

Einfluss einer n-3-reichen Lipidemulsion auf das akute Lungenversagen im Mausmodell

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

vorgelegt von Christoph Sondermann
aus Siegen

Gießen 2015

Aus der Klinik für Innere Medizin und Poliklinik II am Standort Gießen
Der Justus-Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. Werner Seeger

Gutachter: Professor Dr. Konstantin Mayer
Gutachter: Professor Dr. Eveline Baumgart-Vogt

Tag der Disputation: 21.08.2017

Für Jule Johanna Becker
und meine Töchter Lotte und Leni

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	7
1.1 Akute respiratorische Insuffizienz (ARDS).....	7
1.1.1 Definition und klinische Relevanz	7
1.1.1.1 Definition der amerikanisch-europäischen Konsensuskonferenz (AECC) 7	
1.1.1.2.1 Berlin-Definition.....	8
1.1.2 Pathomechanismen.....	9
1.1.2.1 Lungenödem und Surfactantveränderung	9
1.1.2.2 Zytokine und Leukozyteninvasion.....	11
1.1.2.3 LPS-induziertes akutes Lungenversagen.....	14
1.2 Ernährung des ARDS-Patienten	16
1.2.1 Allgemeine Aspekte der Ernährung des ARDS/ALI-Patienten	16
1.2.2 Enterale/Parenterale Ernährung.....	17
1.2.3 Substrate der Ernährung	18
1.2.4 Lipide	19
1.2.4.1 Fettsäuren.....	19
1.2.4.2 Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung.....	20
1.2.4.3 Immunmodulation durch Lipidemulsionen	21
1.3 Hypothese/Zielsetzung	22
Material und Methoden.....	24
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	24
2.2 Geräte und Materialien	24
2.2.1 Materialien für die Tierhaltung	24
2.2.2 Geräte und Materialien für die <i>In-vivo</i> -Eingriffe	25
2.2.2.1 Geräte.....	25
2.2.2.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.2.3 Geräte, Materialien und Chemikalien für die <i>In-vitro</i> -Bestimmungen.....	28
2.2.3.1 Geräte.....	28
2.2.3.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.2.3.3 Chemikalien.....	29
2.3 <i>In-vivo</i> -Eingriffe	31
2.3.1 Anästhesie	31
2.3.2 Katheterimplantation	31
2.3.3 Anschließen an Perfusor	34

2.3.4	LPS-Instillation in die Trachea.....	35
2.3.5	Blutentnahme	35
2.3.6	Broncho-alveoläre Lavage (BAL)	35
2.3.7	VCT	36
2.4	In-vitro-Bestimmungen.....	36
2.4.1	Leukozyten-Zahl in der broncho-alveolären Lavage.....	36
2.4.2	Differenzierung der Leukozyten in der BAL.....	36
2.4.3	Myeloperoxidase Aktivitäts-Assay	37
2.4.4	ELISA (TNF- α , MIP-2, (PG)E2 und (Tx)B2)	37
2.4.5	Proteinbestimmung in der BAL.....	38
2.5	Protokoll der Experimente	39
2.5.1	Gruppeneinteilung	39
2.5.2	Zeitverlauf	39
2.6	Statistik.....	40
Ergebnisse.....		41
3.1	Tierzahlen	41
3.2	Allgemeine Entzündungszeichen.....	41
3.3	Leukozyteninvasion in die Lunge im akuten Lungenversagen.....	41
3.4	Ansammlung der neutrophilen Granulozyten im Interstitium.....	43
3.5	Permeabilität der endo-/epithelialen Barriere der Lungengefäße („vascular leakage“)	44
3.6	Zytokinsynthese	45
3.6.1	Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α).....	45
3.6.2	Makrophagen-inflammatorisches Protein-2 (MIP-2)	46
3.6.3	Thromboxan B2 (TxB2)	48
3.6.4	Prostaglandin E2 (PGE2)	49
3.7	Freie Fettsäuren im Plasma.....	50
3.8	Histologische und radiologische Korrelate des akuten Lungenversagens	55
Diskussion.....		60
4.1	Immunmodulation durch n-3-Fettsäuren.....	61
4.2	Immunologische Effekte durch MCT	63
4.3	Aktuelle Studienlage zu n-3-Fettsäuren.....	64
4.3.1	n-3-Fettsäuren, klinische und experimentelle Studien.....	64
4.3.2	Enterale/parenterale n-3-Gabe und ARDS.....	65

4.4	Fazit	67
	Zusammenfassung	68
	Summary	69
	Abkürzungsverzeichnis	70
	Abbildungsverzeichnis	74
	Literaturverzeichnis	75
	Ehrenwörtliche Erklärung	81
	Danksagung	82
	Tabellarischer Lebenslauf	83

Einleitung

1.1 Akute respiratorische Insuffizienz (ARDS)

1.1.1 Definition und klinische Relevanz

Die akute respiratorische Insuffizienz, „Acute Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS), ist ein häufig auftretendes klinisches Bild, das durch Schädigung des alveolären Epithels und Endothels zu einem proteinreichen, nicht kardiogenen Lungenödem, einem erhöhten pulmonalarteriellen Druck und schließlich zu respiratorischem Versagen führt (Hecker, Walmrath et al. 2008).

D. G. Ashbaugh erläuterte 1967 erstmals das klinische Bild des ARDS (Ashbaugh, Bigelow et al. 1967). Die von ihm beschriebenen zwölf Patienten boten bei unterschiedlichen Ursachen vergleichbare klinische Befunde, wie beispielsweise Dyspnoe, Zyanose, Hypoxämie und diffuse pulmonale Infiltrate.

1.1.1.1 Definition der amerikanisch-europäischen Konsensuskonferenz (AECC)

1994 wurde auf der amerikanisch-europäischen Konsensuskonferenz (AECC) zum ARDS erstmalig eine international gültige Definition aufgestellt. Nach dieser Definition treten die Symptome des Lungenversagens akut auf. In der Röntgenaufnahme des Thorax zeigen sich diffuse bilaterale Infiltrate. Ein kardiales Lungenödem muss durch den Nachweis eines pulmonalkapillären Verschlussdruckes kleiner 18 mmHg oder durch ein alternatives klinisches Verfahren ausgeschlossen werden.

Der Schweregrad wird gemäß dieser Definition anhand des Oxygenierungsindex ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) ermittelt. Der Oxygenierungsindex (OI) stellt das Verhältnis des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (PaO_2) zur inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO_2) und somit den Schweregrad der Hypoxämie dar.

Ein Oxygenierungsindex kleiner als 300 mmHg wird als „Acute Lung Injury“ (ALI) bezeichnet. Ein Wert kleiner als 200 mmHg wird als „Acute Respiratory Distress Syndrome“ definiert (Bernard, Artigas et al. 1994).

1.1.1.2.1 Berlin-Definition

Diese AECC-Klassifizierung wurde im Jahr 2011 durch eine internationale Expertenkommission in Berlin revidiert. Diese sogenannte ARDS Definition Task Force modifizierte und präziserte in der Berlin-Definition die meisten der ursprünglichen Kriterien. Der akute Beginn der Symptomatik wurde auf einen Zeitraum von bis zu sieben Tagen definiert. Radiologisch müssen im Röntgen-Thorax weiterhin bilaterale Infiltrate dargestellt werden. Diese dürfen sich nicht vollständig durch Pleuraergüsse, Atelektasen oder Rundherde erklären lassen. Der pulmonalarterielle Verschlussdruck wurde als Kriterium gestrichen, da der Pulmonalkatheter klinisch zunehmend an Bedeutung verliert. Das respiratorische Versagen sollte aber weiterhin nicht durch Volumenbelastung und bzw. oder linkskardiales Versagen erklärbar sein. Der Ausdruck „Acute Lung Injury“ wird in dieser neuen Definition nicht mehr verwendet. Dafür wird das ARDS anhand des Oxygenierungsindex und des applizierten PEEP in eine milde, moderate und schwere Form eingeteilt (Ranieri, Rubenfeld et al. 2012).

Das schwere ARDS wird durch einen Oxygenierungsindex von kleiner 100 mmHg mit PEEP oder CPAP von mindestens 5 cm H₂O definiert. Der Bereich von 100 mmHg bis kleiner 200 mmHg beschreibt das moderate ARDS, ebenfalls mit einem applizierten PEEP oder CPAP von mindestens 5 cm H₂O. Ein Oxygenierungsindex von 200 mmHg bis 300 mmHg unter PEEP oder CPAP von mindestens 5 cm H₂O definiert den Bereich des milden ARDS.

Die Berlin-Definition hat die AECC-Kriterien an die klinische Realität angepasst und erlaubt durch die Schweregradeinteilung zukünftig eine schweregradadaptierte Therapie (Hecker, Seeger et al. 2012).

Die Inzidenz von ARDS und ALI beträgt 4,5-7,1 % aller Patienten, die auf einer Intensivstation behandelt werden (Esteban, Anzueto et al. 2002; Brun-Buisson, Minelli et al. 2004). Dieser Prozentsatz steigt auf 12,5 %, wenn man die Patienten betrachtet, die länger als 24 Stunden auf einer Intensivstation behandelt werden (Esteban, Anzueto et al. 2002).

Trotz vielfältiger pharmakologischer Ansätze, die in Tiermodellen erfolgreich waren, gibt es gegenwärtig keine nachgewiesenen wirksamen pharmakologischen Behandlungen für ARDS-Patienten. Dies spiegelt sich in einer seit Jahrzehnten anhaltend hohen Mortalitätsrate von 30-40 % wider (Matthay and Zimmerman 2005).

1.1.2 Pathomechanismen

Grundsätzlich werden extra- und intrapulmonale Ursachen des ARDS unterschieden. Zu den intrapulmonalen oder auch direkten Ursachen zählen beispielsweise die Pneumonie, Aspiration, Lungenkontusion oder ein Inhalations- oder Beatmungstrauma. Als extrapulmonale oder auch indirekte Ursachen können eine schwere Sepsis, Massentransfusionen, Pankreatitis oder eine Verbrauchskoagulopathie aufgeführt werden.

Von den vorgenannten Ursachen, ein ARDS zu entwickeln, birgt mit 41 % eine Sepsis das höchste Risiko, mit 36 % folgen Massentransfusionen und mit 22 % Aspirationspneumonien (Hudson, Milberg et al. 1995).

Auch wenn die Ursachen des ARDS vielfältig und heterogen sind, münden sie alle in eine gleichförmige pathophysiologische Endstrecke.

1.1.2.1 Lungenödem und Surfactantveränderung

Das Flüssigkeitsgleichgewicht, auch Homöostase genannt, zwischen den Gefäßen, dem Interstitium und den Lymphgefäßen wird im Körper über den hydrostatischen und den kolloidosmotischen Druckgradienten geregelt. Unter physiologischen Bedingungen stehen die aus dem arteriellen Gefäßschenkel in das Interstitium filtrierte und aus dem Interstitium in das venöse und lymphatische Gefäßsystem resorbierte Flüssigkeiten im Gleichgewicht. Die Endothelmembran hat für die Homöostase eine wichtige Regulationsfunktion. Ist die Membran intakt, wird der Flüssigkeitsaustausch ausschließlich anhand der transvaskulären Druckgradienten geregelt. Wird die Kapillarpermeabilität beispielsweise im Falle einer Inflammation erhöht, wird die Homöostase gestört. Es findet eine vermehrte Filtration in das Interstitium statt und es bildet sich ein Ödem (Aukland and Reed 1993).

Das sich bildende Ödem ist eiweißreich und kann auch in die Alveolen eindringen. Dort inaktiviert es das Surfactant, das in den Flüssigkeitsfilm der Alveolen sezerniert wird, um dort die Oberflächenspannung herabzusetzen. Dadurch führt das Ödem zu einer Gasaustauschstörung. Außerdem kommt es zu einer vaskulären Funktionsstörung mit akuter Widerstandserhöhung in der pulmonalen Strombahn. Diese Prozesse kommen beispielsweise bei chronischer und akuter pulmonaler Hypertension (Lungenhochdruck)

oder bei akuter Lungenschädigung (z. B. pulmonaler Inflammation) vor (Parker and Townsley 2004).

Für die Anpassung der Ventilation, der Belüftung der Lunge, an die Perfusion, die Durchblutung der Lunge unter den Bedingungen einer Inflammation, spielen Prostanoid (Thromboxan A₂/Prostaglandin I₂), die sich von der Arachidonsäure ableiten, eine wichtige Rolle. Sie sind antagonistisch an der Vasomotorik beteiligt. Ihre Produktion kann während einer Inflammation gesteigert werden und so zur Störung der Regulation zwischen Ventilation und Perfusion führen (Walrath, Scharmann et al. 1993; Walrath, Ghofrani et al. 1996)

Thromboxan A₂ wirkt vasokonstriktorisch, erhöht aber auch die Permeabilität der Gefäße, sodass es zu einem vermehrten Flüssigkeitseinstrom mit Ödembildung kommt. Außerdem bewirkt es über Zytokinsekretion einen Einstrom von aktivierten Leukozyten in das entzündete Gewebe (Chemotaxis).

Prostaglandin I₂ (PGI₂, Prostazyklin) hingegen wirkt in vielen Geweben vasodilatierend, was den Blutstrom verlangsamt. Das begünstigt die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten durch die Endothelmembran. Die dadurch gesteigerte vaskuläre Permeabilität führt zu einer Ödembildung (Seeger and Lasch 1987; Seeger and Suttrop 1987).

Surfactant ist ein lecithinhaltiges, an Globuline gebundenes oberflächenaktives Phospholipid. Es bildet auf den Alveolarepithelien einen dünnen Film, der die Oberflächenspannung der Alveolen reduziert. Es wird von Alveolarepithelzellen Typ II gebildet und sezerniert; der Name leitet sich von „Surface Active Agent“ ab. Durch die herabgesetzte Oberflächenspannung beugt das Surfactant besonders in der Expiration der Bildung von Atelektasen vor (Rooney, Young et al. 1994).

Die Surfactantfunktion und -produktion kann durch ein alveoläres Lungenödem gestört werden. Einerseits werden Alveolarepithelzellen Typ II durch den eiweißreichen Flüssigkeitseinstrom abgetötet, sodass die Gesamtproduktion eingeschränkt wird. Andererseits senkt die einströmende Flüssigkeit die Surfactantkonzentration, sodass die Funktion beeinträchtigt wird. Auch Gerinnungsfaktoren können die Wirkung des Surfactants stören (Verbrugge, Sorm et al. 1997; Akella and Deshpande 2013).

1.1.2.2 Zytokine und Leukozyteninvasion

Zytokine sind Mediatoren, die von aktivierten Zellen beispielsweise aufgrund eines Entzündungsreizes sezerniert werden. Das Immunsystem vermittelt auf diese Weise seine Antwort auf den Entzündungsreiz.

Monozyten und Alveolarmakrophagen gehören zu den zytokinsezernierenden Zellen. Alveolarmakrophagen stammen aus der Monozytenreihe und befinden sich in den Alveolen. Dort phagozytieren sie sowohl aerogen aufgenommene Fremdstoffe als auch Stoffe, die in den Alveolen freigesetzt werden. Sie initiieren durch die Freisetzung von Zytokinen die Entzündungskaskade des Immunsystems (Tonks, Tonks et al. 2003).

Tritt ein Lungenversagen ein, transmigrieren Monozyten verstärkt in die Alveolen. Dort werden sie beispielsweise durch Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert. Auf die Aktivierung reagieren sie mit der Synthese und Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α . TNF- α wiederum stimuliert die Freisetzung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin(IL)-1 β und IL-6. TNF- α agiert somit als der entscheidende Botenstoff des klinischen Bildes einer Endotoxinämie (Engelberts, Moller et al. 1992; Vincent and Bihari 1992; Baxter 1997; Brun-Buisson, Minelli et al. 2004).

TNF- α ist zunächst an die Membran der Monozyten gebunden und wird als memTNF- α bezeichnet. Durch die Aktivität des TNF- α converting enzyme (TACE) wird der extrazelluläre Anteil des TNF- α , solTNF- α , abgespalten (O'Dea, Young et al. 2005). Die Wirkung von memTNF- α erfolgt als Zell-zu-Zell-Botenstoff, während solTNF- α seine Wirkung parakrin entfaltet (Mohler, Sleath et al. 1994; Pellegrini, Puyana et al. 1996).

Klinisch zeigt sich die Wirkung von TNF- α durch Schwitzen, Tachykardie, Hyperventilation und Vasodilatation (Beasley, Cohen et al. 1989).

TNF- α kann an zwei Gruppen von Rezeptoren binden, TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2).

Bei Bindung an TNFR1 wird die TNF-Rezeptor-assoziierte Todesdomäne („TNF-receptor associated death domain“ – TRADD) aktiviert, die wiederum den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 2 („TNF-R associated factor 2“ – TRAF2) und die Fas-assoziierte Todesdomäne („Fas associated death domain“ – FADD) aktiviert; dies führt über die Phosphorylierung verschiedener Caspasen zum programmierten Zelltod, der Apoptose.

Die Bindung an TNFR2 führt zur Aktivierung von TRAF2 und über eine Signalkaskade zur Phosphorylierung des I κ B-Proteins, was die Aktivierung von NF- κ B und somit eine Erhöhung der Syntheserate proinflammatorischer Mediatoren zur Folge hat (Chen and Goeddel 2002).

Durch die Ausschüttung von IL-1 β stimuliert TNF- α nahezu alle kernhaltigen Leukozyten, löst die Produktion von IL-6 durch die Zellen des Immunsystems (aktivierte Makrophagen, Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen) aus und wirkt mit IL-6 synergistisch als Aktivator der Komplementkaskade und einiger Akute-Phase-Proteine (Bone 1996). Ebenfalls gemeinsam mit IL-6 begünstigt TNF- α am Endothel die Adhärenz von Granulozyten und somit die Diapedese weiterer Leukozyten in das entzündete Gewebe (Palluy, Morliere et al. 1992).

Die Leukozytenmigration, oder auch Diapedese, bezeichnet das Auswandern von Leukozyten aus dem Gefäßbett in ein entzündetes Gewebe. Die Leukozytenmigration ist ein wichtiger Teil der Infektabwehr. Rollen („rolling“), Adhäsion und Transmigration sind entscheidende Schritte, die den Leukozyten den Übertritt in das entzündete Gewebe ermöglichen (Weyrich, McIntyre et al. 1995). Die Leukozyten rollen während der Rollphase die Gefäßwand entlang und verlieren an Geschwindigkeit. In der Adhäsionsphase kommt es zu einer festen Bindung mit der Gefäßwand, durch die sie schließlich in der Transmigrationsphase in entzündete Gewebe hindurchtreten (van Buul and Hordijk 2004).

LPS und TNF- α führen zu einer Steigerung der Adhärenz von Leukozyten an Endothelzellen, wodurch es zu einem stärkeren Rollen und einer vermehrten Adhäsion kommt.

Zusätzlich zu diesen Faktoren hat ein endothelial synthetisierter und den Leukozyten präsentierter Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) zur Folge, dass die Adhäsionsmoleküle der Leukozyten in einen aktivierten Zustand überführt werden (Zimmerman, McIntyre et al. 2002).

Adhäsionsmoleküle sind Proteine der Zelloberfläche, die für diese Vorgänge wichtig sind. Sie lassen sich in drei unterschiedliche Gruppen gliedern (Patarroyo 1994). Die erste Gruppe ist die Gruppe der Selektine. Hierbei werden E(Endothel)-Selektin (CD62E) und P(Plättchen- und Endothel)-Selektin (CD62P) auf dem aktivierten Endothel exprimiert. P-Selektin wird z. B. aus den Weibel-Palade-Bodies der Endothelzellen mobilisiert und ist

nach TNF- α -Stimulation maximal exprimiert. Die L(Leukozyten)-Selektine (CD62L) sind auf der Zellmembran der Leukozyten lokalisiert. Des Weiteren besitzen Monozyten das P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PGL-1), mit dem sie zusätzlich an die Selektine des Endothels binden können (Tedder, Steeber et al. 1995). Damit sind die Monozyten in der Lage, an Selektine des Endothels zu binden, und gehen vom Fließen im Blutstrom zum langsameren Rollen entlang der Endotheloberfläche über (Konstantopoulos and McIntire 1996).

Die zweite Gruppe der Adhäsionsmoleküle bilden die Integrine. Integrine sind Heterodimere, bestehend aus zwei miteinander assoziierten Glykoprotein-Ketten: einer Alpha- und einer Beta-Kette. Auf den Leukozyten werden β 1- und β 2-Integrine exprimiert. Integrine können an die dritte Gruppe der Adhäsionsmoleküle, die Immunglobulin-ähnlichen Glykoprotein-Moleküle binden.

Diese Immunglobulin-ähnlichen Glykoprotein-Moleküle werden membranständig auf dem Endothel exprimiert. Dabei werden zuerst die endo- und epithelialständigen VCAMs (Vascular Cell Adhesion Molecule, VCAM-1, CD106) ausgebildet. Diese Moleküle können an ihre korrespondierenden Integrine auf der Leukozytenoberfläche binden. Im weiteren Verlauf kommt es so zu einer so genannten „Firm Adhesion“. Dabei haften die Leukozyten fest an der Oberfläche der Gefäßendothelien. Der Ligand Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) und sein Rezeptor nehmen bei diesem Vorgang eine zentrale Rolle ein. PAF wird durch Endothelzellen nach Aktivierung sowohl membranständig exprimiert als auch sezerniert. Der PAF-Rezeptor ist hingegen auf den Leukozyten membranständig lokalisiert. Durch Bindung des Liganden an seinen Rezeptor kann eine interzelluläre Adhäsion ermöglicht werden (Zimmerman, McIntyre et al. 1997). Zusätzlich kommt es zu einer Steigerung der Affinität zwischen den leukozytären β 2-Integrinen und den endothelialen ICAMs, wodurch die Adhäsion der Leukozyten an der Endothelmembran verstärkt wird („Firm Adhesion“) (Lorant, Patel et al. 1991; Prescott, Zimmerman et al. 2000). Durch diesen Prozess und durch von stimulierten Zellen sezernierte Zytokine kommt es zu einer Expressionssteigerung der ICAMs (Intercellular-adhesion molecule-1, CD54 und ICAM-2, CD102), die bereits konstitutiv von den Endothelzellen exprimiert werden. Die folgende Transmigration der Leukozyten durch die interendothelialen Zellverbindungen wird hauptsächlich durch die Bindung von β 2-Integrinen an die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und PECAM-1 (Platelet-Endothelial Cell adhesion molecule, CD31) ermöglicht (Luscinskas, Ding et al. 1996).

Das humane Interleukin-8 (IL-8) entspricht dem murinen Makrophagen-inflammatorischen Protein-2 (MIP-2). Es wird von Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen nach Stimulation von IL-1 β produziert und zählt zu den Chemokinen der CXC-Gruppe. IL-8 wirkt hauptsächlich durch Steigerung der Chemotaxis, vermehrte Produktion von Adhäsionsmolekülen und Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Die neutrophilen Granulozyten sind aufgrund dieser Eigenschaften die wichtigsten Zielzellen dieses Chemokins (Wolpe, Sherry et al. 1989). Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten korreliert in vielen Fällen mit dem Ausmaß der Lungenschädigung.

In einem Tiermodell des akuten Lungenversagens konnte gezeigt werden, dass die Gabe von IL-8-Antikörpern den Einstrom neutrophiler Granulozyten und somit das Ausmaß der Lungenschädigung mildern konnte (Broaddus, Boylan et al. 1994; Modelska, Pittet et al. 1999).

Neben der proinflammatorischen Wirkung ist IL-8 auch in Wundheilungsprozesse einbezogen. Es stimuliert neben der chemotaktischen Wirkung auf Leukozyten und Fibroblasten auch die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und unterstützt die Angiogenese (Broughton, Janis et al. 2006).

