

**Der Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf die
Ausbreitung der Entzündungsreaktion in der
Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis im
Mausmodell**

Lena Vogt

Aus der Klinik für Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf die Ausbreitung der
Entzündungsreaktion in der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis im
Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lena Vogt

aus Bad Segeberg

Datum der Promotion: 06.03.2020

Inhaltsverzeichnis

Titelseite: Der Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf die Ausbreitung der
Entzündungsreaktion in der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis im
Mausmodell

Abstrakt (deutsch)	6
Abstract (englisch)	7
1 Einleitung und Fragestellung	8
1.1 Ätiologie und Pathogenese der akuten Pankreatitis.....	8
1.1.1 Die Trypsinogenaktivierung.....	10
1.1.2 Die Rolle der Zytokine.....	10
1.1.3 Die Rolle der Entzündungszellen.....	13
1.1.4 Die Mechanismen des Zelltodes.....	13
1.2 Die Pankreatitis-assoziierte Lungenschädigung.....	14
1.3 Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren.....	17
1.3.1 Aufbau und Vorkommen.....	17
1.3.2 Der Einfluss von Omega-6-Fettsäuren und ihrer Derivate auf Entzündungsprozesse.....	19
1.3.3 Der Einfluss von Omega-3-Fettsäuren und ihrer Derivate auf Entzündungsprozesse.....	20
1.3.4 Omega-3-, Omega-6-Fettsäuren und ihre Mediatoren und die akute Pankreatitis.....	22
1.4 Das Fat-1 Mausmodell.....	24
1.5 Das Modell der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis und Gründe für die Wahl dieses Modells.....	24
1.6 Fragestellung.....	25
2 Materialien und Methoden	28
2.1 Versuchstiere.....	28
2.1.1 Die Fat-1 Maus.....	28
2.1.2 Zucht und Haltung der Versuchstiere.....	28
2.1.3 Phänotypisierung der Versuchstiere durch Gaschromatographie.....	28
2.1.3.1 Aufbau und Funktion der Gaschromatographie.....	29
2.1.3.2 Probenmessung und Datenauswertung.....	29
2.2 Gruppeneinteilung.....	30

2.3 Induktion der akuten Pankreatitis mit Cerulein.....	30
2.4 Präparation der Versuchstiere.....	31
2.5 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.....	32
2.6 Evaluation der morphologischen Veränderungen im Pankreasgewebe mittels Hämatoxylin/Eosin-Färbung und Lichtmikroskopie.....	32
2.6.1 Beurteilung der Pankreasschädigung mittels Punkteschema.....	32
2.7 Untersuchung der Serumlipase und Serumamylase als Ausdruck einer Gewebeschädigung im Pankreas.....	33
2.8 Bestimmung des IL-6-Gehaltes im Serum als Ausdruck einer beginnenden systemischen Entzündung mittels ELISA.....	33
2.8.1 Aufbau und Funktion des ELISAs.....	34
2.9 Quantifizierung der mRNA pro- und anti-inflammatorisch wirkender Entzündungsmediatoren im Pankreasgewebe mittels Echtzeit RT-PCR.....	35
2.10 Quantifizierung einer Gewebeeinfiltration der Lunge mit neutrophilen Granulozyten mittels Messung der Myeloperoxidaseaktivität.....	37
2.10.1 Myeloperoxidase-Antikörper-Färbung in der Lunge.....	37
2.11 Statistik.....	38
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Ergebnisse der lichtmikroskopisch untersuchten Gewebeschnitte der Pankreata.....	39
3.2 Ergebnisse der Messungen von Serumlipase und Serumamylase.....	44
3.3 Ergebnisse der Messungen intrapankreatischer mRNA von pro- und anti- inflammatorischen Entzündungsmediatoren mittels Echtzeit RT-PCR.....	45
3.3.1 Ergebnisse der intrapankreatischen mRNA-Expression von IL-1 β	46
3.3.2 Ergebnisse der intrapankreatischen mRNA-Expression von IL-6 und TGF- β	47
3.4 Ergebnisse der Messungen der Serumkonzentrationen von IL-6.....	48
3.5 Ergebnisse der Messungen der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe sowie der Myeloperoxidase-Antikörper-Färbung des Lungengewebes.....	50
3.5.1 Ergebnisse der Myeloperoxidase-Aktivitätsmessungen im Lungengewebe.....	50
3.5.2 Ergebnisse der Anti-Myeloperoxidase-Färbungen des Lungengewebes.....	52
4 Diskussion.....	54
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.....	54
4.2 Der Einfluss der Omega-3 Fettsäuren auf die Pankreasschädigung.....	55

4.3 Diskussion der Ergebnisse zu den Messungen intrapancreatischer Entzündungsmediatoren.....	57
4.3.1 Der Einfluss der Omega-3-Fettsäuren auf die mRNA-Expression von IL-1 β , IL-6 und TGF- β im Pankreasgewebe.....	57
4.3.1.1 Einfluss auf die mRNA Expression von IL-1 β	58
4.3.1.2 Einfluss auf die mRNA Expression von IL-6.....	59
4.3.1.3 Einfluss auf die mRNA Expression von TGF- β	60
4.4 Der Einfluss der Omega-3 Fettsäuren auf die systemische Entzündungsausbreitung im Rahmen einer akuten Pankreatitis.....	61
4.4.1 Diskussion der Ergebnisse zu den Messungen der Serumspiegel des IL-6.....	61
4.4.2 Diskussion der Ergebnisse zu den Messungen der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe sowie der Myeloperoxidase-Antikörper-Färbung des Lungengewebes.....	62
4.5 Erklärungsversuch zu der protektiven Wirkung der Omega-3-Fettsäuren auf die akute Pankreatitis in den Fat-1 Mäusen.....	63
4.6 Klinische Bedeutung der Arbeit und Ausblick.....	66
5 Zusammenfassung.....	69
6 Literatur.....	71
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	76
Eidesstattliche Versicherung.....	78
Lebenslauf.....	79
Publikationsliste.....	80
Danksagung.....	81

Abstrakt

Die akute Pankreatitis ist eine ernst zu nehmende Erkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität, die bisher rein symptomatisch behandelt wird. Eine entzündungshemmende Therapie existiert bislang nicht. Für die Zufuhr von Omega-3 Fettsäuren (n-3 Fettsäuren) konnten im Rahmen unterschiedlicher Erkrankungen (z. B. Rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Hepatitis) entzündungshemmende Wirkungen nachgewiesen werden.

Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss eines zugunsten von n-3 Fettsäuren veränderten Lipidprofils im Gewebe auf die Entzündungsausbreitung einer akuten Pankreatitis unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen. Dafür wurde erstmalig das Fat-1 Mausmodell genutzt, das durch endogen erhöhte n-3 Fettsäuren im Gewebe der Mäuse gekennzeichnet ist. Die akute Pankreatitis wurde durch das gut steuerbare Überstimulationsmodell mit Cerulein induziert.

Die Ausprägung der Erkrankung wurde anschließend auf histopathologischer und molekularer Ebene verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass Fat-1 Mäuse geringere Gewebeschäden im Rahmen einer akuten Pankreatitis ausbilden, verglichen mit Wildtyp Mäusen. Zusätzlich war das pro-inflammatorisch wirkende Zytokin IL-1 β signifikant reduziert im Pankreasgewebe der transgenen Tiere. Als Hinweis auf eine Reduktion der systemischen Entzündungsausbreitung waren das IL-6 im Serum der Fat-1 Mäuse sowie die Migration von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe dieser Tiere signifikant reduziert.

Die Arbeit belegt eine Reduktion der Gewebeschädigung und der systemischen Entzündungsausbreitung bei der akuten Pankreatitis durch ein verändertes n-3 Fettsäureprofil in dem Gewebe der Fat-1 Mäuse. Insbesondere scheint die Zytokinproduktion dadurch beeinflusst zu werden.

Diese Beobachtungen könnten Hinweise auf eine mögliche Behandlung oder Prävention der akuten Pankreatitis liefern.

Abstract

Acute Pancreatitis is a severe debilitating disease with high morbidity and significant mortality. Treatment is mostly supportive, and until now there are no clinically useful strategies for anti-inflammatory therapy.

Although omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) are known to have anti-inflammatory effects, the utility of these fatty acids in the alleviation of acute pancreatitis remained to be investigated.

The aim of this study was to examine the effect of n-3 PUFA on acute pancreatitis in a well-controlled experimental system. Therefore we used the fat-1 transgenic mouse model with endogenously increased tissue levels of n-3 PUFA and their wild-type littermates to examine their effect on cerulein-induced acute pancreatitis.

Disease activity and inflammatory status was assessed by histology and biochemical methods.

There was significantly lower pancreatic tissue necrosis, accompanied by a significantly reduced IL-1 β level in the pancreatic tissue of the fat-1 mice, both representing an alleviation of the local damage. As evidence for a reduction of systemic inflammation there were reduced levels of plasma IL-6 as well as reduced neutrophil infiltration in the lung of the fat-1 mice.

Our data provide evidence for a reduction of pancreatic tissue damage and systemic inflammation by increasing the tissue content of omega-3 polyunsaturated fatty acids. These results suggest a therapeutic potential for n-3 PUFA supplementation for the reduction of acute pancreatitis.

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Ätiologie und Pathogenese der akuten Pankreatitis

Die akute Entzündung der Bauchspeicheldrüse (akute Pankreatitis) ist eine insgesamt eher seltene Erkrankung, die jedoch in 9-20% zum Tode führt und dadurch ein ernst zu nehmendes Problem darstellt [1]. Die Inzidenz der akuten Pankreatitis liegt in der westlichen Bevölkerung bei 5-25 Fällen pro Jahr pro 100.000 Einwohner. Das Spektrum der Erkrankung reicht von der häufigeren ödematösen Form bis hin zu der akuten nekrotisierenden Pankreatitis. Während die ödematöse Form eine milde Entzündungsform darstellt, die lokal begrenzt ist und im Regelfall folgenlos ausheilt, kann die schwere, nekrotisierende Form dieser Erkrankung mit systemischen Komplikationen einhergehen, zu Multiorganversagen und bis zum Tode führen.

Die akute Pankreatitis in der schweren nekrotisierenden Form stellt aufgrund ihrer systemischen Ausbreitung und der daraus resultierenden hohen Mortalität eine große therapeutische Herausforderung dar. Bisher ist die Behandlung der Erkrankung rein symptomatisch, da klinisch anwendbare Strategien zur Bekämpfung der Erkrankung und Eindämmung der Entzündungsreaktionen noch nicht existieren. Es ist wichtig, die Mechanismen zu verstehen, die zum Übergang der lokal begrenzten Entzündungsform in die systemische Form führen, um hier therapeutisch angreifen zu können. Erst die systemische Ausbreitung der Entzündung führt zu ernstesten Komplikationen wie einer Sepsis, akutem Lungenversagen, Multiorganversagen.

Führend in der Liste der Ursachen für eine akute Pankreatitis sind ein bilärer Aufstau durch Choledochussteine oder eine Stenose der Papilla Vateri (60%) und Alkoholabusus (30%) [1]. Andere Ursachen können Virusinfektionen (z. B. Mumps), Autoimmunerkrankungen (Systemischer Lupus Erythematodes), Medikamente (z. B. Azathioprin, Aspariginase, Glukokortikoide, ACE-Hemmer), Pankreasanomalien (Pancreas divisum), Stoffwechselstörungen (z. B. Hyperlipidämie, Hyperparathyreoidismus) und Traumen sein. Selten tritt die akute Pankreatitis auch als Komplikation einer endoskopisch retrograden Cholangiopankreatographie (ERCP) auf.

Unabhängig von der Ätiologie münden die unterschiedlichen Formen der Bauchspeicheldrüsenentzündung in denselben Reaktionsweg. Dieser läuft in 3 Phasen ab:

1. eine lokale Entzündungsreaktion im Pankreasgewebe,
2. eine systemische Entzündungsausbreitung,
3. eine generalisierte Sepsis inklusive aller damit verbundenen

Komplikationen. Die Erkrankung kann in jedem dieser drei Stadien sistieren, am häufigsten heilt sie, entsprechend dem ersten Stadium, als milde, lokal begrenzte Pankreatitis aus. Welche Faktoren dafür verantwortlich sind, ob die Erkrankung in der ersten Phase ausheilt oder in eines der Folgestadien übergeht, ist nicht abschließend geklärt. Da die lebensbedrohlichen Komplikationen erst in den Stadien 2 und 3 auftreten, ist das Bestreben groß, die an dieser Ausbreitung beteiligten Mechanismen zu verstehen. Mittels des neu erworbenen Wissens könnten kausale Therapieansätze zur Eindämmung der Erkrankung entwickelt werden.

Am Anfang der Erkrankungsentstehung steht eine Zellschädigung im Pankreasgewebe durch eine der oben genannten Noxen. Anschließend läuft dieselbe Reaktionskette ab, an deren Beginn die frühzeitige Aktivierung inaktiver Vorstufen von Verdauungsenzymen in den Azinuszellen der Bauchspeicheldrüse steht. Zunächst wird Trypsinogen zu Trypsin aktiviert, dieses überführt weitere Verdauungsenzyme in ihre aktiven Formen (z. B. Elastase und Phospholipase A2). Die aktiven Verdauungsenzyme führen zu einer Azinuszellschädigung und zu einer Autodigestion des Pankreasgewebes [2]. Aus den Azinuszellen werden pro-inflammatorisch wirkende Botenstoffe (Zytokine) frei, die zu einer Rekrutierung (Einwanderung) von Entzündungszellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in das Pankreasgewebe führen. Die angelockten und aktivierten Entzündungszellen richten sich gegen das Pankreasgewebe, es kommt zu einer lokalen Zerstörung des Gewebes. Zusätzlich sezernieren die aktivierten Entzündungszellen weitere Zytokine. Es werden sowohl pro-inflammatorische (z. B. IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α) als auch anti-inflammatorische (z. B. IL-10, IL-1-Rezeptorantagonist) Botenstoffe ausgeschüttet, die die Entzündungsreaktion durch hemmende und fördernde Einflüsse eindämmen sollen [3].

Im Rahmen der akuten Pankreatitis kommt es dabei zu einem Ungleichgewicht zugunsten der entzündungsfördernden Stoffe, so dass die Entzündung zunächst die Grenzen des Pankreas überschreiten und sich schließlich im gesamten Organismus ausbreiten kann. In der Klinik macht sich die systemische Ausbreitung bemerkbar als generalisierte systemische Infektion (SIRS = Systemic Inflammatory Response Syndrome), die in eine Sepsis mit Multiorganversagen münden kann. Eine weitere typische Komplikation, die sowohl am Patienten als auch im Tiermodell beobachtet werden kann, ist die Affektion der Lunge im Sinne eines ARDS (acute respiratory distress syndrome).

Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Mechanismen, die an der Entstehung der akuten Pankreatitis beteiligt sind, näher erläutert.

1.1.1 Die Trypsinogenaktivierung

Die Trypsinogenaktivierung in den Azinuszellen des Pankreas stellt das Schlüsselereignis in der Entstehung der akuten Pankreatitis dar. Durch einen gestörten Sekretionsmechanismus werden die in den Azinuszellen gebildeten Verdauungsenzyme intrazellulär in ihre aktive Form überführt. Diese Aktivierung führt zu der primären Schädigung der Azinuszellen, die am Beginn der entzündungsausbreitenden Reaktionskette steht. Die Schlüsselrolle der Enzymaktivierung konnte durch in vitro Studien bestätigt werden [4], in denen nach Injektion des Cholezystokininanalogons Cerulein eine Trypsinogenaktivierung schon deutlich früher nachweisbar war als andere Pankreatitismarker wie Hyperamylasämie, Pankreasödem und Azinuszellvakuolen. Zusätzlich führte eine Vorbehandlung mit Trypsinogen-Inhibitoren zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion und verhinderte die Azinuzellschädigung [4].

Für die intrazelluläre Aktivierung des Trypsinogens müssen mehrere Schutzmechanismen der Zelle umgangen werden. In den Zellorganellen herrscht ein pH-Wert, der für die Enzymaktivierung nicht ideal ist. Außerdem sorgen Trypsininhibitoren und Proteasen normalerweise für den Abbau frühzeitig aktivierter Verdauungsenzyme [3].

Es wird vermutet, dass die Trypsinogenaktivierung erst durch eine Kolo-kalisation von Trypsinogen und lysosomalen Enzymen wie Cathepsin-B möglich wird. In Studien konnte gezeigt werden, dass durch den Cathepsin-B Inhibitor E-64d eine Cerulein-abhängige Trypsinogenaktivierung in vitro vollständig verhindert werden kann [5] und in Cathepsin-B knockout Mäusen wurde, im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen, eine 80% geringere Trypsinogenaktivierung und 50% geringere Pankreasschädigung gemessen [6].

Ein zweiter entscheidender, zur Zellzerstörung führender Mechanismus scheint der Verlust der Sekretionsfunktion der Azinuzelle zu sein. In einer in vitro Studie führte die Gabe supramaximal stimulierender Ceruleinkonzentrationen zu einer Zerstörung des Zytoskeletts und damit assoziierter Intermediärfilamente. Diese Komponenten sind an der Sekretion beteiligt, so dass diese Funktion verloren geht [7]. Erst der Verlust der Sekretionsfunktion stellt die Voraussetzung für die intrazelluläre Aktivierung der Verdauungsenzyme dar.

1.1.2 Die Rolle der Zytokine

In der Einführung wurde erläutert, welche zentrale Rolle die aus den Azinus- und Entzündungszellen sezernierten Botenstoffe in der Ausbreitung der Entzündung einnehmen. Physiologischerweise führt die Regulation durch pro- und anti-inflammatorische Zytokine zu einer lokalen Eindämmung der Entzündung auf das ursprünglich betroffene Organ. Erst durch

ein Ungleichgewicht zwischen den beiden Zytokingruppen werden die Überschreitung der Organgrenze und die anschließende systemische Ausbreitung der Entzündung mit ihren lebensbedrohlichen Komplikationen möglich.

Zytokine sind eine große Gruppe niedermolekularer Proteine, die von einer Vielzahl von Zellen gebildet werden. Sie wirken mit an der Regulierung der komplexen Funktionen des Abwehrsystems, wobei sie hauptsächlich als Botenstoffe zwischen den zahlreichen an der Abwehr beteiligten Zellen agieren und deren Funktion durch Aktivierung und Hemmung regulieren. Unter normalen Bedingungen sind Zytokine nicht im Gewebe nachweisbar, sie werden als Reaktion auf einen Stimulus produziert. Die Produktion ist dabei streng durch sogenannte Transkriptionsfaktoren (z. B. NFkappaB) reguliert. Ihre Wirkung entfalten die Zytokine durch Bindung an spezifische Rezeptoren, somit sind einzelnen Botenstoffen spezifische Wirkungen zugeschrieben.

Im folgenden Abschnitt werden einige Zytokine und ihre Funktionen beschrieben, die einen Einfluss auf die Ausbreitung der akuten Pankreatitis zu haben scheinen und in dem Versuchsteil unserer Arbeit erneut von Relevanz sein werden.

Interleukin 1 (IL-1)

Zu der Familie des Interleukin 1 (IL-1) gehören IL-1 α , IL-1 β und IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra). IL-1 wird vorrangig in Monozyten und Makrophagen gebildet und gilt als ein hochpotentes pro-inflammatorisches Zytokin, dessen Wirkung über die Interleukin 1 Rezeptoren I und II vermittelt werden. Im Allgemeinen vermittelt IL-1 die Induktion einer akuten Phase Entzündung, die Entstehung von Fieber und die Synthese anderer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α , IL-8 [8].

Im Rahmen der akuten Pankreatitis gilt IL-1 als eines der Schlüsselzytokine und ist maßgeblich an der Ausbreitungskaskade der Entzündung beteiligt. Es aktiviert das Endothel im Pankreasgewebe und ermöglicht dadurch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und ihre Degranulation in das Gewebe [1].

Es existieren in vitro und in vivo Studien, die nachweisen konnten, dass IL-1 in der frühen Phase der akuten Pankreatitis erhöht ist und die Ausbreitung der Entzündung begünstigt [9].

In einer tierexperimentellen Studie von Fink et. al konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expression von IL-1 β in dem Pankreasgewebe der Versuchstiere parallel zu dem Ausmaß der Pankreatitis anstieg [10].

In IL-1 knockout Mäusen mit induzierter akuter Pankreatitis wurde eine Reduktion der Pankreaszerstörung, der Entzündungsmarker und der Mortalität beobachtet, verglichen mit normalen Mäusen [11]. Ebenso reduzierte die intraperitoneale Gabe von IL-1-Rezeptorantagonisten bei Mäusen mit durch Cholinmangeldiät ausgelöster akuter Pankreatitis signifikant die Mortalität, die histologisch sichtbare Gewebeerstörung sowie nachweisbare Entzündungsmarker [1].

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) wird von einer Vielzahl an Zellen des Abwehrsystems gebildet und sezerniert. Durch seine Interaktion mit vielen anderen Zytokinen (u. a. IL-1, IL-6, PAF) spielt er eine zentrale Rolle in der Entstehung von Entzündungsreaktionen [1]. Er gilt als einer der Schlüsselmediatoren in der Entstehung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Da dieses Zytokin eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit hat (~15 Minuten), ist es schwer im peripheren Blut nachzuweisen. Sehr geringe oder fehlende Plasmaspiegel sind somit nicht gleichbedeutend mit einem geringen Vorkommen des Botenstoffs in entzündeten Geweben. Trotz des erschwerten Nachweises existieren zahlreichen Studien, die erhöhte TNF- α -Werte bei Patienten mit akuter Pankreatitis nachweisen konnten [12]. In experimentellen Studien mit Ratten konnte gezeigt werden, dass eine TNF- α -Inhibition die gemessenen Entzündungsmarker, das pankreatische Ödem und die Mortalität der Versuchstiere signifikant reduzieren konnte [13].

Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin, das in zahlreichen Entzündungszellen gebildet wird und als früher Marker einer Entzündungsreaktion gilt. Dieses Zytokin wird nachweislich nach Induktion einer akuten Pankreatitis im Pankreasgewebe gebildet [9]. In experimentellen Studien waren hohe IL-6 Spiegel mit schweren Verläufen einer akuten Pankreatitis und mit dem Auftreten einer Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung vergesellschaftet. Im Serum ist IL-6 schon früher nachweisbar als der bislang im klinischen Alltag etablierte Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP), so dass die Messung der IL-6 Spiegel in Zukunft die Bestimmung des CRP ersetzen könnte. Weitere Studien wären notwendig, um zu klären, ob der IL-6-Serumspiegel ein in der Klinik verwendbarer Parameter sein könnte, die Schwere einer akuten Pankreatitis einschätzen und frühzeitiger mit einer adäquaten Therapie beginnen zu können [1].

Transforming growth factor beta (TGF- β)

Der Transforming growth factor beta (TGF- β) ist ein anti-inflammatorisch wirkendes, multifunktionales Zytokin mit Effekten auf fast alle Gewebe. TGF- β beeinflusst die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung. Versuche mit TGF- β knockout Mäusen zeigen, dass der Wegfall dieses Zytokins zu massiven Entzündungsreaktionen in verschiedenen Organsystemen führt. Unter anderem kommt es auch im Pankreas zu massiven entzündlichen Infiltraten. TGF- β knockout Mäuse sind nachweislich anfälliger für eine Cerulein-induzierte akute Pankreatitis. Diese tritt früher und in größerem Ausmaß auf als bei normalen Vergleichsmäusen [14].

1.1.3 Die Rolle der Entzündungszellen

Einen weiteren wichtigen Bestandteil der zur akuten Pankreatitis führenden Reaktionskette bilden die Entzündungszellen des Abwehrsystems. Die Azinuszellen sezernieren nach dem Kontakt mit der auslösenden Noxe Botenstoffe, die insbesondere Makrophagen und neutrophile Granulozyten in das Pankreasgewebe rekrutieren. Diese Entzündungszellen werden aktiviert und richten sich entweder direkt gegen das Pankreasgewebe mit daraus resultierender Gewebeschädigung oder sezernieren weitere pro-inflammatorische Zytokine und begünstigen dadurch eine systemische Manifestation der Erkrankung.

Im Rahmen einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis wurde der Einfluss der Entzündungszellen auf die Entzündungsausbreitung beginnend untersucht. In einer Versuchsreihe an Mäusen führte eine Hemmung der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Pankreasgewebe während der Entstehungsphase der Erkrankung zu einer deutlichen Reduktion des Ausmaßes der Pankreatitis und der Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung [15]. In einer Versuchsreihe mit Ratten führte die isolierte Hemmung der Einwanderung von Makrophagen in das Pankreasgewebe während der Entstehungsphase zu einem entsprechenden Ergebnis [16].

