

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und  
Gastroenterologie, Campus Virchow Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Acetylsalicylsäure verringert die Entzündungsaktivität in einem  
Mausmodell zur Kolitis und führt zu einer vermehrten Bildung von  
anti-inflammatorischen Lipidmediatoren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Köhnke

aus Johannesburg

Datum der Promotion: 27.02.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (CED) .....	2
1.1.1 Einteilung .....	2
1.1.2 Ätiologie und Inzidenz der CED .....	2
1.1.3 CED und Kolorektales Karzinom .....	4
1.1.4 ASS zur Prävention kolorektaler Karzinome .....	5
1.1.5 Prophylaxe der Colitis-assoziierten Karzinogenese.....	6
1.1.6 Aktuelle Therapiestrategien .....	7
1.2 Omega-3- und Omega-6-mehrfach ungesättigte Fettsäuren.....	8
1.2.1 Überblick .....	8
1.2.2 Lipidmediatoren und ihre Rolle in entzündlichen Prozessen .....	11
1.2.3 Die Rolle des omega-3/omega-6 Verhältnisses in chronisch entzündlichen Erkrankungen.....	15
1.3 Experimentelle Ansätze .....	16
1.3.1 <i>in vivo</i> .....	16
1.3.2 Kleintier-MRT .....	19
<b>2. Fragestellung</b> .....	<b>21</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.1 Tiermodell .....	22
3.2 Versuchsaufbau .....	22
3.3 Histologische Analyse .....	23
3.4 Immunhistochemie .....	24
3.5 TNF- $\alpha$ ELISA .....	24
3.6 Protein-Extraktion und COX-2 Western Blot.....	25
3.7 Magnet-Resonanz-Tomographie .....	26
3.8 Analyse der Lipid-Mediatoren .....	29
3.9 Statistik .....	30
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
4.1 <i>in vivo</i> -Bestimmung der Kolitisaktivität .....	31
4.2 Magnet-Resonanz-Tomographie .....	32
4.3 <i>post mortem</i> -Analyse der Kolitisaktivität.....	34

4.3.1 Kolonlänge .....	34
4.3.2 Histologische Analyse .....	34
4.3 Analyse der COX-2-Aktivität .....	36
4.3.1 Immunhistochemie .....	36
4.3.2 COX-2 Western Blot.....	37
4.4 TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum.....	38
4.5 Messung der Lipidmediatoren .....	39
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>40</b>
5.1 Zusammenfassung .....	40
5.2 Vorteile und Einschränkungen des Studiendesigns .....	41
5.2.1 Tiermodelle zur Kolitis.....	41
5.2.2 Dosierung von ASS.....	42
5.2.3 Bestimmung von 17-HDHA.....	42
5.3 Die Rolle von anti-inflammatorischen omega-6-PUFAs .....	43
5.3.1 Lipoxine und Aspirin-getriggerte Lipoxine (ATLs) im zeitlichen Verlauf von Entzündungsreaktionen .....	43
5.4 Malignomentwicklung im Rahmen von chronischen Entzündungen.....	45
5.4.1 Entzündung und Karzinogenese.....	45
5.4.2 Die Rolle der Acetylsalicylsäure.....	46
5.5 Bestimmung der Entzündungsaktivität mittels Kleintier-Magnet-Resonanz-Tomographie.....	47
5.5.1 Sensitivität und Reproduzierbarkeit einer nicht-invasiven, risikoarmen Untersuchung.....	47
5.5.2 Kleintier-Endoskopie .....	48
5.6 Mögliche Implikationen für zukünftige Studien .....	48
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>50</b>
<b>7. Abstract (English).....</b>	<b>52</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>9. Selbständigkeitserklärung/Statement .....</b>	<b>62</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>64</b>
<b>11. Lebenslauf.....</b>	<b>65</b>
<b>12. Publikationsliste.....</b>	<b>66</b>

# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Überblick über die Entwicklung der Inzidenzraten von Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa nach geographischen Regionen .....	3
<b>Abbildung 2.</b> Die Synthese von Omega-6 und Omega-3-mehrfach ungesättigten Fettsäuren.....	10
<b>Abbildung 3.</b> Bildung der anti-inflammatorischen Omega-6-Mediatoren LipoxinA <sub>4</sub> und 15-Epi-LipoxinA <sub>4</sub> .....	12
<b>Abbildung 4.</b> Überblick über die Bildung und Hauptwirkungen der einzelnen Lipidmediatoren aus omega-6- und omega-3-PUFA .....	14
<b>Abbildung 5.</b> Chemische Struktur von Dextran-Natrium-Sulfat (Dextran Sodium Sulfate – DSS).....	18
<b>Abbildung 6.</b> Intrarektale Positionierung des nichtmagnetischen Plastikrohrs während der MRT-Untersuchung.....	27
<b>Abbildung 7.</b> Schematische Darstellung der Schichtselektion.....	28
<b>Abbildung 8.</b> Schematische Darstellung der Helligkeitsmessung durch das Histogramm-Werkzeug .....	29
<b>Abbildung 9.</b> Körpergewicht im Verlauf des Experiments.....	31
<b>Abbildung 10.</b> Tägliche Evaluation der rektalen Blutung durch einen kombinierten Score aus phänotypischer Stuhlqualität und einem Test für okkultes Blut (Hemoccult®)....	32
<b>Abbildung 12.</b> Kolonlänge.....	34
<b>Abbildung 13.</b> Histopathologische Evaluation der Entzündungsaktivität .....	35
<b>Abbildung 14.</b> Kombiniertes histopathologischer Score .....	36
<b>Abbildung 15.</b> Immunhistochemische Gewebe-schnitte für COX-2.....	37
<b>Abbildung 16.</b> Western Blot mit Darstellung der COX-2-Proteinkonzentration.....	38
<b>Abbildung 17.</b> TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum.....	38
<b>Abbildung 18.</b> Lipidmediatoren aus den gewonnenen Kolonproben .....	39
<b>Abbildung 19.</b> Synthese und biologischer Effekt der 17R/S-Derivate .....	43

# Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Übersicht der Tiermodelle zu entzündlichen Darmerkrankungen .....	19
-------------------------------------------------------------------------------------	----

# Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure (arachidonic acid)
ALA	$\alpha$ -Linolensäure
AOM	Azoxymethan
5-ASA	5-Aminosalicylsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
ATLs	Aspirin-getriggerte-Lipoxine
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRC	Kolorektales Karzinom
CYP	Cytochrom P450
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DHA	Docosahexaensäure
DPA	Docosapentaensäure
DSS	Dextran-Natrium-Sulfat
EETs	Epoxyeicosatriensäuren
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPA	Eicosapentaensäure
EtOH	Ethanol
15-Epi-LXA <sub>4</sub>	15-Epi-LipoxinA <sub>4</sub>
17(S)-HDHA	17-hydroxy-DHA
15(R)-HETE	15R-hydroxy-Eicosatetraensäure
15(S)-HpETE	15S-hydroxyperoxy-Eicosatetraensäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
KHK	koronare Herzerkrankung
LA	Linolsäure
12-LO	Lipoxygenase-12
15-LO	Lipoxygenase-15
5-LO	Lipoxygenase-5

LT	Leukotrien
LTA <sub>4</sub>	Leukotrien A <sub>4</sub>
LTB <sub>5</sub>	LeukotrienB <sub>5</sub>
LXA <sub>4</sub>	LipoxinA <sub>4</sub>
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NF-κB	Nuclear factor kappaB
NSAIDs	Nicht-steroidale Antiphlogistika (Non-steroidal anti-inflammatory drugs)
PD	Protectine
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGE <sub>3</sub>	Prostaglandin E <sub>3</sub>
PUFA	mehrfach ungesättigten Fettsäure (polyunsaturated fatty acid)
RvD <sub>1-6</sub>	Resolvin D <sub>1-6</sub>
RvE <sub>1-3</sub>	Resolvin E <sub>1-3</sub>
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfat
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TXA <sub>3</sub>	Thromboxan A <sub>3</sub>

# 1. Einleitung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind entzündliche Autoimmunerkrankungen des Gastrointestinaltrakts, deren Ätiologie und Pathomechanismus bislang nur teilweise verstanden sind [1, 2]. Die Unterhaltung einer chronisch rezidivierenden Entzündungsreaktion ist das Hauptmerkmal dieser Erkrankungen. Daher ist für das Verständnis der CED besonders das Verständnis vom Pathomechanismus dieser Entzündungsreaktionen und deren Unterhaltung von Bedeutung.

Lipidmediatoren spielen eine wichtige Rolle bei der Einleitung, Unterhaltung, aber auch der Auflösung von Entzündungsreaktionen. Sie können pro-inflammatorische sowie auch anti-inflammatorische Effekte haben und sind daher in diesem Kontext von besonderem Interesse [3]. Enzymatisch sind unter anderem die Cyclooxygenasen an der Produktion dieser Lipidmediatoren beteiligt. Hier hat in jüngster Zeit ein Paradigmenwechsel stattgefunden, indem zusätzlich zu den gut dokumentierten pro-inflammatorischen Lipidmediatoren auch die Rolle von anti-inflammatorischen Lipidmediatoren zunehmend deutlicher wird. Auch die Funktionsweise vermeintlich gut bekannter Medikamente, namentlich der Acetylsalicyläure (ASS), wird in diesem Kontext neu entdeckt und neue Wirkmechanismen gezeigt. So scheint ASS in der Lage zu sein, nicht nur die Produktion pro-inflammatorischer Lipidmediatoren zu vermindern, sondern auch die daran beteiligte Cyclooxygenase 2 (COX-2) so zu modifizieren, dass andere, anti-inflammatorisch wirkende Mediatoren produziert werden [4].

Ein weiteres therapeutisches Problem der CED ist das erhöhte Risiko einer Malignomentwicklung. Es konnte gezeigt werden, dass ASS in der Normalbevölkerung die Entwicklung von kolorektalen Polypen [5] und kolorektalen Karzinomen [6-8] signifikant vermindern kann. Im Kontext der CED ist die Lage diesbezüglich weitaus weniger klar [9-12].

Die hier vorgelegte Arbeit befasst sich mit den Effekten von Lipidmediatoren aus Omega-3 und Omega-6-mehrfach ungesättigten Fettsäuren (n-3 und n-6-PUFA) in einem Tiermodell

zur Kolitis sowie deren Beeinflussung durch ASS. Es soll den Auswirkungen von ASS auf Entzündungsaktivität und Lipidmediatorkonzentrationen nachgegangen werden.

Zusätzlich wurde als Basis für weitere Untersuchungen im Rahmen von Tiermodellen zur Kolitis ein strukturierter Algorithmus zur intravitalem Bestimmung der Entzündungsaktivität mittels Kleintier-MRT entwickelt.

## **1.1 Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (CED)**

### **1.1.1 Einteilung**

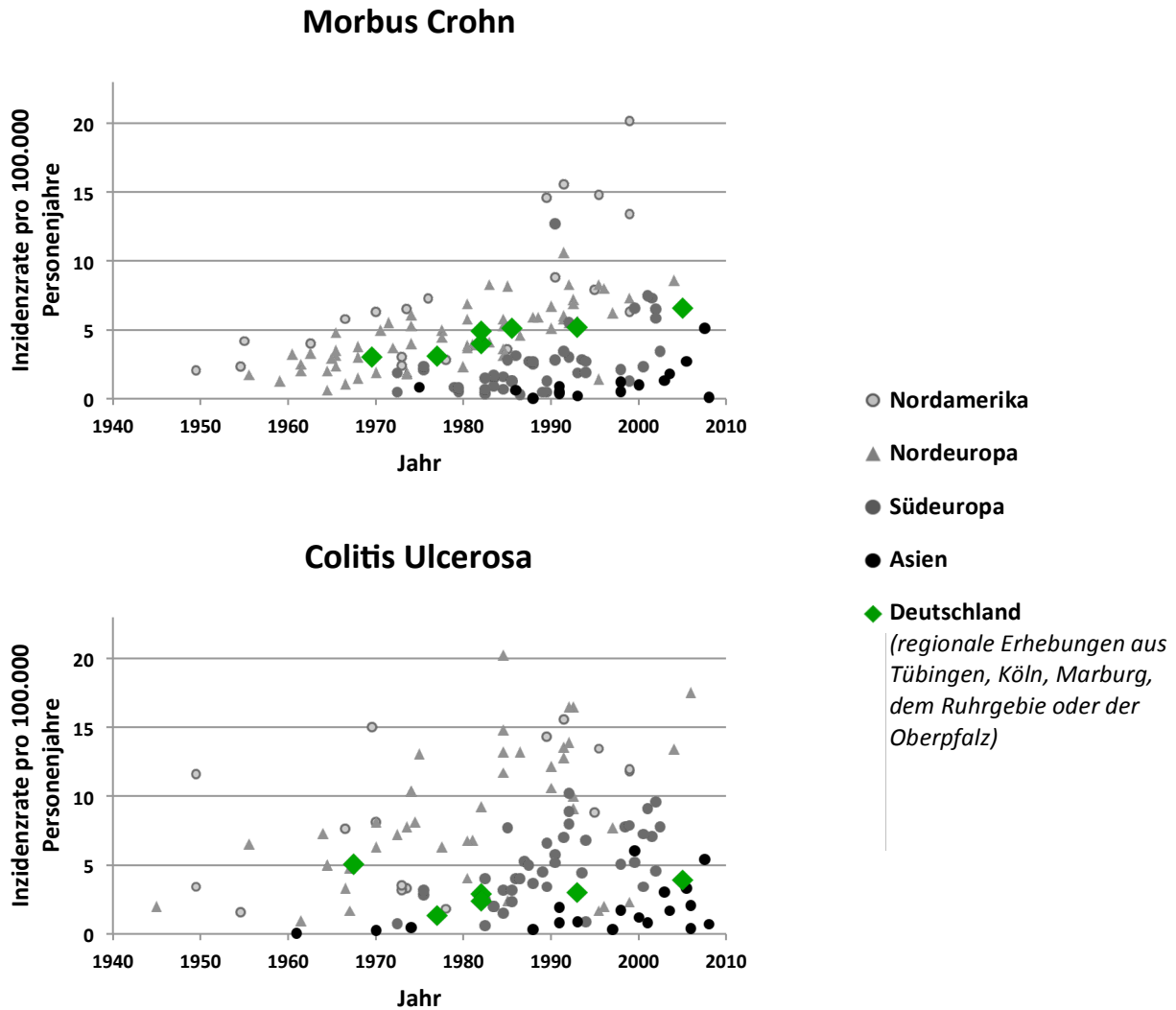
Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind Erkrankungen vor allem des Gastrointestinaltrakts, die mit einer chronischen, häufig auch rezidivierenden Entzündung einhergehen. Die beiden wichtigsten Vertreter sind Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa. Die mikroskopischen Kolitiden mit ihren Formen der kollagenen und lymphozytären Kolitis stellen nur eine untergeordnete Gruppe dar – wobei zu bemerken bleibt, dass die Häufigkeit dieser beiden Erkrankungen in den vergangenen Jahren zugenommen hat. Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa unterscheiden sich nicht nur in ihrer Epidemiologie, Lokalisation und Pathophysiologie, sondern auch in den gewählten therapeutischen Ansätzen. Beiden Erkrankungen gemein ist ein erhöhtes Risiko für Malignomentwicklungen, wobei dies bei der Colitis Ulcerosa am ausgeprägtesten ist, aber auch bei Morbus Crohn, hier vor allem bei einem ausgeprägten Befall des Kolons, eine Komplikation darstellt [13].

### **1.1.2 Ätiologie und Inzidenz der CED**

Wie bei den meisten Autoimmunerkrankungen ist die Ätiologie der CED multifaktoriell zu sehen, wobei breiter Konsens besteht, dass es sich hierbei vor allem um vier Faktoren handelt: genetische Prädisposition, Veränderungen der intestinalen mikrobiellen Flora, das individuelle Reaktionsverhalten des Immunsystems sowie nicht zuletzt auch Umweltveränderungen [2]. Es bleibt hierbei jedoch zu bemerken, dass jedem Faktor bei jedem individuellen Patienten ein unterschiedliches Gewicht zukommt. Global gesehen lässt sich jedoch beobachten, dass die Inzidenz der Autoimmunerkrankungen insgesamt in den letzten 50 Jahren zugenommen hat, so auch bei den CED [14]. Die höchste



Inzidenz der CED findet sich in Nordeuropa inklusive Großbritannien, sowie in Nordamerika. Hier scheint sich die Inzidenz, die seit Ende des zweiten Weltkriegs gestiegen war zu stabilisieren [2], während die Inzidenz der CED in Asien, Südeuropa und den sogenannten Entwicklungsländern weiter zunimmt [15]. Eine Übersicht über die Inzidenzraten in epidemiologischen Studien ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1. Überblick über die Entwicklung der Inzidenzraten von Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa nach geographischen Regionen (modifiziert nach Farrokyar et al. [14] mit Daten aus Prideaux et al. [16] und Molodecky et al. [17]).** Dargestellt sind die Inzidenzraten aus 191 regionalen, epidemiologischen Studien (148 Studien mit Angaben zu Morbus Crohn und 125 mit Angaben zu Colitis Ulcerosa). Für jede Studie wurde die erfasste Inzidenzrate mit dem Mittelpunkt des Erfassungszeitraums korreliert. Es zeigt sich eine höhere Inzidenz der CED insbesondere in Nordamerika und Nordeuropa inklusive Großbritannien. Dagegen ist die Inzidenz in Südeuropa niedriger, steigt jedoch insbesondere bei der Colitis Ulcerosa in den vergangenen zwei Dekaden stetig an. Obwohl die Datenlage für Deutschland begrenzt ist, scheint die Inzidenzrate im Mittel- bzw. unteren Mittelfeld für Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa zu liegen. Im asiatischen Raum lässt sich eine Zunahme der Inzidenzrate beobachten. Einschränkend muss jedoch festgestellt werden, dass die einzelnen Studien sich oftmals auf geographisch sehr eng begrenzte

Gebiete innerhalb einzelner Staaten beziehen und die Beobachtungszeiträume der einzelnen Studien stark variieren [14-17].

Die Zunahme der CED-Inzidenz ist zumeist verbunden mit einer Verbesserung der Lebensbedingungen und einer zunehmenden „Verwestlichung“ des Lebensstils. Hierzu zählen eine ganze Reihe von Faktoren, die möglicher Weise die Inzidenz der CED erhöhen. Auf der einen Seite die verminderte Exposition gegenüber Infektionen [18] wie auch harmlosen Mikroorganismen [19], die durch verbesserte hygienische Bedingungen, kleinere Familiengröße, verbreiteter Einsatz antibiotischer Therapien, zunehmende Verbreitung von flächendeckenden Impfungen, verringerter Kontakt zu Nutztieren, etc. erreicht wird. Auf der anderen Seite sind auch veränderte Ernährungsgewohnheiten, wie der vermehrte Verzehr von gesättigten Fetten und industriell hergestellten Lebensmitteln vermutete Gründe für die beobachtete Zunahme von Autoimmunerkrankungen [20].

### 1.1.3 CED und Kolorektales Karzinom

Eine der schwersten Komplikation der CED ist die Malignomentwicklung. Es kann insgesamt von einem erhöhten Risiko für Kolorektale Karzinome (CRC) bei Colitis Ulcerosa-Patienten ausgegangen werden [13]. Dabei wird die Rate der Risikoerhöhung in einer Vielzahl von epidemiologischen Studien beleuchtet [21]. Während einige Autoren von einem bis zu 6-fach erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Kolorektalen Karzinoms bei dieser Patientengruppe ausgegangen sind [22], gehen andere Studien von einem relativen Risiko von 2,75 aus [13]. Insgesamt korreliert das Risiko mit Krankheitsaktivität sowie Krankheitsdauer [23] und beträgt für Patienten mit Colitis Ulcerosa etwa 2 % nach 10 Jahren, 8 % nach 20 Jahren und 18 % nach 30 Jahren [21]. Für Patienten mit Morbus Crohn scheint sich die initial angenommene Risikoerhöhung für die Entwicklung von Kolorektalen Karzinomen in neueren Studien nicht zu bestätigen [13, 24]. Zudem konnte hier auch gezeigt werden, dass in den vergangenen drei Jahrzehnten eine deutliche Risikoreduktion auch bei Colitis Ulcerosa-Patienten zu beobachten ist, so dass in den ersten 10 Jahren der Erkrankung das Risiko nicht höher als in der Allgemeinbevölkerung zu sein scheint [24]. Ausgenommen hiervon sind jedoch Patienten mit einem Krankheitsbeginn im Kindes- oder Jugendalter, Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis und Patienten mit einer langen Krankheitsdauer [24, 25]. Hier ist weiterhin –

trotz zunehmend verbesserter Krankheitskontrolle – ein deutlich erhöhtes Risiko zu verzeichnen [24].

#### 1.1.4 ASS zur Prävention kolorektaler Karzinome

Niedrig dosierte Acetylsalicylsäure hat sich zur Prävention von sporadischen Kolonpolypen als wirksam erwiesen [5, 26], und einige Studien weisen auch auf eine Reduktion des CRC-Risikos hin [8, 27, 28], andere Studienergebnisse sind hier eher zurückhaltend [29], in jedem Fall herrscht eine kontrovers geführte Debatte [30]. Bedenken gegenüber eines präventiven Einsatzes der ASS erfolgen hauptsächlich aus der Überlegung heraus, dass dem potentiellen Nutzen ein nicht unerhebliches Risiko gegenübersteht [31, 32], hier vor allem Blutungen des Gastrointestinaltrakts, aber auch intrakranielle Blutungen.

Betrachtet man hierzu die vorhandene Datenlage, führt eine systematische Analyse der vorhandenen Studien zum fäkalen Blutgehalt bei Einnahme von niedrig- bzw. hochdosiertem ASS [33] an, dass sich schon bei niedrig dosiertem ASS ein 2-4facher Blutgehalt messen lässt. Jedoch geben die Autoren auch zu bedenken, dass die dieser Annahme zugrunde liegenden Studien zumeist ein selektives Probandenkollektiv (größtenteils gesunde, junge Männer) und teilweise ein kritisch zu beurteilendes Studiendesign besitzen. Laut einer anderen Studie [34] verursacht niedrig dosiertes ASS gastroduodenalen Schaden, jedoch vor allem in Patienten >70J, sowie solchen mit einer Vorgeschichte von gastroduodenalen Ulzera. Interessanter Weise scheint sich der verursachte gastroduodenale Schaden durch ASS von dem durch andere nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) verursachten zu unterscheiden. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass die Autoren ihre Bewertungen auf Basis einer eher deskriptiven statt einer systematischen Analyse der gegenwärtigen Studienlage erreichen. Im klassischen Einsatzfeld von niedrig dosiertem ASS, nämlich der Primär- und Sekundärprävention bei koronarer Herzkrankheit (KHK) lässt sich jedoch eindeutig zeigen, dass Patienten mit einer stabilen KHK von niedrig dosiertem ASS bezüglich der Komplikationen der KHK profitieren, das Blutungsrisiko jedoch signifikant steigt (Odds Ratio 2,2; 95 % Konfidenzintervall 1,4-3,4) [35]. Neue Galeniken, die ASS an Phosphatidylcholin koppeln [36, 37] oder Stickstoffmonoxid (NO) freisetzen [38] und dadurch die GI-Toxizität verringern sollen, könnten hier ein Ausweg sein [39].

