

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-,
Gefäß- und Thoraxchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Ω -3-Fettsäuren auf die Mikrozirkulation
der Lunge: eine tierexperimentelle Studie am
Sepsismodell der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Tamer Arslan
aus Berlin

Gutachter: 1.: Priv.- Doz. Dr. med. P. Schneider
2.: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K.- J. Bauknecht
3.: Prof. Dr. med. J. Konradt

Datum der Promotion: 27.03.2009

1	EINLEITUNG	7
1.1	Das akute Lungenversagen	7
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese	7
1.1.2	Therapie	8
1.2	Biochemie und Pharmakologie der Ω-3- und Ω-6-Fettsäuren	9
1.3	Bedeutung der Mikrozirkulationsstörung bei der akuten Pankreatitis	11
1.4	Tiermodell	12
1.5	Mikrozirkulation der Rattenlunge	12
1.5.1	Historie	12
1.5.2	Eigene Technik	13
1.6	Fragestellung	14
2	METHODE	15
2.1	Versuchstiere und Tierhaltung	15
2.2	Narkose	15
2.3	Katheterimplantation	16
2.4	Pankreatitisinduktion	17
2.4.1	Zubereitung der Glykodeoxycholsäure-Lösung	17
2.4.2	Zubereitung der Cerulein-Lösung	17
2.4.3	Durchführung der intraduktalen Infusion	18
2.4.4	Verifikation der Erkrankungsschwere	19

2.5	Versuchsgruppen	19
2.5.1	Übersicht über die verschiedenen Versuchsgruppen	19
2.5.2	Kontrolltiere	20
2.5.3	Tiere mit nekrotisierender Pankreatitis	20
2.5.4	Therapiegruppen	20
2.6	Blutabnahmen, Monitoring	21
2.7	Ausschlusskriterien	21
2.8	Intravitalmikroskopie	22
2.8.1	Herstellung von Puffer und Lösungen	22
2.8.1.1	Herstellung von Rhodamin-Lösung	22
2.8.1.2	Herstellung von fluoreszenzmarkierten Erythrozyten	22
2.8.1.3	Herstellung von FITC-Dextran-Lösung	23
2.8.2	Versuchsaufbau	24
2.8.3	Durchführung der Narkose und Exposition der Lunge	24
2.8.4	Durchführung der Intravitalmikroskopie	26
2.8.5	Zielparameter	27
2.8.5.1	Leukozytenadhäsion	27
2.8.5.2	Erythrozytengeschwindigkeit	27
2.8.5.3	Kapillarpermeabilität	27
2.8.5.4	Septumdurchmesser	28
2.8.6	Auswertung	28
2.9	Versuchsende und Euthanasie	29
2.10	Organentnahmen und Histologie	29
2.11	Statistik	29
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Ausschluss und Mortalität	30

3.2	Systemische Parameter	31
3.2.1	Hämatokrit	31
3.2.2	Kreislaufparameter	32
3.2.3	Respiratorische Parameter	32
3.2.4	Orale Wasseraufnahme	33
3.3	Mikrozirkulationsparameter	34
3.3.1	Leukozytenadhäsion	34
3.3.2	Erythrozytenflussgeschwindigkeit	36
3.3.3	Kapillarpermeabilität	37
3.3.4	Septumdurchmesser	38
3.3.5	Alveolendurchmesser	40
3.4	Histologie	41
4	DISKUSSION DER METHODE	44
4.1	Tiermodell	44
4.2	Intravitalmikroskopie	49
4.2.1	Intravitalmikroskopie bei akuter Pankreatitis	49
4.2.2	Intravitalmikroskopie der Lunge	50
4.2.3	Zielparameter der Intravitalmikroskopie	52
4.2.3.1	Leukozytenadhäsion	52
4.2.3.2	Erythrozytenflussgeschwindigkeit	53
4.2.3.3	Kapillarpermeabilität	54
4.2.3.4	Septumdicke	54
4.2.4	Equipment und Auswertung mittels Cap-Image	54
4.3	Andere Zielgrößen	55
4.3.1	Hämatokrit	55
4.3.2	Kreislaufparameter und respiratorische Parameter	55

5	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	57
5.1	Ausschlüsse und Mortalität	57
5.2	Systemische Parameter	57
5.2.1	Hämatokrit	57
5.2.2	Kreislaufparameter und respiratorische Parameter	58
5.2.3	Orale Wasseraufnahme	58
5.3	Mikrozirkulationsparameter	59
5.3.1	Leukozytenadhäsion	59
5.3.2	Erythrozytenflussgeschwindigkeit	59
5.3.3	Kapillarpermeabilität	60
5.3.4	Septumdurchmesser	61
5.3.5	Alveolendurchmesser	61
5.4	Histologie	62
6	ZUSAMMENFASSUNG UND BEANTWORTUNG DER FRAGEN	63
7	LITERATURVERZEICHNIS	66
8	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	78
8.1	Tabellen	78
8.2	Abbildungen	78
9	LEBENS LAUF	80
10	DANKSAGUNG	81

1 Einleitung

1.1 Das akute Lungenversagen

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese

Das akute Lungenversagen (adult respiratory distress syndrom: ARDS) ist die häufigste Ursache der Morbidität und Letalität auf der Intensivstation. Das ARDS ist die pulmonale Komponente des Multiorganversagens und ist die Folge von Schock, Pneumonie, Ischämie-Reperfusionsschaden und Sepsis, z.B. bei akuter Pankreatitis (7). Aufgrund der Vielfältigkeit der Ursachen wird deutlich, dass die Pathogenese des ARDS sehr komplex ist.

Folgende Vorstellung besteht über das Zustandekommen des Lungenschadens: Die systemische Ausschwemmung von proinflammatorischen Mediatoren und Enzymen induziert in der Lunge ein interstitielles Ödem und eine Störung des Surfactant Systems (35, 78). In der Folge kommt es zur Verminderung des Gasaustauschs mit progredienter pulmonaler Insuffizienz (ARDS) und konsekutiver systemischer Hypoxie (99). Diese Effekte werden verstärkt durch eine eingeschränkte Atemmechanik infolge des reflektorischen Zwerchfellhochstandes und der Pleuraergussbildung.

Ein wichtiger initialer Mechanismus bei der Ausbildung eines Lungenschadens ist die Aktivierung der humoralen und zellulären Abwehr des klassischen Kaskadesystems bei der Sepsis in dem Eicosanoide eine wesentliche Rolle spielen (74, 43). Dabei wirken vor allen Dingen die Metabolite der Arachidonsäure (AA), die 4er Serie der Leukotriene, proinflammatorisch. Denn sie wirken sowohl direkt auf den vaskulären Tonus und die Permeabilität des Lungenepithels als auch chemotaktisch auf Leukozyten, was sowohl zu einer leukozytären Infiltration des betroffenen Gewebes (63, 51, 52, 32) als auch zur Adhärenz von Leukozyten am Endothel von Lungenkapillaren durch ICAM-1 führt, wie Versuche mit ICAM-1 depletierten Mäusen gezeigt haben (30). Das Zusammenspiel dieser Faktoren kann als eine Ursache für die massive interstitielle Ödembildung und für die Migration von Leukozyten in das Interstitium gesehen werden.

Ein anderer elementarer Vorgang bei der Ödembildung ist die Interaktion von adhärennten Granulozyten und mikrovaskulärem Endothel, wobei der Austausch von freien Fettsäuren (AA) eine zentrale Rolle spielt. Die durch das Zusammenspiel von Endothelzelle und Granulozyt gebildeten Leukotriene der 4er-Serie führen zur Öffnung der endothelialen Junctions bis hin zu einer Verformung der Endothelzellen (32). Dadurch ist die Voraussetzung für die leukozytäre Gewebeeinfiltration geschaffen. Zusätzlich werden von den

Granulozyten Proteasen freigesetzt, die zur Lyse von interstitiellem Gewebe und zur Ödembildung führen. Fink et al. zeigten, dass LTB₄ im akuten Lungenversagen vermehrt gebildet wird und eine direkte positive Korrelation zwischen dem LTB₄-Spiegel und dem Schweregrad des ARDS besteht (20). Die durch Leukozyten vermittelte Störung der endothelialen Barriere führt zum interstitiellen Ödem und zur Migration von Leukozyten in das Interstitium.

1.1.2 Therapie

Die intensivmedizinische Therapie des akuten Lungenversagens beruht auf den Prinzipien, die bei der Therapie des SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), der Sepsis und des MODS (Multiple Organ Dysfunktion Syndrom) zur Anwendung gelangen. Der Ausfall von Organfunktionen macht den Einsatz von entsprechenden Ersatzverfahren notwendig. Die Kriterien zum Einsatz dieser Verfahren sind nicht lungenspezifisch.

Der erhöhte Hämatokrit, welcher Folge des intravasalen Volumenmangels ist, kann durch die isovolämische Hämodilution effektiv abgesenkt werden. Durch Austausch von Vollblut gegen einen Plasmaexpander lässt sich der Hämatokrit ohne Beeinflussung der kardiorespiratorischen Parameter auf 30 bis 35 % absenken und damit eine Verbesserung der rheologischen Eigenschaften des Blutes erreichen. Dieses Therapiekonzept ist tierexperimentell (46, 47, 38) und in einer klinischen Pilotstudie evaluiert (45).

Neben den klassischen Organersatzverfahren der Intensivmedizin gibt es neue experimentelle Ansätze.

Koch et al. haben in einer Reihe von Experimenten den Einfluss von Ω -3-Fettsäuren auf die inflammatorische Gefäßantwort der Lunge untersucht (51, 52). An isoliert perfundierten Kaninchenlungen mit Ω -3-Fettsäuren konnte gezeigt werden, dass die Membranphospholipide der Lunge so verändert wurden, dass bei inflammatorischer Stimulation Ω -3-Metabolite gebildet wurden, die organprotektiv wirkten. Es kam zu einer vermehrten Freisetzung von weniger bronchokonstriktiv wirkenden und vermindert permeabilitätssteigernden Syntheseprodukten der Eicosapentaensäure (LTC₅) und einer Reduzierung der Mediatoren der Arachidonsäure (LTC₄) gegenüber der mit Sojabohnenöl infundierten Vergleichsgruppe (52). Die Ergebnisse von Sane et al. mit endotoxämischen Ratten bestätigten diese Beobachtungen, hier wurde durch die Infusion einer Eicosapentaensäure- (EPA) haltigen Fettemulsion die Entstehung von Lungenödem reduziert (88). Diese Ergebnisse zeigen eine Reduzierung der

Ödembildung beim akuten Lungenversagen und die Möglichkeit einer Intervention durch die Verabreichung von Ω -3-Fettsäuren (Fischöl), da dadurch EPA in die Membranphospholipide eingebaut wird und im folgenden vermehrt die antiinflammatorisch wirkenden Leukotriene der 5er-Serie entstehen. Gleichzeitig werden die Rezeptoren der inflammatorischen AA-Derivate blockiert, wodurch die chemotaktische Rekrutierung von Leukozyten gehemmt wird. Dadurch wird sowohl die leukozytäre Gewebeeinfiltration als auch die Permeabilitätssteigerung des Lungenendothels vermindert (32). Die vielfältigen Effekte von Ω -3-Fettsäuren, die bisher beobachtet wurden, deuten darauf hin, dass sie viel versprechende Substrate bei der Therapie des akuten Lungenversagens sein können (112).

1.2 Biochemie und Pharmakologie der Ω -3- und Ω -6-Fettsäuren

Fettsäuren werden über die Anzahl der C-Atome, die Zahl der Doppelbindungen und die Position der ersten Doppelbindung, gerechnet vom Methylende des Moleküls (Ω -3, Ω -6 oder Ω -9), charakterisiert. Die Ω -6-Fettsäure Linolsäure und die Ω -3-Fettsäure α -Linolensäure sind für den Menschen essentiell. Von der Linolsäure leiten sich als wichtigste Ω -6-Fettsäuren die γ -Linolensäure und die Arachidonsäure (AA) ab, während die α -Linolensäure die Vorläufersubstanz der langkettigen Ω -3-Fettsäuren Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) darstellt. Die Synthese der Eicosanoide startet mit einer Aktivierung des Enzyms Phospholipase A₂, wodurch die Präkursoren EPA und AA aus den Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt werden. Da sich AA und EPA lediglich durch eine Doppelbindung im Molekül unterscheiden, konkurrieren beide Fettsäuren um die Metabolisierung durch die gleichen Enzymsysteme und können sich durch ihr jeweiliges Angebot gegenseitig verdrängen (107).

In Abhängigkeit von dem Enzymmuster der jeweiligen Zelle (z.B. Thrombozyten, Endothelzellen, Leukozyten) entstehen aus diesen Fettsäuren durch das Enzym Cyclooxygenase Endoperoxide, aus denen Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane gebildet werden. Durch das Enzym Lipoxygenase entstehen im ersten Schritt Hydroperoxide, aus denen schließlich Leukotriene hervorgehen. Aus Ω -6-Fettsäuren entstehen Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane der 2er bzw. Leukotriene der 4er Reihe und aus Ω -3-Fettsäuren Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane der 3er bzw. Leukotriene der 5er Reihe (111).

Das von der EPA abgeleitete Cyclooxygenaseprodukt der 3er Reihe Thromboxan A₃ zeigt erheblich reduzierte proaggregatorische und vasokonstriktive Eigenschaften im Vergleich zu den AA-abgeleiteten Thromboxan A₂, während Prostaglandin I₃ in der antiaggregatorischen und vasodilatierenden Wirksamkeit dem Prostaglandin I₂ vergleichbar ist. Daher resultiert aus der Einschleusung von Ω -3-Fettsäuren in den Prostanoidmetabolismus ein geringerer proaggregatorischer sowie ein vasodilatativer Effekt.

Am Ende der enzymatischen Umsetzung über den Lipoxygenaseweg entstehen aus der EPA Leukotriene der 5er Serie (LTB₅, C₅, D₅, E₅), die im Vergleich zu den AA-Derivaten geringere proinflammatorische Eigenschaften aufweisen. So besitzt LTB₅ unter anderem eine wesentlich geringere vasokonstriktorische und chemotaktische Potenz als LTB₄. Auch die Bildung des Plättchenaggregierenden Faktors (PAF), der stark proinflammatorisch und plättchenaggregierend wirkt, wird durch EPA reduziert (108).

Das Verhältnis an zugeführten Ω -3- zu Ω -6-Fettsäuren scheint entscheidend für die protektiven pharmakologischen Effekte des daraus resultierenden Eicosanoidprofils zu sein (111). Während bei den aus Ω -6-Fettsäuren basierenden Emulsionen das Verhältnis von Ω -3: Ω -6 Fettsäuren 1:7 beträgt, wird eine Relation von 1:2 bis 1:4 empfohlen (43).

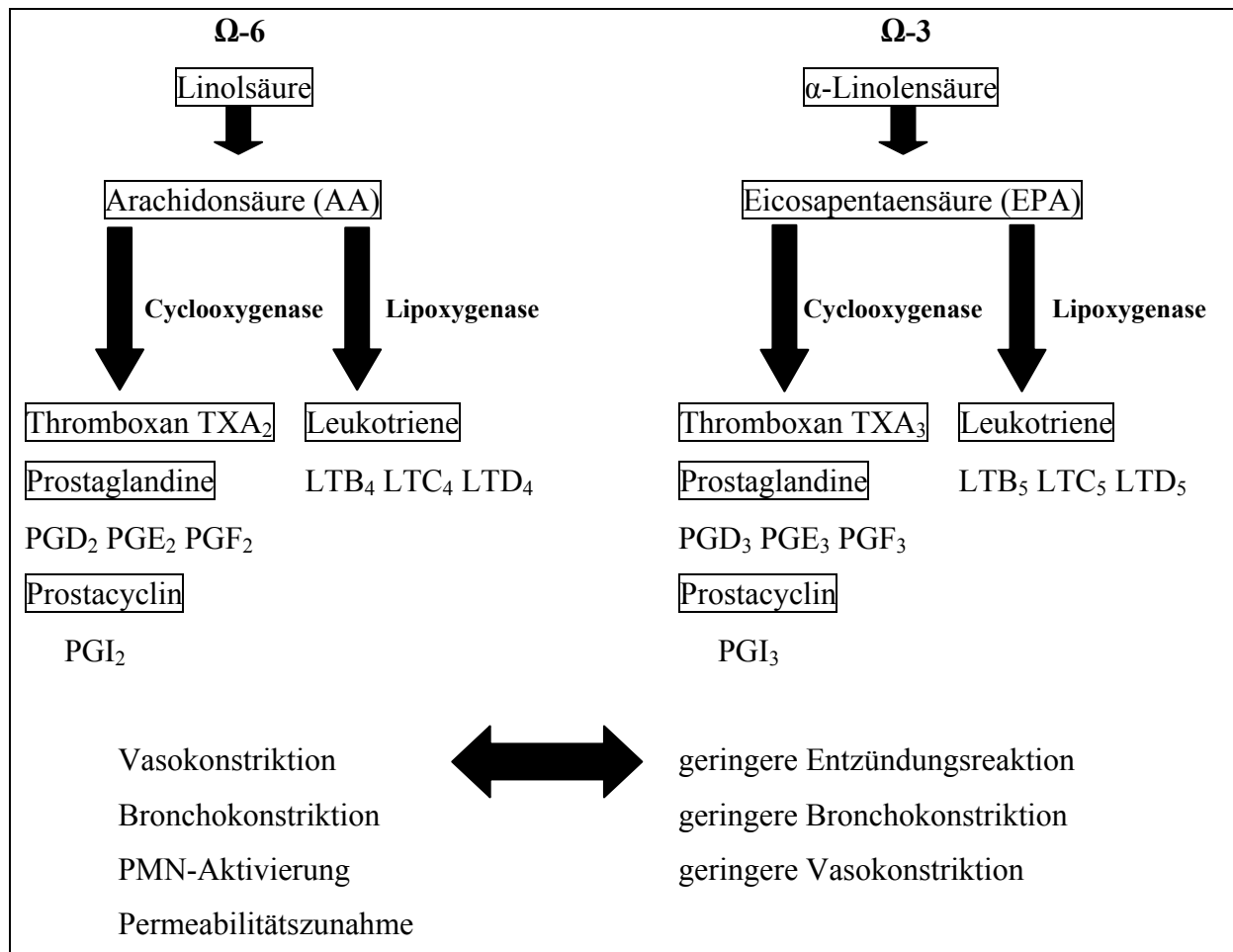


Abb. 1.2: Biochemie und Pharmakologie der Ω -3- und Ω -6-Fettsäuren

1.3 Bedeutung der Mikrozirkulationsstörung bei der akuten Pankreatitis

Mikrozirkulationsstörungen sind ein wichtiger Co-Faktor in der Entwicklung der schweren nekrotisierenden Pankreatitis. Tierexperimentell sind die Mikrozirkulationsstörungen direkt durch Intravitalmikroskopie darstellbar. Klinisch lässt sich eine Minderperfusion oder gar eine aufgehobene Perfusion in der Computertomographie durch die verminderte Anreicherung von Kontrastmittel nachweisen (5). Es gibt allerdings tierexperimentelle Hinweise, dass die Kontrastmittelgabe die Mikrozirkulationsstörung des Pankreas verstärkt (21, 22).

Die frühere Auffassung, dass die Mikrozirkulationsveränderungen auf das Pankreas beschränkt sind, wurde nach aktuellen tierexperimentellen Untersuchungen revidiert, diese zeigen, dass auch in anderen Organen Veränderungen der Mikrozirkulation bestehen (24). Als wichtigste Organsysteme sind hier die Lunge, die Niere, die Leber und das Kolon zu nennen. Während die Veränderungen an Kolon und Leber inzwischen gut charakterisiert werden konnten, sind Mikrozirkulationsuntersuchungen an Niere und Lunge bisher aufgrund technischer Schwierigkeiten nur eingeschränkt möglich gewesen.

Heute fasst man die Mikrozirkulationsstörungen bei der akuten Pankreatitis als Teil des SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) auf, welches durch Aktivierung von proinflammatorischen Mediatoren und Zytokinkaskaden ausgelöst wird. Die Mikrozirkulationsstörungen sind Co-Faktor in der Pathogenese des MODS (Multiorgandysfunktionssyndrom). Da die Mikrozirkulationsstörungen persistieren, haben auch später einsetzende Maßnahmen zur Verbesserung desselben einen positiven Effekt. Auch wenn das Ausmaß der Nekrotisierung – also der lokale Pankreasschaden – bei verzögertem Therapiebeginn nicht mehr beeinflusst wird, kann eine Verbesserung der Mikrozirkulation auch zu einem späteren Zeitpunkt noch das MODS günstig beeinflussen (23). Deshalb ist die Forschung auf diesem Gebiet von besonderem Interesse.

Untersuchungen im Bereich des Kolons zeigen, dass sich durch Verbesserung der Kolon-Mikrozirkulation die Darmbarriere stabilisieren lässt und dadurch die bakterielle Translokation und sekundäre Pankreasinfektion vermindert werden können (17). Bei Verbesserung des kapillären Blutflusses in der Leber konnte bei Ratten mit schwerer nekrotisierender Pankreatitis eine Verbesserung des Retikoendothelialensystem nachgewiesen werden (28).

Daher stellte sich die Frage, ob ähnliche Veränderungen und ggf. therapeutische Effekte auch im Bereich der Lunge zu beobachten sind. Dies ist bisher nicht untersucht worden und gerade in Bezug auf die hohe Rate pulmonaler Komplikationen von besonderem Interesse.

Neben der Bestimmung des kapillären Blutflusses sind als Parameter die Bestimmung der Leukozytenadhäsion und der Kapillarpermeabilität von entscheidender Bedeutung. Die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand wird als initiales Ereignis einer Entzündungsreaktion angesehen.

1.4 Tiermodell

Die Erforschung der Pathogenese der akuten Pankreatitis sowie die Testung neuer Therapieverfahren muss zum größten Teil im Tierexperiment erfolgen. Dieses hat folgende Gründe: Bei der akuten Pankreatitis handelt es sich um ein heterogenes Krankheitsbild, so dass die Vergleichbarkeit von verschiedenen Patientengruppen nur mit Einschränkungen möglich ist. Außerdem handelt es sich um eine seltene Erkrankung, so dass Therapiestudien multizentrisch erfolgen müssen, was die Zahl von Untersuchungen begrenzt.

Als Versuchstiere sind Ratten, Kaninchen oder Katzen benutzt worden (64). Aus Kosten- und Praktikabilitätsgründen waren zumeist Ratten das Versuchstier der Wahl.

Wir haben die Untersuchungen an dem bei uns etablierten Modell der akut nekrotisierenden Pankreatitis der Ratte durchgeführt. Die akut nekrotisierende Pankreatitis wurde durch die Kombination von exokriner Hyperstimulation mittels des Cholecystokininanalogons Cerulein mit einer retrograden Injektion von Gallensäuren in den Pankreasgang induziert. Auf die besondere Eignung dieses Modells wird in der Diskussion eingegangen.

1.5 Mikrozirkulation der Rattenlunge

1.5.1 Historie

Im Jahre 1925 beschrieb Hall erstmals ein Verfahren der intravitalen Mikroskopie der Lunge bei Katzen und Kaninchen (34). 1936 berichtete Wearn über die Betrachtung der Katzenlunge durch ein Fenster in der parietalen Pleura (106). Mit diesem Modell konnten räumliche und zeitliche Veränderungen der Blutflussgeschwindigkeit in Arteriolen und Kapillaren beobachtet werden.

Durch Implantation eines Fensters in die Brustwand konnte Krahl 1963 die Lungenmikrozirkulation bei nicht anästhesierten Tieren untersuchen (53).

Schlosser et al. verwendeten die Technik der Hochgeschwindigkeitsaufnahme und erhielten so die ersten quantitativen Daten der Erythrozytengeschwindigkeit innerhalb von Kapillaren bei Kaninchen (90). Die Messzeit war bei diesen Untersuchungen allerdings auf wenige Sekunden beschränkt, da bei längerer Betrachtung durch die Hitze der Messlampe Gewebeschäden eingetreten wären.

1965 beschrieb Wagner dann eine Technik, bei der mittels Überbeleuchtung die Untersuchung der pulmonalen Mikrozirkulation beim Hund möglich war (103). Diese Methode erlaubte Messungen der kapillären Durchgangszeit mit Hilfe von Fluorescein-Isothiocyanate-(FITC) markiertem Dextran und Untersuchungen der kapillären Perfusion (105, 76, 104).