1.1.4 Die Mechanismen des Zelltodes

Die zwei im Rahmen einer akuten Pankreatitis vorkommenden Mechanismen des Zelltodes sind Apoptose und Nekrose. Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet und ist notwendig, um ein Gleichgewicht zwischen Zellaufbau und Zellabbau im lebenden Gewebe herzustellen. Sie ist physiologisch, kann aber auch unter pathologischen Bedingungen vorkommen. Typische morphologische Veränderungen im Rahmen der Apoptose sind das Einschrumpfen der Zelle und eine Kondensation des Chromatins im Zellkern. Dabei kommt es

nicht zum Austritt von intrazellulär gelegenem Material in die Umgebung, wodurch nur eine minimale Entzündungsreaktion in der Umgebung folgt.

Die Nekrose ist im Gegensatz zur Apoptose ein rein pathologisches Phänomen. Dabei kommt es zu einer Dysfunktion der Mitochondrien, zum Anschwellen der gesamten Zelle und schließlich zur Ruptur der Zellmembran mit Austreten der intrazellulären Komponenten in den Extrazellularraum. Dieser Austritt führt zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion in der Umgebung [3].

Die den unterschiedlichen Formen des Zelltodes (Apoptose und Nekrose) zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher nicht vollständig verstanden, aber gewinnen in der Forschung über die akute Pankreatitis zunehmend an Bedeutung. Das liegt vor allem daran, dass die Entstehung von Pankreasnekrosen im Rahmen dieser Erkrankung ein Schlüsselereignis darstellen und großen Einfluss auf die Prognose der Patienten hat (siehe dazu Einteilung der akuten Pankreatitis im Abschnitt 1.1) [3]. Es existiert die einheitliche Vermutung, dass Strategien zur Hemmung oder Vermeidung der Nekroseentstehung im Pankreasgewebe die Prognose der Patienten maßgeblich verbessern könnte. Folglich gilt es, die Mechanismen der Nekroseentstehung besser zu verstehen. Denkbare therapeutische Ansätze sind eine vollständige Hemmung der Nekroseentstehung, ein Wechsel von Nekroseentstehung zu Apoptoseentstehung, um die Entzündungsreaktion in dem umliegenden Gewebe zu reduzieren oder sogar die bisher besser verstandene Apoptose therapeutisch zu adressieren [17, 18].

1.2 Die Pankreatitis-assoziierte Lungenschädigung

In den vorangehenden Abschnitten wurde bereits auf mögliche systemische Komplikationen im Rahmen einer akuten Pankreatitis eingegangen. Eine typische Komplikation, die sowohl in der Klinik als auch im Tiermodell beobachtet werden kann, ist das ARDS (acute respiratory distress syndrome) [19]. Die Beteiligung der Lunge am Entzündungsgeschehen ist Ausdruck einer systemischen Ausbreitung der Entzündung und wird in tierexperimentellen Studien häufig mit untersucht, um die Schwere einer akuten Pankreatitis einschätzen zu können. Ausgelöst wird das ARDS durch Botenstoffe, die auf der Ebene des Pankreas in die Blutbahn gelangen und dann in der Lunge ihre Wirkung entfalten.

Die Inzidenz von pulmonalen Komplikationen bei Patienten mit akuter Pankreatitis variiert zwischen 15 und 55%, wobei das Spektrum von einer leichten Hypoxie ohne radiologisch sichtbares Korrelat in der Lungenröntgenaufnahme bis zum Vollbild des ARDS reicht [20]. Zu

den typischen Symptomen/radiologischen Veränderungen bei einer Lungenbeteiligung gehören Pleuraergüsse, pulmonale Infiltrate, alveoläre Ödeme und eine Hypoxie. Diese sind wahrscheinlich durch eine erhöhte Permeabilität der Lungengefäße bedingt. Die Bedeutung der pulmonalen Beteiligung wird in einer Studie deutlich, die belegt, dass 50% der Todesfälle im Rahmen einer akuten Pankreatitis mit schweren Schäden des Lungenparenchyms assoziiert sind [21]. Daher werden die der Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung zugrunde liegenden Mechanismen verstärkt im Tiermodell untersucht, um auch hier Strategien einer gezielten Therapie entwickeln zu können.

Der genaue Pathomechanismus der Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung ist bisher nicht geklärt. Mit Hilfe von tierexperimentellen Studien konnten aber eine Vielzahl von beteiligten Mechanismen identifiziert werden, von denen die Wichtigsten im folgenden Abschnitt erläutert werden:

1) Die Rolle der Zytokine: Eine entscheidende Rolle in der Entstehung der Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung nehmen die nun schon mehrfach erwähnten Zytokine ein. Zum Beispiel entwickeln Mäuse, die durch Enzymhemmung die Fähigkeit verlieren, IL-1 β zu sezernieren, keine akute Pankreatitis mit begleitender Lungenschädigung [11]. In einer kombinierten IL-1 β - und TNF- α -knockout Maus führte die i.v. Injektion von sterilem, zytokinfreiem Aszites aus Ratten mit akuter Pankreatitis zu keiner Induktion einer Lungenschädigung, während Wildtyp Mäuse mit derselben Behandlung erkrankten [22]. Diese Entdeckung belegt, dass IL-1 β und TNF- α nötig sind für die Ausbreitung der Entzündung aus dem Pankreas in die Lunge.

Einen schützenden Einfluss hat das anti-inflammatorisch wirkende Zytokin IL-10. In IL-10-knockout Mäusen ist sowohl die akute Pankreatitis als auch die begleitende Lungenschädigung signifikant stärker ausgeprägt als in Wildtyp Mäusen [23].

2) Die Rolle der Chemokine: Chemokine sind eine weitere Gruppe von Botenstoffen, die an der systemischen Entzündungsausbreitung im Rahmen der akuten Pankreatitis beteiligt sind. Es handelt sich um kleine Signalproteine, die chemotaktisch auf Entzündungszellen wirken, also eine Wanderbewegung von Entzündungszellen in bestimmte Gewebe auslösen. Sie können hemmenden oder aktivierenden Einfluss auf bestimmte Entzündungszellen ausüben und sind somit an der komplexen Regulation des Abwehrsystems beteiligt. Die Chemokine wirken über spezielle Chemokinrezeptoren. Untersuchungen einer dieser Rezeptoren, dem Chemokin-1-Rezeptor, belegen die Beteiligung dieser Botenstoffe an der Entzündungsausbreitung in das

Lungengewebe im Rahmen einer akuten Pankreatitis. So konnte in einer Gruppe von Mäusen, die keinen Chemokin-1-Rezeptoren besitzen, durch Injektion von Cerulein zwar eine vergleichbar stark ausgeprägte akute Pankreatitis ausgelöst werden, die Pankreatitis-assoziierte Lungenschädigung war jedoch signifikant geringer ausgeprägt im Vergleich zu einer Wildtyp-Referenzgruppe [24]. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die im Rahmen der Entzündungsreaktion auf Pankreasebene freigesetzten Chemokine zu einer Einwanderung zirkulierender Entzündungszellen in das Lungengewebe führen. Die Tatsache, dass die induzierte Pankreatitis in den Vergleichsgruppen gleich stark ausgeprägt ist, während die begleitende Lungenschädigung isoliert gebessert ist, spricht dafür, dass hier ein Mechanismus gehemmt wurde, der nicht die Entstehung der lokalen Entzündung beeinflusst, sondern allein die gefürchtete systemische Ausbreitung.

3) Die Rolle der Pankreasenzyme: Im Rahmen der Zellschädigung im Pankreas kommt es zu einer systemischen Freisetzung der Pankreasenzyme Phospholipase A2, Elastase und Trypsin. Von der Phospholipase A2 existieren 2 Formen: Typ 1 wird von der Bauchspeicheldrüse gebildet, Typ 2 dient als Mediator in der Akute-Phase-Reaktion. Im Pankreas induziert die Phospholipase A2 durch die Umwandlung des Phospholipids Lecithin in das toxische Lysolecithin eine Zellnekrose. Analog dazu scheint das Enzym nach Freisetzung aus dem Pankreas zu einer Schädigung des Surfactants in der Lunge zu führen, da auch hier Phospholipide verbaut sind, die von der Phospholipase A2 umgesetzt werden können [25]. In tierexperimentellen Studien führte die intrabronchiale Gabe von Phospholipase A2 zu einer Schädigung der Lunge und in klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis die Serumspiegel von Phospholipase A2 mit der Schwere der Lungenschädigung korrelierten [26]. Die anderen Enzyme, die in der Pathophysiologie der Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung eine Rolle zu spielen scheinen, sind Elastase und Trypsin. Die systemische Gabe von pankreatischer Elastase bei Mäusen induziert einen pulmonalen Schaden. Diese Schädigung wird über eine Aktivierung von NFκB und TNF-α vermittelt und ist durch ein Infiltrat aus neutrophilen Granulozyten und eine erhöhte Lungengefäßpermeabilität charakterisiert [27]. Einen entsprechenden Effekt hat die intravenöse Gabe von Trypsin in Schafen [22]. Nach Injektion von Aszites, gewonnen aus Ratten mit akuter Pankreatitis, in gesunde Tiere entwickelten diese ebenfalls einen Lungenschaden mit erhöhter Genexpression von TNF-α, IL-6 und IL-1β [22].

4) Die Rolle der Entzündungszellen: In klinischen und tierexperimentellen Studien wurde ein Infiltrat mit neutrophilen Granulozyten als Charakteristikum der Lungenbeteiligung im Rahmen der akuten Pankreatitis nachgewiesen. Die Gabe von antineutrophilem Serum bei Mäusen, die an einer cholinmangeldiät-induzierten akuten Pankreatitis erkrankt waren, konnte die Entstehung der Lungenschädigung vollständig vermeiden und milderte die Entzündung insgesamt ab [28]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass die Einwanderung der Entzündungszellen durch eine Hochregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) begünstigt wird. Dieses Molekül ist unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur sehr schwach exprimiert. Im Rahmen einer induzierten akuten Pankreatitis ist ICAM-1 im Pankreas, im Lungengewebe und im Serum erhöht. In ICAM-1-knockout Mäusen wurde eine weniger stark ausgeprägte Pankreatitis und Pankreatitis-assoziierte Lungenschädigung beobachtet [29, 30].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass an der Ausbreitung der akuten Pankreatitis auf die Lunge und andere Organsysteme diverse Mechanismen beteiligt sind, die bisher nur unvollständig verstanden sind. Zu den wichtigsten Mechanismen gehören, wie oben erläutert, ein komplexes Zusammenspiel pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, die Chemokine, die Entzündungszellen, die aus der Bauchspeicheldrüse freigesetzten Verdauungsenzyme. Es ist wichtig, die einzelnen Mechanismen und ihr Zusammenspiel genauer zu verstehen, um Therapieansätze finden zu können, die die systemische Ausbreitung der Entzündung mit ihren ernststen Folgen verhindern könnten. Bisher ist es mehrfach gelungen, die Entstehung einer Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung im Tiermodell durch Hemmung z. B. der Verdauungsenzyme oder spezifischer Zytokine abzumildern bzw. zu verhindern. Jedoch konnte dies in klinischen Studien nicht wiederholt werden. Diese Beobachtung ist Ausdruck der Komplexität der beteiligten Mechanismen im menschlichen Organismus und verdeutlicht, wie wichtig weitere Untersuchungen in diesem Bereich sind.

1.3 Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren

1.3.1 Aufbau und Vorkommen

Die Omega-3- (n-3-) und Omega-6- (n-6-) Fettsäuren gehören zu der Gruppe der essentiellen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids = PUFA). Mehrfach ungesättigt bedeutet in diesem Zusammenhang, dass mehr als eine Doppelbindung in der Fettsäure vorhanden sind. Essentiell werden Fettsäuren dann genannt, wenn mindestens eine dieser Doppelbindungen distal des 9. C-Atoms liegt, da der menschliche Organismus nicht in der Lage ist, Doppelbindungen hinter dem 9. C-Atom zu synthetisieren und diese Fettsäuren allein über

die Nahrung aufgenommen werden müssen. Man benennt die PUFAs nach der Position ihrer ersten Doppelbindung. Dabei beginnt man am Ende der Kohlenstoffkette, entfernt von der Carboxylgruppe, zu zählen. Auf diese Weise unterscheidet man z. B. n-3-, n-6-, n-9-PUFAs.

Die PUFAs sind als Bestandteil von Phospholipiden am Aufbau von Zellmembranen beteiligt. Dabei sind sie so ausgerichtet, dass ihr hydrophiler Kopf nach außen und der lipophile Schwanz in das Zellinnere zeigen. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen dienen die Fettsäuren als Ausgangsprodukte zur Herstellung von entzündungsregulierenden Botenstoffen, den Eicosanoiden.

Zu den wichtigsten Vertretern der Omega-3-Fettsäuren gehören die α -Linolensäure (ALA 18:3 n-3), die Eicosapentaensäure (EPA 20:5 n-3) und die Docosahexaensäure (DHA 22:6 n-3). Die häufigste dieser drei Vertreter ist die α -Linolensäure, sie kommt in allen photosynthetisch aktiven Geweben vor. Sie ist z. B. in Leinsamen, Hanföl, Walnussöl, Rapsöl, Algen, Moosen, Farnen enthalten. Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure kommen vor allem in Kaltwasserfischen (z. B. Makrele, Lachs, Thunfisch, Sardellen, Sardinen) vor.

Zwei der wichtigsten Vertreter der Omega-6-Fettsäuren sind die Linolsäure (LA 18:2 n-6) und Arachidonsäure (AA 20:4 n-6). Die Linolsäure kommt in Pflanzenölen vor. Arachidonsäure ist hauptsächlich in tierischen Produkten enthalten und wird vom Menschen über diesen Weg aufgenommen. Durch Dehydrierung und Kettenverlängerung kann aus Linolsäure Arachidonsäure gebildet werden, was diese zu einer bedingt essentiellen Fettsäure macht.

Die Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren werden vom Menschen allein über die Nahrung aufgenommen. Das Verhältnis der beiden Fettsäuregruppen in Geweben zueinander hängt davon ab, in welchen Mengen sie aufgenommen werden. In prähistorischen Zeiten war das Verhältnis von Omega-3- zu Omega-6-Fettsäuren in der Nahrung wahrscheinlich ausgeglichen (1:1). Durch Veränderungen sowohl in der Landwirtschaft als auch den Essgewohnheiten hat sich dieses Verhältnis deutlich zugunsten der Omega-6-Fettsäuren verschoben und liegt heute in der westlichen Welt bei 15-20:1 [31]. Diese Veränderung ist von Bedeutung, da aus den Fettsäuren die Eicosanoide gebildet werden, eine Gruppe von Signalstoffen, die eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen spielen. Dazu gehören die Prostaglandine, Prostazykline, Thromboxane, Leukotriene, Resolvine. Generell werden den Abkömmlingen (Derivaten) der Omega-6-

Fettsäuren ein pro-inflammatorischer Charakter zugeschrieben, denen der Omega-3-Fettsäuren ein anti-inflammatorischer Charakter.

Durch das veränderte Verhältnis der Fettsäuren in der Nahrung zueinander stehen deutlich mehr Omega-6-Fettsäuren als Ausgangsstoffe für die Bildung der Eicosanoide zur Verfügung, es werden überwiegend Derivate der Omega-6-Fettsäuren gebildet. Nachweislich wird dadurch die Entstehung entzündlicher Prozesse im Organismus begünstigt [32].

1.3.2 Der Einfluss von Omega-6-Fettsäuren und ihrer Derivate auf Entzündungsprozesse

Der wichtigste Vertreter der Omega-6-Fettsäuren, in Bezug auf die Bildung von Entzündungsmediatoren, ist die Arachidonsäure (AA). Sie kommt in veresterter Form als Lipidbestandteil vor allem in Zellmembranen vor. Durch das Enzym Phospholipase A2 kann sie durch spezifische Stimuli aus den Zellmembranen herausgelöst werden und dient dann als Ausgangsstoff für unterschiedliche aktive Mediatoren. Für die weitere Metabolisierung stehen 2 Wege zur Verfügung:

Über die Cyclooxygenasen entstehen aus AA die Prostaglandine (PGs) und Thromboxane der 2er Serie. Von der Cyclooxygenase existieren mindestens 2 Isoenzyme, die Cyclooxygenase-1 (COX-1) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2). Während die COX-1 kontinuierlich in allen Geweben exprimiert wird, wird COX-2 bei Fieber, Schmerzen oder im Rahmen von Entzündungsreaktionen durch Zellen des Immunsystems gebildet. In dem ersten Reaktionsschritt entsteht aus AA das Prostaglandin G2 (PGG2). Aus PGG2 wird in einem weiteren Schritt PGH2 gebildet, das in Abhängigkeit von dem Zell- und Gewebetyp durch spezifische Synthasen zu PGD2, PGF2, PGE2, PGI2 und Thromboxan A2 metabolisiert werden kann. Diese aktiven Mediatoren entfalten ihre Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Je nach Gewebe führt die Bindung an die Rezeptoren zu einer Auslösung bzw. Verstärkung von Entzündungsreaktionen, zu einer Vasokonstriktion, Thromboseentstehung oder einer Verstärkung der Schmerzwahrnehmung.

Eine zweite Gruppe von Mediatoren, die aus der AA entstehen, sind die Leukotriene (LTs). Sie werden durch die 5-Lipoxygenase (5-LOX) gebildet. Zunächst entsteht aus AA das Zwischenprodukt 5-Hydroperoxy-Eicosatetraensäure (5-HPETE), das hohe chemotaktische Aktivität besitzt und weiter zum Leukotrien A4 verstoffwechselt wird. Leukotrien A4 (LTA4) ist eine sehr instabile Verbindung und dient als Ausgangsprodukt für die Biosynthese diverser Leukotriene. Die Rolle dieser Mediatoren steht im Zusammenhang mit allergischen und entzündlichen Reaktionen des Körpers und ihre Wirkung wird, wie bei den Prostaglandinen,

durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Die einzelnen aktiven Mediatoren verursachen sehr unterschiedliche Wirkungen. LTB₄ wirkt chemotaktisch auf Leukozyten und Makrophagen, wodurch in der Folge eine Ansammlung neutrophiler Granulozyten entsteht. Desweiteren vermittelt es eine Vasokonstriktion und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität in dem betroffenen Gewebe [33]. Die Leukotriene LTC₄, LTD₄, LTE₄ wirken dagegen stark bronchokonstriktorisch und provozieren die Entstehung eines submukösen Ödems [31]. Sie sind von Bedeutung in der Entstehung des Asthma bronchiale. Die Leukotriene gelten als hochpotente pro-inflammatorische Mediatoren.

Eine relativ neu entdeckte Gruppe von Lipidmediatoren, die aus der AA entstehen, sind die Lipoxine. Diese Mediatoren entstehen durch Zell-Zell-Interaktionen und durch Transformation unterschiedlicher Lipoxygenasen. Als Ausgangsstoff dient auch hier das Leukotrien A₄, das durch die 5-LOX aus AA entsteht. In Thrombozyten wird es zu dem Lipoxin LXA₄ umgewandelt. Die Lipoxine zeigen deutliche anti-inflammatorische Wirkungen. Dazu gehören die Hemmung der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, der Entzündungszellproliferation und -migration [31].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Prostaglandine und Leukotriene, als Derivate der wichtigsten Omega-6-Fettsäure AA, überwiegend entzündungsfördernd wirken, während die Lipoxine eine Gruppe von AA-Derivaten bilden, die entzündungshemmende Wirkungen vermitteln.

1.3.3 Der Einfluss von Omega-3-Fettsäuren und ihrer Derivate auf Entzündungsprozesse

Für die Bildung von Entzündungsmediatoren sind aus der Gruppe der Omega-3 Fettsäuren vor allem die Eicosapentaensäure (EPA 20:5 n-3) und die Docosahexaensäure (DHA 22:6 n-3) von Bedeutung.

Durch die Cyclooxygenasen werden aus EPA und DHA Prostaglandine der 3er Serie und Thromboxan A₃ synthetisiert. Für Thromboxan A₃ konnte gezeigt werden, dass es deutlich weniger gerinnungshemmende Wirkung aufweist als das von der AA abstammende Thromboxan A₂ [34]. Für Prostaglandin E₃ konnte gezeigt werden, dass es die Proliferation von Tumorzellen inhibieren kann [31]. Generell wird den Prostaglandinen der 3er Serie anti-inflammatorisches Potential zugesprochen, was sich im Versuch durch eine verminderte Vasodilatation und eine Reduktion der Ödementstehung zeigte [35].

Die Lipoxygenasen führen zur Bildung von Leukotrienen der 5er Serie. Auch diese Stoffgruppe wirkt, verglichen mit den Leukotrienen der 4er Serie aus AA, weniger chemotaktisch auf Entzündungszellen und weniger bronchokonstriktorisch [36].

Ebenfalls relativ neu entdeckt ist die Gruppe der Resolvine (Rv) und Protectine, eine Gruppe von Lipidmediatoren aus Omega-3-Fettsäuren, die analog zu den Lipoxinen durch Zell-Zell-Interaktionen entstehen. Als Mediatoren der DPA konnten bisher die Resolvine RvD1 bis RvD6, Neuroprotektin D1 (NPD1) und Protektin D1 (PD1) identifiziert werden. In verschiedenen Studien konnten für diese Mediatoren anti-inflammatorische Effekte sowohl in vivo als auch in vitro bestätigt werden. Als Derivat der EPA wurde das Resolvin RvE1 identifiziert. Für RvE1 konnte ein spezifischer Rezeptor und die darüber vermittelte Wirkung identifiziert werden. Über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor ChemR23 wird durch TNF- α die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B und die Bildung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 reduziert. In Studien zeigt sich RvE1 als potenter anti-inflammatorisch und anti-migratorisch wirkender Mediator [37, 38].

Auf einen protektiven Effekt der Omega-3-Fettsäuren wurde 1944 erstmalig der britische Forscher Hugh M. Sinclair indirekt aufmerksam, als er beobachtete, dass die Inzidenzen von kardiovaskulären und degenerativen Erkrankungen in der Population von kanadischen Eskimos signifikant niedriger war als in der westlichen Welt. Diese Beobachtung führte er auf den hohen Fischkonsum dieser Bevölkerungsgruppe zurück. Heute ist bekannt, dass die im Fisch enthaltenen Omega-3-Fettsäuren EPA und DHA für diesen protektiven Effekt verantwortlich sind. Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass durch eine Omega-3-Supplementierung eine antithrombotische, kardioprotektive und anti-entzündliche Wirkung vermittelt wird. Das Risiko für den plötzlichen Herztod wird durch einen günstigen Omega-3-Index signifikant gesenkt, Herzrhythmusstörungen sind seltener, die Inzidenz von Schlaganfällen wird gesenkt und auch die Ausprägung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Rheumatoider Arthritis konnte signifikant reduziert werden [39, 40, 41].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein vermehrtes Vorkommen von Omega-3 Fettsäuren in Geweben wahrscheinlich zu einer vermehrten Produktion der Omega-3-Derivate führt. Diese Mediatoren wirken nachweislich entweder direkt entzündungshemmend oder führen zu einer verminderten Bildung entzündungsfördernder Zytokine.

1.3.4 Omega-3-, Omega-6-Fettsäuren und ihre Mediatoren und die akute Pankreatitis

Es existieren zahlreiche in vitro, in vivo, klinische Studien, die die protektiven Effekte der Omega-3 Fettsäuren und ihrer Abkömmlinge im Zusammenhang mit den unterschiedlichsten Krankheitsbildern untersuchen.

Dabei wurde auch die akute Pankreatitis in unterschiedlichen Studienmodellen adressiert. In dem folgenden Abschnitt werden einige Arbeiten vorgestellt, die unserer Studie vorausgingen:

2009 adressierten Park et al in einer in vitro Studie den Einfluss der Omega-3 Fettsäuren DHA und ALA auf pankreatische Azinuszellen. Dabei wurde untersucht, ob diese Fettsäuren einen Einfluss auf die Zytokinproduktion der Zellen nach Stimulation mit Cerulein haben, sowie die Frage, ob diese Fettsäuren den apoptotischen Zelltod der Azinuszellen nach Exposition gegenüber Wasserstoffperoxid unterdrücken können. Es konnte gezeigt werden, dass DHA und ALA die Expression der als pro-inflammatorisch geltenden Zytokine IL-1 β und IL-6 reduzieren und die Expression von apoptotischen Genen wie p53, Bax, apoptosis-inducing factor hemmen [42].