In jedem Fall ist eine zufriedenstellende, umfassende Beurteilung der Risiken von niedrig dosiertem ASS verglichen mit seiner Rolle in der Prävention des CRC gegenwärtig kaum möglich – die aktuellen Leitlinien raten daher von der Primärprophylaxe des CRC mittels ASS ab und empfehlen auch keine generelle Sekundärprophylaxe mit ASS nach erfolgter Polypektomie [40].

### 1.1.5 Prophylaxe der Colitis-assoziierten Karzinogenese

Die besprochenen Überlegungen zur CRC-Prophylaxe beziehen sich vor allem auf sporadische Karzinome, also solchen Karzinomen, die nicht auf der Basis einer CED oder bei einer familiären Belastung mit bestimmten, mit einem hohen CRC-Risiko verbundenen Genmutationen (Familiäre adenomatöse Polyposis, Hereditäre nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom) entstanden sind. Im Kontext der CED ergibt sich jedoch eine anders gelagerte Situation. Da hier davon ausgegangen wird, dass die chronische Entzündung letztlich zu oxidativem Stress und einer Fehlregulation einiger an der Karzinogenese beteiligten Gene, hier vor allem p53, DNA-Reparatur-Gene und möglicherweise des Nuclear factor-kappaB (NF-κB) [41] führt, muss davon ausgegangen werden, dass eine Unterdrückung der Inflammation auch mit einer niedrigeren Rate an Malignomentwicklung korreliert.

Aus epidemiologischen Studien gibt es Hinweise darauf, dass das erhöhte Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms durch die Einnahme von ASS vermindert werden kann [11, 12]. Bezüglich der ASS verwandten Aminosalicylate ist die Datenlage etwas besser, und obwohl auch hier nicht alle Studien eine signifikante Risikoreduktion zeigen konnten [9] wird aufgrund anderer, positiver Studien [10, 42-44] zumindest bei der Colitis Ulcerosa die Therapie mit 5-Aminosalicylsäure (5-ASA, Mesalazin) und Sulfasalazin auch mit dem Gedanken an die Prävention des Kolorektalen Karzinoms empfohlen [40, 45].

Bezüglich der Risiken der ASS-Einnahme ist die ohnehin spärliche Datenlage teilweise widersprüchlich und die Angst vieler Behandelnder vor gastrointestinalen Komplikationen und insbesondere vor einer Exazerbation bei Patienten in Remission groß. Obwohl es Hinweise gibt, dass NSAIDs zu einer Exazerbation von chronisch entzündlichen Darmerkrankung führen können [46, 47], gibt es dennoch bei der eingeschränkten Studienlage Hinweise darauf, dass selektive Blockade von Cyclooxygenase-1 (COX-1)

mittels niedrig dosierter ASS [48] oder die Gabe von niedrig dosierten NSAIDs inklusive ASS [49] diesbezüglich sicher ist. Die Daten hierzu beleuchten jedoch nur einen eingeschränkten Zeitraum, es gibt also kaum Daten zum Risiko bei langfristiger Einnahme von ASS bei Patienten mit CED. Dabei ist der molekulare Mechanismus, durch den ein Aufflammen der Entzündung bei der Einnahme von höher dosierten NSAIDs verursacht wird, nicht gut aufgeklärt [46]. Einige Autoren vermuten eine durch die NSAIDs verursachte Permeabilitätserhöhung der intestinalen Mukosa und damit ein Anstoßen einer entzündlichen Reaktion [50], andere sehen die Inhibition von COX-1 und COX-2 im Zentrum des Geschehens. Obwohl die Inhibition dieser beiden Enzyme eine anti-inflammatorische Wirkung unter anderem durch die Hemmung der Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-Bildung hat, scheint eine starke Senkung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration durch Hemmung von COX-1 und COX-2 gerade eine Exazerbation auszulösen [51], wohingegen selektive Inhibition von COX-1 hier ebenfalls zu keinem Aufflammen der Entzündung führte. Es scheint also einen komplexen Zusammenhang zwischen den an der eigentlichen Entzündungsreaktion beteiligten Enzymen und den gebildeten Mediatoren sowie deren Rolle in der Integrität der intestinalen Mukosa zu geben, der weiterer Erforschung bedarf.

### 1.1.6 Aktuelle Therapiestrategien

Die aktuellen Therapieempfehlungen der CED richten sich nach Art, Schwere und Hauptlokalisation der Erkrankung. Das Spektrum reicht von der medikamentösen Therapie eines akuten Schubes über supportive Maßnahmen während eines Schubes und zur Stabilisierung einer Remission bis hin zu chirurgischen Eingriffen bei Versagen der konservativen Therapie.

Medikamentös kommen vor allem anti-inflammatorisch wirksame Substanzen zum Einsatz. Bei der Colitis Ulcerosa stehen die Salizylate (5-ASA, Sulfasalazin) im Vordergrund, bei Morbus Crohn konnte zumindest bei 5-ASA bislang nicht eine gleichrangige Wirksamkeit nachgewiesen werden. Dagegen steht hier die Glukokortikoid-Therapie zunächst im Vordergrund, vorzugsweise mit dem systemisch wenig wirkenden Budesonid. Bei Therapieversagen oder fulminanten Verläufen kommen je nach

Schweregrad Prednisolon, Methylprednisolon sowie bei deren Versagen auch andere Immunsuppressiva wie Azathioprin oder 6-Mercaptopurin zum Einsatz [45, 52, 53].

Seit der Einführung von Therapien mit Antikörpern gegen den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) steht eine Gruppe sehr wirksamer Medikamente zur Therapie vor allem in schwierig zu beherrschenden Situationen zur Verfügung. Zudem werden weitere Medikamente aus der Gruppe der Biologika als mögliche Therapeutika der CED erforscht [2, 54]. Darunter sind vor allem Antikörper, aber auch rekombinant hergestellte Zytokine, die letztlich alle an Signalkaskaden und Zellrezeptoren, die an der Entzündungsreaktion beteiligt sind, angreifen. Die künftige Rolle dieser Substanzen ist schwierig einzuschätzen und zunächst vielversprechende Medikamente konnten bisher einen ausreichend überzeugenden Wirksamkeitsnachweis nicht erbringen. So wurde der Antikörper Natalizumab in den Vereinigten Staaten zur Therapie des Morbus Crohn in bestimmten Situationen zugelassen [55], erhielt jedoch in Europa keine Zulassung [56, 57]. Der Wirkmechanismus beruht hier auf einer Verminderung der Leukozytenadhäsion durch Blockade der Integrine  $\alpha_4\beta_1$  und  $\alpha_4\beta_7$ .

Zudem sind die Risiken, die mit den Biologikals verbunden sind, schwierig abzuschätzen. Bei den TNF- $\alpha$ -Antikörpern werden neben akuten Komplikationen wie fulminant verlaufenden Infektionen und Überempfindlichkeitsreaktionen [58] auch die langfristigen Nebenwirkungen, hier vor allem die Entwicklung von Malignomen, kontrovers diskutiert [59, 60]. Daher wird die Indikationen zu einer solchen Therapie weiterhin streng gestellt werden müssen.

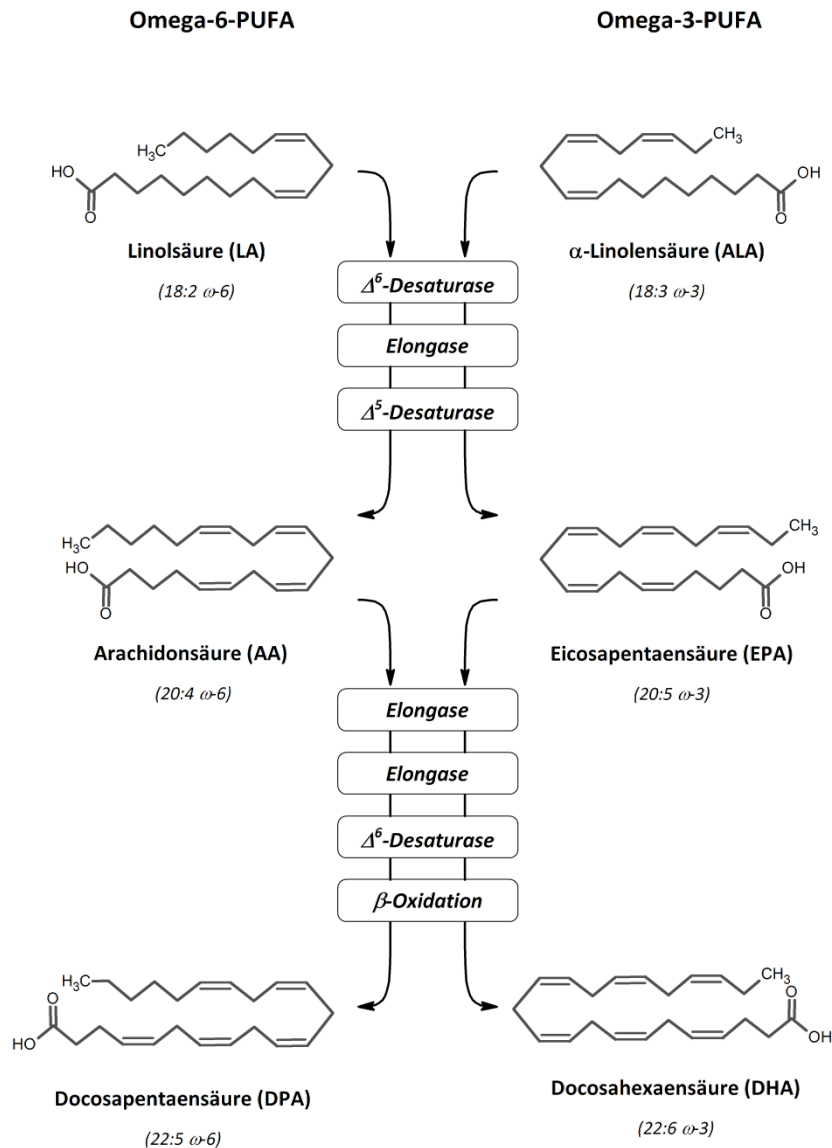
## **1.2 Omega-3- und Omega-6-mehrfach ungesättigte Fettsäuren**

### **1.2.1 Überblick**

Lipide sind an einem Großteil der physiologischen Funktionen des Körpers beteiligt. Neben der Bildung von Zellmembranen, der Energiebereitstellung und -speicherung sind sie zudem Ursprung von Mediatoren, die insbesondere auch an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Fettsäuren bestehen aus einer langkettigen, unverzweigten Kohlenstoffkette und einer Carboxygruppe. Als gesättigt bezeichnet man Fettsäuren ohne Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette. Entsprechend werden solche Fettsäuren, bei denen mindestens eine Doppelbindung in der Kohlenstoffkette vorliegt, als ungesättigt

bezeichnet. Liegen mindestens zwei Doppelbindungen vor, spricht man von einer mehrfach ungesättigten Fettsäure (Polyunsaturated fatty acid, PUFA). Diese werden in mehrere Gruppen weiter unterteilt. Namensgebend ist dabei die Position der ersten Doppelbindung, wobei von der ersten Methyl- oder omega-Gruppe aus begonnen wird zu zählen. Diese Nomenklatur wurde gewählt, da die Position der ersten Doppelbindung für die Stoffwechseleigenschaften dieser Fettsäuren entscheidend ist. So sind unter den PUFA zwei Gruppen für die menschliche Zellphysiologie von besonderer Bedeutung: omega-6-PUFA und omega-3-PUFA. Sie werden zudem als essenziell klassifiziert, da sie nicht von Säugetierorganismen gebildet werden können und daher mit der Nahrung in ausreichender Menge aufgenommen werden müssen.

Unter den omega-6-PUFA stellen die Arachidonsäure (AA, 20:4 $\omega$ -6) und die Linolsäure (LA, 18:2 $\omega$ -6) die beiden Hauptvertreter dar. Dabei besitzen die allermeisten Säugetiere die Fähigkeit Arachidonsäure aus Linolsäure durch Desaturasen zu einem gewissen Grad zu bilden. Als bekanntes Säugetier, dem dies nicht in ausreichender Menge gelingt, sei die Katze genannt. Da Arachidonsäure jedoch in den meisten Pflanzen in keiner oder nur geringsten Mengen vorkommt, ist die Katze daher ein obligater Fleischfresser [61] und dient als Studienobjekt zur Rolle dieser essenziellen Fettsäure [62]. Die wichtigsten omega-3-PUFA sind  $\alpha$ -Linolensäure (ALA, 18:3 $\omega$ -3), Eicosapentaensäure (EPA, 20:5 $\omega$ -3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6 $\omega$ -3). Auch hier können die langkettigen EPA und DHA aus der kürzerkettigen ALA synthetisiert werden. Da jedoch omega-3-PUFA und omega-6-PUFA hierbei auf die gleichen Enzyme angewiesen sind, ist die Rate an Konversionen und damit die Bildung von EPA und DHA auch vom Verhältnis der mit der Nahrung aufgenommenen Ausgangsprodukte abhängig (siehe Abbildung 2) [63].



**Abbildung 2. Die Synthese von Omega-6 und Omega-3-mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) (modifiziert nach Harris et al. [63]).** Säugetiere sind auf eine ausreichende Aufnahme von omega-6- und omega-3-PUFA durch die Nahrung angewiesen, da sie aufgrund der fehlenden Enzymausstattung diese nicht selbst bilden, sondern nur die kürzerkettigen Linolsäure (LA) und α-Linolensäure (ALA) verlängern können. Die allermeisten Säugetieren besitzen daher die Fähigkeit Arachidonsäure (AA) aus LA durch Desaturasen zu bilden. Die gleichen Enzyme werden für die Bildung der Omega-3-PUFA Eicosapentaensäure (EPA) aus ALA benötigt. Im letzten Schritt wird im Rahmen der β-Oxidation die Docosahexaensäure (DHA) gebildet. Dabei ist der erste Schritt im Rahmen dieses Stoffwechselwegs – die Einführung einer Doppelbindung in LA bzw. ALA durch die  $\Delta^6$ -Desaturase – der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Obwohl die Affinität der  $\Delta^6$ -Desaturase höher für ALA als für LA ist, bedingt die oftmals höhere Konzentration von LA im Vergleich zu ALA eine vermehrte Bildung von langkettigen Omega-6-PUFA. Durch diesen Mechanismus kann eine hohe Menge mit der Nahrung aufgenommener Omega-6-PUFA die Bildung von EPA und DHA vermindern [63-65].



## 1.2.2 Lipidmediatoren und ihre Rolle in entzündlichen Prozessen

Aus omega-3 und omega-6-PUFAs entstehen eine Reihe hochwirksamer Mediatoren, deren Rolle zunehmend besser verstanden wird. Dabei war in der Vergangenheit ein Großteil des Forschungsinteresses auf die proinflammatorischen Lipidmediatoren der omega-6-PUFA gerichtet. Ausgangsprodukt ist hier hauptsächlich die durch die Phospholipase-C und -A2 aus der Phospholipidbindung herausgelöste Arachidonsäure. Diese wird durch drei Enzymgruppen weiter konvertiert: den Cyclooxygenasen (COX-1, COX-2), den Lipoxygenasen (5-LO, 12-LO, 15-LO) und Cytochrom P450 (CYP) [66].

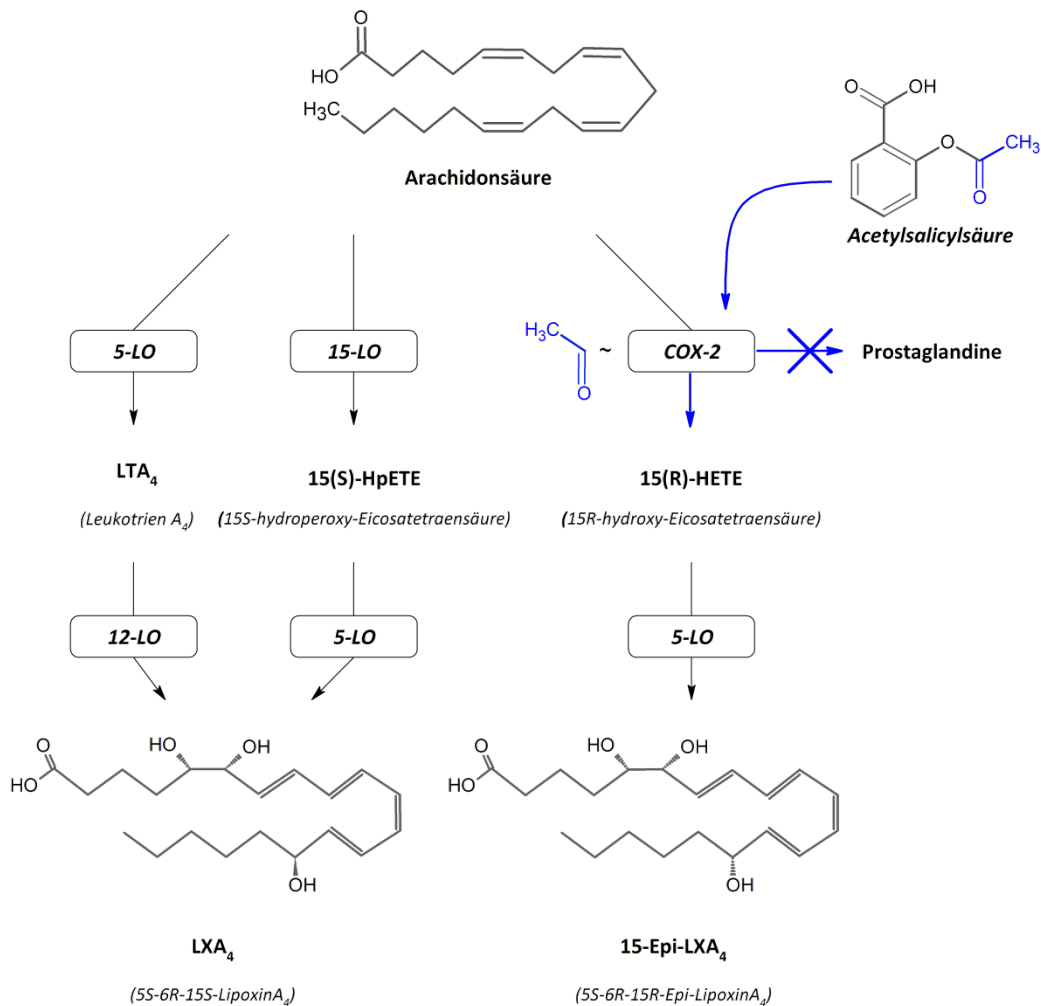
Über den Stoffwechselweg der Cyclooxygenasen werden über den gemeinsamen Zwischenschritt des Prostaglandin  $H_2$  eine Reihe verschiedener Mediatoren der Prostanoid-Gruppe gebildet, unter anderem  $PGE_2$  und Thromboxan  $A_2$  ( $TXA_2$ ). Prostaglandine finden sich in erhöhter Konzentration in entzündetem Gewebe und die Injektion von Prostaglandinen in nicht entzündetes Gewebe führt zu einer Entzündungsreaktion [67].  $TXA_2$  spielt eine entscheidende Rolle bei der Thrombozyten-Aggregation.

Als zweiter Stoffwechselweg werden unter Benutzung der Lipoxygenasen Leukotriene und Lipoxine gebildet. Leukotriene haben eine pro-inflammatorische Wirkung und spielen insbesondere bei allergischen Reaktionen, aber auch bei Infektionen und der Karzinogenese eine Rolle [66].

Zudem werden unter Benutzung der Lipoxygenasen aus Arachidonsäure auch die anti-inflammatorisch wirksamen Lipoxine gebildet [68]. Hier konnten mehrere Studien die anti-inflammatorische Wirkung der Lipoxine aufzeigen [69]. Im Kontext der CED ließ sich zudem in zwei Studien zur murinen, experimentellen Kolitis eine Entzündungsreduktion durch Lipoxin-Analoga demonstrieren [70, 71].

Es ist bemerkenswert, dass unter dem Einfluss von ASS auch die Cyclooxygenase in der Lage ist, ein deutlich wirksamere Untergruppe der Lipoxine zu bilden, die Aspirin-getriggerten-Lipoxine (ATLs) genannt werden (siehe Abbildung 3) [72]. Durch die Aufdeckung dieser Eigenschaft der ASS scheint auch der Wirkmechanismus zunehmend besser verständlich, der alleine durch die Inhibition der Prostaglandin-Bildung nicht

hinreichend erklärbar war. Im Kontext der CED soll dieser Wirkmechanismus in dieser Arbeit näher beleuchtet werden.



**Abbildung 3. Bildung der anti-inflammatorischen Omega-6-Mediatoren LipoxinA<sub>4</sub> und 15-Epi-LipoxinA<sub>4</sub>.** Durch Acetylsalicylsäure wird die Bildung der Prostaglandine durch die Cyclooxygenase-2 (COX-2) gehemmt, jedoch gleichzeitig durch eine Acetylierung des Enzyms die Bildung des anti-inflammatorischen Lipidmediators 15-Epi-LXA<sub>4</sub> beschleunigt. An der Synthese sind neben der Cyclooxygenase vor allem Lipoxygenasen beteiligt: 5-LO: 5-Lipoxygenase (vor allem aus neutrophilen Granulozyten); 15-LO: 15-Lipoxygenase (aus Epithelzellen & Monozyten); 12-LO: 12-Lipoxygenase (aus Thrombozyten) [73, 74].

Erst in den letzten 10 Jahren wird zudem die Rolle einer dritten Enzymgruppe, der Gruppe der Cytochrom P450 – Enzyme, im Arachidonsäurestoffwechsel besser verstanden. Unter anderem entsteht hier Epoxyeicosatriensäuren (EETs), die eine anti-inflammatorische, pro-fibrinolytische Wirkung zu haben scheinen [66]. Insgesamt ist die Rolle dieser Gruppe von Mediatoren jedoch noch Gegenstand intensiver Grundlagenforschung [75].

