

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Thoraxchirurgie, Campus Mitte,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zeitlicher Verlauf der GDOC/Caerulein-induzierten akuten
hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis der Ratte bei
parenteraler Ernährung mit n-3-Fettsäuren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Carsten Wagner
aus Stuttgart

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr.med. F. A. Wenger
2. Priv.-Doz. Dr.med. G. Schumacher
3. Priv.-Doz. Dr.med. B. Ablaßmaier

Datum der Promotion: 18.09.2009

*Meinen Eltern,
Geschwistern und
meiner Oma*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die akute Pankreatitis	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.2	Pathogenese.....	1
1.1.3	Diagnostik und Therapie	2
1.2	Sauerstoffradikalbildung und Lipidperoxidation sowie ihre Bedeutung für die Pathogenese der akuten Pankreatitis	4
1.3	Funktion von Fettsäuren und die spezielle Bedeutung von n-3-Fettsäuren	5
1.4	Eikosanoide und deren Rolle im Inflammationsprozess	7
2	Fragestellung	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Tiermodell	11
3.1.1	Behördliches Aktenzeichen und Datum der Genehmigung.....	11
3.1.2	Haltung der Versuchstiere	11
3.1.3	Gruppeneinteilung.....	11
3.1.4	Ausschlusskriterien	13
3.2	Infusionslösungen	13
3.3	Operationsverfahren und Pankreatitisinduktion	14
3.3.1	Allgemeines Vorgehen.....	14
3.3.2	Postoperatives Management	15
3.3.3	Versuchsbeendigung, Obduktion und Probengewinnung	15
3.4	Histologische Aufarbeitung und Untersuchung des Pankreasgewebes	16
3.5	Biochemische Aufarbeitung und Untersuchung des Pankreasgewebes	18
3.5.1	Homogenatherstellung.....	18

3.5.2	Proteinbestimmung	18
3.5.3	Bestimmung der GSH-Px-Aktivität	19
3.5.4	Bestimmung der SOD-Aktivität	20
3.5.5	Bestimmung der Lipidperoxidation (TBARS)	21
3.5.6	Bestimmung der Eikosanoid-Konzentration	23
3.5.7	Weitere verwendete Geräte	24
3.6	Statistische Berechnungen.....	25
4	Ergebnisse.....	26
4.1	Letalität.....	26
4.2	Inzidenz der Pankreatitis.....	26
4.3	Histologischer Schweregrad der Pankreatitis im zeitlichen Verlauf	26
4.3.1	Pankreatitis-Induktions-Kontrolle (Gruppe 1)	26
4.3.2	E153-Infusion-Vergleichsgruppen (Gruppe 2,4,6,8,10).....	26
4.3.3	n-3-FS-Infusionsgruppen (Gruppe 3,5,7,9,11)	26
4.4	Biochemische Parameter im zeitlichen Verlauf	28
4.4.1	GSH-Px Aktivität	28
4.4.2	SOD Aktivität.....	29
4.4.3	TBARS Konzentration.....	30
4.4.4	PGE ₂ Konzentration.....	31
4.4.5	PGF _{1α} Konzentration.....	33
4.4.6	Leukotrien-Konzentration	34
5	Diskussion.....	35
5.1	n-3-Fettsäuren – Studienlage.....	35
5.2	n-3-Fettsäuren – Radikalstoffwechsel	36
5.3	n-3-Fettsäuren – Eikosanoidstoffwechsel	38
5.3.1	Prostaglandine	39
5.3.2	Leukotriene	42

5.4	Fazit	43
6	Zusammenfassung	45
7	Literaturverzeichnis.....	47
8	Abkürzungsverzeichnis.....	I
9	Erklärung an Eides Statt	II
10	Danksagung	III
11	Lebenslauf.....	IV

1 Einleitung

1.1 Die akute Pankreatitis

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die akute Pankreatitis ist eine akute, primär zumeist abakterielle Entzündung der Bauchspeicheldrüse, welche in Deutschland in ca. 40% der Fälle einer biliären (distale Gallengangsobstruktion durch Gallensteine mit anschließendem biliären Reflux in den Pankreasgang oder pankreatischem Sekretionsstau) und in 35% einer ethyltoxischen Genese folgt. Andere Ursachen (ca. 25%) stellen Medikamente, Pankreasgangstenosen, Dysgenesien des Pankreas, iatrogene (z.B. endoskopische retrograde Cholangio-Pankreatikographie (ERCP)), traumatische, infektiöse, parasitäre, endokrinologische, genetische, autoimmune und vaskuläre Auslöser bzw. eine idiopathische Genese dar [1, 2]. Die jährliche Inzidenz der akuten Pankreatitis in industrialisierten Nationen beträgt 5-80 pro 100.000 Einwohner mit einer Mortalität von ca. 2-9%. Der Verlauf kann von einer milden, selbstlimitierenden, ödematös-interstitiellen (80%) bis hin zu einer schweren, hämorrhagisch-nekrotisierenden Verlaufsform (10-20%) reichen [1, 2]. Die Mortalität der ödematös-interstitiellen Form beträgt lediglich 1-3%, die der hämorrhagisch-nekrotisierenden Verlaufsform dagegen liegt je nach Ausmaß der Parenchymschädigung zwischen 14-25% [1, 2], wobei systemische Komplikationen wie beispielsweise das systemische inflammatorische Response-Syndrom (SIRS) oder das akute Lungenversagen (ARDS) diese hohe Letalitätsrate verursachen.

1.1.2 Pathogenese

Pathophysiologisch liegt eine Autodigestion des Pankreas vor, die durch intrazelluläre Aktivierung und Freisetzung von pankreatischen (Pro-)Enzymen wie Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Elastase, Lipase und Cathepsin B ausgelöst wird. Es kommt unabhängig von der Ätiologie und Verlaufsform der Pankreatitis primär zu einer gestörten Mikroperfusion des Organs und somit zur Ausbildung eines Ödems, welches potentiell vollständig reversibel ist. Bei 14-25% der Patienten kommt es zu einer Progression des Verlaufs mit Ausbildung von Hämorrhagien und Nekrosen, was mit einer irreversiblen Destruktion des Parenchyms und Minderung oder Verlust von dessen

Funktionen einhergeht. Der genaue Pathomechanismus ist aufgrund des komplexen Zusammenwirkens vieler Faktoren noch nicht gänzlich geklärt. Als sicher gilt jedoch, dass die Bildung freier Radikale, die intrazelluläre Aktivierung digestiver Enzyme, eine überschießende Aktivierung zellulärer und humoraler Inflammationsmechanismen und die im Verlauf entstehende Mikrozirkulationsstörung eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Genese und den Verlauf der akuten Pankreatitis spielen [3].

1.1.3 Diagnostik und Therapie

Um eine akute Pankreatitis zu diagnostizieren bedarf es neben den möglichen klinischen, allerdings unspezifischen Zeichen wie z. B. Übelkeit, Erbrechen, gummiartig geblähtem, druckdolentem Abdomen, teilweise schwersten abdominellen Schmerzen, positivem Cullen- oder Grey-Turner-Zeichen oder einem rechts lateral auslösbarem Schmerz (Mallet-Guy'sches Zeichen) weiterer Untersuchungen wie z.B. Laborparameter und bildgebender Diagnostik, um den Verdacht einer akuten Pankreatitis zu erhärten .

Eine Erhöhung der Lipase und Amylase im Serum über das Dreifache der Norm ist hinweisend; jedoch ist eine nur geringe Erhöhung dieser Enzyme nicht spezifisch für die akute Pankreatitis [2, 4, 5]. Bei biliärer Genese findet sich oftmals ein Anstieg der hepatischen Transaminasen [2].

Das C-reaktive Protein (CRP) und das Trypsinogen-Aktivierungspeptid stellen in diesem Zusammenhang Parameter für die Differenzierung zwischen einem milden und einem schweren Verlauf der Pankreatitis dar [5, 6]. Allerdings ist das CRP als allgemeiner Entzündungsparameter nicht spezifisch für die Pankreatitis. In klinischen Studien hat sich zur Verlaufsbeurteilung der akuten Pankreatitis u. a. der Ranson-Score etabliert, mit dem sich Prognosen hinsichtlich Verlauf und Ausmaß der akuten Pankreatitis erstellen lassen [2, 7, 8].

Bei Verdacht auf eine gallensteininduzierte Pankreatitis ist die Abdomensonographie das Mittel der ersten Wahl, die jedoch oftmals aufgrund von überblähten Darmschlingen bzw. Meteorismus in ihrer Aussagekraft eingeschränkt und zudem von der Versiertheit des Untersuchers abhängig ist [2, 4].

Das Mittel der Wahl bei schweren Verläufen stellt die kontrastmittelverstärkte Computertomographie dar, um Nekrosen, Zysten, Kalzifikationen, Hämorrhagien und

somit das Ausmaß der Schädigung bei der akuten hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis nachzuweisen [2, 4].

Therapeutisch stehen bei der akuten Pankreatitis die Beseitigung des Auslösers und das symptomorientierte Handeln im Vordergrund, welches sich wiederum an dem Schweregrad des Verlaufes orientiert.

So wird u. a. von Bühler et al. neben der Regulation des Elektrolyt-, Flüssigkeits- und Kalorienhaushalts eine adäquate Schmerztherapie und eine orale Nahrungskarenz bis zur Schmerzfreiheit des Patienten empfohlen. Bei Schmerzfreiheit sollte möglichst frühzeitig eine orale bzw. enterale Ernährung erfolgen, um eine Zottenatrophie im Darm und damit assoziierte Translokation von Bakterien, welche wiederum die Infektion von Nekrosen begünstigen können, zu vermeiden. Weiterhin hat sich in Studien eine frühzeitige enterale Ernährung mittels einer Jejunalsonde empfohlen [2, 8, 9].

Bei schwerem Verlauf einer biliären Pankreatitis sollte die Indikation zur frühzeitigen ERCP großzügig gestellt werden, da hierdurch eine Reduktion der Morbidität und Mortalität in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte [2, 8, 9].

Die prophylaktische Gabe von Antibiotika bei der milden Verlaufsform der akuten Pankreatitis ist nicht generell indiziert; bei der nekrotisierenden Verlaufsform wird die Gabe empfohlen. Unbestritten ist die antibiotische Therapie bei nachgewiesener Infektion von Nekrosen und Pseudozysten, bei Abszessen und Cholangitiden, da mit deren Auftreten die Letalität sprunghaft ansteigt [2, 8, 9].

Bei klinischem, laborchemischem oder radiologischem Hinweis auf eine Infektion von Nekrosen wird die sonographische bzw. CT-gestützte Feinnadelpunktion derselben empfohlen. Bei positivem Keimnachweis ist eine chirurgische Sanierung mittels Nekrosektomie mit anschließender Lavage in Erwägung zu ziehen, bei Nachweis von sterilen Nekrosen wird ein konservatives Vorgehen empfohlen [2, 8, 9].

Die akute nekrotisierende Pankreatitis (ANP) kann aus den genannten Gründen eine intensivmedizinische Betreuung des Patienten notwendig machen [8]. Es gilt mögliche systemische Komplikationen, die neben den Nekrosen einen weiteren Hauptfaktor der hohen Mortalität der ANP darstellen, zu eruieren und zu behandeln. So wird z.B. bei assoziiertem Nierenversagen eine Nierenersatztherapie, bei ARDS eine kontrollierte Beatmung des Patienten erforderlich.

1.2 Sauerstoffradikalbildung und Lipidperoxidation, sowie deren Bedeutung für die Pathogenese der akuten Pankreatitis

Viele Faktoren tragen zu dem komplexen Inflammationsprozess in der Genese der akuten Pankreatitis bei. Die bisherigen Forschungsergebnisse zeigen, dass oxidativer Stress dahingehend einen Hauptfaktor darstellt. Es zeigten sich erhöhte Konzentrationen von Sauerstoffradikalen und im Verlauf erhöhte Lipidperoxidationsprodukte in den entsprechenden Gewebe- und Plasmaproben [10-16]. Als Quellen der Radikale werden vor allem die Xanthinoxidase, das Cytochrom-Oxygenasen-System und die Enzyme stimulierter Entzündungszellen vermutet [13]. Die Aktivitätsbestimmung der Radikale erfolgt indirekt durch Messung der beiden antioxidativen Enzyme Gluthation-Peroxidase (GSH-Px) und Superoxiddismutase (SOD), welche physiologische Protektoren hinsichtlich der Toxizität der Radikale darstellen [13, 14, 17], aber auch direkt durch die Messung der so genannten Thiobarbitursäure-reaktiven Metaboliten (TBARS), einem Produkt der Lipidperoxidation [16]. Da diese antioxidativen Enzymmechanismen limitiert sind, kann es durch zunehmenden Anstieg der Radikale zur Ausschöpfung dieses Systems kommen, d.h. es kommt vermutlich zu einem Radikalanstieg ohne kompensatorischen Anstieg der antioxidativen Enzyme [10, 11, 18].

Freie Radikale können mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (FS) von Zellmembranen, intrazellulären Organellen und Endothelien interagieren und besitzen die Potenz zur Oxidation von Proteinen [19]. Daraus kann eine schwere Störung im molekularen Zellgefüge resultieren [11, 12, 15, 20]. So trägt die beschriebene Destruktion bzw. Peroxidation der Zellmembranen und intrazellulären Organellen dazu bei, den für die intrazelluläre Aktivierung der Proenzyme in den Azinuszellen des Pankreas notwendigen Sekretionsblock der Zymogene zu fördern [13, 21].

Radikale stimulieren in polymorphkernigen Leukozyten (PMN-Leukozyten) u. a. die Expression von Adhäsionsfaktoren, was zum einen zur Anheftung und Verlegung von Kapillaren, zum anderen zur Gewebsinfiltration durch dieselbigen führt. Hierdurch wird wiederum die Entstehung einer Mikrozirkulationsstörung mit folgender morphologischer Veränderung des Gewebes begünstigt [12, 15, 22].

Freie Radikale jeglicher Herkunft können Enzyme der Inflammationskaskade induzieren, die wiederum den Abbau der membranbildenden Phospholipide im Rahmen

der Inflammatorienproduktion fördern. So wirken sie u. a. auf die Phospholipase A₂ (PLA₂), die Cyclooxygenase (COX) und 5-Lipoxygenase (5-LOX), welche Schlüsselenzyme der Eikosanoidsynthese darstellen; weiterhin können Radikale mit Transkriptionsfaktoren (z. B. Nukleärer Faktor kappa B (nF-κB)) interagieren, die wiederum die Synthese von Interleukinen (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF) und weiterer Zytokine in entsprechenden Zellen der humoralen Immunabwehr steigern [13, 14].

Die genannten Mechanismen und deren Aktivitätsgrad bestimmen den Verlauf der Pankreatitis.

1.3 Funktion von Fettsäuren und die spezielle Bedeutung von n-3-Fettsäuren

FS besitzen vielfältige und wichtige Funktionen im menschlichen Metabolismus. Sie sind u. a. Energielieferanten, dienen als Kohlenstoffquelle für Synthesen, sind Bausteine von Membranen und stellen die Ausgangssubstanz für die Synthese von Prostaglandinen (PG) und Leukotrienen (LT) dar. Man klassifiziert FS anhand ihrer molekularen Struktur, d.h. anhand der Anzahl ihrer Kohlenstoffatome, der Anzahl der Doppelbindung und deren Stellung in Bezug zum Methylrest der Kohlenstoffkette. Bedeutung erlangten sie durch eine Studie in den 1970er Jahren, in der eine Reduktion der Herzinfarkt-Mortalität durch erhöhte Fischölaufuhr bei Eskimos festgestellt wurde. Auch nachfolgende Studien haben diesen Effekt bestätigt [23]. Fischöl enthält einen hohen Anteil von mehrfach ungesättigten n-3-Fettsäuren (n-3-FS), vor allem Eicosapentaensäure (EPA(20:5)) und Docosahexaensäure (DHA(22:6)) [24].