Finger et al. entwickelten 1994 eine Methode, mit der man die Mikrozirkulation an der Lungenoberfläche von Ratten untersuchen konnte (19). Ein thorakales Fenster erlaubte bei Sprague-Dawley Ratten die Beobachtung der pulmonalen Mikrogefäße bei lebenden Tieren über einen Zeitraum von mehr als 30 Minuten.

Von der Arbeitsgruppe um Messmer wurde 1993 eine Methode zur Messung der Mikrohämodynamik bei beatmeten Kaninchenlungen mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie vorgestellt (57). Kuhnle et al. benutzten ein thorakales Fenster, um anhand ihres Modells den Zusammenhang zwischen Mikro- und Makrohämodynamik an der Kaninchenlunge nachzuweisen.

In einer weiteren Arbeit wurde der Effekt von Ischämie und Reperfusion auf die Leukozyten-sequestration in der Lunge untersucht (58).

1.5.2 Eigene Technik

Das in dieser Arbeit benutzte Modell zur Intravitalmikroskopie der Rattenlunge wurde im Rahmen einer Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe etabliert und publiziert (83,94). Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Modell um eine stabile Methode handelt; über einen Zeitraum von 2 Stunden traten keine spontanen Veränderungen der Parameter (Leukozytenadhäsion, Erythrozytenflussgeschwindigkeit und Kapillarpermeabilität) auf. Das Modell wurde unter verschiedenen pathophysiologischen Situationen evaluiert (Hypo- bzw. Hyperthermie, Hypoxie, etc.). Auch unter diesen Bedingungen fanden sich gleichsinnige Veränderungen bei den entsprechenden Versuchstiergruppen.

1.6 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit sollte die folgenden Fragen beantworten:

- 1) Gibt es Mikrozirkulationsstörungen in der Lunge bei akut nekrotisierender Pankreatitis?
- 2) Verändern sich die pulmonalen Mikrozirkulationsstörungen durch parenterale Applikation von Ω -3-Fettsäuren im Vergleich zu einer fettfreien bzw. Ω -6-Fettsäuren haltigen Ernährung ?
- 3) Lässt sich das Überleben bei akuter nekrotisierender Pankreatitis durch Ω -3-Fettsäuren beeinflussen?

2 METHODE

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften zur Benutzung und Haltung von Versuchstieren durchgeführt und von der Kommission zur Erlaubnis von Tierversuchen aufgrund von § 8 des Tierschutzgesetzes (Genehmigung von Tierversuchen an lebenden Wirbeltieren) unter der Nummer G 0074/00 genehmigt.

Es wurden für sämtliche Versuche männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 400 Gramm benutzt. Den Tieren wurde 12 Stunden vor Versuchsbeginn die feste Nahrung entzogen. Sie hatten aber weiterhin freien Zugang zu Wasser. Am Morgen des Versuchstages wurden sie aus den Ställen des Tierlabors der Chirurgischen Klinik in das im selben Gebäudeteil befindliche Versuchslabor gebracht. Bis zur Beendigung des Versuchs wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. Die Versuche wurden unter Beibehaltung des Tag-Nacht-Rhythmus durchgeführt. Während des Experiments erhielten die Tiere in den ersten 6 Stunden Ringer-Lösung i.v., danach hatten sie wieder freien Zugang zu Trinkwasser.

2.2 Narkose

Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere in einem Glasbehälter mit vaporisiertem Ether (Diethylether, Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken) betäubt. Anschließend erfolgte die intramuskuläre Gabe von 10 mg/kg Körpergewicht Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, Bayervital, Leverkusen) sowie von 40 mg/kg Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketanest 50, Parke-Davis GmbH, Berlin). Als Parameter für eine ausreichende Narkosetiefe wurden die Verlangsamung der Atmung, das Erlöschen der typischen Schmerzreflexe sowie das Fehlen einer Reaktion auf externe Stimuli herangezogen. Die Dauer der vollständigen Analgesie betrug ca. 60 Minuten. Bei Bedarf wurde durch erneute Ketanest-Gabe entweder intramuskulär oder über den inzwischen gelegten intravenösen Zugang eine ausreichende Narkosetiefe wiederhergestellt.

2.3 Katheterimplantation

Zur Infusion von Cerulein- und Ringerlösung wurde den Tieren ein zentralvenöser Verweilkatheter über die rechte Vena jugularis interna implantiert. Für die Entnahme von Blut, zur Durchführung der Blutdruckmessung sowie für die parenterale Therapie erfolgte die Implantation eines arteriellen Zugangs in die linke Arteria carotis communis. Für beide Katheter wurden Polyethylen-Verweilkatheter (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm benutzt.

Zur Katheterimplantation wurde an der Halsvorderseite nach Rasur eine ca. 2 cm lange quere Inzision gesetzt. Zuerst wurden der arterielle und venöse Katheter mit Hilfe einer Kanüle am Nacken ausgeleitet, dort durch eine ca. 20 cm lange flexible Stahlfeder geführt, die am Nacken der Tiere befestigt und später aus dem Käfig ausgeleitet wurde. Danach wurde die Vena jugularis interna freipräpariert, nach peripher ligiert und nach zentral angeschlossen. Nach Inzision der Vene wurde der mit physiologischer Kochsalzlösung gespülte Katheter 2,6 cm vorgeschoben und die korrekte intravasale Lage durch Aspiration von Blut geprüft. Der Katheter wurde durch Knoten der vorgelegten Ligatur in seiner Lage fixiert. Anschließend erfolgte die Präparation der linken Arteria carotis communis. Das Gefäß wurde ebenfalls nach peripher ligiert und nach zentral eine Ligatur vorgelegt. Nach Inzision und Vorschieben des Katheters um 2,6 cm, sowie Prüfung auf intravasale Lage, erfolgte die Fixierung des Katheters. Abschließend wurde die Inzision durch fortlaufende Naht (Vicryl 3-0, Ethicon, Norderstedt) verschlossen.

Die intravasalen Verweilkatheter ermöglichten nach Erwachen der Tiere aus der Narkose die problemlose Infusion und Blutabnahme bei freier Beweglichkeit der Tiere im Käfig.

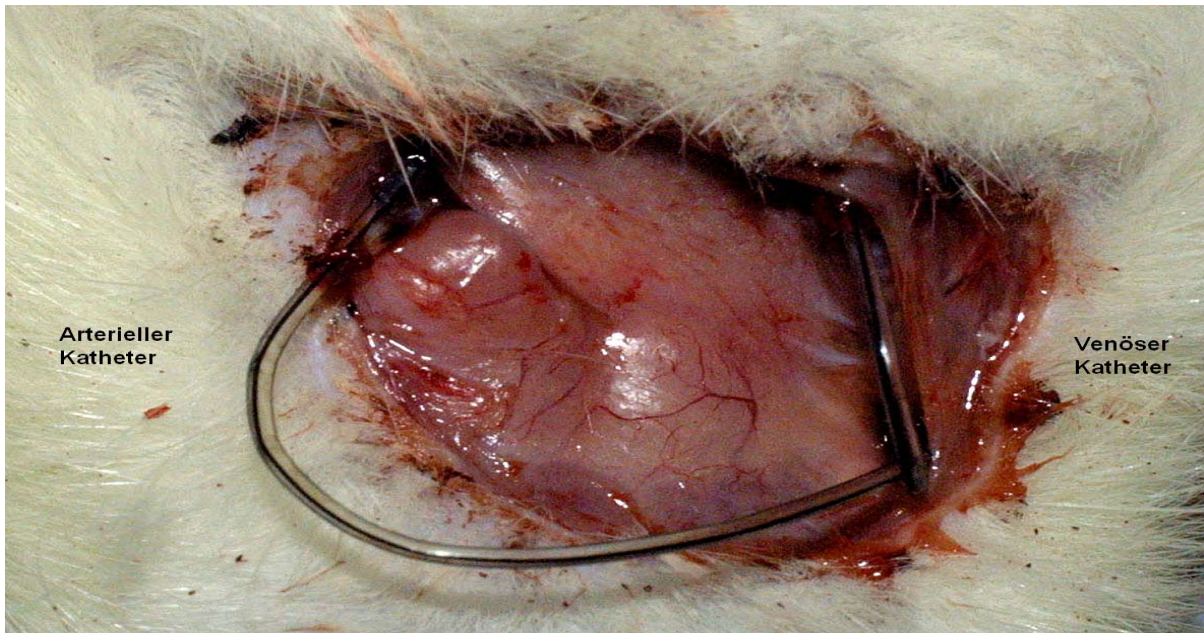


Abb. 2.3.1 zervikale Katheterimplantation: arterieller Katheter in der linken Arteria carotis communis und venöser Katheter in der rechten Vena jugularis interna

2.4 Pankreatitisinduktion

2.4.1 Zubereitung der Glykodeoxycholsäure-Lösung

Die kommerziell erhältliche Glykodeoxycholsäure (No. G-3258, Sigma Chemical, Deisenhofen) wurde in unserem Labor in Glycil-Glycin-Puffer aufgelöst. 100 ml Glycil-Glycin-Puffer enthält 1,321 g Glycil-Glycin und 0,0588 g CaCl_2 . Der Puffer wurde mit NaOH auf $\text{pH} = 8,00$ eingestellt. 0,04716 g GDOC wurden in 10 ml Glycil-Glycin-Puffer aufgelöst, das entspricht einer 10 mM Lösung. Die Tiere erhielten über 10 Minuten jeweils 0,125 ml/ 100 g Körpergewicht dieser Lösung intraduktal (Ductus biliopancreaticus).

2.4.2 Zubereitung der Cerulein-Lösung

Das Cholecystokininanalogon Cerulein (Ceruletid Tris-(diethylamin)-Salz; TAKUS®, Farmitalia Carlo Erba GmbH, Freiburg) wurde in physiologischer Kochsalz-Lösung gelöst. Jedes Tier erhielt 12 ml/ kg physiologische Kochsalz-Lösung mit 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Cerulein kontinuierlich über einen Zeitraum von 6 Stunden intravenös.

2.4.3 Durchführung der intraduktalen Infusion

Die intraduktale Pankreatitisinduktion erfolgte nach der von Schmidt et al. etablierten Methode (93). Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

Nach medianer Oberbauchlaparotomie wurde die Duodenalschlinge zusammen mit dem bei Ratten intraperitoneal gelegenen Pankreas vor die Bauchdecke luxiert. Die Einmündungsstelle des Ductus biliopancreaticus wurde identifiziert und ca. 0,5 cm oberhalb derselben eine oberflächliche Haltenaht durch die Duodenalwand geführt. Nach Aufspannen des Duodenum durch leichten Zug erfolgte ca. 0,5 cm unterhalb der Papille die Punktion mit der Kanüle (24G, Angiocath, Becton-Dickinson Vascular Access, Sandy, USA). Nach Zurückziehen der Nadel konnte der Ductus biliopancreaticus mit der Plastikkanüle über eine Strecke von ca. 3 mm intubiert werden. Anschließend wurde der Operationstisch zur Drainage der Galle und des Pankreassekretes für 3 Minuten um 60 Grad eleviert und danach unter Beibehaltung der Schräglage der Ductus hepaticus im Bereich der Leberpforte mit einer kleinen Bulldog-Gefäßklemme abgeklemmt.

Nachdem das Sekret vollständig abgeflossen war, wurde die Schräglage aufgehoben und die Kanüle im Ductus biliopancreaticus entfernt und durch eine neue, jetzt mit einem Infusionssystem verbundene Kanüle ersetzt. Die Infusion der GDOC-Lösung erfolgte über 10 Minuten druck- (Druckobergrenze 30 mmHg) und volumenkontrolliert (0,125 ml/100 g KG). Hierzu benutzten wir eine handelsübliche Infusionspumpe (IVAC 770; Lilly Medizintechnik, Giessen, Deutschland). Nach Abschluss der Infusion erfolgte die Entfernung der Kanüle und der Verschluss der Punktionsstelle am Duodenum durch eine Naht (Vicryl 5-0, Firma Ethicon, Norderstedt). Der Verschluss des Abdomens erfolgte durch eine zweischichtige fortlaufende Naht (Vicryl 4-0, Ethicon, Norderstedt). Die Tiere wurden anschließend in Einzelkäfige zurückgelegt und an die intravenöse Cerulein-Infusion angeschlossen, welche mittels einer Infusionspumpe (Perfursor segura FT, Firma B. Braun, Melsungen) gesteuert wurde. Der Start der Cerulein-Infusion fiel zeitlich mit dem Erwachen der Tiere aus der Narkose zusammen. Die Dauer der Infusion betrug 6 Stunden bei einer Infusionsmenge von 2 ml/ (kgKGxh). Nach 6 Stunden wurde die Infusion beendet und den Tieren freier Zugang zu Wasser gewährt.

2.4.4 Verifikation der Erkrankungsschwere

Vor Beginn und nach Beendigung der Induktion erfolgte bei allen Tieren eine Blutabnahme zur Bestimmung des Hämatokrits. Die entzogene Blutmenge wurde durch Gabe des doppelten Volumens NaCl-Lösung 0.9 % ersetzt.

In früheren Arbeiten (91) konnte nachgewiesen werden, dass bei der akuten nekrotisierenden Pankreatitis der Hämatokritanstieg mit der Schwere der Erkrankung, gemessen am Ausmaß der Nekrosen, sowie mit dem Anstieg des Trypsinogen-Aktivationspeptids korreliert. Danach kann von einer schweren nekrotisierenden Pankreatitis nur bei einem Hämatokritanstieg von mindestens 5 % ausgegangen werden. Tiere, bei denen der Hämatokrit innerhalb von 6 Stunden nicht um 5 % anstieg, wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen.

2.5 Versuchsgruppen

2.5.1 Übersicht über die verschiedenen Versuchsgruppen

Es wurden zunächst Kontrolltiere mit Tieren mit akut nekrotisierender Pankreatitis verglichen. Des Weiteren wurden mit Ω -3-Fettsäuren, Ω -6-Fettsäuren und Fettfrei infundierte Tiere der Kontrollgruppe und der akut nekrotisierenden Pankreatitisgruppe miteinander verglichen. Die Kurzbezeichnung der Gruppen, die im Folgenden verwendet werden, ist aus der Tabelle 2.5.1.1 zu ersehen.

Gruppe	Kurzbezeichnung
Kontrolle mit Fettfreier-Lösung	K-Fettfrei
Kontrolle mit Ω -6-Lösung	K- Ω -6-Fettsäuren
Kontrolle mit Ω -3-Lösung	K- Ω -3-Fettsäuren
Akut nekrotisierende Pankreatitis mit Fettfreier-Lösung	NP-Fettfrei
Akut nekrotisierende Pankreatitis mit Ω 6-Lösung	NP- Ω -6-Fettsäuren
Akut nekrotisierende Pankreatitis mit Ω 3-Lösung	NP- Ω -3-Fettsäuren

Tab. 2.5.1.1: Versuchsgruppen mit Kurzbezeichnung

2.5.2 Kontrolltiere

Bei den 18 Kontrolltieren wurden zu Beginn des Versuches eine Laparotomie mit Kanülierung des Pankreasganges und anschließend eine sechsstündige Infusion mit NaCl-Lösung (2 ml/ (kgKGxh) durchgeführt. Somit wurden an den Kontrolltieren die gleichen operativen Manipulationen wie an den Pankreatitistieren vorgenommen. Die intravitalmikroskopische Untersuchung erfolgte nach 18 Stunden.

2.5.3 Tiere mit nekrotisierender Pankreatitis

Die Pankreatitisinduktion erfolgte, wie in Punkt 2.4.3 beschrieben, bei 18 Tieren über eine intraduktale Infusion von GDOC (0,125 ml/ 100g KG) und im Anschluss die intravenöse Infusion von Cerulein (2 ml/ (kgKGxh) über 6 Stunden. Die intravitalmikroskopische Untersuchung erfolgte nach 18 Stunden.

2.5.4 Therapiegruppen

Zur Beantwortung der Frage, ob sich die pulmonalen Mikrozirkulationsstörungen durch Gabe von Ω -3-Fettsäuren verbessern lassen, wurden den Tieren mit schwerer Pankreatitis und den Kontrolltieren die folgenden drei Therapiegruppen (fettfrei, Ω -6-Fettsäuren und Ω -3-Fettsäuren) mit jeweils 6 Tieren in Tabelle 2.5.4.1 gegenübergestellt. Alle Tiere erhielten ausschließlich parenterale Ernährung mit 16 ml/ 18 h. In der fettfreien Gruppe wurden die Kalorien über Glucoselösung verabreicht, in der Ω -6-Fettsäuren und Ω -3-Fettsäuren Gruppe mit Fettlösung. Jede Gruppe erhielt insgesamt 32 kcal Kalorien.

Therapiegruppen	Fettfrei	Ω -6-Fettsäuren	Ω -3-Fettsäuren
Infusion	ml/18h	ml/18h	ml/18h
Ringer	12,5	12,5	12
Glukose 50%	3,5	-	-
Lipofundin 20% MCT/LCT (Ω -6-F)	-	3,5	2,85
Omegaven (Ω -3-F)	-	-	1,15
Kalorien in kcal/ml	2	2	2
Total (ml/18h)	16	16	16

Tab. 2.5.4.1: Zusammensetzung der Infusionstherapie der verschiedenen Therapiegruppen

2.6 Blutabnahmen, Monitoring

Die Bestimmung des Hämatokrits diente zur Abschätzung der Erkrankungsschwere bei akuter nekrotisierender Pankreatitis und war außerdem ein Parameter zur Beurteilung des Volumenstatus.

Nach Legen des venösen und arteriellen Zugangs wurde den Tieren erstmalig arteriell Blut abgenommen. Es erfolgte eine Bestimmung des Ausgangshämatokrits. Nach Beendigung der Pankreatitisinduktion wurde erneut eine arterielle Blutabnahme mit Bestimmung des Hämatokrits durchgeführt. Vor Beginn der Mikrozirkulationsuntersuchungen erfolgte die dritte Blutabnahme mit der letzten Bestimmung des Hämatokrits.

Mit Beginn der Mikrozirkulationsuntersuchungen wurde ein kontinuierliches Monitoring des mittleren arteriellen Drucks durch die direkte blutige Druckmessung über den Arteria-carotis-Katheter durchgeführt (Gerät Hellige, Herzfrequenz Monitor 23604902, Analoganzeige Druck 237023).

2.7 Ausschlusskriterien

Der Hämatokritanstieg, der die Hämokonzentration widerspiegelt, ist sowohl bei Patienten (62) als auch bei Tieren mit akuter Pankreatitis ein Gradmesser der Schwere der Erkrankung (17). Daher wurden Tiere, welche nach Abschluss der Induktion einen Hämatokritanstieg von

weniger als 5 Prozent aufwiesen, nicht zur Gruppe der akuten nekrotisierenden Pankreatitis zugelassen.

Während der gesamten Dauer der Mikrozirkulationsuntersuchung wurde kontinuierlich mittels blutiger arterieller Messung der Blutdruck aufgezeichnet. Unterschritt der mittlere arterielle Druck kurzfristig 80 mmHg (z.B. nach Gabe von Rompun zur Aufrechterhaltung der Narkose), wurde gewartet, bis sich der Druck spontan wieder auf einen Wert über 80 mmHg erholt hatte. Sank der Druck dauerhaft unter 80 mmHg, wurden diese Tiere von der Untersuchung ausgeschlossen.

Indem nur hämodynamisch stabile Tiere in die Auswertung eingeschlossen wurden, sollten Störungen der Mikrozirkulation, die offensichtlich durch systemische Veränderungen bedingt waren, eliminiert werden.

Anhand der nach Versuchsende entnommenen Histologie wurde in den Gruppen mit akuter nekrotisierender Pankreatitis das Vorliegen einer nekrotisierenden Pankreatitis histomorphologisch bestätigt.

2.8 Intravitalmikroskopie

2.8.1 Herstellung von Puffer und Lösung

2.8.1.1 Herstellung von Rhodamin-Lösung

Die selektive Färbung von Leukozyten erfolgte mit Rhodamin. 20 mg Rhodamin (Rhodamine 6 G, Sigma R-4127) wurden in 10 ml 0,9 % NaCl gelöst. 1 ml dieser Lösung wurde in 9 ml 0,9 % NaCl gelöst. Von dieser Lösung wurden dem Versuchstier 0,2 ml zur Untersuchung appliziert.

2.8.1.2 Herstellung von fluoreszenzmarkierten Erythrozyten

Zunächst erfolgte die arterielle Entnahme von ca. 5 ml Vollblut bei einem Tier, welches nur für die Blutabnahme benutzt wurde. Das Blut wurde in eine heparinisierte Spritze aufgezogen. Anschließend erfolgte das 3-malige Waschen in Alsevers Puffer. Zum Waschen wurden die Erythrozyten mit dem jeweiligen Puffer versetzt und in der Zentrifuge mit 2000 Upm für 10 min zentrifugiert. Danach erfolgte ein einmaliges Waschen in Bicine-Puffer und die

Verdünnung 1:1 mit Bicine-Puffer. Pro Milliliter Erythrozyten-Sediment wurden 9 mg FITC (Fluoreszeinisothiozyanat, Isomer I, Sigma Nr. F-1628) in 100 µl DMF (N.N-Dimethylformamid, Sigma Nr. D-4254) gelöst und anschließend zu den gelösten Erythrozyten hinzugegeben. Es erfolgte die Inkubation für 3 Stunden im Schüttel-Wasserbad bei 28°C und 60 Oszillationen pro Minute.

Die Probe wurde anschließend mindestens 5-mal in Bicine-Puffer gewaschen, bis der Überstand klar war. Die Erythrozyten wurden 1:1 mit 0,9 % NaCl verdünnt und zur Konservierung mit 100 µl Citrate-Phosphate-Dextrose (Sigma Nr. C-7165) versetzt. Die so markierten Erythrozyten waren 5 Tage verwendbar.

Herstellung des Alsevers Puffer:

1 l Aqua dest. + 20,5 g Dextrose + 8,0 g Zitronensäure (Trisodium Salt Dihydrate, Sigma C-7254) + 0,55 g Zitronensäure (Freie Säure, Anhydrat, Sigma C-0759) gemischt, Einstellung mit NaOH/HCl auf pH 6,2 und mit NaCl auf 290 mosmol.

Herstellung des Bicine-Saline-Puffers:

1 l Aqua dest. + 3,264 Bicine (N, N-bis (2-Hydroxyethyl)glycin, Sigma B-3876) + 7,815 g NaCl + 10 ml 1N NaOH gemischt, Einstellung mit NaOH auf pH 8,3 und mit NaCl auf 290 mosmol.

Zur Durchführung der Mikrozirkulationsuntersuchung wurde den Tieren 0,05 ml/100g KG FITC-markierter Erythrozytenlösung intravenös injiziert.

2.8.1.3 Herstellung von FITC-Dextran-Lösung

Die Markierung des Plasmas erfolgte mit FITC-Dextran. Dazu wurden 5 mg FITC-Dextran (Fluorescein Isothiocyanate-Dextran FD-70, Sigma Lot 128H9801) in 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung gelöst. Zur Durchführung der Messung wurde den Tieren 0,3 ml appliziert.

2.8.2 Versuchsaufbau

Die Mikroskopiereinheit bestand aus dem Objektiv (Achromplan 20x/0,50W Ph2, Firma Zeiss, Deutschland), dem Mikroskop (Firma Leitz, Wetzlar, Deutschland) und war mit einer Kamera (Television Camera 4400, COHU Inc. Electronics Division) verbunden. Die Bilder wurden auf einem handelsüblichen Schwarz-Weiß-Monitor (Firma Sony) dargestellt und auf Video aufgezeichnet (Video Recorder AG-7350, Panasonic). Die Lichtquelle für die Intravitalmikroskopie war eine Quecksilberdampf-Flampe (Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100W/2, Osram, Deutschland). Die Visualisierung von Leukozyten, Erythrozyten und FITC-Dextran erfolgte durch Vorschaltung verschiedener Filter (450-490 nm bzw. 530-560 nm).