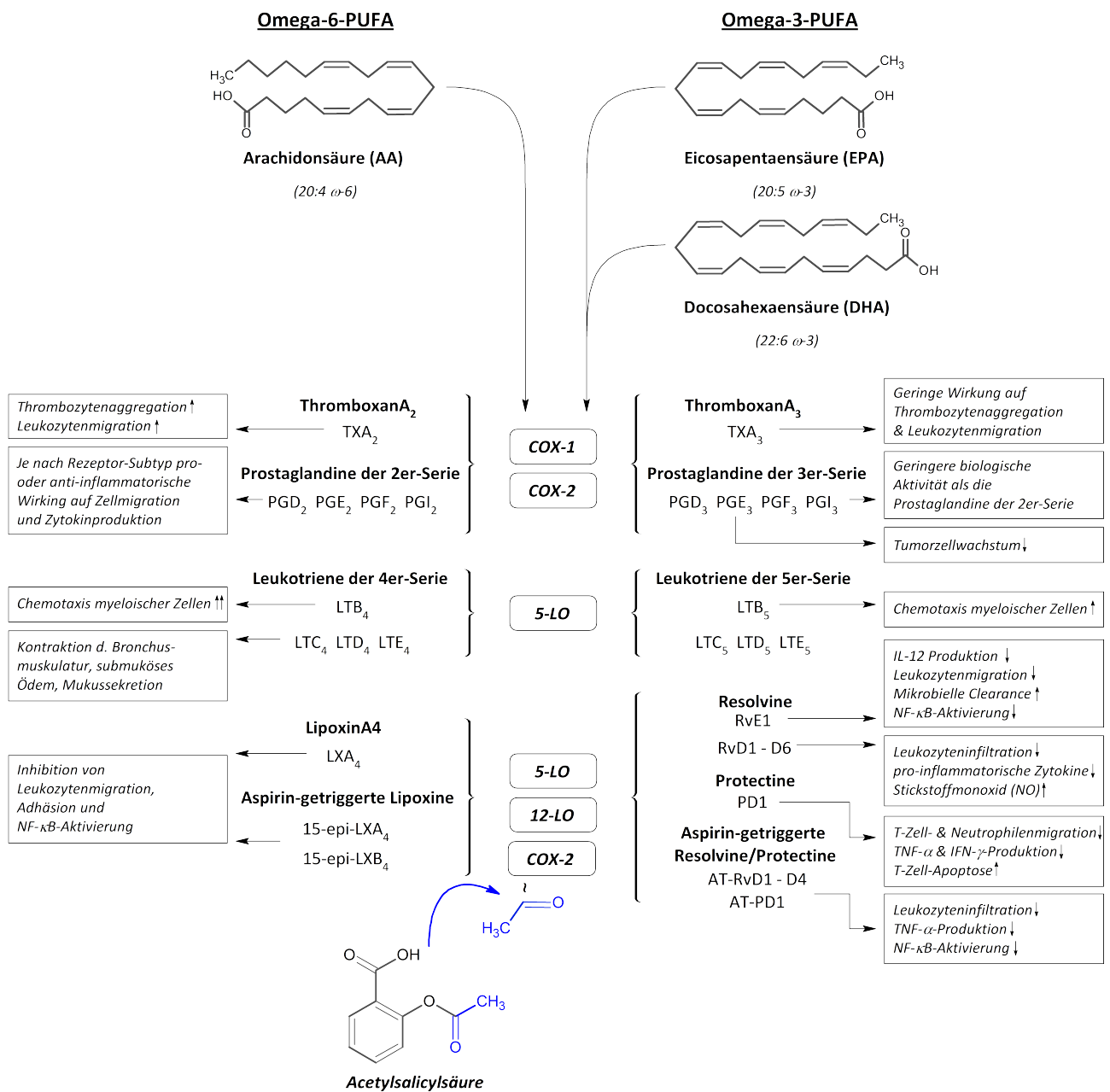
Auf der Seite der omega-3-PUFA wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, dass ihre anti-inflammatorischen Eigenschaften vor allem darauf beruhen, dass sie kompetitiv die

Bildung von Mediatoren aus omega-6-PUFA – insbesondere PGE<sub>2</sub> – hemmen [66, 76]. Erst in jüngerer Zeit wurden die antiinflammatorischen Eigenschaften von Lipidmediatoren aus den omega-3-PUFA selbst näher beschrieben [77]. Erstens können analog zur Bildung der Prostaglandine der 2er-Serie aus Arachidonsäure (PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> etc.) Prostaglandine der 3er-Serie aus EPA (PGE<sub>3</sub>, TXA<sub>3</sub> etc.) gebildet werden. Diese sind auf der einen Seite weniger aktiv als die entsprechenden Mediatoren der 2er-Serie [78-80], und auf der anderen Seite konnte zumindest für PGE<sub>3</sub> im Kontext der Karzinogenese eine signifikante Hemmung des Wachstums von Tumorzellen gezeigt werden [81].

Zweitens können über die Lipoxygenase-5 Leukotriene (LT) der 5er-Serie (im Gegensatz zur 4er-Serie aus Arachidonsäure), z.B. Leukotrien B<sub>5</sub> (LTB<sub>5</sub>), gebildet werden. Diese sind weniger biologisch aktiv als die entsprechenden Mediatoren der 4er-Reihe [82] indem vor allem das Potential, Leukozyten zur Migration und Aggregation im Gewebe zu bewegen, deutlich geringer ist [82]. Dies scheint möglicherweise für den positiven Effekt von omega-3-PUFA bei asthmatischen Erkrankungen eine Rolle zu spielen [83].

Am größten ist jedoch das Interesse an einer großen Gruppe von spezifischen omega-3-Mediatoren, die durch Lipoxygenasen, aber auch – analog der Bildung von ATLs – durch die (durch ASS) acetylierte Cyclooxygenase gebildet werden können. Aus DHA entstehen hier über die gemeinsame Zwischenstufe 17-hydroxy-DHA (17-HDHA) die sogenannten Protectine (PD) – hier vor allem (Neuro-)PD1, benannt nach dem initial beobachteten neuroprotektiven Effekt in ZNS-Ischämie-Modellen [84, 85] – und die Gruppe der sogenannten Resolvine (RvD<sub>1</sub> bis D<sub>6</sub>). Letztere sind benannt nach der „Auflösungs“-Phase (resolution) von Entzündungsreaktionen, wo sie zunächst entdeckt wurden (resolution phase interaction products) [86]. Auch aus EPA können über die gleichen Enzyme Mediatoren aus der Gruppe der Resolvine gebildet werden, die entsprechend der Systematik RvE<sub>1</sub> (bis RvE<sub>3</sub>) benannt werden [86, 87].

Die Gruppe der Resolvine und Protectine zeigen hierbei eine potente antiinflammatorische Wirkung auch im Kontext von CED [3]. Für ResovineE<sub>1</sub> konnte zudem ein eigener Rezeptor (ChemR23) identifiziert werden, welcher bei Bindung von RvE<sub>1</sub> eine verminderte Aktivität von NF-κB bewirken kann [88]. Der Transkriptionsfaktor NF-κB wird in praktisch allen Zellarten gefunden und spielt unter anderem bei der Entstehung und Unterhaltung von Entzündungsreaktionen sowie auch im Rahmen der Karzinogenese eine zentrale Rolle [89, 90]. Ein Überblick ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4. Überblick über die Bildung und Hauptwirkungen der einzelnen Lipidmediatoren aus omega-6- und omega-3-PUFA (modifiziert nach Weylandt et al. [77]).** Bei der Initiierung und Unterhaltung von Entzündungsreaktionen spielen vor allem Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und die Leukotriene der 4er-Serie eine Hauptrolle. Die entsprechenden omega-3-Mediatoren (Prostaglandine der 3er-Serie und Leukotriene der 5er-Serie) haben vor allem durch ihre deutlich geringere biologische Aktivität keine gleichwertige pro-inflammatorischen Wirkungen. Auf der Seite der omega-6-PUFA finden sich jedoch mit den Lipoxinen und Aspirin-getriggerten Lipoxinen (ATLs) eine Gruppe hochwirksamer antiinflammatorischer Mediatoren, die ähnliche Wirkungen wie die antiinflammatorischen Resolvine und Protectine haben [77, 91, 92].

### 1.2.3 Die Rolle des omega-3/omega-6 Verhältnisses in chronisch entzündlichen Erkrankungen

Auch wenn eine vereinfachte Zuordnung von omega-3- und omega-6-PUFA zu anti- bzw. pro-inflammatorischen Wirkungen dem tatsächlich wohl sehr komplexen Zusammenspiel im Verlauf von Entzündungsreaktionen nicht gerecht wird, so ist es doch von Interesse, dass sich das Verhältnis der mit der Nahrung zugeführten PUFAs im Laufe der vergangenen Jahrtausende von ~1 (omega-6- : omega-3-PUFA) zu 15:1–16,7:1 in westlichen Industrienationen geändert hat, wohingegen es anzunehmen ist, dass unser Genom weitestgehend identisch ist [20]. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass sich der Zellstoffwechsel und letztlich auch die Regulation von inflammatorischen Prozessen – evolutionär betrachtet – auf der Basis eines weitestgehend ausgewogenen Verhältnisses von omega-6- und omega-3-PUFA entwickelt hat und nun, da das Verhältnis deutlich zugunsten der vermeintlich proinflammatorischen omega-6-PUFA verlagert ist, insbesondere (auto)inflammatorische Prozesse anders ablaufen. Dies könnte insbesondere im Kontext von kardiovaskulären, chronisch-entzündlichen, autoimmun-, sowie letztlich auch Krebserkrankungen eine Rolle spielen [20, 77]. Einige Autoren argumentieren daher, dass möglicherweise die erhöhte Prävalenz einer ganzen Reihe von Erkrankungen, die vor allem in westlichen Industrienationen vorherrschen, nicht nur über die verminderte Prävalenz von Infektionserkrankungen erklärt werden kann, sondern auch geänderte Ernährungsgewohnheiten eine signifikante Rolle spielen [20].

Hierzu liefern molekularbiologische und tierexperimentelle Forschungen zunehmend bessere Erklärungsmodelle [93]. Dennoch ist die Studienlage zur Korrelation von aufgenommenen omega-3-PUFA und einem verminderten Risiko von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, Krebserkrankungen sowie auch der Gesamtmortalität insgesamt weiterhin umstritten [94-96]. Für das kardiovaskuläre System wurde die größte Anzahl an randomisierten klinischen Studien durchgeführt, die meisten im Kontext der Sekundärprävention [97]. Dabei zeigte sich bei früheren Studien ein kardioprotektiver Effekt der Nahrungsergänzung mit Fisch-Öl-Kapseln [98, 99], der jedoch bei neueren Studien nicht mehr nachweisbar war [100-102]. Möglicherweise kommen hier – neben einigen konzeptionellen Unterschieden im Studienaufbau wie Patientenanzahl im Verhältnis zur Anzahl der kardiovaskulären Ereignisse – auch die zunehmend bessere Behandlung der Patienten mit Statinen und Antikoagulantien als weitere Faktoren in

Frage, die eine Detektion eines (im Verhältnis zu den älteren Studien) geringeren protektiven Effekts der Nahrungsergänzung mit omega-3-PUFA erschweren [97].

## **1.3 Experimentelle Ansätze**

### **1.3.1 *in vivo***

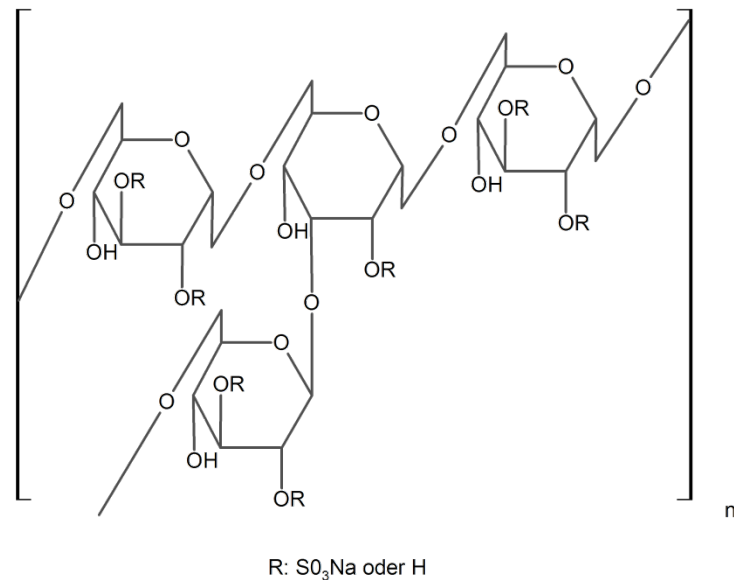
Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte haben sich immer mehr Nachweise ergeben, dass die Ätiologie der CED multifaktoriell ist. So scheinen Umweltveränderungen, genetische Faktoren, Veränderungen im Immunsystem sowie nicht zuletzt die Zusammensetzung der intestinalen mikrobiellen Flora entscheidend zu sein [2]. Neben epidemiologischen Studien haben insbesondere auch Tiermodelle zu diesem besseren Verständnis beigetragen [103]. Dabei scheinen gerade durch die multifaktorielle Ätiologie *in vivo*-Studien am besten in der Lage, das Erkrankungsbild simulieren zu können. Doch selbst hier bleibt wichtig zu bemerken, dass jedes Modell vor allem bestimmte Aspekte der humanen CED nachbildet. Die verfügbaren Tiermodelle lassen sich in fünf wesentliche Gruppen unterteilen: spontane Kolitis, chemisch induzierbare Kolitis, durch adoptiven Zelltransfer induzierbare Kolitis, transgene (Maus-)Modelle und schließlich Modelle mit knock-out-Mäusen [104].

Als Tiermodell mit einem spontanen Auftreten von CED sind die Lisztaffen (*Saguinus oedipus*) zu nennen. Bei diesen Tieren lässt sich eine erhöhte Inzidenz von Kolitis sowie auch die Entwicklung von Kolonkarzinomen beobachten. Die Ausprägung hängt jedoch vor allem von Umweltfaktoren ab – insbesondere Veränderungen durch die Haltung unter Laborbedingungen im Vergleich zur natürlichen Umgebung der Tiere scheinen eine wichtige Rolle zu spielen, da bei Tieren, die in ihrer natürlichen Umgebung beobachtet werden, die Inzidenz deutlich geringer und die Entwicklung von Kolonkarzinomen hier gar nicht beobachtet wird [105].

Bei den Tiermodellen, bei denen die Kolitis chemisch induziert wird, werden vor allem 2,4,6-Trinitrobenzolsulfat (TNBS) oder Dextran-Natrium-Sulfat (Dextran Sodium Sulfate – DSS, siehe Abbildung 5) verwendet. Bei der TNBS-Kolitis wird den Versuchstieren TNBS gelöst in Ethanol intrarektal instilliert. Dies löst eine Kolitis mit einer transmuralen granulomatösen Entzündungsreaktion mit schweren Diarrhoen und Gewichtsverlust aus, wobei jedoch die Schwere und der Verlauf von der Zusammensetzung der Darmflora, der jeweiligen Spezies und nicht zuletzt dem genetischen Hintergrund der Tiere abhängt [104].

Bei der DSS-induzierten Kolitis wird den Versuchstieren Trinkwasser, welches mit 3-5 % (abhängig von der Anfälligkeit des jeweiligen Tiermodells) DSS-Polymeren versetzt ist, über mehrere Tage verabreicht. Die Versuchstiere entwickeln daraufhin eine akute Kolitis mit blutigen Diarrhoen, Ulzerationen und histologisch detektierbare epitheliale Schäden mit Infiltration der Mukosa durch neutrophile Granulozyten [104]. DSS scheint dabei eine direkt toxische Wirkung auf die Epithelzellen zu haben und so die epitheliale Barrierefunktion zu stören [103, 106]. In Tiermodellen mit fehlenden B- und T-Zellen ist eine Kolitis mit DSS ebenfalls auslösbar, so dass wahrscheinlich das adaptive Immunsystem hier eine untergeordnete Rolle spielt und die Entzündungsreaktion hauptsächlich über das angeborene Immunsystem entsteht [107]. Pathophysiologisch erzeugt DSS im Darmlumen eine Verknüpfung von Fettsäuren mittlerer Kettenlänge (z.B. Decansäure). Gemeinsam bilden diese Substanzen daraufhin Vesikel, die mit der Plasmamembran der Epithelzellen verschmelzen und möglicherweise über diesen Mechanismus proinflammatorische Signalkaskaden auslösen [108]. Die Rolle dieser intraluminalen Fettsäuren erscheint zudem nicht zuletzt dadurch plausibel, dass eine fettreiche Nahrung die Ausprägung der DSS-Kolitis verstärkt [108].

Zudem ist es mit DSS ebenfalls möglich durch mehrere Zyklen (in niedrigerer Dosierung – z.B. 1,5 %) eine chronische Kolitis zu erzeugen und durch die Applikation des genotoxischen Agens Azoxymethan (AOM) steht ein Tiermodell zur Kolitis-assoziierten Kolonkarzinogenese zur Verfügung [103, 109].



**Abbildung 5. Chemische Struktur von Dextran-Natrium-Sulfat (Dextran Sodium Sulfate – DSS).** DSS ist ein Heparin-ähnliches, verzweigt-kettiges Polysaccharid, welches ca. 17 % Schwefel in bis zu drei Sulfatgruppen pro Molekül Glukose enthält [110].

Beim adoptiven Transfer werden bestimmte Zellen (z.B. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) in Versuchstiere mit einem Immundefekt übertragen und induzieren dort eine Entzündungsreaktion. In diesen Modellen kann z.B. die Rolle der T-Zellen im Rahmen der Entzündungsreaktion sehr gut untersucht werden [104].

Zuletzt lassen sich durch den knock-out von z.B. Interleukin-10 experimentelle Modelle der CED erstellen. Hier ist die Ausprägung sowie das Befallsmuster je nach verändertem Gen unterschiedlich. Eine Übersicht über die Tiermodelle zu entzündlichen Darmerkrankungen ist in Tabelle 1 dargestellt.



**Tabelle 1. Übersicht der Tiermodelle zu entzündlichen Darmerkrankungen (modifiziert nach Wirtz et al. [104], Rath et al. [111] und Steinhoff et al. [112])**

Modell	Spezies	Befallsmuster	Pathomechanismus
<b>Spontan</b>			
Lisztaffen ( <i>Saguinus oedipus</i> )	Primaten	Colon	T-Zell-vermittelte Entzündung
C3H/HeJBir	Maus	Caecum, Colon ascendens	T-Zell-Aktivierung durch bakterielle Antigene
<b>Induzierbar</b>			
DSS (Dextran-Natrium-Sulfat)	Maus, Ratte	Colon	Toxischer Schaden des intestinalen Epithels / Aktivierung von mukosaständigen Immunzellen ( $T_H1/T_H2$ )
TNBS (2,4,6-Trinitrobenzolsulfat)	Maus, Ratte, Kaninchen	Colon	$T_H1$ -vermittelte Immunantwort gegen bakterielle Antigene
<b>Adoptiver Zelltransfer</b>			
CD45RB <sup>High</sup> → SCID-Mäuse	Maus	Colon, Duodenum	IL-12 getriggert / $T_H1$ -vermittelt
Hsp60-spezifische CD8 <sup>+</sup> Zellen → TCR $\beta$ <sup>-/-</sup>	Maus	Dünndarm	Antigen-vermittelt (heat shock protein 60) / CD8 <sup>+</sup> T-Zellen
<b>Transgene Modelle</b>			
HLA-B27	Ratte	Magen, Ileum, Colon	$T_H1$ -vermittelt / Kontakt mit bakteriellen Antigenen der normalen Darmflora
STAT-4	Maus	Colon	Aktivierung des IL-12 Pathways / $T_H1$ -, TNF- $\alpha$ -, IFN- $\gamma$ -vermittelt
<b>Gen-knock-out</b>			
IL-2 knock-out	Maus	Colon	IFN- $\gamma$ Produktion / $T_H1$ -Pathway
IL-10 knock-out	Maus	Colon, Jejunum, Ileum	$T_H1$ -vermittelt / Kontakt mit bakteriellen Antigenen

Im Kontext dieser Studie erschien uns ein einfaches, gut reproduzierbares und weit verbreitetes Tiermodell am geeignetsten. Daher wurde das DSS-Kolitis-Modell an C57BL/6-Mäusen untersucht.

### 1.3.2 Kleintier-MRT

Die nicht-invasive Evaluation der Entzündungsaktivität im Rahmen von Tiermodellen von CED ist bisher auf klinische Parameter wie Gewicht, Stuhlkonsistenz und rektale Blutabgänge beschränkt. Genauere Aussagen zum Ausmaß der Entzündung im zeitlichen Verlauf sind daher vor allem durch den Einsatz einer erhöhten Anzahl von Versuchstieren möglich. Um dies jedoch zu minimieren und auch einzelne Versuchstiere an mehreren Zeitpunkten zu untersuchen (und dadurch mögliche Messabweichungen durch interindividuelle Variabilität zu minimieren), wäre der Einsatz von nicht invasiven, bildgebenden Methoden wünschenswert. Hier stellt die Kleintier-Magnet-Resonanz-

Tomographie eine interessante Möglichkeit dar. Hierbei sind im Mausmodell die am häufigsten verwendeten Messgrößen die Wanddicke des Kolons, gefolgt von der Signalintensität in T2-gewichteten Bildern und schließlich (wegen der aufwändigeren Vorbereitung) die Aufnahme von Kontrastmittel im T1-gewichteten Bild [113]. Insgesamt ist diese Methodik jedoch noch nicht gut etabliert. Für die DSS-Kolitis im Speziellen konnten andere Arbeitsgruppen bereits zeigen, dass Wanddicke, Signalintensität und Kontrastmittelverhalten mit dem histologisch gesicherten Ausmaß an Entzündungsaktivität korrelieren [114, 115]. Darüber hinaus ist auch eine quantitative Messung von endothelialen Leckagen möglich [116].

Schließlich kann der Einsatz einer nicht-invasiven Bildgebung möglicherweise auch in Tiermodellen zur Kolonkarzinogenese Aufschlüsse zur frühen Tumorentwicklung geben und auch hier die Anzahl der für präklinische Studien genutzten Versuchstiere reduzieren [117].

## 2. Fragestellung

Die Entstehung, Unterhaltung und Auflösung von Entzündungsreaktionen untersteht einer Vielzahl von Faktoren. Unter anderem wird die zentrale Rolle von Lipidmediatoren mit ihren pro- sowie auch anti-inflammatorischen Effekten zunehmend besser verstanden [77]. Dabei stellt sich das initial postulierte Paradigma, dass Lipidmediatoren der omega-6-PUFAs pro- und Lipidmediatoren der omega-3-PUFAs anti-inflammatorische Wirkungen zeigen, als zu vereinfacht dar. Nicht zuletzt werden in diesem Kontext auch neue Aspekte der Wirkungsweise von weit verbreiteten Medikamenten wie der Acetylsalicylsäure (ASS) entdeckt [4]. Hier scheint ASS neben der Inhibition der Prostaglandin-Bildung auch durch die Bildung von anti-inflammatorischen omega-6-PUFAs (den Lipoxinen) einen entscheidenden Beitrag in der Auflösung von Entzündungsreaktionen zu leisten [72].