Die de-novo-Synthese von n-3-FS ist durch die vorhandenen Enzymsysteme im menschlichen Organismus beschränkt, d.h. es können keine bzw. nur sehr wenige FS mit einer Doppelbindung zwischen dem neunten Kohlenstoffatom und dem Methylende der FS synthetisiert werden. Chloroblasten von Algen, Pflanzen und einigen Pilzen sind aufgrund spezieller Elongasen, welche die Verlängerung der bestehenden Kohlenstoffkette bewerkstelligen, und Desaturasen dazu befähigt, diese mehrfach ungesättigten n-3-FS, deren letzte Doppelbindung vom Methylrest aus gesehen zwischen dem 3. und 4. C-Atom liegt, zu synthetisieren.

In den westlichen Industrienationen dominiert mit Blick auf die Ernährung die Aufnahme von n-6-FS (Linolsäure) gegenüber n-3-FS im Verhältnis 20:1 (empfohlenes Verhältnis 4:1) [25].

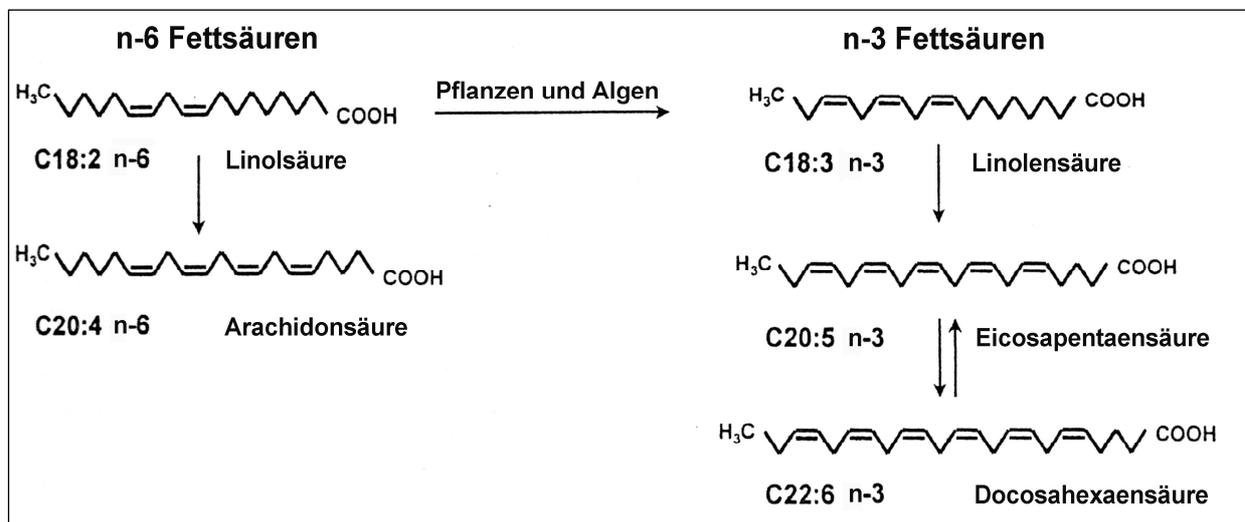


Abb.1: n-6- vs. n-3-FS-Synthese (modifiziert nach O'Keefe [23])

Zahlreiche Studien zeigen eine sehr vielfältige Wirkung der n-3-FS, welche u. a. durch deren Interaktion mit grundlegenden Mechanismen des Körpermetabolismus verursacht wird. Ein chronischer n-3-FS-Mangel äußert sich in Antriebslosigkeit, dermatologischen Auffälligkeiten und neurologischen Ausfallerscheinungen. Zudem stellen n-3-FS einen wichtigen Forschungsbereich innerhalb der Kardiologie (antiarrhythmisch durch Verlängerung der Refraktärphase), in der Behandlung der Psoriasis, bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, bei der rheumatoiden Arthritis und Asthma dar [23-31]. Dabei bestätigen die meisten Studien einen Vorteil durch EPA und DHA und sehen einen Grund dafür in der Veränderung der Inflammationsreaktion bzw. in der Produktion von weniger inflammatorischen bzw. antiinflammatorischen Mediatoren [25]. Weiterhin nehmen diese FS Einfluss auf die Synthese bzw. das Wirkprofil u. a. von vaskulärem Adhäsions-Molekül-1 (VCAM1), E-Selectin, interzellulärem Adhäsions-Molekül-1 (ICAM1), IL-6 und IL-8, TNF und nF-κB [27, 31-33].

In einer vorausgegangenen Studie, bei welcher n-3-FS als Therapeutikum bei einer induzierten ANP im gleichen Tiermodell eingesetzt wurde, beobachteten Kilian et al. nach 24 Stunden Versuchsdauer eine Verringerung des histopathologischen Schweregrades und der Lipidperoxidation [34].

1.4 Eikosanoide und deren Rolle im Inflammationsprozess

Das Wort „Eikosanoide“ (griech. Eikosa= zwanzig) steht für Metaboliten, die aus C20-FS über die PLA₂ letztendlich zu PG und LT synthetisiert werden können. Sie besitzen als auto- und parakrine Hormone vielfältige Funktionen [35, 36], die sich in der Komplexität ihrer Wirkungsweise in Abhängigkeit vom Ort und im Zusammenspiel mit anderen Inflammatoren widerspiegeln.

Radikale jeglichen Ursprungs stellen einen G-Protein-gekoppelten Induktor der PLA₂ dar. Diese katalysiert die Synthese von Arachidonsäure (AA, C20:6-FS) aus membranbildenden Phospholipiden. AA wird anschließend durch die COX über den Metaboliten PGH₂ zu den Prostaglandinen PGE₂, PGD₂, PGF_{1α} oder PGI₂ und Thromboxanen (TxA₂) bzw. durch die 5-LOX über den Metaboliten LTA₄ zu den Leukotrienen LTB₄, LTC₄, LTD₄ und LTE₄ umgesetzt. PG unterliegen einer nach Stimulation erfolgenden de-novo-Synthese, LT werden stattdessen präformiert in Vesikeln von PMN-Leukozyten, Mastzellen und Makrophagen gespeichert und bei Bedarf ausgeschüttet [35].

Von der COX sind zwei Isoenzyme bekannt: COX1, welche in nahezu allen Geweben und Zellen physiologisch exprimiert wird und der basalen Sekretion von PG zum Zwecke der Homöostase (u. a. renaler Elektrolyt- und Wasserhaushalt, Plättchenaggregation und Magenprotektion) dient und weiterhin die COX2, deren Induktion und Expression vor allem in entzündeten Geweben stattfindet und für die gesteigerte Produktion von proinflammatorischen PGs verantwortlich ist [35, 38, 39].

In der vorliegenden Studie wurde der Verlauf der Konzentrationen der PGE₂-, PGF_{1α}- und Cysteinyl-Leukotrien-Konzentrationen erfasst.

PGE₂ wird in nahezu allen Zellen synthetisiert. Die vielfältigen Wirkungen werden über vier Rezeptoren (EP1-4) vermittelt. Es wirkt u. a. aktivierend auf Osteoklasten, fiebermodulierend, vasodilatatorisch, dient der Magenschleimhautprotektion und steigert die Sekretion von Schleim und Bikarbonat.

PGF_{1α} wird aus PGI₂ (Prostacyclin) synthetisiert. Es ist ein starker, im Gefäßendothel gebildeter Vasodilatator, der zudem der Aggregation der Thrombozyten entgegen wirkt. PGF_{1α} stellt somit einen Gegenspieler des Thromboxans dar [40].

LT sind vor allem an entzündlichen und allergischen Reaktionen beteiligt. LTB₄ stellt einen potenten Aktivator der neutrophilen Chemotaxis und Leukozyten-Endothel-Interaktion dar [35], weiterhin fördert es die Degranulation lysosomaler Enzyme. Die Cysteinyl-Leukotriene (LTC, LTD, LTE) hingegen steigern u. a. die Kapillarpermeabilität, sind starke Bronchokonstriktoren und fördern das Sekretionsvolumen von Drüsen.

2 Fragestellung

Eine Vorstudie zeigte, dass die intravenöse Verabreichung von n-3-FS im Vergleich zu n-6-FS und n-9-FS bei der akuten hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis der Ratte die histopathologische Schädigung des Pankreas nach einem Beobachtungszeitraum von 24 Stunden nach Therapiebeginn mildert.

Weiterhin zeigte sich eine signifikant geringere TBARS-Konzentration nach Ablauf der Versuchszeit beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der n-3-FS-Gruppe. Sowohl die GSH-Px- als auch SOD-Aktivität der Verum- und Placebogruppen unterschieden sich nicht signifikant.

Aufgrund der Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die für den Verlauf der ANP ausschlaggebenden (n-3-FS-bedingten) biochemischen Veränderungen bereits zu früheren Zeitpunkten stattgefunden hatten bzw. die Parameter sich bei Versuchsende bereits wieder in einer Art Gleichgewicht befanden [34].

Unklar blieb dabei jedoch, zu welchem Zeitpunkt der ANP der Ratte Veränderungen in der Lipidperoxidation und im Eikosanoidstoffwechsel auftreten und welcher Art diese Veränderungen sind. Weiterhin war anhand der Vorstudie keine Aussage darüber möglich, ob eine n-3-FS-reiche Infusionstherapie bereits zu frühen Zeitpunkten in der Genese der ANP einen Einfluss auf den Verlauf hat.

In der vorliegenden Studie (Aktenzeichen: G0104/03; genehmigt am 24.11.2003) wurde nun sequentiell über einen Versuchszeitraum von bis zu 26 Stunden untersucht, wie und in welcher Art und Weise sich die frühzeitige Gabe einer n-3-FS-reichen Infusionstherapie, gemessen an dem Verlauf der Radikal-, Eikosanoidkonzentrationen und histopathologischen Veränderungen, auf den Verlauf der ANP auswirkt.

3 Material und Methoden

3.1 Tiermodell

3.1.1 Behördliches Aktenzeichen und Datum der Genehmigung

Aktenzeichen: G0104/3; Versuchsantrag genehmigt am 24.11.2003 durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin.

3.1.2 Haltung der Versuchstiere

198 männliche Sprague-Dawley-Ratten, jeweils mit einem Gewicht von 340-360g (Harlan-Winkelmann, Deutschland), wurden unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur $21 \pm 5^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $70 \pm 10\%$, 10 Luftwechsel pro Stunde, 12 Stunden Hell-/Dunkelrhythmus) in Gruppen von 5 Tieren pro Käfig gehalten; mit freiem Zugang zu Rattenstandardfutter (Altrumin GmbH, Deutschland). Präoperativ waren die Tiere für 12 Stunden nüchtern, der freie Zugang zu Wasser wurde jedoch gestattet. Vor Versuchsbeginn akklimatisierten sich die Tiere 3-5 Tage lang.

3.1.3 Gruppeneinteilung

Jeder der 11 Versuchsgruppen gehörten 18 Tiere an. Jedes Tier erhielt unmittelbar postoperativ, nach Randomisierung der Gruppenzugehörigkeit, eine sechsstündige Infusion mit Caerulein ($5\mu\text{l}/\text{kg}/\text{KG}$) im Rahmen der Pankreatitisinduktion. Anschließend wurden die Tiere der Gruppe 1 getötet und dienten als Pankreatitis-Induktionskontrolle. Die Tiere der Gruppen 2-11 erhielten entweder eine E153-Infusion mit 1 ml/h (Serumwerk Bernburg, Deutschland), oder eine OmegavenTM-Infusion mit ebenfalls 1 ml/h (Fresenius AG, Deutschland) über einen entsprechend der Gruppenzugehörigkeit definierten Zeitraum. Die maximale postoperative Versuchsdauer inklusive der Pankreatitisinduktion entsprach 26 Stunden, d.h. die maximale Infusionsdauer von E153 oder OmegavenTM betrug 20 Stunden.

Pankreatitis-Induktion	Gruppe 1	-	-	-	-	-
E153-Infusion	-	Gruppe 2	Gruppe 4	Gruppe 6	Gruppe 8	Gruppe 10
Omegaven™-Infusion	-	Gruppe 3	Gruppe 5	Gruppe 7	Gruppe 9	Gruppe 11
Postop. Versuchsende E153 / Omegeven™ i.v.	6 h	10 h 4 h	14 h 8 h	18 h 12 h	22 h 16 h	26 h 20 h

Tab.1: Versuchsdauer und Infusionsschema entsprechend Gruppe

Gr. 1: Pankreatitis-Induktionskontrollgruppe:

Keine Therapie, Versuchsbeendigung 6 Stunden postoperativ

Gr. 2,4,6,8,10: Elektrolyt-Infusion-Vergleichsgruppen:

Pankreatitis, Elektrolytinfusion, sequentielle Versuchsbeendigung 10,14,18,22, 26 Stunden postoperativ

Gr. 3,5,7,9,11: n-3-Fettsäure-Infusion-Gruppen:

Pankreatitis, n-3-FS-Infusion, sequentielle Versuchsbeendigung 10,14,18,22, 26 Stunden postoperativ

Postoperative Infusionsregime:

- Sofortige postoperative Caerulein-Infusion über 6 Stunden (5µl/kg/KG)
- E153- bzw. Omegeven™-Infusion in Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit (Infusionsdauer über 4,8,12,16,20 Stunden nach Pankreatitis-Induktion; Näheres siehe 3.3.1: Allgemeines Vorgehen)

3.1.4 Ausschlusskriterien

Folgende Kriterien führten zum Ausschluss eines Tieres aus der Studie:

- intraoperativer Tod
- Unmöglichkeit der Sondierung des Ductus pancreaticus
- Perforation des Ductus pancreaticus
- Intraductaler Druckanstieg während der Glycodesoxycholsäure (GDOC)-Infusion über 22 mmHg
- Unmöglichkeit der Gesamtapplikation der GDOC-Dosis
- Tod während der gesamten postoperativen Phase

3.2 Infusionslösungen

100ml Omegaven™ enthalten:

Zusätzlich enthaltene Antioxidants: dl-rac- α -Tocopherol 0,015-0,0296g

Eicosapentaensäure	C20:5 ω -3	1,25-2,82g
Docosahexaensäure	C22:6 ω -3	1,44-3,09g
Tetradecansäure	C14:0	0,1-0,6g
Palmitinsäure	C16:0	0,25-1g
Palmitolensäure	C16:1 ω -7	0,3-0,9g
Stearinsäure	C18:0	0,05-0,2g
Ölsäure	C18:1 ω -9	0,6-1,3g
Linolsäure	C18:2 ω -6	0,1-0,7g
Linolensäure	C18:3 ω -3	\leq 0,2g
Octadecatetraensäure	C18:4 ω -3	0,05-0,65g
Eikosaensäure	C20:1 ω -9	0,05-0,3g
Arachidonsäure	C20:4 ω -6	0,1-0,4g
Docosaensäure	C22:1 ω -9	\leq 0,15g
Docosapentaensäure	C22:5 ω -3	0,15-0,45g
Glycerol		2,5g
Lecithin aus Eiern		1,2g

Tab. 2: Zusammensetzung Omegaven™ laut Hersteller Fresenius AG, Deutschland

1000ml E153-Lösung enthalten:

Natrium	140 mmol/l
Kalium	5 mmol/l
Calcium	2,5 mmol/l
Magnesium	1,5 mmol/l
Chlorid	104,5 mmol/l
Acetat	50 mmol/l

Tab. 3: Zusammensetzung E153
laut Hersteller Serumwerk Bernburg AG,
Deutschland

3.3 Operationsverfahren und Pankreatitisinduktion

3.3.1 Allgemeines Vorgehen

Die Tiere erhielten im Rahmen der Narkose eine intraperitoneale Pentobarbital-Injektion von insgesamt 45 mg/kg/KG und eine intramuskuläre Injektion mit 45 mg/kg/KG Ketamin. Nach Erreichen der gewünschten Narkosetiefe wurden die Tiere cervical und abdominal, im Bereich des rechten Oberbauches, rasiert, gewogen und die Operationsgebiete anschließend desinfiziert.

Nach Lagerung auf einem beheizbaren OP-Tisch erfolgte ein linkscervicaler anteriorer, paramedianer Hockeyschlägerschnitt mit distaler Verlängerung von ca. 2 cm Gesamtlänge. Anschließend erfolgte die Präparation der Vena jugularis interna. Der nach dorso-lateral getunnelte nuchal ausgeleitete Katheter (B. Braun, Melsungen) wurde nun in die präparierte Vene eingebracht und das OP-Gebiet anschließend versorgt, verschlossen (Prolene 4-0) und desinfiziert. Von außen erfolgte der Katheterschutz mit Hilfe einer Metallhülse, welche durch zwei Nähte (Vicryl 3-0) im Nacken fixiert wurde.