2.8.3 Durchführung der Narkose und Exposition der Lunge

Zur Exposition der Lunge und Durchführung der Intravitalmikroskopie wurden die Tiere mittels i.v.-Gabe von Rompun (1%) bzw. Ketanest (80 mg/ml) narkotisiert. Die benötigte Dosis variierte individuell (0,05 – 0,15 ml Rompun 1% bzw. 0,1 – 0,4 ml Ketanest 80 mg/ml) und war insbesondere durch die Erkrankungsschwere bestimmt. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war (Verifizierung durch Nichterweckbarkeit, Erlöschen des Kornealreflexes), wurden die Tiere zunächst linksthorakal rasiert. Es erfolgte dann die Eröffnung der von der Katheterimplantation stammenden Wunde an der Halsvorderseite. Nach Längsspaltung der geraden Halsmuskulatur wurde die Trachea dargestellt. Diese wurde unterfahren und angeschlungen. Die Trachea wurde quer inzidiert und mit einer auf ca. 5 mm gekürzten Kanüle (Insyte-W 1,7 x 51 mm; Firma Becton Dickinson, USA) intubiert. Die Ratte wurde dann an die Beatmung angeschlossen (Small Animal Ventilator KTR 4, Hugo Sachs Elektronik, 79229 March, Deutschland) und im weiteren Verlauf kontrolliert beatmet (Parameter siehe Tabelle).

	Kontinuierliche Beatmung	Beatmung zur Mikrozirkulationsuntersuchung
Atemfrequenz (1/min)	70	0
PEEP (cm H ₂ O)	2,5	2,5
Inspirationsphase (%)	40	(Pause)
Plateauphase (%)	10	(Pause)
Expirationsphase (%)	50	(Pause)
Endinspiratorischer Druck (cm H ₂ O)	12,5	12,5

Tab. 2.8.3.1: Parameter während der kontinuierlichen Beatmung und während der Atempause zur Durchführung der Intravitalmikroskopie



Abb. 2.8.3.1: Beatmungsgerät

Anschließend wurden die Tiere in Rechtsseitenlage gelagert und eine linke laterale Thorakotomie durchgeführt. Die Rippen wurden mit Hilfe eines Sperrers sukzessive auseinandergedrängt. Nach Beatmung und Exposition der Lunge wurden die Tiere an den Mikrozirkulationsarbeitsplatz gebracht.

2.8.4 Durchführung der Intravitalmikroskopie

Die Untersuchungsplattform mit dem darauf gelagerten Tier wurde auf den Mikroskopiertisch gestellt. Das Beatmungsgerät stand auf einem separaten Tisch. Die Beatmungsschläuche wurden auf dem Mikroskopiertisch gegen Verrutschen und versehentliche Diskonnektion gesichert. Zur Konstanthaltung der Körpertemperatur wurde den Tieren eine elektrisch beheizbare Wärmeplatte untergelegt. Die Messung der Körpertemperatur erfolgte mittels eines rektal eingebrachten Temperaturfühlers, welcher mit dem Heizgerät verbunden war (Heizgeräte Regler GTR200, Firma Greisinger, Deutschland). Sank die mittels Rektalsonde gemessene Körpertemperatur des Tieres unter den eingestellten Sollwert von 37°C, so wurde durch die untergelegte Heizplatte so lange Wärme zugeführt, bis das Tier auf die entsprechende Temperatur erwärmt war.

Der arterielle Katheter wurde mit dem Druckaufnehmer zum kontinuierlichen hämodynamischen Monitoring verbunden.

Zur Durchführung der Mikrozirkulationsuntersuchung wurde die Thorakotomiewunde mittels des eingebrachten Sperrers gespreizt. Eine Metallplatte wurde so eingebracht, dass der linke untere Lungenlappen nicht durch Bewegungsartefakte des Herzens gestört wurde. Um eine plane Oberfläche zum Mikroskopieren herzustellen, wurde daraufhin zwischen die Branchen des Thoraxsperrers ein Glasplättchen (Deckglas für Mikroskopie 18 mm x 18 mm, Firma Menzel Gläser, Deutschland) eingeklemmt und darauf Kontaktgel (Sonogel, Vertriebs GmbH Bad Camberg, Deutschland) zur optischen Ankopplung des Mikroskops aufgebracht.

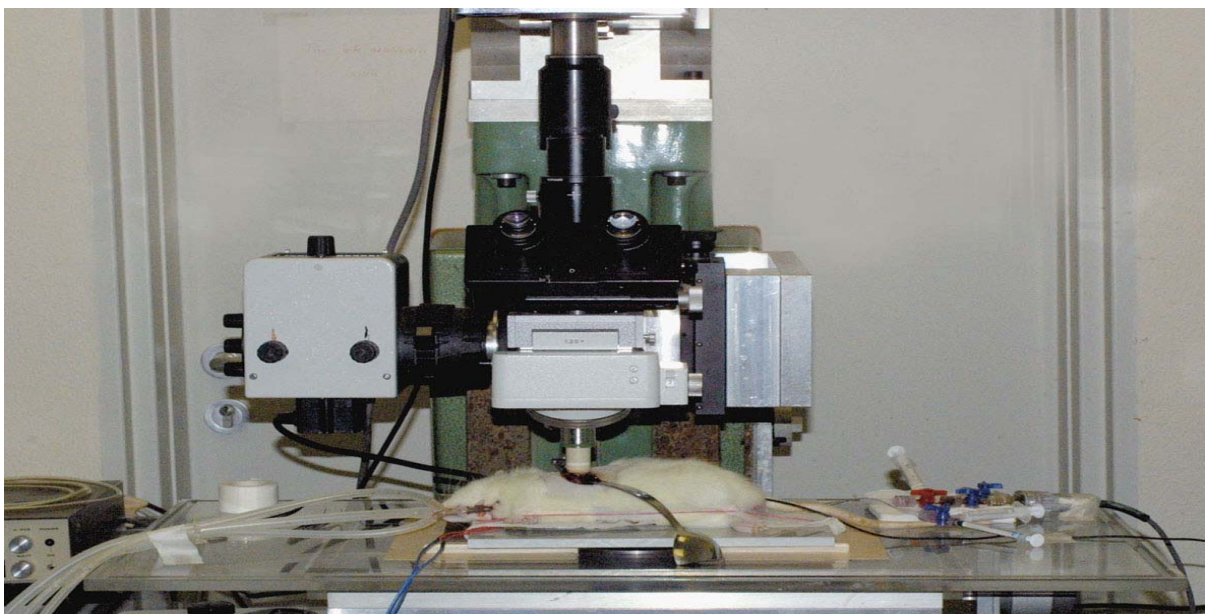


Abb. 2.8.4.1: Lagerung des Untersuchungstieres bei der intravitalmikroskopischen Untersuchung

2.8.5 Zielparameter

2.8.5.1 Leukozytenadhäsionen

Am Anfang der Mikrozirkulationsuntersuchungen stand die Bestimmung der Leukozytenadhäsion. Hierzu wurde den Tieren 0,2 ml der Rhodaminlösung gespritzt (Herstellung siehe 2.8.1.1). Rhodamin färbt selektiv die Leukozyten. Mittels Querstrombeatmung (Parameter siehe oben) wurde die Lunge ruhig gestellt und ein Lungenfeld für 30 Sekunden aufgezeichnet.

Es wurden 5 Felder mit einer Größe von 580 μm x 410 μm aufgenommen. Zwischen den Aufzeichnungen wurde über mindestens eine Minute normal beatmet. Zur Aufnahme wurde ein Filter (530-560 nm) vorgeschaltet.

2.8.5.2 Erythrozytengeschwindigkeiten

Nach Aufzeichnung der oben genannten Sequenzen wurden die FITC markierten Erythrozyten hinzu gegeben (Herstellung siehe 2.8.1.2). Nach Ruhigstellung der Lunge mittels Querstrombeatmung erfolgte die Aufzeichnung der Erythrozytenbewegung in den Kapillaren des Interstitiums über 30 Sekunden. Es wurden 10 Felder (580 μm x 410 μm) aufgezeichnet. Die Visualisierung der Erythrozyten und „Ausblendung“ der markierten Leukozyten erfolgte durch Filterwechsel (Filter zur Visualisierung der FITC-markierten Erythrozyten: 450-490 nm).

2.8.5.3 Kapillarpermeabilität

Nach Ruhigstellung der Lunge wurde die Helligkeit der Bilder so weit herunterreguliert, dass gerade noch die interalveolären Septen zu sehen waren. Dieses Bild diente als Ausgangswert. Anschließend erfolgte die Zugabe von FITC-markiertem Dextran (Herstellung siehe 2.8.1.3) über den venösen Zugang (Injektion über 10 Sekunden). Das Anfluten des Permeabilitätsmarkers wurde zur Kontrolle auf Video aufgezeichnet. Genau 30 Minuten nach Anfluten des Plasmamarkers wurde dasselbe Feld sowie 4 weitere Felder erneut aufgenommen (Größe der Messfelder: 580 μm x 410 μm).

Nach dieser Messung wurde die Mikrozirkulationsuntersuchung der Lunge beendet und das Tier wie in 2.9 beschrieben getötet und anschließend wie in 2.10 beschrieben die Organe entnommen.

2.8.5.4 Septumdurchmesser

Die Auswertung erfolgte anhand der während der Beobachtung der Leukozytenadhäsion gewonnenen Bildsequenzen (siehe Auswertung).

2.8.6 Auswertung

Die Auswertung der Mikrozirkulationsparameter erfolgte mittels eines computerisierten Bildanalyse-Systems (CAP-Image, Firma Zeintl Heidelberg, Deutschland).

- 1) Die Auszählung der pro Alveole adhärenen Leukozyten erfolgte manuell. Hierzu wurde die Anzahl der über 30 Sekunden an einer Alveole adhärenen Leukozyten am Videomonitor ausgezählt.
- 2) Zur Berechnung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit wurde die so genannte Line-Shift-Diagramm-Methode benutzt. Hierzu wurde zunächst mit der Mouse am Standbild des Videomonitors eine gerade oder auch gekrümmte Messlinie entlang des zu untersuchenden Blutgefäßes gezeichnet. Danach wurde eine Bildsequenz von 10 Sekunden Dauer ausgewertet. Während der Auswertung wurden von dem System die Grauwertdaten entlang der Messlinie in einem Bildspeicher als vertikale Linien nebeneinander geschrieben. Nach Ablauf der Messequenz wurde der Bildspeicher mit den aneinander gereihten Messlinien angezeigt. Wenn sich z.B. während der Messequenz ein markierter Erythrozyt entlang der Messlinie fortbewegte, wurde diese Fortbewegung im Diagramm der nebeneinander gezeichneten Grauwertlinien als helle, schräg verlaufende Linie sichtbar. Durch Anklicken dieser Linie wurde automatisch die Steigung ermittelt und daraus die Geschwindigkeit errechnet (49).
- 3) Zur densitometrischen Auswertung der Kapillarpermeabilität der Videosequenzen wurden am Standbild vier selbstdefinierte Messfelder in das Zentrum von vier verschiedenen Alveolen gelegt. Dieses wurde an einer Videosequenz durchgeführt, die vor Gabe des Plasmamarkers aufgenommen worden war. Das System errechnete hierauf den Grauwert in den Messfeldern. Dieser Wert wurde nicht als Absolutwert angegeben, sondern zum Vergleich mit der folgenden Auswertung auf 100 % gesetzt. Anschließend erfolgte die Messung an den Videosequenzen, die 30 Minuten nach Gabe des Plasmamarkers aufgenommen worden

waren. An vier verschiedenen Standbildern wurden die im ersten Arbeitsschritt definierten Messfelder in vier verschiedene Alveolen gelegt und die Messung vorgenommen. Man erhielt so insgesamt 16 verschiedene Dichtewerte, deren Mittelwert ein Maß für die Kapillarpermeabilität war.

2.9 Versuchsende und Euthanasie

Nach Abschluss der Versuche wurden die Tiere, ohne dass sie aus der Narkose erwacht waren, durch i.v. Injektion von T-61 (Hoechst-Roussel, Deutschland) getötet.

2.10 Organentnahmen und Histologie

Für die histologische Untersuchung wurde nach Tötung der Tiere das Pankreas, sowie der rechte Lungenunterlappen entnommen. Die Aufbewahrung und Fixierung der Präparate bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte in 4%-iger Formalinlösung. Die Gewebe wurden in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom ca. 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Färbung der Gewebeschnitte erfolgte nach Standardmethoden mit Hämatoxylin-Eosin.

2.11 Statistik

Die Ergebnisse werden als Säulendiagramme mit Darstellung des Mittelwertes sowie des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) aufgeführt. Die statistische Testung der Gruppen auf Unterschiede erfolgte mit dem t-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit des gesamten Experiments kleiner als 5 % war. Zu diesem Zweck musste die Irrtumswahrscheinlichkeit eines Vergleiches „p“ kleiner sein als der Quotient aus 0,05 und der Anzahl der durchgeführten Vergleiche (Bonferoni-Korrektur).

3 ERGEBNISSE

3.1 Ausschluss und Mortalität

Die nachfolgend dargestellten Gründe führten zu einem Ausschluss von Tieren aus der Versuchsauswertung:

Gesamtzahl der untersuchten Tiere: n = 84

Gesamtzahl der ausgeschlossenen Tiere: n = 25

Ausschluss während des Induktionsintervalls:

Narkosezwischenfälle: n = 2

Gefäßverletzung bei der Katheterimplantation: n = 5

Verletzung von Pankreas oder Ductus pancreaticus: n = 2

Unvollständige Pankreatitisinduktion (Hämatokritanstieg < 5%): n = 3

Tod während Pankreatitisinduktion: n = 3

Ausschluss nach Abschluss der Induktionsbehandlung:

Katheterverschluss oder Dislokation: n = 5

Ausschluss vor oder während der Mikrozirkulationsuntersuchung:

Narkosezwischenfälle: n = 3

Technische Probleme bei Untersuchung: n = 2

Blutdruckabfall < 80 mmHg: n = 0

Mortalität:

Bei der Auswertung der Mortalität wurden nur jene Tiere aufgenommen, welche 6 Stunden nach Beginn der Pankreatitisinduktion überlebt hatten und solche, die nicht aufgrund eines der oben angeführten technischen Probleme von der Untersuchung ausgeschlossen werden mussten.

	Tierzahl	Gestorbene Tiere	Mortalität (%)
K-Fettfrei	6	0	0
K- Ω -6-Fettsäuren	7	1	14,29
K- Ω -3-Fettsäuren	7	1	14,29
NP-Fettfrei	12	6	50
NP- Ω -6-Fettsäuren	18	12	66,67
NP- Ω -3-Fettsäuren	9	3	33,33*

Tabelle 3.1.1: Mortalität von Kontrolltieren im Vergleich zu Tieren mit akut nekrotisierender Pankreatitis (* $p < 0,048$ vs. NP-Fettfrei und NP- Ω -6-Fettsäuren)

3.2 Systemische Parameter

3.2.1 Hämatokrit

Nach Induktion der nekrotisierenden Pankreatitis kam es zu einem Anstieg des Hämatokrits (Abb. 3.2.1). Der Wert nach 6 Stunden unterschied sich signifikant von dem 0-h-Wert und dem 24-h-Wert. Nach 24 h kam es zu einem signifikanten Abfall, der unter dem Normalwert vor der Pankreatitisinduktion lag.

Auch bei den Kontrolltieren kam es zu einem signifikanten Abfall des 24-h-Wertes, der unter dem 0-h-Wert lag.

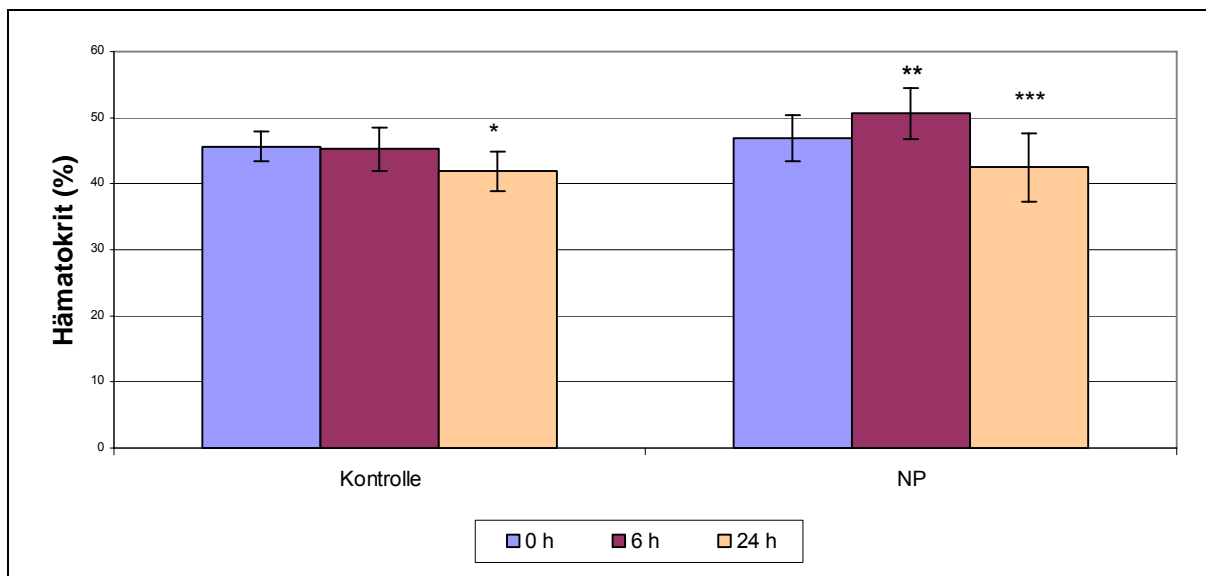


Abb. 3.2.1: Zeitlicher Verlauf des Hämatokrits innerhalb nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere (* $p < 0,01$ vs. K 0 h und $p < 0,04$ vs. K 6 h, ** $p < 0,038$ vs. NP 0 h und $p < 0,001$ vs. NP 24 h, *** $p < 0,013$ vs. NP 0 h und $p < 0,001$ vs. NP 6 h)

Innerhalb der einzelnen Therapiegruppen kam es nach Pankreatitisinduktion ebenfalls zu einem Anstieg des Hämatokrits (ohne Kennzeichnung in der Abbildung). Nach 24 Stunden konnte innerhalb der Therapiegruppen eine Reduktion des Hämatokrits verzeichnet werden. Der Abfall war bei den fettfrei behandelten Tieren am größten (Abb. 3.2.2). Am Versuchsende lagen die Hämatokritwerte unter dem Ausgangswert vor der Pankreatitisinduktion (ohne Kennzeichnung in der Abbildung).

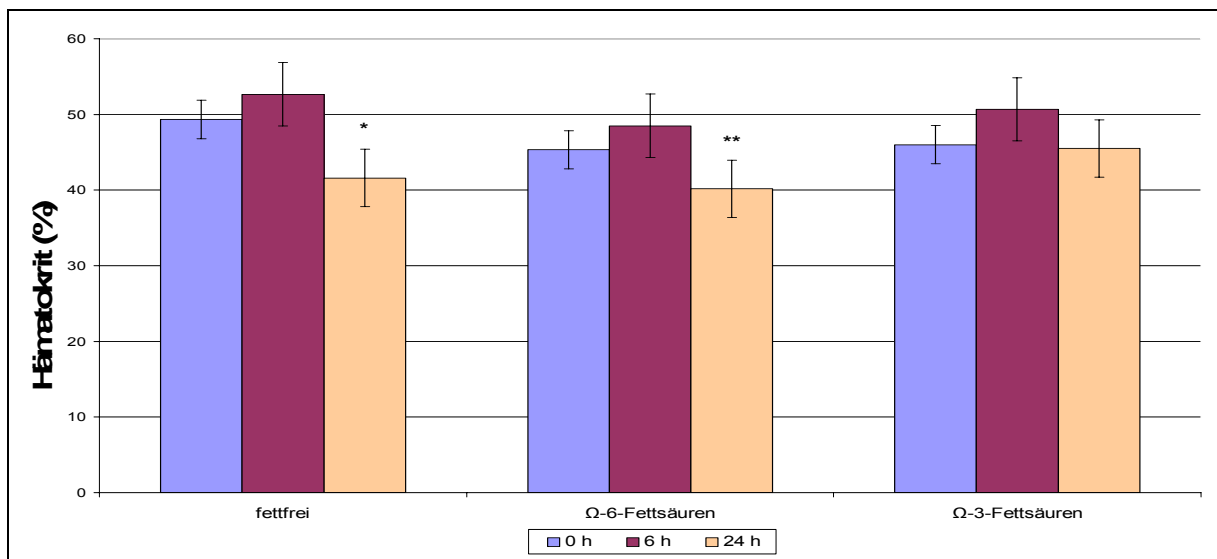


Abb. 3.2.2: Hämatokrit-Werte unter Therapie bei nekrotisierender Pankreatitis (* $p < 0,019$ vs. Fettfrei 6 h, ** $p < 0,002$ vs. Fettfrei 6 h und $p < 0,020$ vs. Ω-3-Fettsäuren 6 h)

3.2.2 Kreislaufparameter

Vor und während der Mikrozirkulationsuntersuchung wurde eine blutige Druckmessung des mittleren arteriellen Drucks (MAP) durchgeführt. Eine dauerhafte Unterschreitung der unteren Druckgrenze von 80 mmHg kam bei keinem Tier vor, so dass keines dieser Tiere von der Mikrozirkulationsuntersuchung ausgeschlossen werden musste.

3.2.3 Respiratorische Parameter

Es wurde nach 6 h und 24 h arterielles Blut über den Arteria-carotis-Katheter entnommen und eine Blutgasanalyse durchgeführt. Im Nachhinein musste leider festgestellt werden, dass ein Defekt des Blutgasanalysegerätes vorlag, die Werte konnten nicht verwendet werden.

3.2.4 Orale Wasseraufnahme

Die orale Wasseraufnahme bei gesunden Kontrolltieren ($8,4 \pm 5,8$ ml) war im Vergleich zu Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis ($5,0 \pm 4,1$ ml) erhöht. Der Unterschied war signifikant.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.4.1 dargestellt.

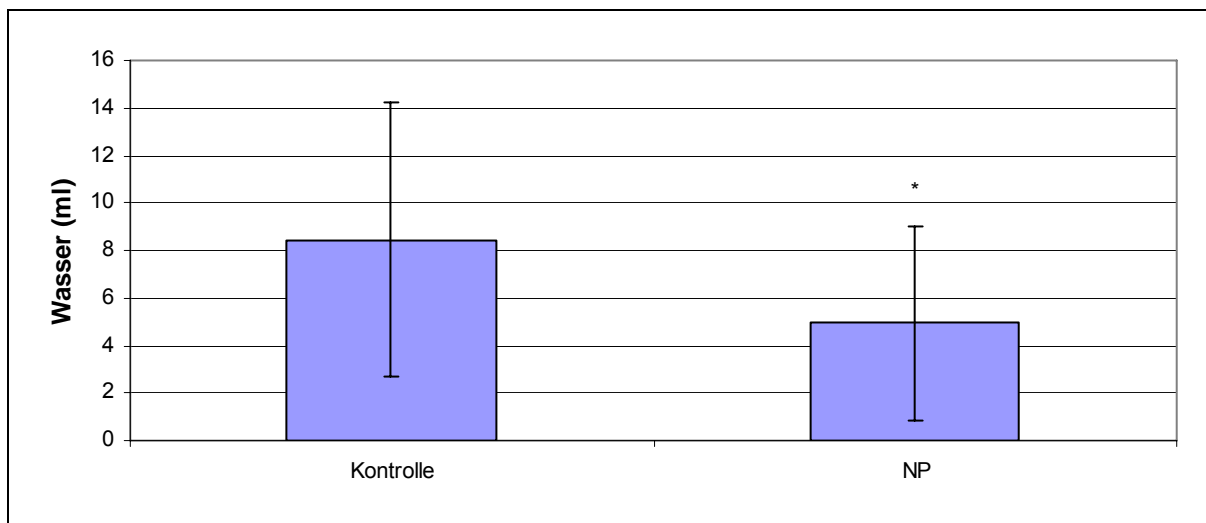


Abb. 3.2.4.1: orale Wasseraufnahme bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis (* $p < 0,044$ vs. Kontrolle)

Tendenziell erhöht waren die Werte der oralen Wasseraufnahme in der Therapiegruppe Ω -3-Fettsäuren ($6,4 \pm 4,5$ ml) mit nekrotisierender Pankreatitis im Vergleich zu Fettfrei (5 ± 4 ml) und Ω -6-Fettsäuren ($3,5 \pm 3,9$ ml) mit nekrotisierender Pankreatitis. Die Werte zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Innerhalb der Gruppe der Kontrolltiere zeigten ebenfalls Tiere, die mit Ω -3-Fettsäuren ($10 \pm 8,5$ ml) behandelt wurden, tendenziell erhöhte Werte im Vergleich zu Tieren, die mit Fettfrei ($8,5 \pm 4,8$ ml) oder mit Ω -6-Fettsäuren ($6,9 \pm 3,5$ ml) behandelt wurden. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.4.2 dargestellt.