In der hier vorgelegten Arbeit sollen daher die Effekte der ASS auf die Bildung dieser anti-inflammatorischen Mediatoren in einem Mausmodell zur chemisch induzierten, akuten DSS-Kolitis untersucht werden. Dieses Modell wurde gewählt, da das DSS-Kolitis-Modell ein gut etabliertes und weit verbreitetes Tiermodell zur Evaluation von therapeutischen Interventionen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen darstellt [118].

Methodisch soll der Effekt von ASS auf die Entzündungsaktivität durch Erfassung von Phänotyp sowie erweiterten post-mortem Analysen (unter anderem durch Messung der Lipidmediatorkonzentrationen im Kolongewebe) untersucht werden. Zur besseren Erfassung der Entzündungsreaktion im zeitlichen Verlauf und als Basis für weitere Untersuchungen soll neben diesen etablierten Methoden ein strukturierter Algorithmus zur intravitalen Bestimmung der Entzündungsaktivität mittels Kleintier-MRT entwickelt werden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Tiermodell**

Als Versuchstiere wurden weibliche C57BL/6-Mäuse von der Firma Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts, USA) erworben.

Mit dem Experiment wurde begonnen, sobald die Tiere ein Alter von 6 Wochen und ein Körpergewicht von 19-21 g erreicht hatten. Die in diesem Versuch verwendeten Tiere standen unter der Pflege der Mitarbeiter des Massachusetts General Hospitals (Massachusetts, USA) und wurden entsprechend den geltenden Richtlinien und unter der Überwachung der zuständigen Kommission für Tierversuche (Massachusetts General Hospital Subcommittee on Research Animal Care) unter der Protokoll-Nr. 2004N000101 (PI Jing X Kang) gehalten.

### **3.2 Versuchsaufbau**

Die in den Versuch eingeschlossenen Mäuse wurden in drei Gruppen unterteilt. Die ersten zwei Gruppen erhielten 3 % Dextran-Natriumsulfat (DSS, MP Biomedicals, Solon, Ohio, USA) aufgelöst in sterilem Trinkwasser für insgesamt 5 Tage. Danach wurde das Trinkwasser wieder mit sterilem Trinkwasser ersetzt. Die dritte Gruppe erhielt kein DSS und diente als Kontroll-Gruppe.

Des Weiteren wurden den Mäusen jeweils während der 5 Tage der DSS-Administration täglich intraperitoneale Injektionen verabreicht. In der ersten Gruppe enthielten diese 0,5 mg Acetylsalicylsäure (ASS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), aufgelöst in 0,3 ml isotonischer Kochsalzlösung mit 3,33 % Ethanol. Die Tiere in der zweiten und dritten Gruppe erhielten über 5 Tage lediglich die Trägerlösung täglich injiziert.

Täglich wurde das Körpergewicht aller Mäuse erfasst und – sofern möglich – Stuhlproben gewonnen. Diese wurden durch folgende Skala von 0 bis 3 evaluiert. Dabei wurde neben der makroskopischen Beurteilung ein Test für okkultes Blut verwendet (Hemocult®, Beckman Coulter Inc., Fullerton, California, USA) und wie folgt bewertet: 0 = geformter

Stuhl, kein okkultes Blut, 1 = geformter Stuhl, Test für okkultes Blut leichtgradig positiv, 2 = geformter Stuhl, Test für okkultes Blut hochgradig positiv, 3 = blutige Diarrhoe.

An Tag 9 des Versuches wurden die Versuchstiere mit Isofluran anästhesiert und nach Eröffnung des Thorax in der Medioklavikularlinie eine intrakardiale Punktion mit Abzug des verfügbaren Blutvolumens durchgeführt. Hierdurch trat der Tod der Tiere ein. Die gewonnenen Blutproben wurden mit unfraktioniertem Heparin antikoaguliert und das Serum mittels Zentrifugation (5000 x g, 5 min) gewonnen. Das Kolon wurde exidiert, mit PBS gespült und die Länge vermessen. Alle Proben wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

### **3.3 Histologische Analyse**

Gefrorene Proben des distalen Kolons wurden in OCT-Medium fixiert (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura Finetek, Torrance, California, USA), in einer Dicke von 5 µm in einem Gefriermikrotom (Leica CM3050 S, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) geschnitten und auf Glasobjektträgern luftgetrocknet. Danach wurden die Schnitte in einem Fixiermedium fixiert (70 % Ethanol [EtOH], 4 % Formaldehyd, 5 % Acetat in H<sub>2</sub>O) und anschließend in EtOH (70 %) sowie H<sub>2</sub>O gewaschen.

Nach einer standardisierten Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Gewebeschnitte einem erfahrenen Pathologen (Jonathan N. Glickman, M.D., Ph.D, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, USA<sup>1</sup>) ohne Kenntnis der Gruppenzuordnung vorgelegt und in jeweils vier Kategorien beurteilt. Diese waren im Einzelnen: Schweregrad der Entzündung (0 = keine Entzündung, 1 = geringe Entzündungsaktivität, 2 = mäßige Entzündungsaktivität, 3 = ausgeprägte Entzündungsaktivität), Tiefenausdehnung der Entzündung (0 = keine Entzündung, 1 = auf Mukosa begrenzt, 2 = Mukosa plus Submukosa, 3 = alle Wandschichten), Charakter der entzündlichen Läsionen (0 = intaktes Epithel, 1 = Störung der physiologischen Architektur, 2 = Erosion, 3 = Ulzeration) und Ausmaß der Läsionen (0 = keine Läsionen, 1 = nur punktuell, 2 = multifokal, 3 = diffus).

---

<sup>1</sup> *aktuelle Adresse: GI Pathology, Boston Caris Diagnostics, Newton, MA 02464*

### **3.4 Immunhistochemie**

Zur weitergehenden Analyse der COX-2-Expression wurden aus den angefertigten Kryoschnitten immunhistochemische Färbungen angefertigt. Hierzu wurden die luftgetrockneten, bei -80 °C gelagerten Schnitte zunächst auf Raumtemperatur gebracht und anschließend für 5 Minuten in -20 °C kaltem Aceton fixiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS für jeweils 2 Minuten und die Inaktivierung der endogenen Peroxidase mit 3 % Wasserstoffperoxid für 5 Minuten. Nach erneuter Waschung (3x PBS für jeweils 3 Minuten) wurden mit 10 % Ziegen Serum in PBS für eine Stunde unspezifische Bindungsstellen blockiert. Es erfolgte nun die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen murines COX-2 (COX-2 murine polyclonal antibody, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA), 1:100 gelöst in 5 % Ziegen Serum in PBS übernacht bei 4 °C in einer mit hoher Luftfeuchtigkeit versehenen Kammer. Nach Waschung erfolgte schließlich die Inkubation mit dem gegen den ersten Antikörper und mit einer Meerrettichperoxidase konjugiertem zweiten Antikörper (monoclonal, goat-anti-rabbit HRP-conjugated antibody, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) in einer Verdünnung von 1:500 wiederum in 5 % Ziegen Serum in PBS für eine Stunde. Nach erneuten Waschschrten erfolgte schließlich die Zugabe des 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB)-Farbsubstrats (Pierce Biotechnologie, Rockford, Illinois, USA) für 2 Minuten. Abschließend wurde nach entsprechender Waschung eine Hämatoxylin-Färbung durchgeführt und die gefärbten Schnitte nach der Dehydrierung in aufsteigend konzentrierten EtOH-Bädern (70 %, 95 %, 100 %) und anschließendem Xylen-Bad fixiert und unter einem Lichtmikroskop betrachtet.

### **3.5 TNF- $\alpha$ ELISA**

Die TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum wurde mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Hierzu wurde ein vorgefertigter Test (Mouse TNF- $\alpha$  ELISA ReadySETGo!, eBioscience, San Diego, California, USA) nach der Anleitung des Herstellers verwendet. Nach der Beschichtung einer 96-Mikrotiterplatte mit einem aufgereinigten TNF- $\alpha$ -Antikörper und den entsprechenden Waschschrten wurden jeweils 100 $\mu$ l der gewonnenen Serum-Proben zur TNF- $\alpha$ -Konzentrationsmessung übernacht bei 4 °C inkubiert. Für jedes Tier erfolgte hierbei eine 3-fache Messung. Nach erneuter Waschung wurde ein zweiter Biotin-konjugierter-TNF- $\alpha$ -Antikörper und schließlich nach erneuten Waschschrten mit einem Avidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat inkubiert.

Schließlich wurde unter Verwendung von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin eine Farbreaktion ausgelöst und die Absorption bei 450 nm mit einem Photometer gemessen (Wallac 1420 Victor Multilabel Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

### **3.6 Protein-Extraktion und COX-2 Western Blot**

Zur Extraktion von Protein-Proben aus dem gewonnenen Kolon-Gewebe wurde ein Extraktions-Kit der Firma Pierce verwendet (T-PER Tissue Protein Extraction Reagent, Rockford, Illinois, USA). Hier wurde die Anleitung des Herstellers befolgt und die Proteinkonzentration des gewonnenen Extrats bestimmt (Coomassie Plus – The Better Bradford™ Assay Kit, Pierce, Rockford, Illinois, USA). Zur Verwendung im Western Blot wurden jeweils 35µg Protein mit dem für das verwendete Gel optimierte Proben-Puffer (TruSep Tris Glycine SDS Sample buffer, NuSep, French's Forrest, NSW, Australien) vermischt, erhitzt und in ein 4-20 % Tris-Glycin, 1mm, 10 well mini iGel (ebenfalls NuSep) geladen. Danach wurde die Proben elektrophoretisch unter Verwendung des vom Hersteller des Gels empfohlenen Puffers (SDS Glycin Running Buffer) in einer entsprechenden Kammer (Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA) aufgetrennt.

Die Proteine wurden dann auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc.), geblockt und zunächst mit einem gegen murines COX-2 gerichteten Antikörper inkubiert (COX-2 murine polyclonal antibody, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) und nach erneutem Waschen mit einem mit Meerrettichperoxidase konjugiertem, gegen den ersten Antikörper gerichtetem Zweitantikörper inkubiert (monoclonal, goat-anti-rabbit HRP-conjugated antibody, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Zur Visualisierung wurde das SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, Illinois, USA) verwendet, mit dem anschließend ein Röntgen-Film (Kodak X-ray film, Kodak, Rochester, New York, USA) belichtet wurde. Dieser wurde in einem automatisierten Entwickler entwickelt (Kodak film processor, Kodak, Rochester, New York, USA).

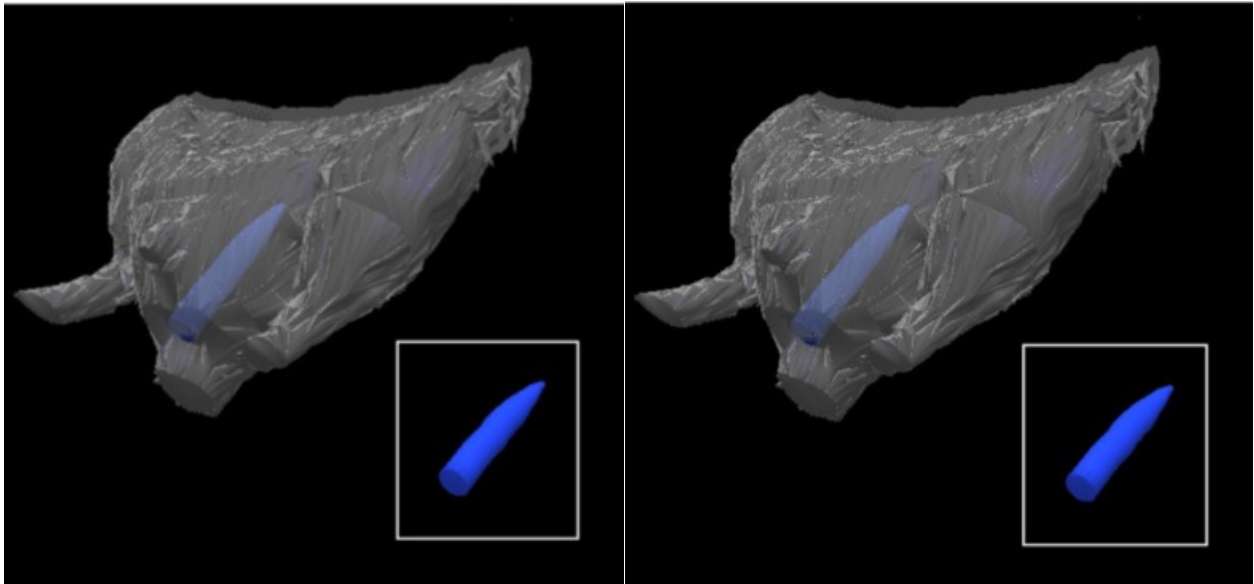
### 3.7 Magnet-Resonanz-Tomographie

Die MRT-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Xiangzhi Zhou und Yanping Sun am Brigham and Women's Hospital, Department of Radiology, Harvard Medical School, Boston, durchgeführt.

An den Tagen 3 und 8 wurden jeweils drei Mäuse aus den verschiedenen Gruppen zur besseren Evaluation des Krankheitsverlaufes einer MRT-Untersuchung unterzogen. Hierzu wurde ein Bruker 4,7 Tesla Avance horizontal bore system (Bruker Avance, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Vor der Untersuchung wurden die Mäuse mit einer 1,5 bis 2 %igen (vol/vol) Inhalation mit Isofluran (Baxter, Deerfield, Illinois, USA) in 1 Liter pro Minute Sauerstoff anästhesiert. Die Tiere wurden dann auf einer nichtmagnetischen, selbstgebauten Haltevorrichtung fixiert und die Inhalation des Anästhetikums über einen angebrachten Trichter vor Nase und Mund fortgeführt. Während der gesamten Untersuchung wurde die Atemfrequenz mit einem Monitor-System überwacht (Small Animal Instruments Inc., NY). Die Isofluran-Konzentration wurde so angepasst, dass eine Atemfrequenz von 20-30 pro Minute erreicht wurde. Bei dieser Atemfrequenz ist eine problemlose Untersuchung möglich, ohne jedoch eine gefährliche Hypoxämie hervorzurufen.

Um bei der Messung der Wanddicke sowie der Signalintensität in der T2-Wichtung eine gute Vergleichbarkeit zu erreichen wurde ein an der Spitze konisch geformtes, nichtmagnetisches Plastikrohr (Außendurchmesser 2,1 mm) ca. 9 mm rektal eingeführt (Abbildung 6). Die Haltevorrichtung wurde in einer 32 mm messenden sogenannten Vogelkäfig-Spule (bird cage coil) platziert und es wurden T2-gewichtete axiale Bilder mit einer Repetitionszeit von 2683 ms, einer Echozeit von 12 ms auf einer Matrix von 128 x 128 und einem Bildausschnitt von 3 x 3 cm gewonnen. Die Schichtdicke wurde auf 1 mm gesetzt.

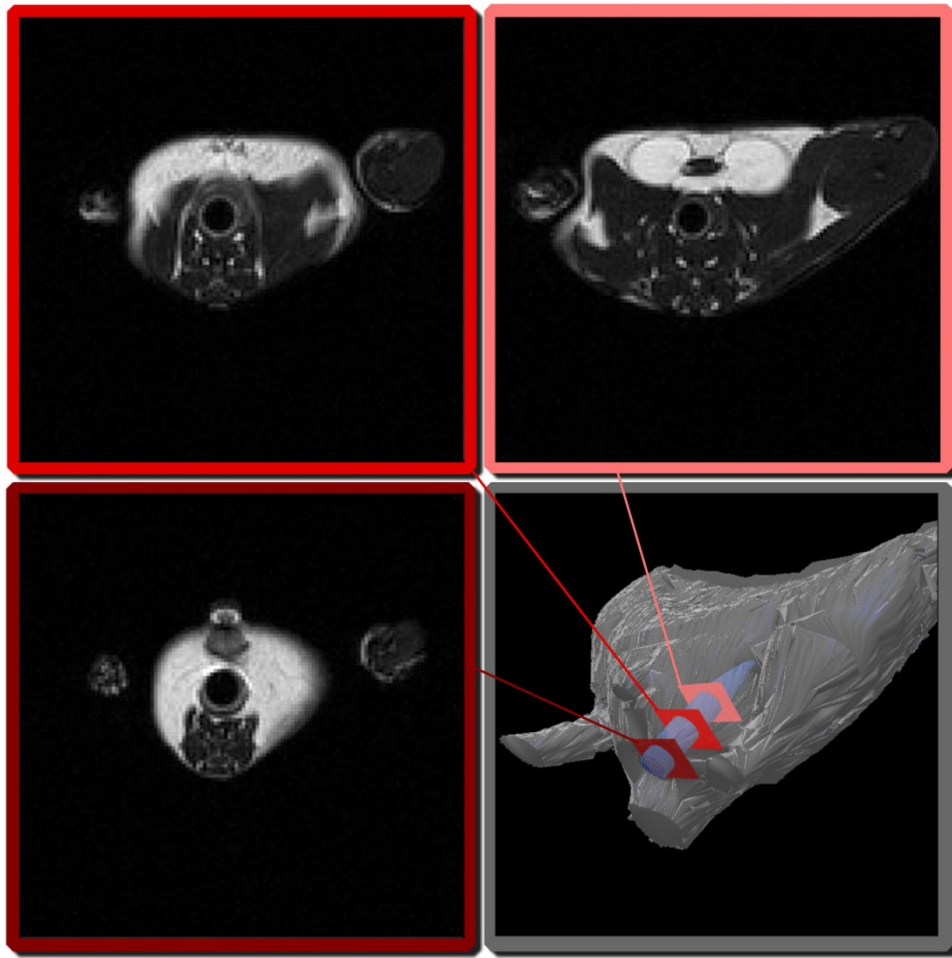




**Abbildung 6. Intrarektale Positionierung des nichtmagnetischen Plastikrohrs während der MRT-Untersuchung.**

Nach der Gewinnung der Bilder wurden die Mäuse aus der Haltevorrichtung entfernt und auf einer Heizdecke belassen, bis sie wieder vollständig erwacht waren. Sämtliche Messungen verliefen komplikationslos und die anästhesierten Tiere erwachten prompt und zeigten nach der Messung keine Änderung in ihrem Verhalten.

Um eine leicht zugängliche, gut vergleichbare Bildauswertung zu verwenden, wurden die gewonnenen Bilder in ein standardisiertes Bildverarbeitungsprogramm geladen (Adobe Photoshop, Adobe Systems, San Jose, California, USA). Die Wanddicke wurde mit dem Lineal-Werkzeug an 3 verschiedenen Stellen und in 3 Schichten, die jeweils 3 mm voneinander entfernt lagen, bestimmt (Abbildung 7).

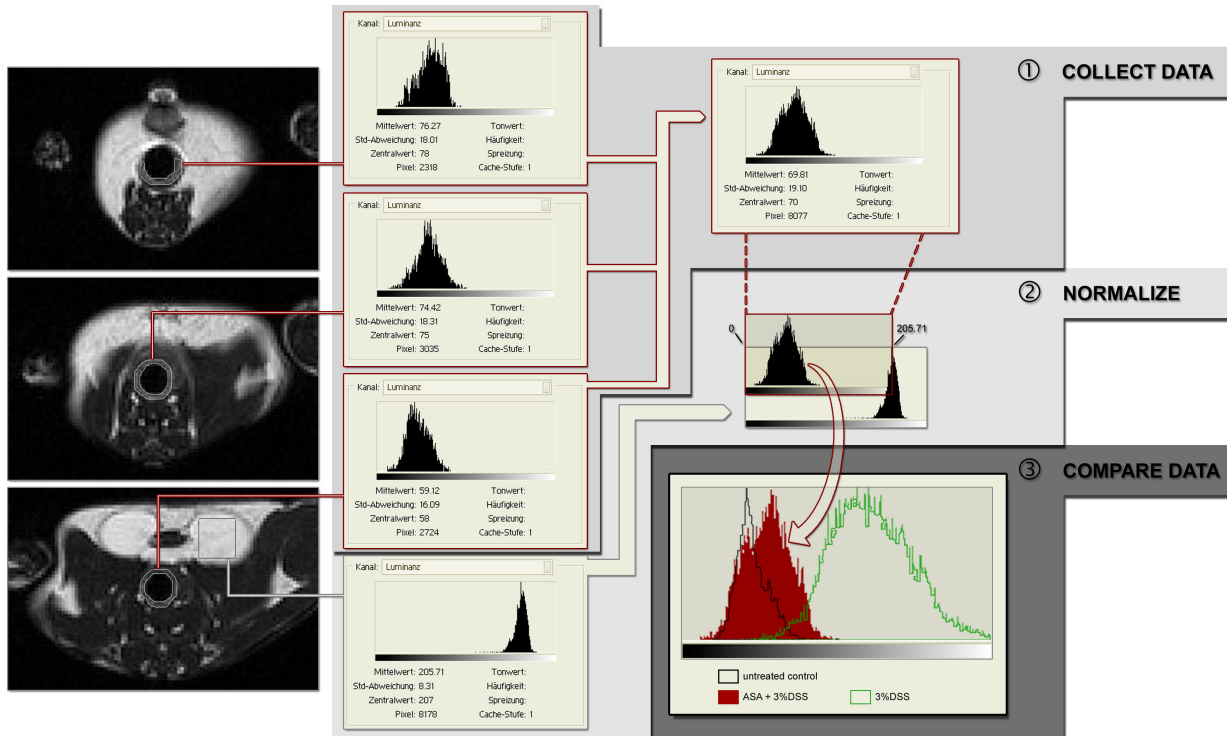


**Abbildung 7. Schematische Darstellung der Schichtselektion.** Pro Tier wurden jeweils drei Schichten im Abstand von je 3 mm zur Messung herangezogen.

Anschließend wurde der Mittelwert aus den 9 pro Versuchstier gemessenen Wanddicken für jedes der untersuchten Tiere errechnet.

Um aus den T2-gewichteten Bildern die Signalintensität der Kolonwand zu bestimmen, wurde per Hand die Kolonwand ausgeschnitten und aus diesem Ausschnitt mittels des Histogramm-Werkzeugs die Helligkeit der ausgeschnittenen Bildregion bestimmt. Dies wurde bei jedem Tier auf den gleichen drei Schichten, die bereits für die Wanddickenbestimmung genutzt worden waren, wiederholt. Der Mittelwert aus diesen Messungen wurde dann gegen die Helligkeit des fettreichen Gewebes um die Ovarien normalisiert (Abbildung 8).