Daraufhin erfolgte eine mediane, supraumbilikale Längslaparotomie mit nachfolgendem Aufsuchen der Pars descendens duodeni. Nun wurde der Ductus pancreaticus transduodenal mit einer 24G-Flexüle (Abott GmbH, Wiesbaden) kanüliert und der Ganginhalt für drei Minuten entleert. Anschließend wurde der Ductus hepaticus communis mit einer Bulldog-Klemme abgeklemmt und das Pankreassekret für weitere zwei Minuten abgelassen. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte eine zweiminütige Instillation

von 10mmol/l GDOC (Sigma), welches in Gly-Gly-NaOH-Puffer entsprechend gelöst war, über eine 24G periphere venöse Kanüle mit Hilfe eines volumengesteuerten Perfusors (6 ml/h kg/KG) mit Druckalarm (20 mmHg) in den Ductus pancreaticus. Im Anschluss wurde die Bulldog-Klemme entfernt, die periphere venöse Kanüle zurückgezogen, wobei die duodenale Perforationsstelle elektrokoaguliert und der Darm rückverlagert wurde. Daraufhin folgte schichtweise der Verschluss des Peritoneums, der Muskulatur und der Haut mit je einer Naht (Vicryl 3-0, Prolene 4-0). Abschließend erfolgten eine erneute Desinfektion des Operationsgebietes und die Rückverlagerung des Tieres in einen Käfig.

3.3.2 Postoperatives Management

Jedes Tier wurde postoperativ in einen Einzelkäfig rückverlagert und erhielt im Rahmen der Pankreatitis-Induktion eine unmittelbar beginnende Caerulein-Infusion (1 ml/h; 5µg/kg/h; Gesamtdosis 10µg) über 6 Stunden, welches in physiologischer Kochsalzlösung gelöst war [41]. Nach der Caerulein-Infusion wurden die Tiere der Gruppe 1 getötet, die Tiere der Gruppen 2 bis 11 erhielten jeweils, entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit, entweder eine Infusion mit E153 (1ml/h) oder mit Omegaven™ (1ml/h) über die entsprechend der Gruppenzugehörigkeit festgelegte Zeitdauer (siehe 3.1.3).

3.3.3 Versuchsbeendigung, Obduktion und Probengewinnung

Abschließend wurden die Tiere entsprechend ihrer jeweiligen randomisierten Gruppen-Versuchsdauer getötet (200 mg/kg/KG Pentobarbital i.v.). Es erfolgte eine Laparatomie des Abdomens in Form eines umgedrehten Y und die Eröffnung des Thorax zur makroskopischen Beurteilung des Situs, weiterhin die Kontrolle hinsichtlich einer regelrechten Katheterlage. Anschließend wurde das Pankreas gezielt aufgesucht, entnommen und die benötigten Proben (Pars duodenalis und lienalis) für die histologische Aufarbeitung in 10%-ige Formalinlösung gegeben bzw. für die biochemische Aufarbeitung bei -80°C eingefroren.

3.4 Histologische Aufarbeitung und Untersuchung des Pankreasgewebes

Die bei der Obduktion gewonnenen Proben (jeweils eine Pars duodenalis und lienalis) wurden in beschriftete Gewebekapseln (Shandon, UK) gebettet und in Formaldehyd aufbewahrt. Diese wurden, nachdem sie per Automat (Histokinette 2000, Reichert-Jung, Deutschland) entwässert wurden, in eine Metallkassette (Shandon, UK) umgebettet und anschließend an einer Gießstation (TBS 88, Medite, Deutschland) in einen Paraffinblock (Merck, Deutschland) eingebettet. Nach Trocknung der Proben wurden aus diesen mit einem Rotationsmikrotom (HM 350, Microm, Deutschland) 2-3µm dünne, longitudinale Schichten aus zwei verschiedenen Gewebeschichten geschnitten und auf einen Objektträger (Menzel Gläser, Deutschland) im Paraffinbad (TFB35, Medite, Deutschland) aufgezogen. Daraufhin wurden die Objektträger bei 75°C für ca. 1 Stunde im Brutschrank (Modell 200, Memmert, Deutschland) getrocknet.

Zur Vorbereitung des Färbens wurden die beschichteten Objektträger nach Trocknung zweimalig für jeweils 5min in einem Xylolbad (Baker, NL) unter Abzug (Hyperclean, Shandon, UK) entparaffiniert. Anschließend erfolgte die Dehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (abs. Alkohol, 96% Alkohol, 80% Alkohol, 50% Alkohol, (Sigma Chem., UK)) und die Waschung in Aqua bidest. Die anschließende Färbung mit Eosin und Hämatoxylin (Merck, Deutschland) wurde in typischer Technik durchgeführt. Daraufhin erfolgte eine erneute Waschung in Aqua bidest. und die abschließende Entparaffinierung in aufsteigender Alkoholreihe mit abschließender Xylolbadung (s.o.). Zum Schluss wurden die Deckgläser (Menzel, Deutschland) auf das Präparat/ den Objektträger aufgebracht und fixiert. Die histologische Beurteilung der Schnitte wurde an einem Lichtmikroskop entsprechend dem Scoring-Schema von Schmidt et al. [41] durch drei geblindete Untersucher durchgeführt. Differierten die Scores um mehr als einen Punkt, so wurde ein vierter Untersucher hinzugezogen.

Score	Ödem	Azinus- nekrosen	Hämorrhagien + Fettgewebs- nekrosen	Entzündung + Perivaskuläres Infiltrat
0	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	0-1 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
0,5	Fokale Expansion der interlobulären Septen	Fokales Vorkommen von 1-4 nekrotischen Zellen/HPF	1 Fokus	2-5 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
1	Diffuse Expansion der interlobulären Septen	Diffuses Vorkommen von 1-4 nekrotischen Zellen/HPF	2 Foki	6-10 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
1,5	Wie 1 + fokale Expansion der interlobulären Septen	Wie 1 + fokales Vorkommen von 5-10 nekrotischen Zellen/HPF	3 Foki	11-15 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
2	Wie 1 + diffuse Expansion der interlobulären Septen	Wie 1 + diffuses Vorkommen von 5-10 nekrotischen Zellen/HPF	4 Foki	16-20 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
2,5	Wie 2 + fokale Expansion der interlobulären Septen	Wie 2 + fokales Vorkommen von 11-16 nekrotischen Zellen/HPF	5 Foki	21-25 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
3	Wie 2 + diffuse Expansion der interlobulären Septen	Wie 2 + diffuses Vorkommen von 11-16 nekrotischen Zellen/HPF	6 Foki	26-30 intralobuläre oder perivaskuläre Leukozyten/HPF
3,5	Wie 3 + fokale Expansion der interlobulären Septen	Wie 3 + fokales Vorkommen von >16 nekrotischen Zellen/HPF	7 Foki	>30 Leukozyten/HPF oder fokale Mikro-Abzesse
4	Wie 3 + diffuse Expansion der interlobulären Septen	>16 nekrotische Zellen/HPF (großflächig konfluierende Nekrosen)	≥8 Foki	>35 Leukozyten/HPF oder konfluierende Mikro-Abzesse

Tab.4: Histopathologisches Scoring nach Schmidt et al. [41] (High Power Field = 313)

3.5 Biochemische Aufarbeitung und Untersuchung des Pankreasgewebes

3.5.1 Homogenatherstellung

Die bei der Obduktion gewonnenen und unverzüglich bei -80°C eingefrorenen Proben, bestehend aus Pars duodenalis und lienalis, wurden im Rahmen der biochemischen Aufarbeitung mit Hilfe eines Ultraturrax Homogenisators (B.Braun GmbH, Deutschland) homogenisiert.

Für die Bestimmung der Aktivität von GSH-Px und SOD sowie der Konzentration der Eikosanoide wurde das Probenmaterial mit eiskaltem 0,1mol/l-Phosphatpuffer (Verhältnis Homogenisat/Lösung: 1/10Vol%) unter Kühlung 4 Mal je 15 Sekunden homogenisiert.

Für die Bestimmung der Lipidperoxidationsprodukte (TBARS) wurde das Probenmaterial mit 0,01% Butylhydroxyanisol enthaltender, eiskalter 140mmol/l-NaCl-Lösung (Verhältnis Homogenisat/Lösung: 1/10Vol%) unter Kühlung 4 Mal je 15min homogenisiert.

Die hergestellten Homogenate wurden bei -80°C gelagert und vor den Messungen jeweils 15 Sekunden mit einem Ultraschall-Homogenisator rehomogenisiert.

3.5.2 Proteinbestimmung

3.5.2.1 Prinzip

Die Proteinbestimmung wurde mit der Methode nach Lowry durchgeführt. Diese beinhaltet die Kombination der Biuret-Methode mit dem Folin-Reagenz. Die Grundlage der Biuret-Methode bildet ein violetter Farbumschlag in alkalischer Lösung bei Vorhandensein von mindestens zwei Peptidbindungen und Cu^{2+} -Ionen. Das Folin-Reagenz bewirkt die Reduktion von Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure zu Wolfram- bzw. Molybdänsäure unter Anwesenheit von Thyrosin und Tryptophan, welche an aromatische Seitenketten eines Kupferkomplexes gebunden sind.

Der Vorteil dieser Kombination besteht in einer höheren Sensitivität des Verfahrens; weiterhin wird nicht so umfangreiches Probenmaterial wie bei alleiniger Durchführung der Biuret-Methode benötigt.

3.5.2.2 Messung und Auswertung

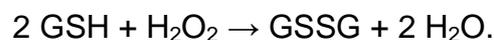
Vorab wurden 50ml Gebrauchslösung aus 49ml Na₂CO₃-Lösung, 0,5ml CuSO₄-Lösung und 0,5ml Na-K-Tartrat-Lösung hergestellt. Anschließend wurde das zu messende Gewebehomogenat 1:100 verdünnt, davon eine 20µl umfassende Probe entnommen, mit 180µl Aqua bidest. und 20µl 1N NaOH versetzt, 1,5ml Gebrauchslösung hinzugefügt und für 10min inkubiert. Daraufhin wurden unter starkem Schütteln 150µl des Folin-Reagenz hinzugegeben und für weitere 30min inkubiert. Die folgende Messung bei 750nm Wellenlänge wurde unter standardisierten Bedingungen (25°C Temperatur, 0,5cm Küvettschichtdicke, Leerwert als Vergleichsprobe) vorgenommen. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierfunktion.

3.5.3 Bestimmung der Gluthationperoxidase-Aktivität

Die GSH-Px-Aktivität wurde nach dem Prinzip von Paglia und Valentine bestimmt [42]. Hierfür wurde das Testkit RANSEL (Fa. Randox, UK) benutzt, in welchem das Reagenz (Gluthation+Gluthationreduktase+NADPH), ein 50mM Phosphat-EDTA-Puffer, 0,18mM Cumenhydroperoxid und Verdünnungsmittel enthalten waren.

3.5.3.1 Prinzip

Das Prinzip von Paglia und Valentine macht sich das Oxidationspotential der Gluthation-Peroxidase (GSH-Px) zunutze. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Gluthation (GSH) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, wobei oxidiertes Gluthation (GSSG) durch Ausbildung einer Disulfidbrücke und freies Wasser entstehen.



Durch Zugabe von Gluthation-Reduktase (GSSG-R) und NADPH wird das Gluthation-Molekül wieder reduziert und NADPH zu NADP⁺ oxidiert.



Die Abnahme der NADPH-Extinktion entspricht dabei der Aktivität der GSH-Px.

3.5.3.2 Messung und Auswertung

Die Leerwerte wurden wie folgt ermittelt: Pipettierung von 50µl Aqua bidest. + 500µl Reagenz + 20µl Wasserstoffperoxid.

Die Proben wurden wie folgt ermittelt: Pipettierung von 40µl Aqua bidest. + 10µl Probe + 500µl Reagenz + 20µl Wasserstoffperoxid.

Das Pipettieren erfolgte direkt in eine leere Meßküvette. Nach guter Durchmischung wurde unter standardisierten Bedingungen gemessen (340nm Wellenlänge, 3-minütige Inkubationszeit, 0,5cm Küvettschichtdicke, Temperatur 37°C, Luft als Vergleichsprobe).

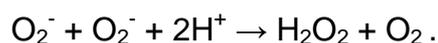
Als Grundlage wird das Lambert-Beer-Gesetz verwendet: $\Delta E = c \cdot d \cdot \epsilon$, wobei ΔE die Extinktionsänderung, c die Konzentration und d die Küvettschichtdicke darstellt. Der Wert des Extinktionskoeffizienten ϵ beträgt $6,22 \cdot 10^3$ l/mol*cm und ist konstant. Daraus ergibt sich zur Berechnung der Konzentration: $c = \Delta E / (d \cdot \epsilon)$. Die Ergebnisse wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

3.5.4 Bestimmung der SOD-Aktivität

Die Bestimmung der SOD-Aktivität erfolgte nach der Methode von Beauchamp und Fridovich [43]. Hierfür wurde das Testkit RANSOD (Fa. Randox, UK) benutzt, welcher als Mischsubstrat Xanthin und I.N.T. [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitro)-5-phenyltetrazoliumchlorid] sowie einem 50mM CAPS-EDTA-Puffer und Xanthinoxidase (80U/l) enthält.

3.5.4.1 Prinzip

Die SOD katalysiert die Dismutation von Sauerstoffradikalen zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid:



Der hier verwendete Testkit (RANSOD) basiert auf der Eigenschaft, dass Xanthin und Xanthinoxidase zur Bildung von Sauerstoffradikalen fähig sind, welche unter Zugabe von I.N.T. (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitro)-5-phenyltetrazoliumchlorid) zu einem roten Formazan-Farbumschlag führen. Somit kann die Aktivität der in den Proben enthaltenen

SOD über die Hemmung der beschriebenen Formazanreaktion bestimmt werden.

3.5.4.2 Messung und Auswertung

Die Leerwerte wurden wie folgt ermittelt: Pipettierung von 50µl Aqua bidest. + 340µl Mischsubstrat + 50µl Xanthinoxidase

Die Aktivität in den Proben wurde wie folgt ermittelt: Pipettierung von ≤49µl Probe + (50-Vol._{Probe}) µl Aqua bidest + 340µl Mischsubstrat + 50µl Xanthinoxidase.

Die Proben wurden mit Aqua bidest. solange verdünnt, bis die Messwerte zwischen 30 und 70%-iger Hemmung lagen. Das Pipettieren erfolgte direkt in eine leere Meßküvette. Nach guter Durchmischung wurde unter standardisierten Bedingungen gemessen (505nm Wellenlänge, 3 minütige Inkubationszeit, 1cm Küvettenschichtdicke, Temperatur 37°C, Luft als Vergleichsprobe).

Die Messwerte wurden als Änderung der Extinktion*10⁻³/min angegeben. Zur Bestimmung der prozentualen Hemmung der o.g. Formazanreaktion wurde folgende Gleichung verwendet:

$$\% \text{Hemmung} = 100 - [(\Delta E / \text{min}_{\text{Probe}}) / (\Delta E / \text{min}_{\text{Leerwert}}) * 100].$$

Zur Angabe der Aktivität in der Einheit „Units“ wurde definiert, dass 1U SOD-Aktivität einer 50%-igen Hemmung entsprechen soll. Die so erhaltenen Werte wurden auf mg Proteingehalt korrigiert.

3.5.5 Bestimmung der Lipidperoxidation

Für die Bestimmung der TBARS wurden folgende Chemikalien verwendet:

- Acetatpuffer (pH=3,5):
wurde aus 40%-iger analytisch reiner Essigsäure (Merck, Deutschland) mittels Zugabe von 5 N Natronlauge (Merck, Deutschland) auf einen pH von 3,5 eingestellt und auf das doppelte Volumen aufgefüllt
- SDS (Natriumdodecylsulfat):
8,1%-ige Lösung in Aqua dest. (Fa. Serva, Deutschland)
- BHA (3-tert-butyl-4-hydroxyanisol):
0,05mg/ml; Lösungsmittel: Ethanol-Wasser-Gemisch 1:1

- Malondialdehyd-Standard (modifiziert nach Esterbauer und Haberland):
10mMol Malondialdehydbisdiethylacetal wurden eine Stunde lang in 1%-iger Schwefelsäure inkubiert, um den säurekatalysierten Prozess der Hydrolyse weitgehend zu beenden.