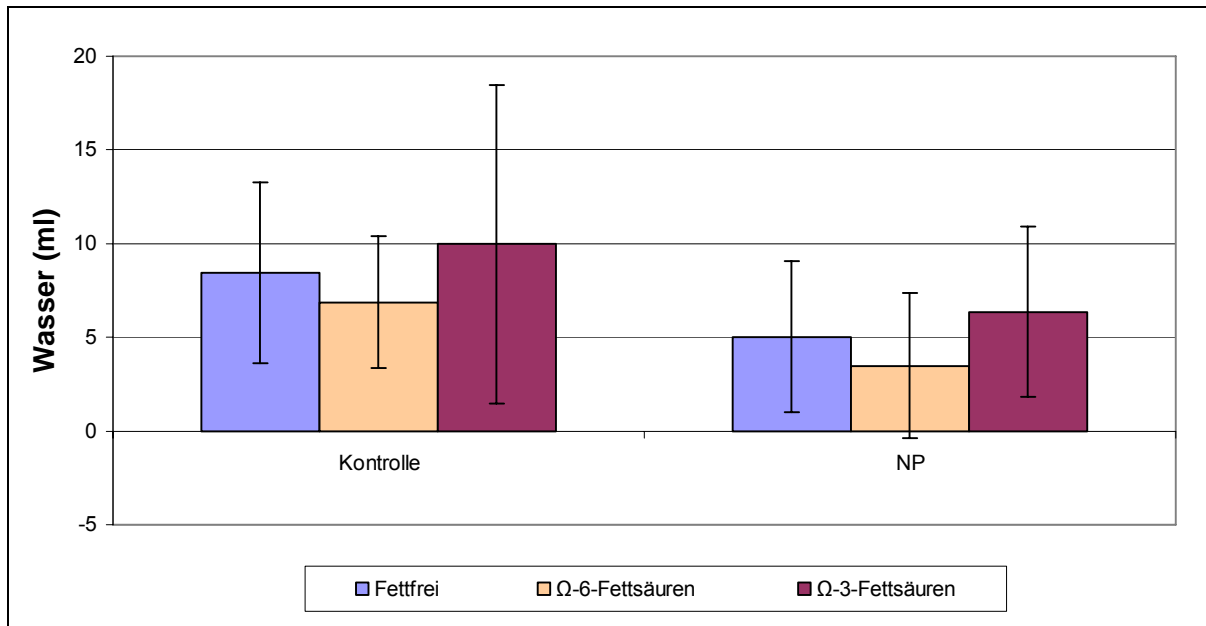


Abb. 3.2.4.2: orale Wasseraufnahme unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere. Unter den Therapiegruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

3.3 Mikrozirkulationsparameter

3.3.1 Leukozytenadhäsion

Bei gesunden Kontrolltieren wurden nach 24 Stunden $5 \pm 1,86$ adhärenente Leukozyten in den Alveolen umgebenden Kapillaren ausgezählt. Bei Tieren mit einer nekrotisierenden Pankreatitis fanden sich nach 24 Stunden $7 \pm 1,04$ adhärenente Leukozyten pro Alveole. Die Leukozytenadhäsion war bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb.3.3.1.1).

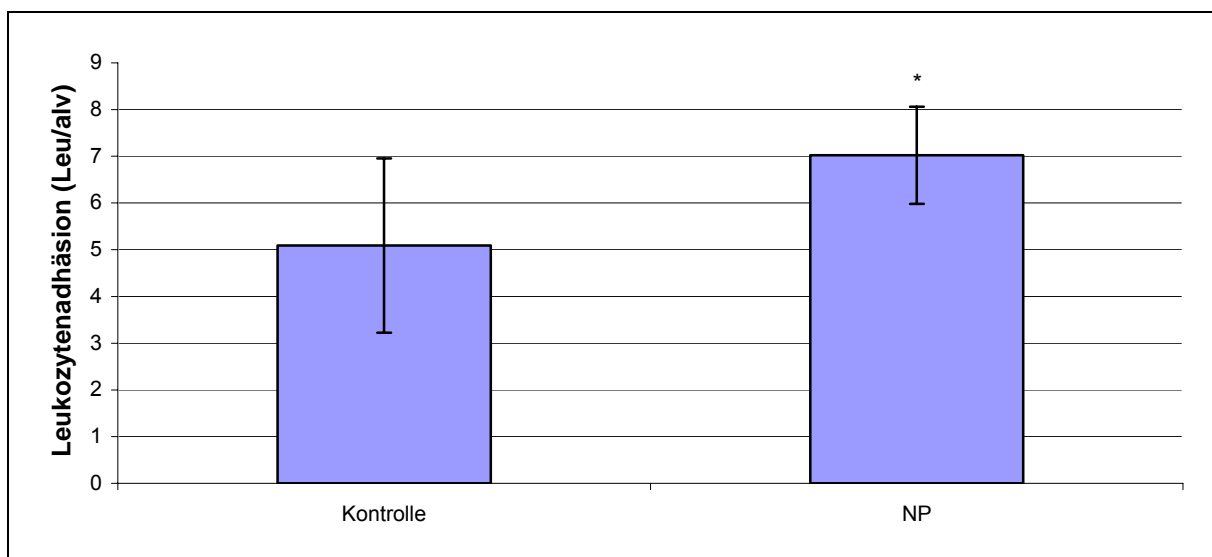


Abb. 3.3.1.1: Leukozytenadhäsion bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis (* $p < 0,001$ vs. Kontrolle)

Erhöht waren Werte der Leukozytenadhäsion in der Therapiegruppe Fettfrei ($7,5 \pm 1,04$ Leu/alv) und in der mit Ω -6-Fettsäuren behandelten Gruppe ($7,5 \pm 0,62$ Leu/alv) von Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis. Diese unterschieden sich signifikant von denen, die mit Ω -3-Fettsäuren behandelt wurden ($6,1 \pm 0,8$ Leu/alv).

Innerhalb der Kontrollgruppe waren die Werte der Leukozytenadhäsion in der Therapiegruppe Ω -6-Fettsäuren ($6,3 \pm 2,26$ Leu/alv) am größten, und die niedrigsten Werte waren bei den fettfrei behandelten Tieren zu beobachten ($3,4 \pm 0,26$ Leu/alv). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.3.2.2 grafisch dargestellt.

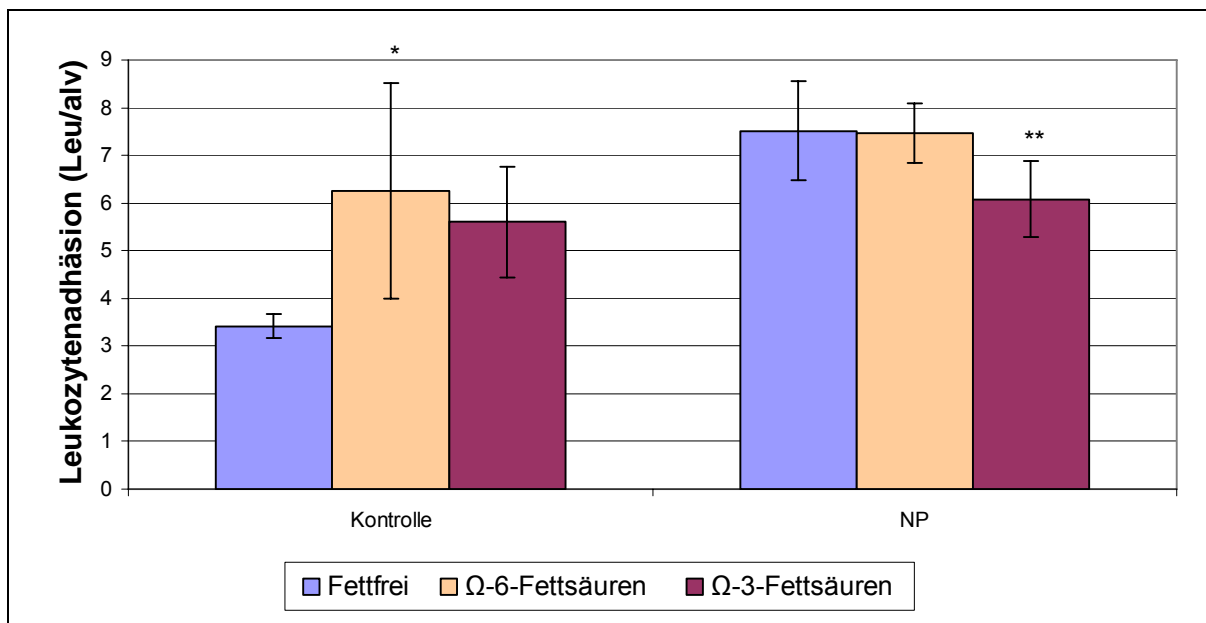


Abb. 3.3.1.2: Leukozytenadhäsion unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere (* $p < 0,016$ vs. Fettfrei, ** $p < 0,032$ vs. Fettfrei NP und $p < 0,038$ vs. Ω -6-Fettsäuren NP)

3.3.2 Erythrozytenflussgeschwindigkeit

Die Erythrozytenflussgeschwindigkeit betrug bei den Kontrolltieren $0,48 \pm 0,03$ mm/ sec. Bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis betrug sie $0,43 \pm 0,03$ mm/ sec. Dieser Unterschied ist signifikant (Abb. 3.3.2.1).

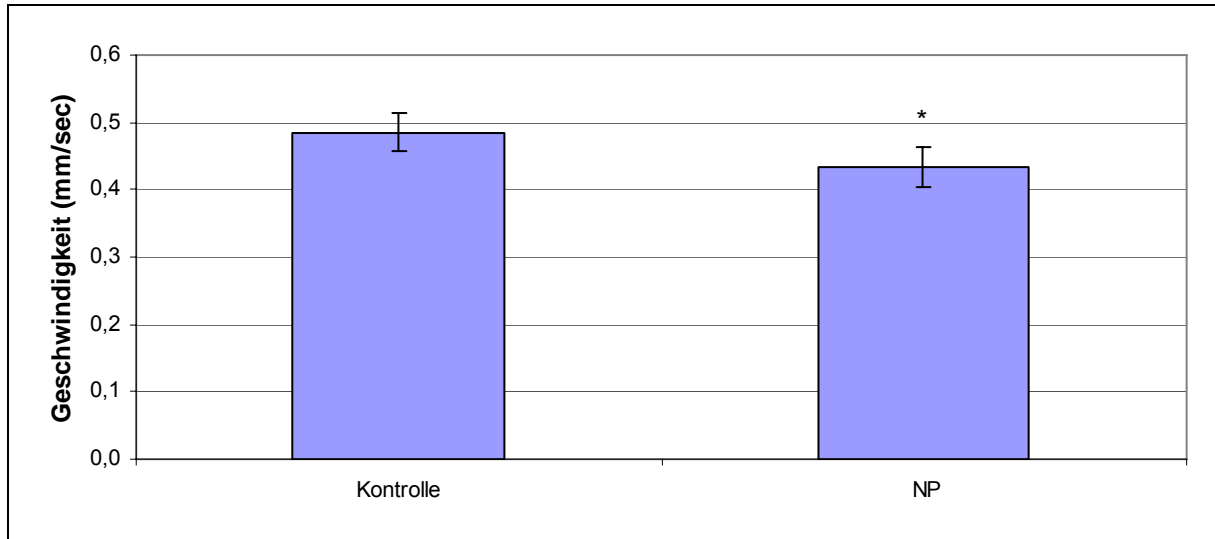


Abb. 3.3.2.1: Erythrozytenflussgeschwindigkeit bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis (* $p < 0,001$ vs. Kontrolle)

In den Therapiegruppen bei nekrotisierender Pankreatitis lagen die Werte für die Erythrozytenflussgeschwindigkeit bei den fettfrei therapierten Tieren bei $0,41 \pm 0,02$ mm/ sec, bei den mit Ω -6-Fettsäuren therapierten Tieren bei $0,42 \pm 0,02$ mm/ sec und bei den mit Ω -3-Fettsäuren therapierten Tieren bei $0,47 \pm 0,01$ mm/ sec. Statistisch unterschieden sich die mit Ω -3-Fettsäuren behandelten Tiere von den mit Ω -6-Fettsäuren und Fettfrei behandelten Tieren signifikant (Abb. 3.3.2.2).

In der Kontrollgruppe der fettfrei behandelten Tiere betrug der Wert $0,50 \pm 0,01$ mm/ sec, der mit Ω -6-Fettsäuren $0,47 \pm 0,03$ mm/ sec und der mit Ω -3-Fettsäuren $0,48 \pm 0,03$ mm/ sec.

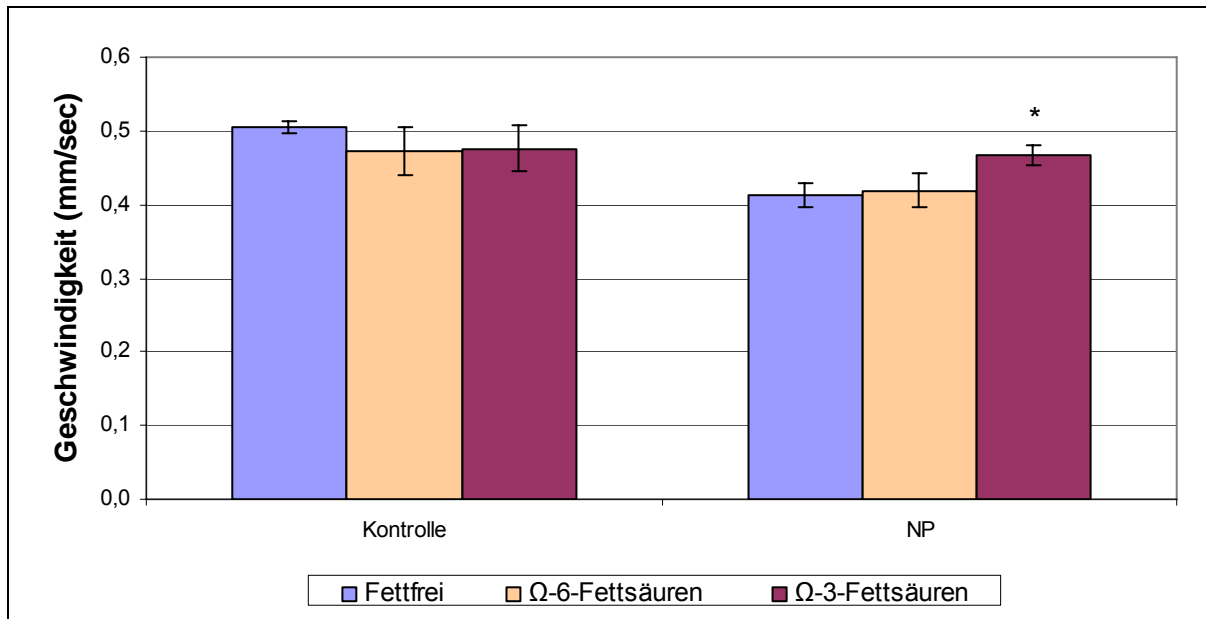
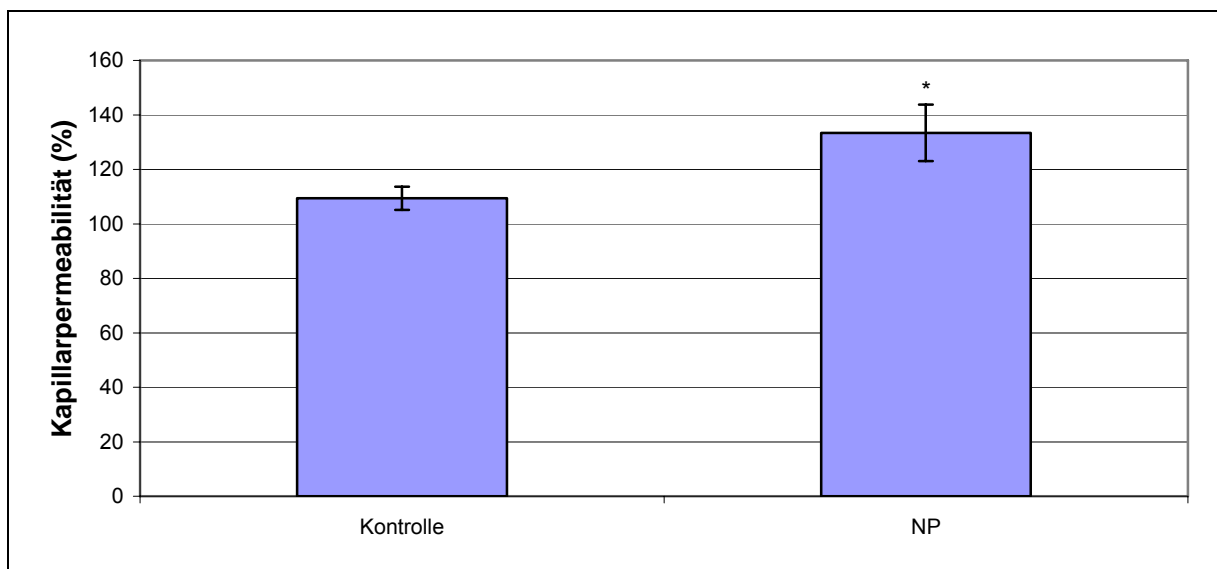


Abb. 3.3.2.2: Erythrozytenflussgeschwindigkeit unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere (* $p < 0,001$ vs. Fettfrei NP und $p < 0,002$ vs. Omega-6-Fettsäuren NP)

3.3.3 Kapillarpermeabilität

Die Kapillarpermeabilität betrug bei gesunden Kontrolltieren $109,4 \pm 4,29$ %. Bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis war die Kapillarpermeabilität auf $133,4 \pm 10,4$ % erhöht. Die Werte unterschieden sich signifikant voneinander (Abb. 3.3.3.1).



3.3.3.1: Kapillarpermeabilität bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis (* $p < 0,001$ vs. Kontrolle)

Die kapilläre Schrankenstörung betrug in den Therapiegruppen bei nekrotisierender Pankreatitis bei den mit Ω -3-Fettsäuren behandelten Tieren $122,7 \pm 5,3$ %, bei den mit Ω -6-Fettsäuren behandelten Tieren $142,6 \pm 8,6$ % und bei den fettfrei behandelten Tieren $135 \pm 4,7$ %. Die Kapillarpermeabilität war bei Ω -3-Fettsäuren signifikant niedriger als bei den beiden anderen Therapiegruppen (Abb. 3.3.3.2).

Innerhalb der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

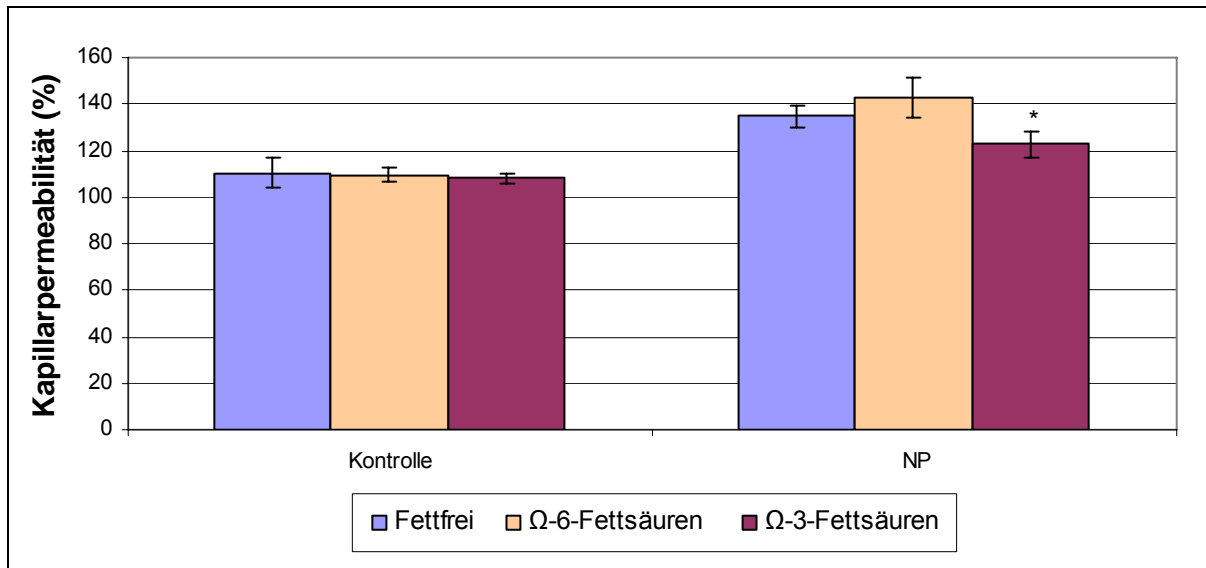


Abb. 3.3.3.2: Kapillarpermeabilität unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere (* $p < 0,016$ vs. Fettfrei NP und $p < 0,001$ vs. Ω -6-Fettsäuren NP)

3.3.4 Septumdurchmesser

Die Septumdurchmesser von Kontrolltieren ($16 \pm 1,56$ μm) und Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis ($16,6 \pm 2,8$ μm) unterschieden sich nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3.4.1 dargestellt.

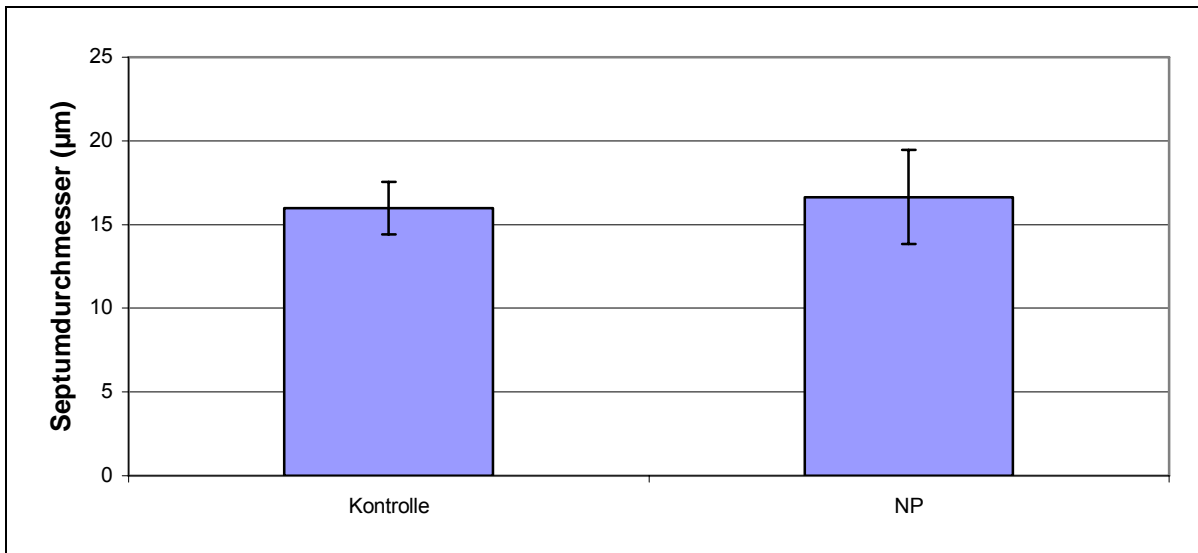


Abb. 3.3.4.1: Septumdurchmesser bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis

In den Therapiegruppen bei nekrotisierender Pankreatitis wiesen die mit Ω -3-Fettsäuren therapierten Tiere ($14,5 \pm 1,91 \mu\text{m}$) im Vergleich zu den mit Ω -6-Fettsäuren therapierten Tieren ($17,7 \pm 2,54 \mu\text{m}$) und zu den fettfrei therapierten Tieren ($17,8 \pm 2,8 \mu\text{m}$) erniedrigte Septumdurchmesser auf. Statistisch unterschieden sich die Werte nicht signifikant (Abb. 3.3.4.2).