## FLOWCHART - Image Analysis using Luminescence Histogram



**Abbildung 8. Schematische Darstellung der Helligkeitsmessung durch das Histogramm-Werkzeug.** Zunächst wurden die Kolonwand aus dem Bild ausgeschnitten und aus den einzelnen Schichten die Helligkeitswerte bestimmt. Als Kontrolle diente das fettreiche Gewebe im Bereich der Ovarien, auf die die gemessene Helligkeit normalisiert wurde.

### 3.8 Analyse der Lipid-Mediatoren

Die Probenvorbereitung und LC-MS/MS Messungen wurden von Beate Gomolka und Dr. Michael Rothe bei der Lipidomix GmbH Berlin durchgeführt.

Zur Analyse der Lipid-Mediatoren wurden 30mg der gefrorenen Kolon-Proben unter ständiger Kühlung mit flüssigem Stickstoff mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden 500 µl H<sub>2</sub>O sowie 500 µl Methanol und ein interner Standard (bestehend aus 10 ng LTB<sub>4</sub>-d<sub>4</sub>) hinzugefügt und das Gemisch unter Beigabe von 300 µl 10M Natriumhydroxid für 30 min bei 60 °C hydrolysiert. Danach wurde mit 60 % Essigsäure neutralisiert und der pH-Wert wurde unter Verwendung eines Natriumacetat-Puffers auf 6,0 eingestellt. Anschließend wurde ein Festphasenextraktion unter Verwendung einer Anionen-Austausch-Trennsäule (Varian Bond Elute Certify II, Varian, Inc., Palo Alto, California, USA) wie bereits beschrieben durchgeführt [119, 120]. Zur Elution wurde eine mobile Phase bestehend aus n-Hexan:Essigsäureethylester im Verhältnis 25:75 mit 1 %

Essigsäure verwendet. Das Eluat wurde bei 40 °C unter einem kontinuierlichen Fluss von Stickstoff evaporiert, so dass ein fester Rückstand verblieb. Dieser wurde dann in 70 µl Acetonitril aufgelöst.

Die so gewonnenen Proben wurden von der Firma Lipidomix GmbH, Berlin in einem Agilent 6410 Triplequad HPLC System (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) mit binärer Pumpe, Autosampler und Trennsäulenheizung gemessen. Hier wurde eine Zorbax Eclipse Plus-C18, 4,6 x 150 mm, 1,8 µm-Trennsäule (Agilent Technologies) verwendet, welche an das Agilent 6410 Triplequad Massenspektrometer gekoppelt war.

### **3.9 Statistik**

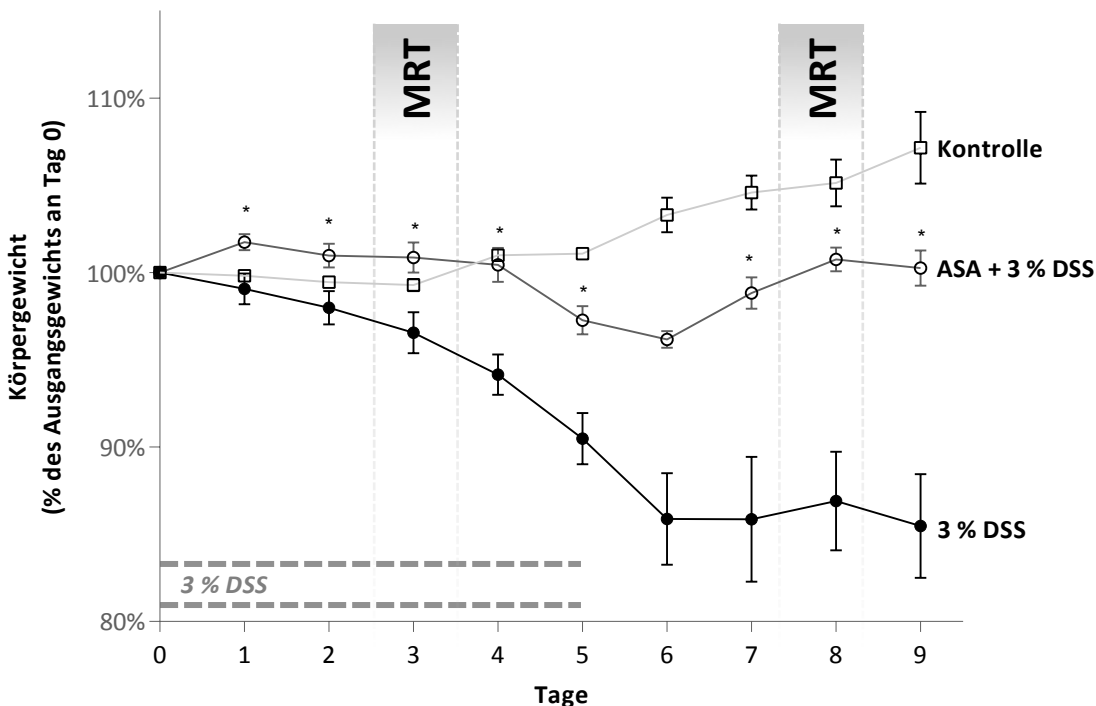
Alle Ergebnisse wurden, außer es ist ausdrücklich angemerkt, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Zur Berechnung, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen wurde sofern nicht explizit erwähnt der Mann–Whitney-U-Test verwendet.

Eine statistisch signifikanter Unterschied wurde für  $p < 0,05$  angenommen. Für alle Berechnungen wurde die Windows-Software GraphPad Prism 3.02v verwendet (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA).

## 4. Ergebnisse

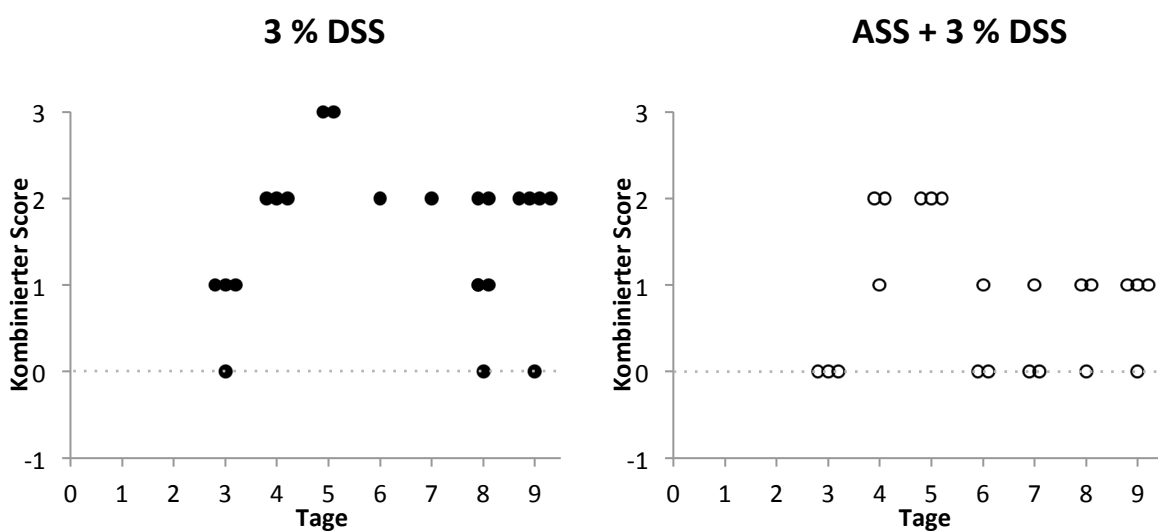
### 4.1 *in vivo*-Bestimmung der Kolitisaktivität

Die tägliche Beurteilung des Körpergewichts sowie der rektalen Blutungen erbrachte signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Versuchstiere, die DSS im Trinkwasser und intraperitoneale Injektionen lediglich der Trägerlösung erhielten, zeigten einen deutlichen Gewichtsverlust im Verlauf des Versuches (an Tag 9 im Mittel auf 85 % des Ausgangsgewichts), wohingegen in der Kontrollgruppe eine erwartete Gewichtszunahme auf im Mittel 107 % des Ausgangsgewichts messbar war. Die Gruppe, die ASS erhielt, zeigte einen geringeren Gewichtsverlust in den Folgetagen der DSS-Behandlung, der sich jedoch bis zum Abschluss des Versuches und nach Beendigung der DSS-Behandlung auf das Ausgangsgewicht stabilisierte (100 % des Ausgangsgewichts in der ASS-Gruppe). Eine Übersicht des Körpergewichts ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9. Körpergewicht im Verlauf des Experiments.** Dargestellt als Prozent des Ausgangsgewichts an Tag 0 des Experiments, n = 3 für die Kontrollgruppe, n = 5 für die „ASS + 3 % DSS“-Gruppe, und n = 6 für die „3 % DSS“-Gruppe. \*Signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen „ASS + 3 % DSS“ und „3 % DSS“.

Ein ähnliches Verhalten zeigte sich bei der Beurteilung der rektalen Blutungen. Hier waren vermehrt rektale Blutungen in der Gruppe der Versuchstiere, die lediglich DSS im Trinkwasser und intraperitoneale Injektionen der Trägerlösung alleine erhielten, zu verzeichnen. In der Gruppe mit zusätzlicher ASS-Behandlung war eine Tendenz zu geringeren rektalen Blutungen ersichtlich. Da jedoch nicht bei allen Versuchstieren täglich eine Stuhlprobe gewonnen werden konnte wurde für diesen Parameter keine Berechnung einer statistisch signifikanten Unterschieds zwischen den Versuchsgruppen durchgeführt. Eine Übersicht ist in Abbildung 10 dargestellt.

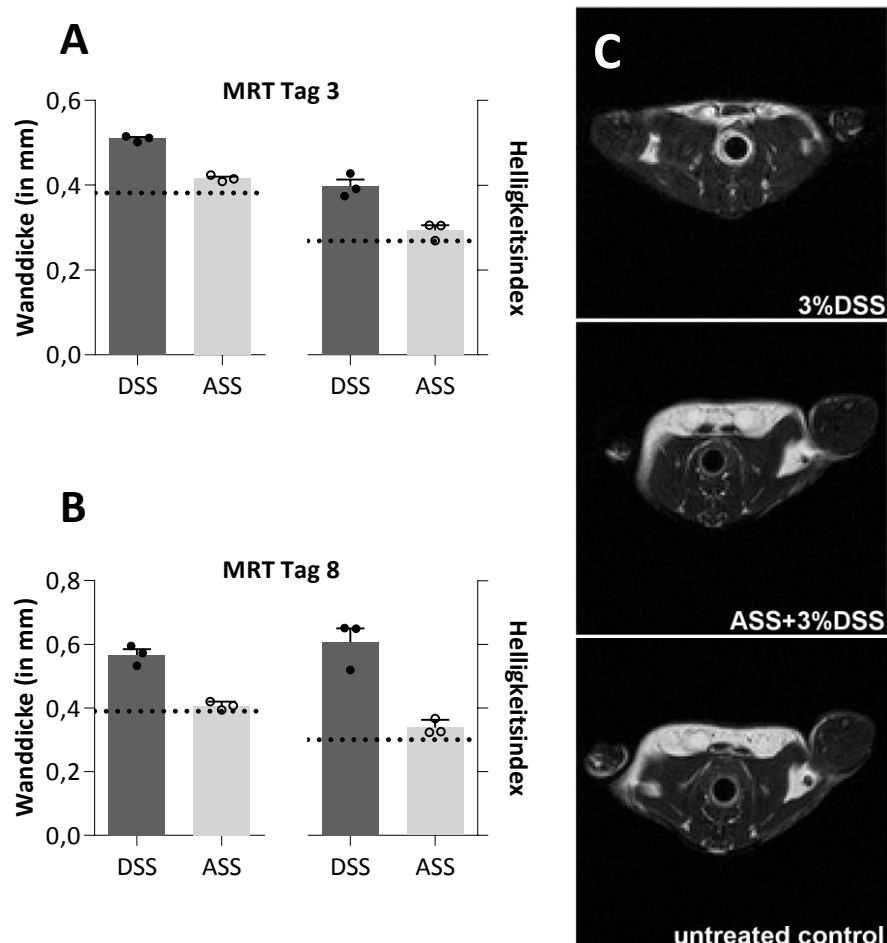


**Abbildung 10. Tägliche Evaluation der rektalen Blutung durch einen kombinierten Score aus phänotypischer Stuhlqualität und einem Test für okkultes Blut (Hemoccult®).** Dabei wurden 0 Punkte bei negativem Test für okkultes Blut, 1 Punkt bei geringgradig positivem Test für okkultes Blut, 2 Punkte bei deutlich positivem Test für okkultes Blut und 3 Punkte bei makroskopisch blutigen Diarrhoen vergeben. Die bei den unbehandelten Kontroll-Tieren untersuchten Stuhlproben waren durchgehend negativ.

## 4.2 Magnet-Resonanz-Tomographie

An Tag 3 und 8 wurden die Versuchstiere jeweils zur Bestimmung der Kolitisaktivität einer MRT unterzogen. Hier zeigte sich an Tag 3 eine Zunahme der Wanddicke sowie eine Zunahme der Helligkeit in der T2-gewichteten Aufnahme für alle Gruppen im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch fiel sowohl die Zunahme der Wanddicke als auch die Helligkeitszunahme für die DSS-Gruppe deutlich höher aus (Abbildung 11A). Aufgrund der limitierten Ressourcen konnten nur jeweils 3 Tiere pro Versuchsgruppe gemessen werden. Diese Einschränkung bedingt, dass eine Testung auf Normalverteilung (z.B.

mittels Kolmogorov-Smirnov-Test) nicht möglich ist. Wendet man nun einen nicht-parametrischen Test wie den Mann-Whitney U Test an, so ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Nimmt man jedoch eine Normalverteilung der Messergebnisse an und wendet daher einen parametrischen Test (z.B. Student's t-Test) an, so ergeben sich sowohl für die Wanddicke als auch für die Helligkeit hochsignifikante Unterschiede bereits an Tag 3 ( $p < 0,01$  für „ASS + 3 % DSS“ versus „3 % DSS“). Dies bestätigte sich ebenfalls an Tag 8, zum Zweitpunkt der zweiten MRT. Bei den Versuchstieren, die zusätzlich ASS erhielten, war hier keine weitere Zunahme der Wanddicke oder der Helligkeit zu verzeichnen, die sich jedoch bei den Versuchstieren, die lediglich DSS (ohne ASS) erhielten, deutlich abzeichnete (siehe Abbildung 11B). Eine Übersicht der Messergebnisse sowie repräsentative Schnittbilder sind in Abbildung 11 dargestellt.

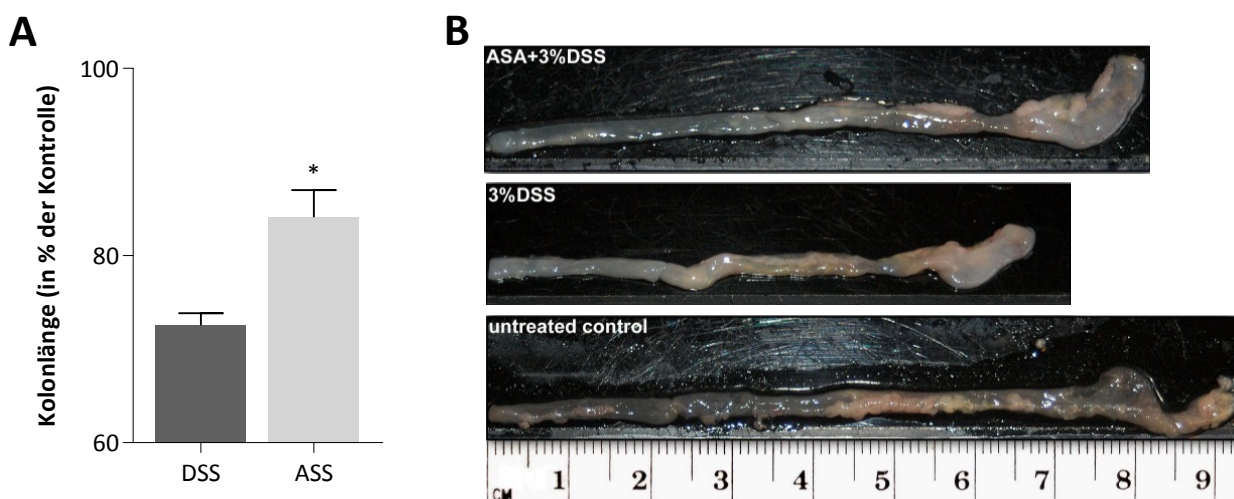


**Abbildung 11. Auswertung der Magnet-Resonanz-Tomographie.** Dargestellt sind die Messungen bezüglich der Wanddicke (in mm) und des Helligkeitsindex in der T2-gewichteten Aufnahme an Tag 3 (A) sowie Tag 8 (B). Die Messwerte der unbehandelten Kontrolltiere sind in den gestrichelten Linien dargestellt. Repräsentative Schnittbilder aus den jeweiligen Versuchsgruppen von Tag 8 sind unter C dargestellt.

### 4.3 *post mortem*-Analyse der Kolitisaktivität

#### 4.3.1 Kolonlänge

Nach der Tötung der Versuchstiere an Tag 9 des Versuches wurde die Kolitisaktivität mittels makroskopischer und mikroskopischer Analyse des Kolons bestimmt. Hier zeigte sich erwartungsgemäß durch die Entzündungsreaktion verursacht eine signifikante Kolon-Verkürzung aller Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. In der ASS-Gruppe war jedoch diese Verkürzung des Kolons signifikant geringer ausgeprägt als in der Gruppe, die lediglich DSS erhielten (siehe Abbildung 12).



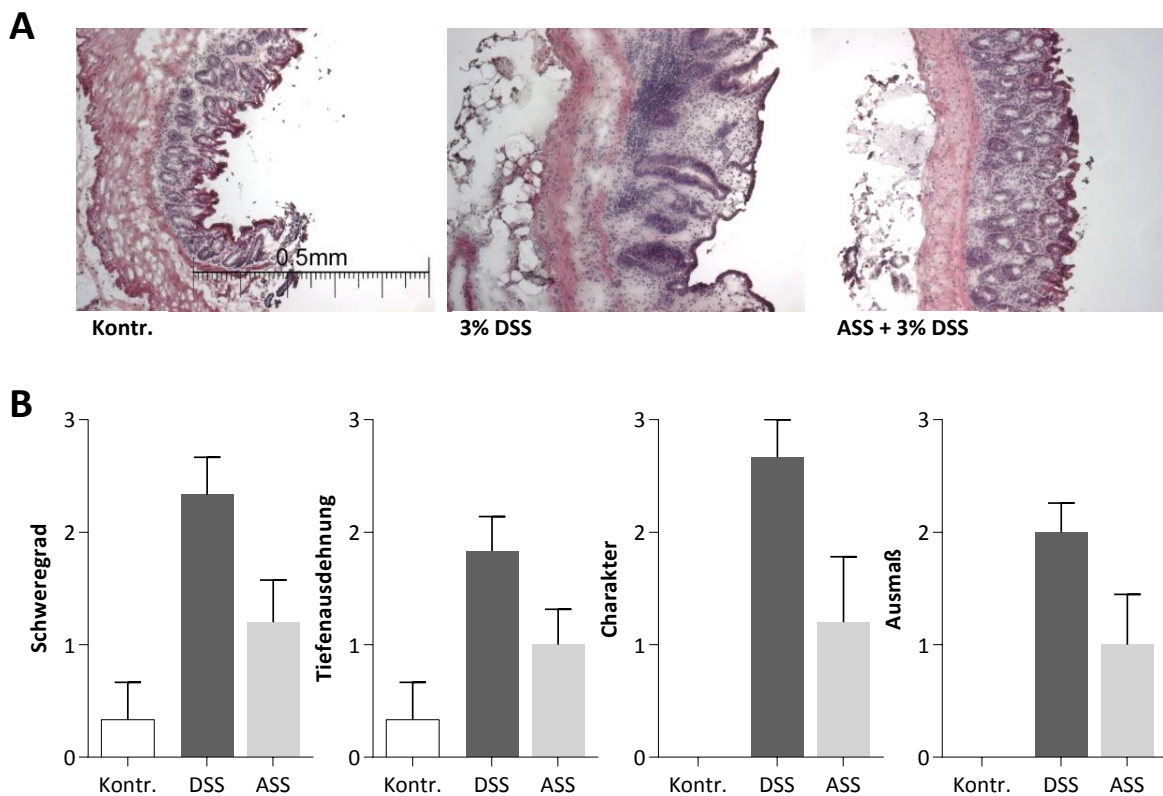
**Abbildung 12. Kolonlänge.** Es zeigte sich eine signifikante Kolonverkürzung in allen Versuchsgruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zudem war jedoch die Behandlung mit ASS mit einer signifikanten Reduktion der Verkürzung vergesellschaftet (A). Repräsentative makroskopische Aufnahmen aus den jeweiligen Versuchsgruppen (B); \*  $p=0,037$  versus DSS.

#### 4.3.2 Histologische Analyse

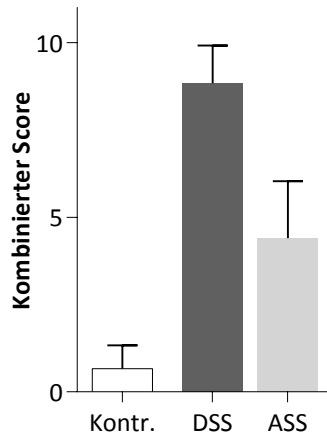
Zur histopathologischen Beurteilung der Kolitisaktivität wurde einem erfahrenen Pathologen entsprechende Gewebeschnitte vorgelegt und in jeweils vier Kategorien beurteilt: Schweregrad der Entzündung, Tiefenausdehnung der Entzündung, Charakter der entzündlichen Läsionen sowie schließlich Ausmaß der entzündlichen Läsionen. Repräsentative Gewebeschnitte sind in Abbildung 13A und eine Übersicht der Ergebnisse



in Abbildung 13B dargestellt. In allen vier Kategorien war erwartungsgemäß in der DSS-Gruppe eine höhere Entzündungsaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar. Entsprechend war auch in der Summe aus den vier genannten Kategorien ein höherer Punktwert der DSS-Gruppe im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle nachweisbar. In allen Kategorien (siehe Abbildung 13B) sowie auch in der Summe (siehe Abbildung 14) war ein Trend zu einer niedrigeren Entzündungsaktivität in der ASS-Gruppe verglichen mit der DSS-Gruppe zu erkennen. Dies war jedoch weder in den Einzelkategorien (p-Werte:  $p=0,07$ ;  $p=0,14$ ;  $p=0,054$ ;  $p=0,11$ ), noch in der Summe ( $p=0,054$ ) signifikant.