3.5.5.1 Prinzip

Das Prinzip dieser Messung wurde von Ohkawa beschrieben [44]. Lipidperoxidationsprodukte bilden hierbei in Anwesenheit von Thiobarbitursäure (TBA) einen roten Polymethinfarbstoff, dessen Konzentration nach Ausfällung mit n-Butanol mittels Fluoreszenz-Messung bestimmt werden kann. Die reagierenden Lipidperoxidationsprodukte werden auch als so genannte TBARS bezeichnet. Die teilweise kritischen Aspekte dieser Methode im Hinblick auf Probengewinnung, -verwahrung und -aufarbeitung und zugleich die Spezifität dieses Testes sind bekannt [45]. Jedoch wird nach vorangegangenen Studien davon ausgegangen, dass artifizielle Veränderungen der TBARS-Konzentration durch strenge Standardisierung aller Arbeitsabläufe (z.B. sehr schnelles Einfrieren der Proben, Probenaufbewahrung in flüssigem Stickstoff, Homogenisierung und Analyse in Gegenwart von Antioxidantien) weitgehend vermieden werden können.

3.5.5.2 Messung und Auswertung

10µl Homogenat der Probe wurden mit Aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 150µl ergänzt, mit 300µl Acetatpuffer (pH=3,5), 40µl SDS und 300µl TBA versetzt und für 60min in 90°C warmen Wasser inkubiert. Nach 5-minütiger Abkühlung in Eiswasser wurden 200µl Aqua bidest. und 1ml n-Butanol hinzugefügt. Die Mixtur wurde nun 20min auf einen Rüttler gestellt und anschließend 10min bei 2000U/min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Messung in der überstehenden n-Butanol-Phase mit folgenden Parametern: 515nm Wellenlänge für Exzitation, 553nm Wellenlänge für Emission, 25°C Temperatur, 0,5cm Küvettschichtdicke, Leerwert als Vergleichsprobe. Die Auswertung erfolgte über eine Kalibrierfunktion.

3.5.6 Bestimmung der Eikosanoid-Konzentration

3.5.6.1 Allgemein

Die Bestimmung der Eikosanoide erfolgte mit Hilfe von kommerziellen ACE™ EIA-Testkits (Cayman Chemical, UK). Allen Kits gemeinsam sind mit polyklonalen IgG beschichtete Messplatten, freie monoklonale Antikörper des zu messenden Eikosanoids, ein entsprechend des zu messenden Eikosanoids vorgefertigter Acetylcholinesterase (AChE)-Eikosanoid-Tracer und weitere, für die Messung benötigte, Chemikalien.

3.5.6.2 Prinzip

Das Kit nutzt als Grundlage die Konkurrenz von zu messendem Eikosanoid der Probe und dem vorgefertigten, in der Konzentration bekanntem, Eikosanoid-AChE-Tracer um freie, in ihrer Konzentration ebenfalls bekannte, monoklonale Eikosanoid-Antikörper. Diese wiederum binden an polyklonale Anti-Maus IgGs, die sich auf der Messplatte befinden. Nach Pipettierung der monoklonalen Eikosanoid-AK in die vorgesehenen Kammern, anschließender Inkubation (18 Stunden, PG bei +4°C, LT bei +25°C) derselbigen mit der Probe und dem Tracer und anschließender Waschung, wird die Konzentration des gebundenen Tracers bestimmt. Dies erfolgt mit Hilfe des Ellman's Reagenz, welches Acetylthiocholin und 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzeosäure) enthält. Die an den Tracer gebundene AChE hydrolysiert die Spaltung von Acetylthiocholin zu Thiocholin. Thiocholin wird in Anwesenheit von 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzeosäure) nicht-enzymatisch zu 5-thio-2-nitrobenzeosäure umgewandelt. Das entstandene Produkt hat sein Absorptionsmaximum bei 412nm. Die Intensität der Absorption entspricht dabei der Konzentration des gebundenen Tracers.

3.5.6.3 Messung und Auswertung

Da sowohl die Gesamtkonzentration des monoklonalen Eikosanoid-AK als auch die Konzentration des hinzugefügten Tracers bekannt sind, stellt sich die gesuchte Eikosanoid-Konzentration der Probe nun wie folgt dar:

$$\text{Absorption} \sim \text{gebundener Eikosanoid-Tracer} \sim 1/(\text{Eikosanoid-Konz.}).$$

D. h., die Eikosanoid-Konzentration der Probe ist umgekehrt proportional zu der gemessenen Konzentration des Tracers, welche sich durch Messung der Intensität der Absorption bei 405nm mit Hilfe des Plattenreader MRX TC Revelation (Dynex Technologies, USA) darstellt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Standardkurven, die jeweils unter gleichen Bedingungen erstellt wurden und dem Vergleich von Abweichungen dienten.

Um probenspezifische Interferenzen auszuschließen wurden jeweils von einer Probe fünf Testsubstrate in drei verschiedenen Verdünnungen zwischen 10 und 200 pg/ml hergestellt und gemessen. Die Ergebnisse korrelierten hierbei gut und differierten um weniger als 20%, so dass keine Probenreinigung nötig war.

3.5.7 Weitere verwendete Geräte

Die photometrische Bestimmung der GSH-Px- und SOD-Aktivitäten wurde mit Hilfe des UV-VIS Scanning Spectrophotometer (UV-2101 PC, Shimadzu, Japan) durchgeführt. Die Bestimmung der TBARS-Konzentration erfolgte mittels Spectrophotometer RF-5001 PC (Shimadzu, Japan).

Weiterhin wurden folgende Geräte verwendet:

- Rüttler (Labortechnik Ilmenau, Deutschland),
- Zentrifuge T23 (Janetzki, Polen),
- Homogenisator Omni International 2000 (Digitana, Schweiz),
- Ultrahomogenisator Labsonic 1510 (B. Braun, Deutschland),
- Laborwaage Sartorius excellence (Sartorius, Deutschland).

3.6 Statistische Berechnungen

Sämtliche Werte (wenn nicht anders angegeben) wurden als Median und Range angegeben. Bei kontinuierlichen Daten erfolgte ein Test auf Normalverteilung nach Shapiro und Francia.

Alle Parameter waren nicht normalverteilt, so dass die Mittelwertvergleiche zwischen den Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test erfolgten.

Bei Ablehnung der globalen Nullhypothese fanden die folgenden Einzelvergleiche zwischen den Gruppen als Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung der α -Fehlerkumulierung statt.

Kategorielle Daten wurden angesichts der kleinen Umfänge mit Fisher's-Exakt-Test verglichen.

Das Signifikanzniveau wurde grundsätzlich mit 95% ($p < 0,05$) festgelegt. Alle Berechnungen fanden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 11.0[®] für WindowsXP[®] statt.

4 Ergebnisse

4.1 Letalität

Es starben 2 Tiere der Gr. 1 (11%), weiterhin 3 Tiere in den Gr. 2-4 (17%), 1 Tier in Gr. 5 (6%), 2 Tiere in Gr. 6 (11%), 4 Tiere in Gr. 7 (22%), 7 Tiere in Gr. 8 (39%), 3 Tiere in Gr. 9 (17%) und 4 Tiere in Gr. 10 (22%). In Gruppe 11 verstarb keines der Tiere.

4.2 Inzidenz der Pankreatitis

Alle Tiere der Gruppen 1 bis 11 zeigten sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch Zeichen einer Pankreatitis unterschiedlichen Schweregrades.

4.3 Histologischer Schweregrad der Pankreatitis im zeitlichen Verlauf

4.3.1 Pankreatitis-Induktions-Kontrollgruppe (Gr. 1)

Der histopathologische Score der Tiere der Gruppe 1 stellte den Ausgangswert nach Pankreatitisinduktion (GDOC + 6h Caerulein) ohne anschließende E153- bzw. n-3-FS-Infusion dar. Der Median der histologischen Schädigung betrug 9,5 [7-12] (Abb. 4).

4.3.2 E153-Infusion-Vergleichsgruppen (Gr. 2,4,6,8,10)

Die Tiere, welche nach Pankreatitisinduktion eine zeitbegrenzte Infusion einer E153-Lösung erhielten, zeigten im Vergleich zur Gruppe 1 einen signifikant erhöhten histopathologischen Schweregrad ($p < 0,05$). Bei Vergleich der einzelnen Elektrolyt-Gruppen untereinander waren jedoch keine zeitabhängigen signifikanten Unterschiede (Gr. 2: 11,5 [7-15]; Gr. 4: 11,0 [8-16]; Gr. 6: 10,75 [5-13]; Gr. 8: 11,0 [7,5-14]; Gr. 10: 11,5 [4-15]; Abb. 4) festzustellen.

4.3.3 n-3-FS-Infusionsgruppen (Gr. 3,5,7,9,11)

Die nach Pankreatitisinduktion begonnene Infusion einer n-3-Fettsäurereichen Infusion (Omegaven™) reduzierte den histopathologischen Schweregrad signifikant von der 14. Stunde (Gr. 5: 8,0 [4-12]) bis zur 26. Stunde im Vergleich mit entsprechenden E153-

therapierten Gruppen (Gr. 7: 8,0 [5-10]; Gr. 9: 7,0 [1,5-9]; Gr. 11: 6,0 [3-9]; $p < 0,05$; Abb. 4).

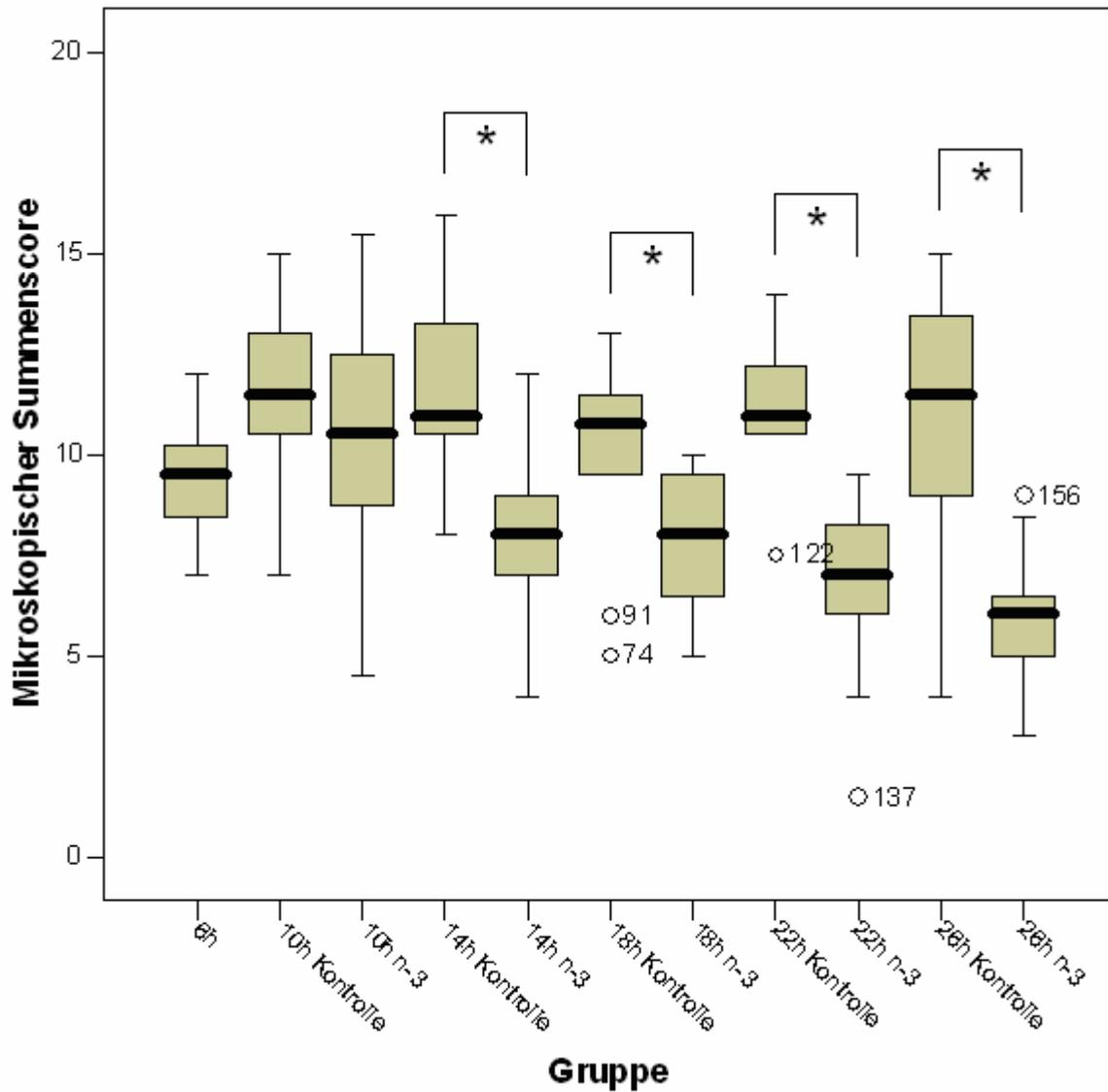


Abb. 4: Mikroskopischer Summenscore, Boxplots, * $p < 0,05$ vice versa

4.4 Biochemische Parameter im zeitlichen Verlauf

4.4.1 GSH-Px Aktivität

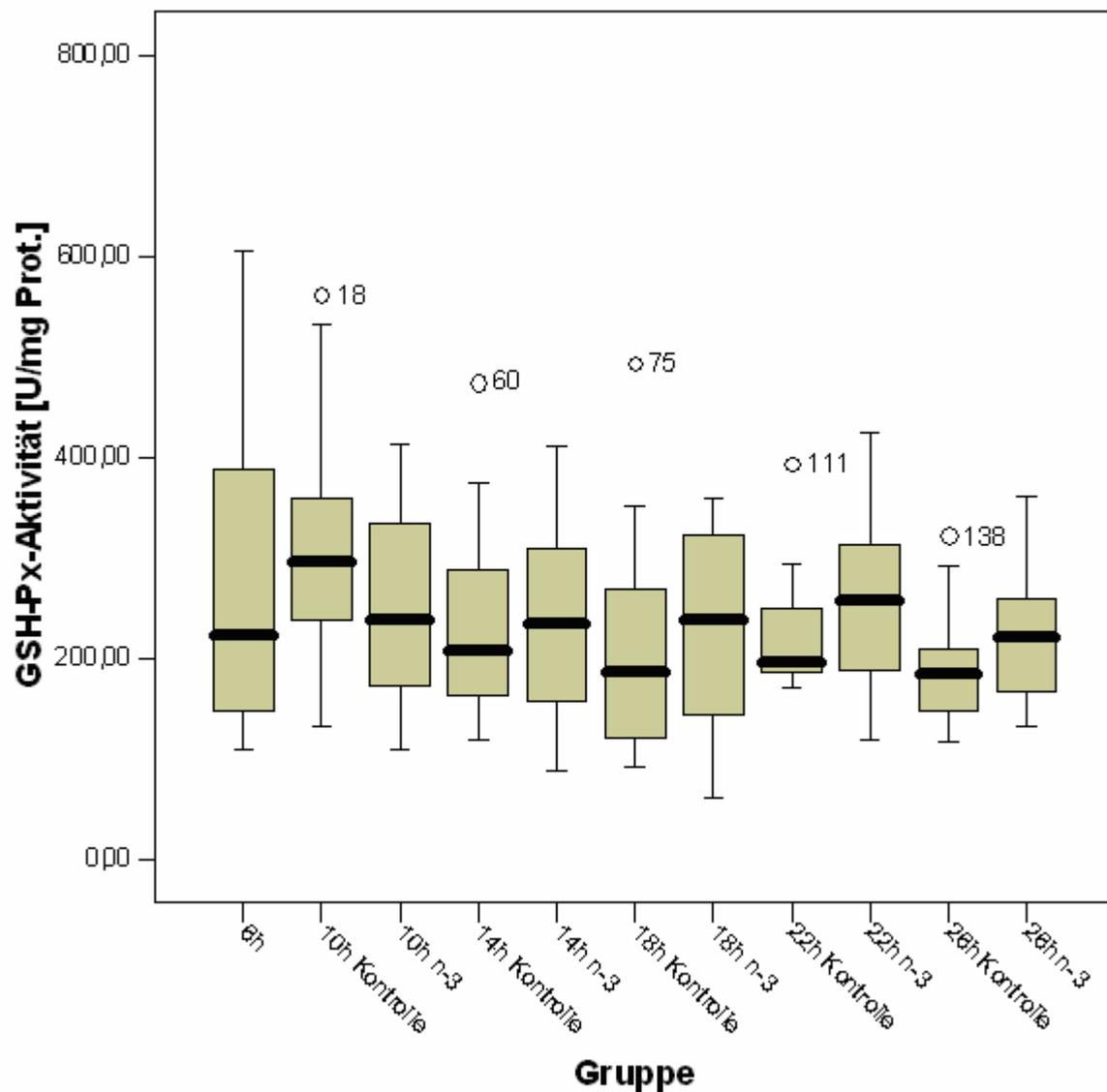


Abb. 5: GSH-Px-Aktivität, Boxplots

Es zeigten sich keinerlei signifikante Unterschiede im Verlauf der GSH-Px-Aktivität bei einem Vergleich aller Gruppen (Abb. 5).

