

**Experimentelle Untersuchungen zum Einfluß von
Entzündung und ω -3- versus ω -6-Fettsäuren
auf die Fettsäurezusammensetzung der Membranphospholipide und
die Lipid-abhängige Signaltransduktion:
Modulation des essentiellen Fettsäuremangel-Syndroms (EFAD)
durch freie Fettsäuren.**

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

vorgelegt von
Tina Steiner
Geburtsname: Bögeholz
aus Bielefeld

Gießen 2007

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik II

der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. med. Veronika Grau

Betreuer: Dr. med. Konstantin Mayer

Tag der Disputation: 31.07.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Vorwort	1
2	Einleitung	2
2.1	Fettsäuren	2
2.1.1	Die Synthese der essentiellen Fettsäuren.....	3
2.2	Eikosanoide	5
2.2.1	Die Synthese der Eikosanoide.....	5
2.2.2	Nomenklatur der Eikosanoide.....	7
2.2.3	ω -3-Fettsäuren als Präkursor für Eikosanoide	7
2.2.4	Die Wirkungsweise der Eikosanoide.....	9
2.3	Das Syndrom des essentiellen Fettsäuremangels	9
2.4	Studien im Rahmen der Fettsäureforschung	11
2.4.1	ω -3-Fettsäuren und Gefäßerkrankungen	11
2.4.2	ω -3-Fettsäuren und Autoimmunerkrankungen	12
2.4.3	ω -3-Fettsäuren und chronische Darmerkrankungen	13
2.4.4	ω -3-Fettsäuren und Transplantationsmedizin	14
2.4.5	ω -3-Fettsäure-Studien mit gesunden Probanden.....	14
2.4.6	ω -3-Fettsäuren und Sepsis	15
2.4.7	Sepsis und Immunonutrition	15
2.4.8	Sepsis als Fokus dieser Arbeit	16
2.5	Definitionen von SIRS und Sepsis.....	16
2.5.1	Das septische Geschehen	17
2.5.2	Septischer Schock, CARS und MOF	19
2.5.3	Gerinnung und Sepsis.....	20
2.5.4	Die Rolle von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α und Thrombin im Sepsis- Geschehen.....	20
2.5.5	Thrombin	21
2.5.6	Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)	22
2.5.7	Die Rolle des Endothels in der Sepsis.....	22
2.6	Endothel und Fettsäuren: Signaltransduktion und Phospholipide	23
2.7	Fragestellung	25

3	Materialien	26
3.1	Materialien und Lösungen für die Endothelzellisolierung und –Kultivierung....	26
3.2	Geräte und Verbrauchsmaterial für die Endothelzellisolierung und –Kultivierung	28
3.3	Materialien und Lösungen für die PI-Response	28
3.4	Geräte und Verbrauchsmaterial für die PI-Response.....	29
3.5	Materialien und Geräte zur gaschromatographischen Analyse	29
3.6	Materialien und Geräte für die RP-HPLC.....	30
4	Methoden.....	31
4.1	Isolierung von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen	31
4.2	Analyse der Phospholipidklassen in Endothelzellen mittels Gaschromatographie	32
4.2.1	Inkubation der Endothelzellen mit den Fettsäuren.....	32
4.2.2	Probenaufbereitung	33
4.2.3	Lipidextraktion nach Bligh and Dyer	33
4.2.4	Herstellung des Diazomethan in Diethylether	34
4.2.5	Methylierung der freien Fettsäuren mit Diazomethan.....	34
4.2.6	Herstellung des Methylierungsreagenzes (2N HCl in Methanol).....	35
4.2.7	Transmethylierung der Phospholipid-gebundenen Fettsäuren mit 2N HCl in Methanol	35
4.2.8	Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phospholipidklassen .	35
4.3	Gaschromatographische Auftrennung der Fettsäuren.....	36
4.3.1	Prinzip der Gaschromatographie.....	36
4.3.2	Apparativer Aufbau	37
4.3.3	Auswertung und Validierung	38
4.4	Analytik der Inositolphosphate, „PI-Response“	40
4.4.1	Prinzip der Meßmethode.....	40
4.4.2	Versuchsablauf und Extraktion der Inositolphosphate.....	40
4.4.3	Anionenaustausch-Chromatographie	41
4.4.4	Statistik	41
5	Ergebnisse	42

5.1 Übersicht	42
5.2 Gliederung der Ergebnisse	42
5.3 Kinetik der Aufnahme von freien Fettsäuren bei Endothelzellen	43
5.4 Gesamphospholipide, prozentuale Verteilung der Phospholipide.....	43
5.4.1 Das Profil der Fettsäuren in den Gesamt-Phospholipiden.....	44
5.4.2 Das Profil der Fettsäuren in Phosphatidylcholin.....	50
5.4.3 Das Profil der Fettsäuren in Phosphatidylethanolamin	55
5.4.4 Das Profil der Fettsäuren in Phosphatidylinositol.....	60
5.4.5 Das Profil der Fettsäuren in Phosphatidylserin.....	65
5.4.6 Das Profil der Fettsäuren in Sphingomyelin.....	67
5.5 PI-Response.....	68
6 Diskussion	73
6.1 Diskussion der Ergebnisse.....	73
6.1.1 Die Phospholipid-Zusammensetzung der Endothelzellen	73
6.1.2 Veränderungen des Fettsäure-Pools unter Fettsäure-Supplementierung...	74
6.1.3 PI-Response	75
6.1.4 EFAD und Eikosatriensäure	76
6.1.5 Mögliche Ursachen des EFAD-Syndroms unter TNF- α	76
6.1.6 Die unterschiedlichen Affinitäten der ω -3-Fettsäuren und ihre Auswirkung auf die endothelial-leukozytäre Adhäsion	78
6.2 Perspektiven	79
7 Zusammenfassung.....	81
8 Anhang	85
8.1 Liste verwendeter Abkürzungen.....	85
8.2 Erklärung.....	87
8.3 Danksagung	88
8.4 Lebenslauf	89
9 Literaturverzeichnis.....	91

1 Vorwort

Die hier vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 1998 bis August 2000 am Zentrum für Innere Medizin im Laborbereich von Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger unter Betreuung von Herrn Dr. med. Konstantin Mayer. Die Untersuchungen wurden im Rahmen von Projekten des Sonderforschungsbereichs 547 durchgeführt und befaßten sich mit der pathophysiologischen Relevanz von essentiellen Fettsäuren im Rahmen des septischen Geschehens, wobei das besondere Augenmerk der Fettsäurezusammensetzung der Membranphospholipide sowie der zellulären Signaltransduktion galt.

2 Einleitung

2.1 Fettsäuren

Fettsäuren sind eine Reihe von Substanzen, die eine lange Kohlenwasserstoffkette und eine endständige Carboxylgruppe besitzen. Sie haben drei bedeutende physiologische Aufgaben: Erstens sind sie Bausteine von Phospholipiden und Glykolipiden, die wichtige Bestandteile biologischer Membranen darstellen. Zweitens dienen Fettsäurederivate als Hormone und intrazelluläre Signalmoleküle. Drittens sind Fettsäuren Brennstoffmoleküle, die als Triacylglycerine gespeichert werden ¹.

In dieser Arbeit wurde die Funktion der Fettsäuren als Bestandteile der Phospholipide und als Signalmoleküle untersucht.

Es existieren sowohl essentielle als auch nicht essentielle Fettsäuren. Essentielle Fettsäuren können vom menschlichen Organismus nicht selbst synthetisiert werden und müssen daher in der Nahrung bereits enthalten sein. Einige der wichtigsten Vertreter der essentiellen Fettsäuren sind die Arachidonsäure (AA), die Eikosapentaensäure (EPA) und die Dokosahexaensäure (DHA). Sie spielen bei der intra- und interzellulären Signalübertragung eine große Rolle, da sie die Ausgangssubstanzen verschiedener Botenstoffe - auch Lipidmediatoren genannt - darstellen. Diese Lipidmediatoren, die z. B. aus den drei oben genannten Fettsäuren synthetisiert werden können, werden unter dem Begriff der „Eikosanoide“ zusammengefaßt.

Arachidonsäure besteht aus 20 Kohlenstoffatomen mit 4 Doppelbindungen (C 20:4 ω -6). Bei der Benennung von Fettsäuren bedeutet „ ω “, dass die Position der Doppelbindungen ab der Methylgruppe des Moleküls gezählt wird. Die Arachidonsäure ist eine ω -6-Fettsäure, d.h. dass die erste Doppelbindung ab der Methyl-Gruppe zwischen dem sechsten und siebten Kohlenstoffatom liegt. Die nächste Doppelbindung ist dann wieder drei Kohlenstoffatome weiter zu finden.

Bei der Eikosapentaensäure (EPA) und der Dokosahexaensäure (DHA) ist der Aufbau ähnlich. Sie zählen zu den ω -3-Fettsäuren, da sich die erste Doppelbindung zwischen dem dritten und vierten Kohlenstoffatom befindet. Die Eikosapentaensäure besitzt fünf Doppelbindungen (C 20:5 ω -3), die Dokosahexaensäure wiederum hat sechs Doppelbindungen (C 22:6 ω -3) ².

2.1.1 Die Synthese der essentiellen Fettsäuren

Zum Verständnis der Funktion der essentiellen Fettsäuren sind deren Synthese und die Bildung der aus ihnen generierten Produkte von Bedeutung.

Am Anfang der Fettsäuresynthese steht die Bildung von Acetyl-Coenzym A aus Acetat und Coenzym A. Über mehrere Syntheseschritte entsteht schließlich das Endprodukt der Fettsäuresynthese, die 16:0-Palmitinsäure, die zu 18:0-Stearinsäure elongiert werden kann (**Abb. 2.1**). Das Enzym δ -9-Desaturase kann 18:0-Stearinsäure in Ölsäure (18:1 ω -9) umwandeln, wobei dieses Enzym sowohl bei Pflanzen als auch bei Tieren vorhanden ist. Im Gegensatz dazu haben nur Pflanzen die δ -12-Desaturase, die in der Lage ist, Ölsäure (18:1 ω -9) zu Linolsäure (18:2 ω -6) zu konvertieren. Pflanzen besitzen zudem die δ -15-Desaturase, die Linolsäure (18:2 ω -6) zu Linolensäure (18:3 ω -3) umwandeln kann. Besonders Meeresalgen benutzen die δ -15-Desaturase, um ω -3-Fettsäuren zu synthetisieren. Da sie Kaltwasserfischen als Nahrungsgrundlage dienen, besitzen diese einen hohen Anteil an ω -3-Fettsäuren. Menschen sind nicht in der Lage, Linol- oder Linolensäure selbst zu bilden, deshalb sind sie darauf angewiesen, sie mit der Nahrung aufzunehmen. Beide Fettsäuren sind so für Menschen essentiell. Dabei ist die Linolsäure (18:2 ω -6) „*precursor*“, d. h. die Vorstufe für weitere ω -6-Fettsäuren. Hier ist Arachidonsäure die Leitsubstanz. Entsprechend ist die Linolensäure (18:2 ω -3) „*precursor*“ für ω -3-Fettsäuren, hauptsächlich für Eikosapentaensäure und Dokosaheptaensäure³.

In unserer für westliche Industrieländer typischen Ernährung ist überwiegend die ω -6-Fettsäure Arachidonsäure zu finden. ω -3-Fettsäuren sind jedoch in nur geringen Mengen in unserer Nahrung und somit in unserem Körper vorhanden. Ein extremes Beispiel für fast ausschließliche Ernährung mit ω -3-Fettsäuren sind die Inuit in Grönland, da ihre Nahrung zu einem großen Anteil aus variantenreichen Fischgerichten besteht.

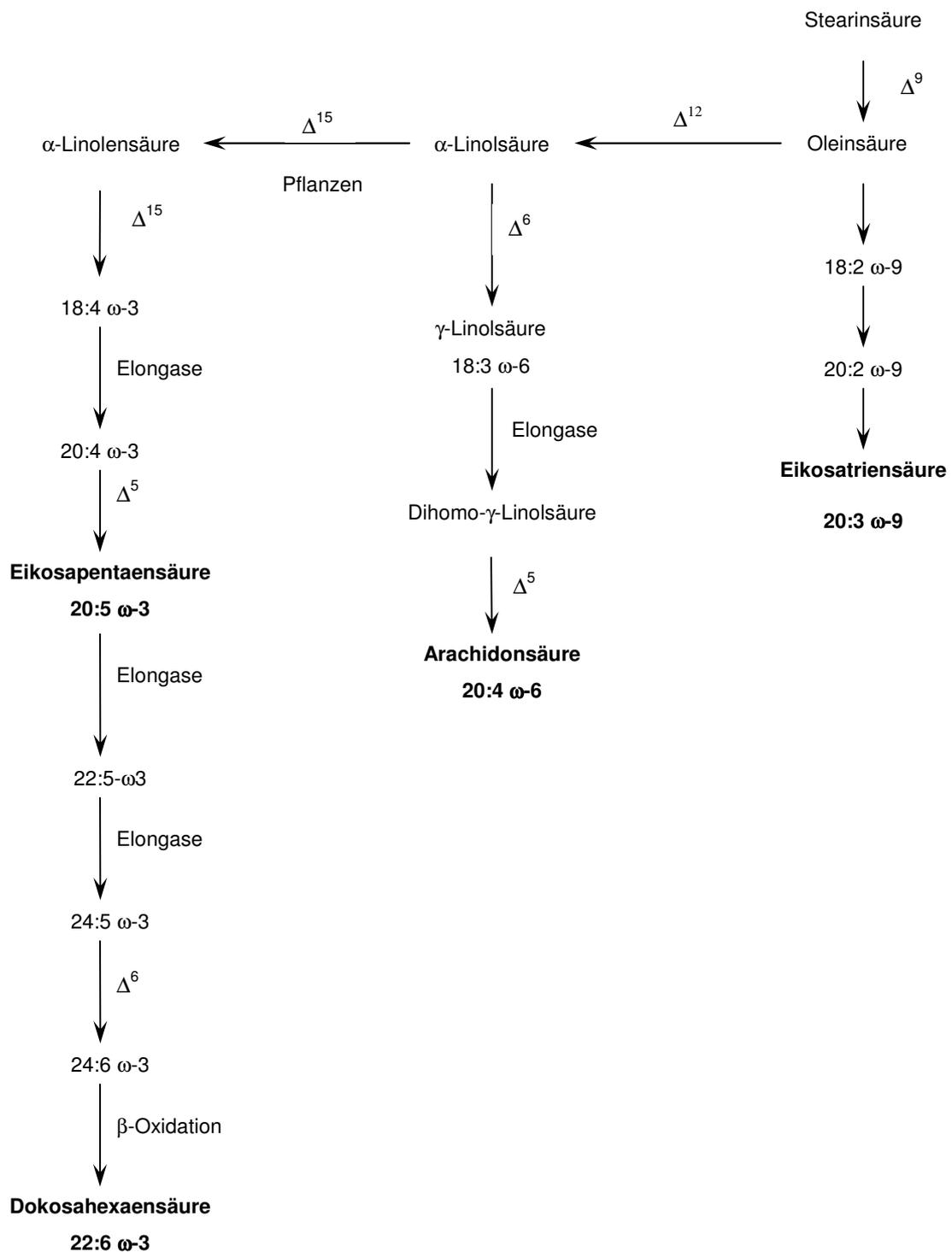


Abb. 2.1: Die Synthesewege der einzelnen Fettsäuren, besonders hervorgehoben Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA) und Eikosatriensäure (ω -9). Für die Synthese der Fettsäuren sind Elongation und Desaturation verantwortlich, wobei die Enzyme Δ^{12} (δ -12-Desaturase) und Δ^{15} (δ -15-Desaturase) nur in Pflanzen vorkommen. Δ^9 (δ -9-Desaturase), Δ^6 (δ -6-Desaturase), Δ^5 (δ -5-Desaturase).

2.2 Eikosanoide

2.2.1 *Die Synthese der Eikosanoide*

Die Eikosanoide gehören zu den wichtigen Mediatoren des Entzündungsgeschehens. Die von der Arachidonsäure abstammenden Eikosanoide modulieren die Produktion von pro-inflammatorischen und immunoregulatorischen Zytokinen. Die Überproduktion dieser Lipidmediatoren ist vergesellschaftet mit dem septischen Schock und chronisch entzündlichen Krankheiten.

Ein weiterer Mediator ist der Plättchen-aktivierende-Faktor (PAF), ein 1-O-alkyl-2-acetyl-glycero-3-phosphorylcholin, dessen Ether-gebundene Alkylgruppe einen 16- oder 18- kohlenstoffgesättigten Terminus hat.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur die Eikosanoide, die Produkte der ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure, Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure sind, betrachtet. Ausgangssubstanz für die Eikosanoid-Bildung ist im Allgemeinen die Arachidonsäure. Sie kann über verschiedene Enzymsysteme verstoffwechselt werden.

Nach dem Enzym, das die erste Oxygenation der Arachidonsäure einleitet, unterscheidet man die Klassen der Cyclooxygenase-, Lipoxigenase- und Cytochrom P450-Produkte. Durch die Lipoxigenase entstehen Leukotriene, Lipoxine, Hydroperoxyeikosatetraensäuren (HPETEs) und Hydroxyeikosatetraensäuren (HETEs). Die Cyclooxygenase produziert Prostaglandine und Thromboxane. Durch die Cytochrom P450-Oxidase, dem dritten Enzym mit geringerem Stellenwert, werden Epoxy- und Hydroxy-Eikosatetraensäuren (EETs) gebildet.

Der erste Schritt zur Synthese der Eikosanoide ist die Freisetzung von Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Zellmembran. Diese ist möglich über drei verschiedene Wege:

1. Die Phospholipase A2 katalysiert die Hydrolyse eines Phosphoglycerids an der sn-2-Position, die Produkte sind Arachidonsäure und ein 1-Acylphosphoglycerid.
2. Die Phospholipase C hydrolysiert eine Glycerylphosphat-Bindung eines Phosphoglycerides und produziert somit phosphorylierte Basen (Cholin, Serin, Ethanolamin oder Inositol) sowie Diacylglycerol. Letzteres kann als Substrat der

Diglycerid-Lipase und anschließend der Monoglycerid-Lipase dienen, um Arachidonsäure freizusetzen.

3. Die Phospholipase D konvertiert Phosphatidylethanolamin (PE) oder Phosphatidylcholin (PC) zu Phosphatidsäure und einer freien Base. Phosphatidylethanolamin kann wie Diacylglycerol verwendet werden, um Arachidonsäure freizusetzen.

Der nächste Schritt in der Eikosanoid-Produktion ist der Einbau eines Sauerstoffmoleküls in die polydesaturierte Fettsäure, entweder durch die Cyclo- oder die Lipoxygenase:

Cyclooxygenase (COX):

Im Falle der Cyclooxygenase entsteht durch eine Bis-Dioxygenierung das Endoperoxid Prostaglandin H_2 (PGH_2), wobei die Bildung über die Zwischenstufe des Prostaglandins G_2 (PGG_2) erfolgt. Dieses nimmt eine zentrale Stellung in der Prostaglandin-Synthese ein, da die weiteren Prostaglandine sowie die Thromboxane mittels verschiedener Isomerasen, Reduktasen und Synthasen aus ihm metabolisiert werden. Dabei kommt es auf den Aktivierungszustand und die Enzymausstattung einer Zelle an, in welchem Ausmaß diese Enzyme exprimiert und aktiviert werden.

Es existieren zwei Isoformen der COX. Die COX-1 ist immer exprimiert, während die COX-2 nur durch Zytokine induzierbar und ca. sechs Stunden nach Aktivierung zu finden ist ⁴.

Lipoxygenase (LO):

Wird die Arachidonsäure von einer der verschiedenen Lipoxygenasen metabolisiert, dann entsteht als erstes die instabile Hydro-Peroxy-Eikosatetraensäure (HPETE), wobei je nach Position des durch die Lipoxygenase eingefügten Sauerstoffmoleküls 5-, 8-, 9-, 11-, 12- oder 15-HPETE entsteht. Durch Hydroxyperoxidasen können sie in die entsprechenden Hydroxy-Eikosatetraensäuren (HETE) umgewandelt werden. Leukotriene können durch eine Dehydrierung der 5-HPETE entstehen, dabei bildet sich insbesondere das instabile Epoxid Leukotrien A_4 (LTA_4). Leukotrien A_4 hat eine sehr kurze Halbwertszeit und zerfällt spontan in die inaktiven Diastereomeren-Paare 6-trans- LTB_4 und 5,6-DiHETE. Diese Reaktion kann auch mittels einer Epoxid-Hydrolase katalysiert werden. Das Leukotrien C_4 entsteht durch Katalyse der Glutathion-S-Transferase aus

LTA₄. Die Leukotriene D₄ und E₄ werden aus dem LTC₄ mittels γ -Glutamyl-Transpeptidase und Dipeptidase gebildet.

2.2.2 Nomenklatur der Eikosanoide

Wenn Arachidonsäure über den Cyclooxygenase-Weg metabolisiert wird, haben die Endprodukte zwei Doppelbindungen, weshalb sie auch bisenoische Prostanoiden heißen. In der verkürzten Schreibweise wird dies durch eine „2“ am Ende gekennzeichnet. Monoenoische Prostanoiden werden aus der Dihomo- γ -Linolensäure gebildet (Kennzeichnung „1“).

Arachidonsäure-Produkte, die durch die 5-Lipoxygenase gebildet werden, sind durch eine „4“ kenntlich gemacht.

2.2.3 ω 3-Fettsäuren als Präkursor für Eikosanoide

Steht Eikosapentaensäure als Präkursor für die Eikosanoidbildung zur Verfügung, so durchläuft sie die gleichen Syntheseschritte wie die Arachidonsäure, allerdings sind die Produkte unterschiedlich in Struktur und Wirkung. Die aus der Eikosapentaensäure entstandenen trienoischen Prostanoiden werden mit einer „3“ bezeichnet. Statt Leukotrienen der 4er-Reihe entstehen Leukotriene der 5er-Reihe, wie beispielsweise LTB₅.

Die 1- und 2-Serien-Prostanoiden haben die gleiche biologische Aktivität, während die 3-Serien-Prostanoiden und die 5-Serien-Leukotriene weniger aktiv sind als die 2-Serien-Prostanoiden und die 4-Serien-Leukotriene⁵.

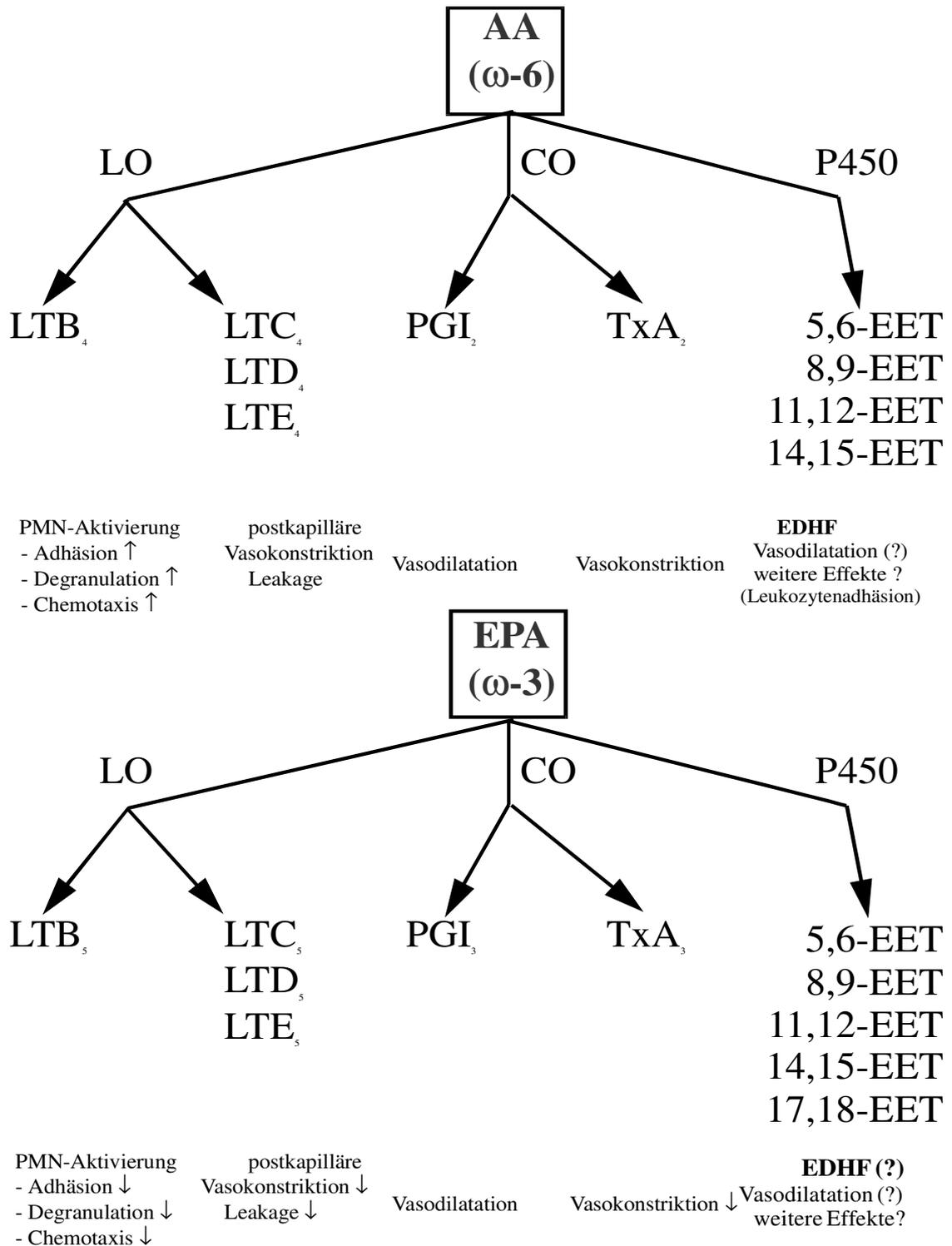


Abb. 2.2: Dargestellt ist die Synthese und Funktion von ausgewählten Lipidmediatoren, die aus Arachidonsäure (AA) und Eikosapentaensäure (EPA) entstehen. Katalysiert werden die Syntheseschritte durch die Lipoxygenase (LO), die Cyclooxygenase (CO) sowie durch das Cytochrom P 450 (P450). Leukotrien B,C,D,E (LTB, LTC, LTD, LTE), Prostaglandin I (PGI), Thromboxan A (TxA), Epoxy-Eikosatetraensäuren (EETs).

2.2.4 Die Wirkungsweise der Eikosanoide

Die aktivsten Eikosanoide sind PGA_2 , PGE_2 , PGI_2 , PGF_2 und Thromboxan A_2 . Sie haben nur eine kurze Halbwertszeit und wirken meist nur in der Nähe der Zelle, die sie produziert hat. Ihre Synthese wird durch unterschiedliche Stimuli (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Endotoxin, Zymosan, freie Sauerstoffradikale, Antigen-Antikörper-Komplexe, Bradykinin, Kollagen und Thrombin) ausgelöst.

Eikosanoide haben zum Teil eine entgegengesetzte Wirkungsweise. So wirkt Prostaglandin I_2 , ähnlich dem Prostaglandin E_2 , vasodilatatorisch und bronchorelaxierend, zudem hemmt es die Plättchen-Aggregation. Dagegen wird durch Prostaglandin F_2 , Thromboxan A_2 , Leukotrien C und Leukotrien D eine Vaso- und Bronchokonstriktion ausgelöst. In der pulmonalen Strombahn übertrifft die Vasokonstriktion durch Thromboxan A_2 die vasodilatative Wirkung des Prostaglandins (PG) I_2 . Wichtig zu erwähnen ist außerdem, dass PGI_3 als einziger Metabolit der ω -3-Fettsäuren äquipotent ist zu seinem ω -6-Fettsäure-Pendant PGI_2 ⁶. Grimminger et al. verglichen Thromboxan A_2 mit Thromboxan A_3 im Hinblick auf ihre Fähigkeit zur pulmonalen Vasokonstriktion und fanden eine um ein vielfaches potentere Wirkung des Arachidonsäure-Metaboliten im Vergleich zum Eikosapentaensäure-Derivat⁷.

Wie bereits oben erwähnt, wirken die Leukotriene C_4 , D_4 und Leukotrien B_4 vaso- und bronchokonstriktorisch, weiterhin erhöhen sie die kapilläre Permeabilität. Hier gilt, dass die Derivate der Arachidonsäure eine weitaus höhere Potenz besitzen als die der ω -3-Fettsäuren. Leukotrien B_4 wird vorwiegend von neutrophilen Granulozyten gebildet und stimuliert die Bildung von Interleukin 1 in Makrophagen. Leukotrien C_4 und D_4 dagegen werden hauptsächlich von Mastzellen und Eosinophilen synthetisiert^{8 9}.

2.3 Das Syndrom des essentiellen Fettsäuremangels

Das Syndrom des essentiellen Fettsäuremangels (Essential Fatty Acid Deficiency, EFAD) kommt in der Bevölkerung hauptsächlich im Rahmen von Malabsorptionssyndromen vor. Malabsorption bedeutet, dass der Organismus nicht in der Lage ist, die zugeführte Nahrung in ausreichender Weise enteral zu verwerten bzw. aufzunehmen. Es handelt sich dabei um Malabsorptionssyndrome im Rahmen von erfolgten Dünn- oder Dickdarmresektionen, oder bei Menschen mit Sepsis/SIRS-Syndrom, auf das später genauer eingegangen wird. Das Vollbild des essentiellen Fettsäuremangels äußert sich

in einer schuppigen Dermatitis, partiellem Haarverlust und einer Wachstumsretardierung¹⁰.