**Abbildung 13. Histopathologische Evaluation der Entzündungsaktivität.** Repräsentative Gewebeschnitte der jeweiligen Versuchsgruppen (A). Die Gewebeschnitte wurden einem erfahrenen Pathologen (Jonathan N. Glickman, M.D., Ph.D, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, USA) ohne Kenntnis der Gruppenzuordnung vorgelegt und in jeweils vier Kategorien beurteilt (B): Schweregrad der Entzündung (0 = keine Entzündung, 1 = geringe Entzündungsaktivität, 2 = mäßige Entzündungsaktivität, 3 = ausgeprägte Entzündungsaktivität), Tiefenausdehnung der Entzündung (0 = keine Entzündung, 1 = auf Mukosa begrenzt, 2 = Mukosa plus Submukosa, 3 = alle Wandschichten), Charakter der entzündlichen Läsionen (0 = intaktes Epithel, 1 = Störung der physiologischen Architektur, 2 = Erosion, 3 = Ulzeration) und Ausmaß der Läsionen (0 = keine Läsionen, 1 = nur punktuell, 2 = multifokal, 3 = diffus). Für die ASS-Gruppen war in allen vier Kategorien ein Trend zu geringerer Entzündungsaktivität im Vergleich zur DSS-Gruppe darstellbar, der jedoch nicht statistisch signifikant waren (p-Werte für die vier Kategorien im Mann-Whitney-U-Test:  $p=0,07$ ;  $p=0,14$ ;  $p=0,054$ ;  $p=0,11$ ).

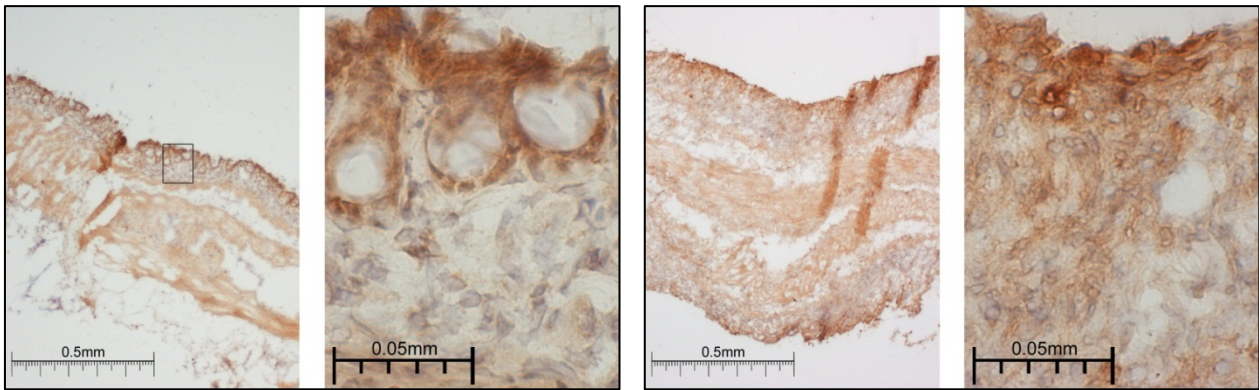


**Abbildung 14. Kombiniertes histopathologisches Score.** Dargestellt sind die Mittelwerte der Summen aus den einzelnen Bewertungen pro Tier und die entsprechenden Standardfehler,  $p=0,054$  für „ASS + 3 % DSS“-Gruppe versus „3 % DSS“-Gruppe im Mann-Whitney-U-Test.

## 4.3 Analyse der COX-2-Aktivität

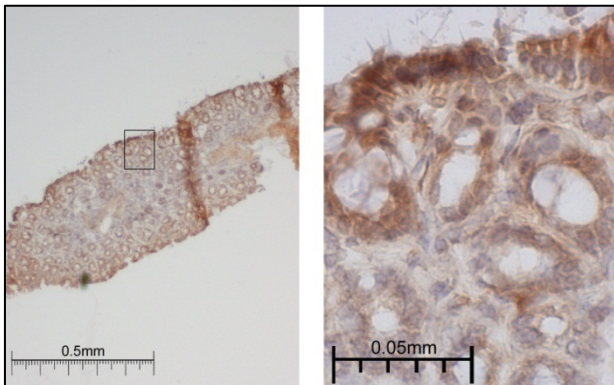
### 4.3.1 Immunhistochemie

Zur qualitativen Bewertung der COX-2-Aktivität wurden zunächst die immunhistochemischen Gewebeschnitte beurteilt. Hier zeigte sich erwartungsgemäß im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei allen Versuchsgruppen eine höhere Expression von COX-2. Jedoch war diese in der DSS-Gruppe darüber hinaus deutlich gesteigert. Auch zeigte sich bei der bereits in der konventionellen H&E-Färbung demonstrierten Zerstörung der Mikroarchitektur eine erhöhte COX-2 Expression auch in den tiefer gelegenen Schichten. Dieses Verhalten war bei der ASS-Gruppe nicht in gleichem Ausmaß zu beobachten. Repräsentative Gewebeschnitte sind in Abbildung 15 dargestellt.



ASS + 3 % DSS

3 % DSS

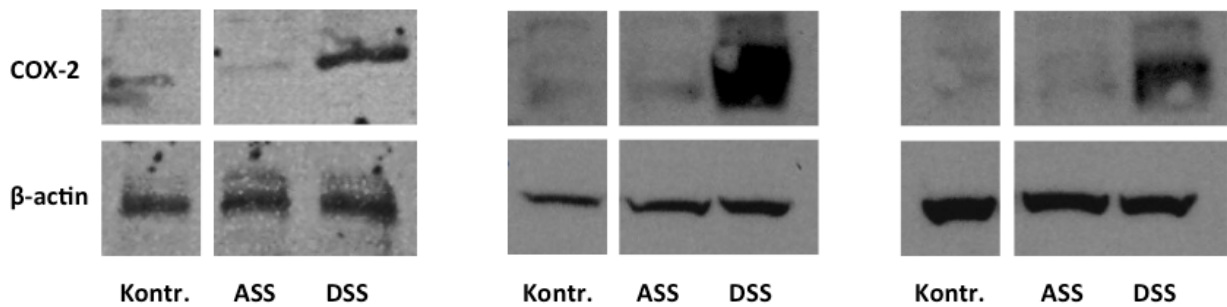


Kontrolle

**Abbildung 15. Immunhistochemische Gewebeschnitte für COX-2.** Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigt sich bei allen Versuchsgruppen eine erhöhte Expression von COX-2 insbesondere luminal. In der DSS-Gruppe war jedoch auch in tieferen Schichten eine deutlich erhöhte COX-2 Expression erkennbar.

#### 4.3.2 COX-2 Western Blot

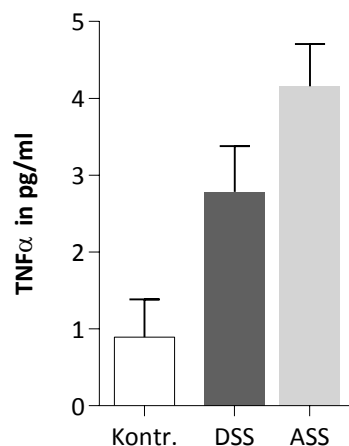
Zur Quantifizierung der Protein-Expression im Kolongewebe wurde zudem nach Protein-Extraktion ein Western Blot durchgeführt. Hier zeigte sich eine deutliche höhere Expression von COX-2 in der DSS-Gruppe im Vergleich zu der Gruppe der ASS-behandelten Tiere. Aufgrund der limitierten Probenmenge konnte jedoch die Messung der ersten drei Proben, die mit einer suboptimalen Antikörperkonzentration gefärbt wurden nicht wiederholt werden. Daher ist eine quantitative Auswertung der Messung nicht möglich. Entsprechende Ausschnitte sind in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16. Western Blot mit Darstellung der COX-2-Proteinkonzentration.** Aus den 3 Versuchsgruppen wurden Proteinextrakte von jeweils 3 Tieren mittels Western Blot analysiert. Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Konzentration in der DSS-Gruppe im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen. Aufgrund der limitierten Probenmenge konnte das mit einer suboptimalen Antikörperkonzentrationen – und dadurch hoher Hintergrundfärbung – inkubierte erste Gel (linkes Panel) nicht wiederholt werden. Von einer quantitativen Analyse wurde daher abgesehen.

#### 4.4 TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum

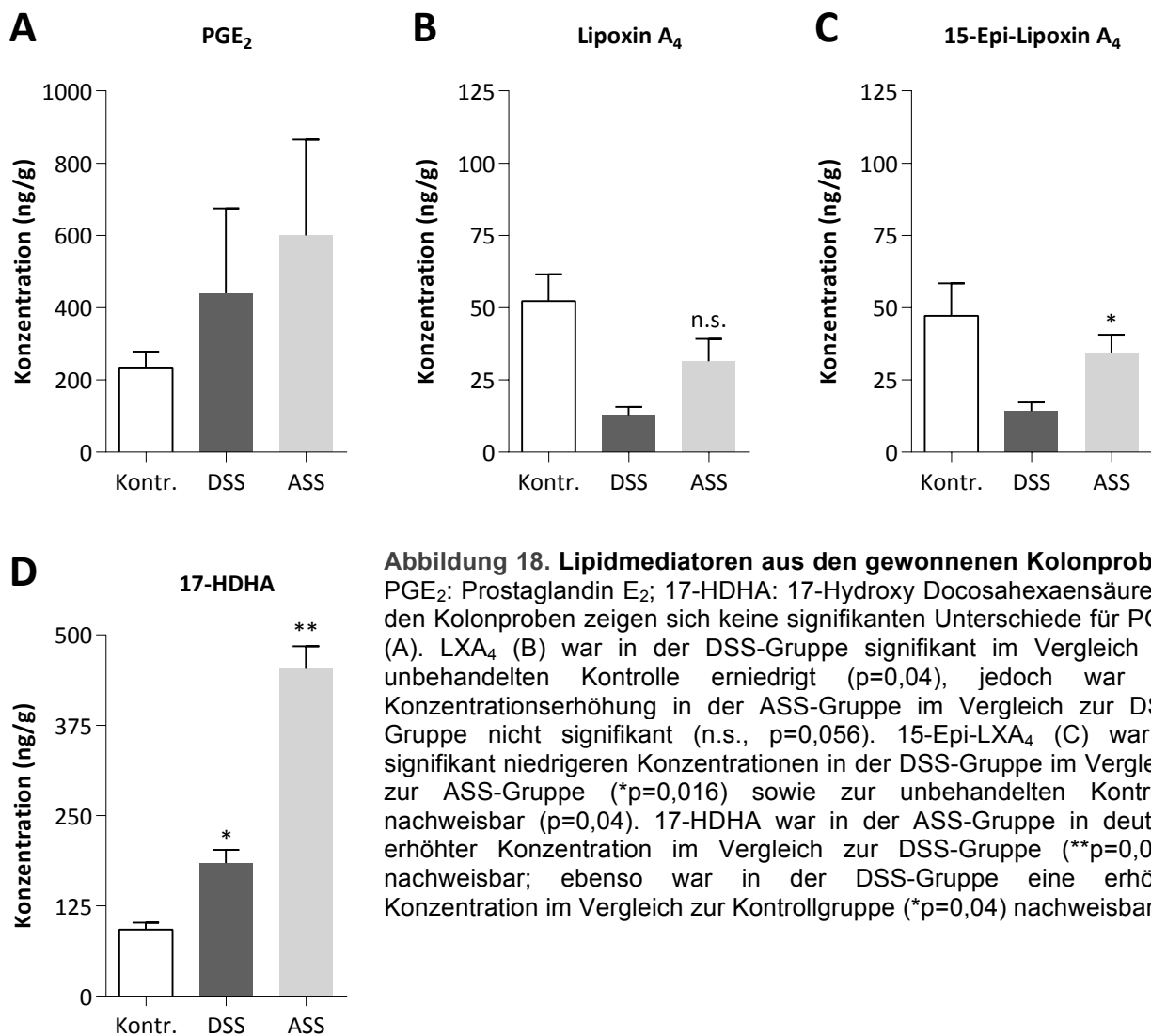
Bei der Analyse der TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum der Versuchstiere ergab sich ein Trend zu einer höheren Konzentration in den Gruppen, die DSS erhielten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die jedoch nicht signifikant waren. Ebenso fanden sich zwischen der ASS- und DSS-Gruppe keine signifikanten Unterschiede. Die Mittelwerte der Messungen sind in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17. TNF- $\alpha$ -Konzentration im Serum.** Zwischen der ASS- und DSS-Gruppe fand sich kein signifikanter Unterschied in der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen ( $p=0,17$ ). Ebenso waren die beobachteten Trends zwischen der Kontrollgruppe und der DSS-Gruppe ( $p=0,1$ ) sowie zwischen der Kontrollgruppe und der ASS-Gruppe ( $p=0,06$ ) nicht signifikant.

## 4.5 Messung der Lipidmediatoren

Aus den gewonnenen Kolonproben wurde mittels Massenspektrometrie die Konzentrationen von mehreren Lipidmediatoren gemessen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen für Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, Abbildung 18A). Für LXA<sub>4</sub> (Abbildung 18B) sowie 15-Epi-LXA<sub>4</sub> (Abbildung 18C) war jeweils eine signifikant niedrigere Konzentration in der DSS-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar, sowie für 15-Epi-LXA<sub>4</sub> im Vergleich zur ASS-Gruppe (siehe Abbildung 18C). 17-HDHA, ein Derivat der omega-3-PUFA DHA und Vorläufer der Protectine (PD) und Resolvine (RvD<sub>1</sub> bis D<sub>6</sub>), fand sich überraschender Weise in erhöhter Konzentration in der DSS-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle und zudem in einer noch höheren Konzentration in der ASS-Gruppe (Abbildung 18D).



**Abbildung 18. Lipidmediatoren aus den gewonnenen Kolonproben.** PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin E<sub>2</sub>; 17-HDHA: 17-Hydroxy Docosahexaensäure. In den Kolonproben zeigen sich keine signifikanten Unterschiede für PGE<sub>2</sub> (A). LXA<sub>4</sub> (B) war in der DSS-Gruppe signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erniedrigt (p=0,04), jedoch war die Konzentrationserhöhung in der ASS-Gruppe im Vergleich zur DSS-Gruppe nicht signifikant (n.s., p=0,056). 15-Epi-LXA<sub>4</sub> (C) war in signifikant niedrigeren Konzentrationen in der DSS-Gruppe im Vergleich zur ASS-Gruppe (\*p=0,016) sowie zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar (p=0,04). 17-HDHA war in der ASS-Gruppe in deutlich erhöhter Konzentration im Vergleich zur DSS-Gruppe (\*\*p=0,008) nachweisbar; ebenso war in der DSS-Gruppe eine erhöhte Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe (\*p=0,04) nachweisbar.

## 5. Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der anti-inflammatorische Effekt der Acetylsalicylsäure in einem Tiermodell zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht.

In diesem Entzündungsmodell war die Behandlung der Versuchstiere mit ASS mit einer signifikanten Reduktion des Ausmaßes der Entzündungsreaktion vergesellschaftet, welche sich durch signifikant verringerte Kolonverkürzung, einen Trend zu geringeren histopathologisch nachweisbaren Schädigungen der Mukosa, einen signifikant geringeren Gewichtsverlust sowie vermindert nachweisbare blutige Diarrhoen darstellen ließ. In der MRT-Bildgebung ließ sich eine signifikant geringere Kolon-Wanddicke sowie -Helligkeit in der T2-gewichteten Aufnahme als Hinweise auf eine geringere Entzündungsaktivität darstellen.

In der Analyse der Lipidmediatoren konnte für die anti-inflammatorischen Mediatoren LXA<sub>4</sub> sowie auch 15-epi-LXA<sub>4</sub> eine signifikant niedrigere Konzentration in der DSS-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezeigt werden. Für die ASS-Gruppe fanden sich signifikante Konzentrationserhöhungen von 15-epi-LXA<sub>4</sub> im Vergleich zur DSS-Gruppe. Dagegen waren die Konzentration des pro-inflammatorischen PGE<sub>2</sub> zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Unerwarteter Weise konnten wir in der DSS-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe erhöhte Konzentrationen der omega-3-PUFA 17-HDHA detektieren. In der ASS-Gruppe fanden sich jedoch noch weiter erhöhte Konzentrationen. Dieses Produkt der DHA ist der Vorläufer der anti-inflammatorischen D-Resolvine und in anderen Arbeiten zur Kolitis, Peritonitis und Arthritis konnte der anti-inflammatorische Effekt dieses Lipidmediators demonstriert werden [91, 121, 122].

Zusammenfassend konnte durch die Applikation von ASS eine reduzierte Entzündungsaktivität in diesem Modell zur murinen, experimentellen Kolitis dargestellt werden, die mit einer vermehrten Bildung der anti-inflammatorischen Lipidmediatoren epi-LXA<sub>4</sub> sowie 17-HDHA einherging.

## 5.2 Vorteile und Einschränkungen des Studiendesigns

### 5.2.1 Tiermodelle zur Kolitis

Tiermodelle zu Erkrankungen des Menschen sind einerseits unerlässliches Werkzeug, die uns ein besseres Verständnis von Pathomechanismen und Therapieansätzen ermöglichen, andererseits ist es von zentraler Bedeutung sich des modellhaften Wesens eines jeden Versuchsaufbaus bewusst zu sein. Tiermodelle können in der Regel nur bestimmte Aspekte von humanen Erkrankungen einigermaßen gut nachbilden und ein Transfer von den hier gewonnenen Erkenntnissen ist nicht immer möglich. Im Kontext der CED sind erfreulicher Weise eine Reihe von Tiermodellen verfügbar. Das hier gewählte Modell der DSS-induzierten Kolitis hat den entscheidenden Vorteil, dass es vor allem eine reproduzierbare Entzündungsreaktion hervorruft und sich als Tiermodell zur CED gut etabliert hat [104].

Dabei sind jedoch die Dosierung des DSS sowie Alter, Gewicht, Mausstamm sowie auch das Geschlecht für die Ausprägung der Kolitis wichtige Einflussfaktoren. Um diese Faktoren im Rahmen des experimentellen Designs als Einflussgrößen auf das Ausmaß der Entzündung möglichst konstant zu halten, haben wir im Rahmen von Pilotstudien festgelegt, weibliche C57BL/6-Mäuse im Alter von 6 Wochen und mit einem Körpergewicht von 19-21 g für die Versuche zu verwenden. Des Weiteren wurde durch eine Beschränkung auf 3 Versuchstiere pro Käfig ein möglichst unrestrictiver Zugang zu dem angebotenen (DSS-haltigen) Trinkwasser ermöglicht.

Es bleibt jedoch zu bemerken, dass der Pathomechanismus in diesem Modell vor allem über eine direkt toxische Wirkung auf die Epithelzellen und dadurch eine Zerstörung der epithelialen Barrierefunktion zu erklären ist [103, 106] und die Entzündungsreaktion hauptsächlich über das angeborene Immunsystem entsteht [107]. Die Rolle des adaptiven Immunsystems ist daher in diesem Modell nicht von entscheidender Bedeutung. Durch die Applikation des karzinogens Azoxymethane ist es im Rahmen der DSS-Kolitis möglich die Entstehung von Adenokarzinomen auf der Basis des entzündlich veränderten Kolonepithels zu initiieren [123]. Daher ist auch unter dem Aspekt des Zusammenhangs von Inflammation und Karzinogenese das DSS-Kolitis Modell interessant [104].

### 5.2.2 Dosierung von ASS

Ziel dieser Studie war, den Effekt einer niedrig dosierten ASS-Therapie auf die Entzündungsaktivität und Bildung von Lipidmediatoren im Kontext der murinen DSS-Kolitis zu untersuchen. In anderen Studien, die den Effekt einer niedrig dosierten ASS-Therapie an Mausmodellen zu Tumorerkrankungen untersucht haben, wurden Dosierungen von 40-50 mg/kg verwendet [124, 125]. In einer andere Studien zur Applikation von ASS wurde eine Dosierung von 400mg/kg verwendet [126].

Wendet man die von Newmark et al. [127] vorgeschlagene Methode zur Berechnung der Dosierung bei tierexperimentellen Studien – ausgehend von einer ASS-Dosierung von 80-110 mg/Tag und einem täglichen Energiebedarf von 2000 kcal beim Menschen – auf dieses Modell an, und nimmt einen Energiebedarf von 8 kcal pro Versuchstier an, so erhält man eine Dosierung von ~25 mg/kg/Tag [128].

Vergleichbare Dosierungen finden sich in der Arbeit von Mahmoud et al., die eine langfristige Applikation von 25 mg ASS/Tag in einem murinen Modell zur familiären adenomatöse Polyposis eingesetzt haben [128].

In Zusammenschau entschlossen wir uns daher zu einer Applikation von 25 mg/Tag. Schließlich ist bei der relativ kurzen Applikationsdauer im Rahmen des Versuchsaufbaus eine interindividuelle Schwankung der ASS-Aufnahme zu minimieren. Es war daher zur Applikation dieser Dosierung entscheidend, die Applikationsroute zu optimieren um möglichst eine Dosisschwankung durch unterschiedliche (orale) Aufnahme zu vermeiden. In Pilotstudien hat sich eine intraperitoneale (i.p.) Applikation als eine gut praktikable und schnell durchführbare Methode erwiesen. Diese Applikationsroute wurde daher auch für die ASS-Applikation gewählt. Für längerfristige ASS-Applikationen sollte jedoch die orale Aufnahme erwogen werden.