4.4.2 SOD-Aktivität

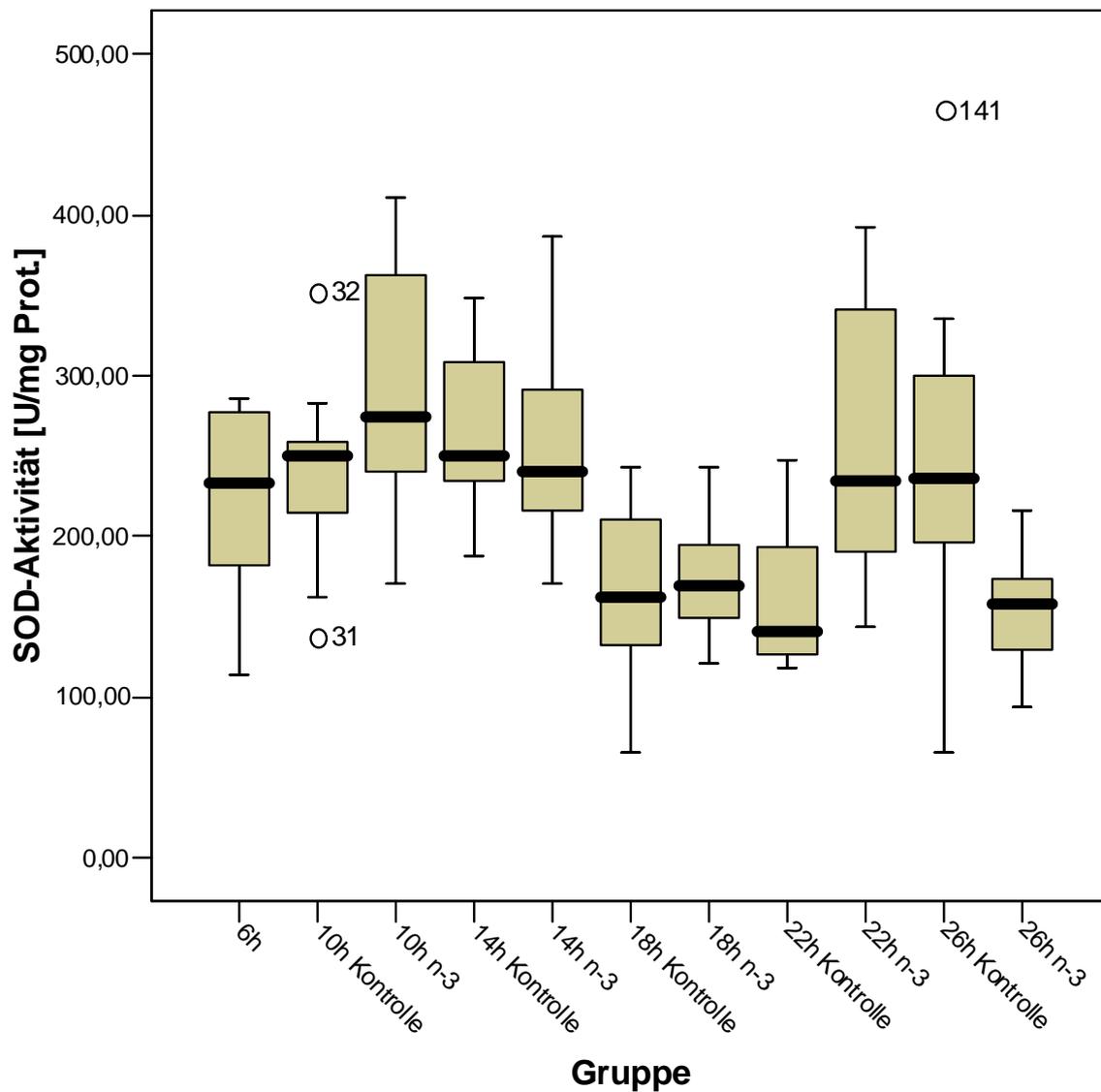


Abb. 6: SOD-Aktivität, Boxplots

Die Aktivität der SOD unterschied sich nicht signifikant im Vergleich zwischen korrespondierender Verum- und Placebogruppen und der Gruppe 1. Die höchste SOD-Aktivität zeigte sich bei n-3-therapierten Tieren nach 10h Versuchszeit (Gr. 3: 274,05 [171,23-410,43] U/mg Prot.), die niedrigste SOD-Aktivität bei E153-therapierten Tieren nach 22h Versuchszeit (Gr. 8: 141,35 [118,16-247] U/mg Prot.; Abb. 6).

4.4.3 TBARS-Konzentration

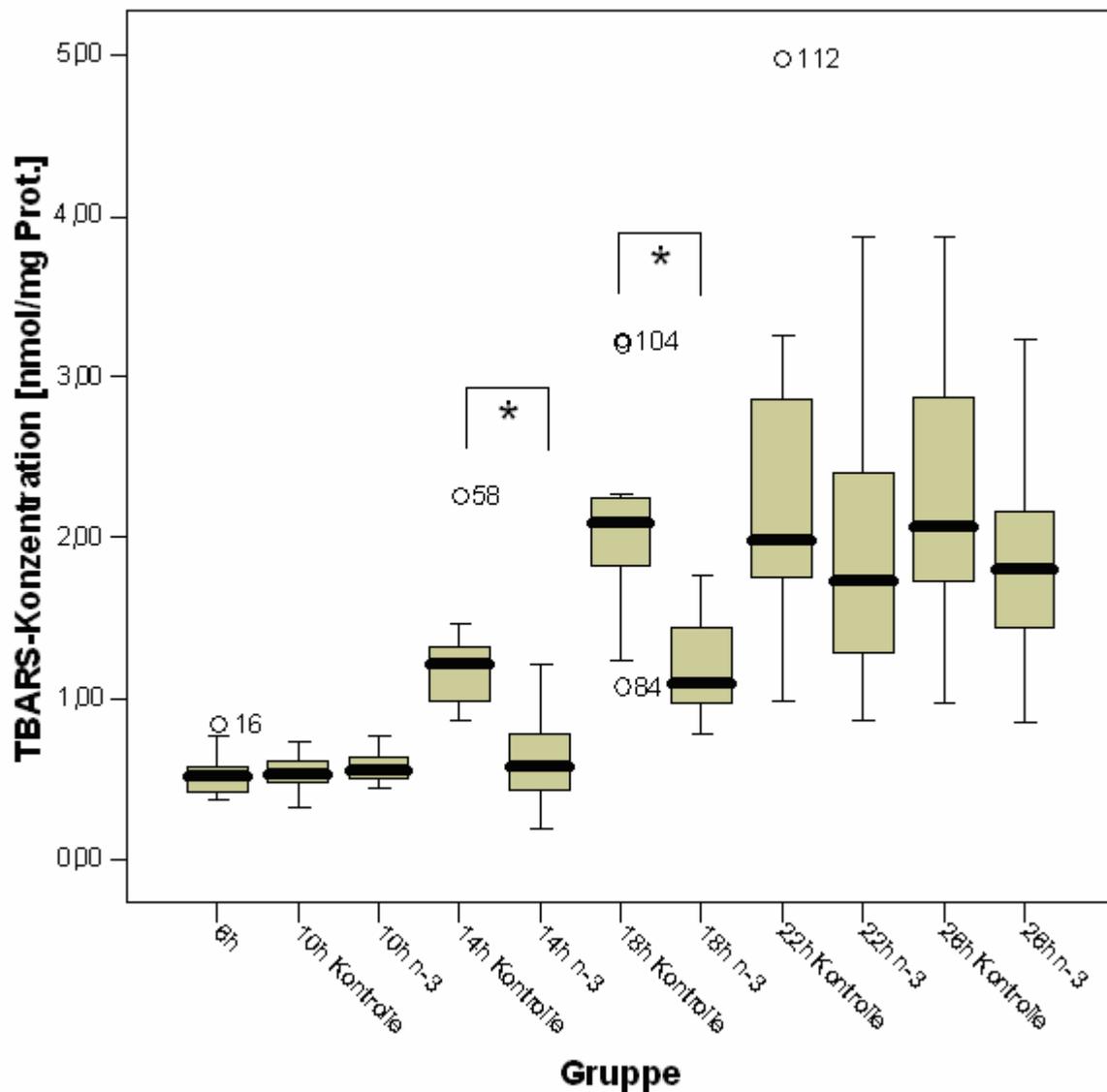


Abb. 7: TBARS-Konzentration, Boxplots, * $p < 0,05$ vice versa

Die Konzentration der TBARS stieg kontinuierlich in beiden zu vergleichenden Therapiegruppen ab der 14. Stunde an. Nach 10h Versuchsdauer zeigte sich in beiden Versuchsgruppen kein Unterschied verglichen mit der Pankreatitis-Induktions-Kontrollgruppe (Gr. 1). Beim Vergleich korrespondierender E153- und n-3-FS-therapierter Gruppen zeigte sich in den n-3-FS-therapierten Gruppen eine signifikant

geringere TBARS-Konzentration zur 14. (Gr. 5 vs Gr. 6) und zur 18. Stunde (Gr. 7 vs Gr. 8; Abb. 7).

4.4.4 PGE₂-Konzentration

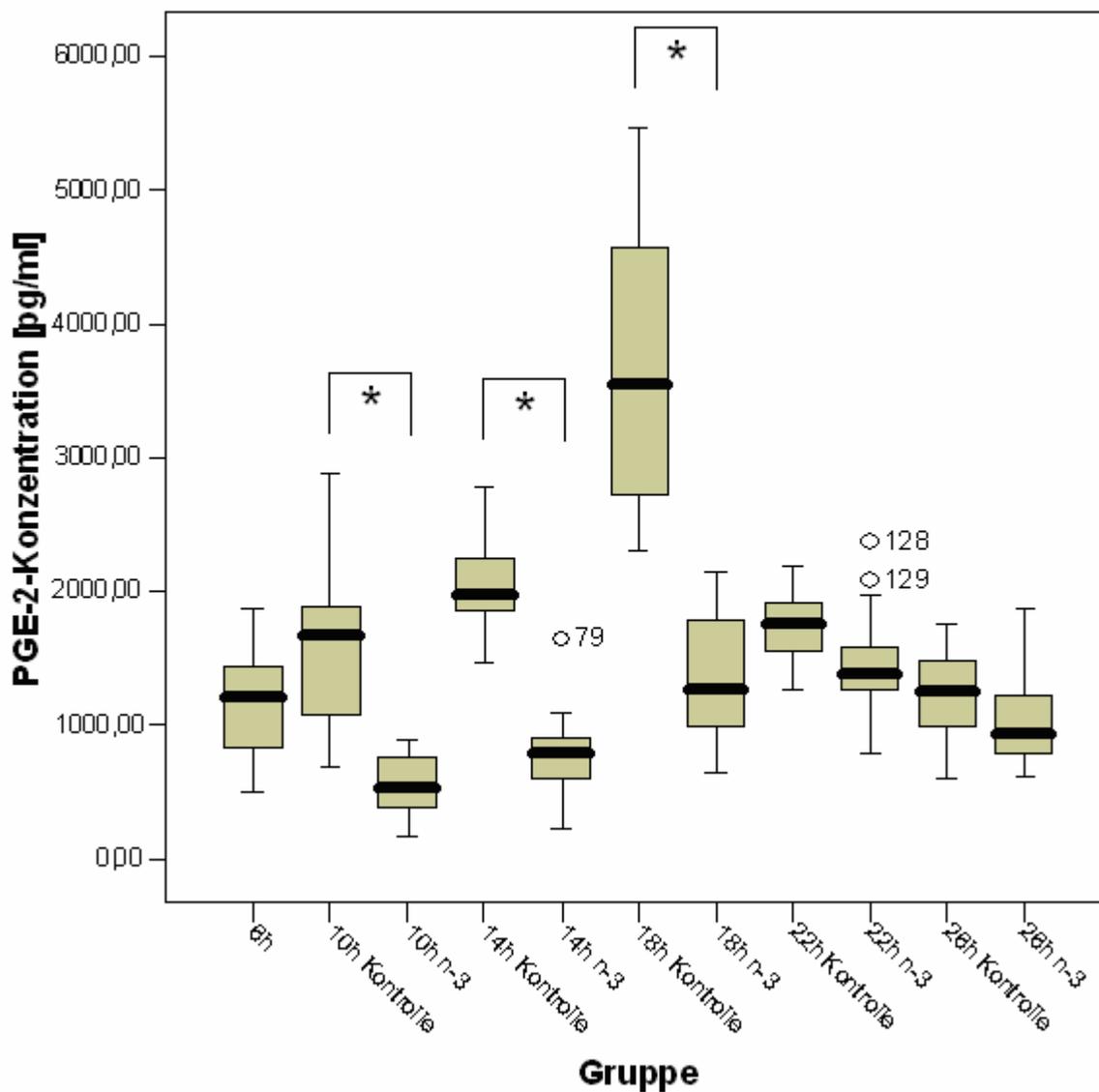
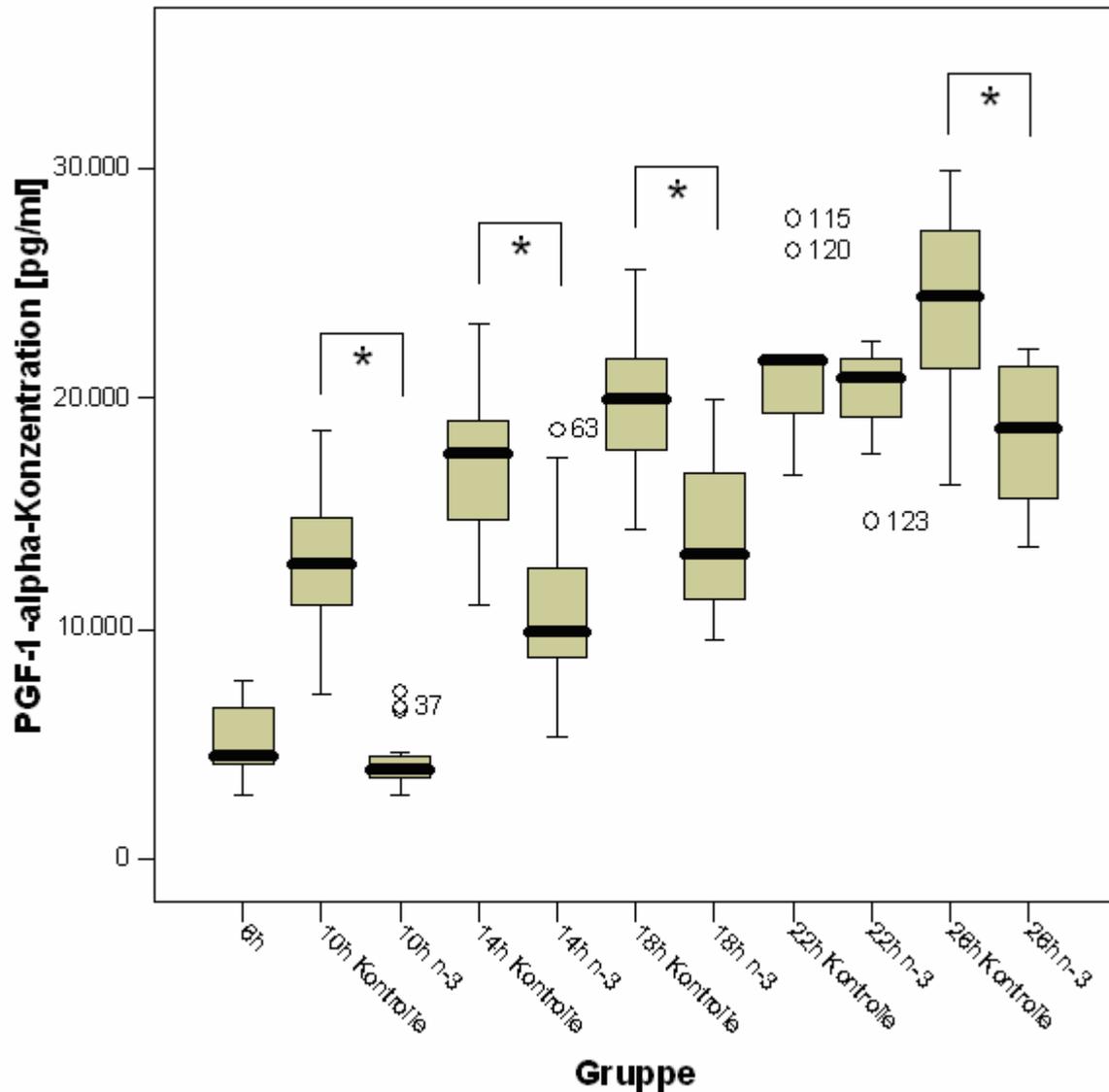


