

Kapitel 5. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen hatte das Ziel, den Einfluss eines erhöhten Omega-3-Fettsäureanteils auf das akute Entzündungsgeschehen in der Leber und ihre Zytokinproduktion zu untersuchen. In dieser Arbeit können deutliche Unterschiede in der Entzündungsreaktion und Schädigung der Leber zwischen der Versuchsgruppe mit hohem Omega-6-Gehalt (Wildtyp-Mäuse) und der Versuchsgruppe mit ausgeglichenem Omega-6-/Omega-3-Verhältnis (transgene Fat-1-Mäuse) nachgewiesen werden.

Damit konnten die Ergebnisse anderer vergleichbarer *in vivo* und *in vitro* Arbeiten zu den entzündungshemmenden Einflüssen von Omega-3-Fettsäuren teilweise bestätigt als auch widerlegt werden. Zusammenfassend kann man über die vergleichbaren Untersuchungen folgendes sagen:

Babcock et al. untersuchten in einer *in vitro* Studie die Wirkung von Omega-3-Fettsäuren auf LPS-stimulierte Monozyten. In dieser Studie kam es zu einer verminderten TNF- α -Produktion unter dem Einfluss der n-3-Fettsäuren [67]. In einer darauf folgenden Untersuchung von Novak wurde gezeigt, dass die verminderte TNF-Produktion in Omega-3-Fettsäuren-behandelten Monozyten eine geringere Aktivierung von NF- κ B zur Ursache hatte [42]. Ähnliche Beobachtungen konnten Endres et al. an humanen Monozyten machen. Probanden mit einer erhöhten Zufuhr an Omega-3-Fettsäuren wiesen in diesen Untersuchungen verringerte TNF- α - und IL-1-Aktivität im Blut auf [41].

Hudert et al. untersuchten in dem Makrophagen-abhängigen DSS-Modell für experimentelle Colitis die Wirkung von Omega-3-Fettsäuren. In dieser Studie wurde, wie auch in der vorliegenden Arbeit, das Fat-1-Maus-Modell für die Omega-3-Versuchsgruppe genutzt. Bei ihren Versuchen zeigte sich, dass Fat-1-Tiere gegen die induzierte Entzündung des Darmgewebes geschützt sind [46].

In der bisher einzigen Studie über n-3-Fettsäuren in der akuten D-GaIN/LPS-induzierten Hepatitis fütterten Watanabe und Okuyama ihre Versuchstiere mit hohen Mengen an α -Linolensäure (18:3 n-3). Versuchstiere mit einer hohen Zufuhr an Omega-3-Fettsäuren zeigten in

dieser Studie erhöhte Schäden des Lebergewebes, verglichen mit Tieren, die eine normale (hoch in n-6-PUFA, niedrig in n-3-PUFA) Diät erhielten [53].

Frühere Untersuchungen in Fütterungsexperimenten an Ratten zum Einfluss der Omega-3-Fettsäuren EPA und DHA auf die chronische alkoholtoxische Hepatitis haben gezeigt, dass Tiere die ausschließlich mit EPA und DHA gefüttert wurden, vermehrte Entzündungsaktivität und Fibrose in der Leber aufwiesen [68,69]. In diesen angeführten Studien scheinen demnach Omega-3-Fettsäuren die Leberentzündung zu fördern.

Die beschriebenen Untersuchungen zeigen, dass es eine Reihe von untersuchten Teilaspekten zur Wirkung von Omega-3-Fettsäuren auf Entzündungsreaktionen gibt. Parallel zu der vorliegenden Studie konnte kürzlich von González-Pérez et al. *in vitro* als auch *in vivo* belegt werden, dass DHA schützenden Einfluss auf die chronische CCl₄ (Carbon Tetra-chlorid)-induzierte Hepatitis hat und dass Tiere mit einem erhöhten Anteil n-3-Fettsäuren geringere hepatozelluläre Schäden durch die induzierte Hepatitis aufzeigten [70].

Besonders im Gebiet von Omega-3-Fettsäuren in Bezug auf akute Leberentzündungen existiert bisher keine Untersuchung, die die Verbindung zwischen dem Omega-6-/Omega-3-Fettsäure-Verhältnis und der daraus resultierenden Zytokinproduktion bei der akuten Hepatitis herstellt. Ebenfalls gibt es noch keine Studie, die die endogene Produktion von Omega-3-Fettsäuren in diesem Kontext untersucht hat. Die vorliegende Arbeit nimmt sich dieser Problemstellungen an und ihre Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen.

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Bei der Analyse der Fettsäurezusammensetzung des Lebergewebes zeigten transgene Fat-1-Mäuse signifikant höhere Konzentrationen an Omega-3-Fettsäuren als Wildtyp-Tiere. Dabei war die Zunahme an α -Linolensäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure sowie Docosahexaensäure besonders auffällig. Während sich der Gehalt an Omega-3-Fettsäuren in der Leber in beiden Versuchsgruppen deutlich voneinander unterschied, konnten nur geringe Unterschiede im Gehalt von Omega-6-Fettsäuren zwischen den verschiedenen Tiergruppen festgestellt werden.

Die Injektion von D-GaIN/LPS in das Peritoneum der Mäuse führte 6 Stunden nach der Behandlung in beiden Versuchsgruppen zur Auslösung einer akuten Hepatitis, was durch erhöhte

ALT-Konzentrationen im Serum belegt werden konnte. Tiere der Fat-1-Versuchsgruppe mit ausgeglichenem n-6/n-3-Verhältnis zeigten dabei signifikant niedrigere ALT-Konzentrationen als Wildtyp-Tiere mit hohen n-6-PUFA-Konzentrationen.

Lichtmikroskopische histopathologische Untersuchungen der Leber zeigten 6 Stunden nach der Behandlung mit D-GaIN/LPS typische Zeichen einer akuten Hepatitis in allen behandelten Tieren. Zu diesen Zeichen gehören Apoptosen, Nekrosen, Hämorrhagien und Entzündungszellinfiltrate. Die Leberschädigungen waren in Fat-1-Mäusen deutlich geringer als in Wildtyp-Tieren. Dieser optische Eindruck wurde durch den HAI-Score quantifiziert und bestätigt.

Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch die quantitative Analyse der apoptotischen Zellkerne mittels DAPI-Färbungen und Fluoreszenzmikroskopie, in der Fat-1-Tiere signifikant weniger Apoptosen zeigten als ihre Vergleichstiere aus der Wildtypgruppe.