Unter dem Mangel an essentiellen Fettsäuren ändert sich die Lipidzusammensetzung der Zellen. Statt der essentiellen Fettsäuren werden ähnliche, nicht essentielle Fettsäuren, wie die Eikosatriensäure (ω -9) synthetisiert und in die Membranen eingebaut. Da diese eine unterschiedliche Anzahl an Doppelbindungen und eine andere Molekülstruktur hat als Arachidonsäure und Eikosapentaensäure, kann auch eine Strukturänderung der Lipidmembranen vermutet werden.

Ein sehr guter Indikator für das Vorhandensein des EFAD-Syndroms ist die oben genannte 5,8,11-Eikosatriensäure (ω -9). Sie ist unter normalen Bedingungen nur in kleinen Mengen in jeder Zelle vorhanden. Unter den Bedingungen des EFAD-Syndroms ist sie die häufigste Fettsäure der ungesättigten Fettsäuren, die im Gegensatz zur Arachidonsäure, Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure komplett endogen gebildet werden kann, also nicht essentiell ist¹¹. Eikosatriensäure (ω -9) wird bei Arachidonsäuremangel anstelle von dieser in Phospholipide eingebaut und ist dann bei über 80 % der Phospholipide in der sn-2-Position zu finden¹². Die Eikosanoidbildung ist während eines Fettsäuremangelsyndroms durch das Fehlen der essentiellen Fettsäuren limitiert. Der Grund dafür ist, dass die Eikosatriensäure (ω -9) kein adäquates Substrat sowohl für die Lipxygenase als auch für die Cyclooxygenase darstellt. Die Cyclooxygenase benötigt beispielsweise Doppelbindungen an den vorderen C-Atomen einer Fettsäure, um sie zu katalysieren.

Durch das Verhältnis von Eikosatriensäure (ω -9) zu Arachidonsäure kann das Ausmaß des EFAD-Status abgeschätzt werden. Dieses Verhältnis beträgt unter normalen Bedingungen ungefähr 1:5¹³.

Die Auswirkungen des EFAD-Syndroms wurden beispielsweise auch auf HepG₂-Zellen *in vitro* untersucht (Hepatozyten als Karzinomzellen). Diese wurden in Lipid-freiem Medium gezüchtet, wobei die essentiellen Fettsäuren nach zehn Tagen aufgebraucht waren¹⁴.

2.4 Studien im Rahmen der Fettsäureforschung

Nachfolgend sind Studien, die im Zusammenhang mit ω -3- und ω -6-Fettsäuren durchgeführt worden sind, dargestellt. Zunächst werden Gefäßerkrankungen und unterschiedliche Autoimmunkrankheiten, bei welchen die Therapie mit ω -3-Fettsäuren einen deutlichen Benefit gezeigt hat, erläutert. Desweiteren wird auf chronische Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn eingegangen, nachfolgend auf Studien aus der Transplantationsmedizin, die im Zusammenhang mit ω -3-Fettsäuren durchgeführt wurden. Abschließend sind Versuchsreihen, die auf den Einfluß von ω -3-Fettsäuren bei *in vivo* induzierter Sepsis eingehen, beschrieben.

2.4.1 ω -3-Fettsäuren und Gefäßerkrankungen

Es waren Dyerberg et al., welche die Bedeutung der Fettsäuren als erste erkannten und sich der Erforschung der Unterschiede zwischen ω -3- und ω -6-Fettsäuren widmeten. 1975 veröffentlichten sie eine vergleichende Studie, in der sie ein Kollektiv grönländischer Inuit mit einer Gruppe von Dänen sowie einer Gruppe von in Dänemark lebenden Inuit im Hinblick auf Thrombosen, koronare Herzkrankheiten und Myokardinfarkte untersuchten. Die Inzidenz war in allen oben genannten Erkrankungen im Kollektiv der grönländischen Inuit signifikant niedriger als in den Kontrollgruppen¹⁵. Andere Forscher haben ebenfalls positive Effekte von ω -3-Fettsäuren auf chronische Herzkrankheiten mittels zweier prospektiver Kohortenstudien feststellen können^{16 17}. Zu diesen Ergebnissen fand Middaugh auch passende histologische Korrelate in Form der sogenannten „fatty streaks“, als er Querschnitte von Arterien einer Gruppe von Inuit mit denen einer Gruppe von Dänen verglich. Die Arterien der dänischen Gruppe waren im Gegensatz zu denen der Inuit bereits durch diese Lipideinlagerungen verändert¹⁸.

In weiteren Untersuchungen konnten andere Gruppen nachweisen, dass die ω -3-Fettsäure Eikosapentaensäure die Signaltransduktion zur Bildung von PDGF (Platelet derived growth factor) in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten an mehreren Stellen inhibiert. Dadurch wird die Proliferation in der Media, der mittleren Gefäßschicht, gehemmt und somit auch der erste Schritt zur Atherosklerosebildung^{19 20}.

2.4.2 ω -3-Fettsäuren und Autoimmunerkrankungen

1980 verglichen Kronman und Green in einer Kohorten-Studie eine Gruppe grönländischer Inuit mit einer hinsichtlich Alter und Geschlecht vergleichbaren Gruppe von Dänen, im Hinblick auf das Auftreten verschiedener Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis, Asthma, Typ I-Diabetes und Multipler Sklerose. Wiederum war die Inzidenz der genannten Krankheiten bei den grönländischen Inuit sehr niedrig²¹. Die Autoren postulierten einen Zusammenhang zwischen der fischreichen Ernährung der Grönländer und dem dort seltenen Auftreten von verschiedenen Autoimmunkrankheiten, die unter anderem durch T-Zellen vermittelte inadäquate Reaktionen hervorgerufen werden.

Daraufhin wurden mehrere Interventionsstudien mit ω -3-Fettsäuren durchgeführt, um deren Einfluß auf die rheumatoide Arthritis zu untersuchen. Bei der Mehrheit der Probanden stellten sich Besserungen bei klinischen Symptomen wie Morgensteifigkeit und Gelenkschwellung ein. Zusätzlich konnte der Verbrauch an nicht-steroidalen Antiphlogistika zwar reduziert, allerdings nicht durch ω -3-Gaben substituiert werden, was deren Funktion als Adjuvans belegt^{22 23 24 25 26 27}.

Bei der Psoriasis wird ebenfalls eine autoimmunologische Genese vermutet. Dass Arachidonsäure-Metabolite bei der Ausprägung dieser Krankheit eine wichtige Rolle spielen, konnte in einer Studie durch den Nachweis eines passenden morphologischen Korrelats gezeigt werden. In der Papillarschicht der Oberhaut fand sich bei Psoriasis-Patienten eine bis zu 20-fach höhere Konzentration von Arachidonsäure-Metaboliten als bei gesunden Probanden²⁸.

Der Effekt von ω -3-Fettsäuren auf den Krankheitsverlauf ist in klinischen Studien mit Psoriasis-Patienten getestet worden. Durch die parenterale Zufuhr von ω -3-Fettsäuren (1,5 g Gesamtdosis/Proband/Tag) im Vergleich zu einem Kollektiv, das ω -6-Fettsäuren erhielt, wurde bei der Gruppe mit der Gabe von Fischöl ein deutlicher Rückgang der klinischen Symptome erzielt. Zusätzlich konnte eine Reduktion der Arachidonsäure-Metabolite zugunsten der von Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure abgeleiteten Produkte festgestellt werden²⁹.

In der Therapie des systemischen Lupus Erythematosus (SLE) hat sich herauskristallisiert, dass eine Langzeiteinnahme von ω -3-Fettsäuren über mehrere Monate oder Jahre eine deutliche klinische Besserung bewirken kann³⁰.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich die Gabe von ω -3-Fettsäuren in vielen klinischen Studien zu Autoimmunerkrankungen als adjuvante Therapie bewährt hat.

2.4.3 ω -3-Fettsäuren und chronische Darmerkrankungen

Auch bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist eine Mitbeteiligung von Lipidmediatoren und Zytokinen nachgewiesen worden ³¹. Hier zeigten die ω -3-PUFAs (polyunsaturated fatty acids oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren) im Tiermodell einen positiven Effekt, indem sie die Eikosanoid-Produktion reduzierten ³². Bei Colitis ulcerosa wurden erhöhte Werte von Prostaglandin E₂ (PGE₂) in rektalen Dialysaten und erhöhte Werte von Leukotrien B₄ (LTB₄) in Kolonresektaten gemessen. Grimminger et al. haben einer schwer an Colitis ulcerosa erkrankten Patientin ω -3-Lipide auf dem oralen und später auf dem parenteralen Weg zugeführt. Während beider Behandlungsmethoden trat eine Besserung der klinischen Symptome ein (beispielsweise die Entwicklung eines normalen Stuhlgangs), wobei die Ergebnisse der parenteralen Variante deutlich eindrucksvoller waren ³³.

Auch bei chronischen Darmerkrankungen zeigte die Zufuhr von ω -3-Fettsäuren einen deutlichen Benefit, wenn sie als Adjuvans eingesetzt wurden.

2.4.4 ω -3-Fettsäuren und Transplantationsmedizin

Aufgrund der oben aufgeführten Studien zeichnet sich ein immunsuppressiver Effekt der ω -3-Fettsäuren ab. Dieser Effekt ist in der Transplantationsmedizin gewollt, weshalb die ω -3-Fettsäuren auch für dieses Gebiet von außerordentlichem Interesse sind. In Tierexperimenten stellte sich heraus, dass mit Fischöl gefütterte Tiere nach Organtransplantationen eine längere Überlebenszeit hatten als Tiere in der Kontrollgruppe. So führten Grimminger et al. Herztransplantationen an Ratten durch. Bei der anschließenden parenteralen Ernährung mit ω -6- oder ω -3-Fettsäuren wiesen die mit ω -3-Fettsäuren substituierten Tiere eine deutlich längere Überlebenszeit der Spenderorgane auf, als die Tiere in der Kontrollgruppe³⁴.

Nierentransplantierten Patienten wurden ω -3-Fettsäuren (6 g/Tag) mit Ciclosporin A zusammen verabreicht, wobei Patienten in dieser Gruppe im ersten postoperativen Jahr eine geringere Abstoßungsrate und eine bessere Nierenfunktion hatten als Patienten, die Kokosnußöl und Ciclosporin A erhielten. Ciclosporin A gehört zur Standardtherapie nach Organtransplantationen. Da eine parenterale Therapie auf Dauer zu aufwendig ist, besteht die Möglichkeit einer dauerhaften adjuvanten diätetischen Therapie mit den mehrfach ungesättigten ω -3-Fettsäuren. ω -3-Fettsäuren reduzieren in diesem Fall die Nebenwirkungen der Dauermedikationen wie die Retinoid-induzierte Hypertriglyceridämie und die Ciclosporin-assoziierte Nephrotoxizität³⁵.

Desweiteren wurde in einer Studie mit herztransplantierten Patienten ein positiver Effekt bei der Gabe von 4 g Fischöl/Tag auf die Bluthochdruck-Prophylaxe festgestellt³⁶.

Transplantierte Patienten profitieren ebenfalls von dem immunsupprimierenden ω -3-Fettsäuren-Effekt, wobei die parenterale Gabe deutlich eindrucksvollere Ergebnisse gezeigt hat als die enterale Gabe.

2.4.5 ω -3-Fettsäure-Studien mit gesunden Probanden

Versuche mit freiwilligen Probanden, die über einen längeren Zeitraum Fischölkapseln oder Kapseln mit ω -6-Lipiden zu sich nahmen, zeigten, dass die ω -3-Fettsäuren einen immunsupprimierenden Einfluß hinsichtlich der Produktion der Zytokine Interleukin 1 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α von Monozyten haben³⁷. Die Forschergruppe um Caughey führte eine Studie durch, bei der über vier Wochen in der Essenzubereitung für freiwillige gesunde Probanden ausschließlich Leinsamenöl (ω -6-Fettsäure) verwen-

det wurde. Nach weiteren vier Wochen, in denen die Probanden zusätzlich täglich 9 g Fischöl (ω -3-Fettsäure) zu sich nahmen, zeigten sich in den anschließenden Untersuchungen deutlich verringerte Anteile von Zytokinen in den Blutproben³⁸.

In einer weiteren Studie konnte eine Veränderung der Lipidzusammensetzung von neutrophilen Granulozyten unter ω -3- und ω -6-Fettsäuren nachgewiesen werden, allerdings hatten diese Änderungen nur bei höheren Dosierungen (2,6 g Eikosapentaensäure und 1,4 g Dokosahexaensäure) eine Auswirkung auf die zellulären Interaktionen (wie FMLP-induzierte Chemotaxis oder Superoxidradikalbildung)³⁹.

2.4.6 ω -3-Fettsäuren und Sepsis

Sepsis stellt eine schwere und oft lebensbedrohliche Erkrankung des gesamten Körpers dar. In den Studien von Murray et al. wurde mittels bakterieller Lipopolysaccharide (LPS) eine Sepsis bei Schweinen induziert. Dabei wurden sie mehrere Tage mit ω -3- oder ω -6-Fettsäuren vorgefüttert. Die mit ω -3 supplementierten Tiere wiesen eine bessere Lungenfunktion und ebenfalls einen besseren Herzindex auf als die des ω -6-Fettsäuren-Kollektivs^{40 41}. In einem ähnlichen Modell wurde an Ratten die Prostaglandinsynthese quantifiziert, wobei in dem ω -3-Kollektiv weniger Prostaglandine sowie eine bessere Durchblutung, verbunden mit einer längeren Überlebenszeit zu finden waren⁴².

2.4.7 Sepsis und Immunonutrition

Mayer et al. veröffentlichten eine Studie, in der gezeigt werden konnte, dass Patienten mit Sepsis, denen ω -3- oder ω -6-Fettsäuren im Rahmen der parenteralen Ernährung als Lipidemulsion zugeführt wurden, bereits nach zwei Tagen einen Anstieg von ω -3-Fettsäuren in den Membranen der Monozyten erfahren haben. So stellt die parenterale Ernährung unter Umständen gleichzeitig ein Werkzeug zur Beeinflussung der immunologischen Reaktionen des Körpers dar⁴³. Dieses Vorgehen wird in der einschlägigen Literatur häufig auch als „Immunonutrition“ bezeichnet.

2.4.8 Sepsis als Fokus dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Sepsis, einem akuten Entzündungsprozeß im Körper, mit der Maximalvariante des immunologischen Ungleichgewichts. Insbesondere wird der Einfluß der ω -3-Fettsäuren im Vergleich zu den ω -6-Fettsäuren auf die Endothelzellen, mögliche Veränderungen der Endothelzellen nach Einbau der verschiedenen Fettsäuren und deren Konsequenzen untersucht. Zuletzt befasst sie sich mit der Signaltransduktion in den Endothelzellen, den Einbau der Fettsäuren in die Phospholipide und die dadurch entstehenden Veränderungen.

2.5 Definitionen von SIRS und Sepsis

Sepsis und SIRS beschreiben unterschiedliche Erkrankungen, die klinisch oft nur schwer voneinander zu trennen sind. Während der Begriff „Sepsis“ nur im Zusammenhang mit einer Infektion als Ursache verwendet wird, kommen beim SIRS verschiedene Auslöser in Betracht, wie Traumata, Verbrennungen oder Ischämien. SIRS ist die Abkürzung für „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ oder auch systemisch inflammatorisches Antwort-Syndrom⁴⁴. Sepsis wird dabei überwiegend durch Gram-negative Infektionen verursacht, speziell durch die Endotoxine, Formylpeptide und Proteasen der gram-negativen Bakterien. Allerdings ist die Anzahl an Gram-positiven septischen Infektionen in den letzten Jahren angestiegen, vorrangig verursacht durch deren Exotoxine, Enterotoxine, Hämolysine und Lipoteichonsäuren. Weitere mögliche Auslöser einer Sepsis sind Pilzinfektionen, virale oder Protozoeninfektionen⁴⁵. Sepsis und septischer Schock zählen zu den häufigsten Todesursachen in der Intensivmedizin weltweit, die Mortalitätsraten belaufen sich auf zwischen 30-60 %⁴⁶.

Der Begriff Sepsis wird definiert als eine systemische Antwort des ganzen Körpers auf eine schwere Infektion. Dabei müssen mindestens zwei der folgend genannten Kriterien erfüllt sein:

- 1.) Körpertemperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$
- 2.) Tachykardie, Herzfrequenz > 90 Schläge pro Minute
- 3.) Tachypnoe > 20 Atemzüge pro Minute oder $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg
- 4.) Leukozyten $> 12.000/\text{mm}^3$ oder $< 4.000/\text{mm}^3$, oder > 10 % unreife Neutrophile

Kommt es zu einem Ungleichgewicht in der Abwehrfunktion des Körpers, beispielsweise durch eine endogenen Entzündung wie Pankreatitis oder exogen durch Operationen, so wird es den verschiedenen pathogenen Erregern erst möglich, sich im Körper zu vermehren und eine Infektion zu verursachen. Diese kann sich im ungünstigen Fall zu einer Sepsis ausweiten.

2.5.1 Das septische Geschehen

Die höchst komplexen Vorgänge im Körper während des septischen Geschehens beschäftigen zahlreiche Wissenschaftler weltweit und sind immer noch Gegenstand aktueller Forschungen. Nach dem gegenwärtigen Erkenntnisstand wird folgender Ablauf angenommen:

Durch eine Eintrittspforte wie eine Hautläsion oder eine Wunde gelangen Gram-negative Bakterien in den Körper und verursachen eine Infektion. Dies ist auch möglich durch die Darmwand, nachdem sie aufgrund eines Traumas (Verbrennung, Operation) ischämisch und somit durchlässiger für die ansässigen Bakterien wurde. Die eingetretenen Bakterien vermehren sich bei schlechter Abwehrlage und setzen ihre Exotoxine frei. Die Freisetzung aktiviert das Immunsystem, vor allem Makrophagen, welche die Bakterien aufnehmen und phagozytieren. Dadurch werden die Bestandteile der Bakterien, die Endotoxine, freigesetzt. Das Endotoxin bei Gram-negativen Bakterien ist das Lipopolysaccharid (LPS), es stammt aus der Zellmembran der Mikrobe. Normalerweise wird ein solches Endotoxin von den Kupffer-Zellen der Leber abgefangen ⁴⁷. Ist LPS einmal in der Blutzirkulation, kann es an HDL (High-Density-Lipoproteins) oder an ein LPS-bindendes Protein (LBP) binden. Letzteres interagiert mit einem CD14-Komplex auf Monozyten und Makrophagen und stimuliert diese. Der LPS-/LBP-Komplex kann sich auch an einen im Blut zirkulierenden CD14-Komplex binden, der dann die Endothelzellen aktiviert. LPS ist in der Lage, sehr viele Entzündungsmediatoren zu stimulieren wie das Komplementsystem, das Bradykinin/Kinin-System und das hämatopoietische System, die dann wiederum andere Mediatoren aktivieren wie Eikosanoide, Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, freie Radikale und PAF. Das Komplementsystem wird von LPS über den klassischen und den alternativen Weg aktiviert, was zur Freisetzung von C3a und C5a führt, die wiederum proinflammatorische Mediatoren von perivaskulären Mastzellen, Endothelzellen und Plättchen freisetzen ⁴⁸. Ebenfalls werden die Adhäsionsmoleküle vermehrt exprimiert. Bei den Neutrophilen sind es die CD11/CD18-Komplexe, bei den Endothelzellen ICAM-1 und ICAM-2, was zu einer vermehrten Ad-

häsion und anschließender Transmigration der Leukozyten durch das Endothel führt⁴⁵. Eine Schädigung des Endothels ist eine der Folgen. Diese Exo-/Endotoxin- und Zytokin-Überflutung aktiviert das Immunsystem so sehr, dass eine „Überantwort“ der proinflammatorischen Mediatoren die Folge ist. Deren Effekte auf die Blutgefäße führt zu makro- und mikrozirkulatorischem Chaos und letztendlich zum Multiorganversagen.

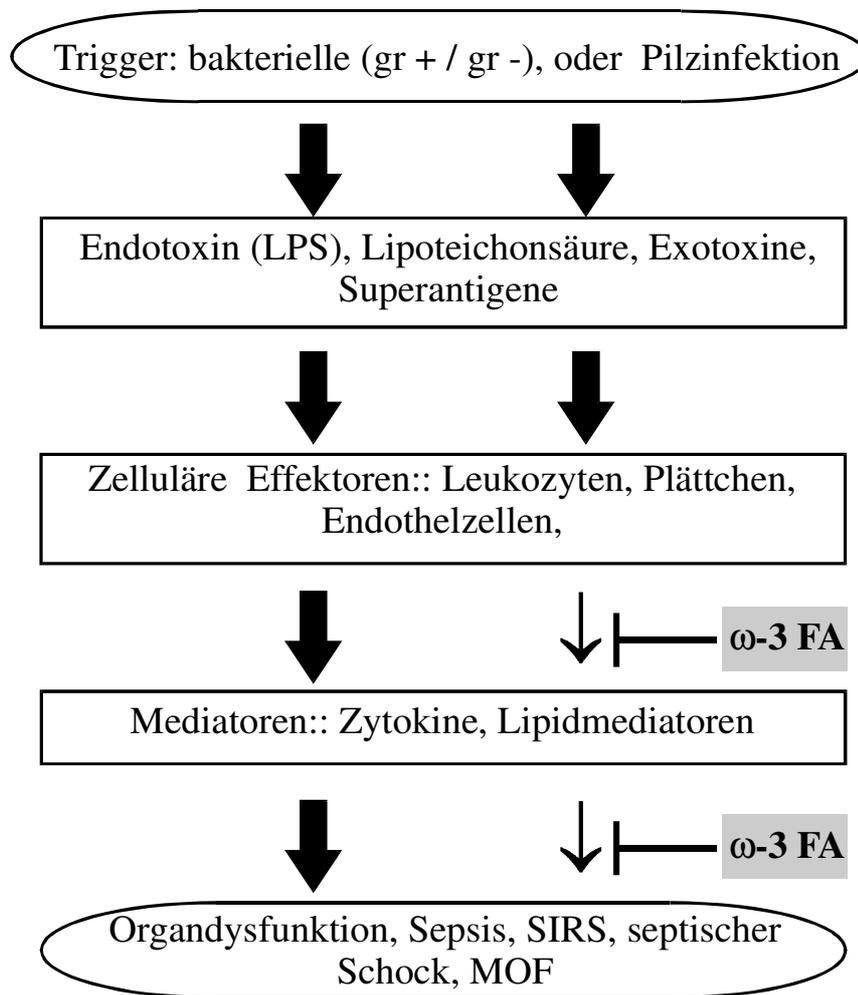


Abb. 2.3: Flußdiagramm zur Entstehung von Sepsis und mögliche Angriffsorte in der Therapie mit ω -3-Fettsäuren. ω -3-Fettsäuren (ω -3 FA), Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), (Systemisch inflammatorisches Antwort-Syndrom), Multiple Organ Failure (MOF), (Multiorganversagen).

Über die Hierarchie der einzelnen Komponenten im septischen Geschehen kann keine Aussage getroffen werden, weil die Vorgänge noch nicht ausreichend erforscht sind. Sicher ist, dass LPS die Entzündungskaskade initiiert und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α und Interleukin-1 (IL-1) zu den ersten Mediatoren gehören, die während dieses Geschehens gebildet werden. Eine der Schwierigkeiten in der Verfolgung des Sepsis-Ablaufes liegt darin, dass die frühen Mediatoren wie TNF- α und IL-1 ihre eigene Produktion sowie die Bildung anderer Mediatoren induzieren, indem sie neutrophile Granulozyten und Thrombozyten stimulieren. Auch eine Feedback-Hemmung ihrer eigenen Bildung wird ausgelöst. Deswegen ist es überhaupt möglich, dass sich das ganze Geschehen unabhängig vom eigentlichen Stimulus, der die Kaskade ausgelöst hat, selbstständig⁴⁹.

Nach der proinflammatorischen Phase wird eine zweite, entzündungshemmende Phase postuliert, in der die antiinflammatorischen Mediatoren wie zum Beispiel endogene Kortikosteroide, Katecholamine, IL-10, IL-4, PGE₂, lösliche TNF- α -Rezeptoren und IL-1-Rezeptor-Antagonisten überwiegen. Sie kommt zustande durch die im septischen Geschehen im Überschuß gebildeten proinflammatorischen Mediatoren, der eine reaktiv vermehrte Produktion von antiinflammatorischen Mediatoren zur Folge hat. Diese Phase ist in den vergangenen Jahren mit dem Begriff des „kompensatorischen antiinflammatorischen Syndroms“ bezeichnet worden, im Englischen „compensatory anti-inflammatory response syndrome“ (CARS). Im Deutschen wird auch der Begriff „Immunparalyse“ verwendet.

2.5.2 Septischer Schock, CARS und MOF

Der septische Schock ist definiert durch eine Sepsis mit Hypotension (Systolischer Blutdruck unter 90 mmHg oder ein Blutdruckabfall von über 40 mmHg für mindestens eine Stunde) trotz ausreichender Volumensubstitution. Zusätzlich zu den Sepsis-Kriterien kommt es zur Kreislaufdysregulation, möglicherweise hervorgerufen durch Laktatazidose.

Das SIRS und die Sepsis können in den Zustand des Multi-Organversagens (MOF= Multiple Organ Failure) kulminieren.

2.5.3 Gerinnung und Sepsis

Das Gerinnungssystem wird während des septischen Geschehens massiv beeinflusst. In der Anfangsphase der Sepsis herrscht ein prokoagulanter Zustand vor, hervorgerufen durch LPS und andere Endotoxine, die das Gerinnungssystem aktivieren und über verschiedene Mechanismen wie die Komplementaktivierung, die Freisetzung des von Wilbrand-Faktors etc., die disseminierte intravasale Gerinnung fördern⁵⁰.

Andererseits wirkt auch TNF- α koagulationsfördernd, indem es speziell auf den extrinsischen Gerinnungsweg Einfluß nimmt. Desweiteren reduziert TNF- α die Aktivitäten von Protein C und Protein S, was zu einer weiteren Aktivierung der Gerinnung führt⁴⁴.

2.5.4 Die Rolle von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α und Thrombin im Sepsis-Geschehen

TNF- α ist einer der zentralen Mediatoren des Körpers, die bei einer Entzündung freigesetzt werden. Die Freisetzung erfolgt hauptsächlich aus aktivierten Monozyten und Makrophagen, aber auch aus natürlichen Killer-Zellen, Neutrophilen und Mastzellen und löst eine Kette von Reaktionen aus⁵¹. Entscheidend dabei ist, in welchem Umfang TNF- α synthetisiert wird. Ist die Produktion lokal beschränkt und eher gering, so ist sie zur Aufrechterhaltung der Homöostase durchaus sinnvoll. Wenn aber die lokale Entzündung sehr ausgeprägt ist und die Immunantwort entsprechend hoch ausfällt, dann können die Zytokine, allen voran TNF- α , sich über die lokale Entzündung hinaus ausbreiten. Verteilen sie sich im ganzen Körper, kann es für den Menschen zu einer lebensbedrohlichen Situation kommen, wenn sich ein SIRS oder eine Sepsis mit resultierendem Multiorganversagen ausbildet⁵².

TNF- α bewirkt ganz verschiedene und zum Teil auch gegensätzliche Reaktionen in den diversen Zellen. Das liegt unter anderem daran, dass Membranrezeptoren existieren, die sich sowohl funktionell als auch strukturell voneinander unterscheiden und sich unterschiedlicher Signaltransduktionswege bedienen. Es gibt zwei TNF- α -Rezeptoren: der TNF R1-Rezeptor ist auf fast allen Zellen vorhanden und vermittelt das Signal bei akuter Entzündung, während TNF R2 nur auf Plasmazellen vorkommt. Die dadurch ausgelösten Signaltransduktionswege aktivieren oder hemmen verschiedene Proteinsynthesewege, deren Endprodukte möglicherweise entgegengesetzte Effekte haben. TNF- α

aktiviert zwei für die Lipidmediatoren wichtige Signalwege: einerseits bedient er sich der Phospholipase A₂, andererseits aktiviert er die PC-spezifische Phospholipase C⁵³.

2.5.5 Thrombin

Während des Schock-Geschehens ist eine frühe Aktivierung des Gerinnungssystems mit Aktivierung von Thrombin durch das extrinsische und intrinsische System zu beobachten. Thrombin stimuliert die Endothelzellen, Adhäsionsmoleküle zu produzieren und spaltet Fibrinogen in seine Spaltprodukte auf, um ein Fibrin-Clot durch Polymerisation zu bilden⁵⁴. Damit Thrombin in der Endothelzelle eine Antwort auslösen kann, muß es an seinen Rezeptor gebunden sein. Es existieren drei Rezeptoren, an die sich Thrombin binden kann: der Proteinase-aktivierte Rezeptor 1 (PAR 1), 3 (PAR 3) und 4 (PAR 4). PAR 1 gehört zu einer Familie von Rezeptoren, die sieben Transmembran-Domänen haben und mit G-Proteinen interagieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass PAR 1 an die Phosphatidyl-Inositol-Hydrolyse gekoppelt ist⁵⁵. Bei PAR 3 und PAR 4 vermutet man, dass sie die Phosphatidylcholin-Hydrolyse induzieren. Thrombin spaltet an dem Rezeptor den NH₂-Terminus ab, was zu einer Bindung zwischen Thrombin und Rezeptor führt sowie zu dessen Aktivierung.