Abb. 8: PGE₂-Konzentration, Boxplots, * p<0,05 vice versa

Die PGE₂-Konzentration veränderte sich signifikant im Verlauf der Pankreatitis im Gruppenvergleich zwischen der 10. und 18. Stunde. Der Medianwert der Pankreatitis-Induktions-Kontrollgruppe (Gr. 1) war 1202,5 (492-1878) pg/ml. Die PGE₂-Konzentration

stieg in den E153-therapierten Gruppen (Gr. 2, 4, 6) von 1673 (684-2887) pg/ml (Gr. 2) auf 3554 (2300-5463) pg/ml (Gr. 6) an. Dies stellte gleichzeitig die höchste im Versuchsverlauf gemessene PGE₂-Konzentration dar. Im Vergleich der n-3-FS-therapierten Gruppen zeigten sich Werte beginnend bei 528 (168-880) pg/ml (Gr. 3) im Verlauf ansteigend auf 1253,5 (646-2151) pg/ml (Gr. 7). Die PGE₂-Konzentrationen in den n-3-FS-Gruppen stiegen deutlich später, langsamer und nicht so sprunghaft wie in den entsprechenden E153-Gruppen an (Abb. 8).

Nach der 22. Stunde sanken die anfangs bestehenden hohen PGE₂-Level in beiden Gruppen wieder, ohne sich jedoch signifikant in der Geschwindigkeit des Abfalls voneinander zu unterscheiden (Abb. 8).

4.4.5 PGF_{1α}-KonzentrationAbb. 9: PGF_{1α}-Konzentration, Boxplots, * p<0,05 vice versa

Die PGF_{1α}-Konzentration in der Gruppe 1 betrug 4473,5 (2784-7716) pg/ml, welche in der E153-therapierten Gruppe weiter anstieg und sich signifikant von der 10. (12764 [7209-18634] pg/ml (Gr. 2) vs. 3835 [2829-7262] pg/ml (Gr. 3)) bis zur 18. Stunde (19875 [14321-25634] pg/ml (Gr. 6) vs. 13206 [9479-19873] pg/ml (Gr. 7)) und nochmals zur 26. Stunde (24372 [16233-29874] pg/ml (Gr. 10) vs. 18744 [13542-22134] pg/ml (Gr. 11)) von der entsprechenden n-3-FS-Gruppe unterschied.

In den n-3-therapierten Gruppen erfolgte der Anstieg der $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentration zeitlich später als in den entsprechenden E153-Gruppen. Weiterhin zeigte sich zur 10. Stunde verglichen mit Gruppe 1 ein niedrigerer $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Wert (Gr. 1 vs. Gr.3) (Abb. 9).

4.4.6 Leukotrien-Konzentration

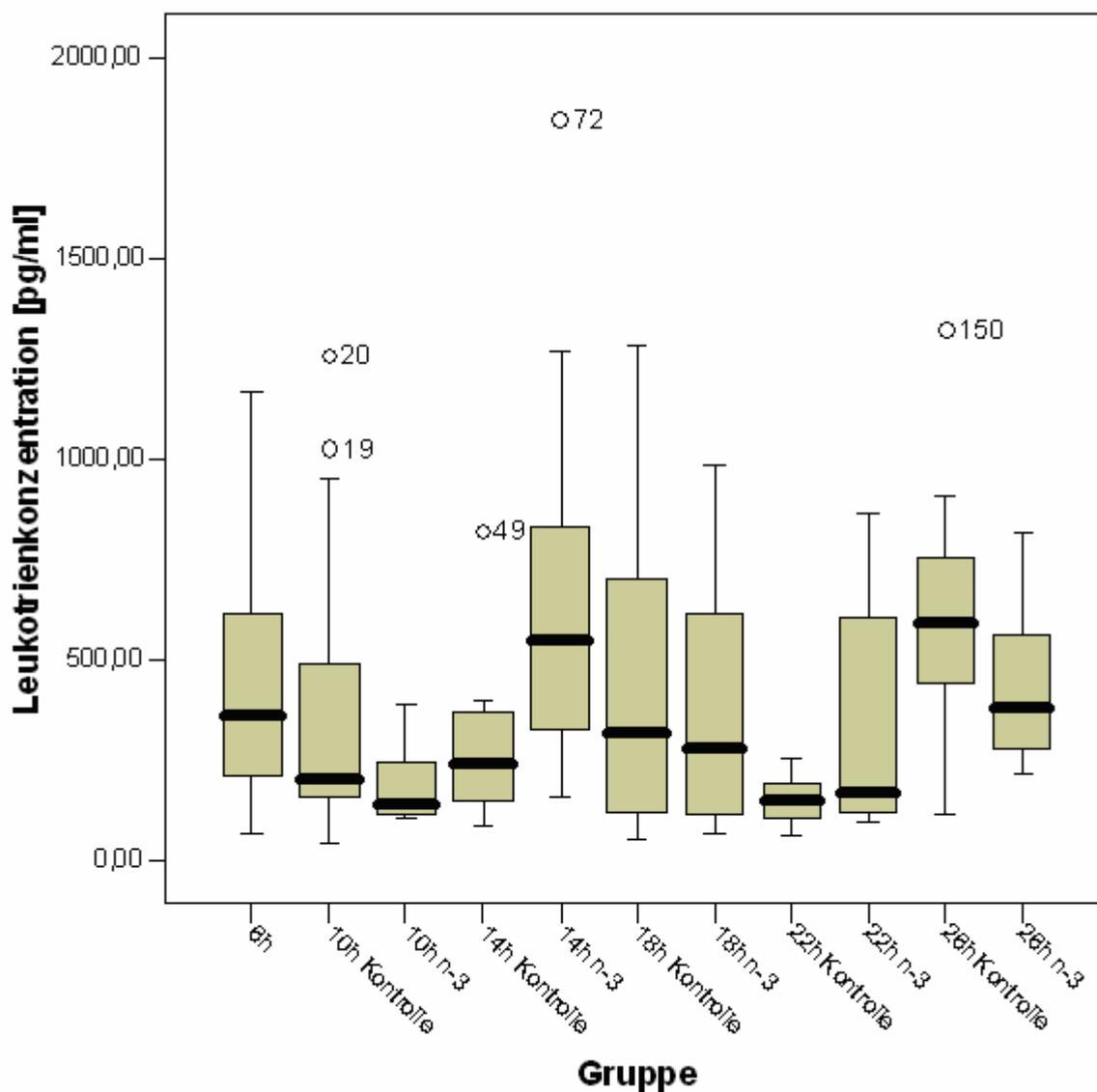


Abb. 10: Leukotrien-Konzentration, Boxplots

Der Verlauf der Leukotrien-Konzentration sowohl entsprechender Gruppen als auch im Vergleich mit der Gruppe 1 zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 10).

5 Diskussion

Die Erkenntnisse der letzten zwanzig Jahre haben dazu beigetragen, ein komplexes Modell hinsichtlich der Genese der akuten Pankreatitis mit resultierenden therapeutischen Optionen zu entwickeln.

Ziel dieser Studie war die Erlangung von Kenntnissen im Hinblick auf die Auswirkung einer parenteralen, sequentiell beendeten n-3-FS-Applikation auf den Verlauf der ANP der Ratte.

5.1 N-3-Fettsäuren: Studienlage

N-3-FS nehmen einen wachsenden Stellenwert in aktuellen Forschungsansätzen ein. Sie zeigen positive Effekte in vielen Forschungsbereichen, was ihren vielfältigen Wirkungen bzw. Wirkungsweisen zugeschrieben wird. Diese werden u. a. durch Interaktion mit zellulären Membranen, durch Veränderungen der Synthese von Eikosanoiden und Zytokinen, durch Einflussnahme auf die Synthese bzw. den Aktivitätsgrad von Komponenten des Signaltransduktionssystems und durch Einfluss auf die Genexpression verursacht [31, 32, 46-48].

In einer Vorstudie konnte gezeigt werden, dass im Tiermodell der akuten hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis die parenterale Applikation von n-3-FS sowohl den histopathologischen Schaden, als auch das Ausmaß der Lipidperoxidation signifikant reduzierte [34]. Aufgrund des verwendeten Studiendesigns konnte jedoch keine Aussage hinsichtlich des Zeitpunktes und der Ursache der Veränderungen gemacht werden.

In einer prospektiv randomisierten kontrollierten klinischen Studie von Lasztity et al. erhielt ein Teil der Patienten mit einer akuten Pankreatitis eine mit n-3-FS angereicherte enterale Ernährung per Jejunalsonde, was zu einer kürzer notwendigen enteralen Versorgung, weniger pankreatitisassoziierten Komplikationen und einer kürzeren Hospitalisationsdauer führte [49].

Foitzik et al. beschreiben unter einer parenteralen n-3-FS-Therapie bei der AP der Ratte eine vermehrte Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen und daraus resultierend einen verminderten Schweregrad der möglichen assoziierten Komplikationen wie SIRS oder ARDS [50].

5.2 N-3-Fettsäuren und Radikalstoffwechsel

Schon in den 1980er Jahren beschrieben u. a. Sanfey et al. die Schlüsselrolle der Sauerstoffradikale in der Genese der akuten Pankreatitis, wobei sie eine Milderung des Verlaufes der ANP durch Gabe von Antioxidantien nachweisen konnten [51]. Auch später folgende Studien beschrieben die vorrangige Bedeutung von Radikalen im Verlauf der ANP [10, 11, 13-17].

Die Bildung von Radikalen wird im Verlauf u. a. durch den für die Genese der Pankreatitis vermutlich notwendigen Sekretionsblock der intrazellulär in Zymogenen gespeicherten Proenzyme, z. B. Trypsinogen, gefördert. Urnuela et al. beschrieben diesbezüglich die Möglichkeit von Azinuszellen die Konzentration von Radikalen direkt und/ oder indirekt durch Aktivierung intrazellulärer Proteasen zu steigern [10]. Grady et al. vermuteten aufgrund ihrer Ergebnisse, dass die intrazelluläre Aktivierung und zugleich Retention von Zymogenen bzw. aktivierter Enzyme eine Voraussetzung für den zellulären Schaden der pankreatischen Azinuszellen darstellt [21]. Jungermann et al. wiesen diesbezüglich eine Zerstörung von intrazellulären Transportfilamenten (Actin und β -Tubulin) als Folge nach [20]. Weiterhin führt die Interaktion von Sauerstoffradikalen mit den Lipiden der Zellmembranen zu einer Zunahme der Lipidperoxidationsprodukte [11], was wiederum mit einer Destabilisierung und somit einer Minderung der physiologischen Funktion von Zellmembranen einhergeht.

In der vorliegenden Studie bestätigt sich bei Betrachtung des Verlaufes der GSH-Px-, SOD-Aktivitäten und der TBARS-Konzentrationen die These, dass Radikale in der Genese und dem Verlauf der ANP eine entscheidende Rolle spielen.

Die GSH-PX- und SOD-Aktivitäten unterscheiden sich weder signifikant im zeitlichen Verlauf innerhalb der n-3-FS-Gruppen noch im Vergleich mit entsprechenden E153-Gruppen. Lediglich ein leichter Abfall der antioxidativen Enzyme SOD und GSH-Px ist zu verzeichnen; dem könnte eine Erschöpfung der enzymatischen Systeme zugrunde liegen. Auch in anderen Studien findet sich diese Erschöpfung der Enzymsysteme im zeitlichen Verlauf der akuten Pankreatitis [10, 11]. Der von Arab et al. in einer aktuellen Studie gezeigte antioxidative Effekt von n-3-FS in humanen Fibroblasten durch Induktion der Gamma-Glutamyl-Cysteinyl-Ligase und Gluthation-Reduktase [52] kann in der vorliegenden Studie bei Betrachtung des Verlaufes der GSH-Px-Aktivitäten nicht

bestätigt werden, was seinen Grund u. a. in den differenten Studienmodellen haben könnte.

In der vorliegenden Studie findet sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes in den n-3-FS-Gruppen eine geringere TBARS-Konzentration im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgruppen. Zwischen der 14. und 18. postoperativen Stunde ist dieser Unterschied signifikant, was auf eine geringere Peroxidation von Lipiden in den n-3-FS-Gruppen hinweist.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die genannten Schutzenzyme nicht die einzigen Schutzmechanismen hinsichtlich Lipidperoxidation in diesem Tiermodell darstellen.

Eine n-3-FS-Therapie bedingt u. a. eine veränderte n-3:n-6-Ratio des plasmatischen als auch zellmembranständigen Phospholipidpools zugunsten der n-3-FS [26, 53, 54]. Somit kann postuliert werden, dass n-3-FS eine geringere Vulnerabilität im Hinblick auf Oxidation aufweisen, was den oben beschriebenen Verlauf der TBARS-Konzentrationen der n-3-FS-Gruppen direkt erklären würde. Diese These wird durch die Arbeit von Applegate et al. unterstützt, welcher in einem Computermodell zeigte, dass FS mit zunehmender Anzahl von Doppelbindungen nach Einbau in Membranen weniger vulnerabel aufgrund einer Veränderung ihrer räumlichen Konformation sind und somit die Möglichkeit der Oxidation durch Radikale stark gemindert wird [55].

Eine weitere Möglichkeit die geminderten Peroxidationsprodukte zu erklären wäre indirekt über eine Hemmung der Inflammationsreaktion, da eine n-3-FS-Therapie eine gesteigerte Bildung von weniger inflammatorischen Eikosanoiden und Zytokinen bedingt [50], was in der Folge wiederum mit einer Minderung des oxidativen Stresses einhergeht. Mori et al. zeigten in einer Studie an hypertensiven Typ-2-Diabetikern, dass mit der Gabe von n-3-FS eine Reduktion des oxidativen Stresses, gemessen an der renalen F2-Isoprostan-Ausscheidung, einhergeht, welches ein Prostaglandin-ähnliches Produkt der radikalbedingten Peroxidation von AA darstellt [56].

Eine signifikant geringere TBARS-Konzentration wurde auch in einer Studie von Yeh et al. gesehen, in welcher u. a. die Auswirkung einer totalen parenteralen n-3-FS-Therapie mit der einer NaCl-Therapie über eine Zeitdauer von sieben Tage verglichen wurde [57]. Die gleiche Aussage erbrachte die bereits beschriebene Vorstudie, in welcher sich eine signifikant geringere TBARS-Konzentration bei der ANP der Ratte unter n-3-FS-Therapie nach 24 Stunden zeigte [34].