1.1.2.3 LPS-induziertes akutes Lungenversagen

In der Vergangenheit wurden mehrere Tiermodelle entwickelt, um das akute Lungenversagen zu untersuchen (Chen and Goeddel 2002). Alle gängigen Tiermodelle haben gemeinsam, dass sie auf einer oder maximal zwei Ursachen beruhen, die das akute Lungenversagen auslösen. Beispielsweise werden Modelle verwendet, in denen Ölsäure intravenös appliziert wird, um die Fettembolie als Ursache des akuten Lungenversagens zu untersuchen. Die intratracheale Applikation von Salzsäure simuliert die Aspiration von Magensäure.

Um die Sepsis als Ursache des akuten Lungenversagens zu untersuchen, wurden mehrere Modelle entwickelt; zum einen die Verabreichung lebender Bakterien oder zum anderen das Auslösen einer Peritonitis durch Ligation und Perforation des Zökums. Schließlich wird noch die Verabreichung von Bakterienbestandteilen wie Lipopolysaccharid (LPS) genutzt, um eine Sepsis auszulösen (Matute-Bello, Frevert et al. 2008). Insbesondere die intratracheale Verabreichung von LPS hat eine hohe Akzeptanz als klinisch relevantes Modell erlangt (Chen and Goeddel 2002).

LPS ist ein Bestandteil der Zellmembran gram-negativer Bakterien, es wird auch als Endotoxin bezeichnet. LPS besteht aus einem Lipidteil (Lipid A) und Polysaccharidseitenketten. Es konnte gezeigt werden, dass mutierte Shigellen ohne LPS in vivo avirulent waren (Okamura and Nakaya 1977). Das Lipid A ist der am höchsten konservierte Teil des Endotoxins und wurde als stärkster immunstimulatorischer Anteil identifiziert. Diese Struktur ist bei nahezu allen gram-negativen Bakterien identisch. Die Polysaccharidseitenketten hingegen zeigen sich bei den gram-negativen Bakterien variabel. Die Gabe von reinem LPS in einen Organismus hat eine typische Sequenz von Abläufen zur Folge (Rietschel, Brade et al. 1987; Christman, Lefferts et al. 1990).

Leukozyten reagieren auf die Stimulation mit LPS mit der Sekretion von Zytokinen wie dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α . LPS bindet in der Blutbahn an das LPS-bindende Protein (LBP), welches in der Leber als Akute-Phase-Protein gebildet wird und eine Verstärkung der LPS-Wirkung zur Folge hat (Schumann 1992). CD14 und der TLR4/MD-2-Komplex auf Monozyten binden Komplexe aus LPS und LBP (Wright, Ramos et al. 1990; Mollnes, Christiansen et al. 2008). TLR4 ist der vorherrschende, dominante Rezeptor für die durch LPS ausgelösten Effekte (Andonegui, Bonder et al. 2003).

Nach der Bindung von LPS an den CD14/TLR4/MD-2-Komplex wird über die zytoplasmatischen Moleküle „Myeloid Differentiation Primary Responsegene (88)“ (MyD88), Interleukin-1 Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK) und den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) das im Zytosol an I κ B gebundene NF- κ B freigesetzt und anschließend durch dessen Wanderung in den Zellkern eine Reihe von Genen aktiviert, die unter anderem für TNF- α und IL-8 kodieren (Poynter, Irvin et al. 2003; Kawai and Akira 2006).

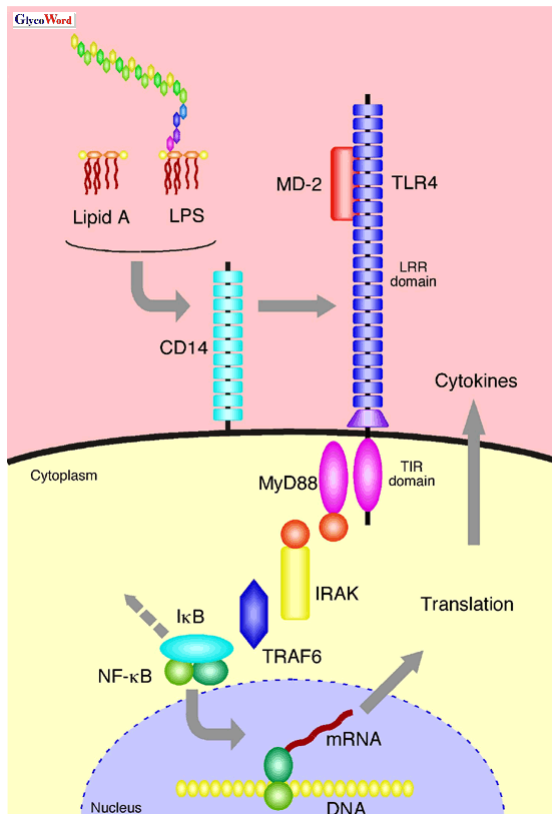


Abbildung 1: Signalweg des Lipopolysaccharides

Die Lipid-A-Struktur des LPS bildet mit dem LBP einen Komplex, der an CD14 bindet. Gemeinsam mit TLR4 kommt es über MyD88, IRAK, TRAF6 und IκB zur Aktivierung von NF-κB. NF-κB transloziert in den Zellkern und löst die Synthese proinflammatorischer Zytokine aus (Darstellung von „GlycoWord“: Masahito Hasimoto, Asahi University School of Dentistry, <http://www.glykoforum.gr.ip/science/word/immunity/IS-A01E.html>; Fig.3 Recognition and signaling pathway of LPS and lipid A).

1.2 Ernährung des ARDS-Patienten

1.2.1 Allgemeine Aspekte der Ernährung des ARDS/ALI-Patienten

ARDS/ALI-Patienten sind, wie viele andere intensivpflichtige Patienten, aufgrund sedierender Medikamente, Intubation und Beatmung oder ihres reduzierten Allgemeinzustandes nicht in der Lage, selbständig ihre Nahrung aufzunehmen. Des Weiteren unterliegen sie dem Stressstoffwechsel, der in ihrem Fall zum einen durch die Ursache des ARDS/ALI (z. B. Traumata, Sepsis) und zum anderen durch Stresshormone wie Kortisol und Katecholamine sowie proinflammatorische Zytokine wie TNF-α und IL-1 ausgelöst wird.

Der Stressstoffwechsel lässt sich in zwei klassische Phasen aufteilen: die Aggressions- sowie die Postaggressions- und Rekonstitutionsphase.

Zunächst kommt es in der Aggressionsphase aufgrund des Überwiegens der Stressmediatoren zu einer katabolen Stoffwechsellage (Hecker, Felbinger et al. 2012). Diese Stoffwechsellage birgt die Gefahr der Substratüberladung bei übermäßiger exogener Zufuhr. Frühere Versuche, diese Phase mittels hochkalorischer Ernährung zu überwinden, scheiterten daher aufgrund negativer Effekte wie Leberversagen und respiratorischer Insuffizienz (Burke, Wolfe et al. 1979; Askanazi, Elwyn et al. 1980). Eine hypokalorische enterale Ernährung in der Aggressionsphase führte zu weniger Komplikationen als eine hochkalorische parenterale Ernährung in Kombination mit niedrigkalorischer enteraler Nahrungsgabe (Casaer, Mesotten et al. 2011; Felbinger, Weigand et al. 2012).

Nachdem der Patient sich stabilisiert hat, kommt es zur Postaggressions- und Rekonstitutionsphase. Aufgrund der vorangegangenen Aggressionsphase hat sich ein ausgeprägtes Energiedefizit eingestellt. Bei nun metabolisch stabilen Verhältnissen muss daher auf eine ausreichende Energiezufuhr geachtet werden, um Mangelzustände zu vermeiden bzw. auszugleichen, da auch eine Mangelernährung aufgrund vielfältiger Komplikationen, vor allem durch Infektionen der mangelernährten Patienten, eine negative Prognose hat (Villet, Chioloro et al. 2005).

1.2.2 Enterale/Parenterale Ernährung

Die Ernährung des ARDS-Patienten kann prinzipiell enteral oder parenteral erfolgen. Goldstandard der Ernährung des ARDS-Patienten ist analog zu anderen Intensivpatienten die enterale Ernährung (Kreymann, Berger et al. 2006). Sofern der Gastrointestinaltrakt funktionstüchtig ist, kann eine enterale Ernährung auch bei sedierten Patienten via nasogastraler oder nasojejunalen Sonde erfolgen. Insbesondere eine frühzeitige Aufnahme der enteralen Ernährung wirkt einer Atrophie der Darmmukosa entgegen. Durch die somit erhaltene Darmintegrität wird der Übertritt von Bakterien und Toxinen in die Blutbahn eingedämmt. Kontraindikationen für eine enterale Ernährung sind ein akutes Abdomen, akute gastrointestinale Blutungen, ein schwerer Ileus oder schwerste Schockzustände (Gramlich, Kichian et al. 2004; Heyland, Dhaliwal et al. 2005; Artinian, Krayem et al. 2006; Kreymann, Berger et al. 2006; McClave, Martindale et al. 2009).

Nur wenn eine vollständige enterale Ernährung absehbar nicht zu realisieren ist, wird das entstehende Defizit über eine Kombination mit parenteraler Ernährung ausgeglichen. Durch eine solche duale Ernährungsstrategie sollen Mangelzustände vermieden werden. Die europäischen Fachgesellschaften empfehlen den Einsatz von parenteraler Ernährung, wenn es absehbar ist, dass die Patienten nach einem Zeitraum von 3 bis 5 Tagen nicht adäquat enteral zu ernähren sind (Koletzko 2007; Singer, Berger et al. 2009). In den amerikanischen Leitlinien wird der Einsatz parenteraler Ernährung nach sieben Tagen empfohlen (McClave, Martindale et al. 2009).

Eine vollständige parenterale Ernährung ist nur dann erforderlich, wenn passager oder auf Dauer Kontraindikationen für eine enterale Ernährung vorliegen (Dudrick 2003; Doig, Simpson et al. 2013).

1.2.3 Substrate der Ernährung

Die Einzelkomponenten der Ernährung sind Kohlenhydrate, Aminosäuren und Lipide.

Kohlenhydrate werden in der Regel als Glukose verabreicht. Die empfohlene Zufuhr für Intensivpatienten liegt bei 2-5 g/kgKG/d, sie entspricht somit rund 50-70 % der Nichteiweißenergie. Die individuell zugeführte Menge ist abhängig von der metabolischen Toleranz des jeweiligen Patienten. Aufgrund von Expertenmeinung wird aktuell ein Blutglukosespiegel von 8,33 bis 10 mmol/l (150-180 mg/dl) angestrebt. Dadurch soll das Risiko von Hypoglykämien vermindert werden (Singer, Berger et al. 2009).

In der katabolen Stoffwechsellage des Intensivpatienten ist die Zufuhr von Aminosäuren aufgrund der ausgeprägten Proteolyse essenziell. Die empfohlene Zufuhr von Aminosäuren liegt bei 1-1,5 g/kgKG/d. Auch hier ist die Zufuhr abhängig von der metabolischen Toleranz. Als Obergrenze für die Proteinzufuhr gilt eine Serumharnstoffkonzentration von 200 mg/dl, unter Berücksichtigung von Katabolie und Nierenfunktion. Zu beachten ist, dass die Proteinsynthese ein energieverbrauchender Prozess ist. Daher sollte die Gabe von Aminosäuren gemeinsam mit einem Energieträger wie Glukose oder Lipiden erfolgen (Singer, Berger et al. 2009).

Lipide sollten 30-50 % der Nichteiweißenergie bereitstellen, das entspricht einer Zufuhr von 0,5 bis 1 g/kgKG/d. Die Zufuhr richtet sich auch hier nach der metabolischen Toleranz, mit einer Serumtriglyzeridkonzentration von 400 mg/dl als Obergrenze. Insbesondere in katabolen Stoffwechselphasen kann es sinnvoll sein, den Energiebedarf

vermehrt durch eine Lipidzufuhr zu decken, um eine Hyperglykämie durch exzessive Glukosegaben zu vermeiden. Die Verabreichung von Lipiden erfolgt in der Praxis meist durch Lipidemulsionen (Singer, Berger et al. 2009; Hecker, Felbinger et al. 2012).

Des Weiteren ist die Verabreichung von Vitaminen und Spurenelementen bei ausschließlich parenteral ernährten Patienten essenziell. Die Zufuhr von Elektrolyten richtet sich nach dem Bedarf, der individuell ermittelt werden muss (Hecker, Felbinger et al. 2012).

1.2.4 Lipide

Lipide sind eine heterogene Gruppe chemischer Verbindungen, die vielfältige wichtige Funktionen erfüllen. Eine wesentliche Funktion ist die Bereitstellung von Substraten zur Energiegewinnung; dies erfolgt vor allem in Form von Fettsäuren.

Beispiele für andere Funktionen von Lipiden sind der Aufbau von Membranen, vor allem durch Phosphoglyzeride, Sphingolipide und Cholesterin. Aber auch die Speicherung von Energie durch Triglyzeride oder eine hormonelle Wirkung vor allem durch Steroidhormone, Leukotriene, Prostaglandine und Thromboxane sind Aufgaben der Lipide (Löffler and Petrides 2003).

1.2.4.1 Fettsäuren

Freie Fettsäuren kommen in einer Konzentration von 0,5 bis 1 mmol/l im Blutplasma vor. Außerdem sind sie als Bausteine in verseifbaren Lipiden wie beispielsweise Triglyceriden oder Sphingolipiden enthalten.

Fettsäuren bestehen aus einer Kohlenwasserstoffkette und einer Carboxylgruppe. Die Kohlenstoffatome werden, beginnend mit der Carboxylgruppe, fortlaufend durchnummeriert. Alternativ können die CH₂-Gruppender Fettsäuren mit griechischen Buchstaben benannt werden. Die erste CH₂-Gruppe nach der Carboxylgruppe bezeichnet man mit α , dann β , γ usw. Die CH₃-Gruppe am Ende der Kette wird immer mit ω bezeichnet (Löffler and Petrides 2003).

Die Fettsäuren tierischer bzw. pflanzlicher Zellen weisen in der Mehrzahl eine oder mehrere Doppelbindungen auf. Fettsäuren, die Doppelbindungen besitzen, bezeichnet man als ungesättigte Fettsäuren; weisen sie mehrere Doppelbindungen auf, werden sie folglich als mehrfach ungesättigt bezeichnet (Löffler and Petrides 2003).

Der tierische Organismus ist nicht in der Lage, Doppelbindungen distal des neunten Kohlenstoffatoms der Kohlenwasserstoffkette zu synthetisieren. Daher müssen Fettsäuren, die Doppelbindungen distal des neunten Kohlenstoffatoms enthalten, mit der Nahrung aufgenommen werden. Sie werden deshalb als essenzielle Fettsäuren bezeichnet (Das 2006).

Eine essenzielle Fettsäure ist die Linolsäure mit zwei Doppelbindungen, die distale Doppelbindung befindet sich sechs Kohlenstoffatome vor dem ω -Kohlenstoffatom. Sie wird daher zu den ω -6 (n-6)-Fettsäuren gerechnet. Ebenfalls eine essenzielle Fettsäure ist die Linolensäure; hier befindet sich die am weitesten von der Carboxylgruppe entfernte Doppelbindung drei Kohlenstoffatome vor dem ω -Kohlenstoffatom. Sie zählt daher zu den ω -3 (n-3)-Fettsäuren (Löffler and Petrides 2003).

1.2.4.2 Lipidemulsionen in der parenteralen Ernährung

Zur parenteralen Ernährung werden Lipidemulsionen unterschiedlicher Zusammensetzung genutzt. Beispielsweise enthalten einige ältere Emulsionen ausschließlich Long-Chain-Triglycerides (LCT), welche heutzutage aufgrund des Nebenwirkungsprofils kaum noch eingesetzt werden. In anderen Lipidemulsionen werden LCT mit Medium-Chain-Triglycerides (MCT), Fischöl (FO) oder auch Olivenöl kombiniert. Diese Kombinationen gibt es in vielfältigen Variationen der Substrate und deren Wichtung (Singer, Berger et al. 2009).

Long-Chain-Triglycerides (LCT) sind aus Sojabohnen oder Distelöl gewonnene Lipidemulsionen aus Fettsäuren mit mehr als 12 Kohlenstoffatomen. Sie enthalten einen hohen Anteil (ca. 52 %) an Linolsäure. Linolsäure wird über die Zwischenstufen γ -Linolensäure (GLA) und eine n-6-Eicosatriensäure (C20:3:6) zur Arachidonsäure (AA) metabolisiert.

Medium-Chain-Triglycerides (MCT) weisen eine Länge von 8 bis 12 Kohlenstoffatomen auf. Sie kommen beispielsweise in Kokosnuss- und Palmkernöl vor. Sie enthalten einen hohen Anteil an Laurinsäure (Greenberger and Skillman 1969). MCT werden über die

Pfortader direkt in die Leber transportiert, wo sie in die Hepatozyten aufgenommen werden und unabhängig von Carnitintransportern in die Mitochondrien gelangen und oxidiert werden (Löffler and Petrides 2003).

Fischöl (FO) enthält n-3-Fettsäuren in hoher Konzentration. Bei Kaltwasserfischen beträgt die Konzentration der n-3-Fettsäuren ca. 30-40 % aller Fettsäuren des Tieres (Singer, Berger et al. 2009; Strobel, Jahreis et al. 2012). n-3 Fettsäuren haben eine Doppelbindung am dritten distalen Kohlenstoffatom. Die in Fischöl enthaltenen Fettsäuren sind v. a. die α -Linolensäure (ALA), Eicosapentaensäure (EPA) und die Docosahexaensäure (DHA). ALA wird durch die delta-6-Desaturase zu Octadecatetraensäure verstoffwechselt. Diese wird durch eine Elongase zu Eicosatetraensäure und über die Delta-5-Desaturase schließlich zu EPA verstoffwechselt. EPA wird mittels Elongase, Delta-6-Desaturase und β -Oxidation in DHA gewandelt (Mayer and Seeger 2008).

1.2.4.3 Immunmodulation durch Lipidemulsionen

Mehrere Studien zeigen, dass die Lipidemulsionen neben der Bereitstellung von Kalorien auch immunmodulierende Wirkungen entfalten. Diese Wirkungen zeigen sich durch veränderte Zytokinausschüttung, Leukozytenfunktion und ihren Einfluss auf die Synthese von Lipidmediatoren, die sowohl pro- als auch antiinflammatorische Komponenten aufweisen (Heller, Rossler et al. 2006; Wanten and Calder 2007; Mayer and Seeger 2008).

Ursprünglich wurde zur parenteralen Ernährung ausschließlich LCT auf Basis von Soja- und Distelöl verwendet. LCT enthält zu einem großen Anteil Linolsäure (LA), eine mehrfach ungesättigte n-6-Fettsäure (PUFA), die als Substrat für Arachidonsäure (AA) bereitsteht. Daher kann die Infusion einer solchen Lipidemulsion die Plasmakonzentration von AA steigern (Adolph, Heller et al. 2009).

Aus der AA entstehen Prostaglandine (PG) und Thromboxane (Tx) der 2er-Serie (Stachowska, Dolegowska et al. 2009). PGE₂ nimmt eine zentrale Stellung unter den PGs ein und ist für viele proinflammatorische Effekte verantwortlich (Gomez, Foudi et al. 2013). Neben der stark proinflammatorischen Wirkung führt es zur Schmerzsensibilisierung und Temperaturerhöhung, es schützt jedoch auch die Magenschleimhaut durch Schleimproduktion. PGE₂ wirkt in vielen Gefäßgebieten vasodilatierend. Indessen verursacht PGD₂ eine Vaso- und Bronchokonstriktion (King, Fukushima et al. 1991). PGI₂

(Prostazyklin) inhibiert noch zusätzlich die Thrombozytenaggregation und verfügt über eine ausgeprägte vasodilatative Wirkung (Seeger, Bauer et al. 1984). Thromboxan A2 erhöht die vaskuläre Permeabilität, wirkt vasokonstriktiv und aktiviert Leukozyten (Seeger and Lasch 1987; Seeger and Suttorp 1987; Holtzman 1991). Durch die Veränderung des Eikosanoidprofils kann es zu einem Ventilations-Perfusions-Missverhältnis in der Lunge kommen und somit zur Minderung des Oxygenierungsindex (Matthay and Zimmerman 2005).

Unter der Vorstellung, die Effekte einer reinen LCT-Infusion zu mildern, wurde eine Kombination von LCT und MCT eingeführt. Somit werden weiterhin Kalorien in adäquater Menge bereitgestellt, während gleichzeitig n-6 PUFA reduziert werden können (Dawes, Royle et al. 1986; Bach, Storck et al. 1988; Wicklmayr, Rett et al. 1988).

Eine der Fettsäuren des Fischöls ist die Eicosapentaensäure (EPA). Diese ist das Substrat für die Prostaglandine und Thromboxan der 3er-Serie. TxA3 und PGI3 können die gleichen Rezeptoren zu TxA2 und PGI2 besetzen, weisen jedoch z. T. deutliche Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit auf. Zwar zeigt PGI3 ähnlich starke Effekte wie PGI2 hinsichtlich der vasodilatierenden Wirkung und des verminderten aggregatorischen Verhaltens, die biologischen Reaktionen auf TxA3 sind jedoch im Gegensatz zu denen von TxA2 zumindest in der Lunge deutlich vermindert (Walrath, Scharmann et al. 1993; Grimminger, Wahn et al. 1995).

Die zusätzliche Verabreichung von FO ist daher ein vielversprechender Ansatz, die parenterale Ernährung zu optimieren. Die Verabreichung von FO konnte im Tiermodell, bei gesunden Freiwilligen und in klinischen Studien die exzessive Entzündungsreaktion modulieren (Pontes-Arruda, Martins et al. 2011).

Bei kritisch kranken Patienten, die an einer Sepsis litten, konnte die Gabe von n-3-basierten Lipidemulsionen die Mortalität reduzieren und antiinflammatorische Wirkungen zeigen (Heller, Rossler et al. 2006). Ebenso konnten positive Effekte durch parenterale FO-Gabe auf das klinische Outcome von Patienten mit schwerer Pankreatitis gezeigt werden (Wang, Li et al. 2008).

1.3 Hypothese/Zielsetzung

Lipidemulsionen sind als essenzieller Teil der parenteralen Ernährung von Intensiv- und ARDS/ALI-Patienten klinischer Alltag. Die pathophysiologischen und

immunmodulatorischen Effekte der unterschiedlichen Lipidemulsionen werden zunehmend besser verstanden. Die Entwicklung neuer Lipidemulsionen, um die Ernährung der schwerkranken Patienten zu optimieren, ist ein wichtiger Teilaspekt der Intensiv- und Ernährungsmedizin. Da es noch wenig Erfahrungswerte für die neuen Lipidemulsionen gibt, die LCT/MCT mit und ohne FO enthalten, müssen sie in Bezug auf ARDS/ALI noch näher untersucht werden.

In dieser Arbeit soll der Einfluss von drei kommerziell erhältlichen Lipidemulsionen auf die Entzündungsreaktion im Mausmodell des akuten Lungenversagens untersucht werden. Die untersuchten Emulsionen sind die bisher als Standard angesehene Emulsion auf Basis von LCT (Lipoven[®], 20 %), eine Mischemulsion aus LCT und MCT (Lipofundin[®], 20 %) und eine neue Emulsion aus LCT, MCT und FO (Lipoplus[®], 20 %). Diese Lipidemulsionen sind alle für die parenterale Ernährung zugelassen.

Die Arbeit dient der Evaluation der aufgeführten Lipidemulsionen während eines akuten Lungenversagens und soll untersuchen, ob es Auswirkungen auf die Entzündungsreaktion und Lungenmorphologie in Abhängigkeit der verwendeten Lipide gibt.

Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere wurden männliche Balb/C-Mäuse verwendet. Diese Tiere wurden bei Charles River, Sulzfeld, Deutschland, bestellt.

Die Tiere wurden artgerecht in transparenten Polykarbonatkäfigen bei 20-22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Wasser und Futter (ssniff R/M-H) standen ad libitum zur Verfügung.