In den weiteren Untersuchungen der Zytokine konnten deutliche Unterschiede zwischen beiden Hepatitis-Versuchsgruppen festgestellt werden. So war die systemische TNF- α -Konzentration im Plasma 90 Minuten nach der D-GaIN/LPS-Injektion in Fat-1-Tieren signifikant niedriger als in der Wildtypgruppe. Die nach 6 Stunden durchgeführte Analyse der intrahepatischen Konzentration von TNF- α mittels Echtzeit RT-PCR bestätigte dieses Ergebnis dadurch, dass Fat-1-Tiere signifikant niedrigere TNF mRNA-Konzentrationen in der Leber hatten.

Die intrahepatische mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Faktoren IL-1 β , IL-6 und IFN- γ war in D-GaIN/LPS-behandelten Tieren mit Wildtyphintergrund deutlich höher als in Fat-1-Tieren.

5.2 Diskussion der Ergebnisse zum Gehalt an Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren in der Leber

In dieser Studie wurde erstmalig die Wirkung endogen produzierter Omega-3-Fettsäuren auf die akute Leberentzündung untersucht. Die durch Futteraufnahme entstehenden Störgrößen, wie sie in reinen Fütterungsexperimenten auftreten, konnten durch die Nutzung des transgenen Fat-1-Modells ausgeschaltet werden.

Die oben aufgeführten Untersuchungen von Watanabe und Okuyama basieren auf einem Fütterungsexperiment, bei dem Mäuse verschiedene Diäten unterschiedlicher Omega-3- und Omega-6-Fettsäurezusammensetzung erhielten. Das Ergebnis ihrer Studie zeigte, dass ein hoher Anteil der n-3-PUFA α -Linolensäure (18:3 n-3) im Futter zu einer Verminderung der Konzentration von Arachidonsäure (20:4 n-3) im Lebergewebe der Versuchstiere führte. Zusammen mit der sinkenden Arachidonsäurekonzentration konnten die Untersucher auch einen verringerten Gehalt an PGE₂ in der Leber nachweisen [53].

Dies führt zu der Annahme, dass der in Studien von Sinclair und Levy sowie von Okano et al. nachgewiesene schützende Einfluss von Prostaglandinen der Omega-6-Fettsäuren in der Leber durch die Fütterung hoher Konzentrationen n-3-PUFA in der Untersuchung von Watanabe und Okuyama verringert wurde [50,51].

In der vorliegenden Studie wurden daher ausschließlich Fat-1-Tiere mit einem AA/EPA-Verhältnis von etwa 1 im Außenohr genutzt, um einem Mangel an Arachidonsäure vorzubeugen.

Allerdings unterschieden sich die Ergebnisse der gas-chromatographischen Fettsäureprofile des Ohres (im Rahmen der Phänotypisierung) deutlich von denen in der Leber (nach Hepatitis-Induktion und in Kontrollen). So nahm in den hier benutzten Fat-1-Mäusen der prozentuale Anteil von Arachidonsäure von 1.825 ± 0.7465 im Außenohr auf 11.12 ± 0.815 in der Leber zu, während sich der Anteil von EPA 1.973 ± 0.68 auf 0.29 ± 0.029 verringerte. Ursächlich für diese Unterschiede könnte der Aufbau der verschiedenen Gewebe sein, eventuell aber auch eine Verschiebung im Rahmen der Infektion. So zeichnet sich das Außenohr durch elastischen Knorpel aus der kaum durchblutet ist. Die Leber als parenchymatöses Organ ist dagegen stark durchblutet. Hier sind weitere Studien notwendig, um die Unterschiede der Fettsäureprofile zwischen den einzelnen Organen und den physiologischen Effekt der verschiedenen Fettsäureverhältnisse besser zu verstehen.

In der vorliegenden Studie gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen im Gehalt der Omega-6-Fettsäuren, vor allem ihres wichtigsten Vertreters der Arachidonsäure, in der Leber. Tiere vom Wildtyp und transgene Fat-1-Tiere unterschieden sich vor allem im Gehalt von Omega-3-Fettsäuren.

Diese Beobachtung wird in der Studie von Hudert et al. bestätigt. Die Fat-1-Tiere ihrer Studie zeigten einen deutlich erhöhten Gehalt an n-3-PUFA im Kolongewebe im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Der Gehalt an n-6-PUFA, insbesondere an Arachidonsäure (20:4), unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Versuchsgruppen [46].

So können die Unterschiede in den Ergebnissen zwischen Watanabes und Okuyamas Arbeit und der vorliegenden Untersuchung aus den verschiedenen Darreichungsformen der Fettsäuren (Fütterungsmodell versus endogene n-3-Produktionen) resultieren. Eine Veränderung des Omega-6-/Omega-3-Fettsäurenverhältnisses ohne signifikante Veränderung der Omega-6-Fettsäuremenge könnte daher sinnvoll sein, um ihre protektiven Metabolite in der Leber zu behalten.

5.3 Einfluss der Omega-3-Fettsäuren auf die Leberschädigung

Die Schädigung des Lebergewebes wurde durch die Messung der Alaninaminotransferase im Serum gemessen. Außerdem wurde von jedem Tier ein Leberbiopsat entnommen und mittels Lichtmikroskopie analysiert. Quantitativ sind die histologischen Veränderungen der Leber durch den Hepatitis-Aktivitäts-Index analysiert worden.

Den Ergebnissen in 4.2 folgend, zeigten alle Tiere nach einer D-GaIN/LPS-Injektion, unabhängig ihres n-6/n-3-Verhältnisses, im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren erhöhte ALT-Konzentrationen. Anders als in der Studie von Watanabe und Okuyama [53] wiesen Versuchstiere mit erhöhtem n-3-PUFA-Gehalt (Fat-1-Mäuse) in der Leber eine erheblich reduzierte ALT-Aktivität im Serum auf als Tiere mit hohem n-6-PUFA-Gehalt (Wildtyp-Mäuse). Aus diesen Daten kann man auf eine verminderte Leberzellschädigung durch die induzierte Hepatitis in Omega-3-reichen Fat-1-Mäusen schließen. Diese Vermutung wurde durch die histologische Analyse in 4.3 und die Quantifizierung mittels HAI bestärkt, in der Fat-1-Mäuse weniger ausgeprägt typische Zeichen einer akuten Hepatitis zeigten.