Ausgehend von der signifikant geringeren TBARS-Konzentrationen der n-3-FS-Gruppen in der vorliegenden Studie könnte die Beobachtung von Arab et al. [52], welche nicht durch den Verlauf der GSH-Px-Aktivitäten in der vorliegenden Studie bestätigt werden konnte, dann doch dahingehend unterstützt werden, dass eben diese Induktion der Gamma-Glutamyl-Cysteinyl-Ligase und der Gluthation-Reduktase sich durch die Minderung der TBARS in dem hier verwendeten Tiermodell ausdrückt.

In der Literatur wird jedoch nicht nur die Möglichkeit einer Minderung, sondern auch keiner Veränderung [58] bzw. einer Steigerung [59] des oxidativen Stresses unter n-3-FS-Therapie in Abhängigkeit verschiedener Parameter wie Applikationsform, Dosierung, untersuchte Gewebe/ Enzymsysteme/ Zellen, etc. beschrieben.

Die vorliegende Studie zeigt hinsichtlich des Verhaltens von Enzymaktivitäten und Radikalkonzentration unter einer n-3-FS-Therapie einen deutlich gemilderten Verlauf. Eine direkte Interaktion mit der GSH-Px bzw. SOD konnte nicht nachgewiesen werden, ein indirekter Effekt kann vermutet werden. Der Verlauf der TBARS-Konzentrationen im Vergleich zeigt einen deutlichen Effekt unter n-3-FS-Therapie, so dass der antioxidative Effekt der n-3-FS ausgehend von dieser Studie bestätigt werden kann.

5.3 N-3-Fettsäuren und Eikosanoidstoffwechsel

Eine der Konsequenzen der Bildung von Radikalen ist die Aktivierung eines primär lokalen Inflammationsprozesses, wobei es u. a. zur Aktivierung der PLA₂ kommt. Dieses cytosolisch und auch plasmatisch vorliegende Schlüsselenzym des Abbaus von membranständigen Phospholipiden zu AA katalysiert die Eingangsreaktion der Eikosanoidproduktion. Im folgenden Prozess kommt es zur Aktivierung der COX und 5-LOX, den Schlüsselenzymen der Prostaglandin- bzw. Leukotrien-Synthese.

N-3-FS entfalten ihre Wirkung u. a. durch eine Veränderung der entstehenden Eikosanoide, welche biologisch weniger aktiv sind [23, 26]. N-3-FS konkurrieren mit n-6-FS um die Aufnahme in den Phospholipidpool zellulärer Membranen, was zu einer Veränderung der n-3:n-6-Ratio führt [26, 53, 54]. Von den in maritimen Organismen vorkommenden n-3-FS EPA (20:5) und DHA (22:6) ist bekannt, dass sie die Synthese von PG der 2er Serie und LT der 4er Serie vermindern und stattdessen die Synthese von PG der 3er Serie und LT der 5er Serie begünstigen. Letztere sind im Vergleich zu

ersteren biologisch weniger aktiv und weisen partiell antiinflammatorische Eigenschaften auf [25, 26].

5.3.1 Prostaglandine

Zu Beginn der Inflammationsreaktion kommt es zu einer gesteigerten Aktivität der COX1, welche physiologisch in nahezu allen Geweben bzw. Zellen exprimiert wird und der Homöostase dient. Deren Produkte, aber auch anhaltender oxidativer Stress und im Rahmen der Inflammation gebildete Zytokine, bedingen dann eine zeitverzögerte Induktion der COX2 [35, 60]. Dies führt zu einer massiven Steigerung der Synthese von PG und trägt somit zum Ausmaß der Inflammation bei. Erkennbar wird dies in der vorliegenden Studie bei Betrachtung der PGE₂- und PGF_{1 α} -Konzentrationen der E153-Kontrollgruppen zwischen der 10. und 18. Stunde.

5.3.1.1 PGE₂

PGE₂ steigert via positiven Feedback-Mechanismus seine eigene Produktion (Auto-Induktion), indem es zum einen die COX2, zum anderen aber auch die PLA₂ stimuliert [61-63]. In einer Vorstudie konnte durch selektive COX2-Blockade die PGE₂-Konzentration nach 24h signifikant gesenkt werden (Kilian et al., in Veröffentlichung). Diese massive Freisetzung von PG fördert wiederum die Bildung von weiteren lokalen und humoralen Inflammatoren, was den Inflammationsprozess weiter aufrecht erhält und verstärkt.

Betrachtet man entsprechende n-3-FS-Gruppen, so sieht man eine signifikant geringere PGE₂-Konzentration zwischen der 10. und 18. Stunde. Der Anstieg erfolgt im Vergleich zeitlich später, weniger steil und erreicht nicht die Konzentrationen der entsprechenden Vergleichsgruppen.

Der signifikant geringere PGE₂-Spiegel in den n-3-FS-Gruppen könnte auf eine inhibitorische Funktion der n-3-FS im Rahmen der Prostaglandin-Synthese zurückzuführen sein. Studien haben dies dahingehend bestätigt, als dass die Induktion der PLA₂ und COX durch PGE₂ um ein Vielfaches stärker als durch PGE₃ erfolgt [61-63]. Bagga zeigte eine schwächere Induktion der COX2 und damit konsekutiv geringere

Produktion von PG in Fibroblasten durch PGE₃ im Vergleich zu PGE₂. Als mögliche Gründe für die differente Wirkung werden zum einen eine unterschiedliche Rezeptoraffinität, zum anderen eine unterschiedliche Halbwertszeit der beiden PG diskutiert [64].

Weiterhin kann der geringe PGE₂-Spiegel auch durch eine verminderte de-novo-Synthese von PGE₂ bedingt sein, da nicht ausreichend n-6-FS, sondern n-3-FS zur Verfügung stehen. N-3- und n-6-FS konkurrieren nachgewiesenermaßen um die Integration in den Phospholipidpool der Zellmembran und folglich indirekt um die Metabolisierung zu Eikosanoiden [54]. Somit würde der PGE₃-Anteil überwiegen, welcher aufgrund des verwendeten PG-Messkits (100% PGE₂, jedoch nur zu 43% PGE₃) nicht eindeutig erfasst worden wäre.

Trotz allem kann unter Berücksichtigung des histopathologischen Scores und aufgrund von Vorstudien davon ausgegangen werden, dass PGE₃ bzw. eine n-3-FS-Therapie einen geringeren inflammatorischen bzw. ödematösen Effekt als PGE₂ bzw. n-6-FS hat. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Portanova überein, welcher u. a. einen geringeren ödematösen und inflammatorischen Effekt durch selektive Blockade von PGE₂ mittels eines spezifischen Antikörpers im Tiermodell feststellte [65]. Hawkes et al. beschreiben nach Injektion von PGE₃ in die Pfote von Mäusen eine 33%-ige Reduktion des resultierenden Ödems im Vergleich zu einer PGE₂-Injektion [66].

Die PGE₂-Konzentration der Elektrolytgruppen erreicht ihre Spitze zur 18. Stunde, gefolgt von einem steilen Abfall bis zur 22. Stunde, was auf eine Erschöpfung der membranständigen Phospholipidressourcen hindeuten könnte. Die daraus resultierende parenchymatöse Destruktion wird durch einen stetigen Anstieg des histopathologischen Scores in den Elektrolytgruppen ab der 18. postoperativen Stunde bestätigt.

5.3.1.2 PGF_{1α}

PGF_{1α} (= aktiver Metabolit des Prostacyclin/ PGI₂) ist ein starker, vor allem im vaskulären Endothel gebildeter Vasodilatator, welcher weiterhin der Aggregation von Thrombozyten entgegenwirkt [67].

In den n-3-FS-therapierten Gruppen fand sich im Vergleich mit den Elektrolytgruppen ein signifikant geringerer PGF_{1α}-Spiegel zwischen der 10. und 18. Stunde, ebenso zur

26. Stunde. Der Anstieg in den n-3-FS-Gruppen erfolgte verzögert, gleiche Konzentrationen finden sich lediglich zur 22. Stunde (Gr. 8, 9). Einer der Gründe für die verringerten $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentrationen in den n-3-FS-Gruppen könnte die inhibierte Autoinduktion der COX durch PGE_3 sein.

Die in den n-3-FS-therapierten Gruppen gemessenen, niedrigeren $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentrationen könnten zu dem geringeren histopathologischen Score dadurch beigetragen haben, dass die vasodilatative und antiaggregatorische Aktivität des $\text{PGF}_{1\alpha}$ aufgrund einer geringeren Synthese supprimiert war. In der Literatur wird kein Unterschied hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit zwischen dem aus n-6-FS synthetisierten PGI_2 und dem aus n-3-FS synthetisierten PGI_3 beschrieben – jedoch zeigen die synthetisierten Thromboxane, die Gegenspieler der Prostacycline, eine unterschiedliche biologische Wirksamkeit [67], wodurch der vasodilatatorische und antiaggregatorische Effekt des PGI_3 indirekt durch Minderung des „Gegenspielers“ stärker in den Vordergrund tritt.

Der ausgeprägt schwere histopathologische Score in den Kontrollgruppen kann zum Teil durch das Wirken des $\text{PGF}_{1\alpha}$ und PGE_2 bedingt sein, da beiden, wie bereits genannt, eine vasodilatative Komponente zugrunde liegt. Wie einleitend beschrieben spielt auch eine Störung der Mikroperfusion eine entscheidende Rolle im Verlauf der akuten Pankreatitis [12]. So kann nach Primärschädigung, d.h. nach Destruktion intra- und interzellulärer Strukturen [20, 21], eine u. a. durch Eikosanoide bedingte vaskuläre Reperfusion das Gewebeödem unterhalten bzw. dessen Zunahme begünstigen. Weiterhin zeigte eine In-vitro-Studie von Colgan et al. die Möglichkeit des endothelial sezernierten $\text{PGF}_{1\alpha}$, auf parakrinem Weg über einen basolateralen epithelialen Rezeptor der intestinalen Mucosa die Chloridsekretion und damit verbundene Flüssigkeitsverschiebungen zu fördern [68]. Somit könnte das Prostacyclin nicht nur durch eine endokrin bedingte Reperfusion, sondern auch durch eine parakrin bedingte Stimulation der Acinuszelle zur Progression des Ödems, welches in den histopathologischen Score eingeht, beitragen. Weiterhin könnte es über diesen parakrinen Weg zur Autodigestion der Acinuszellen des Pankreas beitragen, da es die Sekretion von Pankreasenzymen fördert, jedoch im apikalen Bereich der Acinuszelle ein Sekretionsblock vorliegt. Dieser Punkt könnte somit einen weiteren Faktor in der

Genese und eine interventionelle Option in der Behandlung der Pankreatitis darstellen, welchen es in folgenden Studien zu eruieren gilt.

5.3.2 Leukotriene

Die Leukotrien-Konzentration zeigt beim Vergleich korrespondierender Gruppen bzw. auch im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede. Demnach könnte postuliert werden, dass unter der n-3-FS-Infusionstherapie zwar eine selektive COX-Hemmung stattfindet, die Lipooxygenaseaktivität jedoch unbeeinflusst bleibt.

Eine Möglichkeit zur Klärung dieses Effektes wäre, dass die PG einer de-novo-Synthese unterliegen, die LT dagegen präformiert gebildet werden [35]. Das wiederum bedeutet, dass bei einer maximalen Versuchsdauer von 26 Stunden lediglich die präformierten LT ausgeschüttet werden und der Synthese von LT aus n-3-FS noch keine Bedeutung zukommt. Ein Weg dies zu untersuchen wäre die Etablierung bzw. Nutzung eines Tiermodelles, welches eine längere Versuchsdauer gestattet.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Studie könnte die Vermutung geäußert werden, dass LT nicht primär für den lokalen Inflammationsprozess maßgebend sind, sondern eher systemische Komplikationen induzieren bzw. ihre Wirkung längerfristig ist. Dies wird bei Betrachtung der histologischen und biochemischen Parameter der Verum- und Placebogruppen im Vergleich dahingehend bestätigt, dass die lokale Inflammation und der histologische Schaden bei nicht signifikant unterschiedlicher Leukotrien-Konzentrationen entsprechend gleicher Zeit in den n-3-FS-Gruppen reduziert werden und dieser lokale Wirkmechanismus in diesem Zusammenhang und ausgehend von den Ergebnissen dieser Studie den PG zugerechnet werden kann.

Hall et al. zeigten in einer Studie an stimulierten Neutrophilen von Hunden eine unter n-3-FS-Therapie um das 7,6-fache gesteigerte LTB_5 -Konzentration und ein um das 8,3-fach gesteigerte LTB_5 - LTB_4 Verhältnis – allerdings über einen Versuchszeitraum von 36 Wochen [69].

Lee et al. sahen in einer klinischen Studie bei sieben Patienten nach 6 Wochen unter n-3-FS-Zufuhr (3,2g/d EPA und 2,2g/d DHA) neben einer Minderung der 5-LOX-Produkte

in Neutrophilen und Monozyten auch eine Schwächung der durch LTB_4 vermittelten Chemotaxis bzw. Zelladhäsion von Neutrophilen [70].

Genannte Beispiele unterstützen die Vermutung, dass Leukotriene bereits präformiert gebildet werden bzw. die Folgen einer n-3-FS-Therapie auf die Leukotrienproduktion und deren Auswirkungen erst nach einigen Wochen nachvollziehbar ist.

Die LOX bedingt nicht nur die Synthese von klassischen Leukotrienen sondern auch die von Lipoxinen, Metaboliten im Leukotrienstoffwechsel, auf welche man in den letzten Jahren aufmerksam wurde. Die Produktion von Lipoxinen kann unter COX-Blockade z.B. durch Aspirin getriggert werden (Aspirin-getriggerte Lipoxine). Deren Wirkung besteht in einer selektiven Modulation des Inflammationsgeschehens durch Interaktion mit u. a. Prostaglandinen, Zytokinen, vaskulären Strukturen, Makrophagen und T-Lymphozyten [71]. Unter einer n-3-FS-Therapie entstehen durch den geschilderten Prozess Resolvine, welche ebenfalls eine wichtige Rolle in der selektiven Modulation des Inflammationsgeschehens einnehmen. Es wird vermutet, dass diese Metaboliten für die Interaktionen der n-3-FS auf genexpressorischer Ebene verantwortlich sind. Sie vermindern u. a. die Funktion von PMN-Leukozyten und wirken proinflammatorischen Funktionen von Zytokinen entgegen [72, 73]. Diese Beobachtungen könnten einen weiteren Grund für den milderen Verlauf der ANP der Ratte unter n-3-FS-Therapie darstellen. Es bleibt jedoch fraglich ob bzw. in welchem Ausmaß diese Resolvine hinsichtlich ausreichender Modulation des Inflammationsgeschehens produziert wurden, da keine COX-Blockade in dem hier verwendeten Studienmodell stattfand. Somit ist wiederum die Frage nach der tatsächlichen Wirkung der Resolvine in der vorliegenden Studie schwierig zu beantworten. Dies gilt es in Folgestudien am gleichen Tiermodell ohne und mit COX-Blockade im Vergleich zu untersuchen.

5.4 Fazit

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Ergebnisse von Yacoob und Calder, welche ebenfalls eine Reduktion der COX-Produkte (PGE_2 , $\text{PGF}_{1\alpha}$, TXB_2), aber überraschenderweise keinen Abfall der Leukotrienmetaboliten nach Fischölapplikation über 8 Wochen an LPS-stimulierten Makrophagen von Mäusen feststellten. Sie vermuteten dahingehend eine Inhibition des AA-Metabolismus durch EPA und DHA,

welche mit einer Synthese alternativer, antiinflammatorischer COX-Produkte einhergeht [74].

Der mildere Verlauf der ANP darf aber nicht nur der Synthese von antiinflammatorischen Eikosanoiden zugerechnet werden. Diese stellen lediglich eine von vielen Folgen einer n-3-FS-Therapie im Rahmen eines komplex regulierten Inflammationsgeschehens dar.

Caterina et al. beschrieben unter Einnahme von DHA eine reduzierte Expression von VCAM1, ICAM1, E-Selectin, IL6, IL8 nach Stimulation mit IL1, IL4, TNF oder einem bakteriellen Endotoxin. Weiterhin reduzierte DHA die Adhäsion von Monozyten an zytokin-stimulierten Endothelzellen begleitet von einer Reduktion von VCAM-1-Messenger RNA, was auf Interaktionsmöglichkeiten der n-3-FS im Rahmen der Genexpression hinweist. [31, 32, 47].