Die Mäuse wurden mit einem Gewicht von 22-26 g in die Experimente genommen.

Die Versuche erfolgten auf Grundlage der Tierversuchsgenehmigung Nr. V 54 – 19 c 20-15 (1) GI 20/10– Nr. 23/2007 des Regierungspräsidiums Giessen.

2.2 Geräte und Materialien

2.2.1 Materialien für die Tierhaltung

Mäuse

Balb/C-Mäuse von Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland

Käfige

Makrolon, Typ II L; Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland

Tiereinstreu

Altromin Tiereinstreu Granulat; Altromin GmbH & Co. KG, Lage-Lippe, Deutschland

Tierfutter

ssnif R/M-H, Alleinfuttermittel für Ratten- und Mäuse-Haltung;

ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland

Global Rodent Breed; Harlan Teklad, Bicester, UK

2.2.2 Geräte und Materialien für die *In-vivo*-Eingriffe

2.2.2.1 Geräte

Intravenöser Katheter

Katheter F. Certofix-Mono; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Tube silicone platinum; Fisher Bioblock Scientific, Schwerte, Deutschland

Mini-osmotische Pumpe

ALZET Osmotische Pumpe, Modell 2004 und 2001D; Durect Corporation, Cupertino, USA

Operationsbesteck

Verschiedene Klemmen, Nadelhalter, Pinzetten, Scheren;

Rebstock Instruments GmbH, Dürbheim, Deutschland

Operationsmikroskop

Stereolupe Leica MS 5; Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland

Perfusor

PHD 2000 Infusion; Havard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA

Volumen Computer Tomograph (VCT)

eXplore Locus Ultra (eLU); General Electric Company (GE), Fairfield, Connecticut, USA

2.2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Augensalbe

Bepanthen Augen- und Nasensalbe 5 g; Roche, Eppstein-Bremthal, Deutschland

Desinfizierende Lösung

Braunoderm; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Heparin

Heparin-Natrium 25000 IE/5 ml; ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

Heparin zur Subkutan-Injektion: 10 IE/200 µl

Inflammatorischer Stimulus

Lipopolysaccharid von E. coli (Serotyp O111:B4); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Infusionslösungen

Isotonische Natriumchlorid-Lösung DeltaSelect; DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland

Glucose 10 % Braun; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Lipidemulsion

Die verwendeten Lipidemulsionen waren wie folgt zusammengesetzt:

LCT 20 (Lipoven 20%):

1l LCT 20: Sojabohnenöl 200g, Glycerol 25g, Phospholipide aus Ei 12g

LCT/MCT 20 (Lipofundin 20%):

1l LCT/MCT 20: Sojabohnenöl 100g, Mittelkettige Triglyceride 100g, Phospholipide aus Ei 12g, Glycerol 25g

LCT/MCT/FO (Lipoplus):

1l LCT/MCT/FO 20: Mittelkettige Triglyceride 100g, raffiniertes Sojaöl 80g, Omega-3-Säuren Triglyceride 20g

Fettsäure	LCT	LCT/MCT	LCT/MCT/FO
16:0	21,6	10,3	10,6
16:1 (n-9)	0,0	0,0	0,2
18:0	11,2	7,7	7,4
18:1 (n-9)	49,5	26,9	24,1
18:2 (n-6)	106,1	48,6	41,2
18:3 (n-3)	11,5	6,1	4,5
20:4 (n-6)	0,2	0,4	0,8
20:5 (n-3)	0,0	0,0	5,1
22:5 (n-3)	0,0	0,0	1,6
22:6 (n-3)	0,0	0,2	4,5

Abbildung 2: Zusammensetzung der Lipidemulsionen aus langkettigen Fettsäuren (g/l), bestimmt mittels Gaschromatographie. Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Juliane Mest (MTA der AG Mayer) erhoben und zur Verfügung gestellt. Die Methodik wurde wie beschrieben durchgeführt (Grimminger, Fuhrer et al. 1993), adaptiert an die Bedingungen bei Mäusen (Mayer, Gokorsch et al. 2003)

Nahtmaterial:

Ethicon Ethibond Excel 5-0, Polyester-beschichtete Fäden ohne Nadel; Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien

Ethicon Prolene 6-0, Monofil mit atraumatischer Nadel; Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien

Ethicon Mersilene 1, Polyester; Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien

Narkosemittel:

Ketavet 100 mg/ml; Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland

Rompun 2 %; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

Venenverweilkatheter:

Vasocan Braunüle 20 G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

2.2.3 Geräte, Materialien und Chemikalien für die *In-vitro*-Bestimmungen

2.2.3.1 Geräte

ELISA-Reader:

SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland

Leukozytendifferenzierung:

May-Grünwald Färbelösung; Merck, Darmstadt, Deutschland

Giemsa Stammlösung; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Leukozytenzählung:

Neubauer Zählkammer; Labor Optik, Friedrichsdorf, Deutschland

Mikroskop:

Dialux Mikroskop; Olympus, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland

Wärmeschrank:

Memmert; Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

Zentrifugen:

Hettich Rotanta/AP; Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Cytospin 3; Shandon, Frankfurt a. M., Deutschland

2.2.3.2 Verbrauchsmaterialien

96-well Mikrotiterplatte:

Nunc, Roskilde, Dänemark

Blutentnahmesystem:

1,5 ml Eppendorf-cups manuell mit 50 µl Citrat-Lösung versetzt; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Kanülen:

Verschieden-lumige Kanülen; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Vasocan Braunüle, 20 G; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Objektträger mit Rand:

R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland

Röhrchen:

13 ml Röhrchen, Polysterol; Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland

2.2.3.3 Chemikalien

BAL-Lösung:

400 ml PBS (Pufferlösung aus: NaCl, KCl, Na₂HPO₄·xH₂O, KH₂PO₄, Aqua dest) plus

100 ml EDTA 1 %; Biochrom AG, Berlin, Deutschland

ELISA:

TNF-α Duo-Set; R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

MIP-2 Duo-Set; R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland

PGE2 Parameter Assay Kit; R&D Systems GmbH, Wiesbaden Deutschland

TxB2 ELISA Kit; Assay Designs, Ann Arbor, Michigan, USA

Waschpuffer:

1.000 ml Aqua dest, 2,4 g TRIS; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

0,5 ml Tween 20 (Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaureate); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

pH: 7,3

Blockpuffer:

100 ml PBS, 1 g Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

5 g Saccharose; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

0,05 g NaN₃; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Diluent:

200 ml Aqua dest, 0,2 g BSA; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

0,1 ml Tween 20; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

0,48 g TRIS Base; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

1,75 g NaCl; Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

pH: 7,3

Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate (HRP); Zymed, San Francisco,

USA H₂SO₄ (1 M); Merck, Darmstadt, Deutschland

Proteinbestimmung:

BioRad DC Protein Assay; BioRad, Bad Nauheim, Deutschland

1,42 mg/ml BSA

Lösung A: 1 ml Reagenz A + 20 µl Reagenz S

2.3 In-vivo-Eingriffe

Alle Eingriffe am lebenden Tier wurden durch Dr. vet. med. Juliane Ott durchgeführt.

2.3.1 Anästhesie

Für alle Eingriffe wurde eine intraperitoneale Injektionsnarkose durchgeführt. Hierfür wurde eine Spritze mit zwei Anteilen NaCl-Lösung, einem Anteil Ketavet 10 % und einem Anteil Xylazin 2 % aufgezogen.

Die Maus wurde fixiert, es wurde ventral paramedian abdominal eingestochen und je nach Vorhaben ein Gesamtvolumen von 70-100 μ l injiziert.

2.3.2 Katheterimplantation

Bevor mit der eigentlichen OP begonnen werden konnte, musste ein Katheter für die Infusion hergestellt werden. Hierzu wurde ein 1,3 cm langes Stück incl. Spitze eines Katheters (Fa. B. Braun) abgeschnitten und in einen 5 cm langen Silikonschlauch (Tube silicone platinum) auf 0,5 cm Länge gesteckt.

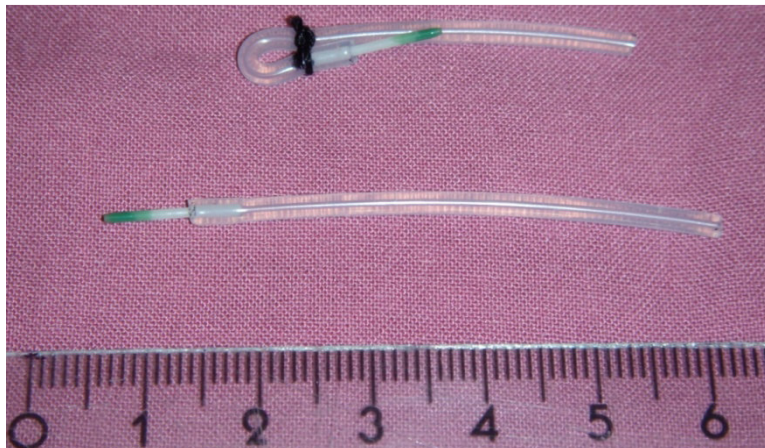


Abbildung 3: Venen-Katheter für die OP

Die NaCl-Pumpe mit einer Pumpleistung von 28 Tagen wurde mindestens 24 Stunden vor der OP präpariert, um anschließend für 24 Stunden im Wärmeschrank aktiviert werden zu können.

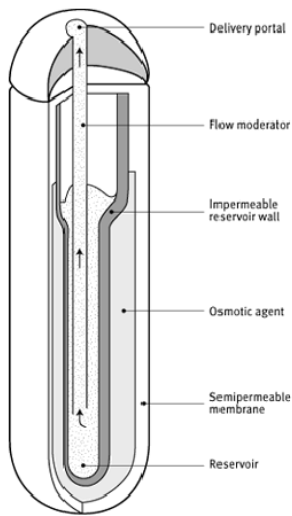


Abbildung 4: Aufbau einer ALZET osmotischen Pumpe

Umhüllt ist die Pumpe außen mit einer semi-permeablen Membran. Im Inneren befindet sich ein flüssigkeitsgefülltes Säckchen, das durch die einströmende Flüssigkeit komprimiert wird. Dadurch wird die im Innern des Reservoir-Säckchens vorhandene Flüssigkeit durch den Flowmoderator in den Schlauch und so letztendlich in die Vene der Maus gepumpt (Abbildung von ALZET).

Zur operativen Katheterimplantation wurde die Maus mit der oben beschriebenen Anästhesie in Narkose gelegt. Dann wurden zuerst eine kleine Stelle zwischen den Ohren auf dem Rücken und die ventrale Halsseite rasiert. Zur Vorbeugung der Austrocknung der Augen während der OP wurde Bepanthensalbe auf die Augen aufgetragen. Nun wurde die Maus in Rückenlage auf den OP-Tisch unter eine Lupe gelegt und fixiert. Es folgte ein ca. 2 cm langer Schnitt auf der linken ventralen Halsseite paramedian. Dann wurde die V. jugularis stumpf freipräpariert, indem das Unterhautfettgewebe entfernt wurde. Lag die V. jugularis sichtbar vor, wurde über den cranial sichtbaren Teil eine Schlinge gelegt und abgebunden. Um den caudal sichtbaren Teil wurde ebenfalls eine Schlinge gelegt, die noch nicht zugezogen wurde, da mit dieser später der Katheter eingebunden wird.

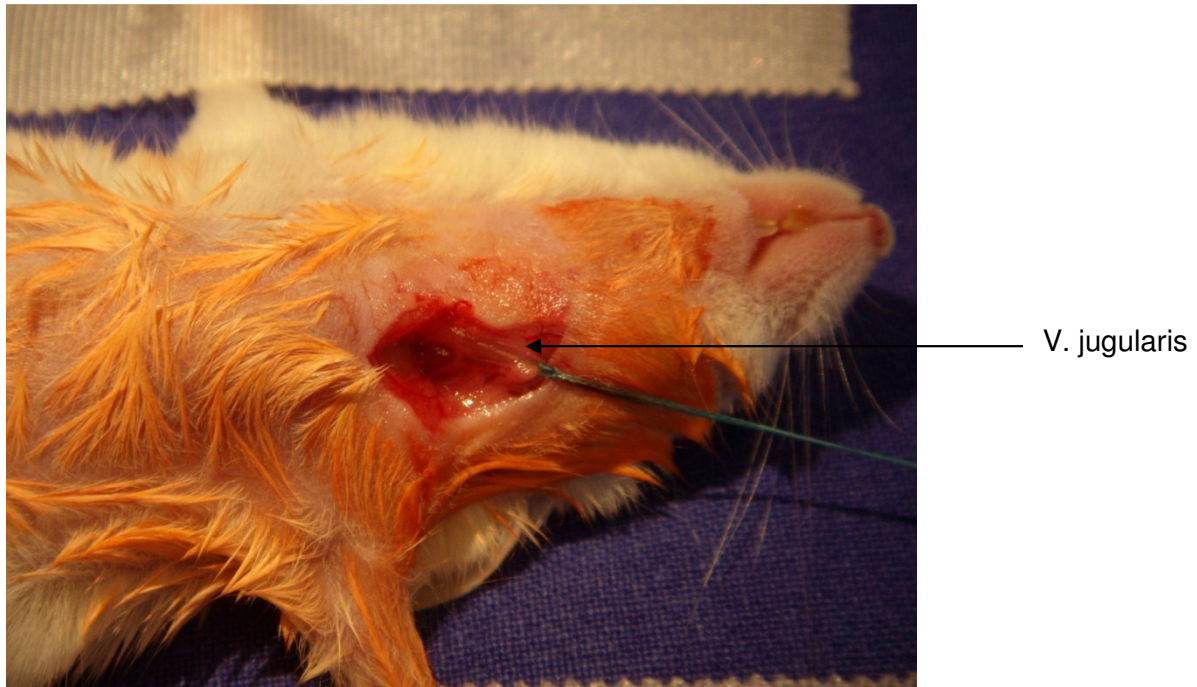


Abbildung 5: Präparierte V. jugularis mit dem cranialen Faden

Jetzt wurde die Maus auf den Bauch gedreht und ein kleiner Schnitt zwischen den Ohren vorgenommen. Hierdurch wurde unter der Haut bis zur Ventralseite getunnelt und der vorbereitete Katheter, der vorher in eine Schleife gelegt und gebunden wurde, durchgezogen. Eine mit Kochsalz gefüllte Spritze wurde aufgesetzt und eventuelle Luftbläschen wurden ausgespült. Nun wurde die Maus wieder auf den Rücken gedreht, um an dem cranialen Faden die Vene straffzuziehen.

Nun wurde mit einer Schere in einem 30°-Winkel ein Schnitt bis auf ein Drittel der Breite der Vene vorgenommen. Durch diese Öffnung wurde der Katheter auf eine Länge von ca. 4 mm in die Vene geschoben. Mit der caudalen Fadenschleife wurde der in der Vene liegende Katheter eingebunden. Zur Sicherheit wurde eine zweite Ligatur gesetzt. Danach wurde geprüft, ob der Katheter richtig liegt, indem zuerst NaCl 0,9% in die Vene injiziert und danach mit der Spritze aspiriert wurde. Nun sollte sich Blut im Katheter befinden. War dies der Fall, konnte man die Fäden kurz oberhalb des Knotens abschneiden. Die Maus wurde jetzt sowohl ventral als auch dorsal mit Einzelheften zugenäht.



Abbildung 6: Katheter in der V. jugularis

Im Katheter erkennt man deutlich das aspirierte Blut der V. jugularis.

Das Ende des Silikonschlauches wurde auf den Flowmoderator einer 28d-Pumpe gesteckt. Diese befand sich in einem mit Kochsalzlösung gefüllten 1,5ml Eppendorf-cup.

Zur Erholung von der OP und um den Flüssigkeitsverlust auszugleichen, wurde der Maus 1 ml einer 5%igen Glucose-Lösung subkutan injiziert. Danach kam sie zum Aufwachen in ihren Käfig.

2.3.3 Anschließen an Perfusor

Zur Vorbereitung der Infusion wurde 1 ml Lipidemulsion mit 2 μ l Heparin 25000 I.E./5 ml unter sterilen Bedingungen versetzt, anschließend wurde die Lösung in 1-ml-Spritzen überführt. Die befüllten Spritzen wurden an den Perfusor angeschlossen und über das zugehörige Schlauchsystem mit dem Katheter der Maus verbunden. Der Perfusor wurde auf eine Laufgeschwindigkeit von 6,5 μ l/h programmiert.

Es erfolgte täglich eine subkutane Injektion eines niedermolekularen Heparins nach Gewicht adaptiert.

2.3.4 LPS-Instillation in die Trachea

Um eine Inflammation der Lunge hervorzurufen, wurde ein Endotoxin, hier LPS von *E. coli*, in die Lunge instilliert. Zu diesem Zweck wurde die Maus anästhesiert. Beide Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepathen Augensalbe versorgt. Nach Erreichen der erwünschten Anästhesietiefe wurde die Maus an den oberen Schneidezähnen auf ein Gestell gehängt, damit man unter Sichtkontrolle und mit Hilfe eines Mikroskops einen Katheter via Mundhöhle in die Trachea einführen konnte. Ein Katheter (Vasocan Braunüle, 20G) wurde an den Stimmbändern vorbei in die Trachea eingeführt. Nun wurde ein Gesamtvolumen von 50 µl (Gemisch aus 10 µg LPS und 0,9%iger NaCl) langsam in drei Portionen in die Lunge eingegeben. Zwischendurch mussten Pausen eingelegt werden, damit die Maus die Menge an Flüssigkeit resorbieren konnte. Danach wurde der Katheter mit einer Menge von ca. 150 µl Luft durchgespült. Für die Aufwachphase wurden die Mäuse unter eine Wärmelampe gelegt.

2.3.5 Blutentnahme und Euthanasie

Die Maus wurde euthanasiert und auf dem Rücken liegend fixiert. Anschließend wurde die Abdominalhöhle eröffnet. Dann wurde die V. caudalis freigelegt und mit einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle (BD Microlance 3, 26G) wurden bis zu 800 µl Blut entnommen. Das Blut wurde in mit 50 µl Citrat versetzte Röhrchen überführt. Danach wurden die Blutröhrchen bei 1.076 g 10 min lang zentrifugiert. Das Serum wurde für die weitere Verwendung abpipettiert und bei -20 °C eingefroren.

2.3.6 Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Die euthanasierte Maus wurde auf dem Rücken liegend fixiert. Danach wurde ein ca. 2 cm langer Schnitt in der Medianen der ventralen Halsseite vorgenommen und die beiden subkutan liegenden Speicheldrüsen wurden in der Mitte stumpf abpräpariert. Nun wurde noch der M. trachealis, der die Trachea bedeckt, durchtrennt. Die Trachea lag sichtbar vor. Nun wurde durch einen Schnitt zwischen zwei Knorpelspangen ein Katheter (Vasocan Braunüle, 20G) in die Trachea eingeführt und eingebunden. Daraufhin wurde mit einem eiskalten Gemisch aus PBS und EDTA die Lunge gespült.

Zuerst wurde ein Volumen von 200 µl eingebracht, um die Lunge vorzudehnen. Danach wurde mit ca. 350 µl gespült, bis ein 1,5-ml Eppendorfcup gefüllt war. Danach wurde dieses bei 336 g 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 1 ml 0,9%ige NaCl-Lösung resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

2.3.7 VCT

Die Mäuse wurden anästhesiert und mittels hochauflösender flat-panel volumetric Computed Tomography (VCT) untersucht. Am Ende der Untersuchungen wurden die Tiere euthanasiert und die Lunge zur histologischen Untersuchung entnommen.

Diese CT wird ausschließlich für experimentelle Tierversuche verwendet. Während der Untersuchung rotieren die Röntgenröhre und der Flachbild-Detektor acht Mal pro Sekunde um das Tier. Es werden Sequenzen mit 0,1 mm Schichtdicke generiert. Die Untersuchungen werden mit 120 kV und 40 mA durchgeführt.

Die Untersuchungen wurden durch Herrn PD Dr. Martin Obert, Leiter Forschungsgruppe medizinische Bildanalyse der diagnostischen und interventionellen Radiologie der Universitätsklinik Giessen und Marburg am Standort Giessen durchgeführt.

2.4 In-vitro-Bestimmungen

2.4.1 Leukozyten-Zahl in der broncho-alveolären Lavage

Nachdem die Lunge lavagiert, die Flüssigkeit zentrifugiert und der Überstand abpipettiert wurde, konnte das Zellpellet mit einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung resuspendiert werden. Eine Neubauerkammer wurde mit 10 µl dieser Lösung beschickt und die Zellen wurden unter dem Mikroskop gezählt. Für die Gesamtzahl wurden 16 Kleinquadrate ausgezählt. Zur Errechnung der Gesamtanzahl in der BAL-Flüssigkeit und somit auch in den Lungenalveolen wurde die gezählte Zahl mit 10.000 multipliziert.

2.4.2 Differenzierung der Leukozyten in der BAL

Um einen prozentualen Überblick der verschiedenen Leukozyten-Populationen in der Lavage zu erhalten, wurden die Leukozyten mittels des Cytospin 3 (5 min, 5.000 rpm) auf

einen Objektträger aufgebracht. Danach wurden die Zellen mit einer Pappenheim-Färbung (May-Grünwald-Giemsa) angefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.4.3 Myeloperoxidase Aktivitäts-Assay

Die Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität in der Lunge wurde ermittelt, um die Ansammlung der neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe nach Stimulation mit LPS darzustellen.

Die Lungen der Versuchstiere wurden entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität wurden die Lungen auf Eis aufgetaut und gewogen. Der aufgetauten Lunge wurde 1 ml HTAB-Puffer je 50 mg Lunge zugesetzt und homogenisiert. Im Anschluss wurde 1 ml des homogenen Gemischs in ein Eppendorfcup überführt und für 4 Minuten mit 5.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Als Nächstes wurde der Überstand in ein weiteres Eppendorfcup überführt. Sieben µl der so hergestellten Proben wurden mit 200 µl der o-Dianisidin-Lösung in ein Well einer 96-Well-Mikroplatte gegeben. Daraufhin kam es zu einem Farbumschlag, der bei 450 nm mittels einer kinetischen Messung ermittelt wurde.

Durch Multiplikation des erhaltenen mOD-Wertes/min mit 0,2528 wurde der MPO-Wert/mg Lungengewebe erhalten (Andonegui, Bonder et al. 2003). Für die Ergebnisse wurden die MPO-Werte/g Lungengewebe dargestellt (Seeger, Bauer et al. 1984).

2.4.4 ELISA (TNF- α , MIP-2, (PG)E2 und (Tx)B2)

Zuerst wurden die ELISA-Platten mit dem Capture-Antibody (Erst-Antikörper), der mit 1x PBS verdünnt wurde, beschichtet und bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Je nach Test verwendete man entweder Ziegen Anti-Maus TNF- α Antikörper (goat anti-mouse TNF- α), Ratten Anti-Maus MIP2 Antikörper (rat anti-mouse Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2)), Maus monoklonale Antikörper gegen PGE2 (mouse monoclonal antibody to Prostaglandin (PG) E2) oder Hasen polyklonale Antikörper gegen TXB2 (rabbit polyclonal antibody to Thromboxane (TX) B2).