Unter den zahlreichen tierexperimentellen Studien ist vor allem die Cerulein-induzierte akute Pankreatitis in Ratten gut untersucht.

Kilian et al zeigten, dass Ratten, die nach einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis mit einer Omega-3-fettsäurereichen Infusion behandelt wurden, einen deutlich reduzierten histopathologischen Score aufwiesen, verglichen mit einer durch eine Kochsalzlösung behandelten Versuchsgruppe. Auch die Synthese von Prostaglandin E2 und Prostaglandin F1- α , die zu der Gruppe der entzündungsfördernden Derivate aus der AA gehören, waren durch die Omega-3 Verabreichung deutlich reduziert [43].

In einer weiteren Studie mit einem ähnlichen Versuchsaufbau verglich dieselbe Forschungsgruppe den Effekt von mit Omega-3, Omega-6 und Omega-9 Fettsäuren angereicherten Infusionen auf eine akute hämorrhagische Pankreatitis in Ratten. Allein in der mit einer Omega-3 Fettsäure-Infusion behandelten Versuchsgruppe konnte die Ausprägung der lokalen Pankreasentzündung reduziert werden, verglichen mit einer unbehandelten Vergleichsgruppe [44].

Kilian et al untersuchten in ihrem Rattenmodell primär die lokale Pankreaszerstörung. In anderen tierexperimentellen Studien wurde jedoch auch die systemische Entzündungsausbreitung im Rahmen einer akuten Pankreatitis untersucht. So zeigten Sharif et al, dass die orale Gabe von EPA vor der Induktion einer akuten Pankreatitis in Ratten zu einem signifikant weniger

Makrophageninfiltrationen im Pankreasgewebe führte, zum anderen auch signifikant weniger Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage der Versuchstiere nachzuweisen waren [45].

Foitzik et al behandelten Ratten mit zuvor induzierter, schweren, akuten Pankreatitis mit einer parenteralen Ernährung, die unterschiedliche Fettsäurekompositionen enthielten (reich an Omega-3 FA vs. reich an Omega-6 FA). Dabei konnte in der Gruppe, die die Lösung mit einem hohen Anteil an Omega-3 Fettsäuren erhielt, signifikant höhere Werte des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 gemessen werden, die renale Funktion war besser als in der Vergleichsgruppe und es kam deutlich seltener zu Episoden von kardiopulmonalen Dysfunktionen [46].

Die parenterale oder intravenöse Gabe von mit Omega-3 Fettsäuren angereicherten Lösungen und anschließende Untersuchung der Effekte dieser auf eine akute Pankreatitis setzte sich auch in klinischen Studien fort.

Wang et al behandelten Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis entweder mit einer durch Omega-3 Fettsäuren angereicherten, parenteral verabreichten Lösung oder mit einer konventionellen, parenteral verabreichten Lösung. In der Gruppe der mit Omega-3 Fettsäuren behandelten Patienten waren signifikant höhere Werte für EPA und signifikant geringere Werte für CRP im Serum nachweisbar. Als Ausdruck einer geringeren systemischen Affektion zeigten die Patienten eine signifikant bessere pulmonale Funktion sowie eine signifikant kürzere Dauer einer Dialysebehandlung [47].

Xiong et al untersuchten den Effekt einer zusätzlich zu der konventionellen Therapie verabreichten, intravenösen Gabe von Omega-3 Fettsäuren auf die systemische Entzündungsausbreitung im Rahmen einer schweren akuten Pankreatitis. Die zusätzliche Behandlung führte zu einem signifikant geringeren SIRS-Score sowie signifikant geringerer Plasmakonzentration des pro-inflammatorisch wirkenden Zytokins TNF- α , während die Plasmakonzentration des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 deutlich erhöht war [48].

In einem ähnlichen Versuchsaufbau konnten Lasztity et al einen klinischen Benefit einer intravenösen Gabe von Omega-3 Fettsäuren bei Patienten mit milder bis schwerer akuter Pankreatitis nachweisen, verglichen mit Patienten ohne diese Zusatztherapie. Die mit Omega-3 Fettsäuren behandelte Versuchsgruppe zeigte eine signifikante Reduktion der Dauer des Krankenhausaufenthaltes sowie der jejunalen Ernährung, des Weiteren traten signifikant weniger Komplikationen als in der unbehandelten Vergleichsgruppe auf [49].

1.4 Das Fat-1 Mausmodell

Säugetieren ist es nicht möglich, Omega-6-Fettsäuren und Omega-3-Fettsäuren ineinander umzuwandeln. Selbst Fische, die für den Menschen das größte Reservoir an Omega-3-Fettsäuren darstellen, nehmen diese ausschließlich über ihre Nahrung auf. Aus diesem Grund mussten Versuchstiere für in-vivo-Studien über den Einfluss von n-3-Fettsäuren auf unterschiedliche biologische Prozesse mit einer speziellen Diät gefüttert werden. Diese Fütterungsexperimente sind schwer steuerbar, da nicht sichergestellt werden kann, dass von allen Versuchstieren dieselbe Menge an Nahrung aufgenommen wird. Durch die Entwicklung des Fat-1 Maus-Modells wird dieses Problem gelöst.

Die Fat-1 Maus ist eine transgene Maus, die das Fat-1-Gen des Rundwurms *Caenorhabditis elegans* trägt. Dieses Gen kodiert für eine n-3 Desaturase, die es der Maus ermöglicht, Omega-6-Fettsäuren in Omega-3-Fettsäuren umzuwandeln. Die synthetisierten Omega-3-Fettsäuren reichern sich in den unterschiedlichen Geweben der Tiere an, das Verhältnis von Omega-3- zu Omega-6-Fettsäuren verschiebt sich deutlich zugunsten der Omega-3-Fettsäuren [50]. Durch dieses Mausmodell werden Ungenauigkeiten, die aus der Gabe unterschiedlicher Diäten resultieren, eliminiert. Es stellt eine einzigartige Möglichkeit dar, die biologischen Funktionen der Omega-3-Fettsäuren und den Einfluss von hohen Omega-3-/Omega-6-Fettsäure-Verhältnissen auf biologische Prozesse zu untersuchen.

1.5 Das Modell der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis und Gründe für die Wahl dieses Modells

Die Entstehungsphase der akuten Pankreatitis ist am Menschen nicht zu untersuchen, da die Krankheit bei Diagnosestellung in der Regel schon ihre volle Ausprägung erreicht hat. In diesem Stadium sind zelluläre Mechanismen der Initialphase nicht mehr nachvollziehbar. Für die genaue Untersuchung der Entstehungsmechanismen sind deshalb unterschiedliche Tiermodelle entwickelt worden. Das am besten charakterisierte und standardisierte Modell ist dabei das Überstimulationsmodell mit Cerulein [19].

Cerulein ist ein Analogon des humanen Hormons Cholezystokinin (CCK). In physiologischen Konzentrationen stimuliert CCK die Sekretion der im Pankreas gebildeten Verdauungsenzyme. Für die Induktion der akuten Pankreatitis werden supramaximale Dosen des Ceruleins intraperitoneal oder intravenös injiziert. Diese Behandlung führt zu einer übermäßigen Enzymsekretion und Enzymaktivierung in den Pankreaszellen und über die Selbstverdauung des Pankreasgewebes zu der Entstehung der akuten Pankreatitis [2].

Durch die Ceruleinbehandlung wird eine leichte, ödematöse Pankreatitis ausgelöst. Sie ist reversibel und durch die einfache Reproduzierbarkeit zu dem am meisten verwendeten Modell zur Untersuchung von zellulären Mechanismen geworden. Durch eine Variation in der Anzahl der Ceruleininjektionen ist es möglich, die Schwere der akuten Pankreatitis zu beeinflussen. Somit reicht das Spektrum der ausgelösten Pankreatitiden von der leichten, ödematösen Form bis zu einer schweren, nekrotisierenden Entzündung mit systemischen Komplikationen [2].

Die Wirkung des Ceruleins wird über CCK-Rezeptoren erzielt: Cerulein bindet an die CCK-Rezeptoren, diese Bindung führt zu einer übermäßigen Stimulation der Azinuszellen mit frühzeitiger Aktivierung des Enzyms Trypsinogen in den Zellen. Durch Trypsinogen werden weitere Verdauungsenzyme aktiviert, die zu einer Schädigung der Azinuszellen des Pankreas führen. Hier mündet die Reaktionskette in die unter 1.1 beschriebene Endstrecke der akuten Pankreatitis. Unter Mitwirken unterschiedlicher pro- und anti-inflammatorischer Zytokine breitet sich die Entzündung in dem Organ, in den angrenzenden Strukturen und schließlich systemisch in andere Organsysteme aus.

Mit diesem Tiermodell wird die beim Menschen ablaufende Entzündungsreaktion imitiert. Dabei wird die extrapancreatische Ausbreitung der Entzündung ebenfalls nachgestellt, was sich z. B. durch die Entstehung einer Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung zeigt.

Die Vorteile dieses Tiermodells liegen in der Einfachheit der Durchführbarkeit und der realistischen Imitation der im menschlichen Organismus ablaufenden Entzündungsreaktionen. Die akute Pankreatitis wird durch mehrfache intraperitoneale oder intravenöse Ceruleininjektionen ausgelöst, für deren Durchführung weder das Erlernen einer komplizierten Technik noch der Einsatz teurer oder komplexer Apparaturen notwendig sind. Zusätzlich werden durch die Ceruleininjektion Mechanismen ausgelöst, die auch für die Entstehung der akuten Pankreatitis beim Menschen verantwortlich gemacht werden. Dieses Tiermodell stellt somit eine Möglichkeit dar, die Entstehung und Ausbreitung der Entzündung weiter zu erforschen und Ansätze für eine kausale Therapie der Erkrankung zu finden, die auch auf den Menschen übertragbar sein könnten.

1.6 Fragestellung

1) Wie wirkt sich ein verändertes Omega-6/Omega-3-Fettsäureverhältnis im Pankreasgewebe auf die Cerulein-induzierte Gewebeschädigung aus?

Erst in den letzten 200 Jahren hat sich durch Veränderungen unserer Ernährungsgewohnheiten das Omega-3/Omega-6-Fettsäureverhältnis deutlich zugunsten der Omega-6-Fettsäuren

verschoben. Aus der veränderten Verfügbarkeit von Fettsäuren im Organismus resultiert eine veränderte Verfügbarkeit der aus den Fettsäuren gebildeten Derivate, die eine wichtige Rolle in der Entstehung und Ausbreitung von unterschiedlichen Entzündungsreaktionen darstellen. Wir beschäftigten uns mit der Frage, wie die unterschiedlichen, an der Ausbreitung einer Entzündungsreaktion im Organismus beteiligten Mechanismen durch ein verändertes Omega-3/Omega-6-Verhältnis im Gewebe beeinflusst werden.

Für Omega-3-Fettsäuren sind in unterschiedlichen Studien entzündungshemmende Effekte nachgewiesen worden. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass ein erhöhter Anteil an Omega-3-Fettsäuren im Pankreasgewebe, dieses vor einer überschießenden Entzündungsreaktion im Rahmen einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis schützen könnte.

In unseren Versuchen wird die transgene Fat-1 Maus eingesetzt, die in der Lage ist, Omega-3-Fettsäuren aus Omega-6-Fettsäuren zu synthetisieren. Es wird untersucht, wie ein erhöhter Gehalt an Omega-3-Fettsäuren im Pankreasgewebe die durch Cerulein verursachte Parenchymschädigung der Bauchspeicheldrüse beeinflusst. Dabei werden die Fat-1 Mäuse, die durch ein Verhältnis von AA/EPA+DHA von 3:2 im Pankreas charakterisiert sind, mit Wildtyp Mäusen verglichen, die ein entsprechendes Verhältnis von etwa 70:1 im Pankreasgewebe haben. In der Untersuchung werden Unterschiede im Schweregrad der Gewebeschädigung zwischen den beiden Gruppen beurteilt.

2)Wie wirkt sich ein verändertes Omega-6/Omega-3-Fettsäureverhältnis im Pankreasgewebe auf die Zytokinproduktion im Rahmen der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis aus?

In den einleitenden Abschnitten wurde ausführlich beschrieben, wie die im Organismus vorkommenden Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren als Ausgangsprodukte für die Bildung von Entzündungsmediatoren dienen. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, wie die Zytokinproduktion im Rahmen einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis durch ein verändertes Omega-6/Omega-3-Verhältnis im Pankreasgewebe beeinflusst wird.

In bisherigen Studien ergaben sich Hinweise dafür, dass es durch eine Verschiebung des Omega-6/Omega-3-Verhältnisses zugunsten der Omega-3-Fettsäuren zu einer vermehrten Produktion der Omega-3-Derivate und einer gleichzeitig verminderten Produktion der Omega-6-Derivate kommt. Wenn wir davon ausgehen, dass die Derivate durch die o. g. Eigenschaften charakterisiert sind, könnte ein entzündungshemmender Effekt dadurch erklärt werden. In unseren Versuchen wird durch die Messung unterschiedlicher pro- und anti-inflammatorisch wirkender Mediatoren untersucht, ob die Bildung der Mediatoren in den Versuchstieren mit unterschiedlichen Fettsäureprofilen differiert.

3) Wie wirkt sich ein verändertes Omega-6/Omega-3-Fettsäureverhältnis im Pankreasgewebe auf die Pankreatitis-assoziierte Lungenschädigung als Ausdruck der systemischen Ausbreitung im Rahmen der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis aus?

In den einleitenden Abschnitten wurde bereits auf die systemische Ausbreitung der im Pankreas beginnenden Entzündung eingegangen. Sowohl in der Klinik als auch im Tiermodell kommt es als Anzeichen einer systemischen Entzündungsausbreitung zu einer Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung. Mit dem Wissen, dass diese durch im Pankreasgewebe freigesetzte Entzündungsmediatoren ausgelöst wird, stellt sich die Frage, wie ein verändertes Omega-6/Omega-3-Fettsäureverhältnis im Pankreasgewebe die hier freigesetzten Mediatoren und deren Wirkung auf das Lungengewebe beeinflusst. In unseren Versuchsgruppen untersuchen und vergleichen wir die lichtmikroskopisch sichtbare Gewebeschädigung in der Lunge sowie die Infiltration des Lungengewebes durch Entzündungszellen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Die Fat-1 Maus

Die transgene Fat-1 C57BL/6 Maus wurde von Professor Jing X. Kang in den Laboren des Massachusetts General Hospitals in Boston, MA, USA entwickelt. Sie trägt das Fat-1 Gen des Rundwurms *Caenorhabditis elegans*, das für eine n-3 Desaturase kodiert und es der Maus ermöglicht, Omega-3 Fettsäuren zu synthetisieren. Dabei dient die korrespondierende Omega-6 Fettsäure als Substrat. Diese Umwandlung ist Säugetieren von Natur aus nicht möglich [50].

2.1.2 Zucht und Haltung der Versuchstiere

Die transgenen Fat-1 Mäuse wurden zunächst mehrfach mit C57BL/6-Mäusen rückgekreuzt. Heterozygote Fat-1 Mäuse wurden dann mit Wildtyp Mäusen gekreuzt, um sowohl heterozygote Fat-1 Mäuse als auch Wildtyp Mäuse zu erhalten. Für unsere Studie wurden ausschließlich weibliche, heterozygote Fat-1-Mäuse und Wildtyp-Mäuse aus denselben Würfen herangezogen.

Alle Mäuse erhielten dieselbe Diät (5% Maisöl mit 10% Diestelöl substituiert, 20% Proteine, 58% Kohlenhydrate, 22% Fett) mit hohen n-6 und geringen n-3 Fettsäureanteilen bis das gewünschte Gewicht (17-22g) und Alter (8-10 Wochen) erreicht wurde. Die Tiere wurden in pathogenfreier Umgebung gehalten, mit jeweils 2-3 sich in Alter und Gewicht entsprechenden weiblichen Mäusen. Die Haltung entsprach den Richtlinien des Komitees für Versuchstierhaltung des Massachusetts General Hospitals.

2.1.3 Phänotypisierung der Versuchstiere durch Gaschromatographie

Die Phänotypisierung der Versuchstiere erfolgte in der vierten Lebenswoche mittels Gaschromatographie. Diese Analyse dient der Unterscheidung zwischen Wildtyp und transgenen Fat-1 Mäusen. Für die Untersuchung wird eine kleine Gewebeprobe des distalen Schwanzes jeder Maus gewonnen, deren Lipidprofile dann mittels Gaschromatographie bestimmt werden. Entscheidend für die Unterscheidung zwischen Wildtyp und Fat-1-Maus ist das ermittelte Verhältnis von Arachidonsäure (20:4 n-6) zu Eicosapentaensäure (22:5 n-3). In den Wildtyp Mäusen ist die Eicosapentaensäure nicht nachweisbar, in den Fat-1 Mäusen sind die Konzentrationen deutlich erhöht.

2.1.3.1 Aufbau und Funktion der Gaschromatographie

Schematische Darstellung des Aufbaus:

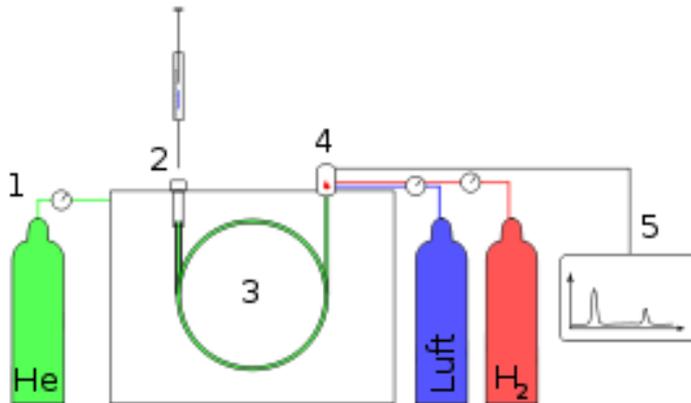


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Gaschromatographen.

1=Trägergas, 2=Injektor, 3=Trennsäule im Gaschromatographie-Ofen, 4=Detektor, 5=Signalaufzeichnung

Das Funktionsprinzip der Gaschromatographie besteht darin, dass Stoffgemische entweder durch unterschiedliche Siedepunkte der einzelnen Stoffe oder durch unterschiedliche Wechselwirkungen dieser mit der stationären Phase (Auskleidung der Trennsäule) aufgetrennt werden.

Dazu werden die zu untersuchenden Proben im Injektor erhitzt bis sie vollständig verdampft sind. Die gasförmigen Stoffe werden von dem Trägergas (in unserem Versuch Helium) durch die Trennsäule des Gaschromatographen transportiert. Diese Säule ist durch die so genannte stationäre Phase ausgekleidet, an der die unterschiedlichen Substanzen des Stoffgemisches, in Abhängigkeit von ihrer Polarität, unterschiedlich lange verweilen.

Ein Detektor misst den Austrittszeitpunkt der unterschiedlichen Stoffe am Säulenende und vergleicht die Werte mit denen von Standardsubstanzen. Die unterschiedlichen Substanzen haben charakteristische Verweildauern in der Trennsäule und können so voneinander unterschieden werden. Somit ist eine qualitative und quantitative Bestimmung komplexer Stoffgemische einfach möglich.

2.1.3.2 Probenmessung und Datenauswertung

Für unsere Untersuchungen wurden die Gewebeproben der distalen Mausschwänze nach einem modifizierten Protokoll aufgearbeitet und analysiert [51]. Dafür wurde zunächst das frische Gewebe unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Puder zerkleinert. Die Proben

wurden mit jeweils 1,5ml 14% Borontrifluorid(BF₃)-Methanollösung und Hexan aufgefüllt und 60 Minuten bei 100°C inkubiert. Dieser Schritt dient der Lösung der Fettsäuren aus dem Gewebe und der Bildung von Fettsäuremethylestern, die anschließend in Hexan gelöst vorliegen und der Analyse zugänglich sind.

Für die Analyse wurde ein vollautomatischer Gaschromatograph vom Typ 6890N (Agilent Technologies) mit Flammenionisationsdetektor verwendet. Die Peaks der gelösten Fettsäuren wurden durch Vergleiche mit Fettsäurestandards (Nu-chek-Prep) identifiziert. Für die Analyse der prozentualen Anteile aller Peaks wurde die GC ChemStation Software (Agilent Technologies) genutzt.

2.2 Gruppeneinteilung

Versuchsgruppe	Behandlung	Gruppengröße
1) Fat-1 Mäuse mit akuter Pankreatitis	Cerulein	n = 6
2) Wildtyp Mäuse mit akuter Pankreatitis	Cerulein	n = 9
3) Wildtyp Mäuse ohne akute Pankreatitis	Kochsalzlösung	n = 5
4) Fat-1 Mäuse ohne akute Pankreatitis	Kochsalzlösung	n = 4

Tabelle 1: Die Aufteilung der Versuchstiere in die Versuchsgruppen, ihre Behandlung und Anzahl der Tiere in einer Gruppe.

Tabelle 1 zeigt die Aufteilung der Versuchstiere in die vier Versuchsgruppen. Die Gruppe 1 dient uns als Pankreatitis Prüfgruppe, an der der Einfluss erhöhter n-3 PUFA Gewebekonzentrationen auf den Verlauf der akuten Pankreatitis untersucht wird, während die Gruppe 2 die ebenfalls erkrankte Wildtyp Kontrollgruppe dazu bildet. Gruppe 3 und Gruppe 4 dienen als gesunde Fat-1- und Wildtyp-Gruppen, um physiologische Daten zu gewinnen, mit denen dann die Daten der erkrankten Gruppen verglichen werden können. Die Wildtyp- und Fat-1-Mäuse wurden anschließend an die Phänotypisierung nach dem Zufallsprinzip in Kontroll- und Pankreatitisgruppen aufgeteilt.

2.3 Induktion der akuten Pankreatitis mit Cerulein

Die Induktion der akuten Pankreatitis durch Cerulein ist eine einfach reproduzierbare, nicht invasive und daher viel verwendete Methode. In unserer Versuchsreihe wurden den Mäusen insgesamt 12 Injektionen mit einem Volumen von jeweils 200ul intraperitoneal appliziert, wobei zwischen den einzelnen Injektionen ein zeitlicher Abstand von 60 Minuten lag. Bei den Tieren

aus den Gruppen 1 und 2 beinhalteten die Injektionen 50 ug/kg Körpergewicht Cerulein (Research Plus Inc., New Jersey, USA), das in 0,9 prozentiger Kochsalzlösung gelöst war. Die Tiere der Gruppen 3 und 4 erhielten 200ul reine Kochsalzlösung.

Während der Versuchsdurchführung hatten die Mäuse freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Unter der Behandlung mit Cerulein zwecks Induktion einer akuten Pankreatitis ist keines der Versuchstiere frühzeitig zu Tode gekommen.

Eine Stunde nach der letzten Injektion wurden die Versuchstiere mit Isofluran anästhetisiert, ihr Thorax wurde durch einen etwa 1 cm langen Schnitt parasternal links eröffnet und das Herz wurde mittels einer Kanüle punktiert. Der Tod der Tiere ist durch das Abziehen des Blutvolumens über die Kanüle innerhalb kürzester Zeit eingetreten.

2.4 Präparation der Versuchstiere

Nach Eintritt des Todes erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle der Versuchstiere durch einen etwa 2cm langen medianen Schnitt. Zunächst wurde das Pankreas resiziert, longitudinal geteilt, ein Teil in 10 % Formalin fixiert und ein Teil in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zusätzlich wurden noch Leber und Lunge entnommen; während die Leber komplett in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde, wurde die Lunge wie das Pankreas zweigeteilt, eine Hälfte in 10% Formalin fixiert, eine ebenfalls schockgefroren.

Die in Formalin fixierten Proben wurden anschließend für nachfolgende histologische Untersuchungen in Paraffinblöcke eingebettet, die gefrorenen Proben wurden bis zur Nutzung für weitere Analysen bei -70°C verwahrt.

Die Blutproben wurden sofort nach Entnahme 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, danach wurden Serum und Zellen getrennt und ebenfalls bei -70°C eingefroren.