Foitzik et al. beschreiben in einer Studie, in welcher der Effekt von n-3-FS im Verlauf der ANP der Ratte beobachtet wurde, einen Anstieg von antiinflammatorischen Zytokinen, begleitet von einem gemilderten systemischen Inflammationsgeschehen (im Vergleich mit der Kontrollgruppe verbesserte renale und respiratorische Funktion) [50].

Insgesamt stimmen sowohl unsere als auch die Untersuchungsergebnisse anderer [31-34, 49, 50, 56, 64, 70] darin überein, dass ein Ersatz der membranbildenden n-6- durch n-3-FS eine Reduktion der zellulären Antwort auf die Noxe bedingt.

6 Zusammenfassung

Zum aktuellen Zeitpunkt besteht die Therapie der akuten hämorrhagisch-nekrotisierenden Pankreatitis lediglich aus supportiven Therapieschemata, wie einleitend beschrieben. Hinsichtlich der Genese spielt das Auftreten von Radikalen und folgenden molekularen Veränderungen eine entscheidende Rolle.

In der vorliegenden Studie sollte der Einfluss einer n-3-FS-reichen Infusion auf den Verlauf der ANP sequentiell eruiert werden.

Von Interesse waren hierbei Alterationen der gemessenen Radikalkonzentrationen bzw. Schutzzyklen, der Eikosanoide (PGE_2 , $\text{PGF}_{1\alpha}$, cys-LT) und morphologische Veränderungen des Pankreasgewebes. 198 männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden randomisiert und 11 Gruppen zugeteilt, wobei Gruppe 1 als ANP-Kontrolle diente. Die restlichen Tiere erhielten postoperativ entweder eine Elektrolyt-Infusion oder eine Infusion reich an n-3-FS über einen, entsprechend der Gruppenzugehörigkeit, definierten Zeitraum.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass durch die frühzeitige intravenöse Gabe von n-3-FS bei der ANP der Ratte zum einen der Verlauf gemildert und zum anderen die Progression der ANP reduziert werden kann. Ab der 14. Stunde Versuchsdauer, d.h. nach 8-stündiger n-3-FS-Infusion, zeigte sich nicht nur eine signifikante Reduktion des histopathologischen Gesamtscores bei Vergleich der n-3-therapierten Gruppen mit entsprechenden Elektrolytersatzgruppen, sondern auch eine signifikante Reduktion des histopathologischen Scores im Verlauf der n-3-FS-Gruppen sequentiell ab der 14ten Stunde. Ein Grund für die Minderung der morphologischen Veränderungen in den n-3-therapierten Gruppen kann in den verminderten Konzentrationen von PGE_2 und $\text{PGF}_{1\alpha}$ gesehen werden, welche die Inflamationsreaktion in Abhängigkeit ihrer Konzentration erhalten. Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll den klinischen Einfluss von Fischölen im Verlauf der akuten Pankreatitis zu evaluieren. Es wird schwierig sein, die in dieser Studie geschaffene Konstellation ebenfalls klinisch herbeizuführen, da Patienten nur selten während der initialen Phase der ANP vorstellig werden, sondern meist erst bei Symptomexazerbation stationär behandelt werden. Die Ergebnisse dieser Studie, als auch wie einleitend und im Verlauf referierte aktuelle Forschungsergebnisse, geben

Hinweise darauf, dass sich der Einsatz von n-3-FS positiv auf den Verlauf der ANP auswirkt.

7 Literaturverzeichnis

1. Sekimoto M, Takada T, Kawarada Y, et al. *JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: epidemiology, etiology, natural history, and outcome predictors in acute pancreatitis*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2006. 13(1): p. 10-24.
2. Bühler H BP. *Akute Pankreatitis: Diagnostik und Therapie*. Schweiz Med Forum, 2004(4): p. 43-48.
3. Klar E, Werner J. *[New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis]*. Chirurg, 2000. 71(3): p. 253-64.
4. Koizumi M, Takada T, Kawarada Y, et al. *JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: diagnostic criteria for acute pancreatitis*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2006. 13(1): p. 25-32.
5. Al-Bahrani AZ, Ammori BJ. *Clinical laboratory assessment of acute pancreatitis*. Clin Chim Acta, 2005. 362(1-2): p. 26-48.
6. Yadav D, Agarwal N, Pitchumoni CS. *A critical evaluation of laboratory tests in acute pancreatitis*. Am J Gastroenterol, 2002. 97(6): p. 1309-18.
7. Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF, Fink SD, Eng K, Spencer FC. *Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis*. Surg Gynecol Obstet, 1974. 139(1): p. 69-81.
8. Nathens AB, Curtis JR, Beale RJ, et al. *Management of the critically ill patient with severe acute pancreatitis*. Crit Care Med, 2004. 32(12): p. 2524-36.
9. Heinrich S, Schafer M, Rousson V, Clavien PA. *Evidence-based treatment of acute pancreatitis: a look at established paradigms*. Ann Surg, 2006. 243(2): p. 154-68.
10. Urunuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. *Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1588(2): p. 159-64.
11. Ferreira L, Perez-Gonzalez N, Llanillo M, Calvo JJ, Sanchez-Bernal C. *Acute pancreatitis decreases pancreas phospholipid levels and increases susceptibility to lipid peroxidation in rat pancreas*. Lipids, 2002. 37(2): p. 167-71.
12. Kusterer K, Poschmann T, Friedemann A, Enghofer M, Zandler S, Usadel KH. *Arterial constriction, ischemia-reperfusion, and leukocyte adherence in acute pancreatitis*. Am J Physiol, 1993. 265(1 Pt 1): p. G165-71.
13. Dabrowski A, Konturek SJ, Konturek JW, Gabryelewicz A. *Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis*. Eur J Pharmacol, 1999. 377(1): p. 1-11.
14. Schulz HU, Niederau C, Klonowski-Stumpe H, Halangk W, Luthen R, Lippert H. *Oxidative stress in acute pancreatitis*. Hepatogastroenterology, 1999. 46(29): p. 2736-50.
15. Schoenberg MH, Büchler M, Beger HG. *Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis*. Hepatogastroenterology, 1994. 41(4): p. 313-9.
16. Schoenberg MH, Büchler M, Gaspar M, et al. *Oxygen free radicals in acute pancreatitis of the rat*. Gut, 1990. 31(10): p. 1138-43.

17. Halliwell B, Chirico S. *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr, 1993. 57(5 Suppl): p. 715S-724S; discussion 724S-725S.
18. Nonaka A, Manabe T, Kyogoku T, Tamura K, Tobe T. *Changes in lipid peroxide and oxygen radical scavengers in cerulein-induced acute pancreatitis. Imbalance between the offense and defense systems*. Digestion, 1990. 47(3): p. 130-7.
19. Reinheckel T, Nedelev B, Prause J, et al. *Occurrence of oxidatively modified proteins: an early event in experimental acute pancreatitis*. Free Radic Biol Med, 1998. 24(3): p. 393-400.
20. Jungermann J, Lerch MM, Weidenbach H, Lutz MP, Kruger B, Adler G. *Disassembly of rat pancreatic acinar cell cytoskeleton during supramaximal secretagogue stimulation*. Am J Physiol, 1995. 268(2 Pt 1): p. G328-38.
21. Grady T, Mah'Moud M, Otani T, Rhee S, Lerch MM, Gorelick FS. *Zymogen proteolysis within the pancreatic acinar cell is associated with cellular injury*. Am J Physiol, 1998. 275(5 Pt 1): p. G1010-7.
22. Poch B, Gansauge F, Rau B, et al. *The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation*. FEBS Lett, 1999. 461(3): p. 268-72.
23. O'Keefe JH, Jr., Harris WS. *From Inuit to implementation: omega-3 fatty acids come of age*. Mayo Clin Proc, 2000. 75(6): p. 607-14.
24. Prichard BN, Smith CC, Ling KL, Betteridge DJ. *Fish oils and cardiovascular disease*. Bmj, 1995. 310(6983): p. 819-20.
25. Simopoulos AP. *Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases*. J Am Coll Nutr, 2002. 21(6): p. 495-505.
26. Heller A, Koch T, Schmeck J, van Ackern K. *Lipid mediators in inflammatory disorders*. Drugs, 1998. 55(4): p. 487-96.
27. Blok WL, Katan MB, van der Meer JW. *Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids*. J Nutr, 1996. 126(6): p. 1515-33.
28. Empey LR, Jewell LD, Garg ML, Thomson AB, Clandinin MT, Fedorak RN. *Fish oil-enriched diet is mucosal protective against acetic acid-induced colitis in rats*. Can J Physiol Pharmacol, 1991. 69(4): p. 480-7.
29. Cleland LG, French JK, Betts WH, Murphy GA, Elliott MJ. *Clinical and biochemical effects of dietary fish oil supplements in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 1988. 15(10): p. 1471-5.
30. Bittiner SB, Tucker WF, Cartwright I, Bleehen SS. *A double-blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis*. Lancet, 1988. 1(8582): p. 378-80.
31. Stulnig TM. *Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects*. Int Arch Allergy Immunol, 2003. 132(4): p. 310-21.
32. De Caterina R, Liao JK, Libby P. *Fatty acid modulation of endothelial activation*. Am J Clin Nutr, 2000. 71(1 Suppl): p. 213S-23S.
33. Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C, et al. *Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 167(10): p. 1321-8.
34. Kilian M, Heukamp I, Gregor JI, et al. *n-3, n-6, and n-9 polyunsaturated fatty acids-which composition in parenteral nutrition decreases severity of acute*

- hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats?* Int J Colorectal Dis, 2006. 21(1): p. 57-63.
35. Funk CD. *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.* Science, 2001. 294(5548): p. 1871-5.
 36. Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. *Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes.* J Clin Invest, 2001. 108(1): p. 15-23.
 37. Schrör K, Hohlfeld T. *Derivate des Arachidonsäurestoffwechsels.* In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Auflage. München, Deutschland: Urban & Fischer bei Elsevier, 2005: 349-361.
 38. Herschman HR. *Prostaglandin synthase 2.* Biochim Biophys Acta, 1996. 1299(1): p. 125-40.
 39. Vane JR, Botting RM. *Mechanism of action of antiinflammatory drugs.* Int J Tissue React, 1998. 20(1): p. 3-15.
 40. Vane JR, Botting RM. *Pharmacodynamic profile of prostacyclin.* Am J Cardiol, 1995. 75(3): p. 3A-10A.
 41. Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. *A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy.* Ann Surg, 1992. 215(1): p. 44-56.
 42. Paglia DE, Valentine WN. *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase.* J Lab Clin Med, 1967. 70(1): p. 158-69.
 43. Beauchamp C, Fridovich I. *Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels.* Anal Biochem, 1971. 44(1): p. 276-87.
 44. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.* Anal Biochem, 1979. 95(2): p. 351-8.
 45. Janero DR. *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury.* Free Radic Biol Med, 1990. 9(6): p. 515-40.
 46. Jump DB. *The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids.* J Biol Chem, 2002. 277(11): p. 8755-8.
 47. Deckelbaum RJ, Worgall TS, Seo T. *n-3 fatty acids and gene expression.* Am J Clin Nutr, 2006. 83(6 Suppl): p. 1520S-1525S.
 48. Onuki Y, Morishita M, Chiba Y, Tokiwa S, Takayama K. *Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid induce changes in the physical properties of a lipid bilayer model membrane.* Chem Pharm Bull (Tokyo), 2006. 54(1): p. 68-71.
 49. Lasztity N, Hamvas J, Biro L, et al. *Effect of enterally administered n-3 polyunsaturated fatty acids in acute pancreatitis--a prospective randomized clinical trial.* Clin Nutr, 2005. 24(2): p. 198-205.
 50. Foitzik T, Eibl G, Schneider P, Wenger FA, Jacobi CA, Buhr HJ. *Omega-3 fatty acid supplementation increases anti-inflammatory cytokines and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis.* JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2002. 26(6): p. 351-6.
 51. Sanfey H, Bulkeley GB, Cameron JL. *The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis.* Ann Surg, 1984. 200(4): p. 405-13.

52. Arab K, Rossary A, Flourie F, Tourneur Y, Steghens JP. *Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating gamma-glutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase*. Br J Nutr, 2006. 95(1): p. 18-26.
53. Hatala MA, Rayburn J, Rose DP. *Comparison of linoleic acid and eicosapentaenoic acid incorporation into human breast cancer cells*. Lipids, 1994. 29(12): p. 831-7.
54. Culp BR, Titus BG, Lands WE. *Inhibition of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic acid*. Prostaglandins Med, 1979. 3(5): p. 269-78.
55. Applegate KR, Glomset JA. *Computer-based modeling of the conformation and packing properties of docosahexaenoic acid*. J Lipid Res, 1986. 27(6): p. 658-80.
56. Mori TA, Woodman RJ, Burke V, Puddey IB, Croft KD, Beilin LJ. *Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects*. Free Radic Biol Med, 2003. 35(7): p. 772-81.
57. Yeh SL, Chang KY, Huang PC, Chen WJ. *Effects of n-3 and n-6 fatty acids on plasma eicosanoids and liver antioxidant enzymes in rats receiving total parenteral nutrition*. Nutrition, 1997. 13(1): p. 32-6.
58. Calviello G, Palozza P, Franceschelli P, Bartoli GM. *Low-dose eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid administration modifies fatty acid composition and does not affect susceptibility to oxidative stress in rat erythrocytes and tissues*. Lipids, 1997. 32(10): p. 1075-83.
59. Piche LA, Draper HH, Cole PD. *Malondialdehyde excretion by subjects consuming cod liver oil vs a concentrate of n-3 fatty acids*. Lipids, 1988. 23(4): p. 370-1.
60. Schmedtje JF, Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. *Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1997. 272(1): p. 601-8.
61. Sonoshita M, Takaku K, Sasaki N, et al. *Acceleration of intestinal polyposis through prostaglandin receptor EP2 in Apc(Delta 716) knockout mice*. Nat Med, 2001. 7(9): p. 1048-51.
62. Tjandrawinata RR, Dahiya R, Hughes-Fulford M. *Induction of cyclo-oxygenase-2 mRNA by prostaglandin E2 in human prostatic carcinoma cells*. Br J Cancer, 1997. 75(8): p. 1111-8.
63. Murakami M, Kuwata H, Amakasu Y, et al. *Prostaglandin E2 amplifies cytosolic phospholipase A2- and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic cells. Enhancement by secretory phospholipase A2*. J Biol Chem, 1997. 272(32): p. 19891-7.
64. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. *Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(4): p. 1751-6.
65. Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, et al. *Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo*. J Exp Med, 1996. 184(3): p. 883-91.

66. Hawkes JS, James MJ, Cleland LG. *Biological activity of prostaglandin E3 with regard to oedema formation in mice*. Agents Actions, 1992. 35(1-2): p. 85-7.
67. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. *Regulatory functions of the vascular endothelium*. N Engl J Med, 1990. 323(1): p. 27-36.
68. Colgan SP, Taylor CT, Narravula S, Synnestvedt K, Blume ED. *Endothelial COX-2 induction by hypoxia liberates 6-keto-PGF1 alpha, a potent epithelial secretagogue*. Adv Exp Med Biol, 2002. 507: p. 107-12.
69. Hall JA, Henry LR, Jha S, Skinner MM, Jewell DE, Wander RC. *Dietary (n-3) fatty acids alter plasma fatty acids and leukotriene B synthesis by stimulated neutrophils from healthy geriatric Beagles*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. 73(5): p. 335-41.
70. Lee TH, Hoover RL, Williams JD, et al. *Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function*. N Engl J Med, 1985. 312(19): p. 1217-24.
71. Parkinson JF. *Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2006. 5(2): p. 91-106.
72. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. *Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing*. J Exp Med, 2000. 192(8): p. 1197-204.
73. Arita M, Bianchini F, Aliberti J, et al. *Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1*. J Exp Med, 2005. 201(5): p. 713-22.
74. Yaqoob P, Calder P. *Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages*. Cell Immunol, 1995. 163(1): p. 120-8.