Die Septumdurchmesser von Kontrolltieren, die mit Ω -3-Fettsäuren behandelten wurden ($16,5 \pm 1,72 \mu\text{m}$), waren im Vergleich zu Ω -6-Fettsäuren ($15,7 \pm 1,91 \mu\text{m}$) und fettfrei ($15,7 \pm 1,08 \mu\text{m}$) behandelten Tieren erhöht. Innerhalb der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

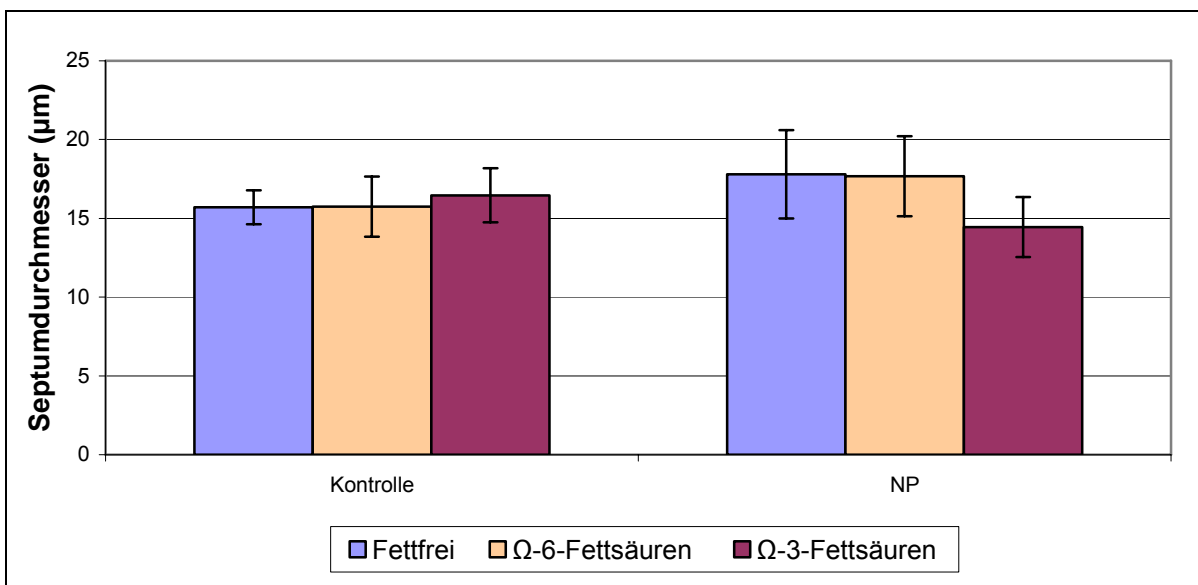


Abb. 3.3.4.2: Septumdurchmesser unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere

3.3.5 Alveolendurchmesser

Die Alveolendurchmesser von Kontrolltieren ($67,8 \pm 6,4 \mu\text{m}$) und Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis ($64,8 \pm 5,87 \mu\text{m}$) unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 3.3.5.1).

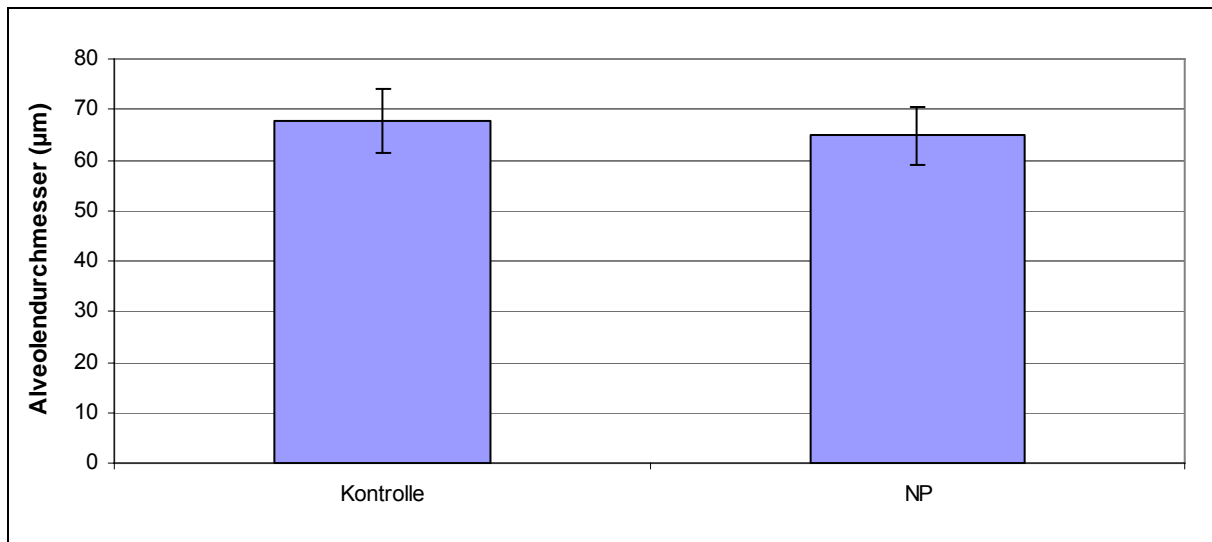


Abb. 3.3.5.1: Alveolendurchmesser bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis

Bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis waren die Alveolendurchmesser bei Ω -3-Fettsäuren mit $66,2 \pm 7,1 \mu\text{m}$, bei Ω -6-Fettsäuren $64,2 \pm 5,3 \mu\text{m}$ und Fettfrei $64 \pm 5,9 \mu\text{m}$. Statistisch unterschieden sich die Werte nicht signifikant.

Die Alveolendurchmesser bei Kontrolltieren betragen bei Tieren, die mit Ω -3-Fettsäuren behandelt wurden $68,2 \pm 6,6 \mu\text{m}$, bei Ω -6-Fettsäuren $71 \pm 7,3 \mu\text{m}$ und bei Tieren die fettfrei behandelt wurden $64,2 \pm 3,7 \mu\text{m}$. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3.5.2 dargestellt.

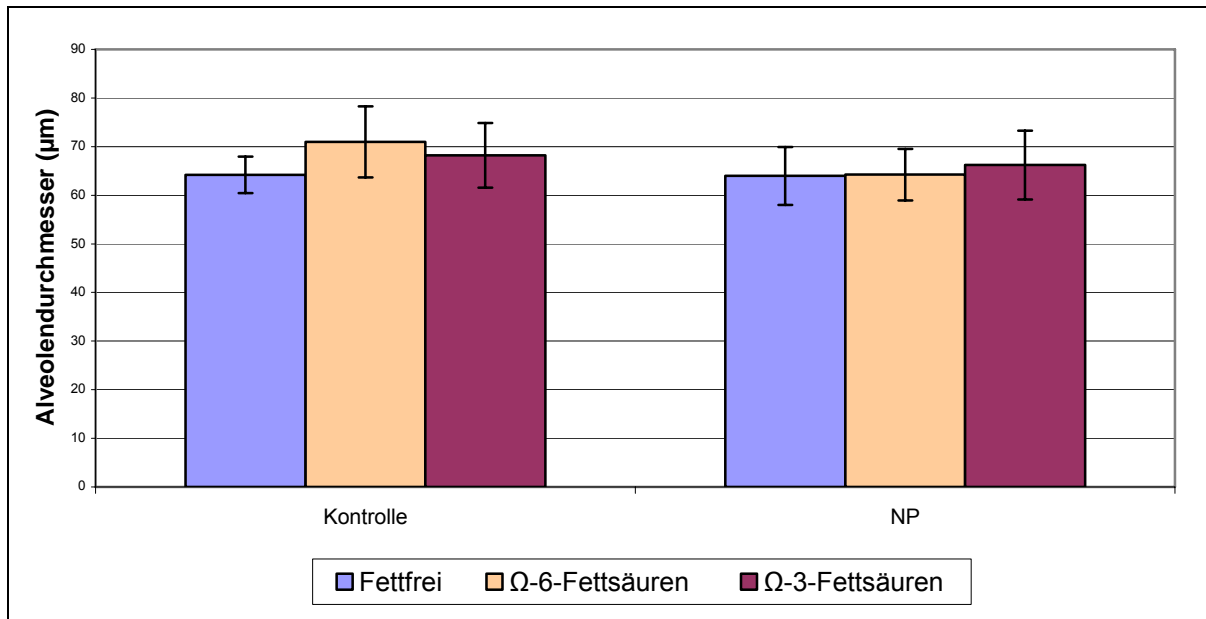


Abb. 3.3.5.2: Alveolendurchmesser unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere

3.4 Histologie

Histologisch zeigte sich bei Kontrolltieren eine normale Lungenarchitektur, gekennzeichnet durch schmale Interalveolarsepten. Ein interstitielles oder alveoläres Ödem war nicht zu sehen, genauso keine Akkumulation von Leukozyten (Abb. 3.4.1).

Bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis, die fettfrei behandelt wurden, zeigten sich massive interstitielle und alveoläre Ödeme mit Vermehrung von Entzündungszellen und dilatierten Kapillaren (Abb. 3.4.2).

Ebenso zeigten sich histologisch massive interstitielle und alveoläre Ödeme mit deutlicher Vermehrung von Entzündungszellen bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis, die mit Ω-6-Fettsäuren behandelt wurden (Abb. 3.4.3).

Bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis, die mit Ω-3-Fettsäuren behandelt wurden, fanden sich leichte interstitielle Ödeme sowie eine geringe Akkumulation von Leukozyten (Abb. 3.4.4).

Die histologischen Veränderungen bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis, die mit Ω-6-Fettsäuren oder fettfrei behandelt wurden, waren im Vergleich zu den mit Ω-3-Fettsäuren behandelten Tieren wesentlich stärker ausgeprägt.

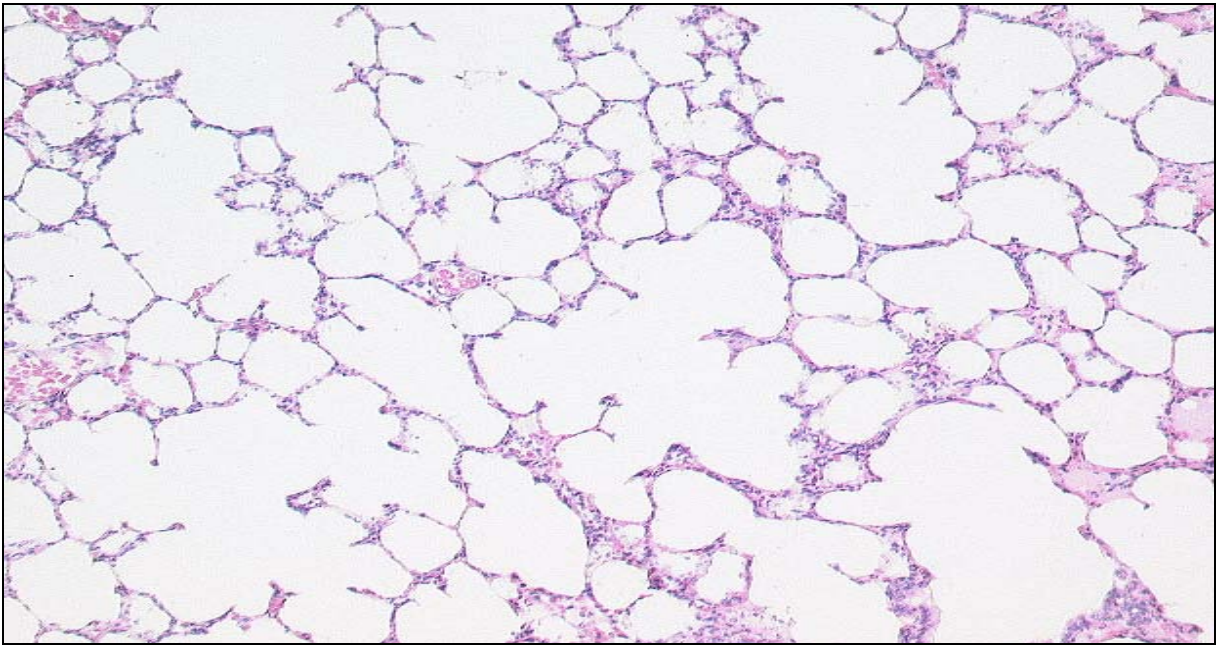


Abb. 3.4.1 Normale Lunge bei Kontrolltier mit schmalen Septen, keine Ödeme und keine Akkumulation von Leukozyten

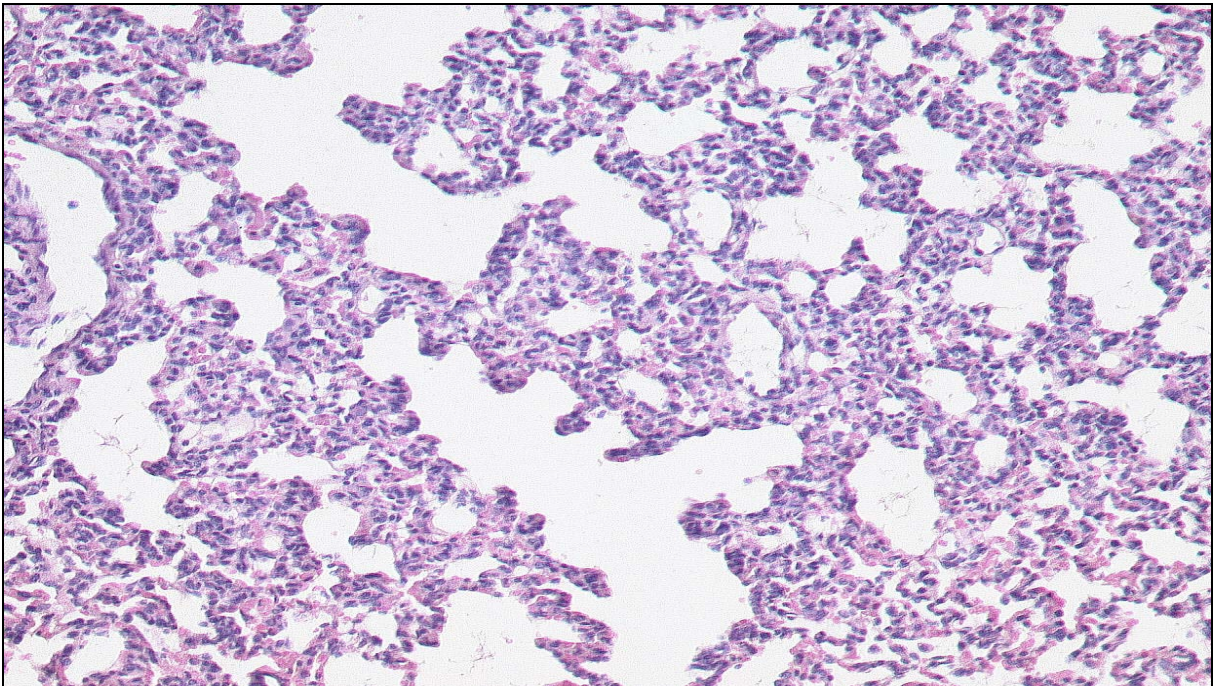


Abb. 3.4.2 Lunge bei fettfrei infundierten Tier bei akut nekrotisierender Pankreatitis mit massiven interstitiellen und alveolären Ödemen und Akkumulation von Entzündungszellen

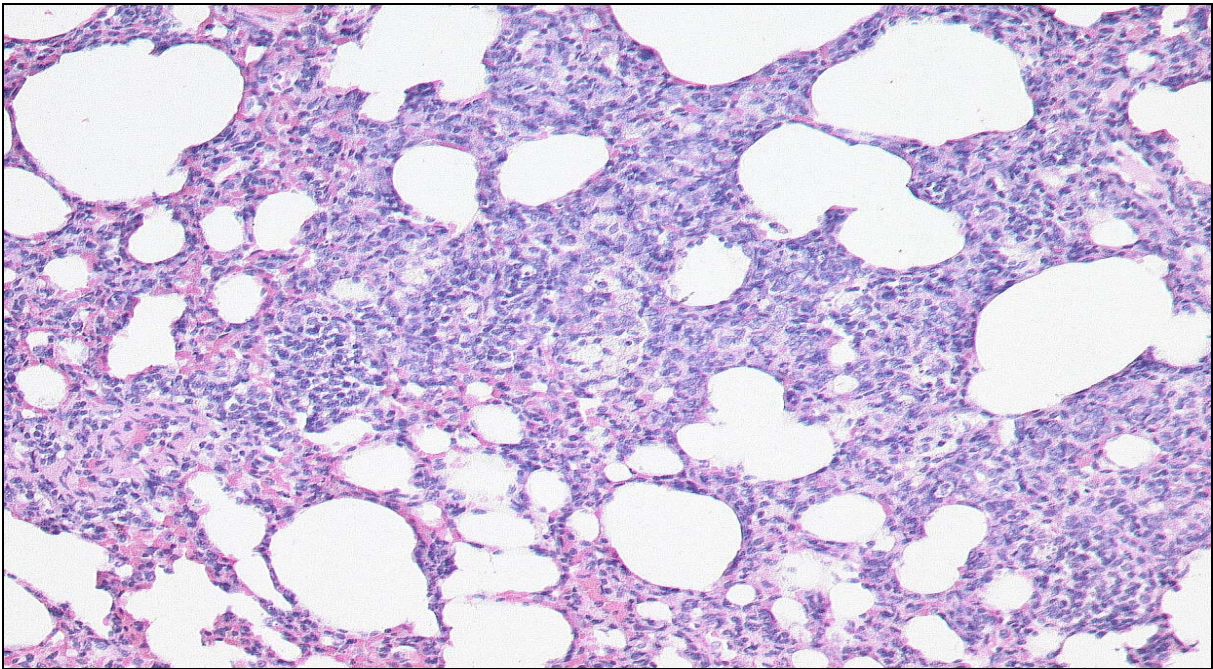


Abb. 3.4.3 Lunge bei Ω -6-Fettsäuren infundierten Tier bei akut nekrotisierender Pankreatitis mit massiven interstitiellen und alveolären Ödemen und Akkumulation von Entzündungszellen

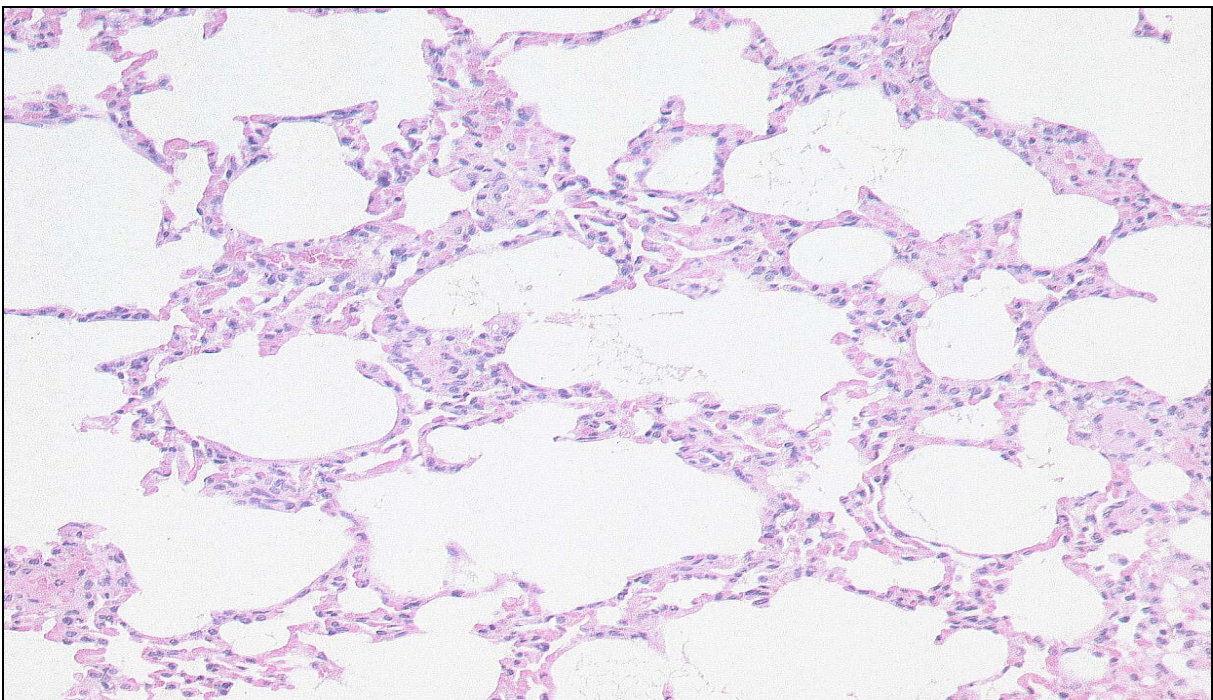


Abb. 3.4.4 Lunge bei Ω -3-Fettsäuren infundierten Tier bei akut nekrotisierender Pankreatitis mit leichten interstitiellen Ödemen und geringe Akkumulation von Entzündungszellen

4 DISKUSSION DER METHODE

4.1 Tiermodell

Untersuchungen zum Verlauf der nekrotisierenden Pankreatitis und ihrer Auswirkung auf andere Organsysteme, wie auch Therapiestudien sollten idealerweise in Form von prospektiven randomisierten klinischen Studien erfolgen. Die Durchführung solcher Studien ist jedoch aus folgenden Gründen nur in sehr begrenztem Umfang möglich: Die nekrotisierende Pankreatitis ist ein verhältnismäßig seltenes und inhomogenes Krankheitsbild (Inzidenz ca. 10 Fälle pro 100000 Einwohner/ Jahr). Daher kommen nur wenige Patienten mit schweren Verläufen in einzelnen Zentren zusammen. Der Beginn der Erkrankung lässt sich objektiv nur schwer abschätzen (in der Klinik gleichgesetzt mit dem Beginn der Schmerzen). Die Behandlung der schweren akuten Pankreatitis ist interdisziplinär. Klinische Studien müssen also zwischen verschiedenen Abteilungen und Zentren koordiniert werden, was erhebliche organisatorische und finanzielle Anforderungen stellt. Hinzu kommt, dass bestimmte invasive Untersuchungen am Patienten aus ethischen Gründen nicht durchgeführt werden können. Dies trifft insbesondere auf Messungen im Bereich der Mikrozirkulation zu. Das einzige auf dem Markt befindliche System (Cytoscan™) erlaubt nur die Beurteilung der Durchblutungssituation an Schleimhäuten, auf Grund seiner Größe kann es noch nicht im Rahmen von endoskopischen Untersuchungen angewandt werden. Die Durchführung von intravitalmikroskopischen Studien am Menschen mit der Erhebung der gleichen Zielparameter wie in tierexperimentellen Studien scheint daher in naher Zukunft nicht realisierbar zu sein. Selbst intraoperativ stehen keine geeigneten Instrumente zur Erfassung von Störungen im Bereich der Mikrozirkulation zur Verfügung. Aus diesem Grund hat sich die Notwendigkeit ergeben, Untersuchungen zur Pathogenese der Pankreatitis und Untersuchungen neuer Therapieverfahren vor dem klinischen Einsatz tierexperimentell durchzuführen. Während tierexperimentelle Untersuchungen zweifellos zum besseren Verständnis der Pathogenese der akuten Pankreatitis beigetragen haben, ist die Anwendung von Tiermodellen für Therapiestudien nach wie vor umstritten, da die Übertragbarkeit der tierexperimentell erzielten Ergebnisse auf die klinische Praxis eingeschränkt ist. Dies zeigte sich u.a. beim Einsatz von Sekretionshemmern und Proteasehemmern, die im Tierexperiment einen günstigen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hatten, in der klinischen Anwendung hingegen nicht effektiv waren (75, 100). Wahrscheinlich lassen sich die erheblichen

Diskrepanzen zwischen experimentell erfolgreichen Therapiestrategien und ihrer mangelnden Effektivität im klinischen Einsatz in vielen Fällen auf methodische Mängel zurückführen. So wurden die auszutestenden Substanzen oft prophylaktisch, das heißt vor Manifestation des Vollbildes der Pankreatitis eingesetzt oder an Modellen getestet, die zwar vom pathogenetischen oder pathomorphologischen Aspekt, nicht aber vom Krankheitsverlauf mit der schweren humanen Pankreatitis vergleichbar sind.

Im Folgenden werden im Hinblick auf die vorliegende Arbeit die methodischen Einwände gegen die am häufigsten eingesetzten Pankreatitismodelle erläutert, und es wird dargelegt, warum das so genannte Cerulein-GDOC-Kombinationsmodell als Untersuchungsmodell gewählt wurde.

Die Kriterien, die ein optimales Tiermodell der Pankreatitis erfüllen sollte, sind u.a. von Foitzik und Mitarbeitern veröffentlicht worden (27). Die verschiedenen Modelle werden unter Anwendung dieser Kriterien in Tabelle 4.1 verglichen.