Es ist bekannt, dass Interaktionen zwischen absterbenden Hepatozyten und Kupffer Zellen der Leber zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion führen. So ist das von nekrotisierenden Hepatozyten freigesetzte Chromatinprotein HMGB 1 für eine Aktivierung der Kupffer Zellen verantwortlich, die wiederum Entzündungsmediatoren freisetzen [71]. Eine deutliche Reduktion nekrotischer Zellen, wie in der Fat-1-Gruppe dieser Studie, könnte zu einer Schwächung dieses

Signalweges führen und so vor einer Unterhaltung oder Verstärkung des Entzündungsgeschehens schützen.

Da eine genaue Untersuchung der apoptotischen Aktivität in den Leberzellen zum besseren Verständnis des zum Zelltod führenden Signalweges während der akuten Hepatitis beitragen kann, wurden die Apoptosen des Leberparenchyms mittels DAPI-Färbungen und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Hier zeigten Tiere mit erhöhtem n-3-PUFA-Gehalt eine deutlich verminderte Zahl apoptotischer Zellen als Vergleichstiere mit wenig n-3-PUFA.

Diese Beobachtungen sprechen für eine verminderte Aktivität apoptosebringender Signalwege, wie sie besonders durch TNF- α ausgelöst werden. Damit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von Omega-3-Fettsäuren in der Leber die apoptotische Aktivität während einer akuten Leberentzündung reduzieren können.

Beide Parameter, ALT und Histologie, sprechen für eine verminderte Empfindlichkeit der Tiere mit ausgeglichenem n-6/n-3-Verhältnis für die D-GaIN/LPS-induzierte Entzündung der Leber im Vergleich zu Wildtyp-Tieren mit hohen n-6-PUFA-Konzentrationen. Damit wird in dieser Arbeit erstmalig ein schützender Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf die D-GaIN/LPS-induzierte akute Hepatitis nachgewiesen.

5.4 Diskussion der Ergebnisse zur Zytokinproduktion

Das D-GaIN/LPS-Modell ist ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der akuten Immunmodellierten Hepatitis, bei der die Kupffer Zellen aktiviert werden. Massive Freisetzung von TNF- α und anderer Zytokine (z.B. IL-1 β , IL-6, IFN- γ) sind die Folge. Im weiteren Verlauf führt die Zytokinfreisetzung zu Apoptosen und Nekrosen in den Hepatozyten. [59,60]

In den folgenden Passagen wird der Einfluss eines ausgewogenen n-6/n-3-Verhältnisses auf die Zytokinproduktion während der D-GaIN/LPS-induzierten akuten Hepatitis erläutert.

5.4.1 Einfluss der Omega-3-Fettsäuren auf die TNF- α -Produktion

TNF- α ist der wichtigste Entzündungsmediator in der D-GaIN/LPS-induzierten akuten Leberentzündung und wird in diesem Modell vor allem von aktivierten Kupffer Zellen in der Leber produziert. Es ist bekannt, dass das Fehlen von TNF- α oder seines TNF-Rezeptors 1 vor einer akuten D-GaIN/LPS-induzierten Hepatitis schützt [6,72].

Fat-1-Mäuse zeigten in der vorliegenden Arbeit signifikant niedrigere TNF- α -Plasmakonzentrationen als die Vergleichstiere vom Wildtyp. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die signifikant niedrigere mRNA-Expression von TNF- α in der Echtzeit RT-PCR. In Verbindung mit den Ergebnissen zur Leberschädigung lässt sich feststellen, dass die TNF- α -Konzentration mit der Schwere der Krankheit korreliert.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass ein erhöhter Gehalt an Omega-3-Fettsäuren in der Leber zu einer geringeren Produktion von TNF- α führt. Damit bestätigt die vorliegende Arbeit die Ergebnisse der Studie von González-Pérez et al., in der der Einfluss der n-3-PUFA auf die CCl₄-induzierte chronische Hepatitis untersucht wurde und nachgewiesen werden konnte, dass die TNF-Produktion unter dem Einfluss von DHA reduziert war [70].

Des Weiteren steht die vorliegende Arbeit im Einklang mit der oben aufgeführten Studie von Babcock et al., die in vitro die Wirkung der Omega-3-Fettsäuren auf LPS aktivierte Monozyten untersuchten und eine Verringerung der TNF-Produktion beobachteten [67]. In weiteren Studien von Endres et al. sowie von Meyer et al. konnte gezeigt werden, dass auch humane endotoxinaktivierte Monozyten eine verringerte TNF-Produktion nach einer Fischölinfusion und nach oraler Fischölaufnahme aufweisen [40,41].

Ursächlich für die beobachtete Reduktion der TNF-Produktion könnte eine verminderte Aktivität von NF- κ B durch Omega-3-Fettsäuren und ihrer Metabolite sein. So konnte in einer Studie von Novak et al. nachgewiesen werden, dass Monozyten unter dem Einfluss von n-3-PUFA eine verringerte Phosphorylierung von I κ B aufweisen, wodurch die Aktivität von NF- κ B sinkt. Dies hat eine verminderte Transkription von TNF- α mRNA zur Folge [42].

Frühere Studien haben gezeigt, dass TNF- α über die Aktivierung von Caspase-3 der wesentliche Verursacher von Apoptosen in D-GaIN-sensibilisiertem Lebergewebe ist [6,73]. Ein ausgeglichenes n-6/n-3-Verhältnis könnte folglich aufgrund der verminderten TNF- α -Produktion effektiv zum Apoptoseschutz des Lebergewebes beitragen. Die Ergebnisse aus TNF- α - und Fluoreszenzuntersuchungen zur Apoptose führen zu der Annahme, dass ein erhöhter n-3-PUFA-Gehalt den TNF-getriggerten apoptoseinduzierenden Signalweg in den Hepatozyten schwächt.

5.4.2 Einfluss der Omega-3-Fettsäuren auf die Expression von IL-1 β , IL-6 und IFN- γ mRNA in der Leber

Neben der frühen Produktion von TNF- α werden im D-GaIN/LPS-Modell weitere Entzündungsmediatoren freigesetzt. Während IL-1 β und IL-6 von den Sinusoidal-Makrophagen der Leber (Kupffer Zellen) nach der Stimulation durch LPS in D-GaIN-sensibilisierten Mäusen gebildet wird [55,61], produzieren aktivierte NK Zellen IFN- γ [13].