2.5 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

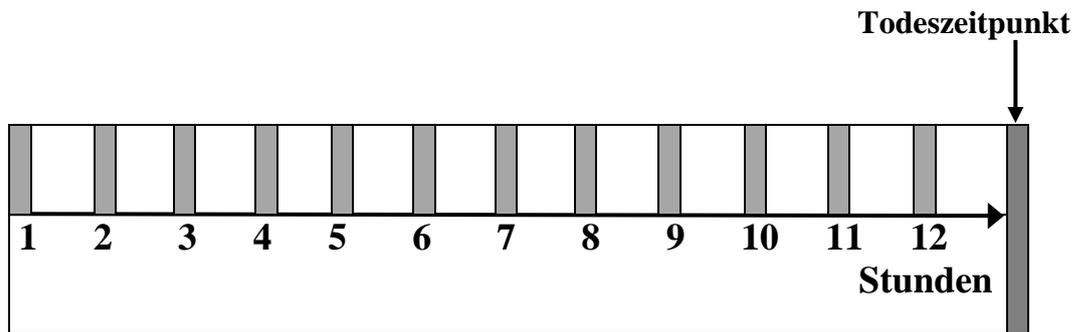


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

Die 12 kleinen grauen Balken repräsentieren die intraperitonealen Ceruleininjektionen, die jeweils in einem Abstand von 60 Minuten erfolgten. 60 Minuten nach der letzten Gabe ist der Todeszeitpunkt als langer grauer Balken markiert.

2.6 Evaluation der morphologischen Veränderungen im Pankreasgewebe mittels Hämatoxylin/Eosin-Färbung und Lichtmikroskopie

Zur Bestätigung der Effizienz der Behandlung mit Cerulein und zur Detektion unterschiedlich starker Entzündungsreaktionen in den verschiedenen Versuchsgruppen, ist es sinnvoll, morphologische Veränderungen im Pankreasgewebe lichtmikroskopisch zu evaluieren. Dafür wurden von den entnommenen Gewebeproben aller Versuchstiere Präparate mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt und von einem erfahrenen Pathologen verblindet beurteilt.

Zur Erstellung der Hämatoxylin/Eosin-Präparate wurden Anteile der entnommenen Bauchspeicheldrüsen zunächst für mindestens 24 Stunden in 10% Formalin fixiert. Anschließend wurden die Proben in Paraffinblöcken eingebettet, von denen 5 µm dünne Gewebeschnitte angefertigt wurden. Die Gewebeschnitte wurden zunächst mit Xylene und Ethanol in absteigender Konzentration deparaffinisiert. Anschließend wurden die Schnitte zunächst mit Hämatoxylin, dann mit Eosin angefärbt. Nach ausführlicher Spülung und Entwässerung der Schnitte wurden Deckplatten aufgesetzt und die Präparate lichtmikroskopisch beurteilt.

2.6.1 Beurteilung der Pankreasschädigung mittels Punkteschema

Für die Beurteilung der morphologischen Veränderungen der Pankreata wurde ein vorher beschriebenes Punktesystem angewendet [52]. Beurteilt wurden folgende Kriterien: 1. Ödem, 2.

Azinuszellnekrosen, 3. das Ausmaß der Entzündungszellinfiltration. Eine genaue Aufstellung des Bewertungsschemas ist in der nachfolgenden Tabelle beschrieben:

Tabelle: Histopathologisches Punktesystem
<p>(1) Ödem</p> <p>0= kein Ödem sichtbar</p> <p>1= mild ausgebildetes Ödem (diffuse Ausbreitung über die interlobulären Septen)</p> <p>2= moderat ausgebildetes Ödem (wie1 +diffuse Ausbreitung über die interlobulären Septen)</p> <p>3= stark ausgebildetes Ödem (wie2 +diffuse Ausbreitung über die interlobulären Septen)</p>
<p>(2) Azinuszellnekrose (in Prozent des Pankreasgewebes)</p> <p>0= keine Nekrosen sichtbar</p> <p>1= 1-5%</p> <p>2= 6-12%</p> <p>3= 13-20%</p>
<p>(3) Entzündungszellinfiltration (Zellen/Sichtfeld bei 400facher Vergrößerung)</p> <p>0= 0-1</p> <p>1= 2-10</p> <p>2= 11-30</p> <p>3= >30</p>

Tabelle 2: Histopathologisches Punktesystem

2.7 Untersuchung der Serumlipase und Serumamylase als Ausdruck einer Gewebeschädigung im Pankreas

Für die Bestätigung der Wirksamkeit des Cerulein-Modells wurden die Serumkonzentrationen der Enzyme Amylase und Lipase gemessen, die als spezifische Parameter für eine Schädigung des Pankreasgewebes bekannt sind. Für die Messungen der Serumlipase- und Serumamylasewerte wurde das im Rahmen der Präparation der Versuchstiere gewonnene Serum verwendet. Die Serumproben wurden in ein Labor versandt und in einem Standardverfahren bestimmt.

2.8 Bestimmung des IL-6-Gehaltes im Serum als Ausdruck einer beginnenden systemischen Entzündung mittels ELISA

Als Ausdruck der beginnenden systemischen Ausbreitung der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis wurden in unseren Versuchen die IL-6-Serumspiegel der Versuchstiere gemessen. Dafür wurde ein ELISA (Enzyme-linked-immunosorbend-assay) genutzt.

2.8.1 Aufbau und Funktion des ELISAs

Ein ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf dem Boden einer enzymatischen Farbreaktion funktioniert. Mithilfe eines ELISAs können Proteine, Viren oder auch niedermolekulare Verbindungen (z. B. Hormone, Toxine) nachgewiesen werden. Das Funktionsprinzip des ELISAs beruht auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion, bei der spezifische Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen genutzt werden. Diese Antikörper werden vor der Reaktion durch ein Enzym markiert, welches im Anschluss an die Antikörper-Antigen-Bindung ein Substrat umsetzt. Das Produkt aus der Reaktion mit dem Substrat wird durch einen Farbumschlag oder Fluoreszenz sichtbar gemacht. Eine quantitative Bestimmung des Antigens ist dann möglich, wenn sich die Signalstärke und die Antigenkonzentration proportional zueinander verhalten.

Durchführung:

Zum Nachweis des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 haben wir ein Sandwich-ELISA von eBioscience verwendet. Der ELISA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine 96-Well-Platte war mit einem spezifischen monoklonalen anti-Maus IL-6 Antikörper beschichtet (Capture Antibody), welcher vorhandenes IL-6 aus zupipettierten Serumproben und Standards bindet. Nach ausreichender Inkubationszeit und fünfmaliger Waschung zur Entfernung der nicht gebundenen Substanzen wurde ein mit Meerrettich Peroxidase gekoppelter zweiter polyklonaler anti-Maus IL-6 Antikörper hinzugegeben, der an eine andere Stelle des IL-6 Proteins bindet (Detecting Antibody). Nach erneutem Waschen wird das Substrat TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine) dazu gegeben, das durch die Meerrettich Peroxidase umgesetzt wird. Die Substratlösung entwickelt zunächst eine blaue Farbe, deren Intensität proportional zu der Konzentration des gebundenen IL-6 ist. Durch eine Stopplösung (1M Phosphorsäure) wandelt sich die blaue in eine gelbe Lösung um. Bei einer Wellenlänge von 450nm kann durch eine spektralphotometrische Messung Absorption gemessen und über eine Standardreihe entsprechend den Herstellerangaben in Konzentrationen umgerechnet werden. Die spektralphotometrische Messung wurde mit einem Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer Life And Analytical Sciences, Inc., Wellesley, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 450nm durchgeführt. Für die Berechnung der IL-6 Konzentrationen wurde die Software Wallace 1420 Manager (Perkin Elmer Life And Analytical Sciences, Inc., Wellesley, MA, USA) genutzt. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde rekombinantes Maus Zytokin IL-6 aus dem ELISA Kit verwendet. Die unterschiedlichen Konzentrationen wurden jeweils in zweifacher

Ausführung auf die Platte aufgetragen und ausgelesen. Der Mittelwert der beiden Proben ergab die Konzentration des Proteins.

Die zu analysierenden Serumproben wurden zunächst in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Platte aufgetragen, um die IL-6 Konzentration der Proben mit denen aus der Standardkurve in eine vergleichbare Größenordnung zu bringen. Alle Proben wurden anschließend ebenfalls in zweifacher Ausführung auf die 96-Loch-Platte aufgetragen und analysiert, wobei wieder die Mittelwerte der Messungen die IL-6 Konzentrationen bildeten.

2.9 Quantifizierung der mRNA pro- und anti-inflammatorisch wirkender Entzündungsmediatoren im Pankreasgewebe mittels Echtzeit RT-PCR

Als weitere Bestätigung der lokalen Entzündungsreaktion im Pankreasgewebe der behandelten Mäuse wurden unterschiedliche Entzündungsmediatoren mittels RT-PCR bestimmt und quantifiziert. Die Extraktion der gesamten RNA aus dem Pankreasgewebe wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Quiagen) durchgeführt. Die Anwendung führten wir dabei exakt nach den Instruktionen des Herstellers durch. Die Extraktion wurde an Gewebeproben von 20-30mg Gewicht durchgeführt. Anschließend wurde die Konzentration und Reinheit der RNA spektralphotometrisch analysiert. Dafür verwendeten wir ein GeneQuant pro analyzer (Amersham Biosciences) und maßen die Absorption bei 260nm in Relation zu der Absorption bei 280nm.

Im weiteren Verlauf wurde aus der gewonnenen RNA in einer Reversen Transkriptase Reaktion cDNA gewonnen. Dazu wurden 1.4µg der isolierten RNA, RNase freies Wasser und ein Oligoprimer (Promega) zunächst für 5 Minuten bei 70°C in einem PTC-100 Thermo Cycler (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) inkubiert. Nach Zugabe einer Mastermixlösung aus Reverser Transkriptase, Ribonuklease-Inhibitor, freien Nukleotiden, Reverse-Transkriptase-Puffer und ribonukleasefreiem Wasser wurde bei erneuter Inkubation der Proben im PTC-100 Thermo Cycler (60 Minuten bei 37°C) die cDNA gebildet. Diese bildet das Ausgangsprodukt für die sich anschließende Echtzeit PCR.

Für die Durchführung der Echtzeit PCR folgten wir dem Standardprotokoll des Herstellers. Je Probe und Primerpaar wurde ein Mastermix aus 1.8µl Primer (sense), 1.8µl Primer (antisense), 10µl SYBR Green (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), 5.2µl ribonukleasefreies Wasser angemischt. Dazu wurden 2µl cDNA gegeben, so dass je Probe ein Volumen von 20µl entstand.

Die Echtzeit PCR führten wir dann mit dem ABI Prism 7000 Light Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) durch.

Alle Proben wurden in dreifacher Ausführung bestimmt und gemittelt. Für die Normalisierung der mRNA-Werte wurde GHPDH als Referenzgen (Housekeeping Gen) bestimmt. Alle verwendeten Primer wurden mit DNA Star konstruiert und bei Invitrogen, USA erworben. Es wurden Primer mit folgenden Sequenzen verwendet:

Maus GHPDH:

5'-ATGGACTGTGGTCATGAGCC-3', 5'-ATTGTCAGCAATGCATCCTG-3';

Maus IL-6:

5'-ACCTGGAGTACATGAAGAACA-3', 5'-TTGGAAATTGGGGTAGGAAG-3';

Maus IL-10:

5'-AAAGGACCAGCTGGACAACATACT-3', 5'-CCAAGTAACCCTTAAAGTCCTGCA-3';

Maus IL-1b:

5'-TGACGGACCCCAAAGAT-3', 5'-GTGATACTGCCTGCCTGAAG-3';

Maus TNF-a:

5'-TACCCCAATGTGTCCGTCGTG-3', 5'-CCTTCAGTGGGCCCTCAGATGC-3';

Maus TGF-b:

5'-GTAACCGGCTGCTGACCCCACTG-3', 5'-AGCCCTGTATTCCGTCTCCTT-3'.

Für die Auswertung der Messergebnisse haben wir die delta-delta CP-Methode angewendet.

Dabei wird hier die Expression des Ziel-Gens der behandelten Proben als ein n-faches der Genexpression in der unbehandelten Vergleichsgruppe ausgedrückt.

Im ersten Schritt wird dafür für jede untersuchte Probe der CP Wert des Referenzgens (GAPDH) vom CP Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\delta CP = CP \text{ Zielgen} - CP \text{ Referenzgen}$). Anschließend wird vom δCP Wert der experimentell behandelten Proben der δCP Wert einer Kontrolle abgezogen ($\delta\delta CP = \delta CP \text{ behandelte Probe} - \delta CP \text{ Kontrolle}$). Somit erhält man den sogenannten delta-delta CP Wert ($\delta\delta CP$ Wert), der den relativen Expressionsunterschied zwischen den beiden Gruppen angibt. Da der CP Wert in der exponentiellen Phase der PCR liegt, ergibt sich für die Berechnung der Ratio die Formel: Ratio: $2^{\text{hoch}(-\delta\delta CP)}$.

2.10 Quantifizierung einer Gewebeeinfiltration der Lunge mit neutrophilen Granulozyten mittels Messung der Myeloperoxidaseaktivität

Zum Ausdruck der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe wurde in unseren Versuchen als indirekter Marker die Aktivität des Enzyms Myeloperoxidase (MPO) in diesem Gewebe gemessen. Bis zur Messung der MPO-Aktivität in den gewonnenen Lungenproben wurden diese bei -70°C aufbewahrt. Für die Messung wurden Gewebeblöcke mit einem Gewicht von 28-32mg verwendet. Diese wurden mit einer sauberen Rasierklinge in kleine Würfel geschnitten und anschließend in einem 50mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6.0) mit 0.5g/dl Centrioniumbromid homogenisiert. Es folgten 3 Zyklen, in denen die Proben jeweils eingefroren, aufgetaut und in einem Ultraschallbad behandelt wurden. Im nächsten Schritt wurden alle Proben für 2 Stunden bei 60°C in einem Wasserbad inkubiert, anschließend für 20 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Für die Analyse wurden die Probenüberstände genutzt.

Für die Analyse wurde ein mit 0.167mg/ml O-dianisidine Hydrochlorid und 0.0005% Wasserstoffperoxid versetzter 50mM Kaliumphosphatpuffer (pH6.0) verwendet. Je 5ul einer Probe und 145ul dieses Puffers wurden in einen Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Die Analyse wurde bei 37°C und einer Wellenlänge von 450nm im Photometer durchgeführt. Alle 30 Sekunden wurde die Änderung der optischen Dichte gemessen.

Alle Proben wurden in dreifacher Ausführung gemessen und die Ergebnisse gemittelt.

2.10.1 Myeloperoxidase-Antikörper-Färbung in der Lunge

Für die Visualisierung der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe haben wir eine immunhistochemische Färbung des Enzyms Myeloperoxidase (MPO) durchgeführt.

Die Färbung wurde an Schnitten des in Paraffinblöcken fixierten Lungengewebes durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde ein polyklonaler Anti-MPO-Antikörper vom Hasen (Abcam) in einer Konzentration von 1:100 verwendet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Als sekundärer Antikörper diente ein BGAR (Biotinylated Goat Anti Rabbit, Vector Labs, Kalifornien, USA) in einer Konzentration von 1:250. Negativkontrollen wurden ohne Verwendung des Primärantikörpers durchgeführt, als Co-Färbung diente eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung. Die Auswertung erfolgte mittels Lichtmikroskopie in 3-facher Ausführung und verblindet.

2.11 Statistik

Innerhalb der Gruppen wurden Mittelwerte gebildet und als Streuungsmaß der Standard error of the Means (SEM) berechnet. Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm Prism, Graph Pad Software Inc, San Diego, USA. Es wurden die Gruppen 1) Fat-1 Mäuse mit akuter Pankreatitis (fat-1 AP), 2) Wildtyp Mäuse mit akuter Pankreatitis (wt AP) miteinander verglichen.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten dieser Gruppen wurden mit dem ungepaarten Student's t-test ermittelt. Ein p-Wert < 0.05 entsprach einem signifikanten Unterschied.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen dargestellt. Alle Methoden wurden wie in dem Kapitel 2 beschrieben durchgeführt.

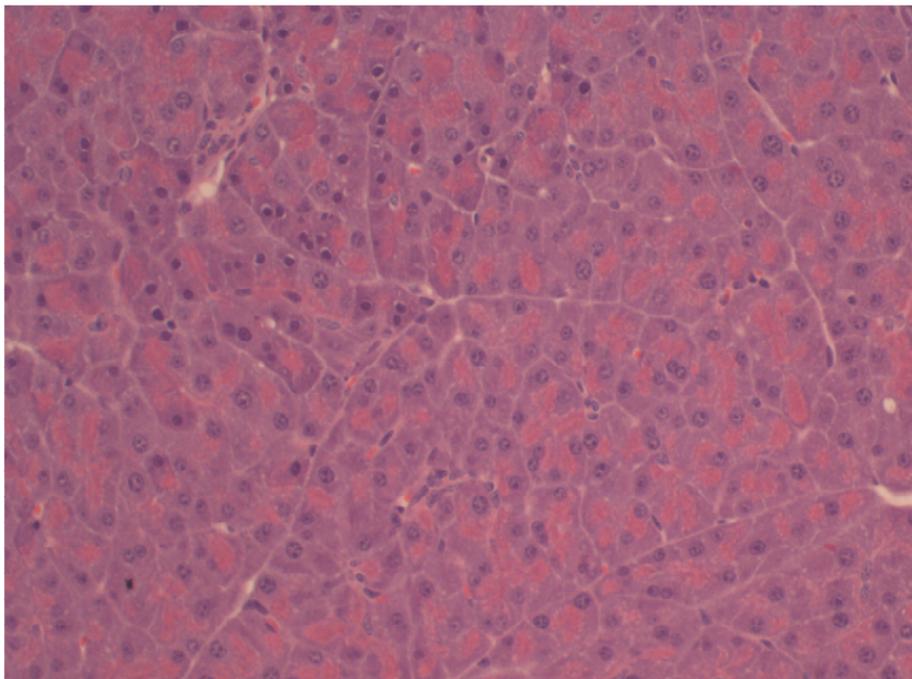
3.1 Ergebnisse der lichtmikroskopisch untersuchten Gewebeschnitte der Pankreata

Bei der histologischen Untersuchung der Pankreata wurden morphologische Veränderungen dieser Gewebe beurteilt, um Rückschlüsse auf die Schwere der Entzündungsreaktionen in diesem Organ treffen und die unterschiedlichen Gruppen untereinander vergleichen zu können. Die Proben wurden wie unter 2.6 beschrieben aufgearbeitet und anschließend beurteilt.

Für die Auswertung der morphologischen Veränderungen wurde das unter 2.6.1 beschriebene Punkteverfahren angewendet. Ein erfahrener Pathologe hat sämtliche Pankreaspräparate verblindet beurteilt.

Bei den Kontrolltieren wurden sowohl in der Gruppe der Wildtyp Mäuse als auch in der Gruppe der Fat-1 Mäuse keine morphologischen Veränderungen festgestellt. Das Pankreasgewebe war in beiden Gruppen vollkommen intakt und zeigte eine gesunde histologische Struktur (Abbildung 3).

Kontrolle Wt (200x)



Kontrolle Fat-1 (200x)

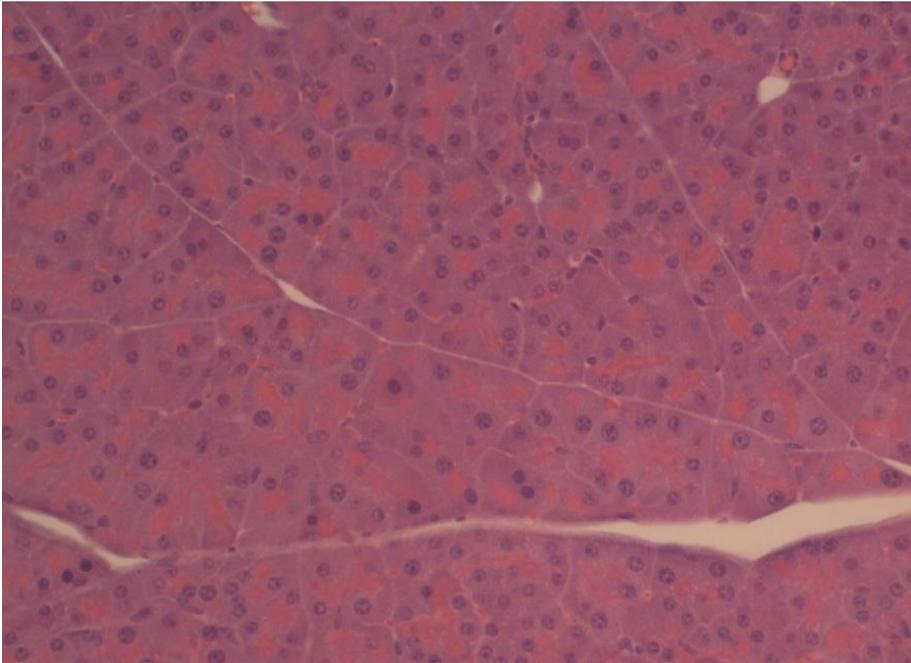
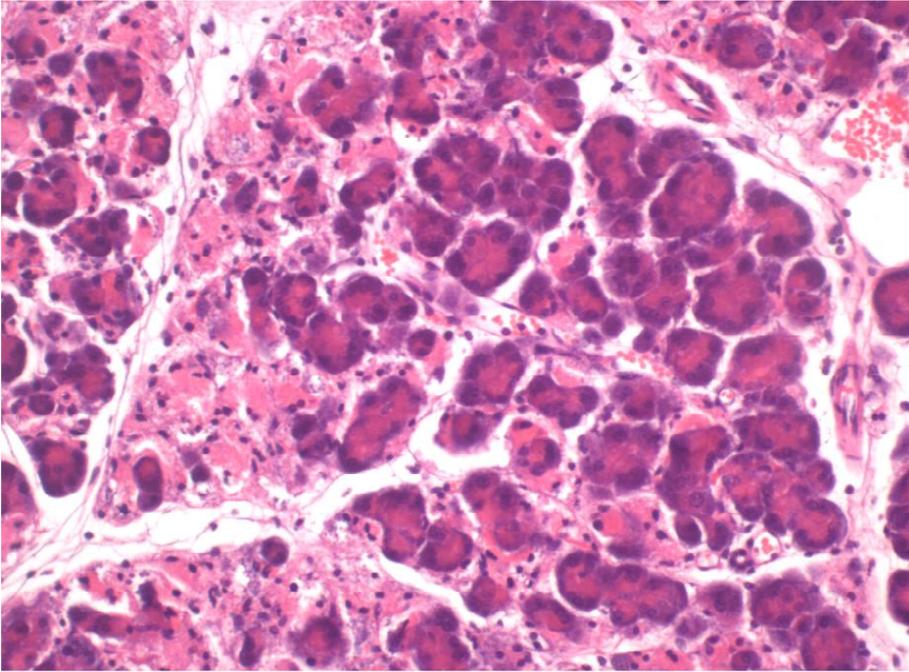


Abb. 3: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme (200x) eines durch Hämatoxylin/Eosin angefärbten Präparates einer repräsentativen Wildtyp Kontrollmaus sowie einer repräsentativen Fat-1 Kontrollmaus.

In der Gruppe der mit Cerulein behandelten Wildtyp Mäuse (Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe) zeigten sich in den mit Hämatoxylin/Eosin (H&E) angefärbten Präparaten deutliche morphologische Veränderungen. Die Pankreasarchitektur war zu großen Teilen aufgehoben. Große Areale des Gewebes waren nekrotisch verändert, die interlobulären Zwischenräume waren als Ausdruck eines Ödems verbreitert und in dem Gewebe war eine deutliche Infiltration durch gewebefremde Zellen nachweisbar (Abbildung 4).