Modell/Induktionstechnik	Tier	1a	1b	1c	2a	2b	3a	3b	4a	4b
Taurocholat-Pankreatitis		+	+	+	(+)	-	?	?	(+)	-
Arterielle Okklusion	Ratte	(+)	-	-	-	-	(-)	(-)	+	+
Closed Duodenal Loop Modell	Versch.	+	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)	-	+
Obstruktionsmodell	Versch.	+	+	-	+	(+)	(+)	(+)	-	+
CDE-Modell	Ratte/ Maus	-/+	(+)	(+)	(+)	-	+	-	(+)	+
Exokrine Hyperstimulation	Ratte	-	(+)	(+)	(+)	-	(+)	-	(+)	-
Cerulein/GDOC-Kombinationsmodell	Ratte	+	(+)	-	(+)	-	+	-	(+)	+

- 1 Schwere nekrotisierende Pankreatitis
- 1a Intra- und extraparenchymale Nekrosen
- 1b SIRS oder MODS
- 1c Reproduzierbare Mortalität
- 2 Phasischer Krankheitsverlauf
- 2a Initiales SIRS mit frühem MODS
- 2b Späte inflammatorische Phase mit spätem MODS
- 3a Frühe Intervention, z.B. durch Flüssigkeitsersatz
- 3b Reduktion infektiöser Komplikationen
- 4 Monitoring
- 4a Standardisierter, reproduzierbarer Verlauf
- 4b Möglichkeit des Monitoring

Tab. 4.1: Modelle der akuten Pankreatitis und ihre Eignung für Therapiestudien

Die durch eine intraduktale Infusion von Gallensäure induzierten Pankreatitiden, wie z.B. Taurocholat-Pankreatitis (1, 77), haben wegen ihres foudroyanten Verlaufes eine Frühmortalität von weit über 50 % und sind daher für Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf und für Therapiestudien ungeeignet.

Die durch Gefäßokklusion hervorgerufenen Pankreatitiden eignen sich weder aus pathophysiologischer noch aus klinischer Sicht: Veränderungen der Pankreasdurchblutung und –mikrozirkulation entstehen in der Pathogenese der Erkrankung sekundär. Außerdem haben die durch Gefäßokklusion ausgelösten ischämischen Pankreatitiden keine Mortalität (87, 29).

Beim Closed Duodenal Loop Modell (82, 95) wird die Pankreatitis durch Abbinden des Duodenums vor und hinter der Einmündung des Ductus hepatopancreaticus ausgelöst. Dadurch kommt es zum Aufstau von Galle und Pankreassekret. Dieser im Prinzip ähnliche Mechanismus wie bei der Entstehung der biliären Pankreatitis des Menschen hat aber den Nachteil, dass durch das Abbinden des Duodenums häufig eine Einschränkung der Durchblutung mit konsekutiver Darmischämie und Sepsis hervorgerufen wird (13). Tritt diese auf, versterben die Tiere innerhalb von 2 – 3 Tagen an einer generalisierten, therapierefraktären Sepsis. Weiterhin ist als nachteilig anzuführen, dass das aufgestaute superinfizierte Sekret und das Fehlen von Galle und Pankreassekret aboral der abgebundenen Schlinge die Darmmotilität und die intestinale Mikroflora verändern.

Das so genannte Obstruktionsmodell (16), bei dem die Pankreatitis durch Abbinden des Ductus hepatopancreaticus ausgelöst wird, simuliert ebenfalls die humane biliäre Pankreatitis, führt jedoch beim Versuchstier Ratte nur zur einer leichten ödematösen Pankreatitis ohne Nekrosen oder infektiöse Komplikationen.

Beim CDE-Modell (Choline Deficient Ethionine) von Lombardi und Mitarbeitern (67) entwickeln die Versuchstiere unter einer cholinarmen Diät, die mit Ethionin angereichert ist, (so genannte CDE-Diät) innerhalb von 2- 8 Tagen eine schwere hämorrhagische Pankreatitis mit einer Mortalität zwischen 80 und 100 %. Dabei ist die Pankreatitis nicht alleinige Ursache der Mortalität: Die Tiere entwickeln unter der CDE-Diät auch Veränderungen in der Leber und im ZNS, die zum Multiorganversagen, unabhängig von der Pankreatitis beitragen. Neben dem variablen Krankheitsverlauf und der hohen Mortalität ist das Modell auch insofern ungeeignet, als es ursprünglich für Mäuse entwickelt wurde und das Legen von Gefäßzugängen (für Blutabnahmen und Narkoseführung) und die Mikrozirkulationsuntersuchungen wegen der geringeren Größe der Versuchstiere erhebliche Schwierigkeiten bereiten.

Eine durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion des Cholecystokininanalogons Cerulein ausgelöste Pankreatitis (61), nimmt, wenn keine extrem hohen Dosen und langen Induktionsintervalle gewählt werden, einen milden Verlauf, ohne die für die schwere Pankreatitis typischen Nekrosen und den schweren Verlauf mit hoher Mortalität. Die exokrine Hypersekretion allein verursacht lediglich ein massives Pankreasödem mit entsprechendem Anstieg der Enzymparameter, das wie bei der leichten ödematösen Pankreatitis des Menschen ohne therapeutische Maßnahmen und ohne Todesfälle ad integrum ausheilt. Dieses ist das am häufigsten benutzte Modell der ödematösen Pankreatitis.

Aufgrund der oben angeführten Einschränkungen der bis dahin etablierten Tiermodelle wurde zwischen 1990 und 1992 ein neues, insbesondere für Therapiestudien geeignetes Modell entwickelt (93). Dieses Modell kombiniert die oben angeführte exokrine Hyperstimulation mit einer kurzzeitigen druck- und volumengesteuerten intraduktalen Injektion von niedrig dosierter Gallensäure. Dieses Modell wurde am Versuchstier Ratte etabliert. Die Größe dieses Versuchstiers erlaubt problemlos intravitalmikroskopische Untersuchungen. Der Verlauf der Erkrankung ist relativ konstant. Ohne Therapie besteht eine Mortalität von 30 – 40 % innerhalb der ersten 24 – 48 Stunden. Damit ist dieses Modell sowohl für Studien zur Pathogenese der Erkrankung als auch für Therapiestudien hervorragend geeignet. Die Gemeinsamkeiten dieses Modells mit der humanen schweren Pankreatitis sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Das Cerulein/GDOC-Kombinationsmodell ist inzwischen durch eine Vielzahl von Untersuchungen standardisiert und international als Modell der schweren (akut nekrotisierenden) Pankreatitis etabliert.

Ein weiterer Grund für die Auswahl gerade dieses Modells für die vorliegende Studie war, dass sämtliche Voruntersuchungen der Intravitalmikroskopie von Pankreas, Kolon und Leber in unserem Labor an diesem Modell durchgeführt worden sind.

Kennzeichen	Cerulein/GDOC- Kombinationsmodell	Akute nekrotisierende Pankreatitis
Entwicklung des Vollbildes der Pankreatitis	ca. 12 – 24 h	ca. 96 h
Nekrosen	Homogen verteilte disseminierte Nekrosen im gesamten Pankreas	Disseminierte Nekrosen in den befallenen Arealen
Pankreasperfusion	Vermindert	Vermindert
Frühmortalität ohne Therapie	ca. 30 %	ca. 30 %
Bakterielle Infektion mit intestinalen Keimen	ja	ja
Spätmortalität	ja	ja

Tabelle 4.2: Parallelen des Cerulein/GDOC-Kombinationsmodells und der akuten nekrotisierenden Pankreatitis beim Menschen

Als Nachteil des Cerulein/GDOC-Kombinationsmodells ist die Invasivität zu nennen, da die Tiere zur Induktion der Pankreatitis laparotomiert werden und das Pankreas zur Kanülierung des Ganges mobilisiert wird. Es bleibt eine relativ hohe Mortalität der Versuchstiere, die aber der hohen Mortalität der unbehandelten Pankreatitis in der Klinik sehr nahe kommt.

Mit der Wahl des Cerulein/GDOC-Kombinationsmodells ist in dieser Studie die Forderung nach einem der Schwere des Krankheitsbildes angemessenen Tiermodell erfüllt worden (Mortalität 30 – 40 %). Die Therapie (Fettfrei, Ω -6-Fettsäuren, Ω -3-Fettsäuren) wurde erst 6 Stunden nach Induktion der Pankreatitis begonnen, einem Zeitpunkt also der 24 bis 36 Stunden nach Erkrankungsbeginn beim Menschen entspricht. Tiere mit signifikanten hämodynamischen oder respiratorischen Einschränkungen wurden ausgeschlossen, um sicherzustellen, dass die Veränderungen im Bereich der Mikrozirkulation nicht durch die systemischen Störungen bedingt waren.

Es ist insbesondere hervorzuheben, dass einige der an diesem Modell erhobenen Befunde in klinischen Untersuchungen bestätigt wurden, z.B. die über den Effekt der Antibiotikatherapie (81) oder der isovolämischen Hämodilution (45). Daher teilen wir auch nicht die Einschätzung (9, 64, 86), dass Therapiestudien an Tiermodellen der akuten Pankreatitis sinnlos sind. Die genannten Beispiele zeigen, dass sie durchaus klinische Relevanz haben, wenn Modell und Studiendesign entsprechend ausgewählt werden.

4.2 Intravitalmikroskopie

4.2.1 Intravitalmikroskopie bei akuter Pankreatitis

Die Einschränkung der Pankreasmikrozirkulation wurde zunächst in zahlreichen Studien durch indirekte Methoden belegt. Eine Darstellung der Mikrogefäße des Pankreas wurde durch arterielle Injektion von Methylenblau (3), India ink (2) oder polymerisierende Agenzien (80, 89) erreicht. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass in von Entzündung betroffenen Arealen des Pankreas eine Vasokonstriktion der Arteriolen bestand. Die Ergebnisse dieser morphologischen Studien wurden bestätigt durch Untersuchungen mittels der Rubidium-Clearance Methode (79, 31).

Seit Beginn der 90er Jahre werden Mikrozirkulationsveränderungen als Schlüsselfaktor in der Pathogenese der Pankreatitis angesehen (48). Zu diesem Zeitpunkt konnte die Mikrozirkulation des Pankreas bei Pankreatitis durch direkte intravitalmikroskopische Untersuchungen dargestellt werden (44, 59, 60). 1994 wurden die Ergebnisse der Intravitalmikroskopie in einer Studie direkt mit den Ergebnissen von einer auf Spektroskopie (Diffuse Reflectance Spectroscopy) beruhenden Methode verglichen (50). Es zeigte sich, dass die Einschränkung der Mikrozirkulation bei der schweren Pankreatitis mit einer Einschränkung der Gewebee-oxygenierung einhergeht. Die Tiere mit einer schweren Pankreatitis blieben hämodynamisch stabil, so dass die Veränderungen der Mikrozirkulation nicht als Folge einer bei schwerer Pankreatitis häufig gestörten Makrohämodynamik zu sehen sind. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch umgekehrt durch eine Ischämie pankreatitisspezifische Veränderungen am gesunden Pankreasorgan ausgelöst werden können (69, 98). Möglicherweise können die Mikrozirkulationsstörungen so im Sinne einer Selbstverstärkung zur Schwere des Krankheitsbildes beitragen.

Mikrozirkulationsstörungen treten bei der schweren Pankreatitis nicht nur im Pankreas, sondern auch in anderen Organen, wie z.B. Kolon und Leber auf (24). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Blockade von vasoaktiven Mediatoren ein besseres „Outcome“ bei der nekrotisierenden Pankreatitis erreicht werden kann (23, 26). Interessanterweise war diese Verbesserung ohne einen lokalen Effekt am Pankreas möglich, was darauf schließen lässt, dass die systemischen Mikrozirkulationsstörungen einen wichtigen Faktor in der Pathogenese des Pankreatitisinduzierten Multiorgan-dysfunktionssyndroms (MODS) darstellen.

Die Methode der Intravitalmikroskopie gilt heute als Goldstandard der Mikrozirkulationsanalyse und erlaubt neben der Quantifizierung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit eine Bestimmung der Leukozytenendothelinteraktion und der Gefäßpermeabilität.

4.2.2 Intravitalmikroskopie der Lunge

Während intravitalmikroskopische Untersuchungen des Pankreas, der Leber und des Darms seit längerer Zeit gut etabliert sind, verliefen Versuche, die Mikrozirkulation der Lunge darzustellen, bis in die 90er Jahre größtenteils unbefriedigend.

1991 zeigten Lien et al. an Hunden mit akuter Lungenentzündung eine Leukozyten-sequestration in der Lunge (66). Im Kaninchenmodell wurde 1992 erstmals intravitalmikroskopisch die hypoxiebedingte pulmonale Vasokonstriktion nachgewiesen (33). 1994 beschrieben Kuebler et al. erstmals die physiologische Kinetik von Leukozyten in Lungengefäßen (55). Die Rolle der für die Leukozytenendothelinteraktion notwendigen Adhäsionsmoleküle wurde in weiteren Untersuchungen aufgeklärt (18, 56, 54). Bei diesen Studien war ein so genanntes Thoraxfenster benutzt worden, welches operativ eingebracht wurde und den Thorax zur Umgebung abschloss. Auch in anderen Arbeiten der Münchner Arbeitsgruppe um Prof. Messmer wurde diese Technik eingesetzt (57, 58). Dieses Modell wurde auch zur Untersuchung von Mikrozirkulationsveränderungen der Lunge im Rahmen der Sepsis bei Ratten eingesetzt (68).

Carter war der Erste, der diese Technik modifizierte und die „offene“ Intravitalmikroskopie der Lunge ohne Thoraxfenster durchführte (11).

Da alle Versuche zur Untersuchung der Mikrozirkulation in unserem Labor am Versuchstier Ratte durchgeführt worden waren und das Pankreatitismodell für dieses Tier etabliert ist, sollten die Versuche aus Gründen der Vergleichbarkeit an Ratten vorgenommen werden.

Unser erster Ansatz, die Technik der Intravitalmikroskopie mittels eines Thoraxfensters vom Kaninchen auf die Ratte zu übertragen, erwies sich aus folgenden Gründen als nicht praktikabel: Die Implantation eines Thoraxfensters ist zwar prinzipiell auch an der Ratte möglich, stellt aber einen größeren Eingriff dar, der eine auch messbare Belastung des Versuchstieres bedeutet. In Abhängigkeit von der Länge der Präparationsdauer stellten wir bei unseren Pilotversuchen hohe Schwankungen der Messwerte (z.B. Erythrozytenflussgeschwindigkeit) fest.

Deshalb entschieden wir uns für die Etablierung der so genannten offenen Technik. Die von Carter et al. (11) beschriebene Technik mittels eines so genannten „Dipping Cone“ war für

unser Versuchsvorhaben nicht praktikabel, da trotz eines induzierten Atemstillstandes von ca. 40 Sekunden nur ein Beobachtungszeitraum von ca. 20 Sekunden pro Untersuchungsintervall resultierte, weil die Mikroskopiereinheit jedes Mal neu fokussiert werden musste.

Daher entschieden wir uns für die im Methodikteil ausführlich beschriebene Technik. Diese wurde im Rahmen einer vorangegangenen Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe etabliert (83) und publiziert (94) und bietet die folgenden Vorteile:

1. Stabilität: Die hämodynamischen Parameter und die pulmonale Erythrozytenflussgeschwindigkeit gesunder Kontrolltiere blieben an dieser Präparation über einen Zeitraum von zwei Stunden stabil.
2. Beatmungstechnik: Als weitere Verbesserung zu der von Carter vorbeschriebenen Technik wurde eine spezielle Beatmungstechnik eingesetzt. Während des Untersuchungsintervalls wurde die Lunge mittels einer so genannten Querstrombeatmung ruhig gestellt. Mit dieser Beatmungstechnik ist es möglich, einen ausreichenden Gasaustausch mittels Diffusion zu ermöglichen (65). Es kommt weder zu einem Abfall des pO_2 noch zu einem Anstieg des pCO_2 nach Ruhigstellung der Lunge.
3. Optische Beurteilbarkeit: Die subpleural gelegenen Gefäße können mit unserer Technik in optisch einwandfreier Qualität dargestellt werden. In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass die Durchblutung von subpleural gelegenen Kapillaren mit denen von zentral gelegenen korreliert (97), so dass valide Aussagen zur Durchblutung der gesamten Lunge getroffen werden können. Capen und Mitarbeiter konnten darüber hinaus eine identische kapilläre Transitzeit in allen Lungensegmenten nachweisen (10).
4. Beeinflussbarkeit durch pathologische Faktoren: Unter spezifischen pathophysiologischen Konditionen zeigten sich in unserer Präparation signifikante Abweichungen von den Normalwerten. So waren unter Hyperthermie das Leukozytensticking und die Erythrozytenflussgeschwindigkeit erhöht. Bei Hypothermie und Hypovolämie trat erwartungsgemäß eine Verringerung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit auf. Unter Hyperthermie und Hypoxämie kam es zu einem signifikanten Anstieg der Kapillarpermeabilität.

Verlauf und Ergebnisse der Voruntersuchungen belegen, dass die Methode für die Beantwortung der eingangs gestellten Fragen geeignet ist und Untersuchungen zum Krankheitsbild der Pankreatitis möglich sind. Diese Methode erlaubt die Aufzeichnung aller wichtigen Mikrozirkulationsparameter an einem Versuchstier, wie Leukozytenadhäsionen, Erythrozytenflussgeschwindigkeit und Kapillarpermeabilität. Das Modell ist somit geeignet zum Nachweis von

Veränderungen der Lungenmikrozirkulation bei schwerer Pankreatitis, die einem möglichen Lungenversagen (ARDS) vorausgehen.

4.2.3 Zielparameter der Intravitalmikroskopie

4.2.3.1 Leukozytenadhäsion

Wie bei einer Vielzahl von akuten oder chronischen entzündlichen Veränderungen spielen Leukozyten auch bei der akuten Pankreatitis eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Lungenschäden (40). Leukozyten im Gefäßbett der Lunge stellen per se noch kein pathologisches Ereignis dar, sondern sind ein physiologisches Phänomen (55). Die Anzahl dieser Leukozyten übersteigt die Menge der in der systemischen Zirkulation befindlichen um das Zwei- bis Dreifache und steht mit diesen in einem dynamischen Gleichgewicht (14). Die physiologische Adhärenz von Leukozyten findet hauptsächlich im Kapillarnetz statt. Als Ursache wurde eine Passagebehinderung durch den geringen Durchmesser der Lungenskapillaren verantwortlich gemacht. Da Leukozyten eine geringere Flexibilität als Erythrozyten aufweisen, kommt es zu einer Passageverzögerung (15). Dies erklärt, warum auch bei gesunden Kontrolltieren Leukozytenadhäsionen nachweisbar sind.

Nach Aktivierung der neutrophilen Leukozyten kommt es zu einer weiteren Abnahme ihrer Flexibilität durch Veränderung ihrer Zytoskelettstruktur (39). Somit kommt es in pathophysiologischen Situationen schon aus mechanischen Gründen zu einer Zunahme von Leukozyten im Kapillarnetz. Allerdings konnte auch nachgewiesen werden, dass für eine Adhärenz von Leukozyten sowohl in der physiologischen (56) als auch in einer pathophysiologischen Situation Adhäsionsmoleküle (71, 72) und bestimmte Chemokine (6) notwendig sind. Auch Endothelin hat neben seinem Einfluss auf den Gefäßtonus einen Einfluss auf die Leukozytenadhäsion. So konnte gezeigt werden, dass durch Endothelin-1-Gabe die Leukozytenadhäsion in gesunden Lungen verstärkt wird (37).

Eine Zunahme von immobilisierten Leukozyten (so genannte Sticker) in der Lunge ist somit ein Zeichen für einen systemischen oder lokalen Entzündungsprozess und führt unter anderem durch die Generation von Sauerstoffradikalen zur Lungenschädigung (73).

Die Festlegung der Messgröße „Leukozytenadhäsionen“ erfolgte im Hinblick auf die Größe des Messfeldes und die Zeitdauer willkürlich. Als Messfeld bot sich die Alveole an, da diese eine funktionelle Einheit darstellt und im Rahmen der Auswertung gut zu überschauen ist. Die Zeitdauer von 30 Sekunden wurde gewählt, da diese zum einen lang genug ist, um ein

Sticking zu detektieren, zum anderen kurz genug, um einen zügigen Versuchsablauf zu gewährleisten. Statt einer Dokumentation der so genannten „Sticker“ wäre auch eine Zählung der „Roller“, also langsam an den Gefäßwänden entlang wandernden Leukozyten, möglich gewesen. Das „Rolling“ wird als Vorstufe des Stickings aufgefasst. Uns erschien die Zählung der „Roller“ als fehleranfälliger. Eine Differenzierung zwischen einem aufgrund eines langsamen Blutflusses ebenfalls langsamen Leukozyten und einem „Roller“ ist kaum möglich. Bei der Bestimmung der adhärenenten Leukozyten ist diese Fehlermöglichkeit nicht gegeben.

4.2.3.2 Erythrozytenflussgeschwindigkeit

Die ödematöse Pankreatitis ist gekennzeichnet durch eine homogen gesteigerte Mikrogefäßperfusion im Sinne einer Hyperämie. Bei der nekrotisierenden Pankreatitis zeigt sich jedoch eine Abnahme der Kapillarperfusion auch bei stabiler Makrohämodynamik. Diese ist Folge einer Vasokonstriktion von Arteriolen, der gesteigerten Leukozytenendothelinteraktion in den Kapillaren und postkapillären Venolen (109) sowie der Eröffnung von arteriovenösen Shunts (70). Daraus resultiert eine Ischämie des Pankreasgewebes, die mit dem Schweregrad der akuten Pankreatitis korreliert. Als wesentlicher Faktor für die Mikrozirkulationsstörung lokal wie auch systemisch wird eine Imbalance der stärksten vasoaktiven Mediatoren Endothelin und NO angesehen (25, 110). Endothelin liegt bei akuter Pankreatitis vermehrt im Plasma vor und bewirkt neben einer Vasokonstriktion eine Steigerung der Kapillarpermeabilität. Diese Effekte sind nicht nur im Pankreas, sondern auch an anderen Organen nachweisbar. So konnte gezeigt werden, dass die Antagonisierung von Endothelin die Kapillarperfusion bei akuter Pankreatitis verbessert (25) und die lokalen und systemischen entzündlichen Reaktionen vermindert (101).

In Ausgusspräparaten der Lunge von Tieren mit akuter Pankreatitis fanden Kelly und Mitarbeiter (41) elektronenmikroskopisch eine Beeinträchtigung des Gefäßbettes mit Minderung der Gefäßdichte und Abbruch von Gefäßen.

Eine intravitalmikroskopische Untersuchung der Lunge mit Bestimmung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit bei akuter Pankreatitis ist in unserem Labor durchgeführt worden.

4.2.3.3 Kapillarpermeabilität

Bei der nekrotisierenden Pankreatitis kommt es zu einer Störung der endothelialen Barriere (42) und einem konsekutiven Verlust von intravasaler Flüssigkeit in den so genannten „Dritten Raum“. Zeichen dieses Flüssigkeitsverlustes intravasal ist der Anstieg des Hämatokrit. Von dieser Flüssigkeitsverschiebung ist auch die Lunge betroffen. Chen und Mitarbeiter (12) wiesen eine Zunahme des relativen Wassergehalts nach. Die Flüssigkeitsverlagerung konnte experimentell durch hyperbare Sauerstofftherapie (12) oder Therapie mit hypertoner Kochsalzlösung (96) partiell verhindert werden. Folge des interstitiellen Ödems ist eine Einschränkung des Gasaustauschs durch Verlängerung der Diffusionsstrecke und eine Erhöhung des Widerstandes in der Lungenstrombahn. Dies könnte auch ein Grund für die Abnahme der Erythrozytenflussgeschwindigkeit sein. Eine intravitalmikroskopische Studie bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Permeabilitätsveränderung an der Lunge bei akuter Pankreatitis liegt bisher nicht vor.

4.2.3.4 Septumdicke

Neben der Quantifizierung des „capillary leakage“ durch Messung der Kapillarpermeabilität, kann an der Lunge auch die direkte Folge, nämlich das interstitielle Ödem, durch Messung der Septumdicke bestimmt werden. Auch das wurde bei der akuten experimentellen Pankreatitis noch nicht vorgenommen.