Am nächsten Tag wusch man die vorbeschichteten Platten dreimal mit dem Waschpuffer und blockte die unspezifischen Bindungen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Blockpuffer. Als Nächstes wurde eine Standard-Verdünnungsreihe für den jeweiligen ELISA angesetzt. Hierfür wurde als Lösungsmittel Diluent genommen. Im Anschluss an

die Inkubation mit dem Blockpuffer wurde dieser durch Waschen entfernt und die Standardreihe sowie die Proben (broncho-alveoläre Lavage) wurden in die einzelnen Wells pipettiert. Jetzt ließ man den ELISA für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren, damit sich das Antigen an die am Boden haftenden Antikörper binden konnte. Nach zwei Stunden wurde das überschüssige Antigen im Überstand dreimal mit dem Waschpuffer ausgewaschen. Nun wurde der bereits verdünnte biotinmarkierte Detection-Antibody (Zweit-Antikörper) auf die Platte pipettiert. Während der zwei Stunden, in denen die Platten bei Raumtemperatur standen, konnte sich der Zweit-Antikörper an das gebundene Antigen binden. Nach Ablauf der Wartezeit wurden die nicht gebundenen Antikörper abgewaschen. Der nächste Schritt war die Zugabe von Streptavidin, einem Protein mit hoher Affinität zu Biotin, in verdünnter Form in die Vertiefungen für 20 min. Streptavidin besteht aus vier Untereinheiten, die jeweils mit einem Biotinmolekül binden können. Eine Untereinheit bindet an den biotinmarkierten Zielantikörper. Die restlichen Untereinheiten binden an ein enzymkonjugiertes Biotin. Da das Enzym bei dem Substrat einen Farbumschlag bewirkt, kommt es so zu einer Verstärkung der späteren Farbreaktion. Auch hier wurden wieder die überzähligen Moleküle ausgewaschen. Letztendlich wurde das Substrat hinzugegeben und 20 min wirken lassen. Diese Reaktion fand in einem abgedunkelten Behältnis statt. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem 1 M Schwefelsäure in jedes Well gegeben wurde. Nun konnte man eine Endpunkt-Messung mittels eines ELISA-Readers bei 450 nm vornehmen.

2.4.5 Proteinbestimmung in der BAL

Die Bestimmung des Proteingehaltes in der BAL erfolgte gemäß dem BIORAD-Protokoll. Als Standard wurde Bovines Serumalbumin (BSA) in einer Verdünnungsreihe verwendet. Nun legte man 5 µl Probenvolumen in ein Well vor und fügte 25 µl Lösung A zu jeder Probe und zu jedem Standard hinzu. Dann wurden 200 µl Reagenz B auf alle Proben und den Standard pipettiert, um den gewünschten Farbumschlag zu erhalten. Die so pipettierte Mikrotiterplatte wurde abgedunkelt und 3 min lang gerüttelt. Danach wurde die Probe mittels eines ELISA-Readers bei 550 nm photometrisch gemessen.

Die Zusammensetzung der Lipidemulsionen aus langkettigen Fettsäuren (g/l) wurde bestimmt mittels Gaschromatographie. Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Juliane Mest (MTA der AG Mayer) erhoben und zur Verfügung gestellt. Die Methodik wurde wie beschrieben durchgeführt (Grimminger, Fuhrer et al. 1993), adaptiert an die Bedingungen bei Mäusen (Mayer, Gokorsch et al. 2003).

2.5 Protokoll der Experimente

2.5.1 Gruppeneinteilung

Mäuse in einem Alter von 10 bis 15 Wochen bei einem Gewicht von 22 bis 26 g wurden für die operativen Eingriffe verwendet.

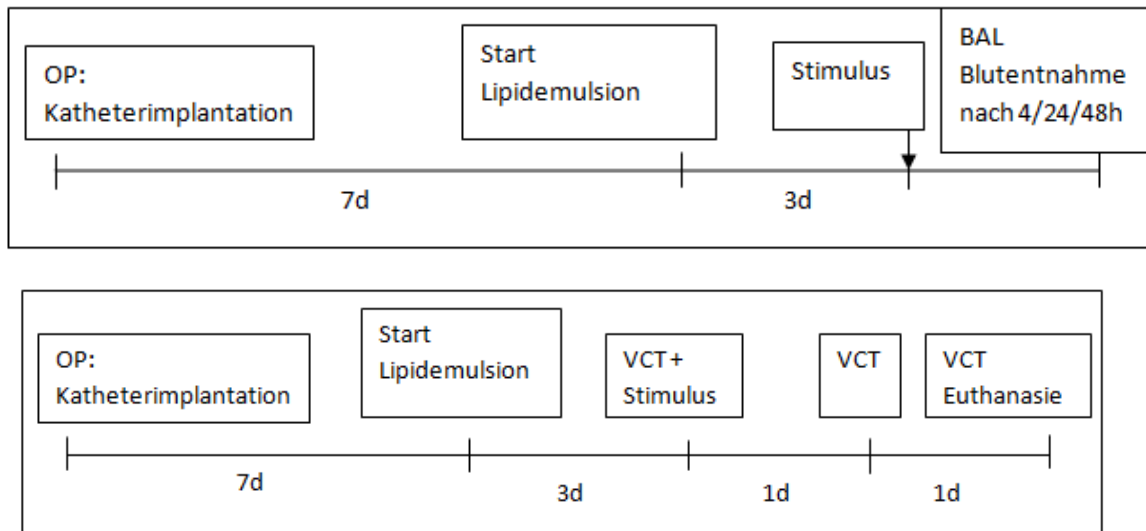
1. Gruppe: Balb/C mit NaCl-Infusion mit 0 oder 10 µg LPS i.t.
2. Gruppe: Balb/C mit LCT-Infusion mit 0 oder 10 µg LPS i.t.
3. Gruppe: Balb/C mit LCT/MCT-Infusion mit 0 oder 10 µg LPS i.t.
4. Gruppe: Balb/C mit LCT/MCT/FO-Infusion mit 0 oder 10 µg LPS i.t.

2.5.2 Zeitverlauf

Die Mäuse wurden am Tag 0 operiert und erhielten zunächst eine Pumpe, die mit steriler Natriumchlorid-Lösung befüllt war. Dies diente dazu, den Mäusen eine Rekonvaleszenz-Phase zu gewähren. Nach 7 Tagen wurde die Pumpe entfernt und die Maus an den Perfusor angeschlossen, der kontinuierlich pro Tag 156 µl Volumen pumpt. Dieser war entweder mit NaCl 0,9 % (Kontrollgruppe), Lipoven 20 % (LCT), Lipofundin 20 % (LCT/MCT) oder Lipoplus 20 % (LCT/MCT/FO) befüllt. Zeitgleich bekamen die Mäuse zusätzlich eine Injektion von 200 µl Heparin mit 10 IE s.c. Sowohl die Lösung über den Perfusor als auch die Heparin-Injektion erhielten sie über drei Tage.

In der Folge wurde den Mäusen 48 Stunden, 24 Stunden oder 4 Stunden vor Versuchsende Endotoxin instilliert. Zum Versuchsende erfolgte die Blutentnahme und broncho-alveoläre Lavage oder Organentnahme.

Zur VCT-Untersuchung wurde ein Scan vor der Endotoxin-Instillation 24 Stunden nach Infusionsbeginn durchgeführt. Es folgten Scans 24 Stunden und 48 Stunden danach. Anschließend wurde die Maus euthanasiert.



2.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden bei den Tiergruppen die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Eine zwei-faktorielle ANOVA wurde angewendet, um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Infusionsgruppen zu testen. Die Student-Newman-Keuls-Methode folgte als post-hoc-Test auf die Varianzanalyse. Als statistisch signifikant wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ angesehen. Die Analyse wurde mit Hilfe des Programms SigmaStat Windows (Release 3.5) berechnet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch die Bildung homogener Gruppen.

Ergebnisse

3.1 Tierzahlen

Es gingen die Daten von 218 Balb/C-Mäusen in die Versuche ein.

3.2 Allgemeine Entzündungszeichen

Nach Instillation von 10 µg LPS, dem Endotoxin von E. coli, zeigten die Tiere allgemeine Krankheitszeichen. Sie waren weniger aktiv, zogen sich in eine Ecke des Käfigs zurück und ihr Fell war gestäubt. Ihr gesamtes Verhalten deutete auf gestörtes Allgemeinbefinden hin (Ishii, Nagase et al. 1997).

3.3 Leukozyteninvasion in die Lunge im akuten Lungenversagen

Die Mäuse erhielten über drei Tage eine Infusion mit NaCl 0,9 % (Kontrollgruppe), Lipoven 20 % (LCT), Lipofundin 20 % (LCT/MCT) oder Lipoplus 20 % (LCT/MCT/FO). Im Anschluss wurden sie endotracheal mit 10 µg Endotoxin (LPS) stimuliert.

4, 24 oder 48 Stunden später wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt, um die in die Alveolen rekrutierten Leukozyten zählen zu können.

Ohne Stimulation zeigten sich $0,10 \pm 0,03 \times 10^6$ Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit, zwischen der Kontroll- und den Lipidinfusionsgruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Nach Stimulation mit 10 µg LPS stieg die Zahl der in den Alveolarraum migrierten Leukozyten mit $0,70 \pm 0,16 \times 10^6$ 4 Stunden nach Stimulation (*, $p < 0,01$ vs. Kontrolle), $2,75 \pm 0,25 \times 10^6$ 24 Stunden nach Stimulation (*, $p < 0,01$ vs. Kontrolle) und $2,62 \pm 0,71 \times 10^6$ 48 Stunden nach Stimulation (*, $p < 0,01$ vs. Kontrolle) signifikant an.

Die gleichen signifikanten Effekte zeigten sich in den unterschiedlichen Lipidinfusionsgruppen 4, 24, und 48 Stunden nach Stimulation (**, LCT; ***, LCT/MCT; §, LCT/MCT/FO). Die Leukozytenzahlen aller Lipidgruppen sowie der NaCl-Gruppe waren zu allen Zeitpunkten, abgesehen von 24 Stunden und 48 Stunden, deutlich verändert.

24 Stunden nach Stimulation mit LPS wies die LCT-Gruppe eine signifikant höhere Zahl alveolärer Leukozyten als die NaCl-Gruppe (§, $p < 0,05$) auf. Zu den übrigen Messzeitpunkten zeigten sowohl die LCT- als auch die LCT/MCT-Gruppe keine signifikant differierenden Leukozytenzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die LCT/MCT/FO-Gruppe zeigte zu allen drei Messzeitpunkten die niedrigste Leukozyteninvasion im Vergleich zur Kontrollgruppe und den anderen beiden Lipidemulsionen (% , $p < 0,01$).

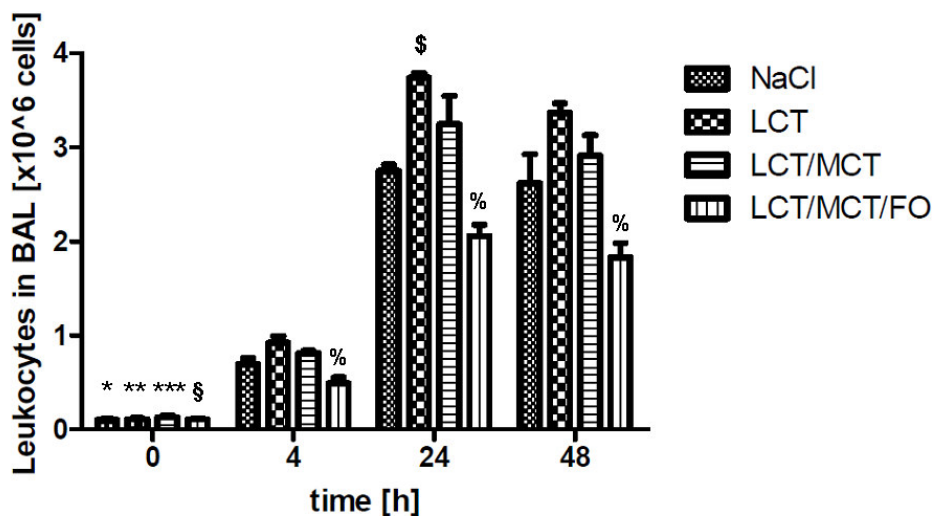


Abbildung 7: Leukozytenzahl in der BAL

Leukozyteninvasion in den Alveolarraum 4, 24, und 48 Stunden nach LPS-induziertem akuten Lungenversagen, durch die intratracheale Gabe von 10 μg LPS. Nach Stimulation mit LPS erfolgte eine Leukozyteninvasion in den Alveolarraum nach 4, 24 und 48 Stunden (*, $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Die gleichen signifikanten Effekte zeigten sich für die unterschiedlichen Lipidemulsionen 4, 24 und 48 Stunden nach Stimulation im Vergleich zur Kontrolle (**, LCT; ***, LCT/MCT; § LCT/MCT/FO). 24 Stunden nach LPS-Gabe zeigte die LCT-Gruppe eine höhere Leukozytenzahl im Vergleich zur NaCl-Gruppe (§, $p < 0,05$). Die Mäuse, die die LCT/MCT/FO-Infusion erhielten zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten die niedrigsten alveolaren Leukozytenzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe und den anderen Lipid-Gruppen (% , $p < 0,05$). $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Die Differenzierung der Leukozyten in Subpopulationen ergab bei den unstimulierten Gruppen 98,1 % \pm 0,7 Monozyten/Makrophagen, 1,9 % \pm 0,4 Granulozyten und 0,1 % \pm 0,02 Lymphozyten. Zwischen den Infusionsgruppen ergaben sich keine Unterschiede.

4 Stunden nach Stimulation mit 10 μg LPS zeigten sich 18,5 % \pm 1,5 Monozyten/Makrophagen, 80,0 % \pm 1,7 Granulozyten und 1,5 % \pm 0,5 Lymphozyten in der Differenzierung. Zwischen den Infusionsgruppen waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

24 Stunden nach Stimulation mit 10 µg LPS zeigten sich 16,4 % ± 2,6 Monozyten/Makrophagen, 82,6 % ± 2,5 Granulozyten und 1,0 % ± 0,4 Lymphozyten. Zwischen den Infusionsgruppen traten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf.

Die Differenzierung der Leukozyten 48 Stunden nach Stimulation mit 10 µg LPS ergab 21,9 % ± 1,8 Monozyten/Makrophagen, 77,3 % ± 1,6 Granulozyten und 1,2 % ± 0,4 Lymphozyten. Zwischen den Infusionsgruppen waren auch zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

3.4 Ansammlung der neutrophilen Granulozyten im Interstitium

Die Myeloperoxidase-Aktivität (MPO) wurde 24 und 48 Stunden nach LPS-Stimulation in allen Gruppen gemessen, um die Ansammlung der neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe zu ermitteln.

Ohne LPS-Stimulation zeigte sich in den Lungen der Mäuse kein signifikanter Unterschied bezüglich der MPO-Aktivität.

Nach Stimulation mit 10 µg LPS stieg die MPO-Aktivität nach 24 Stunden signifikant auf 15,9 ± 0,7 units/g und nach 48h auf 37,0 ± 1,4 units/g in der NaCl-Gruppe an (*, p < 0.05).

Die gleichen signifikanten Effekte traten in den unterschiedlichen Lipidinfusionsgruppen 24 und 48 Stunden nach Stimulation auf (**, LCT; ***, LCT/MCT; §, LCT/MCT/FO).

24 Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens zeigte die LCT-Gruppe die höchste MPO-Aktivität aller Gruppen (§, p < 0,05).

Nach 48 Stunden boten die Tiere der LCT/MCT/FO-Gruppe im Vergleich zur NaCl- und den anderen Behandlungsgruppen die niedrigste MPO-Aktivität (% , p < 0,05).

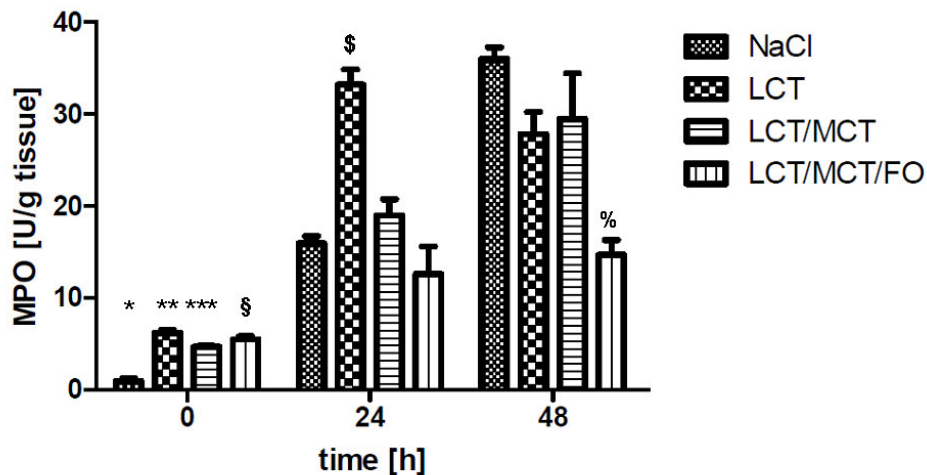


Abbildung 8: MPO-Aktivität

Effekt der Lipid-Emulsionen auf die Ansammlung neutrophiler Granulozyten im Lungengewebe, ohne Stimulation und 24 bzw. 48 Stunden nach intratrachealer Gabe von 10 µg LPS, gemessen durch Myeloperoxidase-Aktivität. 24 und 48 Stunden nach Stimulation stieg die MPO-Aktivität in der NaCl-Gruppe signifikant an (*, $p < 0.05$). Die gleichen signifikanten Effekte konnten in den Lipidgruppen 24 und 48 Stunden nach Stimulation im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (**, LCT; ***, LCT/MCT; §, LCT/MCT/FO). 24 Stunden nach Stimulation zeigte die LCT-Gruppe die höchste MPO-Aktivität aller Gruppen (§, $p < 0.05$). 48 Stunden nach Stimulation zeigte sich die MPO-Aktivität in der LCT/MCT/FO-Gruppe niedriger als die der verglichenen Kontrolle und der anderen Behandlungsgruppen (% , $p < 0.05$). $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

3.5 Permeabilität der endo-/epithelialen Barriere der Lungengefäße („vascular leakage“)

Durch Schädigung der endo-/epithelialen Barriere im Rahmen des akuten Lungenversagens kommt es zu einer vermehrten Permeabilität und daraus folgend erhöhter Proteinkonzentration in den Alveolen.

Ohne Stimulation ergab sich in der Proteinkonzentration zwischen den Infusionsgruppen kein signifikanter Unterschied.

Im Vergleich zu den unstimulierten Infusionsgruppen wurden 4 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach Stimulation mit LPS 10 µg signifikant gesteigerte Proteinkonzentrationen in der NaCl-Gruppe (*, $p < 0,05$) und den Lipidemulsionsgruppen (**, LCT; ***, LCT/MCT; §, LCT/MCT/FO) festgestellt.

48 Stunden nach Stimulation zeigten die Mäuse aus der LCT/MCT/FO-Gruppe signifikant niedrigere Proteinkonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie den beiden anderen Infusionsgruppen zum gleichen Zeitpunkt (% , $p < 0,05$).

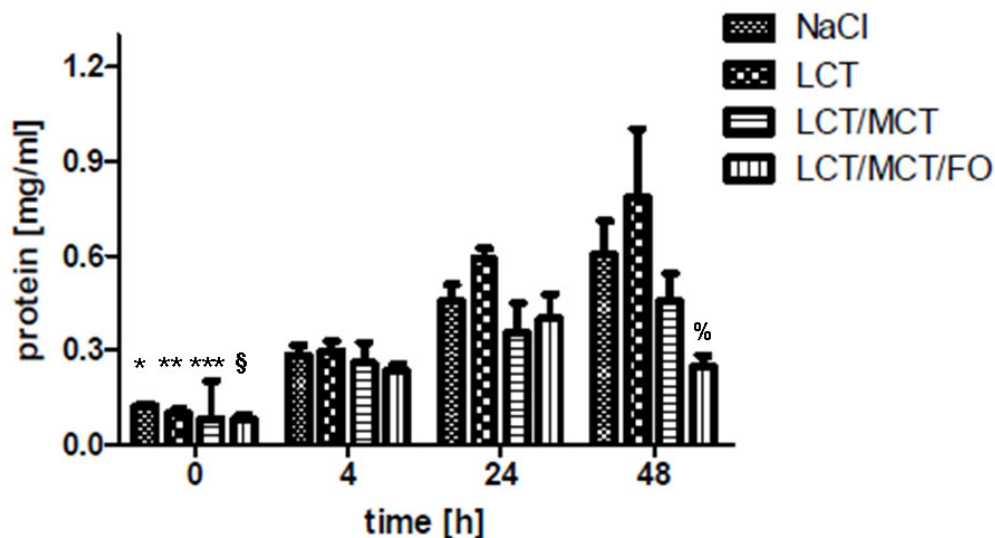


Abbildung 9: Alveoläre Proteinkonzentrationen

Einfluss der Lipidemulsionen auf die Permeabilität und die endo-/epitheliale Barriere der Lungengefäße im akuten Lungenversagen anhand der alveolären Proteinkonzentration ohne Stimulation und 4, 24 bzw. 48 Stunden nach Stimulation mittels intratrachealer Gabe von 10 µg LPS. Zu allen Zeitpunkten nach Stimulation zeigte sich eine signifikante Erhöhung der alveolären Proteinkonzentration in den NaCl-Gruppe (*, $p < 0.05$) und den Lipidgruppen (**, LCT; ***, LCT/MCT; § LCT/MCT/FO). 48 Stunden nach Stimulation boten die Tiere der LCT/MCT/FO-Gruppe signifikant niedrigere alveoläre Proteinkonzentrationen im Vergleich zu den Tieren der NaCl-, LCT-, und LCT/MCT-Gruppen zu diesem Zeitpunkt (% , $p < 0.05$). $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

3.6 Zytokinsynthese

Des Weiteren wurde die Synthese proinflammatorischer Zytokine in den unterschiedlichen Infusionsgruppen vor und nach Induktion des akuten Lungenversagens untersucht.

3.6.1 Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

Die Konzentration von TNF- α in der BAL betrug 72 ± 11 pg/ml in der unstimulierten NaCl-Gruppe, für die weiteren Gruppen ergaben sich zu diesem Zeitpunkt vergleichbare Werte.

Vier Stunden nach Stimulation war in allen betrachteten Gruppen (*, NaCl; **, LCT; ***, LCT/MCT; §, LCT/MCT/FO; $p < 0,05$) ein signifikanter Anstieg der TNF- α Konzentration (4.716 ± 499 pg/ml in der NaCl-Gruppe) festzustellen. 24 Stunden nach Stimulation (303 ± 50 pg/ml in der NaCl-Gruppe) und 48 Stunden nach Stimulation (218 ± 25 pg/ml in der NaCl-Gruppe) zeigten sich stetig fallende Werte.

In der LCT/MCT/FO-Gruppe zeigten sich 24 Stunden nach Stimulation im Vergleich zur LCT-Gruppe und NaCl-Gruppe signifikant reduzierte Werte (\$, $p < 0,05$).