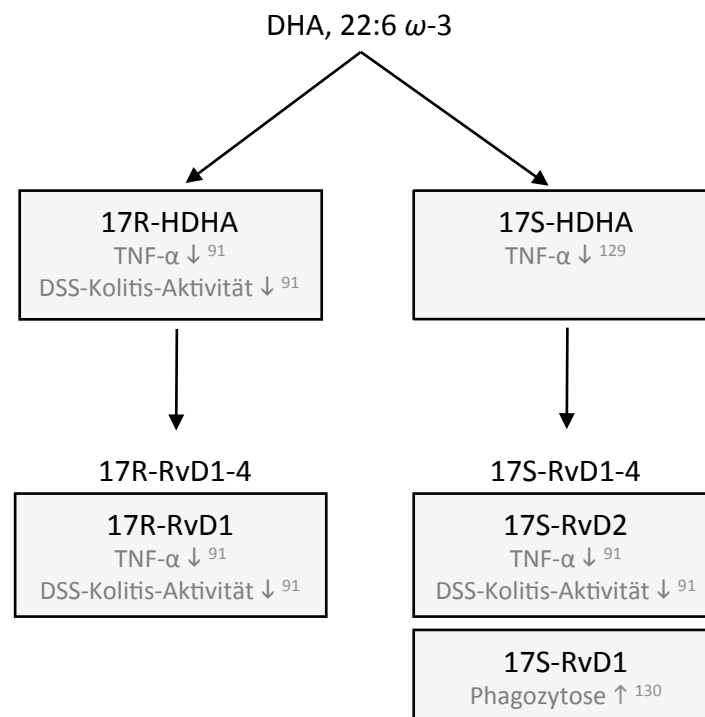
### 5.2.3 Bestimmung von 17-HDHA

17-HDHA als omega-3-PUFA der Verläufermediator der anti-inflammatorischen D-Resolvine. Zudem haben andere Arbeitsgruppen biologische Effekte der Stereoisomere



17R-HDHA und 17S-HDHA demonstrieren können [91, 129]. Die im Rahmen dieser Studie verwendete Methode zur Bestimmung der 17-HDHA ließ eine Differenzierung zwischen den Stereoisomeren nicht zu. Des Weiteren war eine verlässliche Bestimmung von Resolvin D1 aus den gewonnenen Gewebeproben nicht möglich.

Trotz dieser Einschränkung kann jedoch die erhöhte 17-HDHA-Konzentration als Indikator für eine vermehrte Bildung der anti-inflammatorischen D-Resolvine gewertet werden. Eine Übersicht der biologischen Effekte der 17-HDHA-Derivate ist in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19. Synthese und biologischer Effekt der 17R/S-Derivate.** Die gebildeten Lipidmediatoren sind als Resolvine D1-4 bezeichnet. Hier konnten andere Arbeitsgruppen Effekte auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion [91, 129], DSS-Kolitis-Aktivität [91] sowie Phagozytose [130] zeigen.

## 5.3 Die Rolle von anti-inflammatorischen omega-6-PUFAs

### 5.3.1 Lipoxine und Aspirin-getriggerte Lipoxine (ATLs) im zeitlichen Verlauf von Entzündungsreaktionen

Im Kontext der Vermittlung von Entzündungsreaktionen wird die Rolle der anti-inflammatorischen Lipoxine zunehmend besser verstanden. Dabei scheint gewissermaßen

das „Umschalten“ von der Prostaglandinproduktion zur Lipoxinproduktion ein zentraler Zeitpunkt im Verlauf von Entzündungsreaktionen zu sein [131]. Die Lipoxine verhindern hierbei aktiv die weitere Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, reduzieren die endotheliale Permeabilität und stimulieren Makrophagen, apoptotische Zellen aufzunehmen [131-134].

Hier gibt es zusätzlich eine Reihe neu entdeckter Mediatoren, die ein zunehmend besseres Verständnis von ASS ermöglicht [135]. Dies sind neben dem hier untersuchten LXA<sub>4</sub> und dem 15-epi-LXA<sub>4</sub> auch eine Reihe anti-inflammatorischer omega-3-PUFAs, namentlich das Protectin D<sub>1</sub> sowie die Resolvine D<sub>1</sub> bis D<sub>3</sub>, deren Bildung durch ASS verstärkt werden kann [73]. Hier scheint erneut das Verständnis der Wirkungsweise von ASS deutlich vielfältiger zu sein als die Wirkung auf den Arachidonsäure-Metabolismus. In diesem Kontext ist in unserer Untersuchung eine erhöhte Konzentration des gemeinsamen Vorläufers der D-Resolvine, 17-HDHA in der ASS-Gruppe nachweisbar gewesen.

Bemerkenswert bleibt zudem, dass im Rahmen dieser Arbeit trotz hoch signifikanter Unterschiede im Ausmaß der Entzündungsreaktion die Konzentration des pro-inflammatorischen PGE<sub>2</sub> zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant unterschiedlich war. Einschränkend ist sicherlich zu sagen, dass der Untersuchungszeitpunkt für die Lipidmediatorkonzentration möglicherweise spät war (Tag 9 nach Beginn des Versuches und 4 Tage nach Absetzen der DSS-Gabe) und die Entzündungsreaktion auch in der DSS-Gruppe bereits im Zuge eines Abklingens war. Zudem ist bedingt durch die Probenvorbereitung nicht auszuschließen, dass ein Teil des PGE<sub>2</sub> bereits durch die Hydrolyse zerstört wird. Dennoch war zu diesem (vermeintlich) späten Zeitpunkt die Konzentration von LXA<sub>4</sub> und 15-epi-LXA<sub>4</sub> in der DSS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne DSS-Exposition signifikant erniedrigt. Dies lässt darauf schließen, dass eine Auflösungs- oder Resolutionsphase in der DSS-Gruppe nicht im gleichen Ausmaß vorlag, was sich auch mit den anderen *post-mortem* Analysen deckt.

## 5.4 Malignomentwicklung im Rahmen von chronischen Entzündungen

### 5.4.1 Entzündung und Karzinogenese

Im Kontext von chronischen Entzündungen kann vermehrt eine Malignomentwicklung beobachtet werden [136, 137]. Eine Verbindung zwischen Inflammation und Karzinogenese wurde bereits Ende des 19ten und Anfang des 20ten Jahrhunderts mit den Beobachtungen von William Coley postuliert, der bei Patienten mit inoperablen Sarkomen durch die Injektion einer Mischung aus abgetöteten *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* (in der Folge „Coley’s vaccine“ genannt) in Einzelfällen eine – am ehesten entzündungsbedingte – Regression der Tumore erreichen konnte [138]. Auch Paul Ehrlich vermutete „Schutzvorrichtungen des Organismus“, ohne deren Existenz „das Karzinom in einer geradezu ungeheuerlichen Frequenz auftreten“ müsste [139]. Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte ist nun zunehmend klarer geworden, dass Entzündungsprozesse komplexe Abläufe sind, die für die Erhaltung einer Homöostase innerhalb verschiedener Gewebe entscheidend sind und auf den Einfluss externer Stressoren wie Infektionen oder Verletzungen reagieren [140]. Akute Entzündungsreaktionen sind in der Regel mit einem protektiven Effekt bezüglich der Malignomentwicklung – insbesondere aufgrund der wirksamen Elimination von entsprechenden Pathogenen – assoziiert, wohingegen chronische Entzündungsprozesse mit einer erhöhten Rate an Malignomen vergesellschaftet sind [136]. Weitere Erkenntnisse, die den Zusammenhang zwischen Inflammation und Karzinogenese aufgeklärt haben, führten schließlich zu dem weitestgehend akzeptierten Konsens, dass Inflammation ein zentraler Teil der Malignomentwicklung und -progression darstellt [141, 142].

Dies ist im Kontext der CED von besonderem Interesse, da eine wirksame Auflösung der Entzündungsprozesse eine Reduktion des Malignomrisikos bedeuten kann. Diese Korrelation findet sich nun auch zunehmend in epidemiologischen Daten, die in den vergangenen drei Jahrzehnten eine deutliche Risikoreduktion für die Karzinomentwicklung bei Colitis Ulcerosa-Patienten zeigen, die nicht zuletzt durch eine bessere Kontrolle der Erkrankungsaktivität bedingt ist [24].

## 5.4.2 Die Rolle der Acetylsalicylsäure

Im Lichte der Malignomentwicklung erscheint daher die Rolle der Acetylsalicylsäure vor allem durch ihre Fähigkeit, von der pro-inflammatorischen Prostaglandin- auf die Lipoxin-Produktion gewissermaßen „umzuschalten“ und damit letztlich die Resolutions-Phase im Verlauf von Entzündungsreaktionen einzuleiten, von zentraler Bedeutung. Es ist davon auszugehen, dass hier nicht nur eine Dämpfung erfolgt, sondern eine tatsächliche Rückkehr zur physiologischen Gewebshomöostase eingeleitet wird. Über diesen Mechanismus scheint der protektive Effekt der ASS auch besser erklärlich.

Das Fehlen von protektiven Effekten des Immunsystems bei der Malignomentwicklung, insbesondere durch die ineffektive Abwehr gegenüber oncogenen (vor allem viralen) Infektionen, zeigt sich eindrücklich bei der erhöhten Inzidenz von Epstein-Barr-Virus-, Herpesvirus- und Humane Papillomaviren-assoziierte Krebserkrankungen bei Patienten, die mit dem Humanen Immundefizienz-Virus infiziert sind [143]. Zudem konnte in einer Vielzahl von tierexperimentellen Studien eine klare Korrelation von Immundefizienz und erhöhter Malignomentwicklung nachgewiesen werden [144].

Zuletzt war es möglich, in der Analyse von großen, randomisierten Studien eine signifikante Risikoreduktion für malignomspezifische Sterblichkeit durch die langfristige Einnahme von ASS zu zeigen [145, 146]. Für eine rein immunsuppressive Behandlung hingegen (beispielsweise nach erfolgter Organtransplantation) findet sich ein deutlich erhöhtes Malignomrisiko [147]. Im Kontext dieser Beobachtungen sind also die neu gewonnen Erkenntnisse bezüglich der Wirkungsweise der ASS im Rahmen von Entzündungsreaktionen höchst relevant.

## **5.5 Bestimmung der Entzündungsaktivität mittels Kleintier-Magnet-Resonanz-Tomographie**

### **5.5.1 Sensitivität und Reproduzierbarkeit einer nicht-invasiven, risikoarmen Untersuchung**

Im Rahmen von tierexperimentellen Studien ist es von hoher Priorität, die Anzahl der für eine Versuchsreihe verwendeten Tiere zu begrenzen [148]. Im Falle von dynamischen Prozessen ist es jedoch wünschenswert, Daten an mehreren Zeitpunkten zu gewinnen. Im Falle der DSS-Kolitis ist eine Auswertung der phänotypischen Beobachtungen wie Gewichtsverlust, Diarrhoen sowie rektale Blutungen stets Teil der erfassten Parameter. Allerdings sind diese Größen von einer nicht zu vernachlässigenden Schwankung betroffen und letztlich sind die post-mortem Analysen der Entzündungsaktivität in den meisten Untersuchungen von größerem Interesse. Um eine verbesserte intravitale Messung der Entzündungsaktivität zu erreichen, stellt das Kleintier-MRT eine attraktive Möglichkeit dar [113]. Hier konnten andere Gruppen zeigen, dass die Signalintensität der Kolonwand in T2-gewichteten Bildern sowie die Wanddicke gut mit der histopathologischen Entzündungsaktivität korrelieren [114, 149]. Zudem spielt die nicht-invasive Bildgebung bei CED-Patienten eine zunehmend größere Rolle [150].

Im Rahmen dieser Untersuchungen haben wir einen strukturierten Algorithmus zur Messung der Entzündungsaktivität im distalen Kolon mithilfe eines Kleintier-MRTs entwickelt. Dabei korrelierten die gemessene Wanddicke sowie auch die Signalintensität in den T2-gewichteten Aufnahmen in einem hohen Maße. So war der Standardfehler für die Helligkeitsmessung mittels MRT im Mittel geringfügig höher als die Gewichtsmessungen an den entsprechenden Tagen (4,0 % bzw. 6,7 % für die Helligkeitsmessung an Tag 3 bzw. Tag 8). Dagegen waren die Standardfehler der Wanddicken-Messung vergleichbar mit dem Standardfehler der Gewichtsmessung (1,1 % bzw. 2,0 % für die Gewichtsmessung an Tag 3 bzw. 8 sowie 1,1 % bzw. 1,1 % für die Bestimmung der Wanddicke an Tag 3 bzw. 8).

Jedoch waren die gemessenen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen in der MRT-Messung deutlich größer: so fanden sich bereits an Tag 3 in der DSS-Gruppe im Vergleich zur ASS-Gruppe Helligkeitswerte, die um 38,9 % höher lagen und eine 24,8 %ige

Zunahme der Wanddicke aufwies. Dahingegen war an Tag 3 in der DSS-Gruppe das mediane Körpergewicht lediglich 4,3 % niedriger als in der ASS-Gruppe.

Daher stellt die Messung der Entzündungsaktivität mittels Kleintier-MRT bei erhöhter Diskriminationsfähigkeit und vergleichbarer interindividueller Variabilität eine hoch attraktive Methode für die Verlaufsmessung von Entzündungsaktivität in der DSS-Kolitis dar.

### 5.5.2 Kleintier-Endoskopie

Neben nicht-invasiven Methoden wie der MRT ist es lange technisch schwierig gewesen, die für die Bestimmung der humanen CED am häufigsten verwendete Methode, nämlich die Koloskopie, in murinen Modellen anzuwenden. Nach einer Reihe schrittweiser Entwicklungen ist es jedoch nun möglich, hochqualitative Bilder und Videos von Koloskopien in Mäusen zu gewinnen [151, 152]. Dabei werden die Versuchstiere mit einer Nahrungskarenz vorbereitet und mittels eines in der regel starren Kleintier-Endoskops endoskopiert. Zusätzlich zu der rein optischen Beurteilung der Kolonmukosa ist ein entscheidender Vorteil, dass *in vivo* entweder Proben entnommen werden können oder durch intravitale Färbungen des Epithels (z.B. mittels Methylen-Blau) eine genauere makroskopische Beurteilung der Architektur der Krypten möglich ist und hier prämaligene Läsionen identifiziert werden können [151].

Dennoch ist die Prozedur im Vergleich zur MRT zeitlich insbesondere durch die nötige Vorbereitung aufwendiger und das Verletzungsrisiko deutlich höher. Für bestimmte Fragestellungen kann dies jedoch eine attraktive Methode darstellen.

## 5.6 Mögliche Implikationen für zukünftige Studien

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Abschwächung der DSS-induzierten Kolitis durch die Behandlung mit Acetylsalicylsäure möglicherweise mechanistisch über eine Zunahme der anti-inflammatorischen Lipidmediatoren reguliert wird. In dem hier untersuchten Modell ließen sich die Bildung von potenten anti-inflammatorischen

Lipidmediatoren sowohl aus der Gruppe der omega-6-PUFA sowie der omega-3-PUFA nachweisen. Die Verminderung des Entzündungsmaßes ließ sich durch klinische Parameter wie Gewichtsverlust, Diarrhoen und rektale Blutungen; biochemische und histopathologische Gewebeanalysen sowie bildmorphologische Ergebnisse darstellen.

Interessanter Weise gibt es bisher keine publizierten Daten zur ASS bei der DSS-Kolitis. Uns erscheint jedoch dieses Feld höchst attraktiv, da neben der Kontrolle der akuten Entzündungsreaktion möglicherweise auch langfristige Effekte wie die jüngst gezeigte verringerte malignombedingte Mortalität durch die langfristige Einnahme von ASS relevant sein könnten. Dabei können Erkenntnisse im Bereich der CED als Modell für die Entschlüsselung der molekularen Mechanismen dienen. Aus unserer Sicht könnte die Beschäftigung mit der Rolle der ASS im Kontext der CED somit grundlegende Erkenntnisse für mögliche Therapiestrategien bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen im engeren Sinne und für die Rolle von Inflammation im Kontext der Karzinogenese im weiteren Sinne zu liefern.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Acetylsalicylsäure (ASS) in einem Tiermodell zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht.

So zeigen die Versuchstiere, die mit ASS behandelt wurden, einen geringeren Gewichtsverlust, ein geringeres Ausmaß an Diarrhoen und rektalen Blutungen, ein geringeres histopathologisches Entzündungsausmaß, eine geringere Expression der mit Entzündungsreaktionen assoziierten COX-2, sowie nicht zuletzt ein hochsignifikant geringeres Entzündungsausmaß in der Magnet-Resonanz-Tomographie.

Bemerkenswerterweise war in der MRT ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen bereits an Tag 3 des Versuches detektierbar.

In den *post mortem* gewonnen Kolonproben zeigten sich erhöhte Konzentration von anti-inflammatorischen omega-6 Lipidmediatoren. Hier ließen sich in der ASS-Gruppe signifikant höhere Konzentration des anti-inflammatorischen Mediators 15-epi-LXA<sub>4</sub> nachweisen, der unter anderem als Initiator einer Resolutions- oder Auflösungsphase von Entzündungsreaktionen angesehen wird. Zudem ließen sich aus der Gruppe der omega-3-PUFA erhöhte Konzentrationen des anti-inflammatorischen 17-HDHA in der ASS-Gruppe detektieren. So scheint es durch die hier präsentierten Daten plausibel, dass diese Lipidmediatoren einen entscheidenden Anteil an der anti-entzündlichen Wirkung der ASS ausmachen, insbesondere da hier interessanterweise die Konzentration des pro-inflammatorischen Prostaglandin E<sub>2</sub> zwischen den Versuchsgruppen vergleichbar hoch war [153].

Im Kontext der in der jüngsten Zeit erneut durch Daten aus großen randomisierten Studien gezeigten Malignomprotektion durch die langfristige Einnahme von ASS scheint uns eine Reevaluation von ASS im Kontext der CED attraktiv. Hier bedarf es weiterer Studien um letztlich für diese global in ihrer Inzidenz zunehmenden Erkrankung weiter therapeutische Fortschritte zusätzlich zur kurz- oder mittelfristigen Entzündungskontrolle zu erreichen.

Zudem scheint der Einsatz der Kleintier-MRT im Kontext einer longitudinalen Beobachtung des Entzündungsprozesses bei gleichzeitiger Minimierung des Einsatzes von



Versuchstieren sinnvoll. Die durchgeführten Messungen waren gut reproduzierbar und ließen die Detektion von Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt zu.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Jahr 2013 unter dem Titel „Acetylsalicylic Acid Reduces the Severity of Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis and Increases the Formation of Anti-Inflammatory Lipid Mediators“ in BioMed Research International publiziert [153].

## 7. Abstract (English)

The role of non-steroidal anti-inflammatory drugs in inflammatory bowel disease is controversial, as they have been implicated in disease aggravation. Different from other cyclooxygenase inhibitors, acetylsalicylic acid (ASA) enhances the formation of anti-inflammatory and proresolution lipoxins derived from arachidonic acid as well as resolvins from omega-3 polyunsaturated fatty acids such as docosahexaenoic acid (DHA). In this study, we examined the effect of ASA on murine dextran sodium sulfate colitis. A mouse magnetic resonance imaging (MRI) protocol and post mortem assessment were used to assess disease severity, and lipid metabolites were measured using liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry. Decreased colitis activity was demonstrated by phenotype and MRI assessment in mice treated with ASA, and confirmed in postmortem analysis. Analysis of lipid mediators showed sustained formation of lipoxin A4 and an increase of DHA-derived 17-hydroxydocosahexaenoic acid (17-HDHA) after treatment with ASA.

These results show a protective effect of ASA in a murine colitis model and could give a rationale for a careful reassessment of ASA therapy in patients with inflammatory bowel disease and particularly ulcerative colitis, possibly combined with DHA supplementation. The results from this study were published in *BioMed Research International* in 2013 [153].

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet*. 2007 May;369(9573):1627–1640.
- [2] Schirbel A, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J Dig Dis*. 2010 Oct;11(5):266–276.
- [3] Weylandt KH, Kang JX, Wiedenmann B, Baumgart DC. Lipoxins and resolvins in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Jun;13(6):797–799.
- [4] Chiang N, Serhan CN. Aspirin triggers formation of anti-inflammatory mediators: New mechanism for an old drug. *Discov Med*. 2004 Dec;4(24):470–475.
- [5] Asano TK, McLeod RS. Non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and Aspirin for preventing colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;(2):CD004079.
- [6] Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA*. 2005 Aug;294(8):914–923.
- [7] Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Wu K, Fuchs CS. Aspirin dose and duration of use and risk of colorectal cancer in men. *Gastroenterology*. 2008 Jan;134(1):21–28.
- [8] Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP, et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet*. 2010 Nov;376(9754):1741–1750.
- [9] Bernstein CN, Blanchard JF, Metge C, Yogendran M. Does the use of 5-aminosalicylates in inflammatory bowel disease prevent the development of colorectal cancer? *Am J Gastroenterol*. 2003 Dec;98(12):2784–2788.
- [10] Droste JSTS, Tuynman JB, Dullemeijer HMV, Mulder CJJ. Chemoprevention for colon cancer: new opportunities, fact or fiction? *Scand J Gastroenterol Suppl*. 2006 May;(243):158–164.
- [11] Samadder NJ, Mukherjee B, Huang SC, Ahn J, Rennert HS, Greenson JK, et al. Risk of colorectal cancer in self-reported inflammatory bowel disease and modification of risk by statin and NSAID use. *Cancer*. 2010 Nov;.
- [12] Velayos FS, Loftus EV, Jess T, Harmsen WS, Bida J, Zinsmeister AR, et al. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: A case-control study. *Gastroenterology*. 2006 Jun;130(7):1941–1949.
- [13] Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*. 2001 Feb;91(4):854–862.
- [14] Farrokhyar F, Swarbrick ET, Irvine EJ. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2001 Jan;36(1):2–15.
- [15] Gismera CS, Aladrén BS. Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing? *World J Gastroenterol*. 2008 Sep;14(36):5491–5498.
- [16] Prideaux L, Kamm MA, Cruz PPD, Chan FKL, Ng SC. Inflammatory bowel disease in Asia: A systematic review. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Aug;27(8):1266–1280.
- [17] Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):46–54.e42; quiz e30.
- [18] Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002 Sep;347(12):911–920.

- [19] Guarner F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Gill HS, McGuirk P, van Eden W, et al. Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 May;3(5):275–284.
- [20] Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 Jun;233(6):674–688.
- [21] Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001 Apr;48(4):526–535.
- [22] Ekobom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 1990 Nov;323(18):1228–1233.
- [23] Itzkowitz SH, Present DH, Crohn's, of America Colon Cancer in IBD Study Group CF. Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Mar;11(3):314–321.
- [24] Jess T, Simonsen J, Jørgensen KT, Pedersen BV, Nielsen NM, Frisch M. Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology*. 2012 Aug;143(2):375–381.e1.
- [25] Torres J, de Chambrun GP, Itzkowitz S, Sachar DB, Colombel JF. Review article: colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Sep;34(5):497–508.
- [26] Gao F, Liao C, Liu L, Tan A, Cao Y, Mo Z. The effect of aspirin in the recurrence of colorectal adenomas: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Colorectal Dis*. 2009 Nov;11(9):893–901.
- [27] Chan AT, Giovannucci EL, Schernhammer ES, Colditz GA, Hunter DJ, Willett WC, et al. A prospective study of aspirin use and the risk for colorectal adenoma. *Ann Intern Med*. 2004 Feb;140(3):157–166.
- [28] Stürmer T, Glynn RJ, Lee IM, Manson JE, Buring JE, Hennekens CH. Aspirin use and colorectal cancer: post-trial follow-up data from the Physicians' Health Study. *Ann Intern Med*. 1998 May;128(9):713–720.
- [29] Dubé C, Rostom A, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, et al. The use of aspirin for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2007 Mar;146(5):365–375.
- [30] Stürmer T, Buring JE, Glynn RJ. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs for the primary prevention of colorectal cancer: weighing the evidence. *Ann Intern Med*. 2007 Nov;147(9):674; author reply 674–674; author reply 675.
- [31] Imperiale TF. Aspirin and the prevention of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Mar;348(10):879–880.
- [32] Rostom A, Dubé C, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2007 Mar;146(5):376–389.
- [33] Moore RA, Derry S, McQuay HJ. Faecal blood loss with aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors: systematic review of randomized trials using autologous chromium-labelled erythrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(1):R7.
- [34] Yeomans ND, Hawkey CJ, Brailsford W, Naesdal J. Gastrointestinal toxicity of low-dose acetylsalicylic acid: a comparison with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Med Res Opin*. 2009 Nov;25(11):2785–2793.
- [35] Berger JS, Brown DL, Becker RC. Low-dose aspirin in patients with stable cardiovascular disease: a meta-analysis. *Am J Med*. 2008 Jan;121(1):43–49.