Wt AP (200x)



Wt AP (400x)

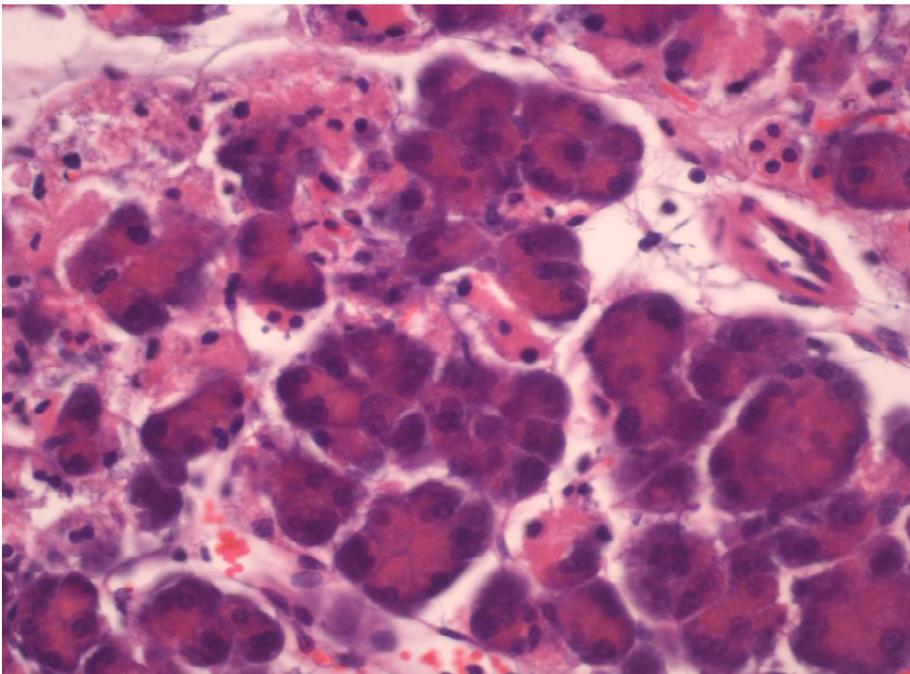
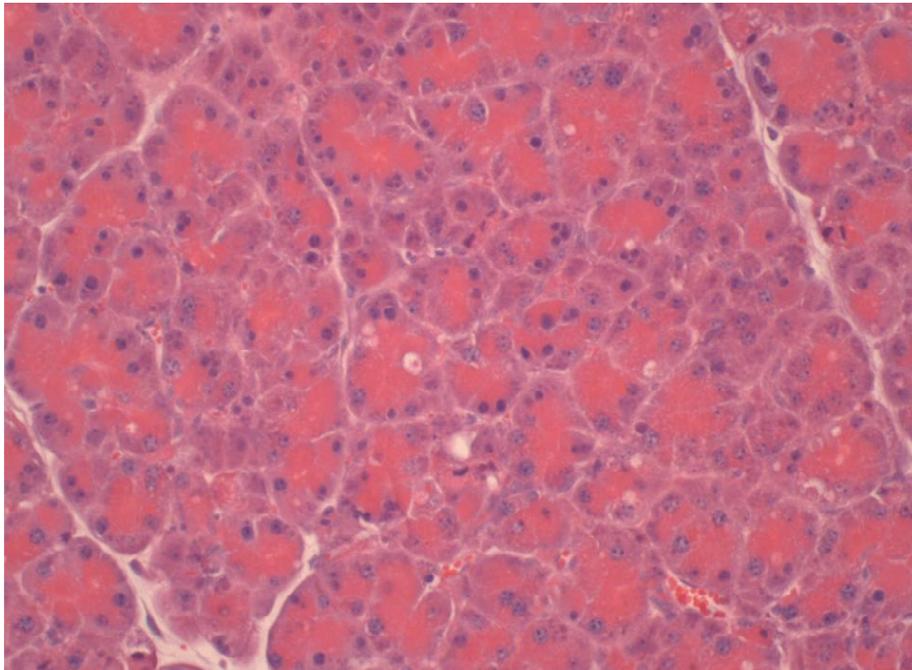


Abb. 4: Übersichtsaufnahme (200x) und Vergrößerung (400x) eines repräsentativen histologischen Präparates aus der Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe.

In der Gruppe der mit Cerulein behandelten Fat-1 Mäuse (Fat-1-Pankreatitis-Gruppe) zeigten sich im Vergleich zu der Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe weniger morphologische Gewebeveränderungen (Abbildung 5). Dabei waren insbesondere die Areale mit nekrotischem

Gewebe deutlich kleiner als die in der Wildtyp Vergleichsgruppe. Die ödematösen Veränderungen und die Gewebeeinfiltration durch Entzündungszellen waren in dieser Gruppe etwas stärker ausgeprägt als in der Wildtyp Vergleichsgruppe.

Fat-1 AP (200x)



Fat-1 AP (400x)

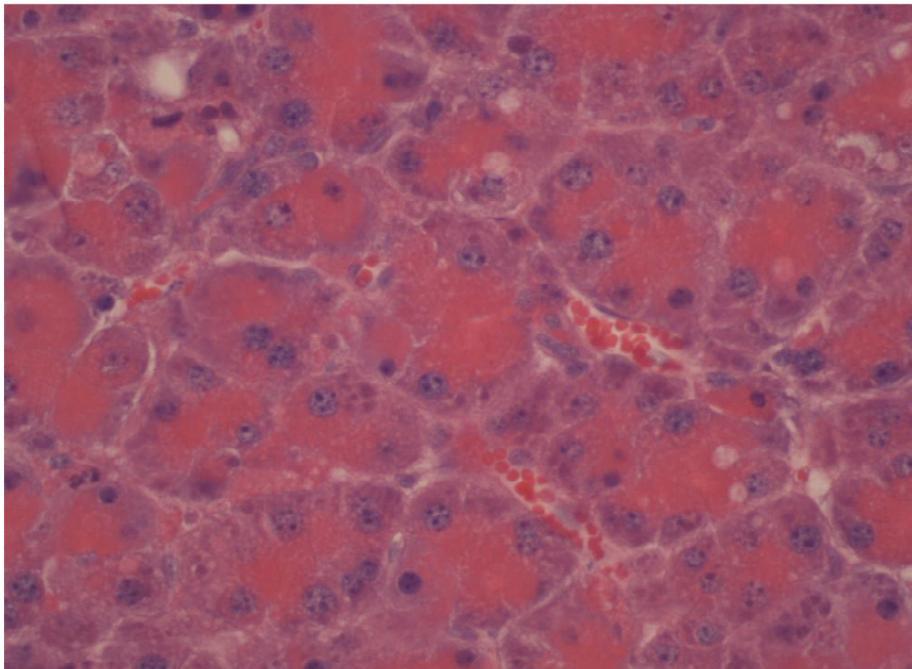


Abb. 5: Übersichtsaufnahme (200x) und Vergrößerung (400x) eines repräsentativen histologischen Präparates aus der Fat-1-Pankreatitis-Gruppe.

Die von uns beurteilten morphologischen Veränderungen in den Pankreaspräparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen wurden mit Hilfe der in 2.6.1 beschriebenen Punkteverteilung quantifiziert, um die unterschiedlichen Gruppen miteinander vergleichen zu können. Die Tabelle 3 zeigt die Zusammenfassung dieser Beurteilung.

Tabelle 3:

Beurteilte Kriterien	Ausmaß der Pankreasschädigung	
	Wt-Pankreatitis Gruppe (n=9)	Fat-1-Pankreatitis-Gruppe (n=6)
(A) Ödem	1.06 ± 0.19	1.08 ± 0.08
(B) Infiltrate	1.06 ± 0.19	1.00 ± 0.13
(C) Nekrose	1.67 ± 0.14	1.33 ± 0.17
(D) Gesamtpunktwert	3.78 ± 0.47	3.42 ± 0.24

Tabelle 3: Für die Quantifizierung der morphologischen Veränderungen im Pankreasgewebe der unterschiedlichen Gruppen wurden entsprechend des Ausmaßes der Kriterien (A) Ödem, (B) Entzündungszellinfiltrat, (C) Nekrose Punkte verteilt. Die Tabelle fasst die Punkteverteilung innerhalb der unterschiedlichen Versuchsgruppen zusammen.

In der Tabelle 3 ist zu erkennen, dass von den 3 bewerteten Kriterien die nekrotischen Veränderungen im Pankreasgewebe (C) am stärksten ausgeprägt sind. Dabei ist die behandelte Wildtyp Gruppe (1.66 ± 0.14 , n=9) im Vergleich zu der behandelten Fat-1 Gruppe (1.33 ± 0.16 , n=6) stärker betroffen. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Vergleichsgruppen konnte nicht nachgewiesen werden. In Bezug auf die beiden anderen untersuchten Kriterien (Entzündungszellinfiltration und Ödem) konnte histologisch kein wesentlicher Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen erkannt werden.

Der Gesamtpunktwert der behandelten Wildtyp Mäuse ist im Vergleich zu dem Gesamtpunktwert der behandelten Fat-1 Mäuse höher. Dieser Wert kommt vor allem durch die

stärker ausgeprägte Nekrose im Pankreasgewebe dieser Tiere zustande. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Gesamtpunktwerte der beiden Gruppen ist nicht erkennbar. Insgesamt scheinen die Wildtyp Mäuse jedoch stärker auf die Ceruleinbehandlung zu reagieren, was sich vor allem in einer stärker ausgeprägten Gewebenekrose widerspiegelt.

3.2 Ergebnisse der Messungen von Serumlipase und Serumamylase

Als Indikator für eine ablaufende Entzündungsreaktion in der Bauchspeicheldrüse wurden in dieser Arbeit die Serumlipase und die Serumamylase gemessen. Die Analyse wurde wie unter 2.7 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 6 und 7 dargestellt.

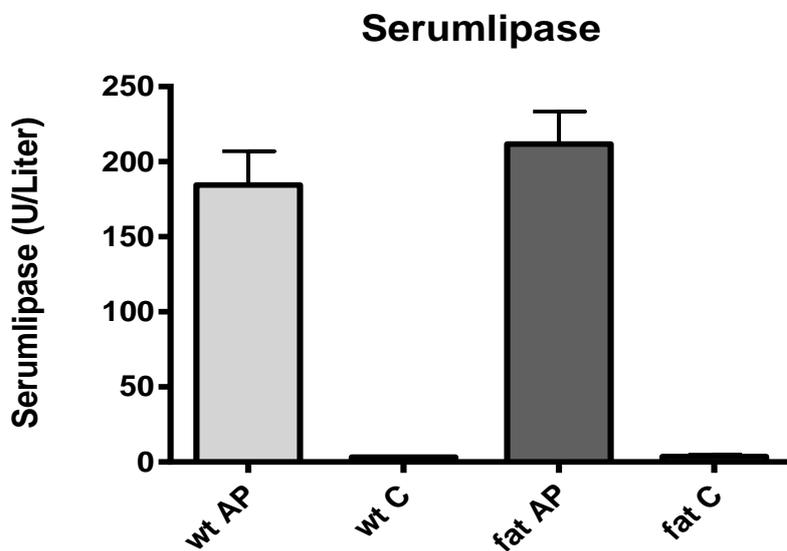


Abb. 6: Graphische Darstellung der Serumlipasespiegel der Versuchstiere nach Induktion einer akuten Pankreatitis mittels 12-maliger Ceruleininjektion.

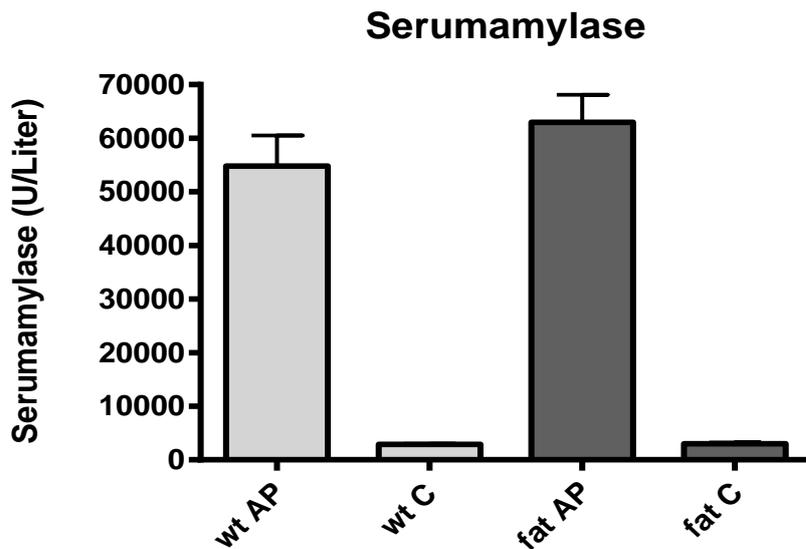


Abb. 7: Graphische Darstellung der Serumamylasespiegel der Versuchstiere nach Induktion der akuten Pankreatitis mittels 12-facher Ceruleininjektion.

Wie in den Abbildungen 6 und 7 zu erkennen ist, zeigen sowohl die Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe als auch die Fat-1-Pankreatitis-Gruppe deutlich erhöhte Werte für die Serumlipase und Serumamylase, verglichen mit den gesunden Kontrolltieren aus beiden Gruppen. Die erhöhte Serumaktivität dieser Enzyme belegt, dass durch die Ceruleinbehandlung eine akute Pankreatitis in den Versuchstieren ausgelöst wurde. Für beide nachgewiesenen Enzyme waren die Werte in der behandelten Fat-1-Gruppe (Amylase: 62967 ± 5166 , $n=6$ / Lipase: 211.7 ± 21.82 , $n=6$) höher als in der behandelten Wildtyp Vergleichsgruppe (Amylase: 54833 ± 5715 , $n=9$ / Lipase: 184.44 ± 22.61 , $n=9$). Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war nicht signifikant.

Da die Werte der Serumlipase und der Serumamylase in der Regel nicht mit der Schwere einer akuten Pankreatitis korrelieren, dient diese Messung in unserem Versuch nicht der Beurteilung, ob eine der Versuchsgruppen stärker als die andere erkrankt ist. Vielmehr dienen die Messungen in unserem Versuch der Kontrolle des eingesetzten Pankreatitismodells.

3.3 Ergebnisse der Messungen intrapankreatischer mRNA von pro- und anti-inflammatorischen Entzündungsmediatoren mittels Echtzeit RT-PCR

In der lichtmikroskopischen Auswertung der Pankreaspräparate ergaben sich erste Hinweise dafür, dass die Gruppe der Fat-1 Mäuse im Vergleich zu der Gruppe der Wildtyp Mäuse weniger stark auf die Ceruleinbehandlung reagierte. Um einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen

belegen zu können, haben wir Entzündungsmediatoren, die bekanntermaßen an der Ausbreitung der Entzündungsreaktion in dem Pankreas beteiligt sind, mittels Echtzeit RT-PCR quantifiziert.

Für die Echtzeit RT-PCR Messungen standen uns, aufgrund der geringen Gesamtgröße der Pankreata, nur kleine Gewebeprobe zur Verfügung. Aus diesem Grund mussten wir uns auf die Messung einiger weniger pro- und anti-inflammatorisch wirkenden Mediatoren, die einen Einfluss auf die Entstehung und Ausbreitung der akuten Pankreatitis haben könnten, beschränken. Desweiteren war es aus o. g. Grund nicht möglich, Proben aller Versuchstiere für die Messung eines jeden Zytokins zu verwenden. Die Probenaufbereitung, Messung und Auswertung wurde wie unter 2.9.2 beschrieben durchgeführt.

Verglichen wurden die mit Cerulein behandelten Mäuse der Fat-1- und der Wildtyp-Gruppe auf Unterschiede in der Expression der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interleukin 6 (IL-6) sowie des anti-inflammatorischen Zytokins Transforming Growth Factor β (TGF- β).

3.3.1 Ergebnisse der intrapancreatischen mRNA-Expression von IL-1 β

IL-1 β ist ein hochpotenter entzündungsfördernder Signalstoff, der im Rahmen der Cerulein-induzierten Azinuszellschädigung freigesetzt wird. In Studien konnte gezeigt werden, dass IL-1 β eine wichtige Rolle in der Entzündungsausbreitung bei einer akuten Pankreatitis spielt. Insbesondere in der Frühphase der akuten Pankreatitis konnten erhöhte Werte für diesen Botenstoff gemessen werden [1].

In unseren Messungen konnte für dieses Zytokin eine erhöhte mRNA-Expression in beiden behandelten Versuchsgruppen gezeigt werden, verglichen mit unbehandelten Tieren aus den entsprechenden Kontrollgruppen. Die Werte der Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe (39.85 ± 10.76 , n=3) zeigten sich signifikant erhöht im Vergleich zu den Werten der Fat-1-Pankreatitis-Gruppe (7.42 ± 0.89 , n=3) (Abbildung 8). Dieses Ergebnis unterstützt die Vorstellung einer verstärkten Entzündungsreaktion im Rahmen der akuten Pankreatitis in der Gruppe der behandelten Wildtyp Mäuse, verglichen mit der Gruppe der behandelten Fat-1 Mäuse.

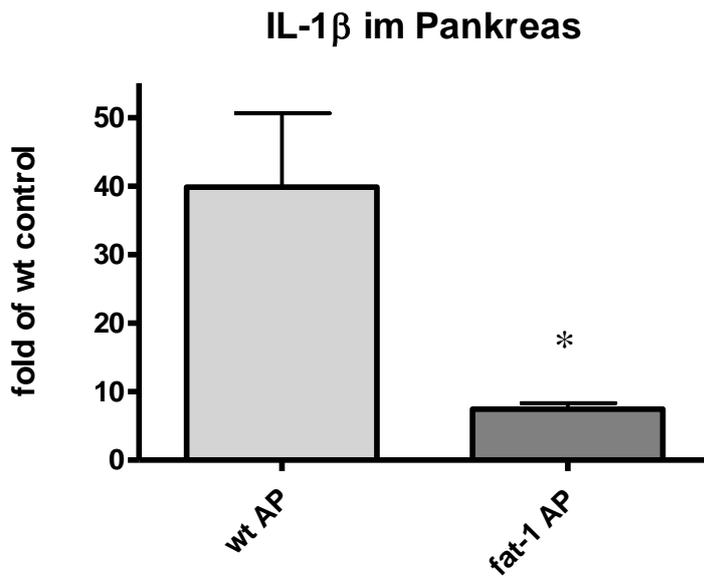


Abb. 8: Vergleich der mRNA-Expression von IL-1 β im Pankreas von Fat-1 (fat-1 AP, n=3) und Wildtyp Mäusen (wt AP, n=3), die mit Cerulein behandelt wurden. Die Daten sind als n-fache Expression von unbehandelten Kontrollmäusen dargestellt.

* = $p < 0.05$ vs. Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe

3.3.2 Ergebnisse der intrapankreatischen mRNA-Expression von IL-6 und TGF- β

Für das ebenfalls pro-inflammatorisch wirkende Zytokin IL-6 sowie das anti-inflammatorisch wirkende Zytokin TGF- β zeigten die behandelten Versuchsgruppen ebenfalls erhöhte mRNA-Expressionen im Pankreasgewebe, verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren. Der Unterschied zwischen der Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe und der Fat-1-Pankreatitis-Gruppe war für beide Zytokine nicht signifikant (Abbildung 9 und 10). Die mRNA Expression von IL-6 zeigte in den behandelten Vergleichsgruppen keinen wesentlichen Unterschied, während die mRNA-Expression von TGF- β in der Gruppe der behandelten Fat-1 Mäuse etwas höher war als in der Gruppe der behandelten Wildtyp Mäuse.

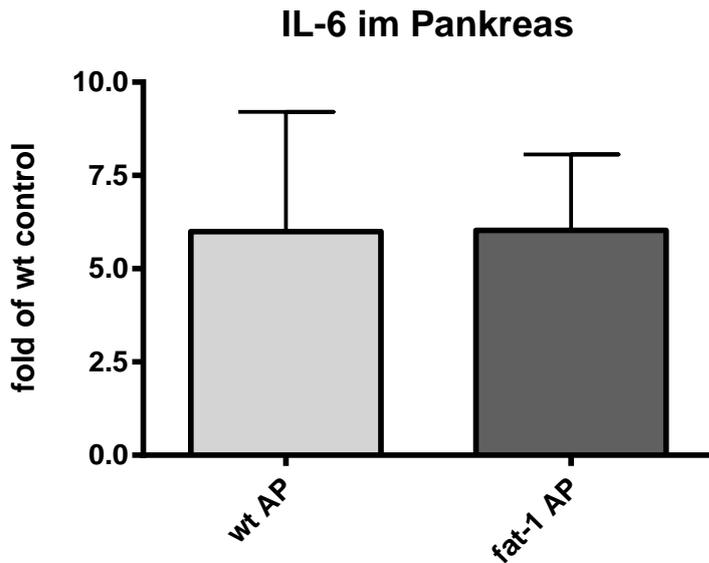


Abb. 9: Vergleich der mRNA-Expression von IL-6 im Pankreas von mit Cerulein behandelten Fat-1 (*fat-1 AP*, 6.03 ± 2.04 , $n=4$) und Wildtyp Mäusen (*wt AP*, 5.99 ± 3.21 , $n=5$). Die Daten sind als n -fache Expression der Werte unbehandelter Kontrollmäuse dargestellt.

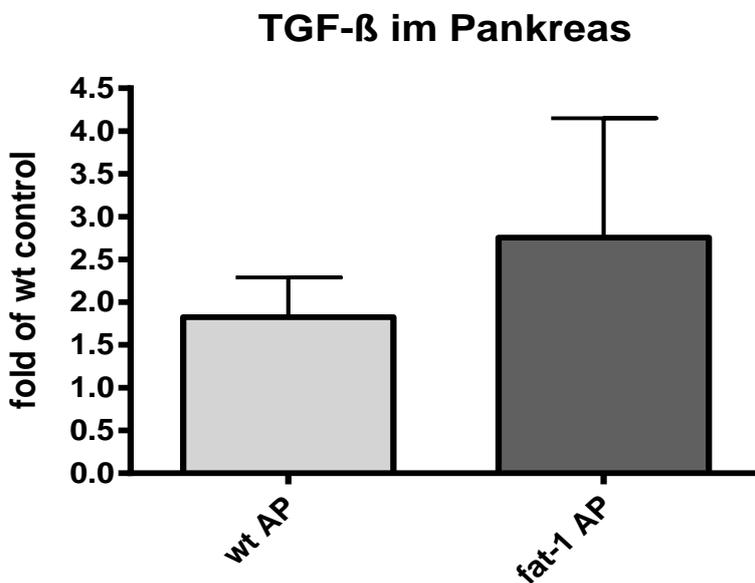


Abb. 10: Vergleich der mRNA-Expression von TGF- β im Pankreas von mit Cerulein behandelten Fat-1 (*fat-1 AP*, 2.76 ± 1.40 , $n=4$) und Wildtyp Mäusen (*wt AP*, 1.83 ± 0.46 , $n=4$). Die Daten sind als n -fache Expression der Werte unbehandelter Kontrollmäuse dargestellt.

3.4 Ergebnisse der Messungen der Serumkonzentrationen von IL-6

In der Auswertung der histologischen Pankreaspräparate ergaben sich erste Hinweise dafür, dass die Gruppe der Fat-1 Mäuse, im Vergleich zu der Gruppe der Wildtyp Mäuse, durch die

Ceruleinbehandlung eine weniger stark ausgeprägte, lokale Entzündungsreaktion im Pankreas entwickelte. Für die Evaluation einer systemischen Entzündungsreaktion wurden im weiteren Verlauf die Serumspiegel des pro-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-6 bestimmt. Dieses Zytokin gilt als Marker für eine systemische Ausbreitung in dem hier gewählten Tiermodell. Die Messungen der IL-6 Spiegel wurden in den gewonnenen Seren der Versuchstiere wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt. Die gewonnene Serummenge je Versuchstier war sehr gering, was uns dazu veranlasste, die Messung der IL-6 Konzentrationen für einen repräsentativen Anteil der unterschiedlichen Versuchsgruppen durchzuführen.

Die Ergebnisse der mittels ELISA gemessenen IL-6 Konzentrationen in den Seren der ausgewählten Versuchstiere sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Gruppen	IL-6 Konzentration in pg/ml
Wildtyp Kontrolle	6.21 ± 0.03, n=4
Fat-1 Kontrolle	7.03 ± 0.36, n=3
Wildtyp Pankreatitis	9,98 ± 0.83, n=6
Fat-1 Pankreatitis	7.06 ± 0.30, n=5 *

Tabelle 4: Vergleich der mittels ELISA gemessenen IL-6 Serumkonzentrationen der Versuchstiere. Dargestellt sind hier die Konzentrationen sowohl der behandelten als auch der unbehandelten Versuchsgruppen.

**= $p < 0.05$ vs. behandelte Wildtyp Versuchsgruppe*

Aus der Tabelle 4 ist zu entnehmen, dass die IL-6 Serumkonzentrationen der unbehandelten Vergleichsgruppen sowie der Fat-1-Pankreatitis-Gruppe kaum voneinander abweichen. Die IL-6 Serumkonzentrationen der Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe (9.98 ± 0.83 , n=6) liegen im Vergleich dazu deutlich höher, der Unterschied im Vergleich zu den behandelten Fat-1 Tieren (7.06 ± 0.30 , n=5) ist signifikant (Abbildung 11).