48 Stunden nach Stimulation war die höchste Konzentration von TNF- α in der NaCl-Gruppe (% , $p < 0,05$) vorhanden.

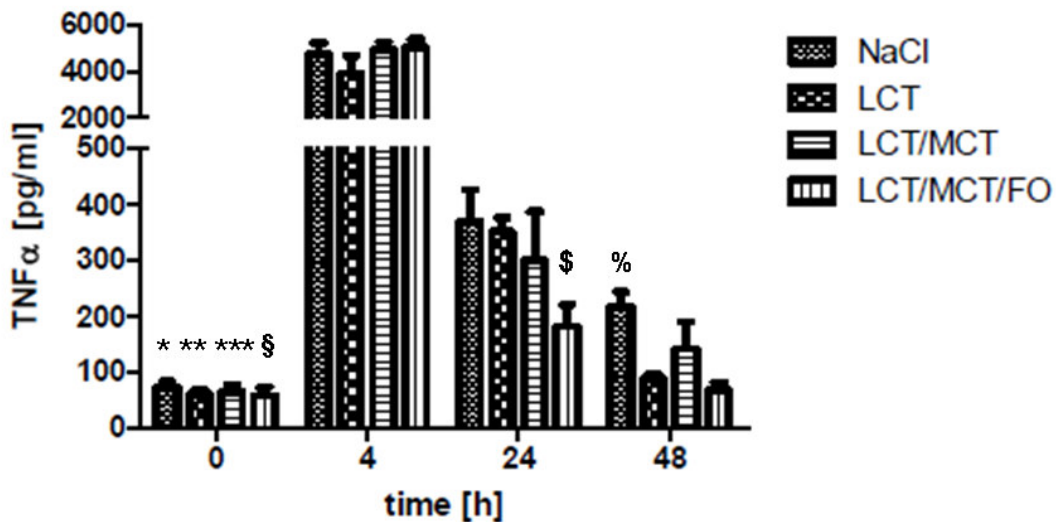


Abbildung 70: TNF- α

Effekt der Lipid-Emulsionen auf die Synthese von TNF- α nach LPS-induziertem akuten Lungenversagen ohne Stimulation und 4, 24 bzw. 48 Stunden nach Stimulation mittels intratrachealer Gabe von 10 μ g LPS. In allen Gruppen zeigte sich vier Stunden nach Stimulation eine signifikant angestiegene Konzentration von TNF- α (*, NaCl, **, LCT; ***, LCT/MCT; § LCT/MCT/FO; $p < 0,05$). 24 Stunden nach Stimulation zeigten die Tiere der LCT/MCT/FO-Gruppe geringere TNF- α Werte im Vergleich zur NaCl- und LCT-Gruppe (\$, $p < 0,05$). Die höchste TNF- α Konzentration 48 Stunden nach Stimulation konnte in der NaCl-Gruppe beobachtet werden (% , $p < 0,05$). $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

3.6.2 Makrophagen-inflammatorisches Protein-2 (MIP-2)

Die Konzentration von MIP-2 in der BAL betrug 64 ± 10 pg/ml in der unstimulierten NaCl-Gruppe; für die weiteren Gruppen ergaben sich zu diesem Zeitpunkt vergleichbare Werte.

Vier Stunden nach Stimulation stieg die MIP-2-Konzentration in allen betrachteten Gruppen deutlich an (3.338 ± 501 pg/ml in der NaCl-Gruppe). 24 Stunden nach Stimulation (161 ± 11 pg/ml in der NaCl-Gruppe) und 48 Stunden nach Stimulation (117 ± 22 pg/ml in der NaCl-Gruppe) zeigten sich fallende Werte (*, $p < 0,05$).

Vor Induktion des akuten Lungenversagens wies sowohl die LCT- (**, $p < 0,05$) als auch die LCT/MCT-Gruppe (***, $p < 0,05$) signifikant erhöhte MIP-2-Werte im Vergleich zur NaCl-Gruppe auf.

Die höchsten MIP-2-Werte wurden in allen Gruppen nach 4 Stunden gemessen (§, $p < 0,05$).

In der LCT/MCT/FO-Gruppe zeigten sich 24 Stunden nach Stimulation im Vergleich zu den anderen Infusionsgruppen signifikant reduzierte Werte (§, $p < 0,05$).

48 Stunden nach Stimulation waren die höchsten MIP-2-Konzentrationen für die NaCl-Gruppe im Vergleich zur LCT- und LCT/MCT/FO-Gruppe messbar (% , $p < 0,05$)

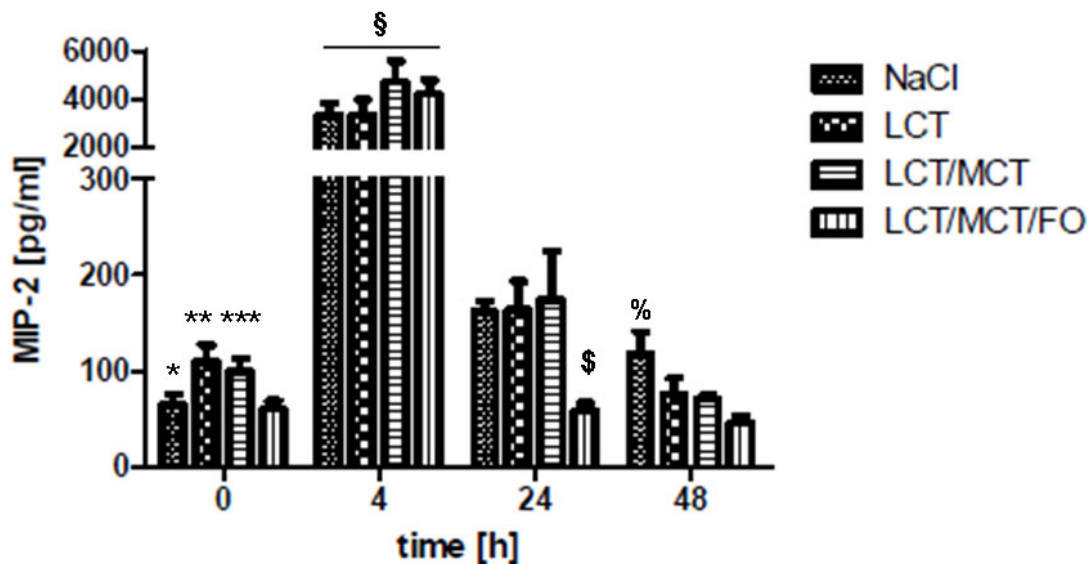


Abbildung 11: MIP-2

Effekt der Lipid-Emulsionen auf die Synthese von MIP-2 nach LPS-induziertem akuten Lungenversagen ohne Stimulation und 4, 24 bzw. 48 Stunden nach Stimulation mittels intratrachealer Gabe von 10 µg LPS. Die höchsten MIP-2 Konzentrationen zeigten sich in der NaCl-Gruppe vier Stunden nach Stimulation (*, $p < 0,05$). Bereits vor Stimulation wiesen die Tiere der LCT-Gruppe (**, $p < 0,05$) und der LCT/MCT-Gruppe (***, $p < 0,05$) signifikant höhere MIP-2 Konzentrationen im Vergleich zur NaCl-Gruppe auf. Die höchsten MIP-2 Werte wurden in allen Gruppen vier Stunden nach Stimulation gemessen (§, $p < 0,05$). Die Tiere der LCT/MCT/FO-Gruppe zeigten 24 Stunden nach Stimulation die niedrigsten MIP-2 Werte im Vergleich zu den Tieren der anderen Gruppen auf (§, $p < 0,05$). 48 Stunden nach Stimulation boten die Tiere der NaCl-Gruppe im Vergleich zur LCT- und LCT/MCT/FO-Gruppe höhere MIP-2 Konzentrationen (% , $p < 0,05$). $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

3.6.3 Thromboxan B2 (TxB2)

Die Konzentration von TxB2 in der BAL unstimulierter Mäuse betrug 31 ± 5 pg/ml ohne signifikante Unterschiede in den Infusionsgruppen.

Vier Stunden nach Stimulation konnten gleichartige Werte in allen Gruppen beobachtet werden (35 ± 3 pg/ml in der NaCl-Gruppe).

Ein signifikanter Anstieg von TxB2 konnte in der NaCl-Gruppe nach 24 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert gemessen werden (*, $p < 0,05$).

24 und 48 Stunden nach Stimulation stieg die TxB2-Konzentration signifikant in der LCT- (**, $p < 0,05$) und LCT/MCT-Gruppe (***, $p < 0,05$) im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten.

Nach 24 Stunden zeigte sich die TxB2-Konzentration in der LCT/MCT/FO-Gruppe im Vergleich zur LCT- und LCT/MCT-Gruppe (\$, $p < 0,05$) reduziert. Nach 48 Stunden waren die höchsten TxB2-Werte bei den Tieren der LCT/MCT-Gruppe im Vergleich zur NaCl- und LCT/MCT/FO-Gruppe messbar (% , $p < 0,05$).

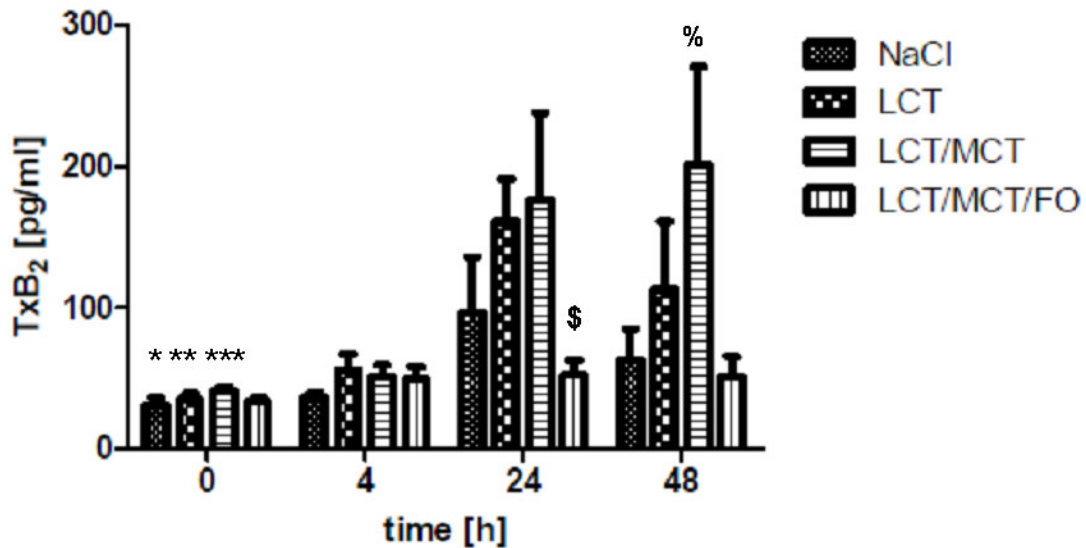


Abbildung 12: TxB2

Effekt der Lipid-Emulsionen auf die Synthese von TxB2 nach LPS-induziertem akuten Lungenversagen ohne Stimulation und 4, 24 bzw. 48 Stunden nach Stimulation mittels intratrachealer Gabe von 10 µg LPS. Ein signifikanter Anstieg von TxB2 zeigte sich in der NaCl-Gruppe 24 Stunden nach Stimulation im Vergleich zum Ausgangswert (*, $p < 0.05$). 24 und 48 Stunden nach Stimulation stieg TxB2 signifikant in der LCT- (**, $p < 0.05$) und LCT/MCT-Gruppe (***, $P < 0.05$) im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten an. 24 Stunden nach Stimulation zeigten sich in der LCT/MCT/FO-Gruppe signifikant niedrigere TxB2 Werte im Vergleich zu denen der LCT- und LCT/MCT-Gruppe (\$, $p < 0.05$). 48 Stunden nach Stimulation waren in der LCT/MCT-Gruppe im Vergleich zu NaCl und LCT/MCT/FO (% , $p < 0.05$) die höchsten Werte messbar. $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt

3.6.4 Prostaglandin E2 (PGE2)

Die Konzentration von PGE2 in der BAL betrug 33 ± 6 pg/ml in der unstimulierten NaCl-Gruppe; für die weiteren Gruppen ergaben sich zu diesem Zeitpunkt vergleichbare Werte.

Vier Stunden nach Stimulation konnten weiterhin gleichartige Werte in allen Gruppen beobachtet werden (15 ± 1 pg/ml in der NaCl-Gruppe).

24 Stunden (371 ± 155 pg/ml in der NaCl-Gruppe) und 48 Stunden (214 ± 40 pg/ml in der NaCl-Gruppe) nach Stimulation stiegen die Konzentrationen von PGE2 in allen Gruppen gegenüber den Ausgangs- und Vier-Stunden-Werten signifikant an (*, $p < 0,05$).

In der LCT/MCT/FO-Gruppe war zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Stimulation eine signifikant niedrigere Konzentration von PGE2 im Vergleich zur NaCl- und LCT-Gruppe (\$, $p < 0,05$) messbar.

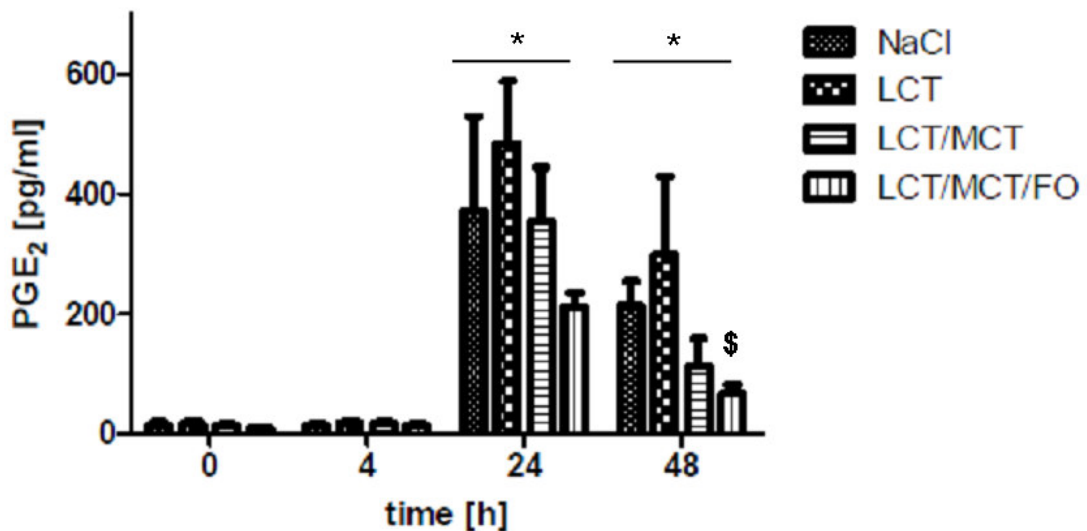


Abbildung 13: PGE2

Effekt der Lipid-Emulsionen auf die Synthese von PGE2 nach LPS-induziertem akuten Lungenversagen ohne Stimulation und 4, 24 bzw. 48 Stunden nach Stimulation mittels intratrachealer Gabe von 10 µg LPS. Die PGE2 Werte nach 24 und 48 Stunden waren in allen Gruppen im Vergleich zu den Werten bei null und vier Stunden signifikant erhöht (*, $p < 0.05$). Die Tiere der LCT/MCT/FO-Gruppe zeigten 48 Stunden nach Stimulation signifikant niedrigere PGE2 Konzentrationen im Vergleich zur NaCl- und LCT-Gruppe (\$, $p < 0.05$). $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

3.7 Freie Fettsäuren im Plasma

Um den Effekt der verschiedenen Fett-Emulsionen im akuten Lungenversagen auf die Zusammensetzung der systemischen freien Fettsäuren zu beobachten, wurden die Plasmakonzentrationen der Eicosapentaensäure (EPA, 20:5), Docosahexaensäure (DHA, 22:6), Linolsäure (LOA, 18:2), Arachidonsäure (AA, 20:4) und Oleinsäure (OA, 18:1) mittels Gaschromatographie bestimmt. Die Daten wurden freundlicherweise von Frau Juliane Mest, MTA der Arbeitsgruppe Mayer, erhoben und zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse der LCT/MCT/FO-Gruppe wiesen ein signifikant erhöhtes EPA-Niveau vier Stunden nach Stimulation mit LPS im Vergleich zur NaCl-, LCT- und LCT/MCT-Gruppe (*, $p < 0,05$) auf. Das Niveau der EPA war vier Stunden nach Stimulation ebenfalls gegenüber dem Niveau der EPA zu den anderen Messzeitpunkten signifikant erhöht (\$, $p < 0,05$).

In der NaCl-Gruppe zeigte sich die EPA-Konzentration im Plasma vier Stunden nach Stimulation mit LPS signifikant erniedrigt gegenüber den 0- und 24-h-Werten (\$, $p < 0,05$).

24 Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens zeigte sich die höchste Konzentration im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten (% , $p < 0,05$).

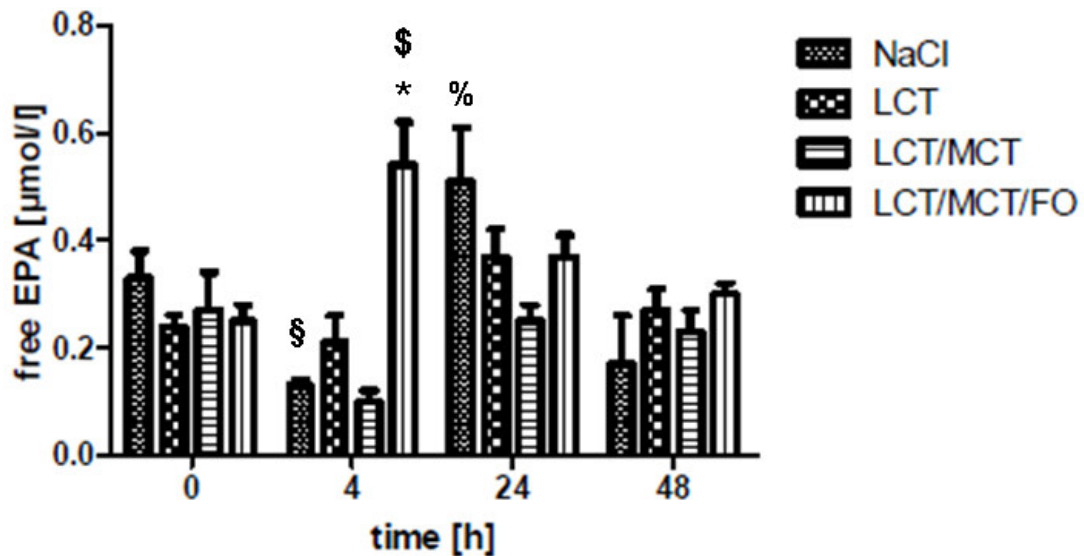


Abbildung 14: Plasmakonzentrationen der Eicosapentaensäure (EPA)

Plasmakonzentrationen von EPA unter Bedingungen des LPS-induzierten akuten Lungenversagens ohne Stimulation und 4, 24 bzw. 48 Stunden nach Stimulation mittels intratrachealer Gabe von 10 µg LPS. Die Tiere der LCT/MCT/FO-Gruppe wiesen significant erhöhte EPA Spiegel vier Stunden nach Stimulation im Vergleich zu den Tieren der NaCl-, LCT- und LCT/MCT-Gruppen (* , $p < 0.05$) sowie zu den EPA Werten der anderen Zeitpunkte auf (\$, $p < 0.05$). Die EPA Konzentrationen der NaCl-Gruppe zeigten sich vier Stunden nach Stimulation im Vergleich zu 0 und 24 Stunden erniedrigt (\$, $p < 0.05$). 24 Stunden nach Stimulation boten sie die höchsten Werte zu allen verglichenen Zeitpunkten (% , $p < 0.05$). $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Bei der Messung der DHA-Plasmakonzentrationen ergab sich ein ähnliches Bild. Vier Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens konnten die höchsten Konzentrationen sowohl zu allen Messzeitpunkten innerhalb der LCT/MCT/FO-Gruppe (* , $p < 0,05$) als auch im Vergleich zur LCT- und LCT/MCT-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt (\$, $p < 0,05$) gemessen werden.

Des Weiteren waren vier Stunden nach Stimulation die DHA-Plasmakonzentrationen innerhalb der NaCl-Gruppe (\$, $p < 0,05$) und der LCT/MCT-Gruppe (% , $p < 0,05$) auf dem höchsten Niveau.

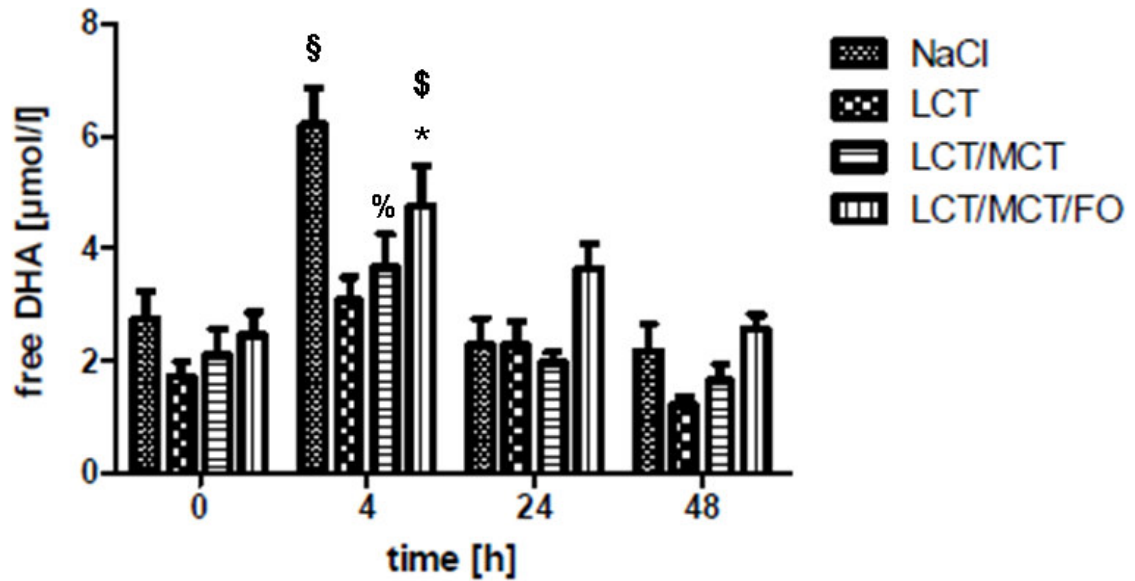


Abbildung 15: Plasmakonzentration der Docosahexaensäure (DHA)

Plasmakonzentrationen von DHA unter Bedingungen des LPS-induzierten akuten Lungenversagens ohne Stimulation und 4, 24 bzw. 48 Stunden nach Stimulation mittels intratrachealer Gabe von 10 µg LPS. Vier Stunden nach Stimulation wurden in der LCT/MCT/FO-Gruppe die höchsten DHA Werte gemessen (*, $p < 0.05$), im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten und zu den Tieren, die LCT und LCT/MCT erhielten (\$, $p < 0.05$). Die höchsten DHA Spiegel der NaCl-Gruppe (§, $p < 0.05$) und der LCT/MCT-Gruppe (% , $p < 0.05$) konnten vier Stunden nach Stimulation gemessen werden. $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Betrachtet man die n-6 Fettsäuren LOA und AA, zeigt sich vier Stunden nach Stimulation in allen untersuchten Infusionsgruppen ein Maximalwert. Die Mäuse der LCT-Gruppe boten im Vergleich zur NaCl-Gruppe und zur LCT/MCT/FO-Gruppe vor Stimulation signifikant höhere LOA-Konzentrationen (*, $p < 0,05$). Vier und 24 Stunden nach Induktion des akuten Lungenversagens boten die Tiere der LCT-Gruppe die höchsten LOA-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu den anderen Infusionsgruppen (**, $p < 0,05$).

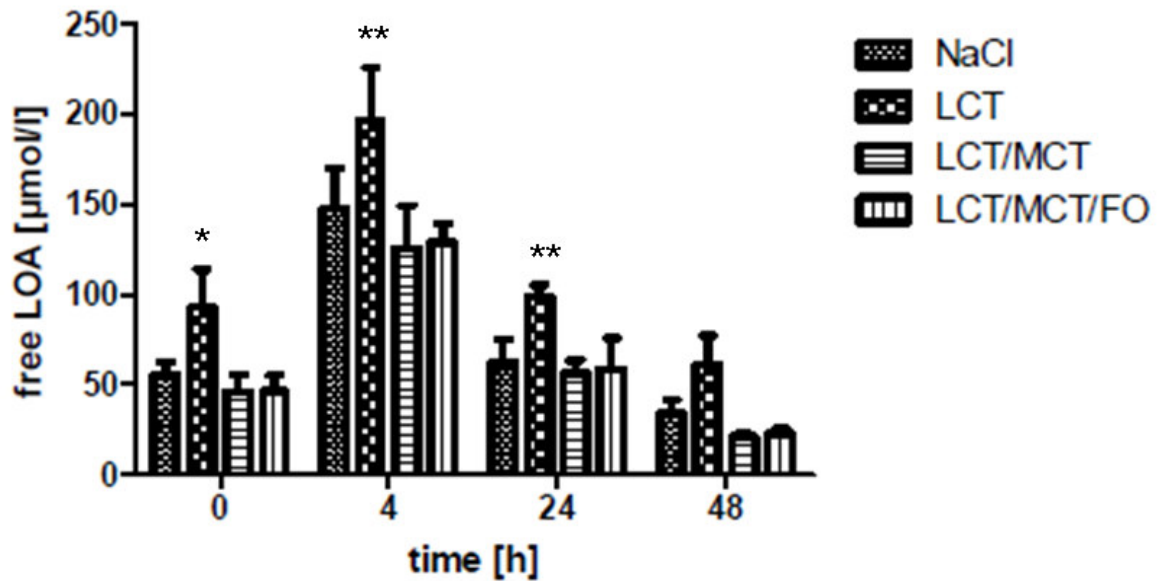


Abbildung 16: Plasmakonzentration der Linolsäure (LOA)

Plasmakonzentrationen von LOA unter Bedingungen des LPS-induzierten akuten Lungenversagens ohne Stimulation und 4, 24 bzw. 48 Stunden nach Stimulation mittels intratrachealer Gabe von 10 µg LPS. Die Mäuse der LCT-Gruppe wiesen vor Stimulation significant höhere LOA Spiegel im Vergleich zu den Mäusen der NaCl- und der LCT/MCT/FO-Gruppe auf (*, $p < 0.05$). Die LOA Konzentrationen 4 und 24 Stunden nach Stimulation in der LCT Gruppe waren die jeweils höchsten im Vergleich zu den anderen Infusionsgruppen (**, $p < 0.05$). $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

24 Stunden nach Stimulation mit LPS zeigte sich die AA-Konzentration in der LCT-Gruppe signifikant höher als in der LCT/MCT/FO-Gruppe (\$, $p < 0,05$).