4.2.4 Equipment und Auswertung mittels Cap-Image

Intravitalmikroskopische Untersuchungen werden videodokumentiert, da eine Online-Auswertung aufgrund der Vielzahl der zu erhebenden Parameter nicht praktikabel ist. Die Bestimmung von Erythrozytenflussgeschwindigkeit, Permeabilitätsveränderung, Alveolendurchmesser und Septumdicke auf den Videosequenzen erfolgte bis vor wenigen Jahren manuell. Dieses hatte den Nachteil, dass die Auswertung sehr zeitaufwendig war und eine hohe Variabilität zwischen einzelnen Untersuchern bestand. Nach Etablierung eines neuentwickelten, multifunktionalen Videobildanalyse-Systems zur computergestützten Auswertung (Cap-Image-Analysesystem) konnte der Arbeitsgang der Auswertung sowohl standardisiert als auch in seinem zeitlichen Ablauf verkürzt werden (49). Das Programm erlaubt die Durchführung von Geschwindigkeitsmessungen und auch morphometrischen

Messungen zur Bestimmung des Septumdurchmessers sowie videodensitometrische Analysen zur Bestimmung der Kapillarpermeabilität. Nur die Auswertung der Leukozytenadhäsion erfolgte weiterhin ohne Benutzung des Cap-Image-Analysesystems durch Auszählung der adhärennten Leukozyten am Monitor.

4.3 Andere Zielgrößen

4.3.1 Hämatokrit

Die schwere nekrotisierende Pankreatitis geht immer mit einem Anstieg des Hämatokrits einher. Der Hämatokrit spiegelt den Verlauf von Plasma aus dem Intravasalvolumen in den so genannten „Dritten Raum“ wieder. Ursache ist eine Zunahme der Kapillarpermeabilität. Experimentelle Untersuchungen bestätigen eine enge Korrelation zwischen Hämatokrit, Kapillarpermeabilität und Schwere der Pankreatitis (17). Nach unseren Erfahrungen liegt die Mortalität bei Tieren, deren Hämatokrit 6 Stunden nach Induktion $> 60\%$ ist, über 90% . Auch klinische Untersuchungen zeigen, dass das Hämatokrit einen wichtigen Hinweis auf die Schwere der Pankreatitis gibt (62, 4, 8).

Die Messung des Hämatokrits erfolgte mit einer auf Zentrifugation und Ablesen an einem Normogramm beruhenden Standardmethode.

4.3.2 Kreislaufparameter und respiratorische Parameter

Ein stabiler Blutdruck und eine suffiziente Atmung oder Beatmung sind Grundvoraussetzungen für eine stabile Mikrozirkulation (94). Deshalb müssen bei Untersuchungen der Mikrozirkulation diese Parameter kontrolliert und bei der Auswertung berücksichtigt werden. Als Parameter für die kardiozirkulatorische Stabilität wurde der mittlere arterielle Druck mittels blutiger Druckmessung bestimmt. Hier ist einschränkend anzumerken, dass dieser zwar eine direkte Wirkung auf die Mikrozirkulation von nachgeordneten Organen wie Pankreas und Darm hat, aber nur eine indirekte Wirkung auf die Lunge. Besser geeignet wäre der pulmonalarterielle Druck. Dieser kann bei Ratten prinzipiell gemessen werden, die hierfür notwendige Katheterisierung würde aber zu einer Störung der Lungenzirkulation und damit der zu untersuchenden Mikrozirkulationsparameter führen. Daher wurde auf diese Messung

verzichtet und vorausgesetzt, dass bei intaktem großen Kreislauf auch eine Stabilität im kleinen Kreislauf besteht. In der vorliegenden Versuchsreihe wurden Blutgasanalysen zur Überwachung der respiratorischen Funktion der Tiere vor der Durchführung der Mikrozirkulationsuntersuchung durchgeführt.

Tiere, bei denen der mittlere arterielle Druck dauerhaft unter 80 mmHg sank, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es aufgrund der gestörten Makrohämodynamik auch zu einer Störung der Mikrozirkulation gekommen war. Die oben angeführten Grenzwerte sind empirisch ermittelt und basieren auf einer langjährigen Erfahrung mit den Mikrozirkulationsuntersuchungen von Ratten. Dieselben bzw. vergleichbare Grenzwerte werden auch von verschiedenen anderen Arbeitsgruppen verwandt.

5 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

5.1 Ausschlüsse und Mortalität

Die Ausschlussquote lag mit 29 % im Rahmen der bei vergleichbaren Versuchen an Ratten mit (zu induzierender) Pankreatitis und Thorakotomie zur Intravitalmikroskopie konstatierten Ausfälle. Verletzungen der Gefäße bei der Katheterimplantation, Verletzungen des Pankreas bzw. Pankreasganges bei der Kanülierung des Ductus biliopancreaticus sowie unvollständige Pankreatitisinduktionen sind aufgrund der diffizilen Technik bei den nur 300 – 400 g schweren Tieren nicht auszuschließen und betragen in dieser Versuchsreihe 5,9 %, 2,4 % bzw. 3,6 %. Als krankheitsbedingte Letalität wurden nur Todesfälle gewertet, die nach Ablauf des sechsständigen Induktionsintervalls auftraten. Aus Voruntersuchungen unseres Labors, bei denen alle Tiere nach dem Tod autopsiert wurden, ist bekannt, dass vor Ablauf dieser Frist keine Todesfälle auftreten, die auf die Erkrankung zurückzuführen sind. Vielmehr lassen sich die frühen Todesfälle (< 6 h) auf allgemeine Operationsfolgen (z.B. Narkose) zurückführen oder spezifische Komplikationen, die im Rahmen der oben angeführten Interventionen entstanden sind (z.B. Blutungen).

In der Gruppe der Kontrolltiere betrug die Mortalität bei der Ω -6-Fettsäuregruppe und Ω -3-Fettsäuregruppe 14,3 %. Bei der FettfreiGruppe gab es keine Todesfälle. Als Todesursache sehen wir Spätkomplikationen an.

Bei der Pankreatitisgruppe betrug die Mortalität für Fettfrei 50 %, für Ω -6-Fettsäuren 66,7 % und Ω -3-Fettsäuren 33,3 %. Die Werte unterschieden sich signifikant (33,3 % vs. 50 % und 66,7 %; $p < 0,048$).

5.2 Systemische Parameter

5.2.1 Hämatokrit

Bei den gesunden Kontrolltieren kam es zu keinen Anstieg des Hämatokrits nach 6 Stunden, allerdings nach 24 Stunden zu einem signifikanten Abfall, bedingt durch die Infusionstherapie.

Bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis stieg der Hämatokrit in den ersten 6 Stunden nach Induktion der Pankreatitis an ($50,5 \pm 3,9$ % vs. $46,9 \pm 3,6$ %; $p < 0,04$). Dieser Anstieg war

signifikant. Nach 24 Stunden sank das Hämatokrit signifikant bei allen Tieren deutlich unter den Ausgangswert ab. Dies ist zurückzuführen auf die Infusion und Stabilisierung der Endothelbarriere und auf eine gleichzeitig beginnende Rückresorption von Flüssigkeit aus dem Interstitium.

Im Vergleich der einzelnen Therapiegruppen zeigten sich nach 6 Stunden keine Unterschiede im Hämatokrit. Dies spricht dafür, dass die Schwere der Pankreatitis vor Therapiebeginn in allen Gruppen vergleichbar war.

5.2.2 Kreislaufparameter und respiratorische Parameter

Die Durchschnittswerte des mittleren arteriellen Druckes waren zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Auch in den Therapiegruppen bei nekrotisierender Pankreatitis fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Therapiegruppen bei Kontrolltieren. Dies entspricht den Erfahrungen mit dem Cerulein-GDOC-Kombinationsmodell und spricht für dessen besondere Eignung für Untersuchungen im Bereich der Mikrozirkulation. Bei ausreichender Volumensubstitution gelingt es, die meisten Tiere mit schwerer Pankreatitis hämodynamisch und respiratorisch zu stabilisieren. Nur die Tiere mit foudroyanten Verläufen dekomensieren frühzeitig und müssen ausgeschlossen werden (siehe Ausschlusskriterien 2.7). Dies verfälscht den Aussagewert der Ergebnisse nicht; im Gegenteil: Da die Tiere mit den schlechteren Werten ausgeschlossen werden, dürfte die Validität der eingeschlossenen pathologischen Ergebnisse besonders hoch sein.

Durch den Defekt des Blutgasanalysegerätes konnten bezüglich der respiratorischen Parameter leider keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

5.2.3 Orale Wasseraufnahme

Eine signifikant höhere Trinkmenge ist bei den Kontrolltieren im Vergleich zu den Pankreatitistieren zu beobachten ($8,4 \pm 5,8$ ml vs. $5,0 \pm 4,1$ ml).

Wenn man die Therapiegruppen einzeln miteinander vergleicht, ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Aber die Trinkmenge ist bei der Ω -3-Fettsäuregruppe höher als in der Ω -6-Fettsäure- und Fettfreigruppe bei nekrotisierender Pankreatitis ($6,4 \pm 4,5$ ml vs. $3,5 \pm 3,9$ ml vs. 5 ± 4 ml) und bei den Kontrolltieren ($10 \pm 8,5$ ml vs. $6,9 \pm 3,5$ ml vs. $8,5 \pm 4,8$ ml).

Wir sehen die Trinkmenge als einen indirekten Parameter für das bessere Wohlbefinden bei mit Ω -3-Fettsäuren infundierten Tieren.

5.3 Mikrozirkulationsparameter

5.3.1 Leukozytenadhäsion

Eine Leukozytenadhäsion ist auch bei gesunden Tieren zu beobachten (siehe 4.2.3.1). Im Vergleich zu Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis ist eine signifikant niedrigere Adhärenz der Leukozyten zu verzeichnen ($5 \pm 1,86$ vs. $7 \pm 1,04$; $p < 0,001$). Die Daten sprechen dafür, dass es bei nekrotisierender Pankreatitis zu systemischen Reaktionen kommt und die Lunge ein Zielorgan des SIRS ist. Diese Aussage wird auch durch die Beobachtungen von Steer et al. gestützt (99), dass die Schwere der Pankreatitis nachließ, wenn Leukozytendepletierte Versuchstiere benutzt wurden.

Bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis, die mit Ω -3-Fettsäuren therapiert wurden, ist die Adhärenz der Leukozyten signifikant niedriger, als bei Tieren, die mit Ω -6-Fettsäuren oder fettfrei behandelt wurden ($6,1 \pm 0,8$ vs. $7,5 \pm 0,62$; $p < 0,038$, vs. $7,5 \pm 1,04$; $p < 0,032$). Eine Erklärung für die verminderte Leukozytenadhäsion bei Ω -3-Fettsäuren ist die vermehrte Ausschüttung von Leukotrien B₅, das geringere chemotaktische und aggregationsfördernde Effekte aufweist als Leukotriene B₄, das unter Ω -6-Fettsäuren und fettfreien Infusionen vermehrt ausgeschüttet wird (84, 85).

Die mit Ω -3-Fettsäuren therapierten Tiere haben eine verminderte Leukozytenadhäsion.

5.3.2 Erythrozytenflussgeschwindigkeit

Die Erythrozytenflussgeschwindigkeit ist bei Kontrolltieren signifikant höher als bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis ($0,48 \pm 0,03$ mm/ sec vs. $0,43 \pm 0,03$ mm/ sec; $p < 0,001$).

Eine signifikant höhere Flussgeschwindigkeit ist bei der Ω -3-Fettsäuregruppe mit nekrotisierender Pankreatitis zu beobachten, im Vergleich zu der Ω -6-Fettsäuregruppe und fettfreien Gruppe mit nekrotisierender Pankreatitis ($0,47 \pm 0,01$ mm/ sec vs. $0,42 \pm 0,02$ mm/ sec; $p < 0,002$, vs. $0,41 \pm 0,02$ mm/ sec; $p < 0,001$). Jedoch fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Ω -3-Fettsäuregruppe mit nekrotisierender Pankreatitis im Vergleich zu den Therapiegruppen bei Kontrolltieren. Ein annähernd gleicher Wert für die

Flussgeschwindigkeit ist sogar im Vergleich zur Ω -6-Fettsäuregruppe bei den Kontrolltieren zu beobachten ($0,47 \pm 0,01$ mm/ sec vs. $0,47 \pm 0,03$ mm/ sec).

Die Unterschiede innerhalb der Therapiegruppen bei den Pankreatitistieren ist durch die vermehrte Aktivierung der Gerinnungskaskade Fibrin-Thrombozyten-Aggregate im Vergleich zu Ω -3-Fettsäuren zu erklären. Bei Tieren, die mit Ω -3-Fettsäuren therapiert werden, wird vermehrt Thromboxan A_3 (TXA₃) ausgeschüttet und in den beiden anderen Therapiegruppen entsprechend mehr Thromboxan A_2 (TXA₂). TXA₃ wirkt in geringerem Maß vasokonstriktiv als TXA₂ und fördert die Plättchenaggregation nicht. Die vasodilatativen Effekte von Prostacyclin I_2 (PGI₂) werden in gleicher Weise durch PGI₃ erzielt (84, 85). Darüber hinaus wird eine verstärkte Freisetzung von Stickstoffmonoxid als Ursache der perfusionssteigernden Eigenschaften der Ω -3-Fettsäuren angesehen (102).

Ω -3-Fettsäuren therapierte Tiere haben eine normale und bessere Flussgeschwindigkeit als mit Ω -6-Fettsäuren und fettfrei therapierten Tiere.

5.3.3 Kapillarpermeabilität

Die Kapillarpermeabilität unterschied sich signifikant zwischen der Kontrollgruppe und der Pankreatitisgruppe ($109,4 \pm 4,29$ % vs. $133,4 \pm 10,4$ %).

Vergleicht man die Permeabilitätswerte von der Ω -3-Fettsäuregruppe mit denen der Ω -6-Fettsäuregruppe und Fettfreigruppe bei nekrotisierender Pankreatitis, ist ein signifikanter Unterschied zu beobachten. Die kapilläre Schrankenstörung ist in der Ω -3-Fettsäuregruppe weniger stark ausgeprägt, aber im Vergleich zu den Therapiegruppen von Kontrolltieren lagen die Werte noch im pathologischen Bereich ($122,7 \pm 5,3$ % vs. $109,4 \pm 4,29$ %).

Die Veränderung der Kapillarpermeabilität korreliert zum einen mit der Flüssigkeitsverschiebung ins Interstitium, ist am Verlauf des Hämatokrits zu ersehen und zum anderen durch die vermehrte Freisetzung von weniger bronchokonstriktiv wirkenden und vermindert permeabilitätssteigernden Syntheseprodukten der Eicosapentaensäure (LTC₅) und einer Reduzierung der Mediatoren der Arachidonsäure (LTC₄) (52).

Die Schrankenstörung ist bei den mit Ω -3-Fettsäuren therapierten Tieren geringer als bei den mit Ω -6-Fettsäuren und fettfrei therapierten Tiere.

5.3.4 Septumdurchmesser

Die Septumdurchmesser der Kontrollgruppe und der Pankreatitisgruppe unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich das interstitielle Ödem bei den Pankreatitisgruppen schon zurückgebildet hat, während die kapilläre Schrankenstörung noch persistierte.

Betrachtet man die Septumdurchmesser innerhalb der Therapiegruppen bei den Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis, so stellt man fest, dass die Ω -3-Fettsäuregruppe einen geringeren Septumdurchmesser hat als die Ω -6-Fettsäuregruppe und Fettfreigruppe ($14,5 \pm 1,9 \mu\text{m}$ vs. $17,7 \pm 2,5 \mu\text{m}$; vs. $17,8 \pm 2,8 \mu\text{m}$). Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Es ist anzunehmen, dass das interstitielle Ödem bei Ω -3-Fettsäuren schneller abnimmt. Diese Annahme wird auch durch die Beobachtungen von Sane et al. gestützt (88), hier wurde durch die Infusion einer EPA-haltigen (Eicosapentaensäure) Fettemulsion die Entstehung von Lungenödemen bei endotoxämischen Versuchstieren reduziert.

Obwohl der Wert das Signifikanzniveau nicht erreicht, haben die Ω -3 therapierten Tiere eine geringere Septumdicke, also weniger Flüssigkeit im Interstitium.

5.3.5 Alveolendurchmesser

Ein signifikanter Unterschied in der Pankreatitisgruppe und der Kontrollgruppe hinsichtlich des Alveolendurchmessers ist nicht festzustellen. Der Alveolendurchmesser spiegelt die alveoläre Ventilation wieder.

Die Alveolendurchmesser bei den Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis, die mit Ω -3-Fettsäuren therapiert wurden, sind größer als bei mit Ω -6-Fettsäuren oder fettfrei therapierten Tieren. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Wie schon oben in 5.3.4 erörtert, erklären wir dies durch die geringeren interstitiellen Ödeme bei Therapie mit Ω -3-Fettsäuren. Bei den mit Ω -3-Fettsäuren therapierten Tieren ist ein größerer Alveolendurchmesser festzustellen, obwohl das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde.

5.4 Histologie

Wie schon beschrieben wurde, kommt es bei der nekrotisierenden Pankreatitis zu einer Zunahme der Leukozytenadhäsion und der Kapillarpermeabilität und Septumdurchmessers im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das lässt sich auch den histologischen Schnitten entnehmen (siehe Abb. 3.4.3 bis 3.4.6).

In den Therapiegruppen finden sich deutliche pathologische Veränderungen, wie dieses an Hand der intravitalmikroskopischen Daten zu erwarten war. Die Veränderungen scheinen in der Gruppe der mit Ω -3-Fettsäuren infundierten Tiere geringer ausgeprägt zu sein als in den mit Ω -6-Fettsäuren- und fettfrei infundierten Tieren. Eine endgültige Wertung ist jedoch nicht möglich, da keine semiquantitative Auswertung unter Zuhilfenahme eines Scoresystems durchgeführt und nicht von allen Tieren histologische Präparate ausgewertet wurden.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND BEANTWORTUNG DER FRAGEN

Die Untersuchung der Mikrozirkulation von Geweben mittels Intravitalmikroskopie stellt zurzeit den Goldstandard in der Mikrozirkulationsforschung dar. Der Vorteil dieser Methode ist die direkte Visualisierung der Endstrombahn. Durch verschiedene Färbemethoden und Benutzung von Filtern gelingt die Darstellung und Differenzierung der Flusseigenschaften von Leukozyten und Erythrozyten. Durch Plasmamarker können die Flüssigkeitsverschiebungen von intra- nach extravaskulär auch semiquantitativ erfasst werden. Damit ist die Intravitalmikroskopie nicht nur geeignet physiologische Vorgänge zu beschreiben, sondern auch zur Aufklärung pathophysiologischer Zusammenhänge beizutragen.

Das Kombinationsmodell der nekrotisierenden Pankreatitis hat sich in den letzten Jahren als Referenzmodell der schweren Verlaufsform der Erkrankung durchgesetzt. Dieses Modell zeichnet sich durch einen gut charakterisierten zeitlichen Verlauf aus. Die relativ konstante Letalität von 30-40 Prozent zeigt die Schwere des Krankheitsbildes, das viele Ähnlichkeiten mit der schweren humanen akuten Pankreatitis hat. Für die Frühletalität der Erkrankung sind insbesondere pulmonale und renale Komplikationen bedeutsam. Die Spätmortalität der Erkrankung ist durch septische Komplikationen bedingt.

Die Lungenbeteiligung bei der nekrotisierenden Pankreatitis zeigt sich unter dem Bild eines ARDS. Daher liegt es nahe, die Lungenbeteiligung bei der tierexperimentellen Pankreatitis auch als ARDS-Modell zu nutzen. In der Literatur wurde hierzu bisher die ödematöse Pankreatitis vorgeschlagen. Da jedoch weder Tiere noch Menschen mit milder ödematöser Pankreatitis ein ARDS entwickeln, ist das in dieser Arbeit gewählte Krankheitsmodell der nekrotisierenden Pankreatitis aus unserer Sicht besser geeignet.

An diesem Modell ließen sich mit den angewandten Methoden die eingangs gestellten Fragen beantworten:

Ad 1) Gibt es Mikrozirkulationsstörungen in der Lunge bei akut nekrotisierender Pankreatitis?

Ja, es konnte gezeigt werden, dass bei der akuten Pankreatitis im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren schwerwiegende Lungenmikrozirkulationsstörungen auftreten. Zwar findet sich auch bei gesunden Kontrolltieren eine Leukozytenadhäsion, doch ist diese wesentlich schwächer ausgeprägt als bei der akuten Pankreatitis. Dies ist als Reaktion auf die operative Manipulation zu erklären.

Bei der akut nekrotisierenden Pankreatitis treten parallel zu den schweren Mikrozirkulationsstörungen signifikante histomorphologische Veränderungen auf. Bei mit Ω -3-Fettsäuren behandelten Tieren ließen sich histologisch nur ein leichtes interstitielles Ödem sowie eine geringere Akkumulation von Leukozyten im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen nachweisen bei geringerer Mortalität (33,33 %).

Ad 2) Verändern sich die pulmonalen Mikrozirkulationsstörungen durch intravenöse Applikation von Ω -3-Fettsäuren im Vergleich zu einer fettfreien bzw. Ω -6-Fettsäuren haltigen Ernährung ?

Es konnte gezeigt werden, dass bei Therapie mit Ω -3-Fettsäuren bei akuter Pankreatitis die Mikrozirkulationsstörungen signifikant schwächer ausgeprägt sind als bei den beiden anderen Therapieverfahren, z.B. geringere Leukozytenadhärenz, bessere Flussgeschwindigkeit und geringere Permeabilität. Dies ist zum einen durch die Stabilisierung der Zellmembranen, bedingt durch den vermehrten Einbau von Ω -3-Fettsäuren in die Zellmembranen und verminderten permeabilitätssteigernden Syntheseprodukten, und zum anderen durch die Synthese ihrer geringer bronchokonstriktiven, vasokonstriktiven, chemotaktischen und aggregationsfördernden Syntheseprodukte zu erklären.

Die pulmonale Mikrozirkulation lässt sich durch die Applikation von Ω -3-Fettsäuren im Vergleich zu fettfreien und Ω -6-Fettsäuren haltigen Ernährung verbessern.

Ad 3) Lässt sich das Überleben bei akuter nekrotisierender Pankreatitis durch Ω -3-Fettsäuren beeinflussen?

Durch die Verbesserung der Lungenmikrozirkulation unter Ω -3-Fettsäuren im Vergleich zu Ω -6-Fettsäuren, die eine starke Mikrozirkulationsstörung aufweisen, korreliert auch die geringere Mortalität für Ω -3-Fettsäuren (33,33 %) im Vergleich zu Ω -6-Fettsäuren (66,67 %), die eine sehr hohe Mortalität aufweisen.

Der Krankheitsverlauf und das Überleben lassen sich durch Ω -3-Fettsäuren zum positiven beeinflussen.

Je geringer die Lungenmikrozirkulationsstörung ist, desto geringer ist die Mortalität.

Schlussfolgerung:

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die parenterale Behandlung mit Ω -3-Fettsäuren in der Frühphase der Sepsis einen positiven Effekt auf die Mikrozirkulation der Lunge hat. Es kommt zu einer geringeren Leukozytenadhäsion und damit zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion. Außerdem werden vermehrt antiinflammatorische Mediatoren gebildet, so dass die Behandlung mit Ω -3-Fettsäuren insgesamt zu einer geringeren Mortalität führt. Die Verbesserungen im Bereich der pulmonalen Mikrozirkulation erklären die in früheren Studien beobachtete Stabilisierung der Lungenfunktion unter Ω -3-Fettsäuren, insbesondere durch die Stabilisierung der Kapillarpermeabilität treten weniger stark ausgeprägte interstitielle Ödeme auf.

Mit dieser Arbeit konnte die positive Wirksamkeit von Ω -3-Fettsäuren auf die pulmonale Mikrozirkulation bei der Sepsis im Tiermodell nachgewiesen werden. Im Anschluss sollten klinische Studien diesbezüglich erfolgen.