Es existiert ein präformierter Pool von PAR 1-Rezeptoren in den Endothelzellen, der eine rasche Antwort innerhalb von Minuten auf den Stimulus Thrombin gewährleistet. Nachdem ein Rezeptor aktiviert und der NH₂-Terminus abgespalten wurde, ist ersterer an der Innenseite der Zellmembran zu finden. Er kann nicht mehr auf die Außenseite der Zellmembran gelangen, um erneut von Thrombin aktiviert zu werden, sondern muß wieder neu gebildet werden. Somit ist die Kapazität der Rezeptor-Aktivierung begrenzt⁵⁶. In Endothelzellen bindet PAR 1 an die heterotrimeren Gi- und Gq-Proteine, die verschiedene Signalkaskaden auslösen. Gi aktiviert zum Beispiel die Ras/MAPK-Kaskade, was zur Transkription von Genen führt. Außerdem werden Inositoltriphosphate sowie Diacylglycerole generiert. Derzeit wird das Einzel-Rezeptor-Modell (single-receptor-model) favorisiert. Ein Rezeptor, in diesem Fall PAR 1, löst die verschiedenen Signalkaskaden aus, wodurch die aktivierten G-Proteine wiederum Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C, Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C, Phospholipase D und Phospholipase A₂ aktivieren⁵⁷.

2.5.6 Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)

Der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) ist ein PLA₂-abhängiger und sehr potenter Mediator des Schocks. Er wird von vielen Zellen wie Endothelzellen, Plättchen, Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen freigesetzt, was im Schock-Geschehen aufgrund verschiedener Stimuli wie Thrombin, Histamin und Leukotrien der Fall ist. Der Stimulus bindet an den PAF-Rezeptor, dadurch wird die Proteinkinase C aktiviert und das intrazelluläre Calcium erhöht. Außerdem vermittelt PAF die Adhäsion von Neutrophilen an das Endothel, erhöht die Endothel-Permeabilität und verursacht die Kontraktion von Arteriolen⁵⁸. PAF wirkt zusätzlich negativ inotrop⁵⁹.

PAF wird durch die sequentielle Aktivierung einer Phospholipase A₂ und einer Acetyltransferase aus dem 2-Hydroxy-Metaboliten Lyso-PAF gebildet. Der entstehende Metabolit PAF ist einer der potentesten Mediatoren von akut-allergischen und entzündlichen Reaktionen²⁹.

2.5.7 Die Rolle des Endothels in der Sepsis

Das Gefäßendothel ist ein sehr dynamischer Zellverband, der in eine Vielzahl von Funktionen eingebunden ist. So kontrolliert es unter anderem den Gefäßtonus, ist verantwortlich für das Ein- und Ausschleusen von Zellen und Nährstoffen und für die Reifung neuer Leukozyten⁶⁰. Endothelzellen sind in der Lage, auf die Informationen, die sie durch Mediatoren erhalten, rasch zu reagieren. Dies geschieht meist durch die Bildung weiterer Mediatoren. Deshalb hat das Gefäßendothel eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese der Sepsis⁶¹. Das Gefäßendothel ist dabei keineswegs als starrer Zellverband zu sehen, der auf den gleichen Stimulus immer die gleiche Quantität an Mediatoren freisetzt. Die Antwort des Endothels ist auch davon abhängig, unter welchem Einfluß anderer Mediatoren es zusätzlich steht.

Die Endothelzellen können das Primärziel einer Infektion sein. Bereits infizierte Endothelzellen können eine systemische Reaktion auf die Infektion initiieren, da sie in der Lage sind, schnell Entzündungsmediatoren freizusetzen⁶². So erscheint es möglich, dass der Mangel an essentiellen Fettsäuren wie Arachidonsäure während eines Entzündungsgeschehens in den Endothelzellen besonders ausgeprägt ist.

2.6 Endothel und Fettsäuren: Signaltransduktion und Phospholipide

Nachdem ein Ligand an seinen Rezeptor gebunden ist, erfolgt die zelluläre Antwort. Die Folge der Ereignisse, die zu einer zellulären Antwort führen, nennt man Signaltransduktion. Die Signaltransduktion kann zu ganz unterschiedlichen Ergebnissen führen, beispielsweise wird ein bereits vorhandenes Protein aktiviert oder inhibiert oder die zelluläre Biosynthese wird dahingehend verändert, dass bestimmte Proteine schneller oder langsamer synthetisiert werden. Dies kann auf Ebene der Transkription, der Translation oder in einem der nachgeschalteten Schritte beeinflusst werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit einem bestimmten Signaltransduktionssystem der Zellen, welches unter anderem das Phosphatidylinositol als *second messenger* nutzt. Diese sogenannte Phosphoinosit-Kaskade löst in vielen Zelltypen eine Fülle von Antworten aus. So beeinflusst sie unter anderem die Glykogenolyse in Leberzellen, die Insulinsekretion von Pankreasinzellen, die Aggregation von Thrombozyten und die Kontraktion glatter Muskelzellen⁶³. Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit ist auf das Phosphatidylinositol-System der Endothelzellen gerichtet, welches von den proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und Thrombin aktiviert wird. Dieses *second messenger*-System wandelt extrazelluläre Signale in intrazelluläre um.

Bindet ein Stimulus an seinen Rezeptor auf der Endothelzelle, so führt dies zu einer Freisetzung der *second messenger*, im Falle des Thrombins handelt es sich um den PAR 1-Rezeptor, der an die G_q-, G_i-, und G_{12/13}-Proteine gekoppelt ist. Dabei werden von dem Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (IP₂) durch die G_q-aktivierte β -Isoform der Phospholipase C zwei *second messenger* abgespalten⁶⁴. Es handelt sich dabei um Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ erhöht die Freisetzung von intrazellulärem Calcium [Ca²⁺] aus dem endo- und sarkoplasmatischen Retikulum, welches zu einer Aktivitätssteigerung der Proteinkinase C führt. Letztere wird auch durch DAG direkt aktiviert. IP₃ und DAG haben also eine synergistische Wirkung. Die Proteinkinase C phosphoryliert Serin- und Threoninreste in vielen Zielproteinen. Einer ihrer Effekte besteht in der Beendigung der Glykogensynthese durch Phosphorylierung der Glykogen-Synthase. Desweiteren erhöht sie die endotheliale Permeabilität, den Sauerstoffverbrauch der Zelle und die Aktivierung von Lipidmediatoren.

IP_3 ist ein kurzlebiger Mediator, er existiert nur für ein paar Sekunden. Die aufeinanderfolgende Aktion dreier Phosphatasen wandelt IP_3 in Inositol um. Die Abspaltung der 5-Phosphorylgruppe beendet seine Funktion als *second messenger*. Inositol-1,4-bisphosphat wird zu Inositol-4-phosphat und anschließend zu Inositol hydrolysiert. Diacylglycerin (DAG) kann zu Phosphatidsäure phosphoryliert werden, die mit CTP zu CDP-Diacylglycerin reagiert. Diacylglycerin kann aber auch zu Glycerin und Fettsäuren hydrolysiert werden. Zum Großteil werden die Abbauprodukte der zwei *second messenger* einem Re-Syntheseweg zugeführt.

Calder stellte die Hypothese auf, dass bei Änderung der Fettsäurezusammensetzung von Phosphatidylcholin und PIP_2 (Überwiegen von ω -3-Fettsäuren gegenüber ω -6-Fettsäuren) diese Membranphospholipide eine veränderte Ausgangssubstanz für die Phospholipasen darstellen. Dies hat seiner Meinung nach möglicherweise eine veränderte Signaltransduktion zur Folge ⁶.

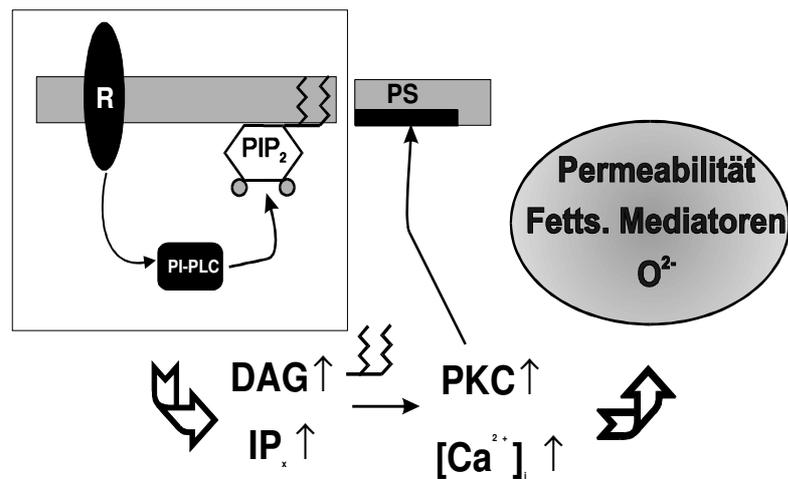


Abb. 2.4: Darstellung des Signaltransduktionsweges mit Phosphatidylinositol und DAG (Diacylglycerol) als *second messenger*. Rezeptor (R), Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP_2), Phosphatidylinositol mit Phospholipase C (PI-PLC), Phosphatidylserin (PS), Proteinkinase C (PKC), Inositolphosphate (IP), Calcium (Ca^{2+}).

2.7 Fragestellung

Bei septischen Patienten ist eine parenterale Ernährung oft notwendig. Integraler Bestandteil dieser parenteralen Ernährung sind Lipide, die als Kalorienträger und Bausteine der Zellmembran dienen. Unter dem Stichwort „Immunonutrition“ wurden verschiedene Studien durchgeführt mit dem Ziel, einen möglichen Benefit der ω -3-Fettsäuren für die Patienten zu eruieren. In dieser Arbeit wurde der Einfluß der ω -3-Fettsäuren auf zellulärer Ebene untersucht. Hierbei interessierte das Verhalten der essentiellen Fettsäuren in Endothelzellmembranen unter septischen Bedingungen *in vitro*.

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Zusammenhänge wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welche Änderungen treten in der Fettsäurezusammensetzung der Endothelzellmembran unter inflammatorischen Bedingungen auf?
2. Sind die Änderungen durch freie Arachidonsäure beziehungsweise Eikosapentaensäure / Dokosahexaensäure reversibel?
3. Welchen Einfluss haben Precursor-Fettsäuren auf die Lipidmembran-assoziierte Signaltransduktion am Beispiel der Phosphoinosit-Kaskade („PI-Response“)?
4. Welchen Einfluß haben ω -3-Fettsäuren auf die PI-Response unter inflammatorischen Bedingungen?

3 Materialien

3.1 Materialien und Lösungen für die Endothelzellisolierung und –Kultivierung

Aqua ad injectabilia und bidest. (Braun, Melsungen, Deutschland)

Arachidonsäure (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)

Calciumchlorid-Stock-Lösung

Ansatz: 2,2 g CaCl₂ (Merck, München, Deutschland)
100 ml Aqua ad injectabilia, steril filtrieren

Collagenase-Lösung

Ansatz: 25 mg Collagenase (CLS type 2) (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ, USA)
100 ml HBS (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
pH-Wert auf 7,4 einstellen und steril filtrieren

Dokosahexaensäure (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)

Eikosapentaensäure (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)

Fötales Kälber-Serum (FCS) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland) oder (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Ansatz: auf 37°C vorwärmen, dann 30 Minuten auf 56°C erwärmen und steril filtrieren

Gelatine-Stock-Lösung 2 % (Serva, Heidelberg, Deutschland)

Ansatz: 2 g Gelatine
100 ml Aqua bidest.
kurz aufkochen lassen, in sterile Flaschen füllen, autoklavieren

Beschichtung der Kulturplatten: 1 ml Gelatine-Stock-Lösung
9 ml NaCl-Lösung 0,9 %

Hanks balanced salt solution, HBS-Lösung (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Ansatz: 88 g Natriumchlorid (Merck, München, Deutschland)
3,3 g Kaliumchlorid (Merck, München, Deutschland)
26,2 g HEPES (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
22 g Glucose (Merck, München, Deutschland)
in 950 ml Aqua ad injectabilia lösen
pH-Wert auf 7,58 einstellen, auf 1000 ml auffüllen

1 ml HBS-Lösung + 10 ml Aqua ad injectabilia zugeben bis der pH-Wert 7,4 erreicht, dann steril filtrieren

HBS+CaCl₂+MgCl₂-Puffer (Hanks balanced salt solution) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Ansatz: siehe HBS-Lösung
5,6 ml CaCl₂-Stock-Lösung
5,6 ml MgCl₂-Stock-Lösung

HEPES (N-2-hydrylethylpiperazine-N-2-ethansulfonsäure), (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Ansatz: 4,76 g HEPES
100 ml Aqua bidest.
pH-Wert auf 7,4 einstellen, steril filtrieren

HUVEC-Medium (Medium für Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen)

Ansatz: MCDB-Medium (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
20 % FCS (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)
1 % RDGF (Retinaler Wachstumsfaktor aus Rinderaugen, Eigenherstellung)
100 U/ml Penicillin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
100 U/ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
1 mM Pyruvat (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
2 mM L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
2 µg/ml Amphotericin B (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Magnesiumchlorid-Stock-Lösung

Ansatz: 1,017 g MgCl₂ (Merck, München, Deutschland)
100 ml Aqua ad injectabilia, steril filtrieren

Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

RPMI 1640-Medium (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)

TNF-α (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Trypsin-EDTA

Ansatz: 10 ml Trypsin 10-fach konzentriert (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
10 ml 200 mM HEPES-Lösung (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
80 ml 0,9 % NaCl-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland)

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterial für die Endothelzellisolierung und –Kultivierung

CO₂-Inkubator IR 1500 (Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland)

Einwegpipettenspitzen aus Polypropylen (10 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml, 10 ml) (Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Hettich-Zentrifuge Rotanta/AP (r = 154 mm) (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)

Kulturplatten für Endothelzellen, 12-Well und 24-Well (Costar Corporation, Cambridge, MA, USA)

Steril-Filtereinheiten, 0,2 µm Porengröße (Nalgene nunc, Neerijse, Belgien)

Sterile Werkbank mit Personenschutz (Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland)

Vakuum-Sauger Medela piccolo (Medela, Baar, Schweiz)

Zentrifugenröhrchen 50 ml BLUE MAX aus Polypropylen (Falcon über Becton Dickinson, Meylan, Cedex, Frankreich)

3.3 Materialien und Lösungen für die PI-Response

Ammoniumformiat 25 %

Ansatz: 38 ml Ameisensäure 98 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)

800 ml Aqua bidest. (Braun, Melsungen, Deutschland)

ca 65 ml Ammoniaklösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)

zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,0

Arachidonsäure (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)

Borax

Ansatz: 4,08 g Ameisensäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)

1,9 g Phosphoglycerolinositol (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland) mit Aqua bidest. auf 1 Liter auffüllen

Diethylether (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Dokosahexaensäure (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)

Eikosapentaensäure (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)

HH-Puffer

Ansatz: 6 g HEPES (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

100 ml HBS-Lösung (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) mit

900 ml Aqua bidest. mischen und mit NaOH (Merck, München, Deutschland) auf pH-Wert von 7,4 einstellen

Lithiumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Myo-³(H)-Inositol (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)
Myo-³(H)-Inositol (Amersham, Dreieich, Deutschland)
Natrium-Tetraborat (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)
Szintillatorflüssigkeit Rota-Szint (Braun, Melsungen, Deutschland)
Thrombin (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)
TNF- α (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
Trichloressigsäure 20 % (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.4 Geräte und Verbrauchsmaterial für die PI-Response

Beta-Counter (Packard, Dreieich, Deutschland)
Eppendorf-Cups (Eppendorf, Eppendorf, Deutschland)
Microliter-Zentrifuge-Biofuge 13 (Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland)
Rüttler-Wasserbad (Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland)
Zellscraper (Chromabond, Düren, Deutschland)

3.5 Materialien und Geräte zur gaschromatographischen Analyse

Aktivkohlefilter, Feuchtigkeitsfilter, Sauerstofffilter (Messer Griesheim, Krefeld, Deutschland)
Azeton (Merck, Darmstadt, Deutschland)
BHT (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)
CaCl₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Diazomethan-Generatoren für 15 ml Diazomethan (Chrompack, Frankfurt, Deutschland)
Diethylether (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Authentische Standards als Fettsäuremethylester (FAME) (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)
Gaschromatograph Chrompack CP 9000 (Chrompack, Frankfurt, Deutschland)
Glasfritte, Teflonfritte (Chrompack, Frankfurt, Deutschland)
Hexan (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Kapillarsäule, Silikat (CP-Sil 88, 50 m x 0,25 mm), (Chrompack, Frankfurt, Deutschland)

Linomat IV-Applikator (Camag, Muttenz, Schweiz)

Margarinsäure (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Phospholipase C (Bacillus cereus, Grad 1, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland)

Primulin (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)

Salzsäure (HCl) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

TLC-Scanner (Camag, Muttenz, Schweiz)

TLC silica 60 (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.6 Materialien und Geräte für die RP-HPLC

Benzen (Merck, Darmstadt, Deutschland)

C-18 Sep-pack-Patronen (Waters Ass., Milford, MA, USA)

DABCO (1,4-diazobicyclo-(2,2,2)-octan) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Diethylether (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Hexan (Merck, Darmstadt, Deutschland)

HPLC-Gradienten-Lösung (Fluka KG, Heidelberg, Deutschland)

Leersäulen (0,25 μm , 4,6 mm), (Shandon, Runcorn, England)

1-Naphthylisozyanat (Sigma AG, Deisenhofen, Deutschland)

Packungsmaterial für die Hauptsäulen (Octadecylsilyl-Hypersil-5 μm -Partikel), (Machery und Nagel, Düren, Deutschland)

Packungsmaterial für die Vorsäulen (Silica-Gelpartikel 40 μm , Vydac, SC- 201 RP), (Vydac, Berlin, Deutschland)

- RP-HPLC-Säule (LiChrosorb 5 μm , 125x4,6 mm), (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Vorsäulen (Merck, Darmstadt, Deutschland)

4 Methoden

4.1 Isolierung von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen

Die Isolierung von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen erfolgte nach der Methode von Jaffe et al. 1973⁶⁵.

Die Nabelschnüre sollten mindestens 15 cm lang und intakt sein. Nach der Abnabelung werden die Nabelschnüre in sterile Becher verpackt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Mit einem sterilen Skalpell wird von jedem Nabelschnurende ungefähr 1 cm abgeschnitten, eine Knopfkanüle mit Dreiwegehahn in die Nabelschnurvene eingeführt und mit einem Nylonstrip befestigt. Anschließend werden die Nabelschnüre mit 50 ml HEPES durchgespült, um die Blutkoagel zu entfernen. Nun wird die andere Seite der Nabelschnur mit dem Nadeladapter, an dem ein Schlauch befestigt ist, versehen und der Schlauch mit einer Klemme verschlossen. Es wird nun soviel 0,025 % Collagenaselösung in die Vene gegeben, bis diese gut gefüllt, aber nicht überdehnt ist.

Es folgen 20 Minuten Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂. Nach vorsichtiger Massage der Nabelschnur wird die Collagenase-Lösung in ein vorbereitetes Falcon-Röhrchen gegeben, in dem sich 1 ml Fötale-Kälber-Serum (FCS) befindet. Das FCS inhibiert die Collagenase, so dass der Ablöse-Vorgang gestoppt wird. Um sicherzugehen, dass möglichst viele Endothelzellen erhalten werden, wird die Nabelschnur mit 30 ml HEPES nachgespült. Anschließend wird das Falcon-Röhrchen mit Endothelzellen für 5 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Nun befinden sich alle Endothelzellen in einem Pellet auf dem Boden des Falcon-Röhrchens, der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 5 ml HUVEC-Medium aufgenommen. Nachdem sichergestellt ist, dass sich die Endothelzellen in Lösung befinden, werden sie auf einer mit Gelatine beschichteten Kulturplatte ausgesät.

Nach drei Tagen Inkubationszeit im CO₂-Schrank sind die Endothelzellen bei normalem Wachstum so konfluent, dass sie mit Trypsin-Lösung abgelöst und auf größeren Schalen ausgesät werden können. Dabei werden die Endothelzellen dreimal mit 37°C warmem RPMI-Medium gewaschen, anschließend kommen 5 ml Trypsin-Lösung in die Kulturschale, die dann für drei Minuten in dem Brutschrank bleibt. Nach dieser Inkuba-

tionszeit wird der Ablösevorgang gestoppt, indem die Endothelzell-Lösung in ein Falcon-Röhrchen mit 1 ml FCS gegeben wird.

Dieses wird für 5 Minuten bei 350 g zentrifugiert, anschließend in HUVEC-Medium aufgenommen und auf die Kulturplatten ausgesät. Nach weiteren drei Tagen sind die Endothelzellen so konfluent, dass sie für einen Versuch eingesetzt werden können.

4.2 Analyse der Phospholipidklassen in Endothelzellen mittels Gaschromatographie

4.2.1 Inkubation der Endothelzellen mit den Fettsäuren

Für diesen Versuch wurden Endothelzellen in der zweiten und dritten Passage verwendet, da jede Probe 12.000 Zellen enthalten sollte und die Zellzahl der ersten Passage nicht ausreichend war. Insgesamt handelte es sich um sieben einzelne Proben, die eine Leerkontrolle (Endothelzellen ohne Fettsäuren und ohne TNF- α), sowie je zwei Proben, die entweder mit Arachidonsäure, Eikosapentaensäure oder Dokosahexaensäure inkubiert wurden, beinhalteten. Nachdem die Endothelzellen dreimal mit 37°C warmem RPMI-Medium gewaschen worden waren, erfolgte die Inkubation mit den Fettsäuren für sechs Stunden und einer Fettsäurekonzentration von 10 μ M. Drei dieser mit Fettsäuren inkubierten Proben wurden nach sechs Stunden zusätzlich mit TNF- α stimuliert, wobei eine TNF- α -Konzentration von 10 ng/ml verwendet wurde. Der Zeitraum der TNF- α -Stimulation betrug 16 Stunden, so dass sich die Gesamtzeit der Fettsäuren-Inkubation auf 22 Stunden belief. Während der Inkubationszeit befanden sich die Endothelzellen im Brutschrank bei 37°C Temperatur und einem CO₂- Gehalt von 5 %.

Anschließend wurde das Medium verworfen, und die Endothelzellen konnten mittels Trypsin-Lösung abgelöst werden. Dafür wurden sie für zwei bis drei Minuten in den Brutschrank gestellt. Um diese Reaktion zu stoppen, wurden sie in ein mit 1 ml FCS befülltes Falcon-Röhrchen gegeben. Nach fünf Minuten Zentrifugation bei 154 rpm und Verwerfen des Überstandes wurden die Endothelzellen, die sich in einem Pellet auf dem Boden des Falcon-Röhrchens befanden, in 2 ml RPMI-Medium aufgenommen. Sie wurden bei -20°C in einem Gefrierschrank zur weiteren Aufbereitung aufbewahrt.

4.2.2 Probenaufbereitung

Vor dem Auftragen auf die empfindlichen Kunstharzsäulen wurden folgende Arbeitsschritte vorgeschaltet:

1. Lipidextraktion nach Bligh and Dyer
2. a) Methylierung der freien Fettsäuren mit Diazomethan in Diethylether
b) Methylierung der Phospholipid-gebundenen Fettsäuren mit Methylierungsreagenz (2N HCl in Methanol)
3. Dünnschichtchromatographische Reinigung der Fettsäuremethylester von kontaminierenden Neutrallipiden und anderen unerwünschten Substanzen

4.2.3 Lipidextraktion nach Bligh and Dyer

Die Lipidextraktion nach Bligh und Dyer gehört zu den klassischen Verfahren der zweiphasigen Extraktionen für Phospholipide und Neutralfette und fand in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Anwendung in der Extraktion von freien Fettsäuren aus Plasma⁶⁶.

Die aufgetauten Proben wurden eine Minute lang Ultraschallwellen ausgesetzt (50 W, 50 % duty cycle), um eine komplette Zerstörung der Phospholipidmembran zu gewährleisten. Die Extraktion erfolgte in Zentrifugenröhrchen aus Glas.

Das Probenvolumen muss genau 2 ml betragen, um ein exaktes Mischungsverhältnis und damit eine optimale Phasentrennung zu gewährleisten. Nach Überführung der Proben in die Glasschliff-Röhrchen wurden zusätzlich 5 ml Methanol und 2,5 ml Chloroform zugegeben. Das Chloroform war mit 0,01 % butyliertem Hydroxytoluene versetzt, das die freien Fettsäuren vor der Oxidation schützen sollte. Die resultierende einphasige Lösung wurde innerhalb 30 Minuten mehrere Male kräftig geschüttelt.

Im zweiten Schritt der Extraktion erfolgte durch Zugabe von je 2,5 ml Chloroform und 0,9 %-iger NaCl-Lösung und nach kräftigem mehrminütigen Schütteln die Phasentrennung. Zur Ausbildung einer korrekten Phasengrenze wurde der Ansatz bei 2000 g 10 Minuten zentrifugiert. Die untere Phase, die Chloroformphase, wurde mit Pasteurpipetten separiert und im Stickstoffstrom getrocknet.

4.2.4 Herstellung des Diazomethan in Diethylether

Diazomethan-Generatoren zu Generierung von etwa 15 ml Diazomethan in Diethylether wurden von der Firma Chrompack bezogen. Im inneren Glaskolben wurden 2,5 g des getrockneten Guanidinderivates N-Methyl-N-Nitroso-N'-Nitroguanidin, im äußeren 15 ml wasserfreier Diethylether vorgelegt. Durch die Kanüle, die in den inneren Kolben führt, wurden vorsichtig ca. 2 ml 5N NaOH tropfenweise zum N-Methyl-N-Nitroso-N-Nitroguanidin hinzugefügt. Das entstandene Diazomethan entwich aus dem inneren Kolben durch eine Öffnung in den äußeren Kolben, wo es sich im Diethylether löste. Wegen der stark exothermen Reaktion fand die Generierung im Eis-Wasser-Salz-Gemisch statt. Das Diazomethan wurde stets frisch eingesetzt.

4.2.5 Methylierung der freien Fettsäuren mit Diazomethan

Die freien Fettsäuren unterscheiden sich nur durch geringe Ladungsunterschiede, hervorgerufen durch unterschiedliche Anzahl und Lage der Doppelbindungen, voneinander. Diese Ladungsunterschiede werden überlagert von den stärker polaren Carboxylgruppen.

Die Methylierung der freien Fettsäuren wurde durchgeführt, um die Polarität, die durch die Carboxyl-Gruppe bedingt ist, zu verringern. Erst dadurch wurde es möglich, die Fettsäuren nach Anzahl und Sitz ihrer Doppelbindungen zu diskriminieren. Diese geringen Unterschiede in der Ladungsverteilung würden sonst von dem stark polaren Carboxylrest überlagert. Diese Art der Methylierung unterscheidet sich von der im Anschluss beschriebenen Transmethylierung unter anderem dadurch, dass selektiv nur die freien Fettsäuren zur Reaktion kommen.

Die getrockneten Proben wurden in 100 µl Methanol aufgenommen und etwa 30 Sekunden lang geschüttelt. Die Methylierung der freien Fettsäuren wurde mit frisch hergestelltem Diazomethan (in Diethylether) durchgeführt. Dazu wurden 200 µl Diazomethan zur Probe gegeben. Die Probe ist unter mehrmaligem Schütteln 20 Minuten im Dunkeln inkubiert worden. Anschließend wurde das Methylierungsmittel unter Stickstoff abgeblasen. Die Probe wurde für die anschließende Dünnschicht-Chromatographie in 100 µl Chloroform gelöst.

4.2.6 Herstellung des Methylierungsreagenzes (2N HCl in Methanol)

200 ml Methanol (HPLC-Grade, wasserfrei) wurden in eine Gaswaschflasche mit Glasinterfritte gefüllt und das Gefäß gewogen. Eine Flasche mit Chlorwasserstoffgas (Reinheitsgrad 5.0) wurde mit einem Edelstahlventil ausgestattet. Zwischen HCl- und Gaswaschflasche wurde eine weitere Gaswaschflasche installiert, um Rückschlagen des Methanols in die HCl-Flasche zu verhindern. Die Gefäße wurden mit säurestabilen Silikonschläuchen verbunden. Das Einleiten des Gases fand unter einem Abzug und Eiskühlung statt. Der Fluss des eingeleiteten Gases musste beständig kontrolliert werden. Zu starker Fluss führte zum Verdampfen des Methanols und übermäßigem Verlust von Chlorwasserstoff, zu geringer Gasfluss bewirkte ein Zurücklaufen in die vorgeschaltete Gasflasche. Nach ca. 45 Minuten wurde der Vorgang unterbrochen und die Gaswaschflasche gewogen. Anschließend wurde mit MeOH auf eine HCl-Konzentration von 2N verdünnt.

4.2.7 Transmethylierung der Phospholipid-gebundenen Fettsäuren mit 2N HCl in Methanol

Bei der Fettsäureanalytik der Gesamtlipide wurde der Lipidextrakt direkt in gasdichte Glasgefäße überführt und mit 1 ml Methylierungsreagenz (2N HCl in Methanol) 12 Stunden bei 100°C verkocht. Nach Zugabe von 1 ml Hexan und kräftigem Schütteln erfolgte eine Extraktion mit Hilfe von Pasteurpipetten. Anschließend wurde die Hexanphase im Stickstoffstrom getrocknet und die Fettsäuremethylester (FAME) in 10 µl Chloroform aufgenommen und von kontaminierenden Neutrallipiden mittels einer Dünnschichtchromatographie separiert.

4.2.8 Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Phospholipidklassen

Die Trennung der Phospholipide von den Neutrallipiden erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Hierzu wurden Kieselgel-Platten der Korngröße 60 verwendet mit einem Hexan/Aceton-Gemisch von 4:1 als mobiler Phase. Die den Phospholipiden korrespondierenden Gelabschnitte wurden von der Platte entfernt und in 3 ml-Glassäulen mit Teflonfritten überführt. Nach Zugabe von 10 µg eines internen Margarinsäure-Standards (C 17:0) wurden die Phospholipide mittels 10 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches eluiert, mit Stickstoff trockengeblasen und in 10 µg Chloroform aufgenommen.