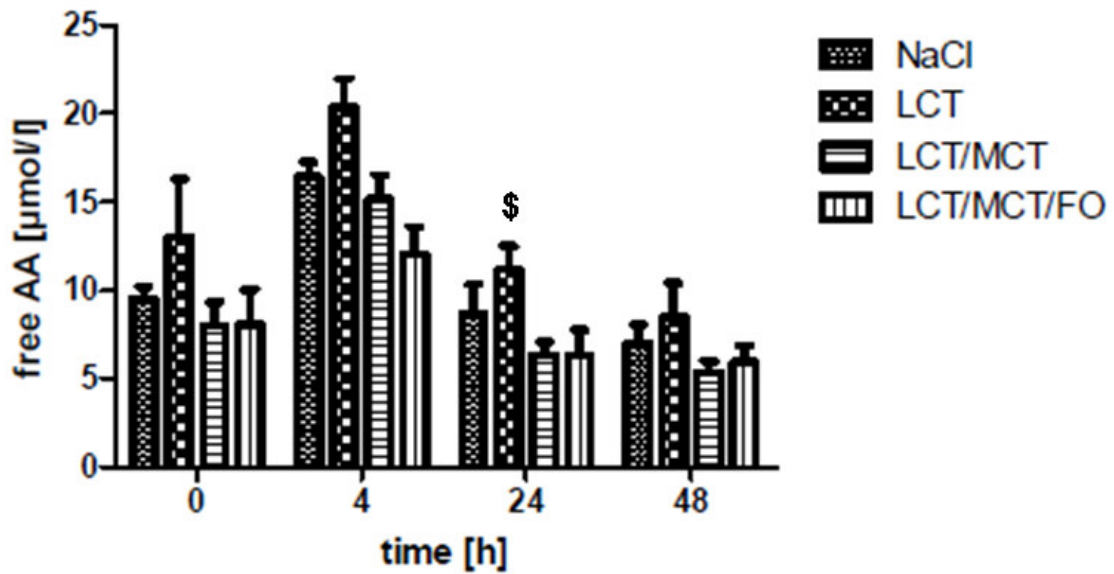


Abbildung 17: Plasmakonzentration der Arachidonsäure (AA)

Plasmakonzentrationen von AA unter Bedingungen des LPS-induzierten akuten Lungenversagens ohne Stimulation und 4, 24 bzw. 48 Stunden nach Stimulation mittels intratrachealer Gabe von 10 μg LPS. 24 Stunden nach Stimulation mit LPS zeigte sich die AA-Konzentration in der LCT-Gruppe signifikant höher als in der LCT/MCT/FO-Gruppe (\$, $p < 0,05$). $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

Die LOA- und AA-Konzentrationen der LCT/MCT- und LCT/MCT/FO-Gruppen waren zu allen Zeitpunkten auf einem vergleichbaren Niveau.

Die Konzentration der n-9-Fettsäure OA zeigte in allen Infusionsgruppen vier Stunden nach Stimulation Maximalwerte. Vier Stunden nach Stimulation war in der LCT-Gruppe eine signifikant höhere OA-Konzentration im Vergleich zur NaCl-, LCT/MCT- und LCT/MCT/FO-Gruppe (*, $p < 0,05$) zu beobachten.

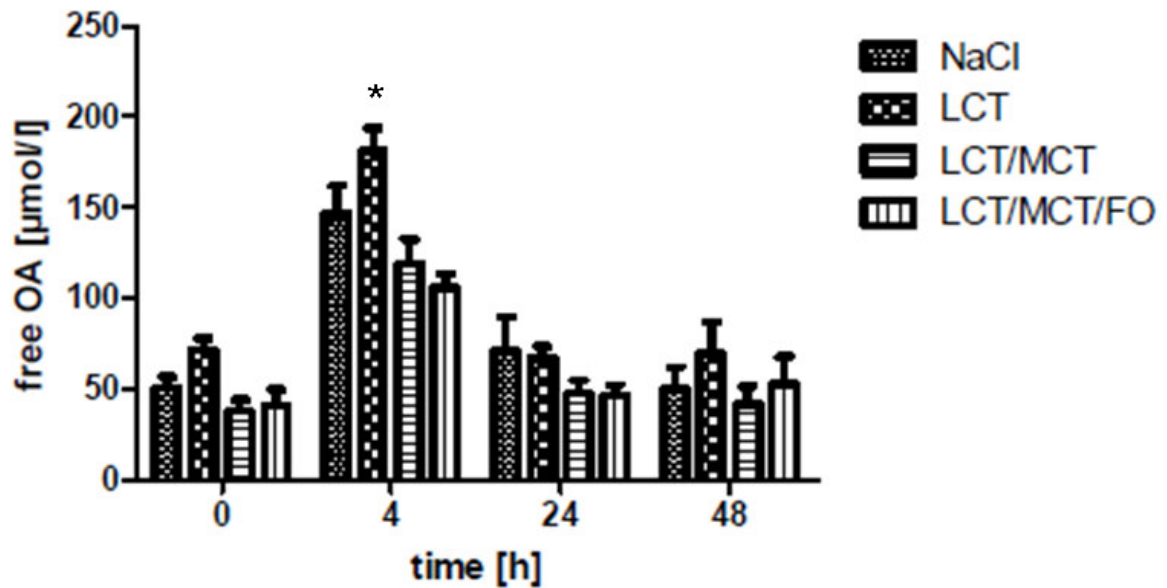


Abbildung 18: Plasmakonzentration der Oleinsäure (OA)

Plasmakonzentrationen von OA unter Bedingungen des LPS-induzierten akuten Lungenversagens ohne Stimulation und 4, 24 bzw. 48 Stunden nach Stimulation mittels intratrachealer Gabe von 10 μg LPS. Vier Stunden nach Stimulation mit LPS wiesen die Mäuse der LCT-Gruppe significant höhere Spiegel von OA im Vergleich zu den Tieren der NaCl-, LCT/MCT- und LCT/MCT/FO-Gruppe auf (*, $p < 0.05$). $n=6-8$ pro Gruppe und Zeitpunkt, die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

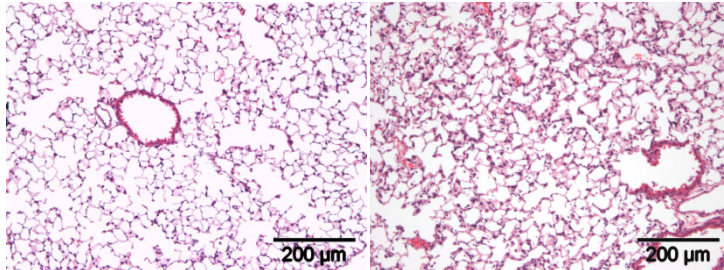
3.8 Histologische und radiologische Korrelate des akuten Lungenversagens

Die Lungenmorphologie wurde histologisch beurteilt, um den Einfluss der Entzündungsreaktion zu bewerten. Vor Stimulation boten die Mäuse aller Infusionsgruppen ein vergleichbares Bild. Nach Stimulation mit LPS wiesen die Mäuse der NaCl-Gruppe eine deutliche Zunahme der Leukozyteninvasion in den Alveolarraum und ein interstitielles Ödem als Zeichen einer pulmonalen Inflammation und Schädigung auf. Dies lässt sich durch die „verdickten“ Interalveolarsepten und die Vielzahl an Leukozyten in den jeweiligen Schnitten nachvollziehen. Diese histologischen Korrelate des akuten Lungenversagens konnten in den LCT- und LCT/MCT-Gruppen noch deutlicher gezeigt werden, während sich die Leukozyteninvasion und Ödembildung in der LCT/MCT/FO-Gruppe abgemildert darstellte.

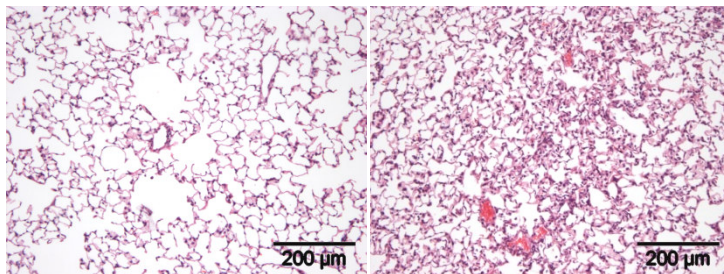
0h

24h

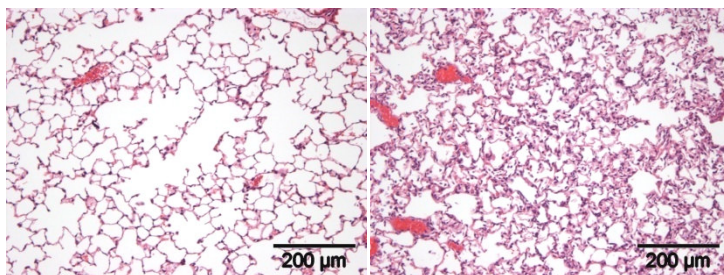
NaCl



LCT



LCT/MCT



LCT/MCT/FO

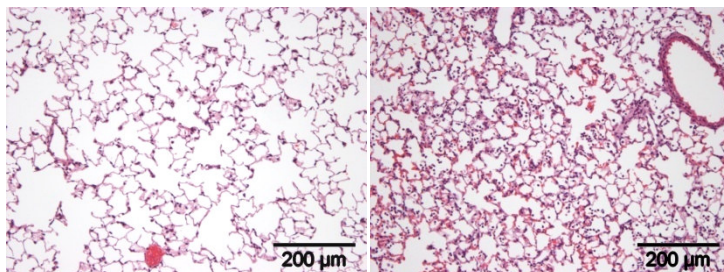


Abbildung 19: Histologie

Histologische Beurteilung der Lungenmorphologie vor (0h) und 24h nach LPS-induziertem akuten Lungenversagen mittels intratrachealer Gabe von 10µg LPS in den verschiedenen Infusionsgruppen. n=6 pro Gruppe und Zeitpunkt

Die Effekte des akuten Lungenversagens auf das Lungengewebe wurden des Weiteren radiologisch mittels VCT untersucht. Unabhängig von der verabreichten Lipidinfusion zeigte keine der untersuchten Lungen Pathologien wie Pleuraergüsse, Pneumothoraces oder Atelektasen. In allen Infusionsgruppen zeigte sich das Bild bilateraler Infiltrate, die in der CT als Transparenzminderung in Folge des vermehrten interstitiellen Flüssigkeitseinstroms imponiert. Passend zu der histologischen Bewertung waren auch im VCT die Lungen der mit LCT behandelten Mäuse im Vergleich zu den Mäusen der LCT/MCT/FO-Gruppe vermehrt transparenzgemindert.

Zur Darstellung der durchgeführten VCT-Untersuchungen sind exemplarisch die Bilder je einer Maus der verschiedenen Infusionsgruppen aufgeführt.

NaCl - Gruppe

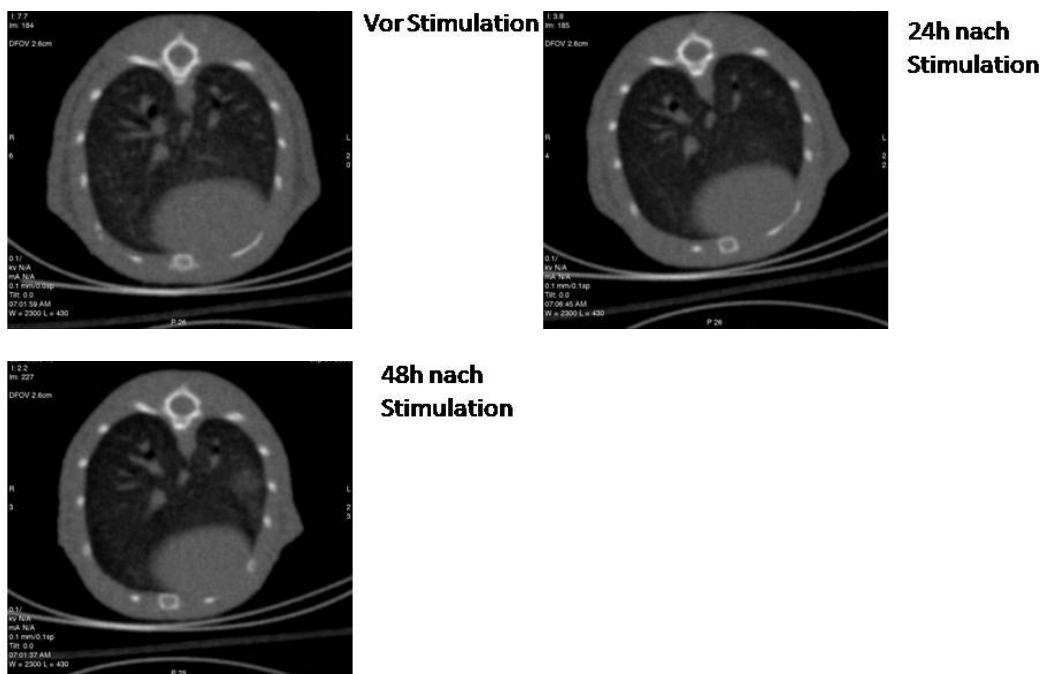


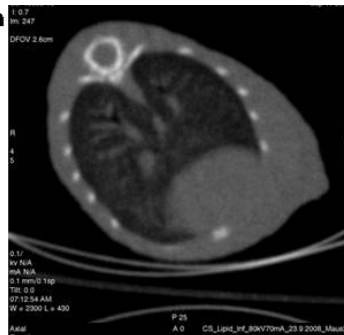
Abbildung 20: Exemplarische VCT-Schnitte der NaCl-Gruppe

VCT-Bilder der Lungenmorphologie vor (0h) und 24 bzw. 48h nach LPS-induziertem akuten Lungenversagen mittels intratrachealer Gabe von 10 μ g LPS in der NaCl-Gruppe. n=6 pro Gruppe. Ein Tier wurde jeweils zu allen drei Zeitpunkten untersucht.

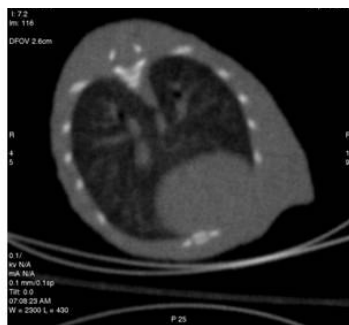
LCT - Gruppe



Vor Stimulation



24h nach Stimulation



48h nach Stimulation

Abbildung 21: Exemplarische VCT-Schnitte der LCT-Gruppe

VCT-Bilder der Lungenmorphologie vor (0h) und 24 bzw. 48h nach LPS-induziertem akutem Lungenversagen mittels intratrachealer Gabe von 10µg LPS in der LCT-Gruppe. n=6 pro Gruppe. Ein Tier wurde jeweils zu allen drei Zeitpunkten untersucht.

LCT/MCT-Gruppe

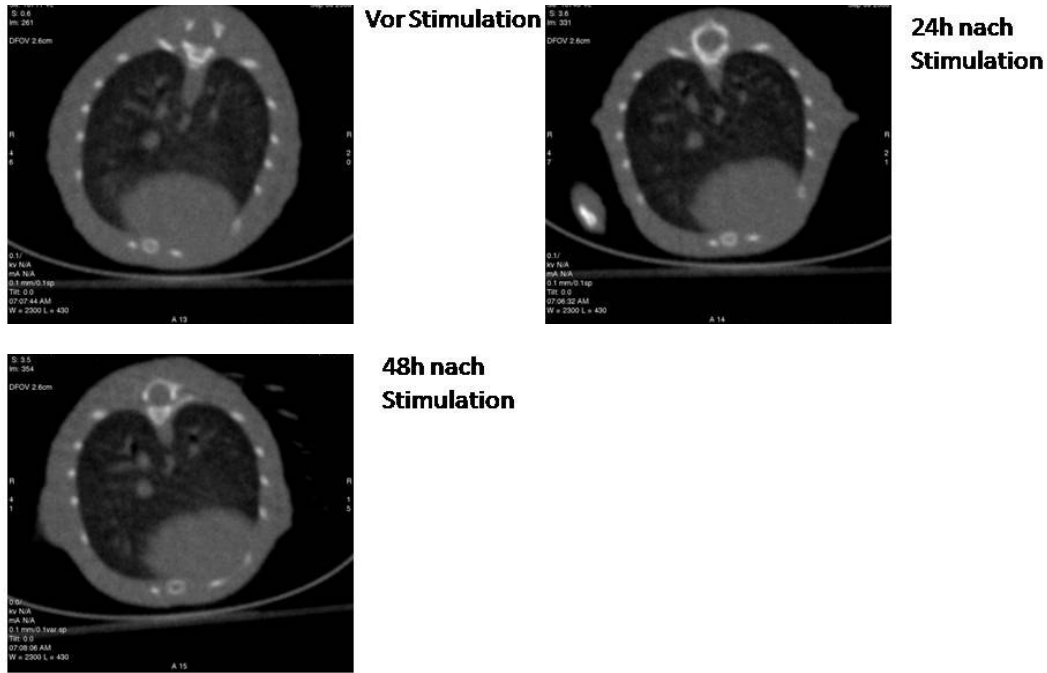


Abbildung 22: Exemplarische VCT-Schnitte der LCT/MCT-Gruppe

VCT-Bilder der Lungenmorphologie vor (0h) und 24 bzw. 48h nach LPS-induziertem akuten Lungenversagen mittels intratrachealer Gabe von 10 μ g LPS in der LCT/MCT-Gruppe. n=6 pro Gruppe. Ein Tier wurde jeweils zu allen drei Zeitpunkten untersucht.

LCT/MCT/FO-Gruppe

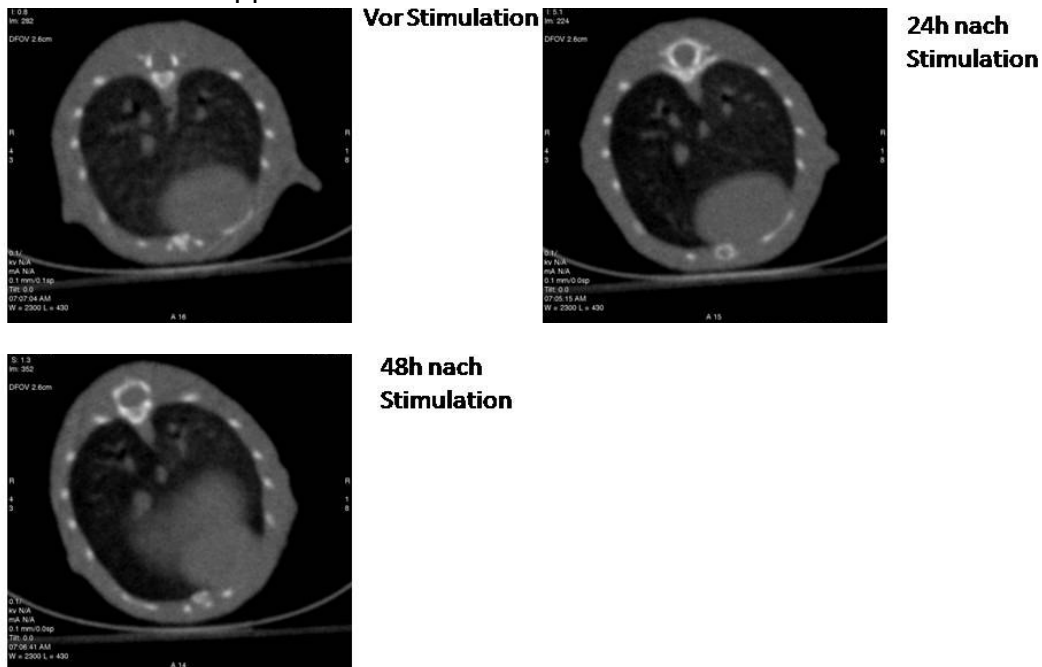


Abbildung 23: Exemplarische VCT-Schnitte der LCT/MCT/FO-Gruppe

VCT-Bilder der Lungenmorphologie vor (0h) und 24 bzw. 48h nach LPS-induziertem akuten Lungenversagen mittels intratrachealer Gabe von 10 μ g LPS in der LCT/MCT/FO-Gruppe. n=6 pro Gruppe. Ein Tier wurde jeweils zu allen drei Zeitpunkten untersucht.

Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von drei verschiedenen Lipidemulsionen (LCT, LCT/MCT, LCT/MCT/FO), die in der Praxis für parenterale Ernährung zur Verfügung stehen, auf das Mausmodell eines akuten Lungenversagens untersucht.

Zur Auslösung des akuten Lungenversagens wurden 10 µg LPS i.t. verabreicht. Diese Dosis erzeugt ein akutes Lungenversagen schweren Ausmaßes (Szarka, Wang et al. 1997).

Das durch die LPS-Instillation ausgelöste akute Lungenversagen wurde hinsichtlich der Leukozyteninvasion, der Permeabilität der Lungengefäße und der Zytokinsynthese untersucht. Zur Begutachtung des Zeitverlaufes wurden die Zeitpunkte 4, 24 und 48 Stunden nach Stimulation betrachtet.

Um der klinischen Realität nahezukommen, wurde in dieser Arbeit ein LPS-Modell verwendet. Dieses Modell bietet mehrere Vorteile. Zum einen kann durch die Gabe einer definierten Menge LPS, bei identischem Applikationsweg, den Tieren immer der gleiche Entzündungsstimulus vermittelt werden. Um im Vergleich zu alternativen Modellen ein akutes Lungenversagen auszulösen, entspricht die Gabe von Endotoxin einem klinisch relevanten Teilaspekt der Sepsis. Das LPS-Modell ist international etabliert und akzeptiert (Matute-Bello, Frevert et al. 2008). Die standardisierte Messung der alveolären Leukozytenzahl und der Proteinkonzentration sowie der systemischen Konzentration der Zytokine und Eicosanoide aus dem Plasma erlaubt eine gute Vergleichbarkeit mit bereits durchgeführten und zukünftigen Studien.

Dennoch gibt das hier verwendete Mausmodell die Realität nur bedingt wieder, da in dieser Arbeit ein gereinigtes Endotoxin eines einzelnen Bakterienstamms verwendet wurde und die Infektion zu einem Zeitpunkt („single-hit“) erfolgte (Hermann, Spreitzer et al. 2002; Yipp, Andonegui et al. 2002). In der klinischen Realität wird das akute Lungenversagen oder eine Sepsis durch eine Vielzahl von Bakterien ausgelöst, die durch kontinuierliche Invasion eine ausgeprägte Entzündungsreaktion hervorrufen.

