(4): p. 467-77.
98. Grimminger, F., et al., *Impact of arachidonic versus eicosapentaenoic acid on exotoxin-induced lung vascular leakage: relation to 4-series versus 5-series leukotriene generation*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **155**(2): p. 513-9.
99. Grimminger, F., et al., *Differential vasoconstrictor potencies of free fatty acids in the lung vasculature: 2-versus 3-series prostanoid generation*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. **267**(1): p. 259-65.
100. Mayer, K., et al., *Acute lung injury is reduced in fat-1 mice endogenously synthesizing n-3 fatty acids*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **179**(6): p. 474-83.
101. Schaefer, M.B., et al., *Immunomodulation by n-3- versus n-6-rich lipid emulsions in murine acute lung injury--role of platelet-activating factor receptor*. Crit Care Med, 2007. **35**(2): p. 544-54.
102. Gadek, J.E., et al., *Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome*. Enteral Nutrition in ARDS Study Group. Crit Care Med, 1999. **27**(8): p. 1409-20.

103. Heller, A.R., et al., *Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome*. Crit Care Med, 2006. **34**(4): p. 972-9.
104. Rice, T.W., et al., *Enteral omega-3 fatty acid, gamma-linolenic acid, and antioxidant supplementation in acute lung injury*. JAMA, 2011. **306**(14): p. 1574-81.
105. Jaume, J.C., et al., *Extremely low doses of heparin release lipase activity into the plasma and can thereby cause artifactual elevations in the serum-free thyroxine concentration as measured by equilibrium dialysis*. Thyroid, 1996. **6**(2): p. 79-83.
106. Ott, J.R., *Einfluss von n-3-versus n-6-basierten Lipidemulsionen für die parenterale Ernährung auf den Verlauf eines akuten Lungenversagens der Maus*. Doctoral dissertation, Universitätsbibliothek Giessen, 2008.
107. Ishii, S., et al., *Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor*. EMBO J, 1997. **16**(1): p. 133-42.
108. Szarka, R.J., et al., *A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation*. J Immunol Methods, 1997. **202**(1): p. 49-57.
109. Hecker, M., et al., *Immunomodulation by fish-oil containing lipid emulsions in murine acute respiratory distress syndrome*. Crit Care, 2014. **18**(2): p. R85.
110. Yipp, B.G., et al., *Profound differences in leukocyte-endothelial cell responses to lipopolysaccharide versus lipoteichoic acid*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4650-8.
111. Witzenrath, M., et al., *Role of platelet-activating factor in pneumolysin-induced acute lung injury*. Crit Care Med, 2007. **35**(7): p. 1756-62.
112. Nagase, T., et al., *Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice*. J Clin Invest, 1999. **104**(8): p. 1071-6.
113. Babcock, T.A., et al., *Omega-3 fatty acid lipid emulsion reduces LPS-stimulated macrophage TNF-alpha production*. Surg Infect (Larchmt), 2002. **3**(2): p. 145-9.
114. Mayer, K., et al., *Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(10): p. 1321-8.
115. Sperling, R.I., et al., *Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils*. J Clin Invest, 1993. **91**(2): p. 651-60.
116. Prescott, S.M., G.A. Zimmerman, and T.M. McIntyre, *Platelet-activating factor*. J Biol Chem, 1990. **265**(29): p. 17381-4.
117. Camandola, S., et al., *Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **229**(2): p. 643-7.
118. Weber, C., et al., *Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(5): p. 622-8.
119. Flower, R.J. and M. Perretti, *Controlling inflammation: a fat chance?* J Exp Med, 2005. **201**(5): p. 671-4.
120. Prescott, S.M. and W.F. Stenson, *Fish oil fix*. Nat Med, 2005. **11**(6): p. 596-8.
121. Wanten, G.J., et al., *Medium-chain, triglyceride-containing lipid emulsions increase human neutrophil beta2 integrin expression, adhesion, and degranulation*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2000. **24**(4): p. 228-33.