Anschließend wurden die Proben sowie 10 µg eines Phospholipid-Standards auf eine Dünnschichtplatte (TLC silica 60, 20x20 cm) aufgetragen und bei 4°C mit einem Gemisch aus Chloroform/Methanol/Essigsäure/H₂O im Verhältnis von 50/37,5/3,5/2 als mobiler Phase entwickelt. Nach 45 Minuten wurde die Platte mit kalter Luft getrocknet und die Phospholipid-Standards, sowie die Proben durch Besprühen mit Primulin-Lösung bei 254 nm detektiert. Im Ganzen konnten acht verschiedene Phospholipid-Klassen unterschieden werden: Lysophosphatidylcholin (LPC), Sphingomyelin (SPH), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidinsäure (PA) und Cardiolipin (CL). Die zu den Standards von Phosphatidylcholin, -serin, -inositol und -ethanolamin korrespondierenden Gelabschnitte wurden von der Dünnschicht-Platte entfernt und in 3 ml-Glassäulen, bestückt mit Teflonfritten, mit 10 x 1 ml Chloroform extrahiert. Den Proben wurden 10 µg eines C 17:0 (Margarinsäure)-Standards als interner Standard hinzugegeben. Die Proben wurden im Stickstoffstrom eingengt, in 1,1 ml Glasvials überführt, im Stickstoffstrom getrocknet und in 100 µl Chloroform gelöst.

4.3 Gaschromatographische Auftrennung der Fettsäuren

4.3.1 Prinzip der Gaschromatographie

Die Grundvoraussetzung für die gaschromatographische Analytik ist die Verdampfbarkeit des zu untersuchenden Probengemisches unter den jeweiligen Analysebedingungen. Außerdem muß gewährleistet sein, dass das Gemisch sich vor Erreichen des Detektors nicht zersetzt. Die Separierung der zu analysierenden Komponenten beruht auf Wechselwirkungen der einzelnen Moleküle mit einer mobilen Phase (inertes Gas, z. B. Wasserstoff) und einer stationären Phase (fest oder flüssig). Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Substanzen gleicher chemischer Struktur (z. B. Fettsäuremethylester) und dem Trägermaterial der Säule nehmen proportional der Molekülmasse zu. Daraus folgt für Substanzen mit größerer Molekülmasse eine niedrigere Wanderungsgeschwindigkeit und somit ein späteres Erreichen des Detektors, also eine längere Retentionszeit als bei kleinerer Molekülmasse.

Die Detektion der eluierten Komponenten erfolgte über einen 220°C heißen Flammenionisationsdetektor (FID). Bei einem FID wird die zu analysierende Substanz in einer Wasserstoffflamme verbrannt und einem elektrischen Potential ausgesetzt, wodurch Ladungsträger entstehen. Durch ein elektrisches Feld an einer Sammelelektrode (Kol-

lektor) wird die Zunahme der Ionisation über einen Verstärker gemessen. Die Zunahme des Ionisationsstromes ist somit ein Maß für die zugeführte Substanzmenge.

4.3.2 Apparativer Aufbau

Die Analysen wurden mit einem Gaschromatographen der Firma Chrompack (Modell CP 9000) durchgeführt. Als Trägergas wurde Wasserstoff benutzt. Der Gaschromatograph war mit einer Kapillarsäule (CP-Sil 88, 50 m x 0,25 mm Innendurchmesser) ausgestattet. Eine 2,5 m lange, desaktivierte Vorsäule wurde installiert. Der Trägerfluss betrug 100 ml/min, die Detektorgase hatten einen Fluss von 250 ml/min (synthetische Luft) bzw 30 ml/min (Wasserstoff). Die beiden Detektorgase wurden mit Aktivkohlefiltern, das Trägergas mit je einem Feuchtigkeits- und Sauerstofffilter gereinigt. Der Injektor wurde auf 250°C aufgeheizt, die Proben im Split-Modus aufgetragen (GC-Split 1:15). Um die geringen Mengen an zu identifizierendem Gas, die aus der Kapillare treten, ohne Verlust dem FID zuzuführen, wurde Stickstoff als Spülgas (make-up-Gas) benutzt.

Die Trennung wurde mit folgendem Temperaturgradienten durchgeführt:

Tabelle 4.1 Temperaturprogramm GC

Start-Temperatur [°C]	End-Temperatur [°C]	ΔT [°C/min]
120	220	3

Die Trennfähigkeit des Systems wurde täglich mit Hilfe eines FAME-Mixes, bestehend aus 25 Fettsäuremethylestern, überprüft.

Das Probenauftragevolumen war im Fall der Gesamtfettsäuren aus Phospholipiden immer 1 μl aus 100 μl Gesamtvolumen und im Fall der freien Fettsäuren 1 μl aus 50 μl Gesamtvolumen. Das Detektionslimit betrug bei einem Trägersplit von 1:15 etwa 500 pg FAME/ μl Probe.

4.3.3 Auswertung und Validierung

Die Auswertung der Fettsäureprofile wurde mit Microsoft EXCEL vorgenommen. Da im Zuge der Probenvorbereitung, insbesondere durch die beteiligten Solventien und Verunreinigungen des Dünnschichtmaterials, geringe Mengen an Fettsäuren eingeschleppt werden können, wurde auf jeder DC-Platte eine Leerkontrolle durchgeführt. Die Integratorfläche des internen Standards der Proben wurde mit der der Kontrollen korreliert und etwaige in den Kontrollen auftretende FAME-Peaks von denen der Proben subtrahiert. Diese korrigierten Fettsäuremethylester-Flächen wurden mit für jede Fettsäure separat ermittelte Responsefaktoren multipliziert. Die errechneten absoluten Flächen (Area units) wurden zur Ergebnisauswertung in Prozentanteile der Gesamt-Phospholipide sowie der Subklassen umgerechnet.

Tabelle 4.2 Komposition des FAME-Mixes, Retentionszeiten und FID-Response der individuellen Fettsäuremethylester

FAME aus	Abkürzung	Retentionszeit [min]	Response [AreaUnits/ng FAME]
Laurinsäure	12:0	5,00	919,83
Myristinsäure	14:0	7,55	969,77
Palmitinsäure	16:0	10,89	999,54
Palmitoleinsäure	16:1	11,98	989,37
Stearinsäure	18:0	14,68	974,38
Ölsäure	18:1	15,63	1006,33
Linolsäure	18:2	17,28	1010,33
γ -Linolensäure	γ -18:3	18,49	800,18
Arachidinsäure	20:0	18,60	1100,40
Linolensäure	18:3	19,24	926,02
cis-11-Eicosensäure	20:1	19,50	1056,08
cis-11,14-Eicosadiensäure	20:2	21,12	827,50
cis-5,8,11-Eicosatriensäure	20:3(9)	21,53	932,88
cis-8,11,14-Eicosatriensäure	20:3(6)	22,25	876,94
Behensäure	22:0	22,45	1073,75
Cis-11,14,17-Eicosatriensäure	20:3(3)	23,00	820,72
Arachidonsäure	20:4	23,12	1094,78
Erucinsäure (cis-13)	22:1	23,29	1067,46
Eicosapentaensäure	20:5	25,01	972,92
Lignocerinsäure	24:0	26,14	1013,82
cis-13,16,19-Docosatriensäure	22:3	26,62	993,21
Nervensäure/ cis-7,10,13,16-Docosatetraensäure	24:1/22:4	26,93	1898,95
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure	22:6	29,60	1000,28
Margarinsäure (interner Standard)	17:0	12,80	893,33

Die Trennung erfolgte mit Wasserstoff als Trägergas und einem Säulensplit von 1:15. Der FAME-Mix bestand aus 24 FAME + internem Standard. Die Injektionsmenge betrug 50 ng/FAME. Die Response wurde über mehrere Konzentrationsstufen ermittelt.

4.4 Analytik der Inositolphosphate, „PI-Response“

4.4.1 Prinzip der Meßmethode

Die Quantifizierung der Inositolphosphate erfolgte nach der Methode von Berridge et al.⁶⁷. Dabei werden die durch Phospholipase C entstandenen Inositol-Phosphate bestimmt, indem sie aus [³H]-Inositol-vormarkierten Membran-Inositiden der menschlichen umbilikal-venösen Endothelzellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) isoliert werden. IP₃ wird hierbei stufenweise bis zum Inositol dephosphoryliert. Das letzte Enzym in dieser Kette wird mittels Lithium-Ionen gehemmt, um eine Akkumulation der freigesetzten Inositolphosphate und damit die Möglichkeit, deren Quantifizierung in der Zelle zu erreichen. Voraussetzung für die Detektierbarkeit der Inositolphosphate ist der Einbau des mit Tritium markierten Inositols, um dessen Metabolite nach Stimulation der Zellen nachzuweisen. Mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie konnten auch die isomeren Metabolite des intrazellulär freigesetzten Second Messengers IP₃ dargestellt werden.

4.4.2 Versuchsablauf und Extraktion der Inositolphosphate

Die Endothelzellen wurden 24 Stunden mit [³H]-Inositol (5 µCi in 500 µl MCDB-Medium) und je 10 µM Fettsäuren vorinkubiert. Die Inkubation erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5 %. Danach wurden die Zellen dreimal mit HH-Puffer mit Calcium und Magnesium gewaschen. Zusätzlich wurde jeder Probe 10 mM Lithiumchlorid zugefügt.

Die Stimulation der Endothelzellen mit Thrombin (0,2 U/ml) erfolgte im Wasserbad bei 37°C in HH-Puffer mit Calcium und Magnesium über eine Zeitreihe (5, 10 und 15 min). Die Versuchsreihe mit TNF-α und Thrombin wurde unter 15-minütiger Stimulation der Endothelzellen mit Thrombin und vorheriger Inkubation mit TNF-α für 16 Stunden durchgeführt.

Die Inkubation wurde durch Zugabe von je 1 ml eiskalter Trichloressigsäure (15 %) auf Eis gestoppt. Nach 15 Minuten wurden die Endothelzellen mittels eines Zellscrapers vollständig abgelöst und in der Zellsuspension in ein Eppendorf-Cup überführt. Mittels Zentrifugation wurde der Überstand von den Zellresten getrennt und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die sich darin befindende Lipidfraktion wurde durch viermaliges Ausschütteln mit wassergesättigtem Diethylether separiert und die zurückbleibende

wäßrige Phase vor der Aufarbeitung über die Anionenaustausch-Säulen mit Na⁺-Tetraborat neutralisiert.

4.4.3 Anionenaustausch-Chromatographie

Zur Konditionierung der mit Dowex-Ionenaustauscherharz gepackten Säulen wurden diese vor Gebrauch jeweils mit 5 ml 1,0 M NH₄-Formiat/0,1 M Ameisensäure, pH 4,58 und 5 ml Aqua Bidest gewaschen, um ³[H]-Inositolreste von der Matrix zu entfernen. Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Säulen mit 3 ml 5 mM Inositol-Lösung gewaschen, bevor der eigentliche Zellextrakt in einem Volumen von ca. 2 ml wässriger Phase appliziert wurde. Nach Zugabe von 4 ml 60 mM Ameisensäure/5mM Na⁺-Tetraborat zur Elution von Glycerophospho-³[H]-Inositol erfolgte die Eluierung der gesamten Phosphoinositide mit 2 ml 1,0 M NH₄-Formiat/0,1 M Ameisensäure (Bruttoelution). Die Eluate wurden im Verhältnis 1:10 mit Szintillator-Flüssigkeit gemischt und im β-Counter gemessen. Die Trennleistung der Säulen wurde jeweils parallel zu den Versuchen mit authentischen Standards überprüft.

4.4.4 Statistik

Die Darstellung der Fettsäure-Messwerte erfolgte als Mittelwert +/- Standardabweichung (N = 6), die der PI-Response-Messwerte als Mittelwert +/- Standardfehler der Mittelwerte (N = 5 Thrombin-Messreihe, N = 8 Thrombin und TNF-Messreihe). Die Ergebnisse wurden einer Varianzanalyse mit post-hoc-Test unterzogen, wobei p < 0,05 als Signifikanzniveau festgelegt wurde.

5 Ergebnisse

5.1 Übersicht

Im Folgenden ist die Abfolge der durchgeführten Experimente wiedergegeben, woraus sich die Gliederung des Ergebnisteils ergibt.

Zunächst stellte sich die Frage, ob es im Verlauf einer schweren entzündlichen Reaktion, wie beispielsweise der Sepsis, zu einer Änderung des Phospholipid-Pools in den Endothelzellen kommt, was möglicherweise nicht ohne Einfluss auf die Signaltransduktion in diesen Zellen bliebe. Davon abgeleitet ergab sich die zweite Frage, ob und in welchem Ausmaß die zusätzliche Gabe von ω -6-Fettsäuren im Vergleich zu den ω -3-Fettsäuren einen Einfluß auf die Zusammensetzung der Phospholipidmembranen hat.

Um die Signaltransduktion in den Endothelzellen zu untersuchen, wurde das Phosphatidylinositol-System ausgewählt, da es als sehr aktives second-messenger-System bekannt ist. Anhand dieses Systems konnte festgestellt werden, ob die Inkubation mit ω -6- und ω -3-Fettsäuren einen Einfluß auf die Signaltransduktion hat.

5.2 Gliederung der Ergebnisse

Einleitend stellt ein kurzer Abschnitt die Kinetik der Aufnahme von freien Fettsäuren bei Endothelzellen vor, welche die Basis der nachfolgenden Versuche darstellt. Dann wird die Fettsäure-Zusammensetzung der Gesamtpospholipide präsentiert. Im Anschluß daran sind die einzelnen Phospholipid-Subklassen aufgefächert. Dabei werden die Meßergebnisse in Form einer Tabelle gezeigt, im weiteren Verlauf wird für jedes einzelne Phospholipid der prozentuale Anteil von Eikosatriensäure (ω -9), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA) und Dokosahexaensäure (DHA) in den Versuchsanordnungen in Form einer Grafik nebeneinander dargestellt. Weiter werden das Verhältnis von Eikosatriensäure (ω -9) zu Arachidonsäure sowie die Relation von Eikosapentaensäure + Dokosahexaensäure zu Arachidonsäure in einer graphischen Darstellung besonders hervorgehoben. Die HUVECs sind entweder als Kontrolle unstimuliert oder mit TNF- α (+TNF- α) inkubiert. Mit den einzelnen Fettsäuren sind die HUVECs stimuliert, wie im Versuchsprotokoll (+AA/+TNF- α ; +EPA/+TNF- α ; +DHA/+TNF- α) vorgegeben.

5.3 Kinetik der Aufnahme von freien Fettsäuren bei Endothelzellen

Zuerst mußte festgestellt werden, in welchem Zeitrahmen sich der Einbau von freien Fettsäuren in die Endothelzellen bewegt, um eine optimale Inkubationsdauer festzulegen. Zu diesem Zweck wurden HUVEC mit Arachidonsäure, Eikosapentaensäure oder Dokosahexaensäure inkubiert. Diesen Fettsäuren sind leicht messbare radioaktiv markierte Moleküle hinzugefügt worden. Es konnten anhand einer Zeitreihe folgende Ergebnisse ausgewertet werden: Nach zwei Stunden Inkubationszeit waren 50 – 60 % der Fettsäuren eingebaut und nach sechs Stunden fanden sich 80 – 90 % der zugegebenen Fettsäuren in den Endothelzellen wieder. Bei den folgenden Versuchen wurde eine Inkubationszeit von zweiundzwanzig Stunden eingehalten. Die einzelnen Phospholipide wurden anschließend gaschromatographisch aufgetrennt und ausgewertet.

Wichtig zu erwähnen ist, dass die hier eingesetzten Konzentrationen der Fettsäuren sowie die der Stimulantien TNF- α und Thrombin nicht toxisch für die Endothelzellen waren. Dies wurde durch LDH-Freisetzung sowie mittels Trypanblau-Testung nachgewiesen.

5.4 Gesamtphospholipide, prozentuale Verteilung der Phospholipide

Bei der Betrachtung der Gesamtphospholipide wird deutlich, dass sich die Verhältnisse der einzelnen Subklassen untereinander nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Es sind in den einzelnen Versuchsanordnungen keine nennenswerten Differenzen zwischen dem Gehalt von beispielsweise Phosphatidylcholin (PC) oder Phosphatidylethanolamin (PE) zu sehen.

Das Phosphatidylcholin stellt in allen Versuchsansätzen mit knapp 40 % den größten Anteil der Phospholipide, gefolgt von Phosphatidylethanolamin mit etwa 30 %. Als nächstes folgt Phosphatidylserin mit ca 12 %, und Sphingomyelin mit ungefähr 9 %. Phosphatidylinositol mit ca 5 % und Cardiolipin mit etwa 4 % spielen, was die Quantität im Gesamtphospholipid-Pool angeht, eine eher untergeordnete Rolle (**Tabelle 5.1**). Es existieren auch andere, zum Phospholipid-Pool gehörende Strukturen, wie das Lyso-Phosphatidylcholin und die Phosphatidsäure, aber bei der hier verwendeten, sehr sensiblen Meßmethode befanden sie sich unter dem Detektionslimit.

Tabelle 5.1 Das Profil der Phospholipidklassen

	PC [%]	PE [%]	PS [%]	SPH [%]	PI [%]	CL [%]
Kontrolle	40,1±2,3	30,4±0,4	13,0±0,9	8,0±0,9	3,7±0,1	4,6±0,6
+ TNF-α	42,5±1,3	28,2±0,9	11,5±0,6	8,3±0,2	4,9±0,2	4,6±0,2
+ AA + TNF-α	42,9±1,8	27,8±1,1	12,4±1,1	9,2±1,1	5,0±0,7	2,7±0,2
+ EPA + TNF-α	40,3±0,7	30,3±0,3	12,1±0,3	9,5±0,3	4,9±0,0	2,9±0,3
+ DHA + TNF-α	40,8±1,0	29,9±1,1	12,4±0,7	8,7±0,5	4,9±0,5	3,3±0,1

Der prozentuale Anteil jeder Phospholipidklasse ist dargestellt als Mittelwert +/- Standardabweichung (N = 6.) Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Sphingomyelin (SPH), Phosphatidylinositol (PI), Cardiolipin (CL), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosatetraensäure (DHA).

5.4.1 Das Profil der Fettsäuren in den Gesamt-Phospholipiden

Das Fettsäure-Profil der Gesamt-Phospholipide unter Kontrollbedingungen sowie unter Inkubation mit den einzelnen Stimuli ist in **Tabelle 5.2** dargestellt. Bei den Kontrollversuchen fällt auf, dass die ω -6-Fettsäure Arachidonsäure mit 9,17 % über dem Anteil der Eikosapentaensäure mit 1,23 % und der der Dokosahexaensäure mit 4,79 % liegt. Die größten Anteile werden von Ölsäure (24,38 %), Palmitinsäure (23,20 %) und Stearinsäure 17,99 %) bestritten.

Die Vorinkubation der Endothelzellen mit TNF- α verursacht erhebliche Änderungen im Fettsäureprofil der Gesamtphospholipide (**Abb. 5.A1**). Der Gehalt der essentiellen Fettsäuren ist im Vergleich zu dem der Kontrollgruppe gesunken (Arachidonsäure auf 6,85 %, Eikosapentaensäure auf 0,91 % und Dokosahexaensäure auf 3,73 %). Im Gegensatz dazu stieg der Gehalt der Eikosatriensäure (ω -9) an von 0,8 % (ohne TNF-Inkubation) auf 1,48 % (mit TNF-Inkubation). Die Konsequenz des erhöhten Eikosatriensäure (ω -9)-Gehalts bestand in einer Änderung des 20:4 (Arachidonsäure) / 20:3 (ω -9)-Verhältnis von 11,4:1 (Kontrolle) auf 3,0:1 (+TNF) (**Abb. 5.E1**).

Bei Betrachtung des Arachidonsäure-Gehaltes in den einzelnen Versuchsgruppen (**Abb. 5.B1**) ist ein deutlicher Rückgang unter Stimulation von TNF- α zu sehen. Bei Vorinkubation mit Arachidonsäure ist ein Anstieg derselben trotz TNF- α -Applikation deutlich sichtbar. Der Schluß liegt nahe, dass somit bei Vorinkubation ein ausreichendes Angebot von Arachidonsäure vorhanden und die Bildung von Eikosatriensäure (ω -9) deutlich reduziert ist. Dies ist in **Abb. 5.E1** ersichtlich. Die Dokosatetraensäure (22:4 (ω -6)), ein

Produkt der Arachidonsäure-Kettenverlängerung, stieg nach Inkubation mit Arachidonsäure von 1,62 % auf 4,62 % an.

Ähnliche Resultate wie bei der Arachidonsäure konnten bei den ω -3-Fettsäuren Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure verzeichnet werden: Der Gehalt der jeweiligen Fettsäure stieg nach Inkubation über den des Kontrollwertes an (**Abb. 5.C1 und 5.D1**). Eikosapentaensäure erreichte nach Inkubation einen Wert, der dem vierfachen seines Kontrollwertes entspricht (von 1,23 % auf 4,91 %), bei Dokosahexaensäure erhöhte sich der Prozentsatz etwa auf das Zweifache des Ausgangswertes (von 4,79 % auf 10,86 %). Wie in **Abb. 5.F1** ersichtlich, kam es bei dem Verhältnis zwischen Arachidonsäure und den ω -3-Fettsäuren zu einer ω -3-Dominanz in den mit letzteren inkubierten Versuchsansätzen.

Bei den mit Eikosapentaensäure inkubierten Endothelzellen konnte ein Elongase-Metabolit von Eikosapentaensäure vermehrt festgestellt werden, die Dokosahexaensäure (22:5 (ω -3)). Ihr Gehalt betrug 3,2 % bei TNF- α -Stimulation, bei Zusatz von Eikosapentaensäure stieg der Wert auf 10,6 % an.

Tabelle 5.2 Fettsäureprofile der Gesamphospholipide

Fettsäure	Kontrolle	+ TNF- α	+ AA + TNF- α	+ EPA + TNF- α	+ DHA + TNF- α
14:0 Myristinsäure	1,42±0,35	2,12±0,49	2,03±0,35	1,60±0,54	1,94±0,70
16:0 Palmitinsäure	23,20±4,90	24,08±1,11	23,82±2,15	23,50±0,68	23,58±0,20
16:1 Palmitolensäure	2,13±0,67	2,98±0,76	2,44±0,14	1,57±0,77	2,16±0,57
18:0 Stearinsäure	17,99±2,11	18,92±1,12	17,46±1,01	17,56±0,76	17,47±0,48
18:1(ω -9) Ölsäure	24,38±0,99	23,12±3,52	22,64±1,43	22,11±1,15	22,33±0,45
18:2(ω -6) Linolsäure	2,36±1,16	1,83±1,03	1,50±0,35	2,05±0,57	1,65±0,31
20:1(ω -9) Eikosensäure	0,44±0,09	0,85±0,49	0,33±0,22	0,14±0,13	0,20±0,13
20:3(ω -9) Eikosatriensäure	0,80±0,45	2,28±0,91	0,89±0,72	0,82±0,70	0,88±0,71
20:3(ω -6) Eikosatriensäure	2,16±0,14	1,14±0,38	1,71±0,47	1,63±0,35	1,65±0,29
20:4(ω -6) Arachidonsäure	9,17±1,73	6,85±0,86 ^a	10,48±1,61 ^c	5,94±0,43	5,75±0,54
20:5(ω -3) Eikosapentaensäure (EPA)	1,23±0,19	0,91±0,33 ^a	0,52±0,16	4,91±1,09 ^d	2,35±1,05
22:0 Beheninsäure	0,46±0,21	0,80±0,35	0,77±0,23	0,73±0,24	0,56±0,42
22:1(ω -9) Erucinsäure	0,13±0,13	0,55±0,30	0,49±0,29	0,14±0,09	0,21±0,14
22:4(ω -6) Dokosatetraensäure	1,62±0,53	2,80±2,02	4,62±1,39	2,29±1,39	1,59±0,91
22:5(ω -3) Dokosapentaensäure	3,86±0,25	3,18±0,23	3,00±0,50	10,60±2,13	3,74±1,20
22:6(ω -3) Dokosahexaensäure (DHA)	4,79±0,96	3,73±0,76 ^a	3,34±0,61	2,86±0,18	10,86±3,73 ^d
24:0 Lignocerinsäure	1,76±0,49	2,24±0,44	1,96±0,42	1,81±0,44	1,83±0,44
24:1 Nervensäure	1,38±0,61	0,80±0,62	1,08±0,94	1,20±0,79	0,98±0,65

Der relative Gehalt jeder einzelnen Fettsäure ist in Prozent angegeben, bezogen auf alle Fettsäuren, die in der Phospholipidfraktion des zellulären Lipidextraktes nachgewiesen wurden (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Signifikanzen für den Vergleich mit der Kontrollgruppe: ^a p < 0,01. Signifikanzen für den Vergleich mit der TNF- α -Gruppe: ^c p < 0,05, ^d p < 0,01. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α).

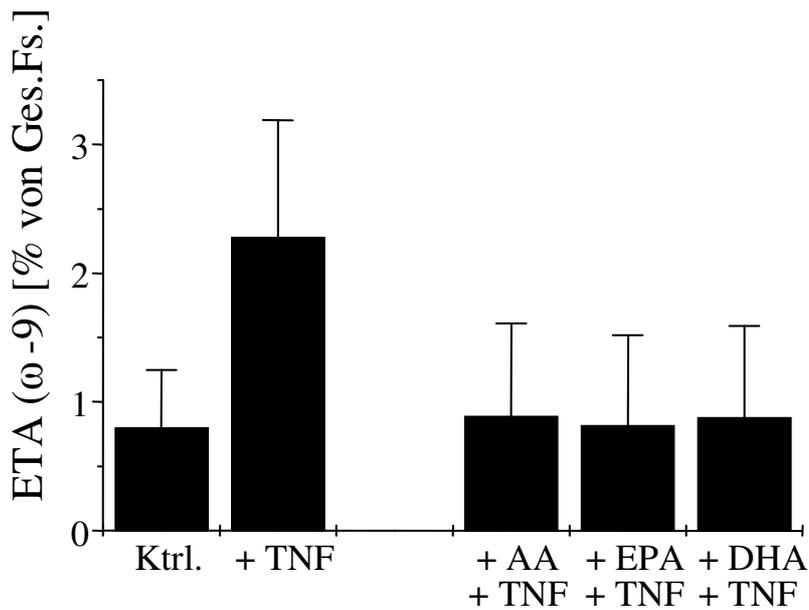


Abb. 5.A1: Der Anteil von Eikosatriensäure (ω -9) in Prozent der Gesamtphospholipide bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

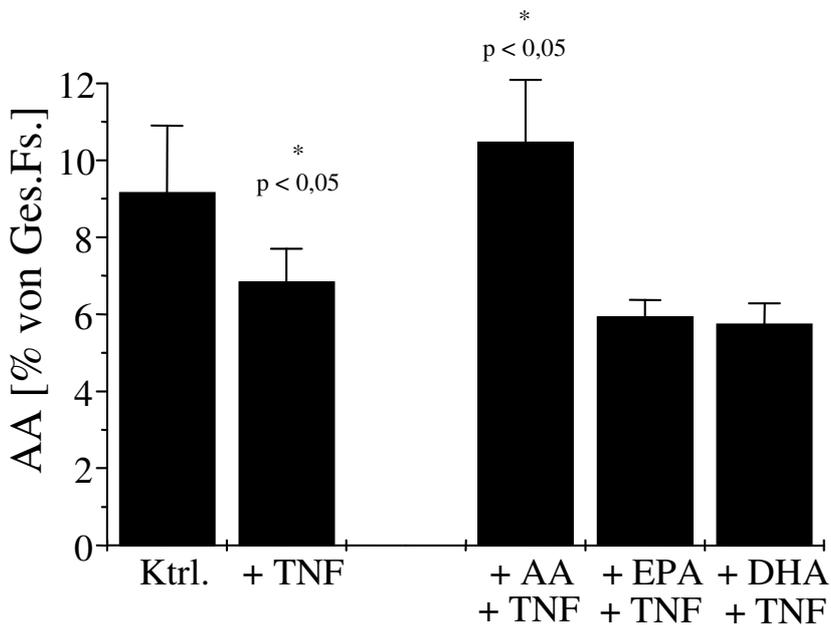


Abb. 5.B1: Der Anteil von Arachidonsäure in Prozent der Gesamtphospholipide bei den verschiedenen Versuchsansätzen (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanz der Arachidonsäure-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

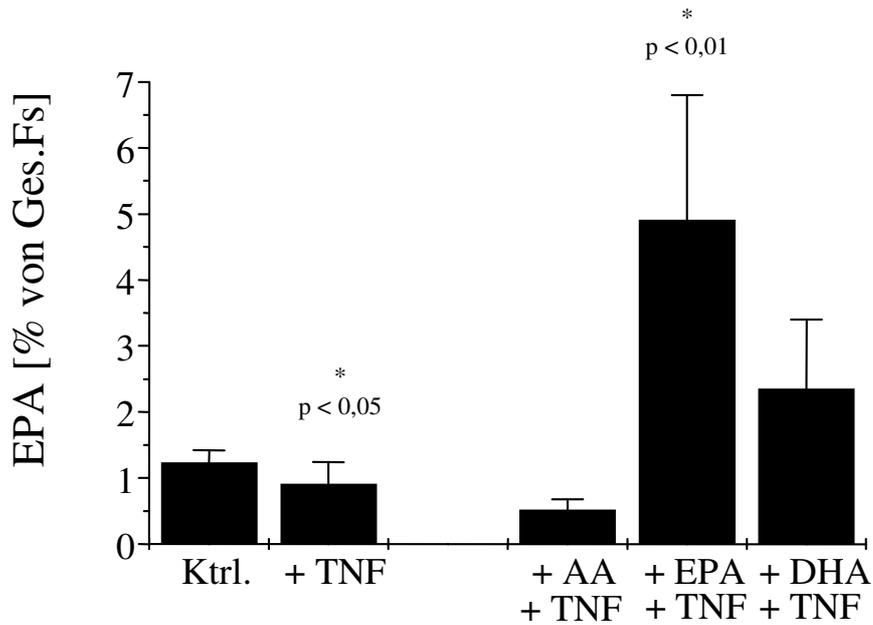


Abb. 5.C1: Der Anteil von Eikosapentaensäure in Prozent der Gesamtphospholipide bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanz der Eikosapentaensäure bezieht sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumornekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