Es konnte gezeigt werden, dass die mit der LCT/MCT/FO-Lipidemulsion ernährten Tiere im Vergleich zu den mit LCT- oder LCT/MCT-Lipidemulsionen ernährten Tieren einen Benefit hatten.

Dies wurde zum einen durch eine signifikant niedrigere pulmonale Leukozyteninvasion zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Stimulation mit 10 µg LPS belegt. Zum anderen

ergibt die Betrachtung der alveolären Proteinkonzentrationen, als Korrelat eines Lungenödems, ein ähnliches Bild. In allen Infusionsgruppen kam es nach Stimulation mit LPS zu einem stetigen Anstieg der Proteinkonzentration zu allen gemessenen Zeitpunkten. 48 Stunden nach Stimulation boten die Mäuse der LCT/MCT/FO-Gruppe signifikant niedrigere Proteinkonzentrationen als die Mäuse der anderen Gruppen. Diese Ergebnisse werden bei der Betrachtung der alveolären Zytokinkonzentrationen weiter untermauert. Dort wiesen bei allen betrachteten Zytokinen 48 Stunden nach Stimulation mit LPS die Mäuse der LCT/MCT/FO-Gruppe jeweils die niedrigsten Konzentrationen auf.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass in diesem Modell die Kombination von LCT und MCT im Vergleich zur reinen LCT-Lipidemulsion keinen Vorteil aufwies, obwohl die gemessenen Plasmakonzentrationen von Linolsäure und Arachidonsäure in der LCT/MCT-Gruppe im Vergleich zur LCT-Gruppe vermindert waren.

4.1 Immunmodulation durch n-3-Fettsäuren

Die Ergebnisse dieses Mausmodells zeigen deutlich immunmodulatorische und antiinflammatorische Effekte der FO-haltigen Lipidemulsion auf das LPS-ausgelöste ARDS/ALI.

Für die positiven Effekte dieser Lipidemulsion lassen sich mehrere mögliche Ursachen finden.

Die Mäuse der LCT/MCT/FO-Gruppe wurden in einem höheren Maße mit EPA und DHA versorgt. Dies konnte durch entsprechend höhere Plasmaspiegel gezeigt werden. Daraus kann postuliert werden, dass diese Fettsäuren aufgrund höherer Verfügbarkeit vermehrt in die Phospholipidmembran der Zellen eingebaut werden. Durch diesen vermehrten Einbau kommt es möglicherweise zu einem teilweisen Verdrängen bzw. Ersetzen von Arachidonsäure (Wantan and Calder 2007; Singer, Shapiro et al. 2008).

Durch die verminderte Verfügbarkeit von AA tritt eine Reduktion der Spiegel der von AA abgeleiteten Eikosanoide wie beispielsweise TxB₂ und PGE₂ ein. Auch das wird durch die entsprechenden Spiegel der Tiere der LCT/MCT/FO-Gruppe im Vergleich zur LCT- bzw. LCT/MCT-Gruppe nachvollzogen.

Abgesehen von Veränderungen in der Eikosanoidsynthese kommt es durch die n-3-bedingte veränderte Zusammensetzung der Phospholipidmembran zu weiteren Wirkungen. Auch von den Phospholipiden abgeleitete Second-messenger werden

beeinflusst, wie beispielsweise die Bildung von Inositolphosphaten (Sperling, Benincaso et al. 1993), Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängigen Signalwegen (Schaefer, Wenzel et al. 2008) oder die Aktivierung der Proteinkinase C (Denys, Hichami et al. 2005).

Camandola und Kollegen konnten zeigen, dass n-6-Fettsäuren, im Gegensatz zu EPA, die nukleäre Translokation und die anschließende Aktivierung von NF- κ B bewirken. NF- κ B ist ein Schlüsselmediator der Entzündungskaskade (Camandola, Leonarduzzi et al. 1996). Dieser Pathomechanismus bietet eine mögliche Erklärung für die verminderten Spiegel der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und MIP-2 in der BAL der LCT/MCT/FO-Mäuse im Vergleich zu den Tieren der LCT- bzw. LCT/MCT-Gruppe.

Die verminderte alveoläre Konzentration von TNF- α in der LCT/MCT/FO-Gruppe erklärt gut die damit korrelierende, verminderte alveoläre Proteinkonzentration im Vergleich zu den anderen Infusionsgruppen. Die Beteiligung von TNF- α an einer erhöhten Proteinkonzentration und somit dem Entstehen eines Lungenödems konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden. Beispielsweise wird durch TNF- α die Adhäsion zwischen Endothelzellen moduliert (Rotundo, Curtis et al. 2002) und die Zahl der „tight junctions“ zwischen den Zellen reduziert (Gitter, Bendfeldt et al. 2000).

Auch die intrapulmonale Leukozyteninvasion, als charakteristischer Bestandteil eines ARDS/ALI, zeigte sich in der Tiergruppe, welche die FO-haltige Lipidemulsion erhielt, signifikant reduziert. Gleichzeitig führte die Verabreichung von LCT- bzw. LCT/MCT-Lipidemulsionen zu einer vermehrten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Lungenschädigung. Die Ergebnisse der Leukozytenzahlen aus der BAL werden durch die MPO-Aktivität im Lungengewebe gestützt, welche die Ansammlung der neutrophilen Granulozyten dort widerspiegelt.

Der Effekt der n-3-Fettsäuren auf die Transmigration der Leukozyten ist komplex und erst teilweise verstanden. Der Einfluss wird möglicherweise durch die verminderte Präsentation von endothelialen Adhäsionsmolekülen (Weber, Erl et al. 1995; Mayer, Merfels et al. 2002) und die Beeinflussung des Rollens von Monozyten erklärt (Prescott, Zimmerman et al. 1990; Smith, Deem et al. 2006).

Ein weiterer Einflussfaktor sind möglicherweise die in den letzten Jahren entdeckten Resolvine. Resolvin steht für „resolution phase interaction products“. Die Resolvine der E-Serie (Resolvin E1 oder RvE1) sind Metabolite der Eicosapentaensäure. Resolvine werden in der Resolutionsphase einer Entzündung gefunden und zeigen sich als potente Regulatoren der Granulozyten in einer Entzündung *in vivo*. Sie wirken antiinflammatorisch, immunregulatorisch, vermindern die Neutrophilenmigration und reduzieren somit das Ausmaß einer Entzündungsantwort (Serhan, Clish et al. 2000;

Serhan, Hong et al. 2002; Serhan, Gotlinger et al. 2004; Serhan, Chiang et al. 2008). In Bezug auf das akute Lungenversagen konnten Seki und Kollegen kürzlich in einem Mausmodell protektive Effekte durch RvE1 zeigen (Seki, Fukunaga et al.).

Die Resolvine der D-Serie sind Metabolite der Docosahexaensäure. Auch die Resolvine der D-Serie (RvD1) zeigen im Mausmodell protektive Effekte auf das akute Lungenversagen (Xie, Wang et al. 2013). Die Wirkung wird auf eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch eine Aktivierung von Peroxisomen proliferatoraktivierten Rezeptor (PPAR)- γ zurückgeführt (Liao, Dong et al. 2012).

Dennoch ist der Einfluss von Resolvinen auf das akute Lungenversagen zurzeit noch recht spekulativ zu beurteilen, da die Messung von Resolvinen in der BAL komplex ist (Mayer, Kiessling et al. 2009).

4.2 Immunologische Effekte durch MCT

Der direkte Vergleich von LCT- und LCT/MCT-Lipidemulsionen konnte interessanterweise keinen Effekt der LCT/MCT- gegenüber der LCT-Lipidemulsion zeigen. Der Grund, MCT in die parenterale Ernährung aufzunehmen, sind die biochemischen Eigenschaften, welche die schnelle Metabolisierung und einen Transport in die Zelle ohne Transportsysteme ermöglichen (Bach, Storck et al. 1988; Wanten and Calder 2007).

Hinsichtlich des Einflusses von MCT auf das Immunsystem zeigt sich in den bisherigen Publikationen kein klares Bild. In experimentellen Arbeiten steigerten LCT/MCT und MCT die Adhäsion und Degranulation der Monozyten. Andererseits wurde von einer verminderten antimykotischen Wirksamkeit neutrophiler Granulozyten berichtet (Wanten, Geijtenbeek et al. 2000; Versleijen, Roelofs et al. 2005).

Die wenigen existierenden klinischen Studien lassen ebenfalls keine eindeutigen Interpretationen zu. Einerseits konnte ein positiver Effekt auf die postoperative Abszessentwicklung durch LCT/MCT nach Laparatomie gezeigt werden (Grau, Ruiz de Adana et al. 2003), andererseits war eine verstärkte Entzündungsreaktion bei ARDS-Patienten festzustellen (Lekka, Liokatis et al. 2004).

In dieser Arbeit treten in den meisten Ergebnissen vergleichbare Effekte von LCT- und LCT/MCT-Lipidemulsionen auf. Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass die biologische oder immunologische Wirkung von Lipidemulsionen zumindest teilweise von

ihrem n-6-zu n-3-Verhältnis bestimmt wird. Dieses Verhältnis liegt hier sowohl in der LCT- als auch in der LCT/MCT-Lipidemulsion bei 7:1.

4.3 Aktuelle Studienlage zu n-3-Fettsäuren

Die in dieser Arbeit durchgeführte kontinuierliche Infusion von LCT/MC/FO wurde im Mausmodell zu ARDS/ALI bisher noch nicht untersucht. Dennoch sind die Ergebnisse im Einklang mit den vorhandenen experimentellen und klinischen Studien.

4.3.1 n-3-Fettsäuren, klinische und experimentelle Studien

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass fat-1-Mäuse, welche die Möglichkeit besitzen, endogen n-6- in n-3 Fettsäuren umzuwandeln, und so ein hohes EPA/DHA-Niveau erreichen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine reduzierte Entzündungsreaktion und verminderte Ausprägung des akuten Lungenversagens aufweisen (Mayer, Kiessling et al. 2009).

Heller et al. konnten im Rahmen einer Datenbankanalyse 661 chirurgischer Patienten, von denen ein Großteil an einer abdominalen Sepsis litt, zeigen, dass die Zugabe von Fischöl zur parenteralen Ernährung dosisabhängig die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation sowie den Bedarf an Antibiotika reduzieren kann. Bei den Patienten, die Fischöl in einer Dosis von 0,15-0,25 g/kgKG/d erhielten, sank die Mortalität signifikant (Heller, Rossler et al. 2006). Obwohl diese Studie weder kontrolliert noch randomisiert war, konnte ein klarer Benefit für Patienten auf Intensivstationen durch die Hinzunahme von Fischöl in die parenterale Ernährung gezeigt werden.

Bei 40 Patienten mit akuter schwerer Pankreatitis konnte in einer randomisierten und kontrollierten Studie ein positiver klinischer Effekt durch die Gabe von Lipidemulsionen, die Fischöl enthalten, gezeigt werden (Wang, Li et al. 2008). Die Patienten der n-3-Gruppe boten verbesserte CRP-Werte und Oxygenierungsindizes im Vergleich zu der Gruppe, die mit herkömmlichen Lipidemulsionen behandelt wurde.

Calder et al. untersuchten in einer klinischen Studie den Effekt einer fischöhlhaltigen Lipidemulsion auf das immunologische und klinische Outcome von septischen Patienten. Ein Einschluss von Fischöl in die parenterale Ernährung bei diesem Patientenkollektiv

führte zu veränderten Konzentrationen inflammatorischer Zytokine und verbesserte den Gasaustausch, während die Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation und die Mortalität in den Gruppen keinen signifikanten Unterschied zeigte (Barbosa, Miles et al. 2010).

4.3.2 Enterale/parenterale n-3-Gabe und ARDS

Bisher wurde keine klinische Studie veröffentlicht, die einen Einfluss parenteral verabreichter fischöhlhaltiger Lipidemulsionen auf das Outcome eines akuten Lungenversagens/ARDS untersucht. Das Fehlen valider Studien im Bereich parenteraler Ernährung im Rahmen des ARDS verstärkt die anhaltende Diskussion um die optimale Ernährung und Lipidversorgung dieser Patienten.

Im Gegensatz dazu ist die enterale Anwendung von n-3-Fettsäuren im akuten Lungenversagen zurzeit deutlich besser untersucht.

Gadek et al. untersuchten in einer multizentrischen, kontrollierten und randomisierten Studie den Effekt von fischöhlhaltiger Ernährung auf das klinische Outcome von 146 Patienten mit ARDS. Die Patienten, die Fischöl erhielten, zeigten eine signifikant verbesserte Oxygenierung, eine kürzere Beatmungsdauer und eine reduzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der BAL. Des Weiteren zeigten sich auch extrapulmonale Kriterien wie die Behandlungsdauer auf der Intensivstation oder die Inzidenz von neuauftretendem Organversagen in der Fischöl-Gruppe verbessert (Gadek, DeMichele et al. 1999).

Diese Ergebnisse konnten von zwei folgenden klinischen Studien unterstützt werden, die sich zum einen mit ARDS-Patienten (Singer, Shapiro et al. 2008) und zum anderen mit septischen Patienten (Pontes-Arruda, Martins et al. 2011) befassten. In diesen Studien konnten positive Effekte der n-3-Fettsäuren, die teilweise mit γ -Linolsäure ergänzt wurden, auf Oxygenierung, Dauer der Beatmung und Organfunktionen gezeigt werden.

Diese Studien untersuchten allerdings ausschließlich enteral ernährte Patienten und verwendeten n-6-reiche Diäten in den Kontrollgruppen. Weiterhin ist kritisch anzumerken, dass jeweils nur eine geringe Fallzahl untersucht wurde. Auf Basis dieser Studien wurde in 2006 von den europäischen Fachgesellschaften für ARDS-Patienten eine Empfehlung (Grad B) für die enterale Gabe von Sondenkost ausgesprochen, die mit n-3-Fettsäuren, γ -Linolensäure und Antioxidantien versetzt ist (Kreymann, Berger et al. 2006).

Im Gegensatz zu den bisherigen Studien, die überzeugende Effekte von n-3-Fettsäuren auf das akute Lungenversagen zeigten, stehen die Ergebnisse der EDEN-OMEGA Studie, die von ARDSnet durchgeführt wurde (Rice, Wheeler et al. 2011; Rice, Wheeler et al. 2012). Diese große Phase-III-Studie, die den Effekt von n-3-Fettsäure-Bolusgaben und Immunergänzungsmitteln auf ARDS untersuchte, musste aufgrund fehlender Wirksamkeit und einer höheren Komplikationsrate in der Gruppe der ARDS-Patienten, die n-3-Fettsäuren erhielten, abgebrochen werden.

Im einen Teil dieser Studie, der EDEN-Studie, wurden 1.000 Patienten mit akutem respiratorischen Versagen innerhalb von 48 bis 72 Stunden randomisiert. Die Teilnehmer erhielten entweder eine „Zottenernährung“ mit ca. 400 kcal/d oder mittels eines standardisierten Nahrungsaufbaus ca. 1.300 kcal/d. Nach sechs Tagen wurde die Ernährung in beiden Gruppen identisch fortgeführt. Die Ergebnisse bezüglich beatmungsfreier Tage und 60-Tagesmortalität zeigten sich vergleichbar (Rice, Wheeler et al. 2012). Der sehr geringe Energiegehalt der Nahrung in beiden Studienarmen wird in der Fachwelt kritisch gewertet (Hecker, Felbinger et al. 2013).

Der andere Teil ist die OMEGA-Studie. Dieser Teil ist bezüglich n-3-Fettsäuren relevant. Bis zur Zwischenanalyse wurden 272 Patienten eingeschlossen. Die Teilnehmer eines Studienarmes erhielten zweimal täglich 120 ml einer Lösung mit n-3-Fettsäuren, γ -Linolensäure und Antioxidantien. Die Kontrollgruppe erhielt eine kohlenhydrat- und proteinreiche Nahrung in identischer Menge. Nach der Zwischenanalyse musste die Studie aufgrund mangelnder Wirksamkeit beendet werden. Die Kontrollgruppe zeigte im Vergleich zur Studiengruppe eine Reduktion von Organversagen, beatmungsfreien Tagen und Dauer des Intensivaufenthaltes. Die Sterblichkeit zeigte sich in der Studiengruppe höher, ohne dass dies signifikant war (Rice, Wheeler et al. 2011). Somit wurden die bisherigen Ergebnisse zu n-3-Fettsäuren im Bereich des ARDS und der Sepsis in Frage gestellt.

Kritisch zum Studiendesign ist anzumerken, dass bei gleicher Kalorienzufuhr in der Studiengruppe ca. 20g Protein weniger zugeführt wurden. Bei Intensivpatienten ist jedoch eine ausreichende Proteinzufuhr essenziell, da im Stoffsstoffwechsel endogene Reserven rasch aufgezehrt werden (Alberda, Gramlich et al. 2009). Auch die Bolusgabe der Lipide führt möglicherweise zur Malabsorption. Dies würde durch eine signifikant höhere Diarrhöerate in der Studiengruppe unterstützt (Felbinger, Weigand et al. 2012). Stapleton und Kollegen konnten in einer aktuellen Studie ebenfalls keine positiven Effekte durch enteral verabreichtes Fischöl auf pulmonale und systemische Entzündungen finden (Stapleton, Martin et al. 2011).

4.4 Fazit

Abschließend lässt sich schlussfolgern, dass die Anwendung von n-3-Fettsäuren im akuten Lungenversagen weiterhin mehrere Unsicherheiten beinhaltet. Daher sollten zukünftige Studien sich auf die folgenden Punkte konzentrieren:

Zum einen sollte die Applikationsweise untersucht werden, also enteral im Vergleich zu parenteral, Bolusgabe oder kontinuierlicher Verabreichung. Des Weiteren sollten die optimale Dosis von n-3-Fettsäuren im akuten Lungenversagen sowie der optimale Zeitpunkt des Therapiebeginns ermittelt werden.

Trotz der eingangs genannten Einschränkungen dieses Mausmodells in Bezug auf die Vergleichbarkeit mit der klinischen Realität, konnte in dieser Arbeit klar ein positiver Effekt durch die parenterale Verabreichung von Fischöl auf das akute Lungenversagen bei Mäusen gezeigt werden.

Zusammenfassung

Das akute Lungenversagen ist ein häufiges Krankheitsbild bei intensivpflichtigen Patienten. Die Ernährung dieser Patienten ist komplex, einen Teil der essenziellen Nahrungskomponenten stellen Lipide dar. Diese stellen dem Patienten nicht nur Energie zur Verfügung, sondern haben auch ein immunmodulatorisches Potenzial und somit Einfluss auf das Lungenversagen und die damit vergesellschaftete Entzündungsreaktion.

Ziel dieser Arbeit war der Vergleich des Einflusses von drei Lipidemulsionen auf die Lungenmorphologie, Leukozyteninvasion, Gefäßpermeabilität (Proteinübertritt) und die Zytokinproduktion in einem Mausmodell des akuten Lungenversagens.

Die Mäuse erhielten Infusionen mit LCT-, LCT/MCT- oder LCT/MCT/FO-Lipidemulsionen oder isotoner Kochsalzlösung über einen intravenösen Katheter, bevor mittels LPS-Stimulation das akute Lungenversagen ausgelöst wurde.

Die Mäuse, welche die Fischöl-haltige Lipidemulsion erhalten hatten, zeigten eine geringere pulmonale Leukozyteninvasion, geringere intraalveoläre Proteinkonzentrationen und Zytokinkonzentrationen sowie geringe Myeloperoxidase-Aktivität im Vergleich zu den Mäusen, die LCT- oder LCT/MCT-Lipidemulsionen bekommen hatten. Des Weiteren zeigten sich histologisch eine abgemilderte Leukozyteninvasion und Ödembildung in den Tieren der LCT/MCT/FO-Gruppe im Vergleich zu den Tieren der LCT- oder LCT/MCT-Gruppe.

Zwischen den Tieren der LCT- und denen der LCT/MCT-Gruppe waren in allen gemessenen Parametern keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Die Fischöl-haltige Lipidemulsion in diesem Modell zeigte protektive Effekte auf das akute Lungenversagen und die Entzündungsreaktion. Somit kann geschlossen werden, dass intensivpflichtige ARDS-Patienten, die auf parenterale Ernährung angewiesen sind, von Lipidemulsionen profitieren könnten, bei denen n-6-Fettsäuren teilweise durch n-3-Fettsäuren ersetzt werden.

Summary

Acute lung injury is a common disease in intensive care units. Patients who need parenteral nutrition receive lipid emulsions as a part of it. Lipid emulsions not only supply energy, they also show immunomodulatory effects and therefore are able to affect the acute lung injury and inflammation.

This thesis investigated the influence of three lipid emulsions on lung morphology, leukocyte invasion, protein leakage, and cytokines in a murine model of acute lung injury.

Mice received infusions containing LCT-, LCT/MCT or LCT/MCT/FO-lipid emulsions or saline before LPS-challenge.

Mice who had received fish-oil containing lipid emulsion showed decreased intraalveolar leukocyte invasion, protein leakage, myeloperoxidase activity and cytokine production after LPS-challenge compared to mice receiving LCT- or LCT/MCT-lipid emulsions. Histological lung morphology after LPS-challenge improved faster in the LCT/MCT/FO group.

No significant difference between mice receiving LCT- or LCT/MCT-lipid emulsions could be shown concerning the above mentioned parameters.