5.4.2.1 Einfluss auf die Expression von IL-6 mRNA in der Leber

In der vorliegenden Untersuchung konnte in transgenen Fat-1-Tieren mit einem ausgeglichenen n-6/n-3-Verhältnis in der Phänotypisierung, eine signifikant niedrigere mRNA-Expression für IL-6 in der Leber gemessen werden als in Wildtyp-Tieren mit hohen n-6-Konzentrationen.

Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, dass TNF- α und IL-6 miteinander interagieren. So konnte nachgewiesen werden, dass TNF- α über die Aktivierung von NF- κ B die Produktion und Freisetzung von IL-6 fördert und IL-6 im Gegenzug die Produktion von TNF- α hemmt [74]. Es ist denkbar, dass die verringerte TNF- α -Produktion in Fat-1-Mäusen zu einer verminderten Expression von IL-6 mRNA in der Leber führen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Omega-3-Fettsäuren direkt die Produktion von IL-6 hemmen, indem sie selbst die Aktivierung von Monozyten reduzieren und so zu der geringeren IL-6-Expression beitragen. Diese Annahme wird durch Untersuchungen von Meyer et al. gestützt, die von einer verminderten IL-6 Produktion in aktivierten humanen Monozyten unter dem Einfluss von Fischöl berichten [40]. Beide Wege könnten einzeln oder gemeinsam zur nachgewiesenen Reduktion der IL-6 Expression in Omega-3-reichen Fat-1-Tieren geführt haben.

5.4.2.2 Einfluss auf die Expression von IL-1 β mRNA in der Leber

Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass IL-1 β seinen Produktionsgipfel bei der D-GaIN/LPS-induzierten Hepatitis später als TNF- α erreicht [61]. Tiere mit einem hohen Anteil an n-6-PUFA zeigten in dieser Arbeit eine signifikant höhere IL-1 β mRNA-Expression in der Leber als Tiere vom Fat-1-Typ.

Daher kann davon ausgegangen werden, dass ein ausgeglichenes n-6/n-3-Fettsäure-Verhältnis die Produktion des pro-inflammatorischen IL-1 β dämpft. Diese Ergebnisse gehen mit früheren Untersuchungen einher, in denen eine Verringerung der IL-1 β mRNA-Konzentration unter dem

Einfluss von EPA und DHA beschrieben wurde [75]. Außerdem zeigten die schon erwähnten Untersuchungen von Endres et al. und Meyer et al. an humanen Monozyten, dass die Einnahme von Fischöl zur verminderten Freisetzung von IL-1 führt [40,41].

Wie für TNF- α und IL-6 beschrieben, könnte daher der erhöhte Anteil an Omega-3-Fettsäuren in Fat-1-Tieren direkt zu einer verminderten Aktivität der Kupffer Zellen führen, was in der reduzierten Freisetzung von IL-1 β resultiert. Möglich ist jedoch auch, dass die geringere TNF- α -Freisetzung in Tieren mit ausgeglichenem n-6/n-3-Verhältnis sekundär zu einer verminderten autokrinen oder parakrinen Aktivierung von Kupffer Zellen führte, die mit einer verminderten IL-1 β -Produktion reagierten.

5.4.2.3 Einfluss auf die Expression von IFN- γ mRNA in der Leber

IFN- γ ist ein wichtiger Entzündungsmediator der via STAT 1-Aktivierung Apoptose im Modell der akuten D-GaIN/LPS auslöst [13]. In unseren Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass Tiere mit einem erhöhten Gehalt an Omega-3-Fettsäuren signifikant niedrigere Konzentrationen an IFN- γ mRNA im Lebergewebe aufweisen. Damit bestätigt die vorliegende Arbeit frühere Studien an mit *Listeria monocytogenes* infizierten Mäusen, die unter einer n-3-PUFA-reichen Diät weniger IFN- γ produzierten [76].

Zusammen mit den Ergebnissen aus den histopathologischen Untersuchungen wäre es denkbar, dass die gemessene reduzierte IFN- γ -Produktion in transgenen Fat-1-Tieren zu einer reduzierten Schädigung des Leberparenchyms beiträgt. So kann es durch die niedrigere IFN- γ -Konzentration in Fat-1-Tieren zu der verminderten Apoptoseinduktion gekommen sein.

Des Weiteren zeigten TNF- α und IFN- γ in verschiedenen Studien synergistische toxische Eigenschaften [13,14]. Es scheint daher möglich, dass die erhöhten n-3-PUFA-Konzentrationen in Fat-1-Tieren durch eine verminderte mRNA-Expression von IFN- γ und TNF- α den Synergismus beider pro-inflammatorischer Zytokine schwächen und so die toxischen Einflüsse abgemildert werden.

5.5 Erklärungsversuche zu dem protektiven Einfluss von Omega-3-Fettsäuren auf die akute Leberentzündung in Fat-1-Tieren

Die erhöhte Zufuhr von Omega-3-Fettsäuren mit der Nahrung könnte deren anti-inflammatorischen Eigenschaften zur Geltung bringen, indem sie die Produktion proinflammatorischer Eicosanoide aus n-6-Fettsäuren, allen voran Arachidonsäure (20:4 n-6), an der Cyclooxygenase und Lipooxygenase kompetitiv hemmen. Dies war in der Vergangenheit eine häufig genutzte Interpretation, um die biologische Wirkung von Omega-3-Fettsäuren zu erklären [77].

Watanabe und Okuyama untersuchten erstmalig die Wirkung eines erhöhten Anteiles n-3-Fettsäuren in der Nahrung auf die D-GaIN/LPS-induzierte Leberentzündung. Dazu fütterten sie ihre Versuchstiere mit α -Linolensäure (18:3 n-3). Die Ergebnisse ihrer Experimente wiesen auf einen schädigenden Einfluss der Omega-3-reichen Nahrung hin. Ursächlich für diese Beobachtungen könnte der verminderte Gehalt an AA in Tieren mit einer n-3-PUFA-reichen Diät gewesen sein. Dies führte zu weniger hepatoprotektiven PGE₂ in der Leber selbiger Tiere. Eine andere Erklärung wäre, dass α -Linolensäure nicht in ausreichendem Maße zu EPA und DHA umgesetzt werden konnte. Folglich wären auch die Konzentration ihrer heute bekannten anti-inflammatorischen Metabolite wie Resolvin E1 und Protectin D1 in den Versuchstieren niedrig gewesen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Watanabe und Okuyama konnte in der Kolitisstudie bei Hudert et al. gezeigt werden, dass Fat-1-Tiere keine signifikanten Unterschiede im Gehalt der wichtigen n-6-PUFA AA (20:4 n-6) und ihrem Metabolit PGE₂ im Kolongewebe, verglichen mit Wildtyp-Tieren, aufwiesen. Tatsächlich war der ermittelte Gehalt an AA (20:4 n-6) im Kolon der Fat-1-Tiere um ein Vielfaches höher als der Anteil der korrespondierenden Omega-3-Fettsäure, EPA (20:5 n-3). Trotzdem waren Fat-1-Tiere vor der induzierten Kolitis messbar geschützt [46].