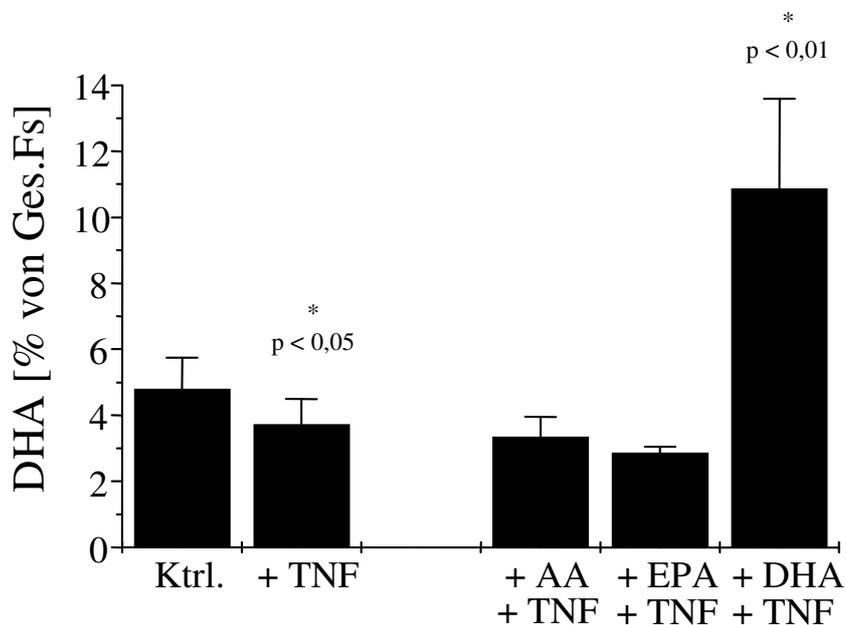


Abb. 5.D1: Der Anteil von Dokosahexaensäure in Prozent der Gesamtphospholipide bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanz der Dokosahexaensäure-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumornekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

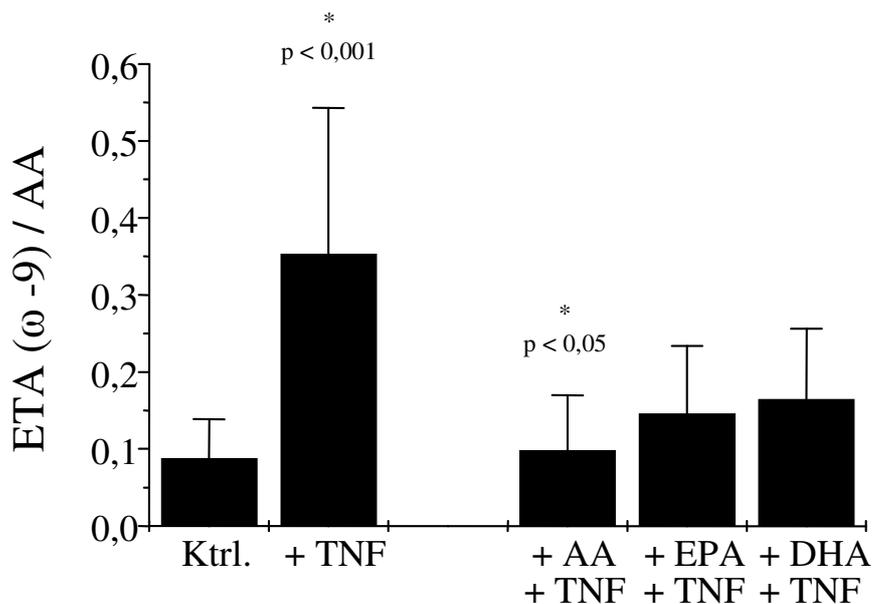


Abb. 5.E1: Dargestellt ist das Verhältnis Arachidonsäure zu Eikosatriensäure (ω -9) in den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanz der Arachidonsäure-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Eikosatriensäure (ETA), Dokosahexaensäure (DHA).

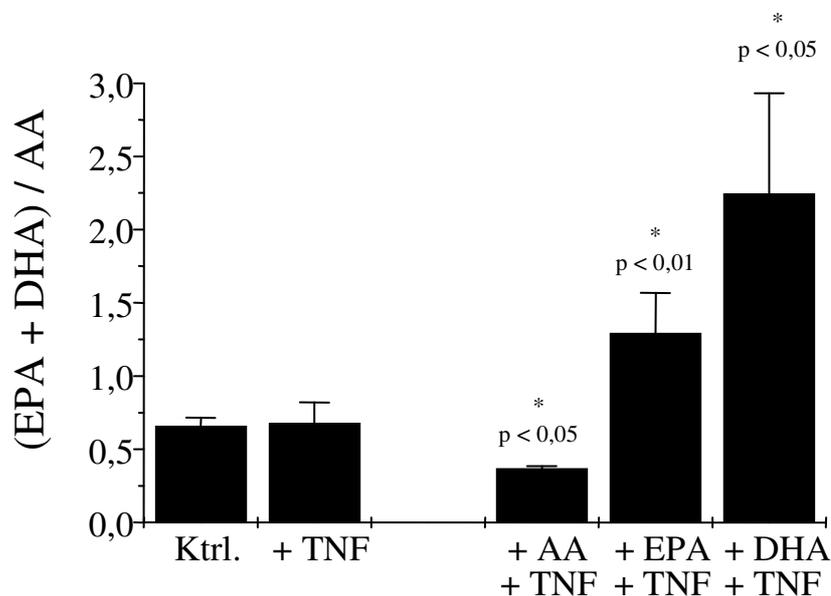


Abb. 5.F1: Dargestellt ist das Verhältnis Eikosapentaensäure +Dokosahexaensäure zu Arachidonsäure in den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanzen der essentiellen-Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

5.4.2 *Das Profil der Fettsäuren in Phosphatidylcholin*

Wie in **Tabelle 5.3** ersichtlich, sind die im Phosphatidylcholin-Pool vorherrschenden Fettsäuren Palmitinsäure, Ölsäure und Stearinsäure, wobei Palmitinsäure in allen Versuchsanordnungen einen Anteil von etwa 40 % besitzt. Die Ölsäure stellt etwa 30 % des Phosphatidylcholins, während Stearinsäure durchschnittlich 7 % des Gesamtanteils bestimmt.

Bei Betrachtung der essentiellen Fettsäuren fällt auf, dass Arachidonsäure, die in der Kontrollgruppe einen Anteil von 3,60 % hat, nach Inkubation mit Arachidonsäure auf 4,97 % steigt. Dieser geringe Anstieg kann begründet sein in der schnellen Metabolisierung dieser Fettsäure. Die 22:4 (ω -6) Dokosatetraensäure, ein Elongase-Metabolit von Arachidonsäure, erfuhr ebenfalls einen bescheidenen Anstieg im Vergleich zu der mit TNF- α inkubierten Kontrollgruppe um 0,39 %.

Eikosapentaensäure ist mit nur 0,66 % in der Kontrollgruppe vertreten, nach Inkubation mit dieser Fettsäure stieg ihr Anteil auf 4,33 %, ebenso wie der Anteil von 22:5 (ω -3) Dokosapentaensäure angestiegen ist. Ebenfalls war ein leichter Anstieg von Eikosapentaensäure bei den mit Dokosahexaensäure inkubierten Proben sichtbar. Eine Erklärung für diese Feststellung liefert die Interkonversionstheorie, die besagt, dass sowohl Eikosapentaensäure zu Dokosahexaensäure umgewandelt werden kann als auch Dokosahexaensäure zu Eikosapentaensäure.

Dokosahexaensäure hat einen 0,13 %-Anteil in der Kontrollgruppe, der auch nach Inkubation mit dieser Fettsäure zwar auf den höchsten Wert von allen Versuchsanordnungen stieg, aber mit 0,17 % immer noch einen recht geringen Anteil darstellt.

Der auch bei den Gesamphospholipiden dargestellte Trend der einzelnen Fettsäuren kann ebenfalls in den **Abbildungen 5.A2 bis 5.F2** beobachtet werden. Der Zusatz der einzelnen Fettsäuren zu den HUVECs ließ den Fettsäuregehalt der jeweils applizierten Fettsäure ansteigen. (**Abb. 5.A2-5.D2**). In der **Abbildung 5.E2** ist das Verhältnis zwischen Arachidonsäure und Eikosatriensäure (ω -9) in den einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. In der mit TNF- α stimulierten Anordnung ist ein höherer Anteil von Eikosatriensäure (ω -9) gemessen worden, wohingegen ein ausreichender Gehalt von essentiellen Fettsäuren in den vorinkubierten Anordnungen einen Anstieg der Eikosatriensäure (ω -9) verhindert hat. **Die Abbildung 5.F2** zeigt das Verhältnis der ω -3-Fettsäuren zur

Arachidonsäure, wobei das Verhältnis am geringsten unter Arachidonsäure-Inkubation und am höchsten unter ω -3-Fettsäure-Vorbehandlung ist.

Tabelle 5.3 Fettsäureprofile von Phosphatidylcholin

Fettsäure	Kontrolle	+ TNF- α	+ AA + TNF- α	+ EPA + TNF- α	+ DHA + TNF- α
14:0 Myristinsäure	3,36 \pm 0,82	4,57 \pm 0,63	4,62 \pm 0,63	3,97 \pm 0,78	4,61 \pm 0,27
16:0 Palmitinsäure	37,69 \pm 1,91	40,68 \pm 2,02	39,31 \pm 1,47	36,83 \pm 0,53	39,41 \pm 2,08
16:1 Palmitolensäure	3,68 \pm 1,33	5,33 \pm 0,79	4,75 \pm 0,31	3,20 \pm 0,91	4,50 \pm 0,36
18:0 Stearinsäure	9,19 \pm 1,56	7,93 \pm 1,14	6,58 \pm 1,54	5,81 \pm 1,91	6,71 \pm 1,43
18:1(ω -9) Ölsäure	30,17 \pm 2,90	31,45 \pm 0,95	29,08 \pm 1,43	26,48 \pm 3,69	30,01 \pm 1,43
18:2(ω -6) Linolsäure	2,94 \pm 1,54	1,61 \pm 0,09	1,98 \pm 0,33	2,74 \pm 0,73	2,13 \pm 0,38
20:1(ω -9) Eikosensäure	0,60 \pm 0,09	0,76 \pm 0,24	0,43 \pm 0,21	0,38 \pm 0,24	0,40 \pm 0,24
20:3(ω -9) Eikosatriensäure (ω -9)	0,44 \pm 0,15	1,15 \pm 0,13 ^b	0,42 \pm 0,33 ^d	0,34 \pm 0,21 ^d	0,33 \pm 0,24 ^d
20:3(ω -6) Eikosatriensäure (ω -6)	1,60 \pm 0,32	0,69 \pm 0,18 ^a	1,53 \pm 0,28 ^d	1,29 \pm 0,29 ^c	1,12 \pm 0,15
20:4(ω -6) Arachidonsäure	3,60 \pm 1,10	1,95 \pm 0,30 ^b	4,97 \pm 0,49 ^c	2,63 \pm 0,28 ^c	2,12 \pm 0,06
20:5(ω -3) Eikospentaensäure (EPA)	0,66 \pm 0,09	0,34 \pm 0,07 ^a	0,34 \pm 0,07	4,33 \pm 1,32 ^e	1,67 \pm 0,68 ^d
22:0 Beheninsäure	0,21 \pm 0,03	0,15 \pm 0,02	0,14 \pm 0,03	0,16 \pm 0,03	0,07 \pm 0,05
22:1(ω -9) Erucinsäure	0,87 \pm 0,49	0,47 \pm 0,09	1,94 \pm 0,23	0,93 \pm 0,23 ^c	0,37 \pm 0,11
22:4(ω -6) Dokosatetraensäure	1,92 \pm 0,71	1,11 \pm 0,20	1,50 \pm 0,14 ^c	8,46 \pm 2,88 ^e	1,82 \pm 0,29 ^c
22:5(ω -3) Dokosapentaensäure	1,68 \pm 0,47	0,93 \pm 0,15 ^a	1,11 \pm 0,19	1,20 \pm 0,25	3,46 \pm 1,03 ^c
22:6(ω -3) Dokosahexaensäure (DHA)	0,13 \pm 0,03	0,10 \pm 0,03 ^b	0,12 \pm 0,03	0,08 \pm 0,05	0,17 \pm 0,09

Der relative Gehalt jeder einzelnen Fettsäure ist in Prozent angegeben, bezogen auf alle Fettsäuren, die in der Phospholipidfraktion des zellulären Lipidextraktes nachgewiesen wurden (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6).

Signifikanzen für den Vergleich mit der Kontrollgruppe: ^a p < 0,01 und ^b p < 0,001. Signifikanzen für den Vergleich mit der TNF- α -Gruppe: ^c p < 0,05, ^d p < 0,01 und ^e p < 0,001.

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α).

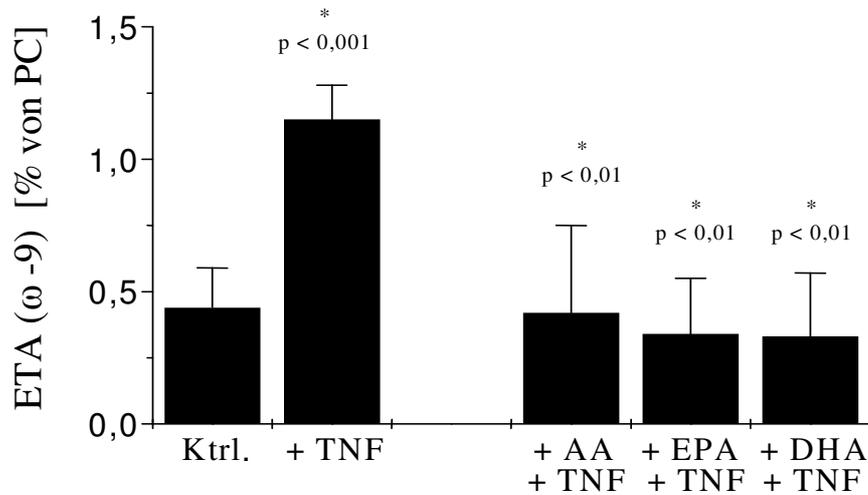


Abb. 5.A2: Der Anteil von Eikosatriensäure (ω -9) in Prozent des Phosphatidylcholins in den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanzen der essentiellen-Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosa-hexaensäure (DHA).

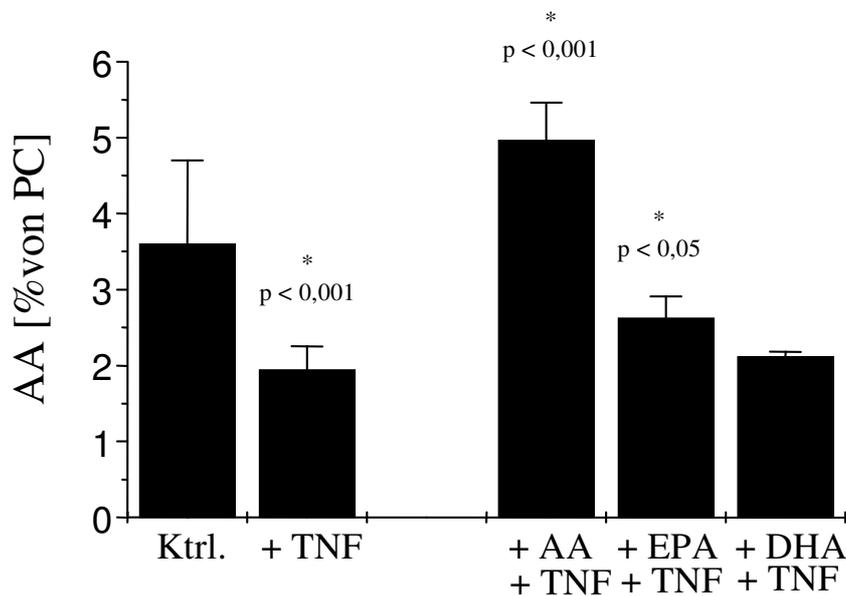


Abb. 5.B2: Der Anteil von Arachidonsäure in Prozent des Phosphatidylcholins in den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanz der Arachidonsäure- und Eikosapentaensäure-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosa-hexaensäure

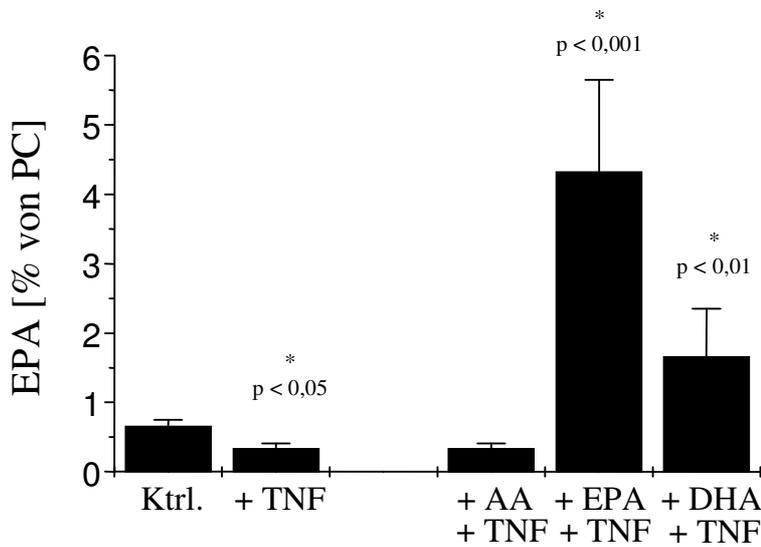


Abb. 5.C2: Der Anteil von Eikosapentaensäure in Prozent des Phosphatidylcholins in den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanzen der essentiellen Fettsäuren-Gruppen bezieht sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

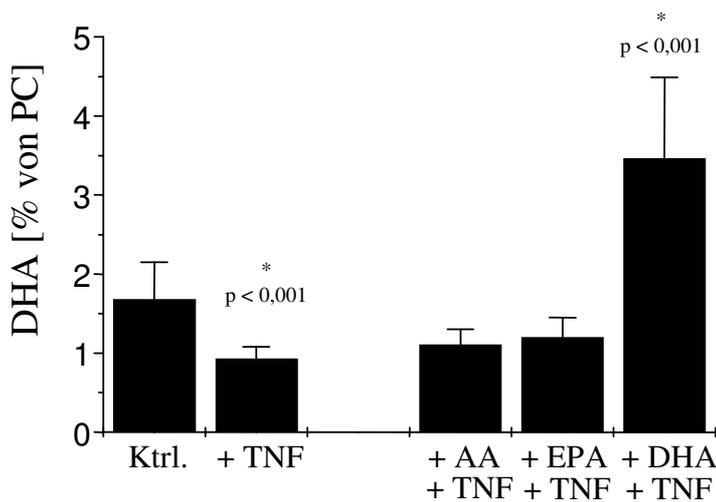


Abb. 5.D2: Der Anteil von Dokosahexaensäure in Prozent des Phosphatidylcholins in den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanz der Dokosahexaensäure-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

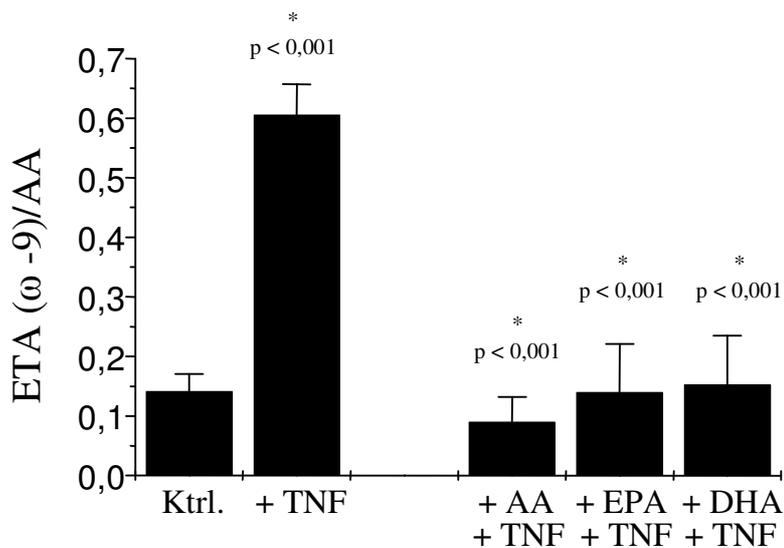


Abb. 5.E2: Dargestellt ist das Verhältnis Eikosatriensäure (ω -9) zu Arachidonsäure in Prozent des Phosphatidylcholins in den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanzen der essentiellen Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosaheptaensäure (DHA).

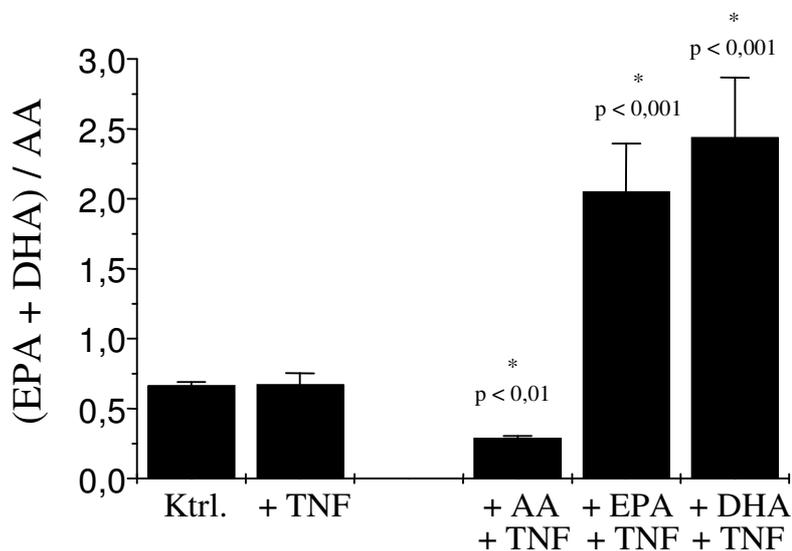


Abb. 5.F2: Dargestellt ist das Verhältnis Eikosapentaensäure + Dokosaheptaensäure zu Arachidonsäure bei den verschiedenen Versuchsansätzen im Phosphatidylinositol. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanzen der essentiellen Fettsäure-Gruppe beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosaheptaensäure (DHA).

5.4.3 Das Profil der Fettsäuren in Phosphatidylethanolamin

Das Phosphatidylethanolamin in der Kontrolle beinhaltet größere Mengen an langkettigen essentiellen Fettsäuren. So ist die Arachidonsäure mit 17,01 % vertreten, Eikosa-pentaensäure mit 3,07 % und Dokosahexaensäure hat einen Anteil von 11,47 % am Phosphatidylethanolamin (**Tabelle 5.4**). Genau wie im Phosphatidylcholin-Pool führte die Vorinkubation mit TNF- α zu einer auffälligen Reduktion der polyunsaturierten Fettsäuren in der Phosphatidylethanolamin-Fraktion (18:2: -31,53 %; 20:3 (ω -6): -35,81 %; 20:4: -19,45 %; 20:5: -26,05 %; 22:4 (ω -6): -24,43 %; 22:5 (ω -3): -16,70 %; 22:6 (ω -3): 17,87 %). Nach der Inkubation mit TNF- α konnte ein Anstieg der Eikosatriensäure (20:3 (ω -9)) von 0,81 % auf 3,79 % festgestellt werden.

Auch hier besitzen die einzelnen Fettsäuren den jeweils höchsten Anteil nach Inkubation mit ihnen (**Abb. 5.B3-5.D3**). Die erhöhte Produktion von Eikosatriensäure (ω -9) unter Stimulation mit TNF- α konnte ebenfalls durch Vorinkubation mit den essentiellen Fettsäuren abgeschwächt werden (**Abb. 5.A3**). So betrug der Anteil von Eikosatriensäure (ω -9) unter TNF- α -Inkubation 3,79 %, während er bei der Vorinkubation mit Fettsäuren nicht über 1,05 % bei der Arachidonsäure-Gruppe stieg (**Abb. 5.A3-5.F3**). Die **Abbildung E3** zeigt anschaulich, wie der Gehalt an Eikosatriensäure (ω -9) unter alleiniger TNF- α -Vorbehandlung ansteigt und unter ausreichender Fettsäure-Supplementierung fast nicht vorhanden ist. Die Grafik in **Abbildung 5.F3** demonstriert das Verhältnis von ω -3- zu ω -6-Fettsäuren in den einzelnen Versuchsanordnungen, dass in der Kontrollgruppe sowie unter TNF- α -Stimulation gleich ist. Im Arachidonsäure-Versuchsansatz ist das Verhältnis mit 0,5 % sehr klein, da die Arachidonsäure überwiegt. Umgekehrt ist es unter Vorinkubation mit Dokosahexaensäure.

Tabelle 5.4 Fettsäureprofile im Phosphatidylethanolamin

Fettsäure	Kontrolle	+ TNF- α	+ AA + TNF- α	+ EPA + TNF- α	+ DHA + TNF- α
14:0	0,38 \pm 0,04	0,49 \pm 0,80	0,42 \pm 0,08	0,52 \pm 0,02	0,57 \pm 0,01
16:0	7,31 \pm 1,06	8,82 \pm 1,10	9,50 \pm 0,61	9,18 \pm 0,91	9,34 \pm 0,50
16:1	1,14 \pm 0,56	1,93 \pm 0,34	1,24 \pm 0,23	1,64 \pm 0,01	1,22 \pm 0,23
18:0	21,21 \pm 1,38	21,98 \pm 2,15	23,38 \pm 2,80	22,52 \pm 0,47	22,57 \pm 0,97
18:1(ω -9)	19,36 \pm 2,44	22,61 \pm 2,45	21,40 \pm 2,11	20,37 \pm 0,38	20,21 \pm 0,12
18:2(ω -6)	1,30 \pm 0,61	0,89 \pm 0,26	0,96 \pm 0,33	1,41 \pm 0,21	1,25 \pm 0,04
20:1(ω -9)	0,44 \pm 0,05	0,87 \pm 0,44	0,44 \pm 0,26	0,75 \pm 0,01	0,75 \pm 0,05
20:3(ω -9)	0,81 \pm 0,51	3,79 \pm 1,11 ^b	1,05 \pm 0,53 ^d	0,19 \pm 0,04 ^c	0,29 \pm 0,09 ^c
20:3(ω -6)	2,15 \pm 0,18	1,38 \pm 0,22 ^a	1,79 \pm 0,36	1,93 \pm 0,35	1,68 \pm 0,02
20:4(ω -6)	17,01 \pm 2,21	13,70 \pm 1,39 ^a	17,23 \pm 1,17 ^c	8,91 \pm 0,23 ^d	7,84 \pm 0,15 ^d
20:5(ω -3)	3,07 \pm 0,43	2,27 \pm 0,70	1,19 \pm 0,20 ^c	7,91 \pm 0,99 ^e	4,48 \pm 0,10 ^d
22:1(ω -9)	0,79 \pm 0,09	0,78 \pm 0,18	0,34 \pm 0,07 ^c	0,05 \pm 0,02 ^d	0,11 \pm 0,07 ^d
22:4(ω -6)	3,56 \pm 1,37	2,69 \pm 0,47	5,26 \pm 0,24 ^e	2,47 \pm 0,37	1,29 \pm 0,21 ^d
22:5(ω -3)	8,62 \pm 0,72	7,18 \pm 0,82	5,80 \pm 0,57	16,00 \pm 1,29 ^e	5,41 \pm 0,71
22:6(ω -3)	11,47 \pm 0,80	9,42 \pm 1,41	7,12 \pm 0,64 ^c	5,18 \pm 0,64 ^d	21,13 \pm 1,02 ^e
24:0	0,43 \pm 0,19	0,48 \pm 0,10	0,32 \pm 0,04	0,41 \pm 0,03	0,39 \pm 0,11

Der relative Gehalt jeder einzelnen Fettsäure ist in Prozent angegeben, bezogen auf alle Fettsäuren, die in der Phospholipidfraktion des zellulären Lipidextraktes nachgewiesen wurden (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6).

Signifikanzen für den Vergleich mit der Kontrollgruppe: ^a p < 0,01 und ^b p < 0,001. Signifikanzen für den Vergleich mit der TNF- α -Gruppe: ^c p < 0,05, ^d p < 0,01 und ^e p < 0,001. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α).