Diese Ergebnisse belegen, dass die Wildtyp Mäuse auf die Ceruleinbehandlung mit einer Erhöhung der IL-6 Serumkonzentration reagieren, während die behandelten Fat-1 Mäuse keinen Anstieg der IL-6 Serumkonzentration zeigen. Da das pro-inflammatorisch wirkende Zytokin IL-6 in dem hier gewählten Tiermodell als Marker für eine beginnende systemische Ausbreitung der Bauchspeicheldrüsenentzündung gilt, sprechen die Ergebnisse dafür, dass die mit Cerulein behandelten Wildtyp Mäuse bereits eine beginnende systemische Entzündung zeigen, während

die identisch behandelten Fat-1 Tiere diese Anzeichen nicht bieten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den reduzierten morphologischen Veränderungen sowie der reduzierten mRNA-Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β im Pankreasgewebe der behandelten Fat-1 Mäuse im Vergleich zu den behandelten Wildtyp Tieren.

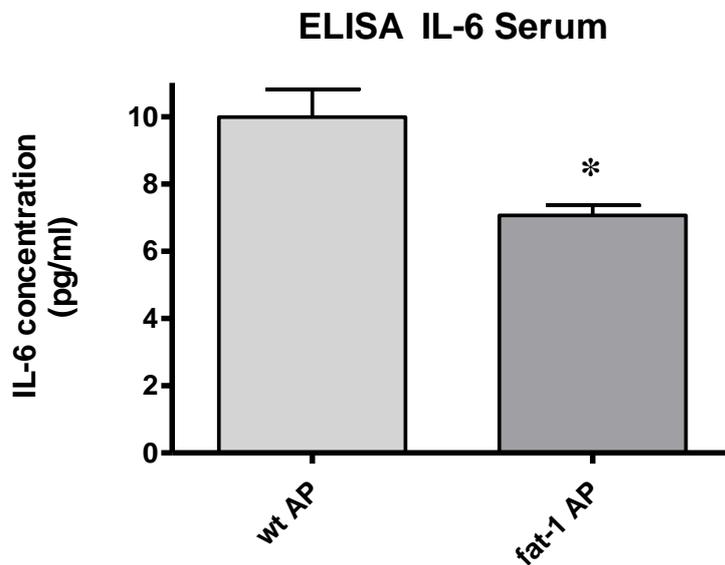


Abb. 11: Graphische Darstellung der Serumspiegel von IL-6 der mit Cerulein behandelten Fat-1 (fat-1 AP, n=5) und Wildtyp Mäuse (wt AP, n=6).

**= $p < 0.05$ vs. behandelte Wildtyp Gruppe*

3.5 Ergebnisse der Messungen der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe sowie der Myeloperoxidase-Antikörper-Färbung des Lungengewebes

Die Bestimmung des Interleukin-6 in den Seren der Versuchstiere hat einen ersten Hinweis auf eine unterschiedlich starke Ausprägung der systemischen Begleitentzündung in den behandelten Versuchsgruppen ergeben. Diesem Hinweis sind wir im Rahmen der Messung der Myeloperoxidase (MPO), einem in neutrophilen Granulozyten vorkommenden Enzym, in dem Lungengewebe der Versuchstiere nachgegangen. In gesundem Lungengewebe sind nur wenige neutrophile Granulozyten nachweisbar, eine verstärkte Infiltration durch diese Zellen gilt als Ausdruck einer Mitbeteiligung der Lunge an der Entzündungsreaktion.

3.5.1 Ergebnisse der Myeloperoxidase-Aktivitätsmessungen im Lungengewebe

Die Messungen wurden wie unter 2.10 beschrieben durchgeführt. Aufgrund der kleinen Probenmengen wurden auch hier die Messungen für repräsentative Anteile der zu

vergleichenden Gruppen durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Gruppe	MPO-Aktivität in der Lunge in U/g Gewebe
Wildtyp-Kontroll-Gruppe	199.80 ± 21.73, n=3
Fat-1-Kontroll-Gruppe	287.60 ± 44.55, n=3
Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe	905.40 ± 137.60, n=4
Fat-1-Pankreatitis-Gruppe	431.73 ± 38.73, n=5*

Tabelle 5: Zusammenfassung der MPO-Aktivität im Lungengewebe der behandelten und unbehandelten Versuchsgruppen.

**= $p < 0.05$ vs. Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe*

Aus der Tabelle 5 ist zu erkennen, dass die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) im Lungengewebe sowohl in der Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe als auch in der Fat-1-Pankreatitis-Gruppe nach Behandlung mit Cerulein deutlich erhöht ist, verglichen mit den Kontrollgruppen. Dieses Ergebnis bestätigt eine beginnende systemische Ausbreitung der Entzündung mit Infiltration des Lungengewebes der behandelten Versuchsgruppen durch neutrophile Granulozyten. Vergleicht man die MPO-Aktivität der Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe (905.40 ± 134.70 , n=4) mit denen der Fat-1-Pankreatitis-Gruppe (431.73 ± 38.73 , n=5), ist zwischen diesen zwei Gruppen ein signifikanter Unterschied zugunsten der Fat-1-Pankreatitis-Gruppe zu erkennen (Abbildung 12). Die Infiltration der Lunge durch neutrophile Granulozyten ist in der Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe deutlich stärker ausgeprägt als in der Fat-1-Pankreatitis-Gruppe. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den in dieser Gruppe erhöhten IL-6 Serumkonzentrationen. Eine stärker ausgeprägte systemische Entzündung in der Gruppe der behandelten Wildtyp Mäuse zieht nach diesen Ergebnissen auch eine ausgeprägtere Lungeninfiltration nach sich.

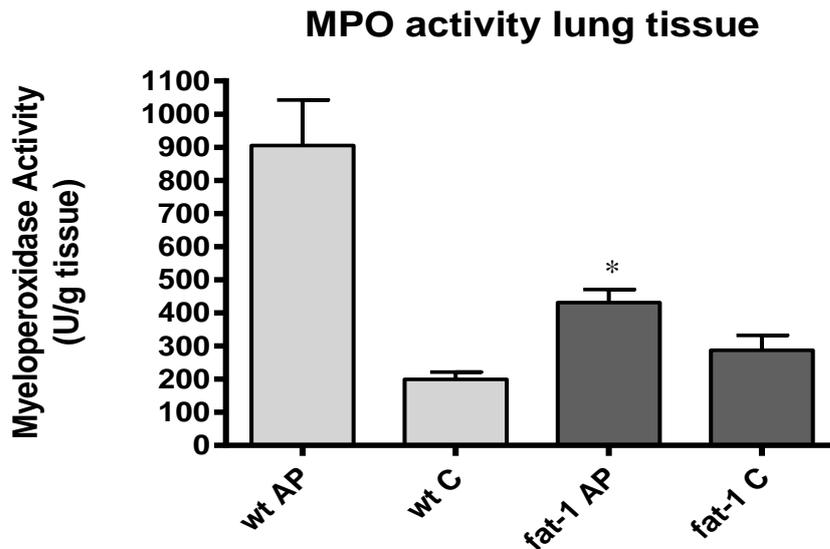


Abb. 12: Graphische Darstellung der MPO-Aktivität im Lungengewebe der mit Cerulein behandelten Wildtyp (wt AP, n=4) und Fat-1 Mäuse (fat-1 AP, n=5) sowie der unbehandelten Wildtyp (wt C, n=3) und Fat-1 Mäuse (fat-1 C, n=3).

*= $p < 0.05$ vs. Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe

3.5.2 Ergebnisse der Anti-Myeloperoxidase-Färbungen des Lungengewebes

Für eine visuelle Darstellung der MPO-Aktivitätsmessungen im Lungengewebe haben wir additiv eine immunhistochemische Färbung der Lungenpräparate mit einem gegen die Myeloperoxidase gerichteten Antikörper durchgeführt. Die Proben des Lungengewebes wurden wie unter 2.10.1 beschrieben angefärbt, repräsentative Präparate der behandelten Versuchsgruppen sind in der Abbildung 13 dargestellt.

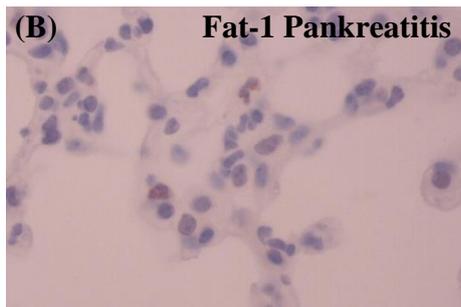
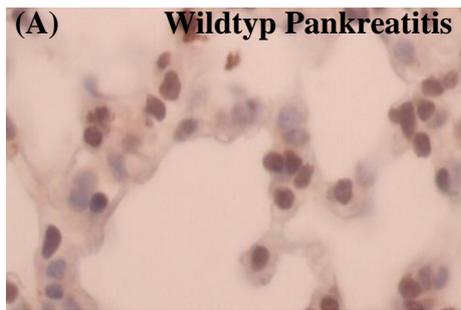


Abb. 13: Immunhistochemische Darstellung von neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe von (A) einer Wildtyp-Pankreatitis-Maus, (B) einer Fat-1-Pankreatitis-Maus. Es wurden für die jeweilige Gruppe repräsentative Präparate ausgewählt und eine Co-Färbung mit Hämatoxylin/Eosin durchgeführt.

In der Abbildung 13 sind lichtmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Präparate der behandelten Versuchsgruppen dargestellt. Durch einen Myeloperoxidase-Antikörper sind neutrophile Granulozyten im Lungengewebe angefärbt. Unter physiologischen Bedingungen finden sich diese nicht in der Lunge. In den Ausschnitten sowohl der Wildtyp-Pankreatitis-Mäuse als auch der Fat-1-Pankreatitis-Mäuse sind neutrophile Granulozyten vermehrt zu sehen.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Die intraperitoneale Injektion des CCK-Analogons Cerulein führte nach 12-maliger Anwendung zu der Manifestation einer akuten Pankreatitis bei allen behandelten Versuchstieren. Als Ausdruck dessen zeigten sich in der lichtmikroskopischen Untersuchung der Pankreata die für eine akute Pankreatitis typischen morphologischen Gewebeveränderungen. Dazu gehören eine Gewebenekrose, ein interstitielles Ödem und eine Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen. Der optische Eindruck wurde durch einen Punktescore quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass die behandelten Wildtyp Mäuse insgesamt einen größeren Gewebeschaden entwickelten als die behandelten Fat-1 Mäuse. Der Gesamtpunktescore (dieser berücksichtigte die drei Kriterien Gewebenekrose, Ödem, Entzündungszellinfiltrat) für die Wildtyp Mäuse war höher als der für die transgenen Fat-1 Mäuse. Am stärksten manifestierte sich die akute Pankreatitis in Form einer Gewebenekrose, der isolierte Punktescore für dieses Kriterium war in der Gruppe der Wildtyp Mäuse ebenfalls höher als in der Gruppe der Fat-1 Vergleichstiere. Signifikante Unterschiede in den Punktescores für die Einzelkriterien oder den Gesamtscore ließen sich nicht nachweisen.

Alle behandelten Versuchstiere entwickelten erhöhte Serumspiegel für die Enzyme Lipase und Amylase. Ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Fat-1 Tieren und den behandelten Wildtyp Tieren konnte nicht gezeigt werden. Die Bestimmung der Enzyme diente in unseren Versuchen primär als Bestätigung dafür, dass alle behandelten Mäuse eine akute Pankreatitis entwickelten.

In den Untersuchungen einiger ausgewählter pro- und anti-inflammatorisch wirkender Zytokine im Pankreasgewebe konnten zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Versuchsgruppen gezeigt werden.

Untersucht wurde die mRNA Expression der pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) sowie des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins Transforming Growth Factor beta (TGF- β). Die mRNA Expression aller untersuchten Zytokine war im Pankreasgewebe der behandelten Mäuse erhöht, verglichen mit den Gruppen der unbehandelten Mäuse.

Die mRNA Expression des pro-inflammatorisch wirkenden Mediators IL-1 β war in dem Gewebe der transgenen Fat-1 Mäuse signifikant niedriger als in dem Gewebe der Wildtyp Mäuse.

Die mRNA Expression des pro-inflammatorisch wirkenden IL-6 sowie des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins TGF- β im Pankreasgewebe der behandelten Versuchstiere zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die Analyse weiterer Zytokine war aufgrund der geringen Größe der Pankreata leider nicht möglich.

Als Ausdruck einer beginnenden systemischen Entzündungsausbreitung wurden die Serumspiegel des proinflammatorisch wirkenden Interleukin-6 (IL-6) bestimmt. Diese waren in der Gruppe der behandelten Wildtyp Tiere signifikant höher als in der Gruppe der behandelten Fat-1 Tiere. Die Werte in der Gruppe der behandelten Fat-1 Mäuse waren im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen kaum angestiegen.

Als typische Komplikation einer akuten Pankreatitis beim Menschen, die Ausdruck einer systemischen Ausbreitung der Entzündungsreaktion ist, gilt eine Affektion der Lunge im Sinne eines ARDS. Diese existiert ebenfalls in dem von uns gewählten Mausmodell. Für die Detektion der Lungenaffektion wurde in unserer Arbeit die Aktivität des Enzyms Myeloperoxidase (MPO) in dem gewonnenen Lungengewebe gemessen. Die MPO kommt insbesondere in Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten vor und ist somit indirekter Ausdruck einer entzündlichen Beteiligung des Lungengewebes.

In unserer Arbeit konnte eine deutlich erhöhte Enzymaktivität in den Lungengeweben der behandelten Versuchstiere beider Versuchsgruppen nachgewiesen werden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. Im Vergleich der Fat-1- und der Wildtyp-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Enzymaktivität zu Ungunsten der Wildtyp-Gruppe.

Diese Messung wurde durch eine spezielle Einfärbung von Lungengewebeschnitten mittels MPO-Antikörper optisch bestätigt.

4.2 Der Einfluss der Omega-3 Fettsäuren auf die Pankreasschädigung

Für die Untersuchung der Parenchymschädigung im Pankreasgewebe wurden Proben aus diesen Geweben entnommen und für eine lichtmikroskopische Untersuchung aufgearbeitet. Eine Quantifizierung der Schädigung wurde mithilfe eines Punktescores durchgeführt. Als weiterer Anhaltspunkt für eine Parenchymschädigung im Pankreas wurden die Serumamylase und die Serumlipase bestimmt. Diese Enzyme gelangen erst durch eine Schädigung der Azinuszellen in den Blutkreislauf.

Entsprechend den Ergebnissen aus 3.2 führte die Behandlung mit 12 Ceruleininjektionen bei allen Mäusen zu deutlich erhöhten Werten für die Serumlipase und die Serumamylase, unabhängig von Unterschieden in der n-3/n-6-Fettsäurezusammensetzung zwischen den Versuchsgruppen. Dieses Ergebnis bestätigt zunächst, dass die Behandlung mit Cerulein zu der von uns gewünschten akuten Pankreatitis führte und dient in unserem Falle der Kontrolle des hier eingesetzten Tiermodells. Eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Enzymserumspiegel und dem Ausmaß der Pankreatitis besteht in der Regel nicht, so dass aus diesen Ergebnissen keine Rückschlüsse darüber getroffen werden können, ob eine der behandelten Versuchsgruppen stärker betroffen ist als die andere.

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Pankreata bestätigte eine Parenchymschädigung in allen behandelten Versuchsgruppen und zeigte zusätzlich einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Gewebeschädigung und der n-3/n-6-Fettsäurezusammensetzung in dem Gewebe der unterschiedlichen Gruppen. Dabei zeigten die Fat-1 Mäuse mit einem zugunsten der n-3 Fettsäuren veränderten n-3/n-6-Fettsäureverhältnis weniger typische Anzeichen einer akuten Pankreatitis im Gewebe als die Mäuse mit hohem n-6-Fettsäuregehalt.

Diese Ergebnisse sind vereinbar mit anderen Studien, die den Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf die durch eine akute Pankreatitis ausgelöste Parenchymschädigung im Pankreas untersuchten. Zunächst haben Kilian et al. die Ausprägung einer Cerulein-induzierten Pankreatitis bei Ratten nach parenteraler Gabe von n-3-, n-6- und n-9-Fettsäuren verglichen. Dabei zeigten sich in der Gruppe der Tiere, die n-3-Fettsäuren erhielten, deutlich weniger ausgeprägte histopathologische Veränderungen als in den Vergleichsgruppen, die n-6- oder n-9-Fettsäuren erhielten [44]. In einer anschließenden Studie derselben Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass Ratten, die nach der Pankreatitisinduktion parenterale Gaben von n-3-Fettsäuren erhielten, weniger PGE₂ und PGF₁α während der Frühphase der ablaufenden Entzündung synthetisierten als eine mit Kochsalzlösung behandelte Vergleichsgruppe [43]. Diese Prostaglandine gehören zu den entzündungsfördernden Botenstoffen, die aus der Arachidonsäure (AA) entstehen.

Es ist bekannt, dass ein vermehrtes Vorkommen von Omega-3 Fettsäuren in einem Gewebe zu einer vermehrten Bildung von Derivaten der Omega-3 Fettsäuren führt. Diese Mediatoren wirken nachgewiesenermaßen direkt entzündungshemmend oder führen zu einer verminderten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine [34 - 38]. Dieser Wirkmechanismus wäre denkbar

als Erklärungsversuch für die signifikant geringere Affektion der transgenen Fat-1 Mäuse gegenüber der Ceruleinbehandlung, verglichen mit den Wildtyp Mäusen.

Ein weiterer Erklärungsansatz ergibt sich aus der Beobachtung, dass die Gruppe der behandelten Fat-1 Mäuse eine geringere Entzündungszellinfiltration im Pankreasgewebe entwickelt als die Wildtyp Vergleichsgruppe. Es konnte in Studien belegt werden, dass die Hemmung einer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Pankreas während der Entstehungsphase einer akuten Entzündung zu einer deutlichen Reduktion der Gewebeschädigung im Pankreas führt [15]. Auch die Hemmung der Einwanderung von Makrophagen in dieser Entstehungsphase führt zu einem entsprechenden Ergebnis [16]. Sollte also ein verändertes n-3/n-6 Fettsäureverhältnis die Rekrutierung von Entzündungszellen in das Pankreasgewebe reduzieren, wäre ein protektiver Effekt dadurch zu erklären. Die zugrunde liegenden Mechanismen gilt es jedoch weiter zu erforschen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse zu den Messungen intrapankreatischer Entzündungsmediatoren

Die Cerulein-induzierte akute Pankreatitis ist ein etabliertes Tiermodell, das die beim Menschen ablaufende Entzündungsreaktion imitiert und dadurch gut geeignet ist, zelluläre Mechanismen der Entzündungsausbreitung zu untersuchen [2, 19]. Ein Charakteristikum der akuten Pankreatitis ist die massive Ausschüttung pro- und anti-inflammatorisch wirkender Botenstoffen, die die Entzündungsreaktion regulieren. Diese Regulierung erfolgt zunächst lokal im Pankreasgewebe, im weiteren Verlauf führen die Botenstoffe zu Nekrosen der Azinuszellen im Pankreas und einer systemischen Entzündungsausbreitung.

In dem folgenden Abschnitt wird diskutiert, welchen Einfluss das zugunsten der n-3 Fettsäuren veränderte Lipidprofil im Pankreasgewebe der Fat-1 Mäuse auf die Zytokinproduktion in diesem Gewebe während der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis hat. Limitiert waren die Untersuchungen der intrapankreatischen Entzündungsmediatoren maßgeblich durch die geringe Größe der Pankreata.

4.3.1 Der Einfluss der Omega-3-Fettsäuren auf die mRNA-Expression von IL-1 β , IL-6 und TGF- β im Pankreasgewebe

Untersucht wurde die mRNA Expression der pro-inflammatorisch wirkenden Botenstoffe IL-1 β und IL-6 sowie des anti-inflammatorisch wirkenden Botenstoffs TGF- β . Die massive Ausschüttung von Zytokinen im Rahmen einer akuten Pankreatitis gilt als typisch für dieses Erkrankungsbild. Folglich ist die Messung der mRNA Expression von Zytokinen im

Pankreasgewebe eine vielgenutzte Methode, um die Beteiligung des Organs an dem Entzündungsgeschehen zu belegen.

4.3.1.1 Einfluss auf die mRNA Expression von IL-1 β

IL-1 β wird in Blutmonozyten und Makrophagen gebildet, ist ein hochpotenter, entzündungsfördernder Signalstoff und gilt als Schlüsselzytokin bei der Entstehung einer akuten Pankreatitis. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 β insbesondere in der Frühphase der akuten Pankreatitis ansteigt [1] und dass die mRNA Expression von IL-1 β im Pankreasgewebe im Rahmen einer im Tiermodell induzierten akuten Pankreatitis proportional zu dem Ausmaß der Gewebeschädigung im Pankreas ansteigt [10].

Im Vergleich der unterschiedlich behandelten Versuchstiere ist zu erkennen, dass das zugunsten der Omega-3 Fettsäuren veränderte Lipidprofil im Pankreasgewebe der Fat-1 Mäuse zu einer signifikant geringeren Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β führt.

Da IL-1 β als eines der Schlüsselzytokine in der Entstehung der lokalen und später auch der systemischen Entzündung zu verstehen ist, unterstützt dieses Ergebnis die Hypothese des protektiven Effektes von Omega-3 Fettsäuren vor der Entzündungsreaktion im Pankreas.

Welche entscheidende Rolle IL-1 β für die Ausbildung einer akuten Pankreatitis spielt, ist zu erkennen an einer Studie von Norman et al, in der beobachtet wurde, dass bei IL-1 knockout Mäusen mit induzierter, akuter Pankreatitis eine Reduktion der Pankreaszerstörung, der Entzündungsmarker und der Mortalität besteht, verglichen mit identisch behandelten Wildtyp Mäusen [11].

Der protektive Effekt des veränderten Lipidprofils im Pankreas der Fat-1 Mäuse steht im Einklang mit einer in vitro Studie von Park et al., in der der Einfluss der Omega-3 Fettsäuren DHA und ALA auf pankreatische Azinuszellen untersucht wurde. Park et al. konnten zeigen, dass DHA und ALA die mRNA Expression von IL-1 β in diesen Zellen nach Stimulation mit Cerulein reduzieren [42].

Ein Erklärungsversuch für die reduzierte IL-1 β Bildung durch das veränderte Lipidprofil im Pankreasgewebe ist eine direkte Hemmung der für die Freisetzung dieses Zytokins verantwortlichen Blutmonozyten. Diese Theorie würde im Einklang stehen mit einer Studie von Endres et al. und Meyer et al. an humanen Monozyten, die zeigen, dass die Einnahme von Fischöl zu einer verminderten Sekretion von IL-1 in diesen Zellen führte [53, 54].

Ein weiterer Erklärungsversuch ergibt sich aus der Beobachtung, dass die Gruppe der als endogene Pyrogene geltenden Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α sich gegenseitig stimulieren. Novak et al. konnte zeigen, dass Monozyten unter dem Einfluss von Omega-3 Fettsäuren

weniger TNF- α produzieren [55]. Schmöcker et al. zeigten, dass transgene Fat-1 Mäuse im Rahmen einer dGAIN/LPS-induzierten Hepatitis eine geringere intrahepatische mRNA Expression von TNF- α aufweisen als gleichbehandelte Wildtyp Vergleichsmäuse [56]. Wenn durch ein verändertes Lipidprofil weniger TNF- α gebildet wird, könnte dies konsekutiv auch zu einer geringeren IL-1 β Bildung führen.

An der Bildung von IL-1 β aus seiner inaktiven Vorstufe im Zytosol ist die Caspase 1 beteiligt. Ein Erklärungsversuch für die geringere IL-1 β Produktion könnte somit auch ein direkt hemmender Effekt der Omega 3 Fettsäuren auf die Caspase 1 sein. In diesem Kontext wird die bereits mehrfach erwähnte Studie von Norman et al. genannt. Hier wurde in einer in vivo Studie gezeigt, dass sowohl durch die Inhibition von Caspase 1 als auch in Caspase 1-knockout Mäusen nach Pankreatitisinduktion deutlich weniger pro-inflammatorische Zytokine ausgeschüttet wurden, die Pankreasschädigung stark vermindert war und die Überlebensrate der Tiere dramatisch gesteigert wurde [11].