The fish-oil containing lipid emulsion in this murine model showed protective effects on acute lung injury and inflammation. Therefore partial replacement of n-6 fatty acids with n-3 fatty acids may be beneficial to critical ill patients with acute lung injury who require parenteral nutrition.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AECC	amerikanisch-europäische Konsensuskonferenz
ALA	α -Linolensäure
ALI	Akute Lungenschädigung (Acute lung injury)
ARDS	Akute respiratorische Insuffizienz (acute respiratory distress syndrome)
BAL	broncho-alveoläre Lavage
Balb/C	Labormaus-Inzuchtlinie
CD	Differenzierungscluster (Cluster of differentiation (Oberflächenrezeptoren auf Leukozyten))
CD62E	Endothel-Selektin
CD62L	Leukozyten-Selektin
CD62P	Plättchen- und Endothel-Selektin
CPAP	kontinuierlich positive Atemwegsdruck (continuous positiv airway pressure)
DHA	Docosahexaensäure
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EPA	Eicosapentaensäure
et al.	et alii
FADD	Fas-assoziierte Todesdomäne (Fas-associated death domain)
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration

FO	Fischöl
GLA	γ -Linolensäure
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (Intercellular-adhesion molecule-1)
ICAM-2	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-2 (Intercellular-adhesion molecule-2)
IE	Internationale Einheiten
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
i.t.	intratracheal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
LBP	LPS-bindendes Protein
LCT	langkettige Triglyceride (Long-chain-triglycerides)
LCT/MCT	Kombination von lang- und mittellangkettigen Triglyceriden
LCT/MCT/FO	Kombination von lang- und mittellangkettigen Triglyceriden sowie Fischöl
LOA	Linolsäure
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
MCT	mittellangkettige Triglyceride
MIP-2	Makrophagen-inflammatorisches Protein-2
MPO	Myeloperoxidase
n	Anzahl in der Stichgruppe
n-3	Omega-3
n-6	Omega-6
NaCl	Natriumchlorid

NF-κB	Nukleärer Faktor-kappa B
OA	Oleinsäure
OI	Oxygenierungsindex
OP	Operation
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PECAM-1	plättchen-endotheliales Zelladhäsionsmolekül-1 (Platelet-Endothelial Cell adhesion molecule-1)
PEEP	positive endexpiratorischer Atemwegsdruck (positive endexpiratory pressure)
PG	Prostaglandin
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ , Prostazyklin
PGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s.c.	subkutan
TACE	TNF-α umwandelndes Enzym (TNF-α converting enzyme)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-α
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TNFR2	TNF-Rezeptor 2
TRADD	TNF-Rezeptor assoziierte Todesdomäne (TNF-receptor associated death domaine)
TRAF2	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierter Faktor 2

TRAF6	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor 6
Tx	Thromboxan
TxB2	Thromboxan B2
v.	vena
VCAM	gefäßständiges Zelladhäsionsmolekül (vascular cell adhesion molecule)
VCT	Volumen Computer Tomograph

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signalweg des Lipopolysaccharides	16
Abbildung 2: Zusammensetzung der Lipidemulsionen aus langkettigen Fettsäuren.	27
Abbildung 3: Venen-Katheter für die OP.....	31
Abbildung 4: Aufbau einer ALZET osmotischen Pumpe	32
Abbildung 5: Präparierte V. jugularis mit dem cranialen Faden	33
Abbildung 6: Katheter in der V. jugularis.....	34
Abbildung 7: Leukozytenzahl in der BAL	42
Abbildung 8: MPO-Aktivität	44
Abbildung 9: Alveoläre Proteinkonzentrationen	45
Abbildung 10: TNF- α	46
Abbildung 11: MIP-2.....	47
Abbildung 12: TxB2	49
Abbildung 13: PGE2.....	50
Abbildung 14: Plasmakonzentrationen der Eicosapentaensäure (EPA).....	51
Abbildung 15: Plasmakonzentration der Docosahexaensäure (DHA)	52
Abbildung 16: Plasmakonzentration der Linolsäure (LOA)	53
Abbildung 17: Plasmakonzentration der Arachidonsäure (AA)	54
Abbildung 18: Plasmakonzentration der Oleinsäure (OA)	55
Abbildung 19: Histologie.....	56
Abbildung 20: Exemplarische VCT-Schnitte der NaCl-Gruppe	57
Abbildung 21: Exemplarische VCT-Schnitte der LCT-Gruppe	58
Abbildung 22: Exemplarische VCT-Schnitte der LCT/MCT-Gruppe	59
Abbildung 23: Exemplarische VCT-Schnitte der LCT/MCT/FO-Gruppe.....	59

Literaturverzeichnis

- Adolph, M., A. R. Heller, et al. (2009). "Lipid emulsions - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 6." Ger Med Sci **7**: Doc22.
- Akella, A. and S. B. Deshpande (2013). "Pulmonary surfactants and their role in pathophysiology of lung disorders." Indian J Exp Biol **51**(1): 5-22.
- Alberda, C., L. Gramlich, et al. (2009). "The relationship between nutritional intake and clinical outcomes in critically ill patients: results of an international multicenter observational study." Intensive Care Med **35**(10): 1728-37.
- Andonegui, G., C. S. Bonder, et al. (2003). "Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs." J Clin Invest **111**(7): 1011-20.
- Artinian, V., H. Krayem, et al. (2006). "Effects of early enteral feeding on the outcome of critically ill mechanically ventilated medical patients." Chest **129**(4): 960-7.
- Ashbaugh, D. G., D. B. Bigelow, et al. (1967). "Acute respiratory distress in adults." Lancet **2**(7511): 319-23.
- Askanazi, J., D. H. Elwyn, et al. (1980). "Respiratory distress secondary to a high carbohydrate load: a case report." Surgery **87**(5): 596-8.
- Aukland, K. and R. K. Reed (1993). "Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume." Physiol Rev **73**(1): 1-78.
- Bach, A. C., D. Storck, et al. (1988). "Medium-chain triglyceride-based fat emulsions: an alternative energy supply in stress and sepsis." JPEN J Parenter Enteral Nutr **12**(6 Suppl): 82S-88S.
- Barbosa, V. M., E. A. Miles, et al. (2010). "Effects of a fish oil containing lipid emulsion on plasma phospholipid fatty acids, inflammatory markers, and clinical outcomes in septic patients: a randomized, controlled clinical trial." Crit Care **14**(1): R5.
- Baxter, F. (1997). "Septic shock." Can J Anaesth **44**(1): 59-72.
- Beasley, D., R. A. Cohen, et al. (1989). "Interleukin 1 inhibits contraction of vascular smooth muscle." J Clin Invest **83**(1): 331-5.
- Bernard, G. R., A. Artigas, et al. (1994). "The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination." Am J Respir Crit Care Med **149**(3 Pt 1): 818-24.
- Bone, R. C. (1996). "Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation." Crit Care Med **24**(1): 163-72.
- Broadus, V. C., A. M. Boylan, et al. (1994). "Neutralization of IL-8 inhibits neutrophil influx in a rabbit model of endotoxin-induced pleurisy." J Immunol **152**(6): 2960-7.
- Broughton, G., 2nd, J. E. Janis, et al. (2006). "The basic science of wound healing." Plast Reconstr Surg **117**(7 Suppl): 12S-34S.
- Brun-Buisson, C., C. Minelli, et al. (2004). "Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study." Intensive Care Med **30**(1): 51-61.
- Burke, J. F., R. R. Wolfe, et al. (1979). "Glucose requirements following burn injury. Parameters of optimal glucose infusion and possible hepatic and respiratory abnormalities following excessive glucose intake." Ann Surg **190**(3): 274-85.
- Camandola, S., G. Leonarduzzi, et al. (1996). "Nuclear factor kB is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid." Biochem Biophys Res Commun **229**(2): 643-7.
- Casaer, M. P., D. Mesotten, et al. (2011). "Early versus late parenteral nutrition in critically ill adults." N Engl J Med **365**(6): 506-17.
- Chen, G. and D. V. Goeddel (2002). "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway." Science **296**(5573): 1634-5.
- Christman, B. W., P. L. Lefferts, et al. (1990). "Effect of platelet-activating factor receptor antagonism on endotoxin-induced lung dysfunction in awake sheep." Am Rev Respir Dis **142**(6 Pt 1): 1272-8.

- Das, U. N. (2006). "Essential Fatty acids - a review." Curr Pharm Biotechnol **7**(6): 467-82.
- Dawes, R. F., G. T. Royle, et al. (1986). "Metabolic studies of a lipid emulsion containing medium-chain triglyceride in perioperative and total parenteral nutrition infusions." World J Surg **10**(1): 38-46.
- Denys, A., A. Hichami, et al. (2005). "n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C-alpha and -epsilon and the NF-kappaB signaling pathway." J Lipid Res **46**(4): 752-8.
- Doig, G. S., F. Simpson, et al. (2013). "Early parenteral nutrition in critically ill patients with short-term relative contraindications to early enteral nutrition: a randomized controlled trial." Jama **309**(20): 2130-8.
- Dudrick, S. J. (2003). "Early developments and clinical applications of total parenteral nutrition." JPEN J Parenter Enteral Nutr **27**(4): 291-9.
- Engelberts, I., A. Moller, et al. (1992). "Administration of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) inhibitors after exposure to TNF alpha prevents development of the maximal biological effect: an argument for clinical treatment with TNF alpha inhibitors." J Surg Res **53**(5): 510-4.
- Esteban, A., A. Anzueto, et al. (2002). "Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study." Jama **287**(3): 345-55.
- Felbinger, T. W., M. A. Weigand, et al. (2012). "Supplementation in acute lung injury." Jama **307**(2): 144; author reply 145-6.
- Gadek, J. E., S. J. DeMichele, et al. (1999). "Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. Enteral Nutrition in ARDS Study Group." Crit Care Med **27**(8): 1409-20.
- Gitter, A. H., K. Bendfeldt, et al. (2000). "Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis." Faseb J **14**(12): 1749-53.
- Gomez, I., N. Foudi, et al. (2013). "The role of prostaglandin E2 in human vascular inflammation." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **89**(2-3): 55-63.
- Gramlich, L., K. Kichian, et al. (2004). "Does enteral nutrition compared to parenteral nutrition result in better outcomes in critically ill adult patients? A systematic review of the literature." Nutrition **20**(10): 843-8.
- Grau, T., J. C. Ruiz de Adana, et al. (2003). "[Randomized study of two different fat emulsions in total parenteral nutrition of malnourished surgical patients; effect of infectious morbidity and mortality]." Nutr Hosp **18**(3): 159-66.
- Greenberger, N. J. and T. G. Skillman (1969). "Medium-chain triglycerides." N Engl J Med **280**(19): 1045-58.
- Grimminger, F., D. Fuhrer, et al. (1993). "Influence of intravenous n-3 lipid supplementation on fatty acid profiles and lipid mediator generation in a patient with severe ulcerative colitis." Eur J Clin Invest **23**(11): 706-15.
- Grimminger, F., H. Wahn, et al. (1995). "Differential influence of arachidonic vs. eicosapentaenoic acid on experimental pulmonary hypertension." Am J Physiol **268**(6 Pt 2): H2252-9.
- Hecker, M., T. Felbinger, et al. (2012). "[Nutrition in intensive care medicine]." Anaesthesist **61**(6): 553-64.
- Hecker, M., T. W. Felbinger, et al. (2013). "[Nutrition and acute respiratory failure]." Med Klin Intensivmed Notfmed **108**(5): 379-83.
- Hecker, M., W. Seeger, et al. (2012). "[The Berlin Definition: novel criteria and classification of ARDS]." Med Klin Intensivmed Notfmed **107**(6): 488-90.
- Hecker, M., H. D. Walmrath, et al. (2008). "Clinical Aspects of Acute Lung Insufficiency (ALI/TRALI)." Transfus Med Hemother **35**(2): 80-88.
- Heller, A. R., S. Rosslar, et al. (2006). "Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome." Crit Care Med **34**(4): 972-9.

- Hermann, C., I. Spreitzer, et al. (2002). "Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species--role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release." Eur J Immunol **32**(2): 541-51.
- Heyland, D. K., R. Dhaliwal, et al. (2005). "Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient." Intensive Care Med **31**(3): 327-37.
- Holtzman, M. J. (1991). "Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease." Am Rev Respir Dis **143**(1): 188-203.
- Hudson, L. D., J. A. Milberg, et al. (1995). "Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome." Am J Respir Crit Care Med **151**(2 Pt 1): 293-301.
- Ishii, S., T. Nagase, et al. (1997). "Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor." Embo J **16**(1): 133-42.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "TLR signaling." Cell Death Differ **13**(5): 816-25.
- King, L. S., M. Fukushima, et al. (1991). "Pulmonary vascular effects of prostaglandin D2, but not its systemic vascular or airway effects, are mediated through thromboxane receptor activation." Circ Res **68**(2): 352-8.
- Koletzko, B., Jauch KW, Krohn K (2007). "Leitlinie parenterale Ernährung der DGEM." Aktuel Ernährungsmed(32): 89-92.
- Konstantopoulos, K. and L. V. McIntire (1996). "Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion." J Clin Invest **98**(12): 2661-5.
- Kreymann, K. G., M. M. Berger, et al. (2006). "ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Intensive care." Clin Nutr **25**(2): 210-23.
- Lekka, M. E., S. Liokatis, et al. (2004). "The impact of intravenous fat emulsion administration in acute lung injury." Am J Respir Crit Care Med **169**(5): 638-44.
- Liao, Z., J. Dong, et al. (2012). "Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPARgamma/NF-kappaB pathway." Respir Res **13**: 110.
- Löffler, G. and P. E. Petrides (2003). Biochemie und Pathobiochemie, siebte völlig neu bearbeitete Auflage. Heidelberg, Springer Medizin Verlag
- Lorant, D. E., K. D. Patel, et al. (1991). "Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils." J Cell Biol **115**(1): 223-34.
- Luscinskas, F. W., H. Ding, et al. (1996). "L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro." J Immunol **157**(1): 326-35.
- Matthay, M. A. and G. A. Zimmerman (2005). "Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management." Am J Respir Cell Mol Biol **33**(4): 319-27.
- Matute-Bello, G., C. W. Frevert, et al. (2008). "Animal models of acute lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **295**(3): L379-99.
- Mayer, K., S. Gokorsch, et al. (2003). "Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis." Am J Respir Crit Care Med **167**(10): 1321-8.
- Mayer, K., A. Kiessling, et al. (2009). "Acute lung injury is reduced in fat-1 mice endogenously synthesizing n-3 fatty acids." Am J Respir Crit Care Med **179**(6): 474-83.
- Mayer, K., M. Merfels, et al. (2002). "Omega-3 fatty acids suppress monocyte adhesion to human endothelial cells: role of endothelial PAF generation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(2): H811-8.
- Mayer, K. and W. Seeger (2008). "Fish oil in critical illness." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **11**(2): 121-7.
- McClave, S. A., R. G. Martindale, et al. (2009). "Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.)." JPEN J Parenter Enteral Nutr **33**(3): 277-316.

- Modelska, K., J. F. Pittet, et al. (1999). "Acid-induced lung injury. Protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits." Am J Respir Crit Care Med **160**(5 Pt 1): 1450-6.
- Mohler, K. M., P. R. Sleath, et al. (1994). "Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing." Nature **370**(6486): 218-20.
- Mollnes, T. E., D. Christiansen, et al. (2008). "Hypothesis: combined inhibition of complement and CD14 as treatment regimen to attenuate the inflammatory response." Adv Exp Med Biol **632**: 253-63.
- O'Dea, K. P., A. J. Young, et al. (2005). "Lung-margined monocytes modulate pulmonary microvascular injury during early endotoxemia." Am J Respir Crit Care Med **172**(9): 1119-27.
- Okamura, N. and R. Nakaya (1977). "Rough mutant of Shigella flexneri 2a that penetrates tissue culture cells but does not evoke keratoconjunctivitis in guinea pigs." Infect Immun **17**(1): 4-8.
- Palluy, O., L. Morliere, et al. (1992). "Hypoxia/reoxygenation stimulates endothelium to promote neutrophil adhesion." Free Radic Biol Med **13**(1): 21-30.
- Parker, J. C. and M. I. Townsley (2004). "Evaluation of lung injury in rats and mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(2): L231-46.
- Patarroyo, M. (1994). "Adhesion molecules mediating recruitment of monocytes to inflamed tissue." Immunobiology **191**(4-5): 474-7.
- Pellegrini, J. D., J. C. Puyana, et al. (1996). "A membrane TNF-alpha/TNFR ratio correlates to MODS score and mortality." Shock **6**(6): 389-96.
- Pontes-Arruda, A., L. F. Martins, et al. (2011). "Enteral nutrition with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid and antioxidants in the early treatment of sepsis: results from a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, controlled study: the INTERSEPT study." Crit Care **15**(3): R144.
- Poynter, M. E., C. G. Irvin, et al. (2003). "A prominent role for airway epithelial NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-induced airway inflammation." J Immunol **170**(12): 6257-65.
- Prescott, S. M., G. A. Zimmerman, et al. (1990). "Platelet-activating factor." J Biol Chem **265**(29): 17381-4.
- Prescott, S. M., G. A. Zimmerman, et al. (2000). "Platelet-activating factor and related lipid mediators." Annu Rev Biochem **69**: 419-45.
- Ranieri, V. M., G. D. Rubenfeld, et al. (2012). "Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition." Jama **307**(23): 2526-33.
- Rice, T. W., A. P. Wheeler, et al. (2011). "Enteral omega-3 fatty acid, gamma-linolenic acid, and antioxidant supplementation in acute lung injury." Jama **306**(14): 1574-81.
- Rice, T. W., A. P. Wheeler, et al. (2012). "Initial trophic vs full enteral feeding in patients with acute lung injury: the EDEN randomized trial." Jama **307**(8): 795-803.
- Rietschel, E. T., H. Brade, et al. (1987). "Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity." Prog Clin Biol Res **231**: 25-53.
- Rooney, S. A., S. L. Young, et al. (1994). "Molecular and cellular processing of lung surfactant." Faseb J **8**(12): 957-67.
- Rotundo, R. F., T. M. Curtis, et al. (2002). "TNF-alpha disruption of lung endothelial integrity: reduced integrin mediated adhesion to fibronectin." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(2): L316-29.
- Schaefer, M. B., A. Wenzel, et al. (2008). "Fatty acids differentially influence phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in endothelial cells: impact on adhesion and apoptosis." Atherosclerosis **197**(2): 630-7.
- Schumann, R. R. (1992). "Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review." Res Immunol **143**(1): 11-5.

- Seeger, W., M. Bauer, et al. (1984). "Staphylococcal alpha-toxin elicits hypertension in isolated rabbit lungs. Evidence for thromboxane formation and the role of extracellular calcium." J Clin Invest **74**(3): 849-58.
- Seeger, W. and H. G. Lasch (1987). "Septic lung." Rev Infect Dis **9 Suppl 5**: S570-9.
- Seeger, W. and N. Suttorp (1987). "Role of membrane lipids in the pulmonary vascular abnormalities caused by bacterial toxins." Am Rev Respir Dis **136**(2): 462-6.
- Seki, H., K. Fukunaga, et al. "The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury." J Immunol **184**(2): 836-43.
- Serhan, C. N., N. Chiang, et al. (2008). "Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators." Nat Rev Immunol **8**(5): 349-61.
- Serhan, C. N., C. B. Clish, et al. (2000). "Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing." J Exp Med **192**(8): 1197-204.
- Serhan, C. N., K. Gotlinger, et al. (2004). "Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis." Prostaglandins Other Lipid Mediat **73**(3-4): 155-72.
- Serhan, C. N., S. Hong, et al. (2002). "Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals." J Exp Med **196**(8): 1025-37.
- Singer, P., M. M. Berger, et al. (2009). "ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: intensive care." Clin Nutr **28**(4): 387-400.
- Singer, P., H. Shapiro, et al. (2008). "Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective." Intensive Care Med **34**(9): 1580-92.
- Smith, D. F., T. L. Deem, et al. (2006). "Leukocyte phosphoinositide-3 kinase {gamma} is required for chemokine-induced, sustained adhesion under flow in vivo." J Leukoc Biol **80**(6): 1491-9.
- Sperling, R. I., A. I. Benincaso, et al. (1993). "Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils." J Clin Invest **91**(2): 651-60.
- Stachowska, E., B. Dolegowska, et al. (2009). "Prostaglandin E2 (PGE2) and thromboxane A2 (TXA2) synthesis is regulated by conjugated linoleic acids (CLA) in human macrophages." J Physiol Pharmacol **60**(1): 77-85.
- Stapleton, R. D., T. R. Martin, et al. (2011). "A phase II randomized placebo-controlled trial of omega-3 fatty acids for the treatment of acute lung injury." Crit Care Med **39**(7): 1655-62.
- Strobel, C., G. Jahreis, et al. (2012). "Survey of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in fish and fish products." Lipids Health Dis **11**: 144.
- Szarka, R. J., N. Wang, et al. (1997). "A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation." J Immunol Methods **202**(1): 49-57.
- Tedder, T. F., D. A. Steeber, et al. (1995). "The selectins: vascular adhesion molecules." Faseb J **9**(10): 866-73.
- Tonks, A. J., A. Tonks, et al. (2003). "Regulation of platelet-activating factor synthesis in human monocytes by dipalmitoyl phosphatidylcholine." J Leukoc Biol **74**(1): 95-101.
- van Buul, J. D. and P. L. Hordijk (2004). "Signaling in leukocyte transendothelial migration." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(5): 824-33.
- Verbrugge, S. J., V. Sorm, et al. (1997). "Mechanisms of acute respiratory distress syndrome: role of surfactant changes and mechanical ventilation." J Physiol Pharmacol **48**(4): 537-57.
- Versleijen, M., H. Roelofs, et al. (2005). "Parenteral lipids modulate leukocyte phenotypes in whole blood, depending on their fatty acid composition." Clin Nutr **24**(5): 822-9.

- Villet, S., R. L. Chioloro, et al. (2005). "Negative impact of hypocaloric feeding and energy balance on clinical outcome in ICU patients." Clin Nutr **24**(4): 502-9.
- Vincent, J. L. and D. Bihari (1992). "Sepsis, severe sepsis or sepsis syndrome: need for clarification." Intensive Care Med **18**(5): 255-7.
- Walmrath, D., H. A. Ghofrani, et al. (1996). "Synergism of alveolar endotoxin "priming" and intravascular exotoxin challenge in lung injury." Am J Respir Crit Care Med **154**(2 Pt 1): 460-8.
- Walmrath, D., M. Scharmann, et al. (1993). "Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs." J Appl Physiol **74**(4): 1972-80.
- Wang, X., W. Li, et al. (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." JPEN J Parenter Enteral Nutr **32**(3): 236-41.
- Wanten, G. J. and P. C. Calder (2007). "Immune modulation by parenteral lipid emulsions." Am J Clin Nutr **85**(5): 1171-84.
- Wanten, G. J., T. B. Geijtenbeek, et al. (2000). "Medium-chain, triglyceride-containing lipid emulsions increase human neutrophil beta2 integrin expression, adhesion, and degranulation." JPEN J Parenter Enteral Nutr **24**(4): 228-33.
- Weber, C., W. Erl, et al. (1995). "Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(5): 622-8.
- Weyrich, A. S., T. M. McIntyre, et al. (1995). "Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation." J Clin Invest **95**(5): 2297-303.
- Wicklmayr, M., K. Rett, et al. (1988). "Comparison of metabolic clearance rates of MCT/LCT and LCT emulsions in diabetics." JPEN J Parenter Enteral Nutr **12**(1): 68-71.
- Wolpe, S. D., B. Sherry, et al. (1989). "Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(2): 612-6.
- Wright, S. D., R. A. Ramos, et al. (1990). "CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein." Science **249**(4975): 1431-3.
- Xie, W., H. Wang, et al. (2013). "Resolvin D1 reduces deterioration of tight junction proteins by upregulating HO-1 in LPS-induced mice." Lab Invest **93**(9): 991-1000.
- Yipp, B. G., G. Andonegui, et al. (2002). "Profound differences in leukocyte-endothelial cell responses to lipopolysaccharide versus lipoteichoic acid." J Immunol **168**(9): 4650-8.
- Zimmerman, G. A., T. M. McIntyre, et al. (1997). "Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions." J Clin Invest **100**(11 Suppl): S3-5.
- Zimmerman, G. A., T. M. McIntyre, et al. (2002). "The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis." Crit Care Med **30**(5 Suppl): S294-301.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder ich habe diese nachstehend spezifiziert.

Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Seeger für die Möglichkeit, in seiner Klinik diese Arbeit anfertigen zu dürfen.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Professor Dr. Konstantin Mayer, der mir dieses Thema angeboten und mich während der Durchführung der Versuche, der Auswertung und im Verfassen der Dissertation vorbildlich unterstützt und motiviert hat.

Frau Dr. Juliane Ott war von Anfang an eine kompetente Ansprechpartnerin und eine ausgezeichnete Betreuerin, die mich praktisch in der Durchführung meiner Versuche angeleitet und fortlaufend im Labor hervorragend betreut hat.

Dr. Matthias Hecker hat mich geduldig in der wissenschaftlichen Einordnung meiner Arbeit unterstützt und stand mir mit praktischen Anregungen und konstruktiver Kritik jederzeit zur Verfügung.

Das gesamte Team der AG Mayer hat mich stets in der Durchführung meiner Versuche unterstützt und ausgesprochen kollegial mit mir zusammengearbeitet. Namentlich seien hier dankend Andrea Mohr, Juliane Mest, Britta Bausch und meine Mitdoktoranden Almuth Kiessling, Steffen Noack und Lukas Tomczyk erwähnt.

Auch das Team von Professor Dr. Lohmeyer und Herr PD Dr. Martin Obert standen mir gerne hilfreich zur Seite.

Außerhalb der Universitätsklinik gebührt mein besonderer Dank Professor Dr. Rainer Burghard, meinem klinischen Lehrer, der mich ausdrücklich und wiederholt auf den hohen Stellenwert wissenschaftlicher Arbeit hinwies.

Sehr gerne möchte ich meinen Eltern Waltraud und Rudolf Sondermann danken, die immer für mich da sind und mir das Studium der Humanmedizin ermöglichen.

Zum Schluss danke ich meiner Frau Henriette, die mir immer zur Seite stand und mir manchmal auch ein wenig Antrieb gab, wenn es erforderlich war.

Tabellarischer Lebenslauf

Name: Christoph Sondermann