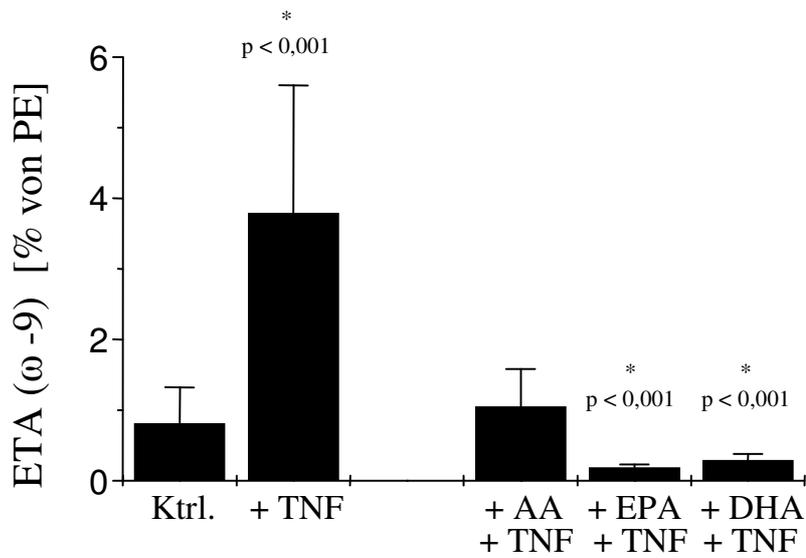


Abb. 5.A3: Der Anteil von Eikosatriensäure (ω -9) in Prozent des Phosphatidylethanolamins bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanz der essentiellen Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosaheptaensäure (DHA).

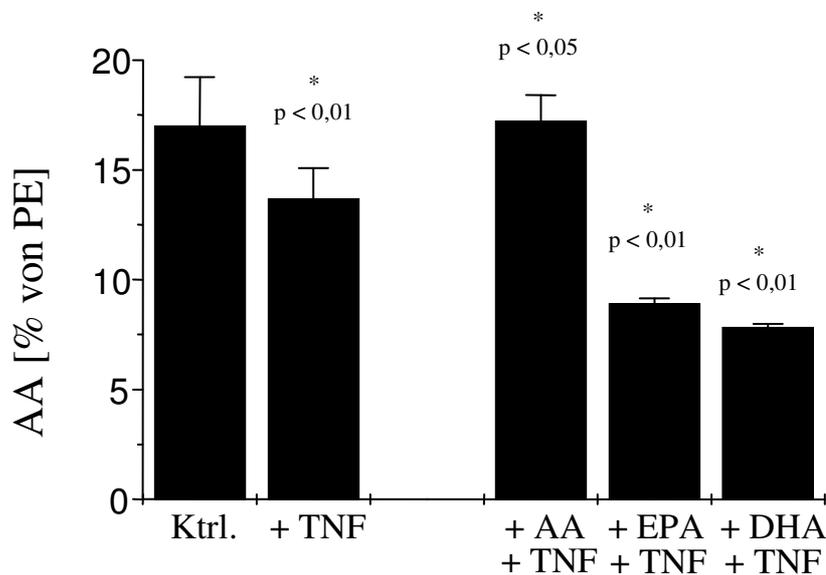


Abb. 5.B3: Der Anteil von Arachidonsäure in Prozent des Phosphatidylethanolamins bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanz der essentiellen Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosaheptaensäure (DHA).

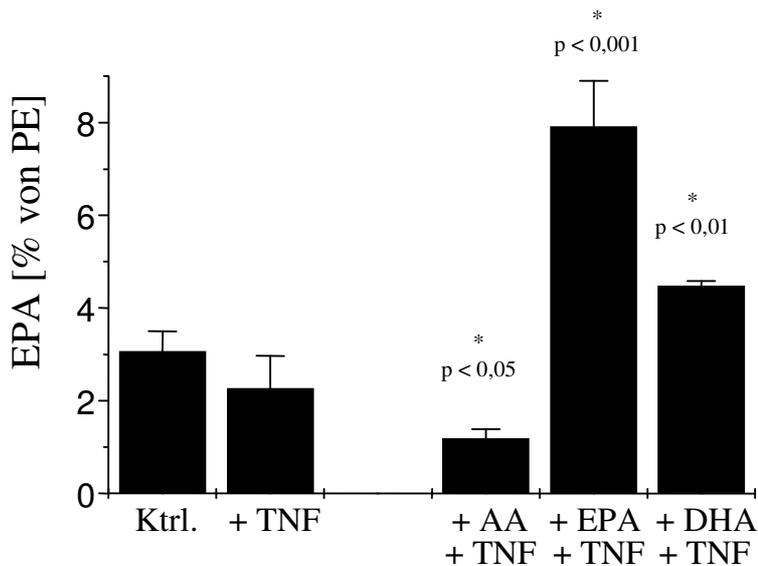


Abb. 5.C3: Der Anteil von Eikosapentaensäure in Prozent des Phosphatidylethanolamins bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanzen der essentiellen Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

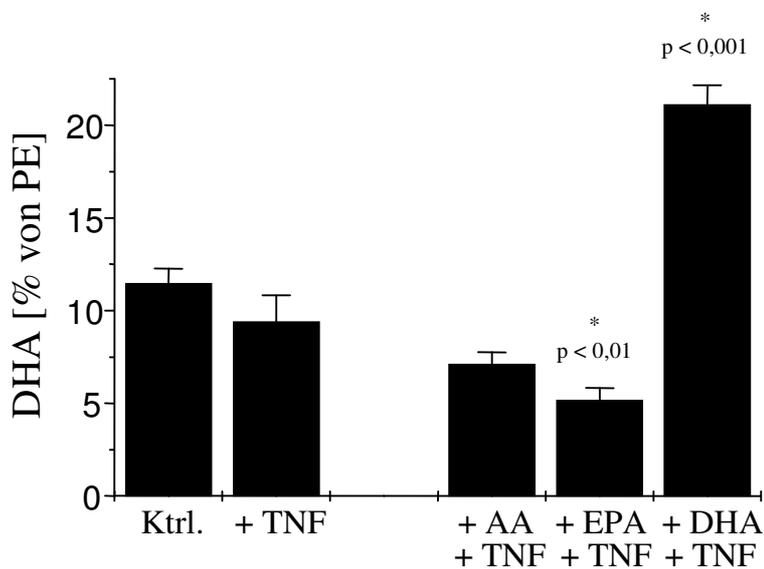


Abb. 5.D3: Der Anteil von Dokosahexaensäure in Prozent des Phosphatidylethanolamins bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanzen der essentiellen Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

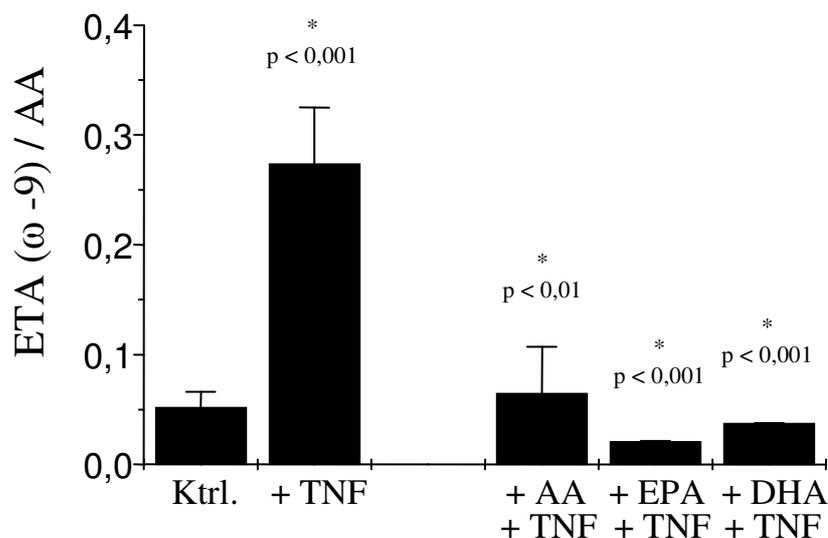


Abb. 5.E3: Dargestellt ist das Verhältnis Eikosatriensäure (ω -9) zu Arachidonsäure bei den verschiedenen Versuchsansätzen im Phosphatidylethanolamin. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanzen der essentiellen Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosaheptaensäure (DHA).

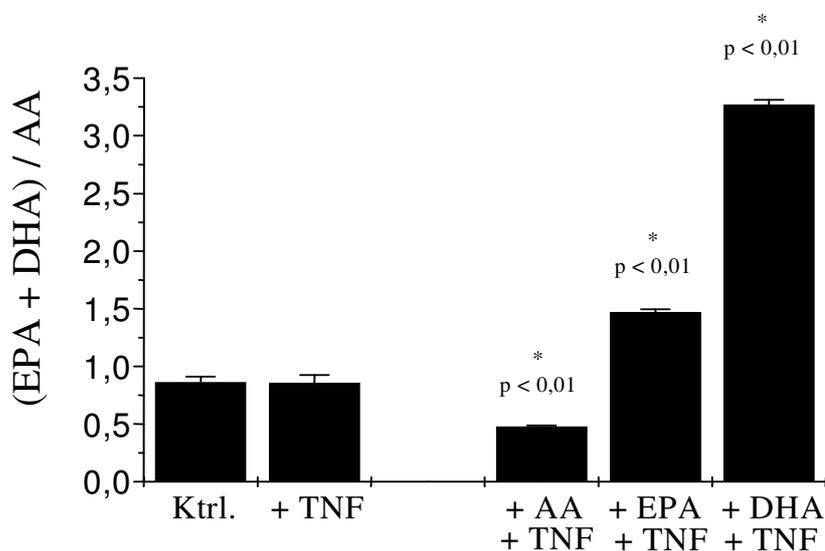


Abb. 5.F3: Dargestellt ist das Verhältnis Eikosapentaensäure + Dokosaheptaensäure zu Arachidonsäure bei den verschiedenen Versuchsansätzen im Phosphatidylethanolamin. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanzen der essentiellen Fettsäure-Gruppe beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosaheptaensäure (DHA).

5.4.4 Das Profil der Fettsäuren in Phosphatidylinositol

Den größten Anteil der Fettsäuren in der Phosphatidylinositol-Fraktion der Kontrollgruppe besitzt Stearinsäure (41,71 %), gefolgt von Arachidonsäure (26,08 %). Ölsäure stellt einen Anteil von 9,75 % (**Tabelle 5.5**). Die Vorbehandlung mit TNF- α führt ebenfalls zu dem in den anderen Phospholipid-Pools beschriebenen Verlust der essentiellen Fettsäuren. Die Eikosatriensäure (20:3 (ω -9)) steigt von 3,74 % in der Kontrolle auf 11,06 % in dem mit TNF- α -stimulierten Versuch. Bei Vorbehandlung mit den einzelnen Fettsäuren sind die Ergebnisse mit denen der Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin-Fraktion vergleichbar (**Abbildungen 5.A4-5.F4**). Auffallend ist die in **Abbildung 5.B4** gezeigte Verteilung der Arachidonsäure, die in den beiden Ansätzen mit Eikosapentaensäure (EPA) und Dokosahexaensäure (DHA) noch einen - verglichen mit Phosphatidylcholin und -ethanolamin - recht hohen Anteil besitzt. Diese Anteile übertreffen den in der mit TNF- α stimulierten Gruppe, letzterer weist mit 17,86 % den niedrigsten Gehalt auf. Eine Erklärung wäre, dass die Arachidonsäure als second messenger bereits verbraucht worden ist.

Die **Abbildung 5.E4** zeigt wie in den vorangegangenen Phospholipid-Fraktionen das Verhältnis von Eikosatriensäure (ω -9) zu Arachidonsäure, auch hier ist ein Überwiegen von ersterer nur unter alleiniger TNF-Stimulation zu sehen. Auch in der **Abbildung 5.F4** zeigt sich unter ω -3-Fettsäure-Inkubation eine Verschiebung des Verhältnisses ω -3/ ω -6 zugunsten der ω -3-Fettsäuren.

Tabelle 5.5: Fettsäureprofile im Phosphatidylinositol

Fettsäure	Kontrolle	+ TNF	+ AA + TNF	+ EPA + TNF	+ DHA + TNF
14:0	0,21±0,09	0,34±0,25	0,48±0,10	0,46±0,28	0,34±0,03
16:0	3,11±0,40	4,20±0,47	4,37±0,59	4,33±0,66	4,34±0,81
16:1	0,45±0,19	0,80±0,16	0,47±0,21	0,52±0,42	0,36±0,24
18:0	41,71±1,14	39,81±0,97	39,57±1,71	38,82±0,77	44,47±0,60 ^d
18:1(ω-9)	9,75±2,72	13,41±1,36	11,62±0,82	11,19±0,79	11,46±0,86
18:2(ω-6)	0,67±0,25	0,60±0,14	0,59±0,11	0,92±0,12	0,72±0,11
20:2(ω-6)	0,41±0,27	1,04±0,47	0,16±0,10	0,09±0,06 ^d	0,01±0,01 ^d
20:3(ω-9)	3,74±0,55	11,06±4,06 ^b	2,82±1,63 ^d	2,52±1,78	3,62±1,98 ^d
20:3(ω-6)	5,05±1,79	3,38±1,17	2,67±0,53	2,54±0,40 ^d	3,60±0,80
20:4(ω-6)	26,08±3,17	17,86±2,88 ^a	27,09±5,12 ^c	20,58±2,99	18,72±2,47
20:5(ω-3)	0,54±0,41	0,37±0,04	0,14±0,08 ^d	6,16±2,28 ^c	1,95±1,02 ^d
22:4(ω-6)	1,86±0,07	1,52±0,22	3,21±0,25 ^c	1,22±0,15	0,94±0,40
22:5(ω-3)	3,48±0,51	2,66±0,64	3,63±0,74	8,06±2,59 ^d	2,94±0,20
22:6(ω-3)	2,31±0,79	1,69±0,58	2,52±0,37	1,42±0,18	5,96±1,06 ^c

Der relative Gehalt jeder einzelnen Fettsäure ist in Prozent angegeben, bezogen auf alle Fettsäuren, die in der Phospholipidfraktion des zellulären Lipidextraktes nachgewiesen wurden (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6).

Signifikanzen für den Vergleich mit der Kontrollgruppe: ^a p < 0,01 und ^b p < 0,001. Signifikanzen für den Vergleich mit der TNF-α-Gruppe: ^c p < 0,05, ^d p < 0,01 und ^e p < 0,001. Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α).

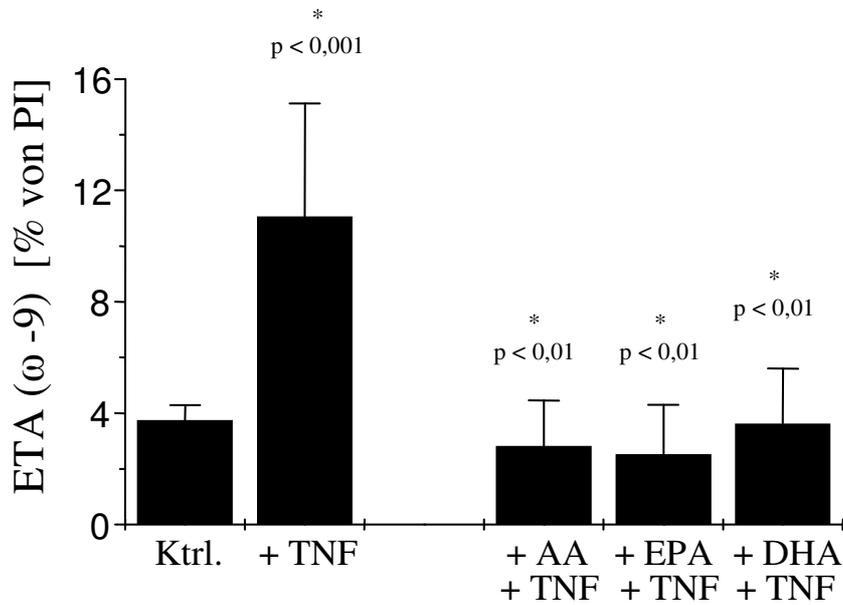


Abb. 5.A4: Der Anteil von Eikosatriensäure (ω -9) in Prozent des Phosphatidylinositols bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanz der essentiellen Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

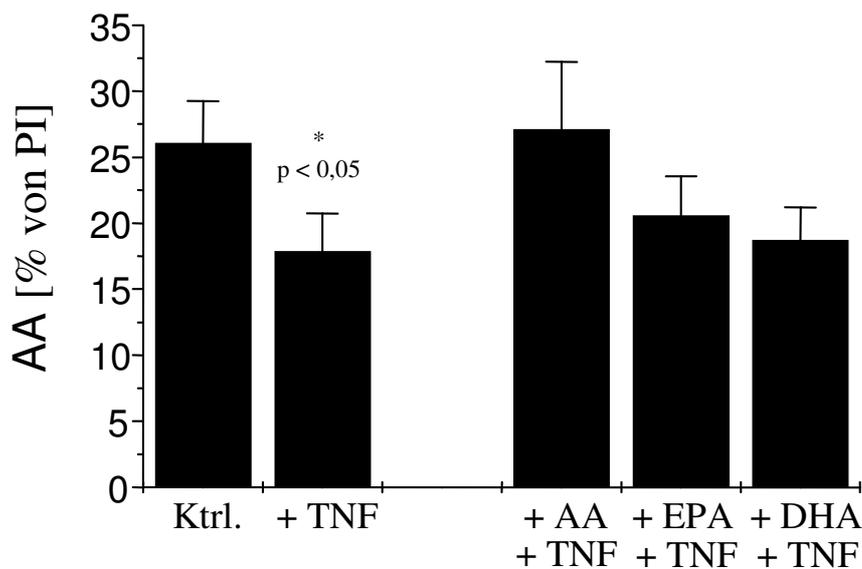


Abb. 5.B4: Der Anteil von Arachidonsäure in Prozent des Phosphatidylinositols bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppen bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

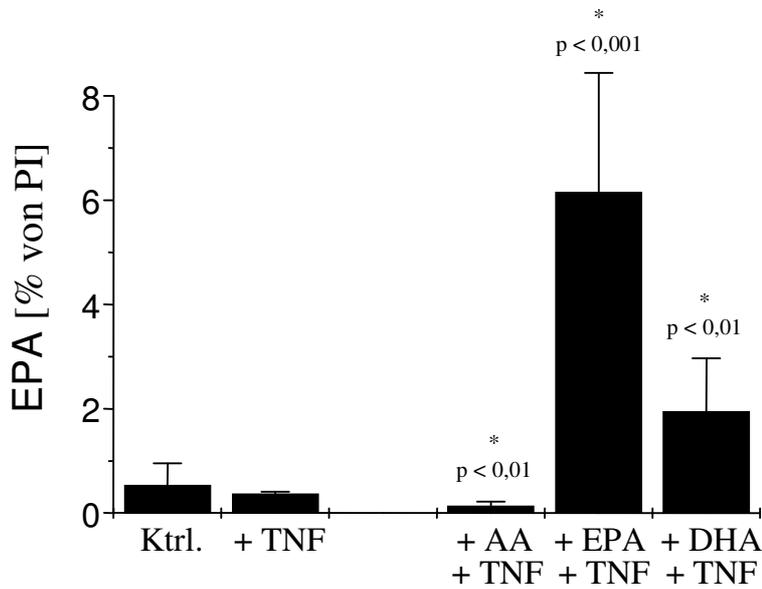


Abb. 5.C4: Der Anteil von Eikosapentaensäure in Prozent des Phosphatidylinositols bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanzen der essentiellen Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosa-hexaensäure (DHA).

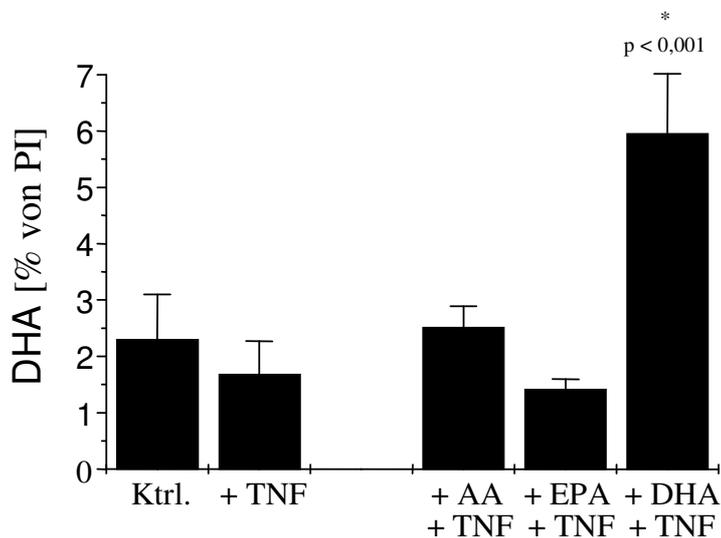


Abb. 5.D4: Der Anteil von Dokosa-hexaensäure in Prozent des Phosphatidylinositols bei den verschiedenen Versuchsansätzen. (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der Dokosa-hexaensäure-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosa-hexaensäure (DHA).

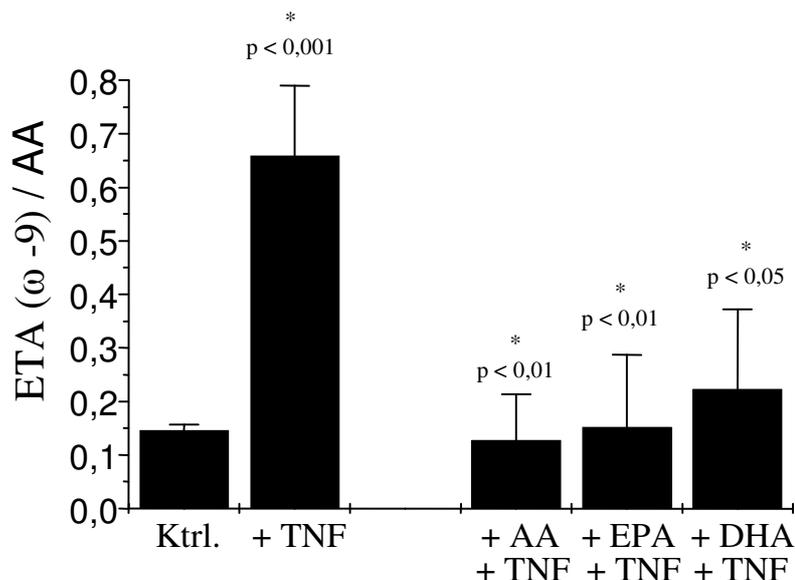


Abb. 5.E4: Dargestellt ist das Verhältnis Eikosatriensäure (ω -9) zu Arachidonsäure bei den verschiedenen Versuchsansätzen im Phosphatidylinositol. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanz der TNF-Gruppe bezieht sich auf den Vergleich mit der Kontrollgruppe, die Signifikanzen der essentiellen Fettsäure-Gruppen beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

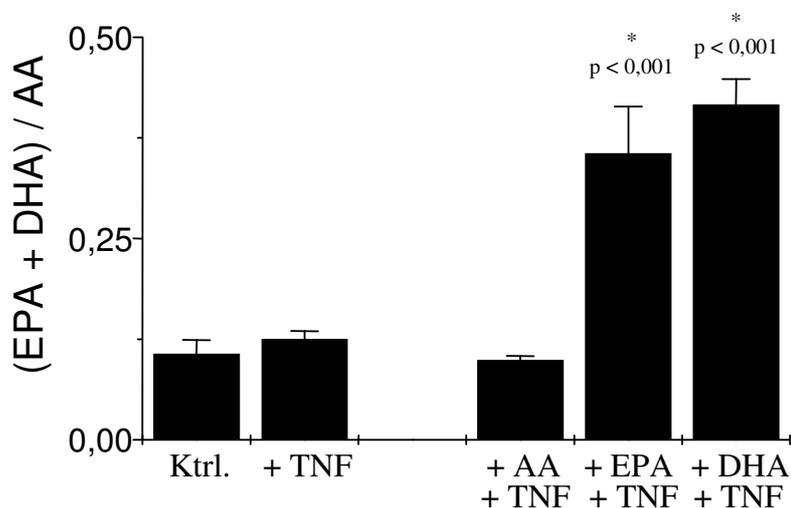


Abb. 5.F4: Dargestellt ist das Verhältnis Eikosapentaensäure + Dokosahexaensäure zu Arachidonsäure bei den verschiedenen Versuchsansätzen im Phosphatidylinositol. (Mittelwert \pm Standardabweichung, N = 6). Die Signifikanzen der essentiellen Fettsäure-Gruppe beziehen sich auf den Vergleich mit der TNF-Gruppe. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

5.4.5 Das Profil der Fettsäuren in Phosphatidylserin

Das Phosphatidylserin der Kontrollgruppe beinhaltet hauptsächlich Stearinsäure mit 36,39 % und Ölsäure (21,22 %). Lignocerinsäure hat einen Anteil von 8,75 %, Palmitinsäure ist mit 5,61 % vertreten (**Tabelle 5.6**). Wieder verursachte die Inkubation mit TNF- α eine Reduktion der essentiellen Fettsäuren und einen Anstieg von Eikosatriensäure (ω -9). Nur geringe Mengen an Arachidonsäure und Dokosahexaensäure konnten in der Phosphatidylserin-Fraktion der Kontrollgruppe gefunden werden; Eikosapentaensäure befand sich sogar nahe am Detektionslimit. Alle drei Fettsäuren fielen unter dem Einfluß von TNF- α weiter ab. Die Ergänzung mit jeder dieser Fettsäuren in den Versuchsanordnungen führte dagegen zu einer Erhöhung ihrer jeweiligen Anteile.

Tabelle 5.6: Fettsäureprofile des Phosphatidylserin

Fettsäure	Kontrolle	+ TNF	+ AA + TNF	+ EPA + TNF	+ DHA + TNF
14:0	0,29±0,07	0,57±0,03 ^a	0,82±0,45	0,78±0,42	0,86±0,16
16:0	5,61±1,66	8,96±0,75 ^a	11,66±3,21	9,83±5,44	10,42±0,57
16:1	0,91±0,44	1,48±0,35	0,96±0,64	0,73±0,37	0,62±0,44
18:0	36,39±1,10	35,18±1,15	34,42±2,37	33,14±1,36	34,03±1,43
18:1(ω-9)	21,22±4,13	22,08±1,17	20,02±2,74	19,66±0,37	22,17±1,56
18:2(ω-6)	1,14±0,53	0,93±0,28	1,08±0,29	1,10±0,53	0,83±0,26
20:0	0,67±0,94	0,62±0,03	0,40±0,19	0,55±0,27	0,42±0,28
20:1(ω-9)	0,47±0,19	0,37±0,03	0,20±0,13	0,20±0,10	0,17±0,10
20:3(ω-9)	0,14±0,11	0,19±0,04	0,18±0,09	0,18±0,06	0,18±0,10
20:3(ω-6)	2,95±0,26	2,92±0,94	1,99±0,49	1,94±0,45	2,62±0,16
20:4(ω-6)	2,09±1,15	1,06±0,16	1,99±0,42 ^c	1,16±0,28	1,47±0,26
20:5(ω-3)	0,07±0,05	0,11±0,02	0,06±0,03	0,70±0,48 ^c	0,08±0,05
22:0	2,67±0,61	2,34±0,41	2,48±0,58	2,42±0,78	3,03±0,17
22:1(ω-9)	0,79±0,16	0,53±0,09	0,59±0,21	0,48±0,36	0,49±0,10
22:4(ω-6)	8,20±1,70	7,62±1,12	9,16±1,59	7,71±2,93	7,13±2,70
22:5(ω-3)	3,67±1,09	3,48±0,69	2,02±0,26	8,67±2,40 ^c	2,61±0,93
22:6(ω-3)	3,81±1,27	1,98±1,15	1,92±0,28	2,71±1,18	2,41±0,34
24:0	8,75±1,53	9,37±1,41	9,98±0,67	8,00±0,23	9,15±2,02

Der relative Gehalt jeder einzelnen Fettsäure ist in Prozent angegeben, bezogen auf alle Fettsäuren, die in der Phospholipidfraktion des zellulären Lipidextraktes nachgewiesen wurden (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6).

Signifikanzen für den Vergleich mit der Kontrollgruppe: ^a p < 0,01. Signifikanzen für den Vergleich mit der TNF-α-Gruppe: ^c p < 0,05 und ^e p < 0,001. Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α).

5.4.6 Das Profil der Fettsäuren in Sphingomyelin

Sphingomyelin von unbehandelten HUVECs enthielt hauptsächlich Palmitinsäure (41,87 %), Lignocerinsäure (18,14 %), Nervonsäure (26,30 %) und Stearinsäure (4,87 %). Beheninsäure ist mit 5,66 % vertreten (**Tabelle 5.7**). Es konnten nur gesättigte und monoenoische Fettsäuren in diesem Phospholipid-Pool gefunden werden. Die Inkubation mit TNF- α verursachte nur eine geringe Veränderung der Fettsäure-Profile. Desweiteren konnten keine Anteile von essentiellen Fettsäuren unter einer Fettsäure-Vorinkubation nachgewiesen werden.

Tabelle 5.7: Fettsäureprofile im Sphingomyelin

Fettsäure	Kontrolle	+ TNF	+ AA + TNF	+ EPA + TNF	+ DHA + TNF
14:0	1,50±0,85	1,95±1,11	1,92±0,80	2,15±0,61	1,31±0,14
16:0	41,87±2,89	40,87±3,48	42,14±4,33	43,22±4,17	45,44±4,12
18:0	4,87±1,62	7,01±2,94	5,81±2,59	5,07±1,04	5,28±1,55
18:1(ω -9)	0,41±0,25	0,78±0,52	1,25±0,80	1,03±0,73	0,56±0,25
20:0	0,65±0,33	0,85±0,57	0,86±0,42	0,77±0,50	0,59±0,36
22:0	5,66±1,08	6,29±1,67	6,21±1,08	5,62±1,19	5,63±0,87
24:0	18,14±2,08	16,35±2,61	16,01±2,67	15,34±0,61	17,33±1,92
24:1	26,30±3,52	25,00±4,07	25,13±3,15	26,25±3,63	23,41±3,31

Der relative Gehalt jeder einzelnen Fettsäure ist in Prozent angegeben bezogen auf alle Fettsäuren, die in der Phospholipidfraktion des zellulären Lipidextraktes nachgewiesen wurden (Mittelwert +/- Standardabweichung, N = 6).