Ω -3-Fettsäuren können den klinischen Verlauf der Sepsis in der Frühphase positiv beeinflussen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aho HJ, Koskensalo SML, Nevalainen TJ: Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15(4): 411-416
2. Anderson MC, Schiller WR: Microcirculatory dynamics in the normal and inflamed pancreas. *Am J Surg* 1968; 115: 118-127
3. Anderson MC, Schoenfeld FB, Jams WB, Suwa M: Circulatory changes in pancreatitis. *Surg Clin North Am* 1967; 47: 127-132
4. Baillargon JD, Orav J, Ramagopal V, Tenner SM, Banks PA: Haemoconcentration as an early risk factor for necrotizing pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2130-2134
5. Balthazar EJ, Freeny PC: Contrast-enhanced computed tomography in acute pancreatitis: Is it beneficial or harmful? (editorial) *Gastroenterology* 1994; 106: 259-261
6. Becker CG, Nachman RL: Contractile proteins of endothelial cells, platelets and smooth muscles. *Am J Pathol* 1973; 71: 1-22
7. Berk et al. *Handbuch der Intensivmedizin* S. Karger AG, Basel, ISBN 3-8055-2941-4
8. Brown A, Orav J, Banks PA: Hemoconcentration is an early marker for organ failure and necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2000; 20: 367-372
9. Büchler M, Friess H, Uhl W, Beger HG: Clinical relevance of experimental acute pancreatitis. *Eur Surg Res* 1992; 24 (Suppl): 85-88
10. Capen RL, Latham LP, Wagner WW: Comparison of direct and indirect measurement of capillary transit times. *J Appl Physiol* 1987; 62: 1150-1154
11. Carter MB, Wilson MA, Wead WB, Garrison RN: Pulmonary subpleural arteriolar diameters during intestinal ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1995; 59: 51-58

12. Chen HM, Shyr MH, Ueng SWN, Chen MF: Hyperbaric Oxygen Therapy Attenuates Pancreatic Microcirculatory Derangement and Lung Edema in an Acute Pancreatitis Model in Rats. *Pancreas* 1998; 17: 44-49
13. Dickson AP, Foulis AK, Imrie CW: Histology and bacteriology of closed duodenal loop models of experimental acute pancreatitis in the rat. *Digestion* 1986; 34: 15-20
14. Doerschuk CM, Allard MF, Martin BA, MacKenzie A, Autor AP, Hogg JC: Marginated pool of neutrophils in rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1987; 63: 1806-1815
15. Doerschuk CM, Beyers N, Coxson HO, Wiggs B, Hogg JC: Comparison of neutrophil and capillary diameters and their relation to neutrophil sequestration in the lung. *J Appl Physiol* 1993; 74: 3040-3045
16. Dumont RE, Martelli AB: Pathogenesis of pancreatic oedema following exocrine duct obstruction. *Ann Surg* 1968: 302-309
17. Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ, Foitzik T: Effect of Endothelin and Endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimental pancreatitis. *Gut* 2000; 46: 390-394
18. Fingar VH, Taber SW, Buschenmeyer WC, ten Tijme A, Cerrito PB, Tseng M, Guo H, Johnston MN, Wieman TJ: Constitutive and stimulated expression of ICAM-1 protein on pulmonary endothel cells in vivo. *Microvasc Res* 1997; 54: 135-144
19. Fingar VH, Taber SW, Wieman TJ: A new model for the study of pulmonary microcirculation: Determination of pulmonary edema in rats. *J Surg Research* 1994; 57: 385-393
20. Fink et al. Adult respiratory distress syndrom: Roles of Leukotriene C4 and platelet activating factor. *Crit. Care Med.* 1990; 18(9): 905-910

21. Foitzik T, Bassi DG, Fernández-del-Castillo C, Warshaw AL, Rattner DW: Intravenous contrast medium impairs oxygenation of the pancreas in acute necrotizing pancreatitis in the rat. *Arch Surg* 1994 Jul; 129(7): 706-711
22. Foitzik T, Bassi DG, Schmidt J, Lewandrowski KB, Fernández-del-Castillo C; Rattner DW, Warshaw AL: Intravenous contrast medium accentuates the severity of acute necrotizing pancreatitis in the rat. *Gastroenterology* 1994 Jan; 106(1): 207-214
23. Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ: Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability and improved survival rates. *Surgery* 2000; 128: 399-407
24. Foitzik T, Eibl G, Kahrau S, Kasten C, Buhr HJ: Nachweis persistierender systemischer Mikrozirkulationsstörungen bei der akuten Pankreatitis. Ansatz für neue Therapiekonzepte. *Langenbecks Arch Chir* 2000; Suppl. 1: 595-599
25. Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ: Endothelin triggert die Ausbildung der schweren akuten Pankreatitis. *Langenbecks Arch Chir* 1997; 1: 749-753
26. Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ: Endothelin receptor blockade improves fluid sequestration, pancreatic capillary blood flow and survival in severe experimental pancreatitis. *Ann Surg* 1998; 228: 670-675
27. Foitzik T, Hotz H, Eibl G, Buhr HJ: Experimental models of acute pancreatitis: are they suitable for evaluating therapy?, *Int J Colorectal Dis* 2000; 15: 127-135
28. Forgács B, Eibl G, Wudel E, Franke J, Faulhaber J, Kahrau S, Buhr HJ, Foitzik T: Res function and liver microcirculation in the early stage of acute experimental pancreatitis. Präsentiert: "Annual Meeting of American Pancreatic Association", Chicago, USA, 5.-6. November, 1998 (eingereicht zur Veröffentlichung)
29. Freiburghaus AU, Redha F, Ammann RW: Does Acute Pancreatitis Progress to Chronic Pancreatitis? A Microvascular Pancreatitis Model in the Rat. *Pancreas* 1995; 11: 374-381

30. Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML: The Role of Intercellular Adhesion Molecule 1 and Neutrophils in Acute Pancreatitis and Pancreatitis-Associated Lung Injury. *Gastroenterology* 1999; 116: 694-701
31. Goodhead B: Acute pancreatitis and pancreatic blood flow. *Surg Gynecol Obstet* 1969; 129: 331-340
32. Grimminger et al. Parenterale Omega-3-Lipidbehandlung bei inflammatorischen Systemerkrankungen. *Med. Welt* 1993; 44: 207-216
33. Groh J, Kuhnle GEH, Kuebler WM, Goetz AE: An experimental model for simultaneous quantitative analysis of pulmonary micro- and macrocirculation during unilateral hypoxia in vivo. *Res Exp Med* 1992; 431-441
34. Hall HL: A study of the pulmonary circulation by the transillumination method. *Am. J. Physiol.* 1925; 72: 446-457
35. Hartwig W, Werner J, Jimenez RE, Z'graggen K, Weimann J, Lewandrowski KB, Warshaw AL: Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute to pancreatitis-associated lung injury. *Am J Physiol* 1999; 277: G1008-G1016
36. Heller, Koch. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs* 1998; 55: 487-496
37. Helset E, Lindal S, Olsen R, Myklebust R, Jorgensen L: Endothelin-1 causes sequential trapping of platelets and neutrophils in pulmonary microcirculation in rats. *Am J Physiol* 1996; 271: L538-L546
38. Hotz HG, Schmidt J, Ryschich EW, Foitzik T, Buhr HJ, Warshaw AL, Herfarth C, Klar E: Isovolemic Hemodilution with Dextran Prevents Contrast Medium Induced Impairment of Pancreatic Microcirculation in Necrotizing Pancreatitis of the Rat. *The American Journal of Surgery* 1995; 169: 161-166

39. Inano H, English D, Doerschuk CM: Effect of zymosan-activated plasma on the deformability of rabbit polymorphonuclear leukocytes and the role of the cytoskeleton. *J Appl Physiol* 1992; 73: 1370-1376
40. Inoue S, Nakao A, Kishimoto W, Murakami H, Itoh K, Itoh T, Harada A, Nonami T, Takagi H: Anti-Neutrophil Antibody Attenuates the Severity of Acute Lung Injury in Rats with Experimental Acute Pancreatitis. *Arch Surg* 1995; 130: 93-98
41. Kelly DM, McEntee GP, McGeeney KF, Fitzpatrick JM: Pulmonary microvasculature in experimental acute haemorrhagic and edematous pancreatitis. *Br J Surg* 1991; 78: 1064-1067
42. Kelly DM, McEntee GP, McGeeney KF, Fitzpatrick JM: Microvasculature of pancreas, liver and kidney in cerulein-induced pancreatitis. *ARCH Surg* 1993; 128: 293-295
43. Kinsella et al. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: Potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: An overview. *Nutrition* 1990; 6: 24
44. Klar E, Endrich B, Messmer K: Microcirculation of the pancreas a quantitative study of physiology and changes in pancreatitis. *Int J Microcirc Clin Exp* 1990; 9: 85-101
45. Klar E, Foitzik T, Buhr H, Messmer K, Herfarth C: Isovolemic hemodilution with dextran 60 as treatment of pancreatic ischemia in acute pancreatitis. *Ann Surg* 1993; 217: 369-374
46. Klar E, Herfarth C, Messmer K: Therapeutic effect of isovolemic hemodilution with Dextran 60 on the impairment of pancreatic microcirculation in acute biliary pancreatitis. *Ann Surg* 1990; 211: 346-349
47. Klar E, Mall G, Messmer K, Herfarth C: Improvement of impaired pancreatic microcirculation by isovolemic hemodilution protects pancreatic morphology in acute biliary pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176: 144-151
48. Klar E, Messmer K, Warshaw AL, Herfarth C: Pancreatic ischaemia in experimental acute pancreatitis mechanism, significance and therapy. *Br J Surg* 1990; 77: 1205-1210

49. Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H: Cap Image: ein neuartiges computergestütztes Videobildanalysesystem für die dynamische Kapillarmikroskopie. *Biomed Technik* 1997; 42: 168-175
50. Knoefel WT, Kollias N, Warshaw AL, Waldner H, Nishioka NS, Rattner DW: Pancreatic microcirculatory changes in experimental pancreatitis of graded severity in the rat. *Surgery* 1994; 116: 904-913
51. Koch et al. Modulation of pulmonary vascular resistance and edema formation by short-term infusion of a 10% fish oil emulsion. *Infusionsther. Transfusionsmed* 1993; 20: 291-300
52. Koch et al. Alterations of pulmonary capillary filtration and Leukotriene synthesis due to infusion of a lipid emulsion enriched with Omega-3-fatty-acids. *Clinical Intensive Care* 1995; 6: 112-120
53. Krahl VE: A method of studying the living lung in the closed thorax and some preliminary observations. *Angiology* 1963; 14: 149-159
54. Kuebler WM, Borges J, Sckell A, Kuhnle GEH, Bergh K, Messmer K, Goetz AE: Role of L-Selection in Leukocyte Sequestration in Lung Capillaries in a Rabbit Model of Endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161: 36-43
55. Kuebler WM, Kuhnle GEH, Groh J, Goetz AE: Leukocytes kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol* 1994; 76: 65-71
56. Kuebler WM, Kuhnle GEH, Groh J, Goetz AE: Contribution of selectins to leukocytes sequestration in pulmonary microvessels by intravital microscopy in rabbits. *J Physiol* 1997; 501: 375-386

57. Kuhnle GE, Leipfinger FH, Goetz AE: Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1461-1471
58. Kuhnle GE, Reichenspurner H, Lange T, Wagner F, Groh J, Messmer K, Goetz AE: Microhemodynamics and leukocyte sequestration after pulmonary ischemia and reperfusion in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115: 937-944
59. Kusterer K, Enghofer M, Zender S, Blöchle C, Usadel KH: Microcirculatory changes in sodium taurocholate-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 1991; 250: G346-G351
60. Kusterer K, Poschmann T, Friedemann A, Enghofer M: Arterial constriction, ischemia-reperfusion, and leucocyte in acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1993; 265: G165-171
61. Lampel M, Kern HF: Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. A path. Anat. and Histol.* 1977; 373: 97-103
62. Lankisch PG, Mahlke R, Blum T, Bruns A, Bruns D, Maisonneuve P, Lowenfels AB: Hemoconcentration: an early marker of severe and/or necrotising pancreatitis? A critical appraisal. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2081-2085
63. Lawrence, Sorrell: Eicosapentaenoic acid in cystic fibrosis: evidence of a pathogenetic role for Leukotriene B₄. *Lancet* 1993; 342: 465-469
64. Lerch MM, Adler G: Experimental Animal Models of Acute Pancreatitis. *International Journal of Pancreatology* 1994; 15: 159-169
65. Lewis JW, Serwin JP, Gabriel FS, Bastanfar M, Jacobsen G: The utility of a double-lumen tube for one lung ventilation in a variety of noncardiac thoracic surgical procedures. *Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 1992; 6: 705-710
66. Lien DC, Henson Pm, Capen RL, Henson JE, Henson WL, Wagner WW, Worthen GS: Neutrophil kinetics in the pulmonary microcirculation during acute inflammation. *Lab Invest* 1991; 65: 145-159

67. Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS: Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by DL-ethionin fed with choline-deficient diet. *AM J Pathol* 1975; 79: 465-474
68. McCormack DG, Letha S, Tyml K, Scott JA, Potter R, Rohan M: Pulmonary Microvascular Changes during Sepsis: Evaluation Using Intravital Videomicroscopy. *Microvascular Research* 2000; 60: 131-140
69. Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B: Ischemia-Reperfusion-Induced Pancreatic Microvascular Injury. *Digestive Diseases and Sciences* 1996; 41: 823-830
70. Menger MD, Vollmar B: In vivo documentation of an arteriovenous shunt in rat pancreatic acinar tissue. *Pancreas* 1996; 13: 125-129
71. Mulligan MS, Miyasaka M, Tamatani T, Jones ML, Ward PA: Requirements for L-selectin in neutrophil-mediated lung injury in rats. *J Immunol* 1994; 152: 832-840
72. Mulligan MS, Polley MJ, Bayer RJ, Nunn MF, Paulson JC, Ward PA: Neutrophil dependent lung injury: requirement for P-selectin (GMP-140). *J Clin Invest* 1992; 90: 1600-1607
73. Murakami H, Nakao A, Kishimoto W, Nakano M, Takagi H: Detection of O₂-generation and neutrophil accumulation in rat lungs after acute necrotising pancreatitis. *Surgery* 1995; 118: 547-554
74. Neuhof: Actions and interactions of mediator systems and mediators in the pathogenesis of ARDS and multiorgan failure. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1991; 35, Supplementum 95: 7-14
75. Niderau C: Experimentelle Therapieansätze bei akuter Pankreatitis. In: Mössner J, Adler G, Fölsch UR, Singer MV (Hrsg.). *Erkrankungen des exkretorischen Pankreas*, G. Fischer, Jena, 1995: 293-302

76. Okada O, Presson RG, Kirk KR, Godbey PS, Capen RL, Wagner WW: Capillary perfusion patterns in single alveolar walls. *J. Physiol.* 1992; 72: 1838-1844

77. Orda R, Hadas N, Orda S, Wiznitzer T: Experimental acute pancreatitis. Inducement by taurocholate sodium-trypsin injection into a temporarily closed duodenal loop in the rat. *Arch Surg* 1980; 115: 327-329

78. Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, Lausten SB, Deleuran B, Deleuran M, Gesser B, Matsushima K, Larsen CG, Jensen SL: A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotising pancreatitis in rabbits. *Gut* 1998; 43: 232-239

79. Papp M, Makara GB, Hajman B, Csaki L: A quantitative study of pancreatic blood flow in experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 1966; 51: 524-528

80. Papp M, Ungvari GY, Nemeth PE, Munkacsi J, Zubeck C: The effect of bile-induced pancreatitis on the intrapancreatic vascular pattern in dogs. *Scand J Gastroenterol* 1969; 4: 681-689

81. Pederzoli P, Bassi C, Vesentini S, Campedelli A: A randomized multicenter clinical trial of antibiotic prophylaxis of septic complications in acute necrotising pancreatitis with Imipenem. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176: 480-483

82. Pfeffer RB, Stasio O, Hinton JW: The clinical picture of the sequential development of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog. *Surg Forum* 1957; 8: 248-251

83. Podufal A: Mikrozirkulation der Lunge. INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin (in Vorbereitung)

84. Pomposelli et al. Short-term TPN containing n-3 fatty acids ameliorate lactic acidosis induced by endotoxin in guinea pigs. *Am. J. Clin. Nutr.* 1990; 52: 548-552

85. Pscheidl et al. Influence of ω -3 fatty acids on splanchnic blood flow and lactate metabolism in an endotoxemic rat model. *Metabolism* 1992; 41: 698-705
86. Rattner DW: Experimental Models of Acute Pancreatitis and their Relevance to Human Disease. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31: 6-9
87. Redha F, Uhlschmid G, Ammann RW, Freiburghaus AU: Injection of Microspheres into Pancreatic Arteries Causes Acute Hemorrhagic Pancreatitis in the Rat: A New Animal Model. *Pancreas* 1990; 5: 188-193
88. Sane et al.: Eicosapentaenoic acid reduces pulmonary edema in endotoxemic rats. *J. Surg. Res.* 2000; 93: 21-27
89. Schiller WR, Anderson MC: Microcirculation of the normal and inflamed canine pancreas. *Ann Surg* 1975; 181: 466-470
90. Schlosser D, Heyes E, Bartels H: Flow rate of erythrocytes in the capillaries of the lung. *J. Appl. Physiol.* 1965; 20: 110-112
91. Schmidt J, Fernandez-del-Castillo C, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Warshaw AL: Trypsinogen-activation peptides in experimental rat pancreatitis prognostic implications and histopathologic correlates. *Gastroenterology* 1992; 103: 1009-1016
92. Schmidt J, Lewandrowski K, Fernandez-del-Castillo C, Mandavilli U, Compton CC, Warshaw AL, Rattner DW: Histopathologic correlates of serum amylase activity in acute experimental pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1992; 37: 1426-1433
93. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL: A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56
94. Schneider P, Foitzik T, Kahrau S, Podufal A, Buhr HJ: An Experimental Rat Model for Studying Pulmonary Microcirculation by In Vivo Videomicroscopy. *Microvasc Res* 2001; 62: 421-434

95. Seidel H: Bemerkungen zu meiner Methode der experimentellen Erzeugung der akuten haemorrhagischen Pankreatitis. Zentralbl Chir 1910; 37: 1601-1604
96. Shields CJ, Winter DC, Sookhai S, Ryan L, Kirwan WO, Redmond HP: Hypertonic saline attenuates end-organ damage in an experimental model of acute pancreatitis. British Journal of Surgery 2000; 87: 1336-1340
97. Short Ac, Montoya ML, Gebb SA, Presson RG, Wagner WW, Capen RL: Pulmonary capillary diameters and recruitment characteristics in subpleural and interior networks. J Appl Physiol 1996; 80: 1568-1573
98. Spormann H, Sokolowski A, Birkigt HG, Letko G: Contribution of pancreatic edema and short-term ischemia to experimental acute pancreatitis in the rat. Procedure and pathomorphological investigations. Z Exp Chir Transplant Künstliche Organe 1986; 19: 323-330
99. Steer ML: Relationship between pancreatitis and lung diseases. Respiration Physiology 2001; 128: 13-16
100. Steinberg WM, Schlesselman SE: Treatment of Acute Pancreatitis, Comparison of Animal and Human Studies. Gastroenterology 1987; 93: 1420-1427
101. Todd KE, Lewis MPN, Gloor B, Lane JS, Ashley SW, Reber HA: An Eta/Etb Endothelin antagonist ameliorates systemic inflammation in a murine model of acute hemorrhagic pancreatitis. Surgery 1997; 122: 443-450
102. Vanhoutte. Fish oil and endothelium-dependent relaxations. In: II International Conference on the Health Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods 1990.
103. Wagner WW, Filley GF: Microscopic Observations of the Lung in Vivo. Vasc. Dis. 1965; 2: 229-241

104. Wagner WW, Latham LP: Pulmonary capillary recruitment during airway hypoxia in the dog. *J. Appl. Physiol.* 1975; 39: 900-905
105. Wagner WW, Latham LP, Gillespie MN, Guenther JP: Direct measurement of pulmonary capillary transit times. *Science Wash. DC* 1982; 218: 379-381
106. Wearn JT, Ernestine AC, Bromer AW, Barr JW, German WJ, Zschiesche LJ: The normal behaviour of the pulmonary blood vessels with observations on the intermittence of the flow of blood in arterioles and capillaries. *Am. J. Physiol.* 1934; 109: 236-256
107. Weber et al. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in man. Academic Press, Orlando 1986; 49-60
108. Weber et al. Docosahexaenoic acid inhibits PAF and LTD stimulated Ca-increase in different monocytic U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1133: 38-45
109. Werner J, Dragotakes SC, Fernandez-del-Castillo C, Rivera JA: Technetium-99m-labeled white blood cells – a new method to define the local and systemic role of leukocytes in acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* 1998; 227: 86-94
110. Werner J, Rivera JA, Fernandez-del-Castillo C, Warshaw AL: Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous versus necrotising pancreatitis. *Surgery* 1997; 121: 23-30
111. Wolfram. Ω -3-Fettsäuren- ihr Stoffwechsel und ihre Wirkungen auf das vaskuläre System, Fettstoffwechsel und Immunsystem. *Akt. Ernähr.-Med.* 1995; 20: 173-179
112. Zadak et al.: PUFA n-3 lipid emulsion: a promising agent in ARDS treatment. *Nutrition* 1997; 13: 232-233

8 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

8.1 Tabellen

- Tab. 2.5.1.1 Versuchsgruppen mit Kurzbezeichnung
- Tab. 2.5.4.1 Zusammensetzung der Infusionstherapie der verschiedenen Therapiegruppen
- Tab. 2.8.3.1 Parameter während der kontinuierlichen Beatmung und während der Atempause zur Durchführung der Intravitalmikroskopie
- Tab. 3.1.1 Mortalität von Kontrolltieren im Vergleich zu Tieren mit akut nekrotisierender Pankreatitis
- Tab. 4.1 Modelle der akuten Pankreatitis und ihre Eignung für Therapiestudien
- Tab. 4.2 Parallelen des Cerulein/GDOC-Kombinationsmodells und der humanen schweren Pankreatitis

8.2 Abbildungen

- Abb. 1.2 Biochemie und Pharmakologie der Ω -3- und Ω -6-Fettsäuren
- Abb. 2.3.1 Katheterimplantation
- Abb. 2.8.3.1 Beatmungsgerät
- Abb. 2.8.4.1 Lagerung des Untersuchungstieres bei der intravitalmikroskopischen Untersuchung
- Abb. 3.2.1 Zeitlicher Verlauf des Hämatokrits innerhalb nekrotisierender Pankreatitis und Kontrollgruppe
- Abb. 3.2.2 Hämatokrit-Werte unter Therapie bei nekrotisierender Pankreatitis
- Abb. 3.2.4.1 Orale Wasseraufnahme bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis
- Abb. 3.2.4.2 Orale Wasseraufnahme unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere
- Abb. 3.3.1.1 Leukozytenadhäsion bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis
- Abb. 3.3.1.2 Leukozytenadhäsion unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere

- Abb. 3.3.2.1 Erythrozytenflussgeschwindigkeit bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis
- Abb. 3.3.2.2 Erythrozytenflussgeschwindigkeit unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere
- Abb. 3.3.3.1 Kapillarpermeabilität bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis
- Abb. 3.3.3.2 Kapillarpermeabilität unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere
- Abb. 3.3.4.1 Septendurchmesser bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis
- Abb. 3.3.4.2 Septendurchmesser unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere
- Abb. 3.3.5.1 Alveolendurchmesser bei Kontrolltieren und bei Tieren mit nekrotisierender Pankreatitis
- Abb. 3.3.5.2 Alveolendurchmesser unter den einzelnen Therapien bei nekrotisierender Pankreatitis und Kontrolltiere
- Abb. 3.4.1 Normale Lunge bei Kontrolltier
- Abb. 3.4.2 Lunge bei fettfrei infundierten Tier bei akut nekrotisierender Pankreatitis
- Abb. 3.4.3 Lunge bei Ω -6-Fettsäuren infundierten Tier bei akut nekrotisierender Pankreatitis
- Abb. 3.4.4 Lunge bei Ω -3-Fettsäuren infundierten Tier bei akut nekrotisierender Pankreatitis

9 **LEBENS LAUF**

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

10 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. H. -J. Buhr danke ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für seine Unterstützung, welche die Durchführung dieser Studie ermöglicht hat.

Des Weiteren danke ich Herrn PD Dr. med. P. Schneider und Herrn Dr. med. S. Kahrau, die mich am Anfang der Arbeit in vielfältiger Weise unterstützt und mich mit viel Geduld in die Operationstechniken und Instrumentierung der Versuchstiere eingeführt haben.

Herrn Prof. Dr. med. Loddenkemper danke ich für sein Interesse und für die Unterstützung bei der Auswertung der histologischen Präparaten.

Mein Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen und Frau Hotz für die Hilfe bei Fragen und der Aufarbeitung der histologischen Präparate.

Meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin sowie die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben, danke ich von ganzem Herzen für ihre großzügige Unterstützung und liebevolle Geduld.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Ehefrau Günes Tetik Arslan aussprechen, die mir in statistischen Fragen und Bearbeitung meiner Doktorarbeit zur Seite stand, und meinen Kindern von ganzem Herzen danken.

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.