4.3.1.2 Einfluss auf die mRNA Expression von IL-6

IL-6 wird von einer Vielzahl an Entzündungszellen wie Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten freigesetzt und gilt als früher Marker einer Entzündungsreaktion. Es gilt als wichtiges Zytokin im Zusammenhang mit einer akuten Pankreatitis und wird immer wieder zur Beurteilung der Schwere der Erkrankung im Pankreasgewebe und im Serum bestimmt. Norman et al. konnten nachweisen, dass IL-6, unabhängig von dem gewählten Tiermodell, im Rahmen einer akuten Pankreatitis im Pankreasgewebe gebildet wird [9]. In unseren Versuchen zeigten sich erhöhte mRNA Expressionen für IL-6 im Pankreas aller behandelten Versuchstiere. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Interleukinmengen im Pankreas in Abhängigkeit des Lipidprofils der behandelten Versuchsgruppen konnten wir jedoch nicht nachweisen. Dieses steht zunächst im Gegensatz zu der bereits mehrfach genannten Studie von Park et al., in der die Applikation der Omega-3 Fettsäuren DHA und ALA die IL-6 Produktion in pankreatischen Azinuszellen nach Ceruleinstimulation deutlich reduzierte im Vergleich zu unbehandelten Zellen [42]. Auch die Studie von Mayer et al., in der eine Omega-3 Infusion bei humanen Monozyten nach Endotoxinkontakt die IL-6 Sekretion reduzieren konnte, ist mit unserem Ergebnis nicht in Einklang zu bringen [53].

IL-6 gilt als Frühmarker in Entzündungsreaktionen. In einer Studie von Paran et al., in der der IL-6 Serumspiegel in unterschiedlichen Zeitabständen nach Pankreatitisinduktion bestimmt wurde, konnte, auch abhängig von der Schwere der induzierten Pankreatitis, ein maximaler Anstieg des IL-6-Spiegels bereits nach 2 oder 4 Stunden nachgewiesen werden [57]. Geht man

davon aus, dass dieses auch für die intrapankreatische Interleukinbildung gilt, könnte es sein, dass wir in unserer Arbeit einen zu späten Zeitpunkt für den Nachweis von unterschiedlichen Mengen an IL-6 im Pankreasgewebe gewählt haben. Da die systemische Zytokinbildung zeitlich hinter der lokalen liegt, wäre dieser Erklärungsversuch vereinbar mit den signifikant unterschiedlichen Serumspiegeln des IL-6 im Serum unserer Versuchsgruppen.

4.3.1.3 Einfluss auf die mRNA Expression von TGF- β

TGF- β ist ein Zytokin mit Effekten auf fast alle Gewebe, er beeinflusst die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung. Er gilt als anti-inflammatorisch wirkendes Zytokin.

Versuche mit TGF- β knockout Mäusen führten zu massiven Entzündungsreaktionen in unterschiedlichen Organsystemen, die insbesondere durch ausgeprägte Leukozyteninfiltrate in den Organen charakterisiert waren. Das Pankreas zeigte sich dabei mit betroffen.

Hahm et al. zeigten in einer Studie, dass Mäuse, in denen isoliert der TGF- β Signalweg im Pankreasgewebe blockiert war, deutlich früher und stärker auf eine Ceruleinbehandlung reagierten als Vergleichstiere vom Wildtyp. Sie hatten einen signifikant erhöhten histopathologischen Score, signifikant erhöhte Werte für Serumamylase und -lipase und eine signifikant erhöhte MPO-Aktivität als indirekten Ausdruck eines Infiltrates mit neutrophilen Granulozyten [14]. In unseren Versuchen wurden erhöhte mRNA Expressionen für TGF- β bei allen behandelten Versuchstieren gemessen. Ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit des Lipidprofils der Pankreata konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Durchschnitt waren die gemessenen mRNA-Mengen in der Gruppe der Fat-1 Tiere jedoch höher als in der Gruppe der Wildtyp Tiere.

Somit könnte man einen möglichen protektiven Effekt des veränderten Lipidprofils, insbesondere unter Berücksichtigung der Ergebnisse der o. g. Studie, auch im Zusammenhang mit der größeren Menge an TGF- β im Pankreasgewebe der Fat-1 Tiere sehen. Eine Blockade des TGF- β Signalweges führt zu einer deutlich stärkeren Reaktion im Pankreas nach Ceruleinstimulation, bei vermehrtem Vorkommen dieses Botenstoffes ist ein gegenteiliger Effekt zu erwarten. Das TGF- β könnte direkt hemmend auf die Rekrutierung von Entzündungszellen in das Pankreasgewebe wirken. Man weiß, dass TGF- β über spezielle Rezeptoren auf eine Vielzahl von Zellen, insbesondere des Immunsystems, wirkt. Diese Vorstellung wäre vereinbar mit unseren lichtmikroskopischen Ergebnissen und den Messungen der Myeloperoxidase als indirekter Nachweis von neutrophilen Granulozyten.

Auch hier wäre eine Interaktion mit anderen an der Regulierung der Entzündungsreaktion beteiligten Zytokinen denkbar. Ähnlich wie sich die pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine

IL-1, IL-6 und TNF- α gegenseitig stimulieren, könnte TGF- β zu einer vermehrten Expression weiterer anti-inflammatorisch wirkender Zytokine führen.

4.4 Der Einfluss der Omega-3 Fettsäuren auf die systemische Entzündungsausbreitung im Rahmen einer akuten Pankreatitis

In den vorausgegangenen Abschnitten der Diskussion wurde auf die lokale Entzündungsreaktion im Pankreas nach Ceruleingabe ausführlich eingegangen. Das hier verwendete Modell der akuten Pankreatitis dient jedoch weiterführend der Untersuchung der systemischen Entzündungsausbreitung [19]. Als Ausdruck dieser wurde in unserer Arbeit zum einen der Serumspiegel des Interleukin-6 (IL-6) bestimmt. Dieses Zytokin ist im Rahmen der akuten Pankreatitis als Frühmarker einer systemischen Infektion zu verstehen [1].

Des Weiteren wurde, durch die Bestimmung des Enzyms Myeloperoxidase (MPO) im Lungengewebe der Versuchstiere, eine Beteiligung dieses Organs am Entzündungsgeschehen untersucht. Die Lungenaffektion gilt als typische systemische Komplikation im Rahmen einer akuten Pankreatitis [1] und wird wahrscheinlich durch entzündungsfördernde Botenstoffe, die auf der Ebene des Pankreas freigesetzt werden, ausgelöst.

4.4.1 Diskussion der Ergebnisse zu den Messungen der Serumspiegel des IL-6

Interleukin-6 ist ein pro-inflammatorisch wirkendes Zytokin, das von unterschiedlichen Entzündungszellen freigesetzt wird und nachweislich in der Frühphase einer akuten Pankreatitis gebildet wird [9]. Es gilt als wichtiges Zytokin im Zusammenhang mit einer akuten Pankreatitis. Erhöhte Serumspiegel des Zytokins gelten als Ausdruck einer beginnenden systemischen Entzündung und werden standardmäßig im Rahmen von Studien zur Untersuchung dieser bestimmt [1]. In unserer Arbeit zeigten die mit Cerulein behandelten Wildtyp Mäuse signifikant erhöhte Serumspiegel von IL-6, während bei den behandelten Fat-1 Mäusen kein relevanter Anstieg des Botenstoffs im Serum nachweisbar war. Das zugunsten der n-3 Fettsäuren veränderte Lipidprofil der Fat-1 Mäuse führte im Rahmen der akuten Pankreatitis zu einem signifikant reduzierten IL-6 Serumspiegel. Das Ergebnis ist vereinbar mit einer Studie von Alhan et al., in der eine intravenöse Verabreichung von n-3 angereicherten Lösungen nach der Induktion einer akuten Pankreatitis bei Ratten zu einem reduzierten IL-6 Serumspiegel in dieser Versuchsgruppe führte [52].

Im Rahmen einer anderen Studie konnte sogar eine eindeutige Korrelation zwischen einem hohen IL-6 Serumspiegel und einem schweren Pankreatitisverlauf sowie dem Auftreten einer Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung festgestellt werden [1]. Auch in unserer Arbeit

gehen die geringeren IL-6 Serumspiegel der Fat-1 Mäuse mit einer geringeren Zerstörung des Pankreasgewebes in dieser Gruppe einher, was oben genanntes Studienergebnis unterstützt.

Da IL-6 aus Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten freigesetzt wird, ist zu vermuten, dass der die Entzündungszellen stimulierende Signalweg im Pankreas durch das veränderte Lipidangebot in diesem Organ verändert ist. Denkbar ist ein direkt hemmender Effekt auf die sezernierenden Zellen. Diese Vorstellung wäre vereinbar mit der bereits genannten Studie von Mayer et al., in der eine Omega-3 Infusion bei humanen Monozyten nach Endotoxinkontakt die IL-6 Sekretion aus den Zellen reduzieren konnte [53]. Ein anderer Ansatz ergibt sich aus der Beobachtung, dass Entzündungszellen durch die im Rahmen einer Entzündungsreaktion ausgeschütteten Zytokine und Chemokine zunächst in ein Gewebe rekrutiert und dann dort stimuliert werden. Ein vermehrtes Vorkommen von n-3 Fettsäuren könnte zu einer verminderten Rekrutierung von Entzündungszellen oder einer reduzierten Stimulation der bereits eingewanderten Zellen führen.

Sharif et al. beobachteten den Effekt einer reduzierten Rekrutierung von Entzündungszellen unter dem Einfluss von Omega-3 Fettsäuren bereits in einer Fütterstudie an Ratten. Eine mit Omega-3 Fettsäuren angereicherte Diät vor der Induktion einer akuten Pankreatitis führte hier zu einer signifikanten Reduktion eines Makrophageninfiltrates in dem Pankreasgewebe der entsprechenden Versuchsgruppe [45].

Eine verminderte Stimulation von bereits eingewanderten Entzündungszellen in dem Zielgewebe wäre z. B. denkbar, wenn aufgrund des vermehrten Vorkommens von n-3 Fettsäuren weniger entzündungsfördernde Mediatoren gebildet werden, die für die Stimulation der Entzündungszellen verantwortlich sind. Dafür, dass unter dem Einfluss von Omega-3 Fettsäuren die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-1 β , TNF- α reduziert ist, wurden in dem Kapitel 4.3 Beispielstudien genannt. Die dort erläuterten Mechanismen könnten auch im Hinblick auf die verminderte Entzündungszellstimulation verantwortlich sein.

4.4.2 Diskussion der Ergebnisse zu den Messungen der Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe sowie der Myeloperoxidase-Antikörper-Färbung des Lungengewebes

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das in neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Monozyten vorkommt. Die Aktivität dieses Enzyms in einem Gewebe steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in diesem Gewebe [1]. In Untersuchungen zu der akuten Pankreatitis gilt die MPO-Aktivität im Lungengewebe als typischer Marker einer systemischen Beteiligung im Rahmen der Entzündung.

Die Behandlung mit Cerulein führte in unseren Versuchen zu einer erhöhten Aktivität der MPO im Lungengewebe der Versuchstiere, was im Einklang mit einer Vielzahl vorausgegangener Studien steht, und bestätigt somit zunächst, dass die Cerulein-induzierte Pankreatitis zu einer systemischen Entzündungsausbreitung mit Beteiligung der Lunge in unseren Versuchen führte. Das veränderte n-3/n-6 Fettsäureverhältnis in dem Gewebe der transgenen Fat-1 Mäuse führte zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität dieses Enzyms im Lungengewebe, verglichen mit den identisch behandelten Wildtyp Tieren. Das Ergebnis steht im Einklang mit einer Studie von Alhan et al., in der Ratten nach der Induktion einer akuten Pankreatitis eine mit n-3 Fettsäuren angereicherte Infusion verabreicht bekamen und diese Behandlung ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des Infiltrates mit neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe der Tiere führte [52].

Das zugunsten von n-3 Fettsäuren veränderte Lipidprofil der transgenen Fat-1 Mäuse scheint in unseren Versuchen Einfluss auf die Signalwege auszuüben, die für die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe verantwortlich sind.

Insgesamt sind die Mechanismen der Rekrutierung von Entzündungszellen in bestimmte Gewebe sehr komplex, was einen Erklärungsversuch des hier beobachteten Phänomens erschwert. Die Rekrutierungsmechanismen reichen von der Aktivierung der Zellen über die Adhäsion der aktivierten Zellen an das Endothel des Zielorgans bis zur Überwindung der endothelialen Barriere in das Gewebe [58].

Man weiß, dass an der Aktivierung von Entzündungszellen unterschiedliche Botenstoffe beteiligt sind. In dem Abschnitt über die Diskussion der intrapankreatischen und systemischen Zytokinproduktion wurde deutlich, dass in unseren Versuchen das veränderte Lipidprofil der Fat-1 Mäuse Einfluss auf die Bildung unterschiedlicher Zytokine nimmt. In dem Abschnitt 4.5 wird noch ausführlicher darauf eingegangen, dass ein vermehrtes Vorkommen von Omega-3 Fettsäuren auch einen Einfluss auf die Bildung der Derivate aus der AA nimmt, die zum Teil chemotaktische Wirkungen entfalten. Vor diesem Hintergrund wäre der Erklärungsansatz denkbar, dass ein verändertes Lipidprofil in den Fat-1 Mäusen zu einer geringeren Produktion von Zytokinen und Chemokinen führt, die für die Stimulation der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut verantwortlich sind.

4.5 Erklärungsversuch zu der protektiven Wirkung der Omega-3-Fettsäuren auf die akute Pankreatitis in den Fat-1 Mäusen

Auf den protektiven Effekt der Omega-3 Fettsäuren wurde erstmals der britische Forscher Hugh M. Sinclair aufmerksam, als er beobachtete, dass die Inzidenzen von kardiovaskulären und

degenerativen Erkrankungen in der Population von kanadischen Eskimos signifikant niedriger waren als in der westlichen Welt. Ein verbreiteter Erklärungsversuch ist, dass die anti-inflammatorische Wirkung der Omega-3 Fettsäuren vermittelt wird, indem sie die Produktion der pro-inflammatorisch wirkenden Eicosanoide aus den Omega-6 Fettsäuren, insbesondere aus der Arachidonsäure (AA), an den Enzymen Cyclooxygenase und Lipoxygenase kompetitiv hemmen [59].

Diese Vorstellung wäre vereinbar mit einer tierexperimentellen Studie von Kilian et al. an Ratten. Hier wurde zunächst ein protektiver Effekt von n-3 Fettsäuren vor einer Cerulein-induzierten Pankreatitis gezeigt, indem Tiere, die nach der Pankreatitisinduktion mit einer n-3-fettsäurereichen Infusion behandelt wurden, einen deutlich reduzierten histopathologischen Score aufwiesen, verglichen mit einer durch eine Kochsalzlösung behandelten Versuchsgruppe. Desweiteren waren auch die Synthese von Prostaglandin E2 und Prostaglandin F1- α , die zu der Gruppe der entzündungsfördernden Derivate aus der AA gehören, nach der n-3 Fettsäureverabreichung deutlich reduziert [43], was mit der Theorie einer kompetitiven Hemmung der n-6 Fettsäuren durch die n-3 Fettsäuren und konsekutiv geringerem Vorkommen der n-6 Derivate vereinbar wäre.

Dem widerspricht die Kolitisstudie von Hudert et al. an transgenen Fat-1 Mäusen. Hier wurde gezeigt, dass Fat-1 Mäuse durch ein zugunsten von n-3 Fettsäuren verändertes n-6/n-3-Fettsäureverhältnis vor einer Kolitis messbar geschützt sind [60]. Für die AA und deren stark pro-inflammatorisch wirkende Derivate PGE2 und LTB4 konnte zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen allerdings kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, was gegen die Vorstellung einer kompetitiven Hemmung von n-3 und n-6 Fettsäuren spricht.

Hingegen wurden die potenten, anti-inflammatorisch wirkenden n-3 Derivate Resolvin E1, Resolvin D3, Neuroprotectin D1, Protectin D1 nur im Colongewebe der Fat-1 Mäuse nachgewiesen. Die Mengen von Prostaglandin E3 (PGE3) und Leukotrien B5 (LTB5), beides anti-inflammatorisch wirkende Derivate der n-3 Fettsäuren EPA und DHA, waren im Colongewebe der Fat-1 Tiere signifikant höher als im Gewebe der Wildtyp Tiere.

Dieses Ergebnis spricht weniger für die Vermutung eines kompetitiven Effektes der Omega-3 Fettsäuren an der Cyclooxygenase und der Lipoxygenase. Wahrscheinlicher ist ein unabhängiger, anti-inflammatorischer Effekt der Omega-3 Fettsäuren und seiner Derivate.

Oben genannte Kolitisstudie von Hudert et al. und die Hepatitisstudie von Schmöcker et al. an transgenen Fat-1 Mäusen, in der ein messbarer Schutz vor einer Hepatitis durch ein zugunsten

von n-3 Fettsäuren verändertes Lipidprofil gezeigt werden konnte, führten zu unserer hier vorgestellte Arbeit. Insbesondere die Beobachtung aus Voruntersuchungen zu unserer Studie, dass das Pankreasgewebe durch viel höhere Konzentrationen an n-3 Fettsäuren gekennzeichnet ist als z. B. das Colon- oder Lebergewebe und dass die AA in signifikant höheren Konzentrationen in dem Pankreasgewebe der Wildtyp Tiere nachgewiesen werden konnte als in dem der Fat-1 Tiere, ließ die Vermutung wachsen, dass eine Entzündungsreaktion in diesen Geweben sehr unterschiedlich ablaufen würde.

Die Fat-1 Mäuse waren durch ein vermehrtes Vorkommen von n-3 Fettsäuren im Pankreasgewebe messbar geschützt vor einer Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis. Die Entzündungsreaktionen fielen jedoch nicht so unterschiedlich stark aus, wie von uns mit dem Wissen aus o. g. Vorstudien erwartet.

Ein Charakteristikum der akuten Pankreatitis ist die massive Ausschüttung von Zytokinen, die sowohl die lokale als auch die systemische Entzündungsausbreitung regulieren. Dafür, dass unter dem Einfluss von Omega-3 Fettsäuren die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-1 β , TNF- α reduziert ist, wurden in dem Kapitel 4.3 Beispielstudien genannt. Auch in den beiden Arbeiten von Hudert et al. und Schmöcker et al., die zu unserer Arbeit geführt haben, wurde dieser Einfluss der Omega-3 Fettsäuren belegt. Schmöcker maß in den transgenen Fat-1 Mäusen mit Hepatitis geringere TNF- α Serumspiegel und geringere intrahepatische mRNA Expressionen für TNF- α , IL-6, IFN- γ und IL-1 β . Hudert konnte geringere mRNA Expressionen von TNF- α und IL-1 β im Colongewebe sowie einen geringeren Serumspiegel für NF- κ B in den Fat-1 Tieren belegen.

Einen Erklärungsversuch dieser Beobachtung kann man unter Berücksichtigung von Untersuchungen zu der Wirkung von Omega-3 Fettsäuren von Serhan et al. und Arita et al. machen. Serhan et al. konnten erstmalig Resolvine und Protectine isolieren und deren anti-inflammatorische Wirkung belegen [61]. Arita et al. identifizierten anschließend den Rezeptor ChemR23, über den Resolvin E1 seine Wirkung entfaltet und zu einer Inaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt. Diese Inaktivierung führt zu einer geringeren Produktion wichtiger entzündungsfördernder Zytokine wie TNF- α und IL-12 [37]. Man weiß, dass sich die Gruppe der als endogene Pyrogene geltenden Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α gegenseitig stimulieren. Somit könnte auch in unserer Arbeit die geringere intrapankreatische mRNA Expression von IL-1 β sowie der reduzierte Serumspiegel von IL-6 in der Gruppe der Fat-1 Mäuse über den von Arita postulierten Signalweg ausgelöst sein: Resolvin E1 aus EPA führt zu

einer Inaktivierung von NF- κ B, konsekutiv wird weniger TNF- α gebildet und dieses führt zu einer geringeren Produktion von IL-1 β und IL-6.

Eine weitere wichtige Beobachtung in unserer Arbeit sind die signifikant geringeren Entzündungszellinfiltrate im Lungengewebe der Fat-1 Mäuse verglichen mit den Wildtyp Mäusen. In dem Abschnitt 4.2 wurde anhand unterschiedlicher Studien belegt, dass Omega-3 Fettsäuren zu einer Reduktion von Entzündungszellinfiltraten führen können. Die Chemotaxis, also die Rekrutierung von Entzündungszellen aus dem peripheren Blut in bestimmte Gewebe, wird unter anderem durch Leukotriene aus der AA vermittelt [33]. Von den Leukotrienen aus der EPA und DHA weiß man, dass sie viel weniger chemotaktisch wirken als die Leukotriene aus der AA. Betrachtet man das unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Lipidprofile der Fat-1 und der Wildtyp Tiere, könnte ein vermehrter Umsatz von EPA und DHA in den Fat-1 Tieren zu einer Zusammensetzung von Lipidmediatoren führen, die eine geringere chemotaktische Wirkung entfalten als die Lipidmediatoren aus der AA in den Wildtyp Tieren.

Ein anderer Ansatz wird in einer Studie von González-Pérez et al. vermittelt. Hier wurde gezeigt, dass die COX-II und die 5-LOX unter dem Einfluss von DHA weniger aktiv sind und somit weniger Eicosanoide gebildet werden [62]. Die daraus resultierende geringere Bildung von Leukotrienen würde ebenfalls zu der hier beobachteten reduzierten Chemotaxis führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der in unserer Arbeit beobachtete entzündungshemmende Effekt vor allem auf den erhöhten n-3 Fettsäureanteil der Fat-1 Mäuse zurückzuführen ist. Es wurden mehrere mögliche Signalwege aufgezeigt, über die die Omega-3 Fettsäuren und ihre Derivate ihre Wirkung entfalten können und diese wurden jeweils durch unterschiedliche Evidenzen belegt. Die erhöhte Konzentration von Omega-3 Fettsäuren in dem Pankreasgewebe unserer transgenen Mäuse führte zu einer Reduktion wichtiger Entzündungsmediatoren im Pankreasgewebe und im Serum der Tiere. Eine Beteiligung der entzündungshemmenden Derivate aus der EPA und der DHA, die Resolvine und Protectine, könnte in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle spielen.

4.6 Klinische Bedeutung der Arbeit und Ausblick

Die entzündungshemmenden Eigenschaften von n-3 Fettsäuren sind seit vielen Jahren bekannt und wurden im Zusammenhang mit unterschiedlichen Krankheitsbildern untersucht, darunter auch die akute Pankreatitis.

Das Fat-1 Mausmodell ist bisher jedoch das einzige Tiermodell, an dem man den Effekt endogen produzierter n-3 Fettsäuren auf unterschiedliche Krankheitsbilder studieren kann. Hudert et al. wiesen erstmals einen protektiven Effekt endogen produzierter n-3 Fettsäuren bei der experimentellen DSS Colitis nach, Schmöcker et al. konnten einen entsprechenden Effekt auf die DGaIN/LPS-induzierte Hepatitis zeigen. In unserer Studie wird erstmals ein protektiver Effekt endogen produzierter n-3 Fettsäuren auf die lokale und die systemische Entzündungsausbreitung bei Cerulein-induzierter akuter Pankreatitis im Mausmodell nachgewiesen.

Das Ziel dieser und nachfolgender Studien sollte es sein, die an der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion beteiligten Mechanismen zu verstehen, um kausale Therapieansätze zur frühzeitigen Eindämmung der Erkrankung zu entwickeln. Bisher existieren rein symptomatische Therapieansätze. Es existieren keine Marker, die frühzeitig einen schweren von einem milden Verlauf kennzeichnen und es existieren keine eindeutigen Kenntnisse über Faktoren, die den Übergang von der milden, lokal begrenzten Entzündungsform in die schwere nekrotisierende Form mit systemischen Komplikationen begünstigen.

Mögliche Ansätze zur Verbesserung der Therapie könnten somit die Eindämmung der lokalen Entzündung sein oder eine Einflussnahme auf die Mechanismen, die zu dem Übergang der lokalen in die systemische Entzündung führen, z. B. durch gezielte Hemmung bestimmter Entzündungszellen oder der Expression bestimmter Zyto- oder Chemokine.

Eine große Herausforderung bleibt die Übertragbarkeit von Effekten, die im Tiermodell beobachtet wurden, auf den menschlichen Organismus. So ist es z. B. mehrfach gelungen, die Entstehung einer Pankreatitis-assoziierten Lungenschädigung im Tiermodell durch Hemmung von Verdauungsenzymen oder spezifischen Zytokinen abzumildern bzw. zu verhindern, jedoch konnte dieser Effekt in klinischen Studien nicht wiederholt werden.

Das in unserer Arbeit verwendete Tiermodell ist ein etabliertes und weit verbreitetes Modell. Trotzdem gilt es, die Übertragbarkeit der hier beobachteten Effekte auf den menschlichen Organismus weiter zu untersuchen.

Eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der akuten Pankreatitis spielen die pro- und anti-inflammatorisch wirkenden Zytokine. Sowohl in unserer Arbeit als auch in einigen der im Diskussionsteil erwähnten Studien, beeinflussen die n-3 Fettsäuren die Zytokinproduktion positiv durch Reduktion wichtiger pro-inflammatorisch wirkender Botenstoffe oder vermehrter

Expression wichtiger anti-inflammatorisch wirkender Botenstoffe. Dieser Effekt könnte auch im Rahmen einer humanen akuten Pankreatitis zu einem positiven Verlauf der Erkrankung führen. Desweiteren konnten wir nachweisen, dass der Einfluss von n-3 Fettsäuren zu signifikant geringeren Entzündungszellinfiltraten im Lungengewebe führte, was ein Hinweis auf eine reduzierte systemische Entzündungsreaktion darstellt. Diese Beobachtung lässt einen positiven Einfluss durch n-3 Supplementierung auch im Rahmen einer akuten Pankreatitis im Menschen vermuten.

Die in unserer Arbeit beobachtete Abschwächung der Entzündungsreaktion bei akuter Pankreatitis unter dem Einfluss von endogen erhöhten n-3 Fettsäuren führte zu der Vermutung, dass ein protektiver Effekt auch im Zusammenhang mit einer chronischen Entzündung desselben Organs auftreten könnte. In einer Folgeuntersuchung wurde in demselben Mausmodell der Verlauf einer durch Cerulein-induzierten chronischen Pankreatitis untersucht, mit besonderem Augenmerk auf den Effekt der n-3 Fettsäuren auf die Ausbildung einer Pankreasgewebefibrose. Es konnte gezeigt werden, dass die erkrankten Fat-1 Mäuse im Vergleich zu den erkrankten Wildtyp Mäusen signifikant weniger fibrotische Veränderungen im Pankreasgewebe entwickelten. Desweiteren war in dem Pankreasgewebe der Fat-1 Tiere eine signifikant geringere Aktivität von Pankreassternzellen nachweisbar [63]. Die Pankreassternzellen sind Bindegewebszellen, die im aktiven Zustand bindegewebige Extrazellulärmatrix produzieren und somit maßgeblich beteiligt sind an einer fibrotischen Gewebeveränderung, die typischerweise im Rahmen einer chronischen Pankreatitis und in der Entstehung eines Pankreascarcinoms auftritt [64].

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass n-3 Fettsäuren auch eine wichtige Rolle in der Prävention und Behandlung der chronischen Pankreatitis und des Pankreascarcinoms zukommen könnte.

5 Zusammenfassung

Die akute Pankreatitis ist, unabhängig von der auslösenden Noxe, durch eine frühzeitige Aktivierung von Verdauungsenzymen in den Azinuszellen gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf führen die massive Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine sowie die Aktivierung einer Vielzahl von Entzündungszellen zunächst zu einer lokalen Gewebeerstörung im Pankreas, dann zu einer systemischen Entzündungsausbreitung.

In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Zufuhr von n-3 Fettsäuren die Entzündungszeichen im Rahmen unterschiedlicher Erkrankungen reduzieren konnte (Arthritis, Colitis, Hepatitis). Es wurde belegt, dass z. B. die Produktion entzündungsfördernder Botenstoffe oder die Aktivierung von Entzündungszellen durch n-3 Fettsäuren reduziert war.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von n-3 Fettsäuren auf die Cerulein-induzierte akute Pankreatitis in Mäusen untersucht. Dieses Überstimulationsmodell ist ein gut charakterisiertes, etabliertes und weit verbreitetes Tiermodell, das die Mechanismen, die bei der Entstehung einer akuten Pankreatitis im Menschen ablaufen, realistisch nachahmt.

Für unsere Versuche wurde das Fat-1 Mausmodell genutzt. Durch das Tragen des Fat-1 Gens aus dem Rundwurm *Caenorhabditis elegans* ist es diesen Tieren möglich, n-3 Fettsäuren aus n-6 Fettsäuren zu synthetisieren. Somit stellt dieses Tiermodell eine einzigartige Möglichkeit dar, den Einfluss endogen erhöhter n-3 Fettsäurekonzentrationen auf unterschiedliche Krankheitsbilder zu untersuchen.

In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fat-1 Mäuse die durch ein zugunsten der n-3 Fettsäuren verschobenes Lipidprofil im Pankreasgewebe charakterisiert sind, geringere Gewebeschäden im Rahmen einer Pankreatitis ausbildeten als Tiere vom Wildtyp. Diese konnten in einer histopathologischen Begutachtung nachgewiesen werden. Begleitet war diese Beobachtung von einer signifikant geringeren mRNA Expression des pro-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-1 β in dem Pankreasgewebe der Fat-1 Mäuse.

Als Hinweis auf eine Reduktion der systemischen Entzündungsausbreitung in den Fat-1 Tieren waren signifikant geringere Serumkonzentration des stark pro-inflammatorisch wirkenden Zytokins Interleukin-6 (IL-6) nachweisbar im Vergleich mit den Wildtyp Tieren. Die Fat-1 Tiere waren signifikant weniger betroffen von einem entzündlichen Lungenschaden, der als typische

Komplikation im Rahmen einer systemischen Entzündungsausbreitung bei akuter Pankreatitis auftritt. Die Lungenbeteiligung wurde durch die Messung der Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) im Lungengewebe nachgewiesen sowie durch eine spezielle Einfärbung der Lungenschnitte mit einem MPO-Antikörper optisch dargestellt.

Die hier beschriebenen Effekte führen wir auf das vermehrte Vorkommen der n-3 Fettsäuren in den Geweben der Fat-1 Mäuse zurück. Die Arbeit liefert einen Hinweis darauf, dass vor allem die Zytokinproduktion durch die n-3 Fettsäuren beeinflusst werden kann.

Die Beobachtung könnte Hinweise auf eine mögliche Behandlung oder Prävention der akuten oder chronischen Pankreatitis beim Menschen liefern.

6 Literatur

1. Makhija R., Kingsnorth A.N. (2002) Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9:401-410
2. Chan Y.C., Leung P.S. (2007) Akute Pancreatitis: Animal Models and Recent Advances in Basic Research. *Pancreas*. Jan;34(1):1-14
3. Pandol S.J., Saluja A.K., Imrie C.W., Banks P.A. (2007) Acute Pancreatitis. Bench to the Bedside. *Gastroenterology*;132:1127-1151
4. Grady T., Saluja A., Kaiser A., Steer M. (1996) Edema and intrapancreatic trypsinogen activation precede glutathione depletion during caerulein pancreatitis. *Am J Physiol*. Jul; 271(1 PT 1):G20-G26
5. Saluja A.K., Donovan E.A., Yamanaka K., Yamaguchi Y., Hofbauer B., Steer M.L. (2007) Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. *Gastroenterology* Jul;113(1):304-10
6. Halangk W., Lerch M.M., Brandt-Nedelev B., Roth W., Ruthenbueger M., Reinheckel T., Domschke W., Lippert H., Peters C., Deussing J. (2000) Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest*. Sep;106(6):773-81
7. O'Konski M.S., Pandol S.J. (1990) Effects of cerulein in the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell. *J Clin Invest*; 86:1649-1657
8. Rijnveld A.W., Florquin S., Branger J., Speelman P., Van Deventer S.J.H., Van der Poll T. (2001) TNF- α Compensates for the Impaired Host Defense of IL-1 Type I Receptor-Deficient Mice During Pneumococcal Pneumonia. *The Journal of Immunology*. Nov1;167(9): 5240–5246
9. Norman J.G., Fink G.W., Denham W., Yang J., Carter G., Sexton C., Faulkner J., Gower W.R., Franz M.G. (1996) Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distang organ dysfunction. *Dig Dis Sci* Aug;42(8):1783-1788
10. Fink G.W., Norman J.G. (1997) Specific changes in the pancreatic expression of the interleukin 1 family of genes during experimental acute pancreatitis. *Cytokine*. Dec;9(12):1023-7
11. Norman J., Yang J., Fink G., Carter G., Ku G., Denham W., Livingston D. (1997) Severity and mortality of experimental pancreatitis are dependent on interleukin-1 converting enzyme (ICE). *J Interferon Cytokine Res* Feb;17(2):113-118
12. De Beaux A.C., Fearon K.C. (1996) Circulating endotoxin, tumor necrosis factor-alpha, and their natural antagonists in the pathophysiology of acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 219:43-46
13. Norman J.G., Fink G.W., Messina J., Carter G., Franz M.G. (1996) Timing of tumor necrosis factor antagonism is critical in determining outcome in murine lethal acute pancreatitis. *Surgery* Sep;120(3):515-521
14. Hahm K.B., Im Y.H., Lee C., Parks W.T., Bang Y.J., Green J.E., Kim S.J. (2000) Loss of TGF-beta signaling contributes to autoimmune pancreatitis. *J Clin Invest*. Apr;105(8):1057-65)

15. Pastor C.M., Vonlaufen A., Georgi F., Hadengue A., Morel P., Fossard J.L. (2006) Neutrophil depletion-but not prevention of Kupffer cell activation- decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* Feb28;12(8):1219-1224
16. Sharif S., Broman M., Babcock T., Ong E., Jho D., Rudnicki M., Helton W.S., Espat N.J. (2006) A Priori Dietary Omega-3 Lipid Supplementation Results in Local Pancreatic Macrophage and Pulmonary Inflammatory Response Attenuation in a Model of Experimental Acute Edematous Pancreatitis (AEP). *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* Jul-Aug;30(4):271-6
17. Kaiser A.M., Saluja A.K., Sengupta A., Saluja M., Steer M.L. (1995) Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol.* Nov;269(5 PT 1):C1295-C1304
18. Gukovskaya A.S., Perkins P., Zaninovic V., Sandoval D., Rutherford R., Fitzsimmons T., Pandol S.J., Poucell-Hatton S. (1996) Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat. *Gastroenterology.* Mar;110(3):875-884
19. Pastor C.M., Matthay M.A., Frossard J.L. (2003) Pancreatitis-Associated Lung Injury, New Insights. *Chest.* Dec;124(6):2341-51
20. Pitchumoni C., Agarwal N., Jain N.K. (1988) Systemic complications of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol.* Jun;83(6):597-606
21. Steer M. (2001) Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol.* Oct; 128(1):13-16
22. Denham W., Yang J., Norman J. (1997) Evidence for an unknown component of pancreatic ascites that unduces adult respiratory distress syndrome through an interleukin-1 and tumor necrosis factor-dependent mechanism. *Surgery.* Aug;122(2):295-301; discussion 301-2
23. Gloor B., Todd K.E., Lane J.S., Rigberg D.A., Reber H.A. (1998) Mechanism of increased lung injury after acute pancreatitis in IL-10 knockout mice. *J Surg Res.* Nov;80(1):110-114
24. Gerard C., Frossard J.L., Bhatia M., Saluja A., Gerard N.P., Lu B., Steer M. (1997) Targeted disruption of the β -chemokine receptor CCR1 protects against pancreatitis-associated lung injury. *J Clin Invest.* Oct 15;100(8):2022-2027
25. Vadas P. (1984) Elevated plasma phospholipase A2 levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in Gram-negative septic shock. *J Lab Clin Med.* Dec;104(6):873-881
26. Grönroos J.M., Nevalainen T.J. (1992) Increased concentrations of synovial-type phospholipase A2 in serum and pulmonary and renal complications in acute pancreatitis. *Digestion.* 52(3-4):232-236
27. Jaffray C., Yang J., Carter B., Mendez C., Norman J. (2000) Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor κ B and inhibitory κ B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery.* Aug;128(2):225-231
28. Bhatia M., Saluja A.K., Hofbauer B., Lee H.S., Frossard J.L., Steer M.L. (1998) The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury. *Int J Pancreatol.* Oct;24(2):77-83

29. Frossard J.L., Saluja A., Bhagat L., Lee H.S., Bhatia M., Hofbauer B., Steer M.L. (1999) The role of intracellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* Mar;116(3):694-701
30. Werner J., Z'graggen K., Fernandez-del Castillo C., Lewandrowski K.B., Compton C.C., Warshaw A.L. (1999) Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surgery*. Jun;226(6):834-842
31. Weylandt K.H., Kang J.X. (2005) Rethinking lipid mediators. *The Lancet*, Volume 366, Issue 9486, Pages 618-620
32. Simopoulos A.P. (2002) Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Disease. *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 21, No. 6, 495-505
33. Yokomizo T., Izumi T., Chang K., Takuwa Y., Shimizu T. (1997) A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*. Jun 5;377(6633):620-624
34. Fischer S., Weber P.C. (1983) Thromboxane A3 (TXA3) is formed in human platelets after dietary eicosapentaenoic acid (C20:5 omega-3). *Biochem Biophys Res Commun*. Nov 15;116(3):1091-9
35. Bagga D., Wang L., Farias-Eisner R., Glaspy J.A., Reddy S.T. (2003) Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Feb 18;100(5):1751-1756
36. James M.J., Cleland L.G., Gibson R.A., Hawkes, J.S. (1991) Interaction between fish and vegetable oils in relation to rat leucocyte leukotriene production. *J Nutr*. May; 121(5): 631-637
37. Arita M., Bianchini F., Aliberti J., Sher A., Chiang N., Hong S., Yang R., Petasis N.A., Serhan C.N. (2005) Stereochemical assignment, anti-inflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med*. Mar 7;201(5):713-722
38. Arita M., Yoshida M., Hong S., Tjonahen E., Glickman J.N., Petasis N.A., Blumberg R.S., Serhan C.N. (2005) Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protect against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. May 24; 102(21):7671-7676
39. London B., Albert C., Anderson M.E., Giles W.R., Van Wagoner D.R., Balk E., Billman G.E., Chung M., Lands W., Leaf A., McAnulty J., Martens J.R., Costello R.B., Lathrop D.A. (2007) Omega-3 Fatty acids and cardiac arrhythmias: prior studies and recommendations for future research: a report from the National Heart, Lung, and Blood Institute and Office Of Dietary Supplements Omega-3 Fatty Acids and Their Role In Cardiac Arrhythmogenesis Workshop. *Circulation*. Sep 4;116(10):e320-35
40. Iso H., Sato S., Umemura U., Kudo M., Koike K., Kitamura A., Imano H., Okamura T., Naito Y., Shimamoto T. (2002) Linoleic acid, other fatty acids, and the risk of stroke. *Stroke*. Aug;33(8):2086-93
41. Harris W.S., Von Schacky C. (2004) The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease. *Prev Med*., Jul;39(1):212-20
42. Park K.S., Lim J.W., Kim H. (2009) Inhibitory mechanism of omega-3 fatty acids in pancreatic inflammation and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. Aug;1171:421-7

43. Kilian M., Gregor J.I., Heukamp I., Wagner C., Walz M.K., Schimke I., Kristiansen G., Wenger F.A. (2009) Early inhibition of prostaglandin synthesis by n-3 fatty acids determinates histologic severity of necrotizing pancreatitis. *Pancreas*. May;38(4):436-41
44. Kilian M., Heukamp I., Gregor J.I., Bretthauer C., Walz M.K., Jacobi C.A., Lochs H., Schimke I., Guski H., Wenger F.A. (2006) N-3, n-6, and n-9 polyunsaturated fatty acids--which composition in parenteral nutrition decreases severity of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats? *Int J Colorectal Dis*. Jan;21(1):57-63
45. Sharif S., Broman M., Babcock T., Ong E., Jho D., Rudnicki M., Helton W.S., Espat N.J. (2006) A priori dietary omega-3 lipid supplementation results in local pancreatic macrophage and pulmonary inflammatory response attenuation in a model of experimental acute edematous pancreatitis (AEP). *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. Jul-Aug;30(4):271-6
46. Foitzik T., Eibl G., Schneider P., Wenger F.A., Jacobi C.A., Buhr H.J. (2002) Omega-3 fatty acid supplementation increases anti-inflammatory cytokines and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. Nov-Dec; 26(6):351-6
47. Wang X., Li W., Li N., Li J. (2008) Omega-3 fatty acids-supplemented parenteral nutrition decreases hyperinflammatory response and attenuates systemic disease sequelae in severe acute pancreatitis: a randomized and controlled study. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. May-Jun;32(3):236-41
48. Xiong J., Zhu S., Zhou Y., Wu H., Wang C. (2009) Regulation of omega-3 fish oil emulsion on the SIRS during the initial stage of severe acute pancreatitis. *Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. Feb;29(1):35-8
49. Laszity N., Hamvas J., Biró L., Németh E., Marosvölgyi T., Decsi T., Pap A., Antal M. (2005) Effect of enterally administered n-3 polyunsaturated fatty acids in acute pancreatitis--a prospective randomized clinical trial. *Clin Nutr*. Apr;24(2):198-205
50. Kang J.X., Wang J., Wu L., Kang Z.B. (2004) Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature*, 427, S. 504
51. Kang J.X., Wang J. (2005) A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. *BMC Biochemistry*, 6:5, doi:1186/1471-2091-6-5
52. Alhan E., Turkyilmaz S., Ercin C., Kaklikkaya N., Kural B.V. (2006) Effects of omega-3 fatty acids on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Eur Surg Res*, 38, 314-321
53. Mayer K., Meyer S., Reinholz-Muhly M., Maus U., Merfels M., Lohmeyer J., Grimminger F., Seeger W. (2003) Short-time infusion of fish oil-based lipid emulsions, approved for parenteral nutrition, reduces monocyte proinflammatory cytokine generation and adhesive interaction with endothelium in humans. *J Immunol*. Nov1;171(9):4837-4843
54. Endres S., Ghorbani R., Kelley V.E., Georgilis K., Lonnemann G., van der Meer J.W., Cannon J.G., Rogers T.S., Klempner M.S., Weber P.C., et al. (1989) The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med*. Feb2;320(5): 265-271
55. Novak T.E., Babcock T.A., Jho D.H., Helton W.S., Espat N.J. (2003) NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Jan;284(1):L84-9

56. Schmöcker Ch., Weylandt K.H., Kahlke L., Wang J., Lobeck H., Tiegs G., Berg T., Kang J.X. (2007) Omega-3 Fatty Acids Alleviate Chemically Induced Acute Hepatitis by Suppression of Cytokines. *Hepatology*. Apr;45(4):864-869
57. Paran H., Sivak G., Mayo A., Freund U., Reshef T., Kidron D. (2000) Evaluation of inflammatory cytokines as prognostic markers in experimental acute pancreatitis in rats. *Acta Cir Bras*. Apr-Jun;15(2)
58. Pastor C.M., Rubbia-Brandt L., Hadengue A., Jordan M., Morel P., Frossard J.L. (2003) Role of Macrophage Inflammatory Peptide-2 in Cerulein-Induced Acute Pancreatitis and Pancreatitis-Associated Lung Injury. *Lab Invest*. Apr;83(4):471-478
59. James M.J., Gibson R.A., Cleland L.G. (2000) Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*. Jan;71(1 Suppl):343S-348S
60. Hudert C.A., Weylandt K.H., Lu Y., Wang J., Hong S., Dignass A., Serhan C.N., Kang J.X. (2006) Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul25;103(30):11276-11281
61. Serhan C.N., Arita M., Hong S., Gotlinger K. (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids*. Nov;39(11):1125-1132
62. Gonzalez-Periz A., Planaguma A., Gronert K., Miquel R., Lopez-Parra M., Titos E., Horrillo R., Ferre N., Deulofeu R., Arroyo V., Rodes J., Claria J. (2006) Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *Faseb J*. Dec;20(4):2537-2539
63. Weylandt K.H., Nadolny A., Kahlke L., Köhnke T., Schmöcker C., Wang J., Lauwers G.Y., Glickman J.N., Kang J.X. (2008) Reduction of inflammation and chronic tissue damage by omega-3 fatty acids in fat-1 transgenic mice with pancreatitis. *Biochim Biophys Acta*. Nov;1782(11): 634-641
64. Omary M.B., Lugea A., Lowe A.W., Pandol S.J. (2007) The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *Journal of Clinical Investigation*. Jun;117(1):50-59

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

- Abb. 1: Schematische Darstellung eines Gaschromatographen
- Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes
- Abb. 3: Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme einer repräsentativen Wildtyp Kontrollmaus sowie einer repräsentativen Fat-1 Kontrollmaus.
- Abb. 4: Übersichtsaufnahme und Vergrößerung eines repräsentativen histologischen Präparates aus der Wildtyp-Pankreatitis-Gruppe
- Abb. 5: Übersichtsaufnahme und Vergrößerung eines repräsentativen histologischen Präparates aus der Fat-1-Pankreatitis-Gruppe.
- Abb. 6: Graphische Darstellung der Serumlipasespiegel der Versuchstiere
- Abb. 7: Graphische Darstellung der Serumamylasespiegel der Versuchstiere
- Abb. 8: Graphische Darstellung der mRNA-Expression von IL-1 β im Pankreas von Fat-1 und Wildtyp Mäusen mit akuter Pankreatitis
- Abb. 9: Graphische Darstellung der mRNA-Expression von IL-6 im Pankreas von Fat-1 und Wildtyp Mäusen mit akuter Pankreatitis
- Abb. 10: Graphische Darstellung der mRNA-Expression von TGF- β im Pankreas von Fat-1 und Wildtyp Mäusen mit akuter Pankreatitis
- Abb. 11: Graphische Darstellung der Serumspiegel von IL-6 von Fat-1 und Wildtyp Mäusen mit akuter Pankreatitis
- Abb. 12: Graphische Darstellung der MPO-Aktivität im Lungengewebe der behandelten und unbehandelten Versuchsgruppen
- Abb. 13: Immunhistochemische Darstellung von neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe einer repräsentativen Wildtyp-Pankreatitis-Maus und einer repräsentativen Fat-1-Pankreatitis-Maus.

Tabellen

- Tabelle 1: Gruppeneinteilung
- Tabelle 2: Histopathologisches Punktesystem
- Tabelle 3: Zusammenfassung der Punktwerte für die morphologischen Veränderungen in der histopathologischen Begutachtung der unterschiedlichen Versuchsgruppen

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der mittels ELISA gemessenen IL-6 Konzentrationen in den Seren der ausgewählten Versuchstiere

Tabelle 5: Zusammenfassung der MPO-Aktivität im Lungengewebe der behandelten und unbehandelten Versuchsgruppen

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lena Vogt (geb. Kahlke), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf die Ausbreitung der Entzündungsreaktion in der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis im Mausmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf von Lena Vogt, geb. Kahlke

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen:

Lena Vogt (geb. Kahlke) hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Karsten H. Weylandt, Anja Nadolny, Lena Kahlke, Thomas Köhnke, Christoph Schmöcker, Jingdong Wang, Gregory Y Lawers, Jonathan N. Glickman, and Jing X. Kang; “Reduction of inflammation and chronic tissue damage by omega-3 fatty acids in fat-1 transgenic mice with pancreatitis”; *Biochim Biophys Acta*; 2008.

Beitrag im Einzelnen: Co-Autor, Durchführung der Experimente.

Publikation 2: Christoph Schmöcker, Karsten H. Weylandt, Lena Kahlke, Jingdong Wang, Hartmut Lobeck, Gisa Tiegs, Thomas Berg, Jing X. Kang;

„Omega-3 fatty acids alleviate chemically induced acute hepatitis by suppression of cytokines”; *Hepatology*; 2007.

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit bei den biochemischen Experimenten zur Messung der Entzündungsaktivität in der Leber.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Danksagung

Mein besonderer und herzlicher Dank geht an Priv.-Doz. Dr. Dr. med. K. H. Weylandt für die zuverlässige, geduldige und kompetente Betreuung dieser Arbeit, die diese trotz der örtlichen Entfernung von Berlin nach Kiel möglich machte.

Danken möchte ich außerdem Prof. J. X. Kang für die freundliche Aufnahme in sein Laborteam am Massachusetts General Hospital und die unkomplizierte und spannende Zusammenarbeit vor Ort.

Des Weiteren danke ich J. N. Glickman, MD, PhD (Brigham and Women's Hospital, Boston) für die histopathologische Begutachtung der Pankreaspräparate.

Ich danke D. J. van Westerloo (Academic Medical Center, Amsterdam) für die freundliche Beratung bei der Etablierung des Tiermodells der Cerulein-induzierten akuten Pankreatitis.

Für die finanzielle Unterstützung des Auslandsaufenthaltes danke ich dem Boehringer Ingelheim Fond.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Großmutter und meinem Ehemann ohne deren emotionalen Rückhalt und auch finanzielle Unterstützung weder das Medizinstudium noch diese Dissertation für mich möglich gewesen wären.