5.5 PI-Response

Nach der Analyse der einzelnen Phospholipid-Klassen in Bezug auf ihre Fettsäurezusammensetzung stellte sich die Frage, ob und inwieweit die Signaltransduktion der Endothelzellen beeinflusst wird, wenn die Membranlipide unterschiedliche Konzentrationen der Fettsäuren aufweisen. Deshalb wurde eine Untersuchungsreihe mit humanen Endothelzellen durchgeführt, die für die Dauer von 24 Stunden mit je einer Fettsäure (Arachidonsäure, Eikosapentaensäure oder Dokosahexaensäure) inkubiert wurden. Anschließend wurde die Signaltransduktion dieser Zellen gemessen. Dies geschah mittels Quantifizierung eines Produktes dieses second-messenger-Systems sowie dessen Abbauprodukten. Gemessen wurden Phosphatidylinositol-tri-, di- und -monophosphat. Neben unstimulierten Kontrollgruppen wurden parallel auch mit Thrombin stimulierte Versuchsreihen durchgeführt. Thrombin ist bekannt als ideales Stimulans für die PI-Response in Endothelzellen. Da TNF- α als einer der ersten und potentesten Mediatoren im septischen Geschehen gilt, wurde eine weitere Versuchsreihe unter vorheriger Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α durchgeführt.

Als Vorversuche wurden Zeitreihen durchgeführt, um die optimale Wirkungszeit von Thrombin auf die Endothelzellen zu ermitteln. Die Inkubationszeiten von Thrombin betragen eins, zwei, fünf, zehn, fünfzehn und dreißig Minuten. Dabei wurden immer nicht-stimulierte Endothelzellen als Kontrolle mituntersucht. Es zeigte sich, dass bei einer Zeitspanne von zehn und fünfzehn Minuten die Unterschiede zwischen den unstimulierten und den stimulierten Endothelzellen am deutlichsten zu sehen waren. In weiteren Versuchen wurden die HUVECs mit je einer der Fettsäuren (Arachidonsäure, Eikosapentaensäure oder Dokosahexaensäure) inkubiert und zehn bzw. fünfzehn Minuten lang mit Thrombin stimuliert. Bei den unten gezeigten Ergebnissen sind jeweils fünf Versuche zusammengefaßt worden, die Anzahl der mit TNF- α und Thrombin stimulierten Versuche beträgt acht. Die Phosphatidylinositolextraktion und -bestimmung erfolgte wie im Methodikabschnitt beschrieben.

In den **Abbildungen 5.A5** und **5.B5** sind die Resultate nach zehn- bzw. fünfzehnminütiger Inkubation mit Thrombin dargestellt. Die Kontrollgruppe ist gleich 100 % gesetzt, die mit Fettsäuren versetzten Gruppen sind relativ zu diesem Wert zu sehen. Bei der Inkubation mit Thrombin für zehn Minuten ist die Bildung der Inositolphosphate unter ω -3-Fettsäuren-Vorbehandlung noch geringer als in der Kontrollgruppe, während die

Generierung der Inositolphosphate nach Vorinkubation mit der ω -6-Fettsäure Arachidonsäure einen deutlichen Anstieg verzeichnet. So liegt die PI-Response der mit Arachidonsäure vorinkubierten HUVEC bereits bei 128 %, während sie unter Vorbehandlung mit Eikosapentaensäure mit ca 80 % und DHA mit 70 % einen geringeren Anteil aufweist.

Im Gegensatz dazu zeigt sich bei der Thrombin-Stimulation für fünfzehn Minuten bereits ein merklicher Anstieg der PI-Response auch in der ω -3-Fettsäuren-Gruppe, allerdings war die Generierung der Inositolphosphate unter Arachidonsäure deutlich höher. So liegt die PI-Response unter Arachidonsäure bereits bei 148 % im Vergleich zu der auf 100 % normierten Kontrolle, die der Eikosapentaensäure bei 125 %, während die der Dokosahexaensäure den moderatsten Anstieg mit 115 % aufweist. Dies zeigt, dass es unter einem ausreichenden Angebot der essentiellen Fettsäuren auch nach TNF- α -Applikation zu einer vermehrten Bildung der Inositolphosphate kommt, aber die Arachidonsäure hier den deutlichsten Anstieg auslöst.

Die **Abbildung 5.C5** zeigt die Bildung der Inositolphosphate unter Stimulation mit Thrombin und vorheriger Inkubation mit TNF- α . Die Kontrollgruppe ist mit TNF- α inkubiert, nicht aber mit Thrombin. Die Stimulationszeit für Thrombin betrug fünfzehn Minuten. Hier sind die Resultate vergleichbar mit der alleinigen Stimulation mit Thrombin für fünfzehn Minuten. Die mit Arachidonsäure vorbehandelten Endothelzellen zeigen einen Anstieg der PI-Response von 140 % gegenüber der Kontrollgruppe, während die der Eikosapentaensäure bei 112 % liegt. Die Dokosahexaensäure hat wieder die geringste Bildung der Inositolphosphate zu verzeichnen, diese liegt mit 107 % knapp über der Kontrollgruppe.

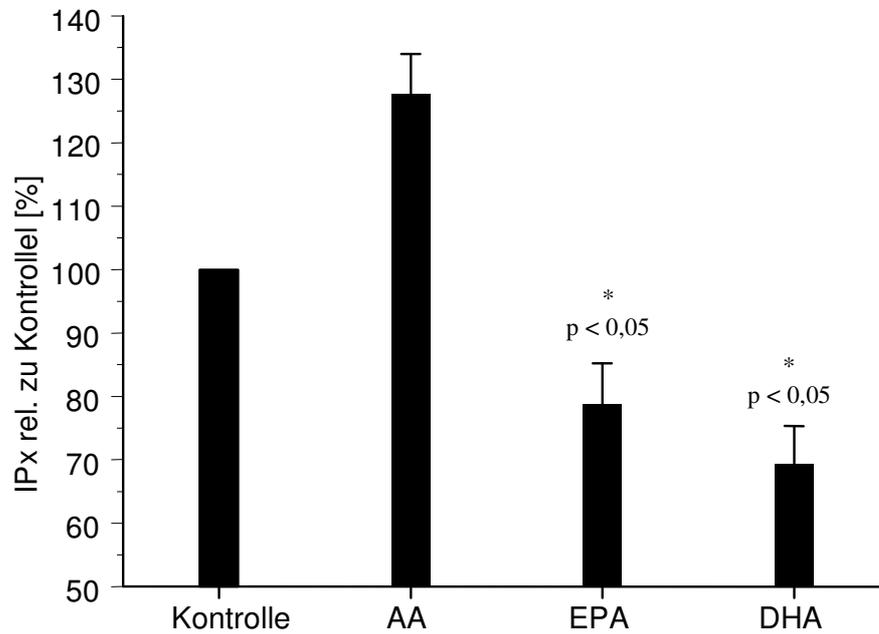


Abb. 5.A5: Dargestellt ist die Bildung der Inositolphosphate (IP_x, der Summe aus IP₁+IP₂+IP₃) nach Stimulation mit Thrombin nach zehnminütiger Inkubationszeit. Der Kontrollwert ist gleich 100 % gesetzt. Die beiden ω -3-Fettsäuren unterscheiden sich signifikant von der Arachidonsäure (p < 0,05). Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

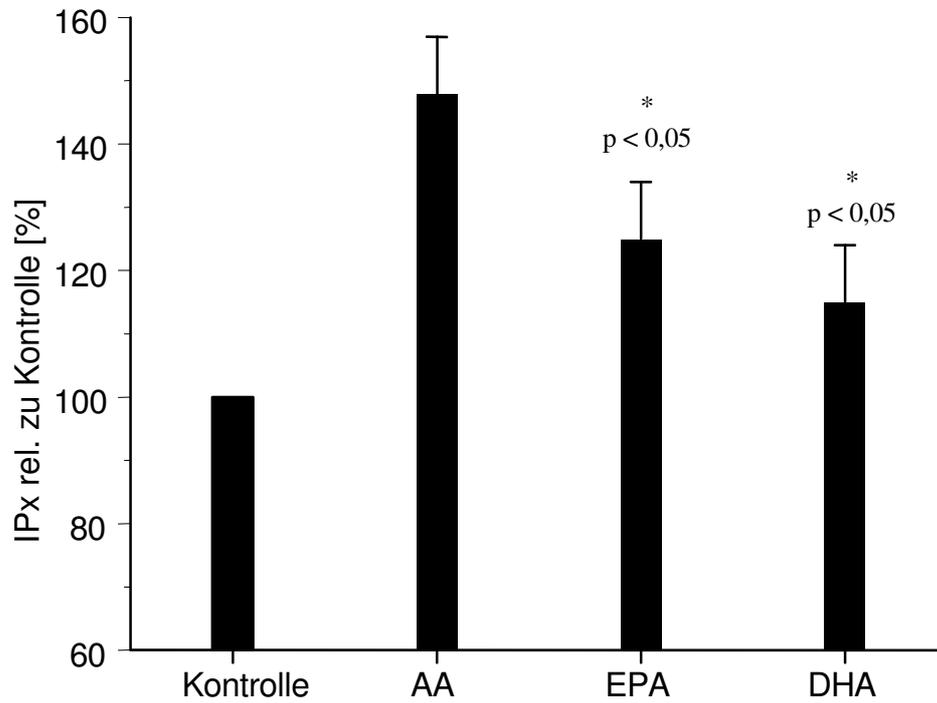


Abb. 5.B5: Dargestellt ist die Bildung der Inositolphosphate (IPx, der Summe aus IP₁+IP₂+IP₃) nach Stimulation mit Thrombin nach fünfzehnminütiger Inkubationszeit. Der Kontrollwert ist gleich 100 % gesetzt. Die beiden ω -3-Fettsäuren unterscheiden sich signifikant von der Arachidonsäure ($p < 0,05$). Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

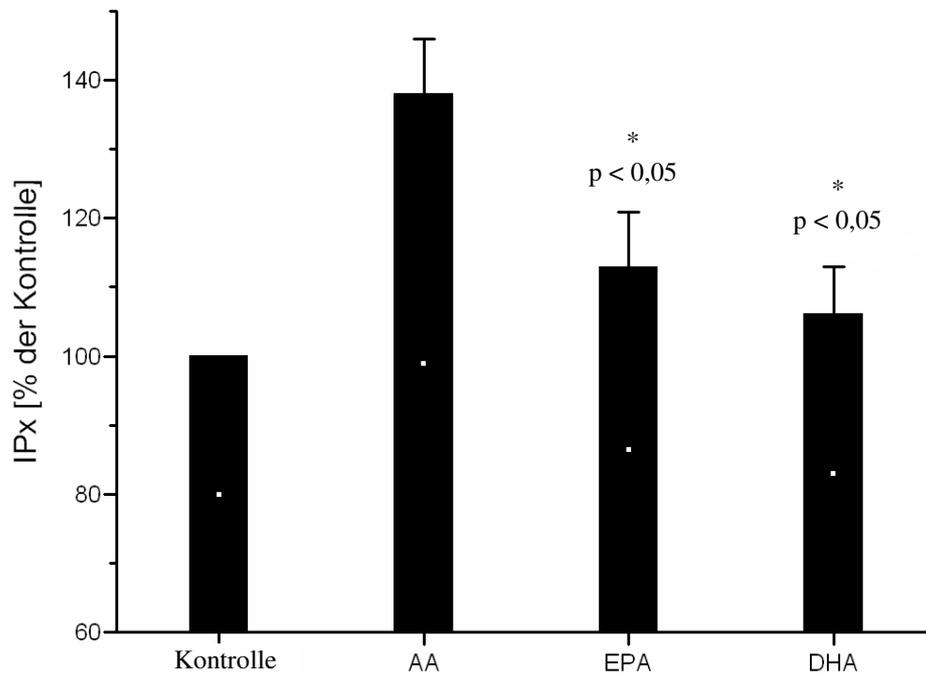


Abb. 5.C5: Dargestellt ist die Bildung der Inositolphosphate (IPx, der Summe aus IP₁+IP₂+IP₃) nach Inkubation mit TNF- α für sechzehn Stunden und Stimulation mit Thrombin für fünfzehn Minuten. Der Kontrollwert ist gleich 100 % gesetzt. Die beiden ω -3-Fettsäuren unterscheiden sich signifikant von der Arachidonsäure ($p < 0,05$). Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA), Dokosahexaensäure (DHA).

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Ergebnisse

6.1.1 Die Phospholipid-Zusammensetzung der Endothelzellen

Bei den vorliegenden Versuchen zu der Frage, ob sich die Phospholipid-Zusammensetzung unter inflammatorischen Bedingungen *in vitro* verändert, zeigte schon die Inkubation der Endothelzellen mit TNF- α für 16 Stunden auffällige Veränderungen in der Fettsäure-Zusammensetzung der Gesamt-Phospholipide. Diese wurden deutlich durch den Abfall des Gehalts der langkettigen Fettsäuren wie 18:2, 20:3 (ω -6), 20:4, 20:5, 22:5 (ω -3) und 22:6 (ω -3), während der Prozentsatz von Eikosatriensäure (ω -9) einen Anstieg zu verzeichnen hatte, der mehr als dem Doppelten des Ausgangswertes entspricht. Korrespondierende Änderungen wurden in den Pools von Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol festgestellt, nicht aber in der Sphingomyelin-Fraktion. Der Zusatz der einzelnen Fettsäuren Arachidonsäure, Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure zu den HUVECs ließ den Fettsäuregehalt der jeweils gegebenen Fettsäure in den verschiedenen Phospholipid-Pools ansteigen, mit einer entsprechenden Änderung im ω -3/ ω -6-Verhältnis und einer Unterdrückung des Anstiegs der Eikosatriensäure (ω -9).

In den hier durchgeführten Versuchsreihen konnte der höchste Anteil der Arachidonsäure in dem kleinen, metabolisch aber sehr aktiven PI-Pool der Kontrollgruppe detektiert werden. In dieser Phospholipidfraktion betrug die ω -3/ ω -6- (Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure)/Arachidonsäure-Ratio 1:10 und interessanterweise wurden in den PC-, PE- und PS-Pools deutlich höhere Prozentsätze von ω -3-Fettsäuren gefunden. Bei Betrachtung der Gesamtphospholipide findet sich ein Verhältnis von ω -3- zu ω -6-Fettsäuren von 1:1,5. Das deckt sich mit der Feststellung von Takayama et al., die in humanen Endothelzellen ebenfalls einen hohen Umsatz in dem Phosphatidylinositol-Pool fanden⁶⁸.

Am beeindruckendsten aber war, dass eine Inkubationszeit mit TNF- α für 16 Stunden genügte, um eine deutliche Änderung in der Fettsäurezusammensetzung der untersuchten endothelialen Phospholipid-Pools zu bewirken. Ein durchgehender Abfall der lang-

kettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) wurde festgestellt, was bei den Fettsäuren 18:2, 20:3 (ω -6), 20:4, 20:5, 22:5 (ω -3) und 22:6 (ω -3) sichtbar wurde.

Auffallend bei der Sphingomyelin-Fraktion ist, dass sie sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei Stimulation mit TNF- α sehr von allen anderen hier untersuchten Phospholipid-Pools unterscheidet. Nur gesättigte und monoenoische Fettsäuren wurden im Sphingomyelin-Pool detektiert, die Antwort auf TNF- α war charakterisiert durch einen drastischen Anstieg von Nervensäure auf Kosten von Palmitin- und Beheninsäure. Ein möglicher Einfluß dieser Änderungen auf die Sphingomyelin-abhängige Signaltransduktion bleibt offen.

Im Gegenteil zu Messungen in Leukozyten existiert nur eine begrenzte Anzahl von Daten über die Fettsäure-Komposition in den verschiedenen Phospholipid-Pools in HU-VECs^{69 70 71}, so dass zur Zeit nur Ergebnisse mit HepG₂-Zellen (Hepatozyten als Karzinomzellen) zum Vergleich herangezogen werden können. Bei diesen Versuchen war eine Kultivierung über mehr als zehn Tage in Fettsäure-depletiertem Medium notwendig, um ähnliche Veränderungen zu ergeben¹⁴.

6.1.2 Veränderungen des Fettsäure-Pools unter Fettsäure-Supplementierung

Wenn TNF- α -aktivierten Endothelzellen zusätzlich vorher exogene Arachidonsäure angeboten wurde, konnte ein merklicher Anstieg dieser Fettsäure in den verschiedenen PL-Pools verzeichnet werden, anders als in den nicht vorgefütterten Endothelzellen. Bei Betrachtung der Gesamt-Phospholipide konnte eine Normalisierung des Arachidonsäure-Gehaltes vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe erreicht werden. Dies ging einher mit einer Suppression des Anstiegs der Eikosatriensäure (ω -9). Zusätzlich signalisierte ein begleitender Anstieg von 22:4 (ω -6) die Konversion von exogener Arachidonsäure zu dieser ω -6-Dokosatetraensäure in dem mit Arachidonsäure und TNF- α inkubierten Ansatz.

Die Versuchsansätze, in denen HUVECs mit Eikosapentaensäure oder Dokosahexaensäure vorinkubiert und mit TNF- α stimuliert wurden sind, zeigten ähnlich wie bei Arachidonsäure-Zugabe einen merklichen Anstieg der jeweiligen Fettsäure in den Phospholipid-Pools im Vergleich zu ihren Kontrollwerten.

Bei dem Vergleich der Phospholipidklassen in den verschiedenen Versuchsansätzen sind die Anteile von Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure in den TNF- α /EPA-

und TNF- α /DHA-Gruppen jeweils sogar zweifach höher als in der Kontrollgruppe. Durch den vermehrten Einbau der Fettsäuren verändert sich auch das Verhältnis von ω -3-/ ω -6-PUFAs in allen Phospholipid-Pools. In der Kontrollgruppe beträgt es 1:9,4 während es in den einzelnen PL-Pools zwischen 1:2,8 und 1:2,4 liegt.

Solch ein beeindruckender Wechsel des ω -3/ ω -6-Verhältnisses hin zu den alternativen Präkursoren konnte bisher nur in Leukozyten bei Langzeiternährung mit Fischölkapseln festgestellt werden⁷². Der Anstieg der Eikosatriensäure (ω -9) als Indikatorfettsäure für EFAD wurde gleichzeitig mit der Gabe von ω -3-Fettsäuren unterdrückt, ebenso wie es bei zusätzlicher Arachidonsäure-Gabe der Fall war.

6.1.3 PI-Response

Auch die Signaltransduktion am Beispiel der PI-Response war unter zehn- und fünf-zehnminütiger Inkubation mit den ω -3-Fettsäuren verringert. ω -3-Fettsäuren sind aufgrund ihrer Molekülstruktur als Substrate für die Eikosanoid-Produktion weniger geeignet als die Arachidonsäure. Infolge dessen konnte in den mit ω -3-Fettsäuren inkubierten und Thrombin stimulierten Versuchen eine verminderte PI-Produktion und somit Signaltransduktion festgestellt werden. Im Gegensatz dazu kam es nach Inkubation mit Arachidonsäure zu einem Anstieg der PI-Response. So betragen nach zehn Minuten Stimulationszeit mit Thrombin die PI-Response unter Arachidonsäure 128 % des Kontrollwertes, während die der Eikosapentaensäure bei nur 80 % und Dokosahexaensäure bei ca. 70 % der Kontrollgruppe lagen. Allerdings zeigte sich bei der Thrombin-Stimulation für fünfzehn Minuten bereits ein merklicher Anstieg der PI-Response auch in der ω -3-Fettsäuren-Gruppe. Dies zeigt, dass es unter einem ausreichenden Angebot der essentiellen Fettsäuren zu einer vermehrten Bildung des second messengers IPx kommt, aber die Arachidonsäure das beste Substrat für die PI-Response zu sein scheint, da hier der Anstieg am deutlichsten war. So wäre es nicht überraschend, wenn es unter ω -3-Supplementierung zu einer Verzögerung der PI-Response kommen würde. Ebenfalls unter vorheriger Inkubation mit TNF- α und anschließender Thrombin-Gabe für fünfzehn Minuten war ein deutlicher Anstieg der PI-Response in der Arachidonsäure-Gruppe zu sehen. Die ω -3-Fettsäuren zeigten eine - im Vergleich zur Kontrollgruppe - erhöhte PI-Response, die aber weit unter der von Arachidonsäure liegt. Die Ergebnisse sind ähnlich wie unter alleiniger Thrombin-Stimulation.

6.1.4 EFAD und Eikosatriensäure

Eikosatriensäure (ω -9) ist normalerweise in geringen Mengen in tierischem Gewebe vorhanden. Sie ist diejenige Fettsäure, die in komplett endogener Synthese durch Elongation und Desaturation aus 18:1 (ω -9)-Ölsäure hergestellt wird. Ihre Bildung wird forciert durch den Mangel an essentiellen Fettsäuren. Eikosatriensäure (ω -9) ist kein ideales Substrat zur Elongation und Desaturation und aufgrund des Fehlens einer ω -6-Doppelbindung auch nicht geeignet als Ausgangssubstrat für die Prostanoid- und Lipoxygenase-Produktion. Auch der Einbau in die Phospholipidmembranen ist erschwert.

In Kongruenz mit der aufgestellten These, dass sich unter septischen Bedingungen die Phospholipidzusammensetzung der Endothelzellen verändert, ist ein Anstieg von Eikosatriensäure (ω -9), der Indikatorfettsäure von EFAD, unter TNF- α -Inkubation zu verzeichnen. Dies ist sowohl bei Analyse der gesamten Phospholipide, als auch bei Untersuchung der einzelnen Subklassen wie Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol deutlich geworden.

Am deutlichsten aber zeigte sich die Inkorporation der Eikosatriensäure (ω -9) in den PI-Pool, dort ist der 20:3(ω -9)-Prozentsatz am beeindruckendsten angestiegen. In der Kontrollgruppe ist Eikosatriensäure (ω -9) zu 4 % im PI-Pool enthalten, in den mit TNF- α inkubierten Versuchen besitzt sie einen Anteil von 11 % der PI-Fraktion.

Ein weiterer wichtiger Wert ist das Arachidonsäure/Eikosatriensäure (ω -9)-Verhältnis (20:4/20:3 (ω -9)), das üblicherweise verwendet wird als Parameter zur Quantifizierung der Schwere des EFAD-Syndromes. Dieses Verhältnis fiel von 11:1 auf 3:1 im Gesamt-Phospholipidpool. Bei Phosphatidylethanolamin sank es von 21:1 auf 3,6:1 und in der Phosphatidylcholinfraktion belief sich die Veränderung auf 9:1 respektive 1,7:1 unter TNF- α . Ähnlich sah es in der Phosphatidylinositol-Fraktion aus, hier betrug das Verhältnis unstimuliert 7:1 während es unter TNF- α -Stimulation auf 1,6:1 fiel.

6.1.5 Mögliche Ursachen des EFAD-Syndroms unter TNF- α

Mehrere Mechanismen können den Mangel an PUFAs und den damit verbundenen kompensatorischen Anstieg der Eikosatriensäure (ω -9) in den TNF- α ausgesetzten Endothelzellen unterstreichen:

Möglicherweise waren die Fettsäuren in zu geringen Mengen im Medium vorhanden. Eine Studie zeigt, dass in vitro-Wachstum von Leberzellen und HUVECs in fettfreiem Medium in der Lage war, EFAD nachzuahmen mit Hochregulierung von Eikosatriensäure (ω -9) in nur zehn Tagen ¹⁴.

Bei den in der hier vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchsansätzen wurden die HUVECs in FCS-angereichertem Medium mit normalem Fettgehalt gezüchtet und die Kontrollzellen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden, entwickelten normale PUFA-Konzentrationen mit normalen Eikosatriensäure (ω -9)/Arachidonsäure-Verhältnissen. Insofern ist ein Mangel an essentiellen Fettsäuren auszuschließen.

Einen anderen Ansatz bietet die Hypothese, dass es zu einem verstärkten Abfall der essentiellen Fettsäuren kommt. Das könnte z. B. vor sich gehen via Angriff von O₂-Radikalen auf die sensitive ungesättigte Domäne der PUFAs, die entweder noch membrangebunden sind oder durch die verstärkte phospholipolytische Aktivität freigesetzt wurden. Bis heute wurde die quantitative Relevanz dieser Mechanismen in Endothelzellen unter Abwesenheit von Neutrophilen-Einfluß nicht näher untersucht. Es sind jedoch reduzierte intrazelluläre Glutathion-Levels festgestellt worden bei Endothelzellen, die mit TNF- α stimuliert wurden, was als zusätzlicher Hinweis auf deren Apoptose zu deuten ist ^{73 74 75}.

Eine weitere Erklärung der Ergebnisse könnte die gesteigerte Freisetzung von PUFAs unter Stimulation von TNF- α sein. Die Aktivierung von unterschiedlichen phospholipolytischen Aktivitäten wurden beschrieben für die TNF- α -Inkubation von verschiedenen Zelltypen. Dabei wurde vorwiegend die Freisetzung von PUFAs, speziell Arachidonsäure, festgestellt ⁴⁰. Wäre dies der Fall, würde zusätzlich zur verstärkten Phospholipolyse eine reduzierte Wiederaufnahme der Fettsäuren erwartet werden, was zu einer deutlich gestörten PUFA-Balance der verschiedenen Phospholipid-Pools führen würde.

Eine andere Erklärung wäre eine eingeschränkte metabolische Kapazität der Endothelzellen. Tatsache ist, dass Endothelzellen nur über eine geringe Rate an basal vorhandenen Enzymen wie Elongase und Desaturase verfügen und somit nur begrenzte Möglichkeiten haben, Arachidonsäure aus ihrem Präkursor Linolsäure zu synthetisieren ^{76 77}.

Wichtig zu erwähnen ist, dass die auffälligen Veränderungen der Phospholipid-Fettsäure-Komposition in den Endothelzellen als Antwort auf die hier eingesetzte TNF-

α -Konzentration nicht durch Zellschäden verursacht wurden. Dies konnte nachgewiesen werden durch gemessene LDH-Freisetzung sowie mittels des Trypanblau-Testes.

Der Einfluß und die Größe der oben dargestellten Parameter wie O_2 -Radikale und Syntheseleistung der Endothelzellen in Kombination mit $TNF-\alpha$ wären Fragestellungen, denen in Zukunft nachzugehen sicherlich interessant wäre.

6.1.6 Die unterschiedlichen Affinitäten der ω -3-Fettsäuren und ihre Auswirkung auf die endothelial-leukozytäre Adhäsion

Die ω -3-Fettsäuren Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure zeichnen sich auch durch unterschiedliche Wirkungen aus. Bei dem Einbau in die Membranphospholipide und im weiteren Metabolismus durch die Cyclo- und die Lipoxygenase konkurrieren sie sowohl untereinander als auch mit der Arachidonsäure. Mehrere Forschungsarbeiten bestätigen, dass Eikosapentaensäure eine höhere Affinität zu der Lipoxygenase hat, sie ist ihr bevorzugtes Substrat^{78 79 80}. DHA besitzt eine höhere Potenz in Bezug auf die Hemmung proinflammatorischer Ereignisse als Eikosapentaensäure. So kam De Caterina et al. zu dem Schluß, dass die Anzahl der Doppelbindungen einer essentiellen Fettsäure mit der Fähigkeit zusammenhängt, Endothelzellaktivierung bei Inflammation und Atherogenese zu inhibieren⁸¹. Ähnliche antiinflammatorische Eigenschaften der ω -3-Fettsäuren stellten Kalfoun et al. fest, als sie nach Inkubation mit den drei Fettsäuren Arachidonsäure, Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure eine geringere Adhäsionsrate der Lymphozyten an HUVECs bei den ω -3-Fettsäuren gemessen haben⁸².

In Kongruenz mit den oben genannten Veröffentlichungen konnte von Sperling et al. ebenfalls eine stark veränderte Adhäsion der Neutrophilen an die Endothelzellen von Probanden nach längerfristiger Einnahme von Fischölkapseln (drei und zehn Wochen) festgestellt werden⁸³.

Diese Ergebnisse wurden wiederum durch eine Veröffentlichung von Mayer et al. bestätigt, in der nach ω -3-Fettsäuren-Inkubation von HUVECs die Produktion von PAF (Plättchen Aktivierender Faktor) signifikant gesenkt wurde. Unter dem Einfluss von ω -3-Fettsäure konnte eine verminderte Adhäsion von Monozyten auf HUVECs nachgewiesen werden⁸⁴. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit beschriebenen Resultaten zur PI-Response, die unter ω -3-Fettsäuren-Inkubation verringert ist.

6.2 Perspektiven

Im Rahmen dieser Arbeit wird zum ersten Mal beschrieben, dass die Kurzzeitinkubation von HUVECs mit TNF- α in nichttoxischen Dosierungen in der Lage ist, die Bedingungen für EFAD zu reproduzieren, zum Beispiel den Verlust von PUFAs in verschiedenen PL-Pools und die Hochregulierung von Eikosatriensäure (ω -9) als Indikator für EFAD. Die Zugabe von Arachidonsäure, Eikosapentaensäure oder Dokosahexaensäure unter diesen Bedingungen, resultierte in einem schnellen Einbau in die verschiedenen PL-Pools. Dadurch konnte der Anstieg von Eikosatriensäure (ω -9) wieder rückgängig gemacht werden. Gleichzeitig hat das ω -3/ ω -6-Verhältnis in den Endothelzellen entweder zu einer Dominanz von ω -6 (bei Arachidonsäure-Inkubation) oder zu beinahe äquimolaren Anteilen von ω -6 und ω -3 (bei Eikosapentaensäure/Dokosahexaensäure-Inkubation) geführt.