- [36] Cryer B, Bhatt DL, Lanza FL, Dong JF, Lichtenberger LM, Marathi UK. Low-Dose Aspirin-Induced Ulceration Is Attenuated by Aspirin-Phosphatidylcholine: A Randomized Clinical Trial. *Am J Gastroenterol*. 2010 Nov;.
- [37] Darling RL, Romero JJ, Dial EJ, Akunda JK, Langenbach R, Lichtenberger LM. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. *Gastroenterology*. 2004 Jul;127(1):94–104.
- [38] Fiorucci S, Santucci L, Wallace JL, Sardina M, Romano M, del Soldato P, et al. Interaction of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with aspirin and NO-releasing aspirin in the human gastric mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep;100(19):10937–10941.
- [39] Tarnawski AS, Caves TC. Aspirin in the XXI century: its major clinical impact, novel mechanisms of action, and new safer formulations. *Gastroenterology*. 2004 Jul;127(1):341–343.
- [40] Pox C, Aretz S, Bischoff SC, Graeven U, Hass M, Heußner P, et al. S3-guideline colorectal cancer version 1.0. *Z Gastroenterol*. 2013 Aug;51(8):753-854.
- [41] Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Jul;287(1):G7–17.
- [42] Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000 Feb;14(2):145–153.
- [43] Moody GA, Jayanthi V, Probert CS, Kay HM, Mayberry JF. Long-term therapy with sulphasalazine protects against colorectal cancer in ulcerative colitis: a retrospective study of colorectal cancer risk and compliance with treatment in Leicestershire. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1996 Dec;8(12):1179–1183.
- [44] Pinczowski D, Ekbom A, Baron J, Yuen J, Adami HO. Risk factors for colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a case-control study. *Gastroenterology*. 1994 Jul;107(1):117–120.
- [45] Dignass A, Preiss JC, Aust DE, Autschbach F, Ballauff A, Barretton G, et al. Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011. *Z Gastroenterol*. 2011 Sep;49(9):1276-341.
- [46] Kefalakes H, Stylianides TJ, Amanakis G, Kolios G. Exacerbation of inflammatory bowel diseases associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: myth or reality? *Eur J Clin Pharmacol*. 2009 Oct;65(10):963–970.
- [47] Meyer AM, Ramzan NN, Heigh RI, Leighton JA. Relapse of inflammatory bowel disease associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Dig Dis Sci*. 2006 Jan;51(1):168–172.
- [48] Takeuchi K, Smale S, Premchand P, Maiden L, Sherwood R, Thjodleifsson B, et al. Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Feb;4(2):196–202.
- [49] Bonner GF, Fakhri A, Vennamaneni SR. A long-term cohort study of nonsteroidal anti-inflammatory drug use and disease activity in outpatients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004 Nov;10(6):751–757.
- [50] Thiéfin G, Beaugerie L. Toxic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the small bowel, colon, and rectum. *Joint Bone Spine*. 2005 Jul;72(4):286–294.
- [51] Tanaka KI, Suemasu S, Ishihara T, Tasaka Y, Arai Y, Mizushima T. Inhibition of both COX-1 and COX-2 and resulting decrease in the level of prostaglandins E2 is responsible for non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-dependent exacerbation of colitis. *Eur J Pharmacol*. 2009 Jan;603(1-3):120–132.

- [52] Assche GV, Vermeire S, Rutgeerts P. Management of acute severe ulcerative colitis. *Gut*. 2011 Jan;60(1):130–133.
- [53] Dignass A, Assche GV, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis*. 2010 Feb;4(1):28–62.
- [54] Rutgeerts P, Vermeire S, Assche GV. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2009 Apr;136(4):1182–1197.
- [55] <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2008/ucm116835.htm>. abgerufen am 25.03.2012;.
- [56] [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Summary\\_of\\_opinion\\_-\\_Initial\\_authorisation/human/000624/WC500070716.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/000624/WC500070716.pdf). abgerufen am 25.03.2012;.
- [57] MacDonald JK, McDonald JWD. Natalizumab for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(1):CD006097.
- [58] Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Diamond RH, Chen DM, et al. Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 May;4(5):621–630.
- [59] Askling J, Fahrback K, Nordstrom B, Ross S, Schmid CH, Symmons D. Cancer risk with tumor necrosis factor alpha (TNF) inhibitors: meta-analysis of randomized controlled trials of adalimumab, etanercept, and infliximab using patient level data. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2010 Dec;.
- [60] Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA*. 2006 May;295(19):2275–2285.
- [61] Rivers JP, Sinclair AJ, Craford MA. Inability of the cat to desaturate essential fatty acids. *Nature*. 1975 Nov;258(5531):171–173.
- [62] MacDonald ML, Rogers QR, Morris JG, Cupps PT. Effects of linoleate and arachidonate deficiencies on reproduction and spermatogenesis in the cat. *J Nutr*. 1984 Apr;114(4):719–726.
- [63] Harris WS, Miller M, Tighe AP, Davidson MH, Schaefer EJ. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*. 2008 Mar;197(1):12–24.
- [64] Calder PC. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Jul;107(1):1–11.
- [65] Jump DB. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. 2002 Mar;277(11):8755–8758.
- [66] Stables MJ, Gilroy DW. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res*. 2011 Jan;50(1):35–51.
- [67] Tilley SL, Coffman TM, Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest*. 2001 Jul;108(1):15–23.
- [68] Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Sep;81(17):5335–5339.
- [69] Parkinson JF. Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2006 Apr;5(2):91–106.
- [70] Gewirtz AT, Collier-Hyams LS, Young AN, Kucharzik T, Guilford WJ, Parkinson JF, et al. Lipoxin a4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene

expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis. *J Immunol.* 2002 May;168(10):5260–5267.

[71] Fiorucci S, Wallace JL, Mencarelli A, Distrutti E, Rizzo G, Farneti S, et al. A beta-oxidation-resistant lipoxin A4 analog treats hapten-induced colitis by attenuating inflammation and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov;101(44):15736–15741.

[72] McMahon B, Godson C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Feb;286(2):F189–F201.

[73] Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:279–312.

[74] Ryan A, Godson C. Lipoxins: regulators of resolution. *Curr Opin Pharmacol.* 2010 Apr;10(2):166–172.

[75] Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res.* 2004 Jan;43(1):55–90.

[76] Rose DP, Connolly JM. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacol Ther.* 1999 Sep;83(3):217–244.

[77] Weylandt KH, Kang JX. Rethinking lipid mediators. *Lancet.* 2005;366(9486):618–620.

[78] 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 Feb;100(4):1751–1756.

[79] Needleman P, Raz A, Minkes MS, Ferrendelli JA, Sprecher H. Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Feb;76(2):944–948.

[80] Seki H, Sasaki T, Ueda T, Arita M. Resolvins as regulators of the immune system. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:818–831.

[81] Yang P, Chan D, Felix E, Cartwright C, Menter DG, Madden T, et al. Formation and antiproliferative effect of prostaglandin E(3) from eicosapentaenoic acid in human lung cancer cells. *J Lipid Res.* 2004 Jun;45(6):1030–1039.

[82] Lee TH, Menica-Huerta JM, Shih C, Corey EJ, Lewis RA, Austen KF. Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B5 and the double lipoxygenase product. *J Biol Chem.* 1984 Feb;259(4):2383–2389.

[83] Mickleborough TD, Lindley MR, Ionescu AA, Fly AD. Protective effect of fish oil supplementation on exercise-induced bronchoconstriction in asthma. *Chest.* 2006 Jan;129(1):39–49.

[84] Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, et al. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem.* 2003 Oct;278(44):43807–43817.

[85] Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, et al. Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes. *J Immunol.* 2006 Feb;176(3):1848–1859.

[86] Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med.* 2002 Oct;196(8):1025–1037.

[87] Isobe Y, Arita M, Matsueda S, Iwamoto R, Fujihara T, Nakanishi H, et al. Identification and structure determination of a novel anti-inflammatory mediator resolvin E3: 17,18-Dihydroxy-eicosapentaenoic acid. *J Biol Chem.* 2012 Jan;.

- [88] Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, et al. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J Exp Med*. 2005 Mar;201(5):713–722.
- [89] Greten FR, Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway—a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*. 2004 Apr;206(2):193–199.
- [90] Lind DS, Hochwald SN, Malaty J, Rekkas S, Hebig P, Mishra G, et al. Nuclear factor-kappa B is upregulated in colorectal cancer. *Surgery*. 2001 Aug;130(2):363–369.
- [91] Bento AF, Claudino RF, Dutra RC, Marcon R, Calixto JB. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice. *J Immunol*. 2011 Aug;187(4):1957–1969.
- [92] Spite M, Serhan CN. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. *Circ Res*. 2010 Nov;107(10):1170–1184.
- [93] Kang JX. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio in chronic diseases: animal models and molecular aspects. *World Rev Nutr Diet*. 2011;102:22–29.
- [94] Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Moore H, Worthington HV, et al. Omega 3 fatty acids for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;(4):CD003177.
- [95] Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Ness AR, Moore HJ, et al. Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. *BMJ*. 2006 Apr;332(7544):752–760.
- [96] Kwak SM, Myung SK, Lee YJ, Seo HG, for the Korean Meta-analysis Study Group. Efficacy of Omega-3 Fatty Acid Supplements (Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid) in the Secondary Prevention of Cardiovascular Disease: A Meta-analysis of Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trials. *Arch Intern Med*. 2012;p. archinternmed.2012.262.
- [97] Hu FB, Manson JE. Omega-3 Fatty Acids and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease—Is It Just a Fish Tale?: Comment on "Efficacy of Omega-3 Fatty Acid Supplements (Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid) in the Secondary Prevention of Cardiovascular Disease". *Arch Intern Med*. 2012;p. archinternmed.2012.463.
- [98] per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico) GPIGI. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*. 1999 Aug;354(9177):447–455.
- [99] Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, et al. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*. 2007 Mar;369(9567):1090–1098.
- [100] Kromhout D, Giltay EJ, Geleijnse JM, Group AOT. n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2010 Nov;363(21):2015–2026.
- [101] Rauch B, Schiele R, Schneider S, Diller F, Victor N, Gohlke H, et al. OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction. *Circulation*. 2010 Nov;122(21):2152–2159.
- [102] Galan P, Kesse-Guyot E, Czernichow S, Briancon S, Blacher J, Hercberg S, et al. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial. *BMJ*. 2010;341:c6273.
- [103] Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc*. 2007;2(3):541–546.



- [104] Wirtz S, Neurath MF. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis.* 2000 Jun;15(3):144–160.
- [105] Wood JD, Peck OC, Tefend KS, Rodriguez-M MA, Rodriguez-M JV, Hernández-C JI, et al. Colitis and colon cancer in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus oedipus*) living wild in their natural habitat. *Dig Dis Sci.* 1998 Jul;43(7):1443–1453.
- [106] Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim.* 1999 Jul;48(3):137–143.
- [107] Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology.* 1994 Dec;107(6):1643–1652.
- [108] Laroui H, Ingersoll SA, Liu HC, Baker MT, Ayyadurai S, Charania MA, et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One.* 2012;7(3):e32084.
- [109] Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 2003 Nov;94(11):965–973.
- [110] Araki Y, Andoh A, Fujiyama Y, Hata K, Makino J, Okuno T, et al. Application of 2-aminopyridine fluorescence labeling in the analysis of in vivo and in vitro metabolism of dextran sulfate sodium by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 Apr;753(2):209–215.
- [111] Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE, Balish E, et al. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest.* 1996 Aug;98(4):945–953.
- [112] Steinhoff U, Brinkmann V, Klemm U, Aichele P, Seiler P, Brandt U, et al. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. *Immunity.* 1999 Sep;11(3):349–358.
- [113] Melgar S, Gillberg PG, Hockings PD, Olsson LE. High-throughput magnetic resonance imaging in murine colonic inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Apr;355(4):1102–1107.
- [114] Larsson AE, Melgar S, Rehnström E, Michaëlsson E, Svensson L, Hockings P, et al. Magnetic resonance imaging of experimental mouse colitis and association with inflammatory activity. *Inflamm Bowel Dis.* 2006 Jun;12(6):478–485.
- [115] Mustafi D, Fan X, Dougherty U, Bissonnette M, Karczmar GS, Oto A, et al. High-resolution magnetic resonance colonography and dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in a murine model of colitis. *Magn Reson Med.* 2010 Apr;63(4):922–929.
- [116] Aychek T, Vandoorne K, Brenner O, Jung S, Neeman M. Quantitative analysis of intravenously administered contrast media reveals changes in vascular barrier functions in a murine colitis model. *Magn Reson Med.* 2011 Jul;66(1):235–243.
- [117] Young MR, Ileva LV, Bernardo M, Riffle LA, Jones YL, Kim YS, et al. Monitoring of tumor promotion and progression in a mouse model of inflammation-induced colon cancer with magnetic resonance colonography. *Neoplasia.* 2009 Mar;11(3):237–46, 1p following 246.
- [118] Melgar S, Karlsson L, Rehnström E, Karlsson A, Utkovic H, Jansson L, et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. *Int Immunopharmacol.* 2008 Jun;8(6):836–844.

- [119] Rivera J, Ward N, Hodgson J, Puddey IB, Falck JR, Croft KD. Measurement of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem*. 2004 Jan;50(1):224–226.
- [120] Gomolka B, Siegert E, Blossey K, Schunck WH, Rothe M, Weylandt KH. Analysis of omega-3 and omega-6 fatty acid-derived lipid metabolite formation in human and mouse blood samples. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2011 Apr;94(3-4):81–87.
- [121] Sun YP, Oh SF, Uddin J, Yang R, Gotlinger K, Campbell E, et al. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J Biol Chem*. 2007 Mar;282(13):9323–9334.
- [122] Lima-Garcia JF, Dutra RC, da Silva K, Motta EM, Campos MM, Calixto JB. The precursor of resolvin D series and aspirin-triggered resolvin D1 display anti-hyperalgesic properties in adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol*. 2011 Sep;164(2):278–293.
- [123] Okayasu I, Ohkusa T, Kajiura K, Kanno J, Sakamoto S. Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis. *Gut*. 1996 Jul;39(1):87–92.
- [124] Stark LA, Reid K, Sansom OJ, Din FV, Guichard S, Mayer I, et al. Aspirin activates the NF-kappaB signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2007 May;28(5):968–976.
- [125] Zhang X, Wang Z, Wang Z, Zhang Y, Jia Q, Wu L, et al. Impact of acetylsalicylic acid on tumor angiogenesis and lymphangiogenesis through inhibition of VEGF signaling in a murine sarcoma model. *Oncol Rep*. 2013 May;29(5):1907–1913.
- [126] McIlhatton MA, Tyler J, Kerepesi LA, Bocker-Edmonston T, Kucherlapati MH, Edelman W, et al. Aspirin and low-dose nitric oxide-donating aspirin increase life span in a Lynch syndrome mouse model. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 May;4(5):684–693.
- [127] Newmark HL. Nutrient density: an important and useful tool for laboratory animal studies. *Carcinogenesis*. 1987 Jul;8(7):871–873.
- [128] Mahmoud NN, Dannenberg AJ, Mestre J, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, et al. Aspirin prevents tumors in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Surgery*. 1998 Aug;124(2):225–231.
- [129] González-Pérez A, Planagumà A, Gronert K, Miquel R, López-Parra M, Titos E, et al. Docosahexaenoic acid (DHA) blunts liver injury by conversion to protective lipid mediators: protectin D1 and 17S-hydroxy-DHA. *FASEB J*. 2006 Dec;20(14):2537–2539.
- [130] Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N, Yacoubian S, Lee CH, Yang R, et al. Resolvin D1 binds human phagocytes with evidence for proresolving receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan;107(4):1660–1665.
- [131] Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1191–1197.
- [132] Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni A, Brady HR, et al. Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry*. 1995 Nov;34(44):14609–14615.
- [133] Takano T, Clish CB, Gronert K, Petasis N, Serhan CN. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and novel lipoxin B4 stable analogues. *J Clin Invest*. 1998 Feb;101(4):819–826.
- [134] Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphagocytic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2000 Feb;164(4):1663–1667.
- [135] Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LAJ, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. 2007 Feb;21(2):325–332.

- [136] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010 Mar;140(6):883–899.
- [137] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860–867.
- [138] Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther*. 1994;64(3):529–564.
- [139] Ehrlich P. Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft M. B. H.; 1909.
- [140] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar;331(6024):1565–1570.
- [141] Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009 Jul;30(7):1073–1081.
- [142] Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature*. 2009 Jan;457(7225):36–37.
- [143] Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer*. 2002 May;2(5):373–382.
- [144] Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235–271.
- [145] Rothwell PM, Fowkes FGR, Belch JFF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2011 Jan;377(9759):31–41.
- [146] Jacobs EJ, Newton CC, Gapstur SM, Thun MJ. Daily Aspirin Use and Cancer Mortality in a Large US Cohort. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Aug;104(16):1208–1217.
- [147] Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF, Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ, et al. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA*. 2011 Nov;306(17):1891–1901.
- [148] Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London; 1959.
- [149] Michael S, Keubler LM, Smoczek A, Meier M, Gunzer F, Pöhlmann C, et al. Quantitative phenotyping of inflammatory bowel disease in the IL-10-deficient mouse by use of noninvasive magnetic resonance imaging. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 May;.
- [150] Mackalski BA, Bernstein CN. New diagnostic imaging tools for inflammatory bowel disease. *Gut*. 2006 May;55(5):733–741.
- [151] Becker C, Fantini MC, Neurath MF. High resolution colonoscopy in live mice. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2900–2904.
- [152] Chiu CY, Gomolka B, Dierkes C, Huang NR, Schroeder M, Purschke M, et al. Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis. *Inflamm Res*. 2012 May;.
- [153] Köhnke T, Gomolka B, Bilal S, Zhou X, Sun Y, Rothe M, et al. Acetylsalicylic Acid reduces the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis and increases the formation of anti-inflammatory lipid mediators. *Biomed Res Int*. 2013;2013:748160.

## 9. Selbständigkeitserklärung/Statement

„Ich, Thomas Köhnke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Acetylsalicylsäure verringert die Entzündungsaktivität in einem Mausmodell zur Kolitis und führt zu einer vermehrten Bildung von anti-inflammatorischen Lipidmediatoren“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

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

Datum

Unterschrift

## Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Thomas Köhnke hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

**Köhnke T**, Gomolka B, Bilal S, Zhou X, Sun Y, Rothe M, Baumgart DC, Weylandt KH. Acetylsalicylic Acid reduces the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis and increases the formation of anti-inflammatory lipid mediators. Biomed Res Int. 2013;2013:748160.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der tierexperimentellen Untersuchungen mit Ausnahme der MRT-Messungen (in Zusammenarbeit mit Xiangzhi Zhou und Yanping Sun); Durchführung sämtlicher post-mortem Analysen mit Ausnahme der LC-MS/MS-Probenvorbereitung und -Messungen (durchgeführt von Beate Gomolka und Dr. Michael Rothe); Analyse der gewonnenen Daten (gemeinsam mit PD Dr. Dr. Karsten H. Weylandt); Anteiliges Verfassen des Manuskripts (gemeinsam mit PD Dr. Dr. Karsten H. Weylandt).

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

## 10. Danksagung

Für die stete Unterstützung und herausragende Betreuung möchte ich vor allem PD Dr. Dr. Karsten H. Weylandt danken.

Den Mitarbeitern des *Laboratory for Lipid Medicine and Technology* des Massachusetts General Hospital danke ich für die enge Zusammenarbeit und Hilfe. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Jing X. Kang, Jingdong Wang und Chenwei He für die freundliche Aufnahme und stete Unterstützung in Boston bedanken. Ich danke Beate Gomolka und Michael Rothe für die Zusammenarbeit bei der Analyse der Lipidmediatoren und Xiangzhi Zhou und Yanping Sun für die Hilfe bei der Etablierung und Durchführung der MRT-Messungen.

Meinen Laborpartnern in Boston Vivien Dornberger, Anja Nadolny, Lena Krause und Simon Wächter danke ich für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

# 11. Lebenslauf

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

## 12. Publikationsliste

Krupka C, Kufer P, Kischel R, Zugmaier G, Bögeholz J, **Köhnke T**, Lichtenegger FS, Schneider S, Metzeler KH, Fiegl M, Spiekermann K, Baeuerle PA, Hiddemann W, Riethmüller G, Subklewe M. CD33 target validation and sustained depletion of AML blasts in long-term cultures by the bispecific T-cell- engaging antibody AMG 330. Blood. 2014 Jan 16;123(3):356-65.

**Köhnke T**, Gomolka B, Bilal S, Zhou X, Sun Y, Rothe M, Baumgart DC, Weylandt KH. Acetylsalicylic Acid reduces the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis and increases the formation of anti-inflammatory lipid mediators. Biomed Res Int. 2013;2013:748160.

Di Gioia D, Heinemann V, Nagel D, Untch M, Kahlert S, Bauerfeind I, **Koehnke T**, Stieber P. Kinetics of CEA and CA15-3 correlate with treatment response in patients undergoing chemotherapy for metastatic breast cancer (MBC). Tumour Biol. 2011 Aug;32(4):777-85.

Weylandt KH, Nadolny A, Kahlke L, **Köhnke T**, Schmöcker C, Wang J, Lauwers GY, Glickman JN, Kang JX. Reduction of inflammation and chronic tissue damage by omega-3 fatty acids in fat-1 transgenic mice with pancreatitis. Biochim Biophys Acta. 2008 Nov;1782(11):634-641.