Aufbauend auf den Ergebnissen von Hudert et al. schien es möglich, dass Fat-1-Tiere auch vor einer akuten Entzündung des Lebergewebes geschützt sein könnten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Annahme und zeigen, dass die Leberentzündung in Fat-1-Tieren mit ausgeglichenem n-6/n-3-Verhältnis nachweislich geringer war. In Übereinstimmung mit Hudert et al. und im Gegensatz zu Watanabe et al. zeigte das Lebergewebe in Fat-1-Tieren dieser Studie keinen signifikanten Unterschied in der Konzentration von AA (20:4 n-6) verglichen mit Wildtyp-Tieren.

Diese Beobachtungen sprechen eher gegen eine mögliche kompetitive Hemmung von Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren an der Cyclooxygenase oder Lipooxygenase. Sie deuten vielmehr auf eine unabhängige anti-inflammatorische Wirkung der Omega-3-Fettsäuren und ihrer Lipidmediatoren auf das Entzündungsgeschehen in Fat-1-Tieren hin.

Es ist bekannt, dass sich PGE₂ positiv auf die D-Galaktosamin induzierte Hepatitis auswirkt und zu einer Zunahme von Hepatic Growth Factor führt [50]. So wäre es denkbar, dass PGE₂ aus AA zusammen mit den Metaboliten der Omega-3-Fettsäuren synergistisch wirkt und das Lebergewebe in Tieren der Fat-1-Hepatitis-Gruppe geschützt wird.

In ihren Untersuchungen zu Derivaten der Omega-3-Fettsäuren haben Serhan et al. so genannte Resolvine und Protectine isoliert sowie ihre entzündungshemmenden Eigenschaften nachweisen können [47]. Studien über die molekulare Wirkung von Omega-3-Fettsäuren und ihrer Metabolite von Arita et al. zeigten einen Weg der Signalweiterleitung über den G-Protein gekoppelten Rezeptor ChemR23 für Resolvin E1, welcher eine Inhibition von NF-κB zur Folge hat. Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Regulierung von Entzündungsreaktionen, führte die Inaktivierung von NF-κB zu einer verminderten Produktion wichtiger Entzündungsmediatoren wie TNF-α und IL-12 [78]. Es ist bekannt, dass die Zytokine IL-12 und IL-18 die Freisetzung von IFN-γ aus NK-Zellen fördern [79,80]. Damit könnte durch das anti-inflammatorische Resolvin E1 aus EPA (20:5 n-3) ein entscheidender Stimulus für die IFN-γ-Produktion unterdrückt werden.

In diesem Zusammenhang konnten Hudert et al. nachweisen, dass Fat-1-Tiere signifikant mehr anti-inflammatorische Metabolite der Omega-3-Fettsäuren, wie z.B. RvE1, ReD3 und PD1/NPD1, im Kolongewebe aufweisen als die Vergleichstiere vom Wildtyp. Diese Ergebnisse waren mit deutlich reduzierten Konzentrationen von NF-κB p65 im Kolon der Fat-1-Tiere verbunden [81]. Die Beobachtungen von Hudert et al. zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geben Hinweise zu Gunsten des von Arita et al. postulierten Weges der Signaltransduktion anti-inflammatorischer Derivate aus Omega-3-Fettsäuren. Die mögliche Inhibition des zentralen Entzündungsregulators NF-κB durch Metabolite der Omega-3-Fettsäuren könnte somit zu der nachgewiesenen Reduktion von TNF-α als auch zur

Verminderung der mRNA für die Zytokine IL-1 β und IL-6 in der Leber von Fat-1-Mäusen in der vorliegenden Arbeit geführt haben.

Unterstützt werden diese Annahmen durch eine kürzlich erschienene Studie von González-Pérez et al., die parallel zu der vorliegenden Arbeit entstand [70]. Dort untersuchte man den Einfluss von DHA (22:6 n-3) auf die chronische toxische Hepatitis in Mäusen, induziert durch CCl₄ (Carbon Tetrachlorid). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass DHA durch ihre Metabolite Protectin D1 und 17S-HDHA das Lebergewebe schützt, indem Schädigungen der DNA und oxidativer Stress in Hepatozyten signifikant reduziert werden. Begleitet wurden diese Beobachtungen durch eine geringere Freisetzung von TNF- α aus Kupffer Zellen.