Auch die Signaltransduktion blieb nicht unbeeinflusst. Dienten ω -3-Fettsäuren als Substrate für die PI-Response, resultierte dies in einer verminderten Bildung der second messenger (IPx), während es bei Zugabe der ω -6-Fettsäure Arachidonsäure zu einem Anstieg der Generierung von Signaltransduktionsmolekülen kam.

Obwohl eine Einschätzung über die funktionellen Konsequenzen dieser hier deutlich gemachten Änderungen der Fettsäurekomposition in den verschiedenen Fettsäure-Phospholipid-Pools, sowie die der Signaltransduktion nicht leicht zu treffen ist, ist ein spürbarer Einfluß auf metabolische Ereignisse zu erwarten. Das Auftreten von Eikosatriensäure (ω -9), die ein ungeeignetes Substrat für viele metabolische Wege darstellt, gemeinsam mit den verringerten Anteilen der PUFAs, impliziert Abnormalitäten bei der Prostanoidbildung und der weiteren intra- und interzellulären Signaltransduktion im EFAD-Syndrom. Besonders im Hinblick auf Patienten mit Sepsis oder SIRS kann die parenterale Supplementierung mit Lipidemulsionen als „Immunonutrition“ relevant sein für die endothelialen Veränderungen und Antworten, die Auswirkungen auf den weiteren Krankheitsverlauf haben können. Mayer et al. zeigten bereits in einer Studie mit septischen Patienten einen deutlichen Einfluß der essentiellen Fettsäuren auf die Eikosanoid-Bildung. So konnte er eine Reduktion der essentiellen Fettsäuren in den Membranen der Monozyten in der Sepsis selbst unter Therapie mit intravenöser Gabe von ω -3- oder ω -6-Fettsäuren nachweisen⁴³. Dass die enterale Ernährung mit ω -3-Fettsäuren im ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) eine Reduktion der Mortalität und

eine Verbesserung des Outcomes bewirkt, zeigten Gadek et al. in einer Doppelblindstudie 1990⁸⁵. Ebenfalls konnte in einer 2006 veröffentlichten Doppelblindstudie von Pontes-Arruda et al. ein deutlicher Benefit durch die enterale Gabe von ω -3-Fettsäuren bei septischen Patienten festgestellt werden. Dieser wurde belegt durch eine kürzere Beatmungszeit, kürzere Verweildauer auf der Intensivstation und Reduktion der Mortalität⁸⁶.

Der Nutzen einer solchen parenteralen Sepsis-Therapie liegt aufgrund der dargestellten Studien auf der Hand, so dass die parenterale Ernährung bei septischen Patienten als optimale Therapieunterstützung wirken kann.

7 Zusammenfassung

Die essentiellen Fettsäuren unserer westlichen Ernährung bestehen zum überwiegenden Teil aus ω -6-Fettsäuren. Die Arachidonsäure ist die wichtigste Vertreterin, die in die Lipidmediatorsynthese eingeht. Die alternativen ω -3-Fettsäuren Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure kommen in Kaltwasserfischen vor. Eikosatriensäure (ω -9) ist eine ungesättigte Fettsäure, die komplett endogen synthetisiert werden kann. Bedingt durch ihre Struktur kann sie nicht als Ersatz für die Arachidonsäure zur Lipidmediator-Synthese dienen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einbau von Arachidonsäure in die Membranphospholipide von humanen Endothelzellen (HUVEC) im Vergleich zum Einbau der ω -3-Fettsäuren Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure unter inflammatorischen Bedingungen untersucht. Da aus diesen Phospholipiden unter anderem *second messenger* für die Signaltransduktion generiert werden, wurde weiterhin die Phosphatidylinositol-Kaskade als bedeutendes System der Signaltransduktion untersucht.

Unter Simulation inflammatorischer Bedingungen mittels TNF- α veränderte sich der relative Anteil der Phospholipidklassen in den humanen Endothelzellen nicht. Der Anteil der essentiellen ω -6- und ω -3-Fettsäuren in den einzelnen Subklassen sank nach Inkubation mit TNF- α erheblich. Der Anteil an Eikosatriensäure (ω -9) hingegen stieg nach Stimulation mit TNF- α , da sie als Ersatzsubstrat für die reduzierten essentiellen Fettsäuren vermehrt gebildet wurde. Unter der gleichzeitigen Inkubation mit Arachidonsäure, Eikosapentaensäure oder Dokosahexaensäure und TNF- α konnte der Anstieg der Eikosatriensäure (ω -9) nicht nachgewiesen werden. Die essentiellen Fettsäuren waren in ausreichendem Maße vorhanden. Unter Behandlung mit den ω -3-Fettsäuren konnte gleichzeitig das ω -3/ ω -6-Verhältnis rasch moduliert werden.

Die Signaltransduktion am Beispiel der PI-Response veränderte sich unter der Fettsäuren-Inkubation. Es zeigte sich eine Reduktion der Thrombin-induzierten Bildung von Inositolphosphaten nach Vorbehandlung mit Eikosapentaensäure und Dokosahexaensäure im Vergleich zur Arachidonsäure. Auch unter inflammatorischen Bedingungen war diese Reduktion nachweisbar.

Es konnte somit der Nachweis erbracht werden, dass die ω -3-Fettsäuren unter inflammatorischen Bedingungen einen Einfluß auf die Phospholipid-Zusammensetzung der Endothelzellmembranen und auf die Signaltransduktion in Endothelzellen haben.

Summary

The essential fatty acids of our common western diet are consisting mostly of ω -6 fatty acids. Their most important representative is the arachidonic acid serving as substrate for the lipid mediator synthesis.

The ω -3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid can be found in high amounts in cold water fish. Eicosatrienoic acid is one of the main unsaturated fatty acids which may be completely endogenously synthesized. Due to its structure it can't substitute arachidonic acid in terms of lipid mediator synthesis. In this study the incorporation of the ω -6 fatty acid arachidonic acid compared to the ω -3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid into the human endothelial cell membranes under inflammatory conditions was examined. Because the phospholipids of the membrane serve as source of second messengers for the signal transduction, the PI-cascade as one major representative was also examined.

While simulating inflammatory conditions with TNF- α the relative proportion of the phospholipid subclasses did not change. The proportion of the essential fatty acids in every subclass decreased after the incubation with TNF- α . The fraction of eicosatrienoic acid increased in the control group because it was taken as a substitute instead of the three essential fatty acids. After simultaneous incubation with arachidonic acid, eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid and TNF- α no increase in the fraction of eicosatrienoic acid could be determined. The fraction of essential fatty acids remained stable. By application of ω -3 fatty acids, the ω -3/ ω -6 ratio could be rapidly modulated.

Signal transduction in terms of PI-response was modulated by incubation with essential fatty acids. After pre-treatment of HUVEC with arachidonic acid, eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid, a reduction of the thrombin-induced generation of inositolphosphates under ω -3 fatty acids in comparison to arachidonic acid was revealed. Under inflammatory conditions simulated by stimulation with TNF- α a similar reduction in generation of inositolphosphates after application of ω -3 fatty acids was determined.

We could show that ω -3 fatty acids have a provable influence of the phospholipid composition of the endothelial cell membranes and also on the signal transduction even under inflammatory conditions.

8 Anhang

8.1 Liste verwendeter Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerol
DHA	Dokosahexaensäure
EET	Eikosatetraensäure
EFAD	Essential Fatty Acid Deficiency
EPA	Eikosapentaensäure
HDL	High Density Lipoprotein
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
ICAM	Intracellular Adhesion Moleküle
IL	Interleukine
IP _(1,2,3)	Inositolphosphat _(1,2,3)
LO	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAR	Proteinase-aktivierter Rezeptor
PC	Phosphatidylcholin
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phosphatidylethanolamin
PG (A, E, I, F)	Prostaglandin (A, E, I, F)
PI	Phosphatidylinositol

PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TX	Thromboxan
VCAM	Vascular Adhesion Molecule

8.2 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“

8.3 Danksagung

Bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Herrn Prof. Seeger danke ich für das äußerst interessante Promotionsthema und für seine guten Anregungen und Ideen, die den Fortgang der Arbeit stets förderten. Darüber hinaus möchte ich mich für die Bereitstellung der sehr umfangreichen materiellen und apparativen Voraussetzungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Konstantin Mayer für seine höchst engagierte und kontinuierliche Betreuung während der Promotion.

Frau Karin Fietzner, Frau Anette Tschuschner und Frau Marion Muhly-Reinholz sei Dank gesagt für ihre technische Hilfe, mit der sie einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leisteten.

Den Mitarbeitern des Instituts für Katastrophenmedizin in Tübingen danke ich für die formalen Korrekturen.

8.4 Lebenslauf

I. Angaben zur Person

Tina Steiner, geb. Bögeholz
geb. 29.04.1976, in Bielefeld
verheiratet

II. Schulbildung

Abschluss: Jun 1995 Allgemeine Hochschulreife, Bielefeld
Friedrich von Bodelschwingh-Gymnasium

III. Hochschule

Okt 1995 - Nov 2002 Justus-Liebig-Universität, Gießen
Studiengang: Humanmedizin
PJ - Wahlfach: Anaesthesiologie

20. Nov 2002 3. Staatsexamen
Universitätsklinikum Gießen

IV. Famulaturen

1999 Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
1999 Innere Medizin, Pneumologie
1999 Gynäkologie und Geburtshilfe
2000 Allgemeine Innere Medizin
2000 Allgemein- und Unfallchirurgie

V. Praktisches Jahr

Nov 2001 - Sep 2002 Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
Universitätsklinikum Gießen

Allgemein- und Unfallchirurgie
Université catholique de Lille, Frankreich

Innere Medizin
Universitätsklinikum Gießen

VI. Arzt im Praktikum

Jan 2003 - Jun 2004 Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin
Diakonie-Klinikum, Stuttgart

VII. Berufserfahrung

Jul 2004 - Sep 2004

Praxis für Anästhesie und Schmerztherapie
Dr. Albrecht und Partner, Stuttgart

seit Okt 2004

Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin
Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart

VIII. Sonstiges

Feb 2000 - Jul 2000

Studentische Hilfskraft

Labor Grimminger / Seeger
Universitätsklinikum Gießen

Forschungsbereich Innere Medizin
Schwerpunkt: Pneumologie / Sepsis

9 Literaturverzeichnis

¹ Stryer L. "Biochemie." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage (1990): 489

² Spielman D. "Metabolism of unsaturated fatty acids. Role of n-3 and n-6 fatty acids in clinical nutrition." In: Perspectives in Clinical Nutrition, Kinney J.M., Borum P.R. (eds.). Urban and Schwarzenberg Inc., Baltimore, MD, USA. (1989): 351-378

³ Calder P.C. "N-3 polyunsaturated fatty acids and immune cell function." Adv. Enzyme Regul. (1997) 37: 197-237

⁴ Curzen N.P., Jourdan K.B., Mitchell J.A. "Endothelial modification of pulmonary vascular tone." Intensive Care Med. (1996) 22(6): 596-607

⁵ Heller A., Koch T., Schmeck J., van Ackern K. "Lipid mediators in inflammatory disorders." Drugs. (1998) 55(4): 487-496

⁶ Calder P.C. "Can n-3 polyunsaturated fatty acids be used as immunomodulatory agents?" Biochem. Soc. Trans. (1996) 21(1): 211-220

⁷ Grimminger F., Mayer K., Krämer H.J., Stevens J., Walmrath D., Seeger W. "Differential vasoconstrictor potencies of free fatty acids in the lung vasculature: 2- versus 3-series prostanoid generation." J. Pharmacol. Exp. Ther. (1993) 267(1): 259-265

⁸ Lee T.H., Sethi T., Crea A.E., Peters W., Arm J.P., Horton C.E., Walport M.J., Spur B.W. "Characterization of Leukotrien B3 : comparison of its biological activities with leukotrien B4 and leukotrien B5 in complement receptor enhancement, lysozyme release and chemotaxis of human neutrophils." Clin. Sci. (Lond). (1988) 74(5): 467-475

⁹ Goldman D.W., Pickett W.C., Goetzl E.J. "Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of Leukotrien B5 (LTB5) derived from eicosapentaenoic acid." Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983) 117(1): 282-288

¹⁰ Evers A.S., Elliott W.J., Lefkowitz J.B., Needleman P. "Manipulation of rat brain fatty acid composition alters volatile anesthetic potency." J. Clin. Invest. (1986) 77(3): 1028-1033

¹¹ Jeppesen P.B., Hoy C.E., Mortensen P.B. "Essential fatty acid deficiency in patients receiving home parenteral nutrition." Am. J. Clin. Nutr. (1998) 68(1): 126-33.

¹² Jakschik B.A., Morrison A.R., Sprecher H. "Products derived from 5,8,11-eicosatrienoic acid by the 5-lipoxygenase-leukotriene pathway." J. Biol. Chem. (1983) 258(21): 12797-12800

¹³ Retterstol K., Woldseth B., Christophersen B.O. "Studies on the metabolism of [1-¹⁴C]- 5,8,11- eicosatrienoic (Mead) acid in rat hepatocytes." Biochim. Biophys. Acta. (1995) 1259(1): 82-88

¹⁴ Furth E.E., Sprecher H., Fisher E.A., Fleishman H.D., Laposata M. "An in vitro model for essential fatty acid deficiency: HepG2 cells permanently maintained in lipid-free medium." J. Lipid Res. (1992) 33(11): 1719-1726

- ¹⁵ Dyerberg J., Bang H.O., Hjørne N. "Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos." *Am. J. Clin. Nutr.* (1975) 28(9): 958-966
- ¹⁶ Kromhout D., Bosschieter E.B., de Lezenne Coulander C. "The inverse correlation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease." *N. Engl. J. Med.* (1985) 312(19): 1205-1209
- ¹⁷ Shekelle R.B., Missell L., Oglesby P., Shryock A.M., Stamler J. "Fish consumption and mortality from coronary heart disease." *N. Engl. J. Med.* (1985) 313: 820-821
- ¹⁸ Middaugh J.P. "Cardiovascular deaths among alaskan natives 1980-1986." *Am. J. Public Health.* (1990) 80(3): 282-285
- ¹⁹ Terano T., Shiina T., Tamura Y. "Eicosapentaenoic acid suppressed the proliferation of vascular smooth muscle cells through modulation of various steps of growth signals." *Lipids.* (1996) 31 (Suppl.): 301-304
- ²⁰ Miles E.A., Wallace F.A., Calder P.C. "Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages." *Atherosclerosis.* (2000) 152(1): 43-50
- ²¹ Kronman N., Green A. "Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974." *Acta. Med. Scand.* (1980) 208(5): 401-406

- ²² Kremer J.M., Lawrence D.A., Jubiz W., Di Giacomo R., Rynes K., Bartholomew L.E., Sherman M. "Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum.* (1990) 33(6): 810-820
- ²³ Kremer J.M., Jubiz W., Michalek A., Rynes R., Bartholomew L.E., Bigaouette J., Timchalk M.A., Beeler D., Lininger L. "Fish oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A double-blinded, controlled, crossover study." *Ann. Intern. Med.* (1987) 106(4): 497-503
- ²⁴ Van der Tempel H., Tulleken J.E., Limburg P.C., Muskiet F.A.J., van Rijswijk M.K. "Effects of fish oil supplementation in rheumatoid arthritis." *Ann. Rheum. Dis.* (1990) 49(2): 76-80
- ²⁵ Kremer J.M., Bigaouette J., Michalek A.V., Timchalk M.A., Lininger L., Rynes R.I., Huyck C., Zieminski J., Bartholomew L.E. "Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis." *Lancet.* (1985) 26(1): 184-187
- ²⁶ Cleland L.G., French J.K., Betts W.H., Murphy G.A., Elliott M.J. "Clinical and biochemical effects of dietary fish oil supplements in rheumatoid arthritis." *J. Rheumatol.* (1988) 15(10): 1471-1475
- ²⁷ Sperling R.I., Weinblatt M.E., Robin J.L., Ravalese J., Hoover R.L., House F., Coblyn J.S., Fraser P.A., Spur B.W., Robinson D.R., Lewis R.A., Austen K.E. "Effects of dietary supplementation with marine fish oil on leukocyte lipid mediator generation and function in rheumatoid arthritis." *Arthritis. Rheum.* (1987) 30(9): 988-997

- ²⁸ Hammarström S., Hamberg M., Samuelsson B., Duell E.A., Stawiski M., Vorhees J.J. „Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E2, and prostaglandin F2alpha in epidermis of psoriasis.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1975) 72(12): 5130-5134
- ²⁹ Grimminger F., Mayser P. “Lipid mediators, free fatty acids and psoriasis.” Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. (1995) 52(1): 1-15
- ³⁰ Das U.N. “Beneficial effect of EPA and DHA in the management of systemic lupus erythematosus and its relationship to the cytokine network.” Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. (1994) 51(3): 207-213
- ³¹ Vilaseca J., Salas A., Guarner F., Rodriguez R., Malagelada J.R. “Participation of thromboxane and other eicosanoid synthesis in the course of experimental inflammatory colitis.” Gastroenterology. (1990) 98(2): 269-277
- ³² Campbell J.M., Fahey G.C., Lichtensteiger C.A., DeMichele S.J., Garleb K.A. “An enteral formula containing fish oil, indigestible oligosaccharides, gum arabic and antioxidants affects plasma and colonic phospholipid fatty acid and prostaglandin profiles in pigs.” J. Nutr. (1997) 127(1): 137-145
- ³³ Grimminger F., Führer D., Papavassilis E., Schlotzer K., Mayer K., Heuer K.U., Kiss L., Walmrath D., Piberhofer S., Lübbecke F., Krämer H.J., Stevens J., Schütterle G., Seeger W. “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. (1993) 23(11): 706-715

³⁴ Grimminger F., Grimm H., Führer D., Papavassilis C., Lindemann G., Blecher C., Mayer K., Tabesch F., Krämer H.J., Stevens J., Seeger W. "Omega-3 Lipid infusion in a heart allotransplant model. Shift in fatty acid and lipid mediator profiles and prolongation of transplant survival." *Circulation*. (1996) 93(2): 365-371

³⁵ van der Heide J.J., Bilo H.J.G., Donker J.M., Wilmink J.M., Tegzess A.M. "Effect of dietary fish oil on renal function and rejection in cyclosporine-treated recipients of renal transplants." *N. Engl. J. Med.* (1993) 329(11): 769-773

³⁶ Andreassen A.K., Hartmann A., Offstad J., Geiran O., Kvernebo K., Simonsen S. "Hypertension prophylaxis with omega-3 fatty acids in heart transplant recipients." *J. Am. Coll. Cardiol.* (1997) 29(6): 1324-1331

³⁷ Endres S., Ghorbani R., Kelley V.E., Georgilis K., Lonnemann G., van der Meer J.W., Cannon J.G., Rogers T.S., Klempner M.S., Weber P.C. "The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells." *N. Engl. J. Med.* (1989) 320(5): 265-271

³⁸ Caughey G.E., Mantzioris E., Gibson R.A., Cleland L.G., James M.J. "The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil." *Am. J. Clin. Nutr.* (1996) 63(1): 116-122

³⁹ Healy D.A., Wallace F.A., Miles E.A., Calder P.C., Newsholm P. "Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function." *Lipids*. (2000) 35(7): 763-768

⁴⁰ Murray M.J., Svingen B.A., Yaksh T.L., Holman R.T. "Effects of endotoxin on pigs prefed omega-3 versus omega-6 fatty acid-enriched diets." *Am. J. Physiol.* (1993) 265(6): E920-E927

⁴¹ Murray M.J., Svingen B.A., Holman R.T., Yaksh T.L. "Effects of a fish oil diet on pigs' cardiopulmonary response to bacteremia." *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* (1991) 15(2): 152-158

⁴² Pscheidl E., Reisch S., Rugheimer E. "Chemically defined structured lipids with omega-3 fatty acids maintain splanchnic blood flow in a low-dose continuous endotoxin model." *Infusionsther. Transfusionsmed.* (1994) 21(6): 380-387

⁴³ Mayer K., Gokorsch S., Fegbeutel C., Hattar K., Rosseau S., Walmrath D., Seeger W., Grimminger F. "Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis." *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2003) 167(10): 1321-1328

⁴⁴ Murphy K., Haudek S.B., Thompson M., Giroir B.P. "Molecular biology of septic shock." *New Horiz.* (1998) 6(2): 181-193

⁴⁵ Astiz M.E., Rackow E.C. "Septic shock." *Lancet.* (1998) 16(351(9114)): 1501-1505

⁴⁶ Wheeler A.P., Bernard G.R. "Treating patients with severe sepsis." *N. Engl. J. Med.* (1999) 340(3): 207-214

⁴⁷ Ruiter D.J., van der Maulen J., Brouwer A., Hummel M.J., Mauw B.J., van der Ploeg J.C., Wisse E. "Uptake by liver cells of endotoxin following its intravenous injection." *Lab. Invest.* (1981) 45(1): 38-45

- ⁴⁸ Yao Y.M., Redl H., Bahrami S., Schlag G. "The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure." *Inflamm. Res.* (1998) 47(5): 201-210
- ⁴⁹ Bone R.C. "Phospholipids and their inhibitors: a critical evaluation of their role in the treatment of sepsis." *Crit. Care Med.* (1992) 20(6): 884-890
- ⁵⁰ McCuskey R.S., Urbaschek R., Urbaschek B. "The microcirculation during endotoxemia." *Cardiovasc. Res.* (1996) 32(4): 752-763
- ⁵¹ Calder P.C. "n-3 polyunsaturated fatty acids and cytokine production in health and disease." *Ann. Nutr. Metab.* (1997) 41(4): 203-234
- ⁵² Strieter R.M., Kunkel S.L., Bone R.C. "Role of tumor necrosis factor alpha in disease states and inflammation." *Crit. Care Med.* (1993) 21(10 Suppl): 447-463
- ⁵³ Schütze S., Machleidt T., Krönke M. "Mechanisms of tumor necrose factor action." *Seminars in oncology.* (1992) 19: 16-24
- ⁵⁴ Ellis C.A., Tiruppathi C., Sandoval R., Niles W.D., Malik A.B. "Time course of recovery of endothelial cell surface thrombin receptor (PAR-1) expression." *Am. J. Physiol.* (1999) 276(1 Pt1): C38-C45
- ⁵⁵ Coughlin S.R., Scarborough R.M., Vu T.K., Hung D.T. "Thrombin receptor structure and function." *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (1992) 57: 149-154

- ⁵⁶ Cheng J., Baldassare J.J., Raben D.M. "Dual coupling of the alpha-thrombin receptor to signal-transduction pathways involving phosphatidylinositol and phosphatidylcholine metabolism." *Biochem. J.* (1999) 337 (Pt1): 97-104
- ⁵⁷ Ellis C.A., Malik A.B., Gilchrist A., Hamm H., Sandoval R., Voyno-Yasenetskaya T., Tirupathi C. "Thrombin induces proteinase-activated receptor-1 gene expression in endothelial cells via activation of Gi-linked Ras/mitogen-activated protein kinase pathway." *J. Biol. Chem.* (1999) 274(19): 13718-13727
- ⁵⁸ Fink M.P. "Therapeutic options directed against platelet activating factor, eicosanoids and bradykinin in sepsis." *J. Antimicrob. Chemother.* (1998) 41(Suppl A): 81-94
- ⁵⁹ Schlag G., Redl H. "Mediators of injury and inflammation." *World J. Surg.* (1996) 20(4): 406-410
- ⁶⁰ Aird W.C. "Endothelium as an organ system." *Crit. Care Med.* (2004) 32(5 Suppl.): 271-279
- ⁶¹ Hack C.E., Zeerleder S. "The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation." *Crit. Care Med.* (2001) 29(7): 21-27
- ⁶² Volk T., Kox W.J. "Endothelium function in sepsis." *Inflamm. Res.* (2000) 49(5): 185-198
- ⁶³ Stryer L. "Biochemie." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 3. Auflage (1990): 1021-1024

⁶⁴ Sandoval R., Malik A.B., Minshall R.D., Kouklis P., Ellis C. "Ca (2+) signalling and PKC α activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions." J. Physiol. (2001) 533(Pt2): 433-445

⁶⁵ Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R. "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunological criteria." J. Clin. Invest. (1973) 52(11): 2745-2756

⁶⁶ Bligh E.G., Dyer W.J. "A rapid method of total lipid extraction and purification." Can. J. Biochem. Physiol. (1959) 37: 911-917

⁶⁷ Berridge M.J., Dawson R.M.C., Downes C.P., Heslop J.P., Irvine R.F. "Changes in the levels of inositol-phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides." Biochem. J. (1987) 212: 473-482

⁶⁸ Takayama H., Gimbrone M.A., Schafer A.I. "Preferential incorporation of eicosanoid precursor fatty acids into human umbilical vein endothelial cell phospholipids." Biochim. Biophys. Acta. (1987) 922(3): 314-322

⁶⁹ Bougnoux P., Salem N., Lyons C., Hoffman T. "Alteration in the membrane fatty acid composition of human lymphocytes and cultured transformed cells induced by interferon." Mol. Immunol. (1985) 22(9): 1107-1113

⁷⁰ Anel A., Naval J., Gonzalez B., Torres J.M., Mishal Z., Uriel J., Pineiro A. "Fatty acid metabolism in human lymphocytes. A Time-course changes in fatty acid composition and membrane fluidity during blasic transformation of peripheral blood lymphocytes." Biochim. Biophys. Acta. (1990) 1044(3): 323-331

- ⁷¹ Vossen R.C., Feijge M.A., Heemskerk J.W., van Dam-Mieras M.C., Hornstra G., Zwaal R.F. "Long-term fatty acid modification of endothelial cells: implication for arachidonic acid distribution in phospholipid-classes." *J. Lipid Res.* (1993) 34(3): 409-420
- ⁷² Kelley D.S., Branch L.B., Love J.E., Taylor P.C., Rivera J.M., Iacono J.M. "Dietary alpha-linolenic acid and immunocompetence in humans." *Am. J. Clin. Nutr.* (1991) 53(1): 40-46
- ⁷³ Camacho M., Godessart N., Anton R., Garcia M., Vila L. "Interleukin-1 enhances the ability of cultured human umbilical vein cells to oxidize linoleic acid." *J. Biol. Chem.* (1995) 270(29): 17279-17286
- ⁷⁴ Toborek M., Blanc E.M., Kaiser S., Mattson M.P., Hennig B. "Linoleic acid potentiates TNF-mediated oxidative stress, disruption of calcium homeostasis and apoptosis of cultured vascular endothelial cells." *J. Lipid Res.* (1997) 38(10): 2155-2167
- ⁷⁵ Toborek M., Barger S.W., Mattson M.P., Barve S., Mc Clain C.J., Hennig B. "Linoleic acid and TNF-alpha cross-amplify oxidative injury and dysfunction of endothelial cells." *J. Lipid Res.* (1996) 37(1): 123-135
- ⁷⁶ Lerner R., Lindström P., Berg A., Johansson E., Rosendahl K., Palmblad J. "Development and characterization of essential fatty acid deficiency in human endothelial cells in culture." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1995) 92(4): 1147-1151
- ⁷⁷ Spector A.A., Kaduce T.L., Hoak C.J., Fry G.L. "Utilization of arachidonic and linoleic acids by cultured endothelial cells." *J. Clin. Invest.* (1981) 68(4): 1003-1011

⁷⁸ Mayer K., Seeger W., Grimminger F. "Clinical use of lipids to control inflammatory disease." *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* (1998) 1(2): 179-184

⁷⁹ Rose F., Kiss L., Grimminger F., Mayer K., Grandel U., Seeger W., Bienik E., Sibelius U. "E. coli hemolysin-induced lipid mediator metabolism in alveolar macrophages: impact of eicosapentaenoic acid." *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* (2000) 279(1): L100-L109

⁸⁰ Grimminger F., Mayer K., Kiss L., Wahn H., Walmrath D., Seeger W. "Synthesis of 4- and 5-series leukotrienes in the lung microvasculature challenged with E. coli hemolysin: critical dependence on exogenous free fatty acid supply." *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* (1997) 16(3): 317-324

⁸¹ De Caterina R., Bernini W., Carluccio M.A., Liao J.K., Libby P. "Structural requirements for inhibition of cytokine-induced endothelial activation by unsaturated fatty acids." *J. Lipid Res.* (1998) 39: 1062-1070

⁸² Khalfoun B., Thibault G., Bardos P., Lebranchu Y. "Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human lymphocyte-endothelial cell adhesion." *Transplantation.* (1996) 62(11): 1649-1657

⁸³ Sperling R.I., Benincaso A.I., Knoell C.T., Larkin J.K., Austen K.F., Robinson D.R. "Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils." *J. Clin. Invest.* (1993) 91(2): 651-660

⁸⁴ Mayer K., Merfels M., Muhly-Reinholz M., Gokorsch S., Rosseau S., Lohmeyer J., Schwarzer N., Krüll M., Suttorp N., Grimminger F., Seeger W. "ω-3 fatty acids suppress monocyte adhesion to human endothelial cells: role of endothelial PAF generation." *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2002) 283(2): H811-H818

⁸⁵ Gadek J.E., DeMichele S.J., Karlstad M.D., Pacht E.R., Donahoe M., Albertson T.E., Van Hoozen C., Wennberg A.K., Nelson J.L., Noursalehi M. “Effect of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in patients with acute respiratory distress syndrome. Enteral Nutrition in ARDS Study Group.” Crit. Care Med. (1999) 27(8): 1409-1420

⁸⁶ Pontes-Arruda A., Albuquerque Aragao A.M., Albuquerque J.D., “Effects of enteral feeding with eicosapentaenoic acid, gamma-linolenic acid, and antioxidants in mechanically ventilated patients with severe sepsis and septic shock.” Crit. Care Med. (2006) 34(9): 2325-2333