122. Versleijen, M., et al., *Parenteral lipids modulate leukocyte phenotypes in whole blood, depending on their fatty acid composition*. Clin Nutr, 2005. **24**(5): p. 822-9.
123. Wanten, G.J., et al., *Phagocytosis and killing of Candida albicans by human neutrophils after exposure to structurally different lipid emulsions*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2001. **25**(1): p. 9-13.
124. Grau, T., et al., *[Randomized study of two different fat emulsions in total parenteral nutrition of malnourished surgical patients; effect of infectious morbidity and mortality]*. Nutr Hosp, 2003. **18**(3): p. 159-66.
125. Lekka, M.E., et al., *The impact of intravenous fat emulsion administration in acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(5): p. 638-44.
126. Bi, M.H., et al., *Induction of lymphocyte apoptosis in a murine model of acute lung injury--modulation by lipid emulsions*. Shock, 2010. **33**(2): p. 179-88.
127. Mertes, N., et al., *Safety and efficacy of a new parenteral lipid emulsion (SMOFlipid) in surgical patients: a randomized, double-blind, multicenter study*. Ann Nutr Metab, 2006. **50**(3): p. 253-9.
128. Klek, S. and D.L. Waitzberg, *Intravenous lipids in adult surgical patients*. World Rev Nutr Diet, 2015. **112**: p. 115-9.
129. Goulet, O., et al., *A new intravenous fat emulsion containing soybean oil, medium-chain triglycerides, olive oil, and fish oil: a single-center, double-blind randomized study on efficacy and safety in pediatric patients receiving home parenteral nutrition*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2010. **34**(5): p. 485-95.
130. Klek, S., et al., *Four-week parenteral nutrition using a third generation lipid emulsion (SMOFlipid)--a double-blind, randomised, multicentre study in adults*. Clin Nutr, 2013. **32**(2): p. 224-31.
131. Grimm, H., et al., *Improved fatty acid and leukotriene pattern with a novel lipid emulsion in surgical patients*. Eur J Nutr, 2006. **45**(1): p. 55-60.
132. Wang, X., et al., *Omega-3 fatty acids-supplemented parenteral nutrition decreases hyperinflammatory response and attenuates systemic disease sequelae in severe acute pancreatitis: a randomized and controlled study*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2008. **32**(3): p. 236-41.
133. Barbosa, V.M., et al., *Effects of a fish oil containing lipid emulsion on plasma phospholipid fatty acids, inflammatory markers, and clinical outcomes in septic patients: a randomized, controlled clinical trial*. Crit Care, 2010. **14**(1): p. R5.
134. Tsekos, E., et al., *Perioperative administration of parenteral fish oil supplements in a routine clinical setting improves patient outcome after major abdominal surgery*. Clin Nutr, 2004. **23**(3): p. 325-30.
135. Wichmann, M.W., et al., *Evaluation of clinical safety and beneficial effects of a fish oil containing lipid emulsion (Lipoplus, MLF541): data from a prospective, randomized, multicenter trial*. Crit Care Med, 2007. **35**(3): p. 700-6.
136. Berger, M.M., et al., *Fish oil after abdominal aorta aneurysm surgery*. Eur J Clin Nutr, 2008. **62**(9): p. 1116-22.
137. Sabater, J., et al., *Effects of an omega-3 fatty acid-enriched lipid emulsion on eicosanoid synthesis in acute respiratory distress syndrome (ARDS): A prospective, randomized, double-blind, parallel group study*. Nutr Metab (Lond), 2011. **8**(1): p. 22.
138. Hecker, M., et al., *Immunomodulation by lipid emulsions in pulmonary inflammation: a randomized controlled trial*. Crit Care, 2015. **19**: p. 226.
139. Pacht, E.R., et al., *Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants reduces alveolar inflammatory mediators and*

- protein influx in patients with acute respiratory distress syndrome. Crit Care Med, 2003. 31(2): p. 491-500.*
140. Singer, P., et al., *Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective. Intensive Care Med, 2008. 34(9): p. 1580-92.*
141. Pontes-Arruda, A., et al., *Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid and antioxidants in the early treatment of sepsis: results from a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, controlled study: the INTERSEPT study. Crit Care, 2011. 15(3): p. R144.*
142. Pontes-Arruda, A., A.M. Aragao, and J.D. Albuquerque, *Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock. Crit Care Med, 2006. 34(9): p. 2325-33.*
143. Stapleton, R.D., et al., *A phase II randomized placebo-controlled trial of omega-3 fatty acids for the treatment of acute lung injury. Crit Care Med, 2011. 39(7): p. 1655-62.*
144. Grimm, H., et al., *Immunoregulation by parenteral lipids: impact of the n-3 to n-6 fatty acid ratio. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1994. 18(5): p. 417-21.*

10. Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

11. Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt allen Personen, deren Mithilfe zur Verwirklichung der vorliegenden Dissertation beigetragen hat:

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Konstantin Mayer bedanken, dass er mir das Thema für die Arbeit überlassen hat. Auch für die zahlreichen Hilfestellungen, Ratschläge und Anmerkungen sowie für die hervorragende Betreuung bei der Entstehung dieser Dissertation bin ich ihm zutiefst dankbar.

Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger als Direktor der Medizinischen Klinik II danke ich für die Bereitstellung des Labors und der technischen Mittel.

Großen Dank schulde ich Dr. med. vet. Juliane Ott, Andrea Mohr, Dr. med. vet. Britta Bausch und Juliane Mest sowie der gesamten AG Mayer, die mich in grundlegende Arbeitstechniken eingearbeitet haben, immer ein offenes Ohr für Fragen und Anmerkungen hatten und mich bei meiner Arbeit durch die wunderbar angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen Gespräche unterstützt haben.

Großer Dank an Dr. med. Melanie Schuldes und Tobias Pieper für die orthographische Korrektur meiner Arbeit.

Nicht zuletzt gilt der größte Dank natürlich meiner Familie und meiner Freundin. Zu jedem Zeitpunkt meiner Ausbildung und in jedem Lebensabschnitt konnte ich uneingeschränkte Unterstützung jeglicher Art erfahren. Hierfür schulde ich Euch unendlichen Dank.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6554-6



9 783835 196546