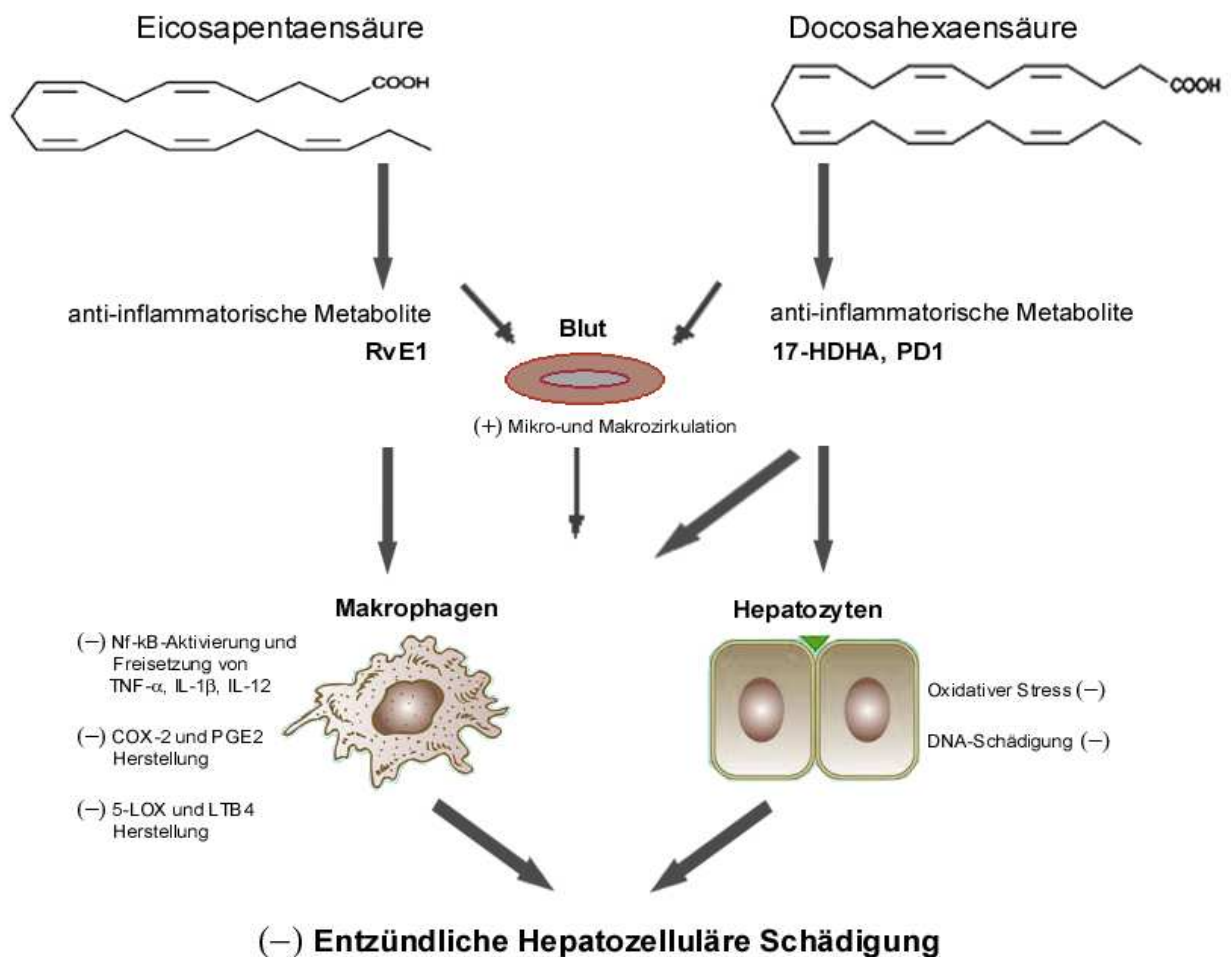


Abbildung 14 Übersicht der möglichen Signalwege der Omega-3-Fettsäuren und ihrer Mediatoren. Über diese Wege könnten Entzündungen des Lebergewebes und die resultierenden hepatozellulären Apoptosen und Nekrosen durch n-3-PUFA vermindert werden. In Anlehnung an González-Pérez et al.[70]

Die González-Pérez-Studie zeigte außerdem, dass die COX-2 und 5-LOX unter dem Einfluss von DHA und ihrer Metabolite weniger aktiv waren. Daraus vermuteten die Autoren, dass die geringere Aktivität beider Enzyme zu einer allgemein verminderten Produktion von Eicosanoiden geführt hat. Die verminderte Aktivität von 5-Lox schien in diesem Zusammenhang eine weitere Möglichkeit des protektiven Wirkens von Omega-3-Fettsäuren zu liefern. So könnte die daraus resultierende reduzierte Produktion von Leukotrienen (besonders LTB₄) die Chemotaxis in der Leber vermindern. Geringere Zahlen von Entzündungszellen in der Leber sowie weniger hepatozelluläre Nekrosen wären das Resultat [70].

Einen weiteren Aspekt liefert eine aktuelle Untersuchung von El-Badry et al. an zwei Maus-Modellen zur Steatohepatitis. So konnte in der Studie gezeigt werden, dass ein hoher Anteil an Omega-3-Fettsäuren in der Nahrung zu einer signifikant verbesserten Mikro- und Makro-zirkulation im Lebergewebe führte. Die Hepatozyten waren so vor den schädigenden Einflüssen von Ischämie und Reperfusion geschützt. In diesem Zusammenhang berichteten El-Badry et al. unter dem Einfluss von Omega-3-Fettsäuren von einer verminderten Aktivität der Kupffer Zellen in der Leber, die vor einer weiteren Exacerbation der Leberentzündung schützen könnte [82].

Zusammenfassend zeigen sich vielfältige Evidenzen, die dafür sprechen, dass die abgeschwächte Entzündungsreaktion in Fat-1-Tieren vor allem auf den protektiven Einfluss eines erhöhten Omega-3-Fettsäureanteils zurückzuführen ist. Eine erhöhte Konzentration von Omega-3-Fettsäuren in der Leber transgener Tiere scheint die Produktion wichtiger pro-inflammatorischer Mediatoren reduziert zu haben, während die Konzentration der wichtigen n-6 Arachidonsäure in beiden Versuchsgruppen nahezu unverändert war. Anti-inflammatorische Metabolite der n-3-Fettsäuren wie Resolvin E1 und Protectin D1 aus den EPA (20:5 n-3) bzw. DHA (22:6 n-3) scheinen in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen. Sie können dabei ihre anti-inflammatorische Wirkung sowohl direkt in den Hepatozyten als auch indirekt über die verminderte Aktivität von Kupffer Zellen ausgeübt haben.

5.6 Methodenkritik

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der akuten D-GaIN/LPS-induzierten Hepatitis verwendet, um zu untersuchen, wie sich ein verändertes Verhältnis von Omega-6- zu Omega-3-Fettsäuren auf die akute Entzündungsreaktion in der Leber auswirkt. Bei diesem Modell handelt es sich um ein etabliertes Tiermodell mit Parallelen zu humanen Lebererkrankungen. Das D-

GaIN/LPS-Modell führt über die Aktivierung von Monozyten in der Leber zur massiven Freisetzung von Zytokinen [55,59]. Es konnten Ähnlichkeiten zur akuten humanen Virushepatitis sowie zur Autoimmun Hepatitis beschrieben werden [6,57]. Die Freisetzung von TNF- α ist als ein wichtiges frühes Ereignis in der Entzündungsausbreitung für die akute Alkoholhepatitis sowie für die Steatohepatitis beschrieben worden [7]. Im D-GaIN/LPS-Modell ist TNF- α der entscheidende Mediator. Daher ist dieses Modell besonders gut geeignet, um den Einfluss von TNF- α auf die Leberentzündung und -schädigung zu untersuchen [12,59].

Im Verlauf der akuten Virus-, Autoimmun- oder toxischen Hepatitis kommt es neben der Aktivierung von Monozyten auch zu einer T-Zell-Aktivierung. Aufgrund dieser Tatsache stellt sich die Frage, ob das D-GaIN/LPS-Modell der monozytären Aktivierung hinreichend repräsentativ zur Klärung des Einflusses des n-6/n-3-Verhältnisses auf akute Hepatitiden ist. Dafür spricht, dass die bisherigen *in vitro* und *in vivo* Studien in Tiermodellen und Zelllinien zu den Einflüssen von Omega-3-Fettsäuren auf Entzündungsgeschehen jeweils ihren Focus auf die Aktivität von Monozyten sowie die Produktion von TNF- α richteten und schützende Mechanismen nachweisen konnten [42,46,67,78]. Des Weiteren konnte man auch in Untersuchungen an isolierten humanen Monozyten nach der parenteralen Gabe von Fischöl eine Reduktion ihrer Aktivität zeigen [40]. Um der derzeitigen Studienlage Rechnung zu tragen und auf den bisherigen Ergebnissen aufbauen zu können, nutzte die vorliegende Arbeit das D-GaIN/LPS-Modell zur monozytären Aktivierung.

Es erscheint dennoch sinnvoll, in Tiermodellen mit unterschiedlicher Entzündungsaktivierung die Auswirkungen eines veränderten n-6/n-3-Verhältnisses zu untersuchen, da der Einfluss der Fettsäuren auf T-Zellen und andere Komponenten des Immunsystems im D-GaIN/LPS-Modell nicht genügend berücksichtigt wird. Weitere Hinweise auf hepatoprotektive Effekte der n-3-Fettsäuren, über das D-GaIN/LPS-Modell hinaus, enthalten die kürzlich veröffentlichten Untersuchungen von González-Pérez et al. im CCl₄-Modell und die Arbeit von El-Badry et al. im Steatohepatitis-Modell [70,82].

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Ergebnisse nicht auch mit Hilfe von *in vitro* Zellkulturmodellen hätten erreicht werden können. Dem ist jedoch entgegen zu setzen, dass die Entstehung und Ausbreitung einer akuten Leberentzündung ein komplexer Vorgang ist, an dem

eine Vielzahl verschiedener Zellen (z.B. Hepatozyten, Kupffer Zellen, T-Zellen, Endothelzellen) und systemische Faktoren (z.B. Hämodynamik) beteiligt sind.

Untersuchungen haben gezeigt, dass die Fettsäurezusammensetzung im gesamten Organismus transgener Fat-1-Mäuse zu Gunsten von Omega-3-Fettsäuren verändert ist [54], so dass ein systemischer Einfluss der Omega-3-Fettsäuren in diesem Modell wahrscheinlich ist. Lipidmediatoren der n-3-Fettsäuren wie Resolvin E1 sind hochpotente anti-inflammatorische Stoffe, die durch Zell-Zell-Interaktionen entstehen und erstmals im Entzündungsexsudat von Mäusen nachgewiesen wurden [83]. Weitere Studien haben gezeigt, dass aus EPA (20:5 n-3) in Blutgefäßen, im Zusammenspiel von Endothelzellen und Leukozyten, über die Zwischenstufe 18R-HEPE (Hydroxyeicosapentaensäure) in einer transzellulären Biosynthese Resolvin E1 entsteht [78]. Eine solche Komplexität können in vitro Studien nicht hinreichend nachstellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass ein gesteigerter Anteil von Omega-3-Fettsäuren im Lebergewebe zu einer Reduktion der Entzündungsaktivität und geringeren Zytokinfreisetzung geführt hat. Eine Einschränkung dieser Studie könnte der schmale Bereich des gewählten AA/EPA-Verhältnisses von etwa 1/1 in der Phänotypisierung der Fat-1-Mäuse sein. Ob und wie höhere oder niedrigere AA/EPA-Verhältnisse den beobachteten zytokinreduzierenden Effekt von Omega-3-Fettsäuren modifizieren, konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden. So ist es beispielsweise unklar in welchem Konzentrationsbereich n-3 PUFA ihren protektiven Einfluss auf die Leberentzündung ausüben. In diesem Zusammenhang wäre es auch von Interesse, ob es eine lineare dosisabhängige Wirkung oder eine Sättigungskinetik der n-3-Fettsäuren in der Leber gibt. Dies wäre eine Aufgabenstellung zukünftiger Studien.

Außerdem stellt sich die Frage in welchem Umfang sich Aussagen über das Fettsäureprofil der Leber anhand der Phänotypisierung am Außenohr treffen lassen. So könnte das bradytrophe Knorpelgewebe am Ohr Hinweise auf das Fettsäureprofil in Zellen des Leberparenchyms und - Bindegewebes geben. Die Fettsäureprofile des Lebergewebes könnten aufgrund der starken Durchblutung eher das Fettsäureprofil im Blut widerspiegeln. Eine zusätzliche gaschromatographische Analyse der Blutzellen könnte zukünftig eine sinnvolle Ergänzung der Phänotypisierung sein.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die ALT als Parameter zur Beurteilung der Leberschädigung genutzt. Die Messung eines einzelnen Parameters kann jedoch nur in einem beschränkten Maße Aussagen über die gesamte Leberfunktion machen. Deshalb wäre es von zusätzlichem Interesse, weitere Parameter wie die Aspartataminotransferase, die Alkalische Phosphatase oder das Bilirubin und ihre Veränderungen in den Versuchsgruppen zu untersuchen, um die Leberfunktion genauer beurteilen zu können.

Aus den Messungen mittels Echtzeit RT-PCR konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass das Verhältnis von der mRNA-Produktion von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IFN- γ zu der mRNA-Produktion des HkG GAP-DH in Fat-1-Mäusen signifikant reduziert ist. Es ist bekannt, dass die GAP-DH selbst aufgrund ihrer zentralen Stellung im Glukosestoffwechsel reguliert sein könnte. Dadurch wären Verfälschungen der Ergebnisse möglich, die die Verwertbarkeit der Messungen in Frage stellen würden. In der Literatur wurde jedoch die Nutzung der GAP-DH als HkG in Studien zur akuten Leberentzündung beschrieben. Davon wurde auch in dieser Arbeit Gebrauch gemacht [23].

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Auswirkung von Omega-3-Fettsäuren auf die Entzündungsreaktion und Zytokinproduktion bei einer akuten Leberentzündung zu untersuchen. Für diese Untersuchung scheint das Fat-1-Modell in Verbindung mit der D-GaIN/LPS induzierten Hepatitis gut geeignet zu sein. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die genauen Wirkungen und Zielstrukturen in der Zelle von Omega-3-Fettsäuren und ihrer Lipidmediatoren zu erkennen und verstehen zu können.

5.7 Klinische Bedeutung der Arbeit und Ausblick

Nachdem die entzündungshemmenden Eigenschaften von Omega-3-Fettsäuren seit mehreren Jahren bekannt sind und ihre Wirkung erfolgreich an verschiedenen Krankheitsmodellen (z.B. Rheumatoide Arthritis, Koronare Herzkrankheit, Colitis Ulcerosa) getestet wurden [43-45], gab es bisher noch keine Erkenntnis über einen eventuell protektiven Einfluss auf die akute Hepatitis.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen erstmalig auf einen protektiven Effekt von Omega-3-Fettsäuren auf die akute D-GaIN/LPS-induzierte Hepatitis hin. Auch wenn es sich hierbei um ein etabliertes Tiermodell handelt, muss die Übertragbarkeit auf den Menschen in zukünftigen Studien überprüft werden. Diese Untersuchung gibt wichtige Hinweise zum Einfluss von essentiellen Fettsäuren in der Pathogenese von humanen Hepatitiden und könnte neue

Therapieoptionen zur Behandlung dieser Krankheit liefern. Neben akuten Hepatitiden könnte diese Behandlungsmöglichkeit auch für chronische Hepatitiden, bei denen in vielen Fällen nur eine symptomatische Therapie möglich ist, in Betracht gezogen werden.

Die vielfältigen Ergebnisse aus Studien, die die zytokinsenkende Wirkung von Omega-3-Fettsäuren an Zellkulturen und im Menschen nachweisen konnten, haben gezeigt, dass Monozyten in der Gegenwart von n-3-Fettsäuren weniger aktiv sind [40,41,70]. Es erscheint daher möglich, dass Omega-3-Fettsäuren auch die Kupffer Zell-Aktivität und Zytokinfreisetzung im humanen Lebergewebe senken könnten. Auf diese Weise würden Omega-3-Fettsäuren zu einem mildereren Krankheitsverlauf beitragen.

Es ist bekannt, dass die enzymatische Ausstattung zur Verarbeitung langkettiger ungesättigter Fettsäuren in der Leber besonders hoch ist [84]. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Patienten sowohl mit nicht-alkoholtoxisch als auch alkoholtoxisch bedingten Leberschäden wie Zirrhose oder Cholestase ein Defizit an essentiellen Fettsäuren aufweisen. So existiert bei Patienten mit Leberzirrhose eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Schwere der Krankheit und der DHA-Konzentration im Plasma [85,86]. Diese Patienten könnten besonders von einer Anreicherung der Nahrung mit Omega-3-Fettsäuren profitieren.

Chronische Leberentzündungen sind nachweislich an der Entwicklung von Neoplasien, wie dem Hepatozellulären Karzinom, beteiligt. Die chronische Unterhaltung der Entzündung durch Zellen des Immunsystems erfolgt u.a. durch die Freisetzung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 oder IL-6. Außerdem werden verstärkt Chemokine, Wachstumsfaktoren sowie reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt. Unter dem Einfluss dieser Mediatoren entsteht ein Milieu, in dem Zellmigration, Zellproliferation und schließlich die Tumorentwicklung begünstigt werden. Es ist bekannt, dass chronische Entzündungen über die Einbeziehung umliegender Entzündungszellen die Bildung von Karzinomen begünstigen [87].

In ihren Untersuchungen konnten Karin et al. eine Verbindung zwischen der Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ und der Karzinogenese feststellen [88]. Weitere Studien von Pikarsky et al. demonstrierten, dass $\text{NF-}\kappa\text{B}$ als Tumorpromotor in einem Modell für entzündungsvermittelten Leberkrebs fungiert und dessen Ausschaltung schützend auf das Lebergewebe wirkt [89]. Im Hinblick auf den chronischen Krankheitsverlauf verschiedener Hepatitiden könnte daher der hier

gezeigte entzündungshemmende Einfluss von Omega-3-Fettsäuren im Zusammenhang mit der Karzinogenese zukünftig von klinischer Relevanz sein. So wäre es denkbar, dass die Hemmung von NF- κ B durch Metabolite der n-3-Fettsäuren die Entstehung eines Krebs erzeugenden Umfeldes verzögern könnte.

Weitere Aspekte für den zukünftigen klinischen Einsatz der n-3-Fettsäuren im Zusammenhang mit Lebererkrankungen liefern die Untersuchungen von Beharry et al. und El-Badry et al.. Beharry et al. zeigten, dass eine DHA (22:6 n-3)-reiche Nahrung den Grad der Leberentzündung bei Cystischer Fibrose in CFTR^{-/-} Mäusen signifikant senken kann [90]. Die Studie von El-Badry et al. wies nach, dass eine Omega-3-reiche Nahrung die Schwere der Leberentzündung bei der Steatohepatitis durch eine verbesserte Blutzirkulation deutlich reduzieren kann [82]. Beide Studien verdeutlichen, dass Omega-3-Fettsäuren eine Exerbation von Leberentzündungen signifikant dämpfen können. Damit eröffnen sie neue zukünftige Behandlungsmöglichkeiten für betroffene Patienten mit Cystischer Fibrose bzw. Patienten nach Lebertransplantation.

Omega-3-Fettsäuren scheinen eine einfache, günstige und attraktive Möglichkeit zur Behandlung von Leberentzündungen aber auch zu einer allgemeinen Senkung der Entzündungsaktivität im Körper darzustellen. So könnten sie zum Beispiel existierende Therapien ergänzen oder präventiv eingesetzt werden. Um ihren klinischen Nutzen besser beurteilen zu können, ist es notwendig, die positiven Ergebnisse aus den Tiermodellen zukünftig in klinischen Studien zu überprüfen.