

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Auswirkungen einer moderaten Hyperkapnie auf die
Immunmodulation des Organismus im septischen
Tiermodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jan Wilhelm Schulz
2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Gehrman

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Stübs CC, Picker O, Schulz J, Obermiller K, Barthel F, Hahn AM, Bauer I, Beck C
Acute, short-term hypercapnia improves microvascular oxygenation of the colon in an animal model of sepsis. *Microvasc. Res.* 90, 180–6 (2013).

Zusammenfassung

Eine moderate Hyperkapnie kann möglicherweise durch Optimierung der Durchblutungsverhältnisse im Darm die Prognose von septischen Patienten verbessern. In diesem Zusammenhang ist allerdings unklar, ob der Verlauf der Sepsis durch immunmodulatorische Effekte der Hyperkapnie zusätzlich modifiziert wird und ob diese Effekte möglichen günstigen Auswirkungen der Hyperkapnie gegenüberstehen. Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob eine moderate Hyperkapnie *in vivo* die systemische Zytokinantwort und die lokale inflammatorische Reaktion der Leber in einer moderaten Sepsis beeinflusst.

Dafür wurde bei 40 männlichen Wistar-Ratten entweder ein Stent (18G) in das *Colon ascendens* implantiert (*colon ascendens stent peritonitis* (CASP)) und dadurch eine polymikrobielle Sepsis induziert (n = 20) oder es wurde eine Sham-Operation durchgeführt (n = 20). Nach 24 Stunden wurden die Tiere erneut narkotisiert, laparotomiert und für 120 Minuten druckkontrolliert beatmet, entweder unter normokapnischen ($p\text{CO}_2 = 35 - 45$ mmHg) oder hyperkapnischen ($p\text{CO}_2 = 65 - 70$ mmHg, exogene CO_2 -Zufuhr) Bedingungen. Die Zytokinpiegel (TNF- α / IL-6 / IL-10) wurden im Plasma untersucht. In der Leber wurde die Myeloperoxidase-Aktivität, die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten und die Expression der miRNA-223 bestimmt.

Durch die moderate Sepsis kam es nach 24 Stunden zu einem Anstieg der systemischen Zytokinantwort (TNF- α : 0 (0–16) pg/ml vs. 0 (0–0) pg/ml; IL-6: 0 (0–153) pg/ml vs. 0 (0–0) pg/ml; IL-10: 202 (86–794) pg/ml vs. 40 (0–141) pg/ml ($p < 0,05$); septische vs. Sham-Tiere) sowie zu einem Anstieg der Myeloperoxidase-Aktivität in der Leber (1,57 (1,42–2,18) vs. 0,87 (0,73–1,31) ($p < 0,05$); Normokapnie Sepsis vs. Normokapnie Sham). Die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten und die relative Expression der miRNA-223 in der Leber wurden durch die Sepsis nicht beeinflusst. 120 Minuten hyperkapnischer Beatmung haben weder auf die systemische Zytokinantwort noch auf die lokale inflammatorische Reaktion der Leber einen Effekt.

Eine CASP-Operation führt reproduzierbar zur Induktion einer moderaten systemischen Sepsis und zu einer Inflammation in der Leber, welche nicht durch eine zusätzliche moderate Hyperkapnie beeinflusst wird. Dabei verändert die moderate Sepsis nicht die relative Expression der miRNA-223 in der Leber. Insofern scheint die kurzzeitige moderate Hyperkapnie in einer moderaten Sepsis keine beeinträchtigenden Effekte auf die Immunfunktion zu induzieren, die einer möglicherweise günstigen Wirkung auf die intestinale Oxygenierung gegenüberstehen.

Abkürzungsverzeichnis

3-MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
Aqua dest.	destilliertes Wasser	HCl	Chlorwasserstoff
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>	HF	Herzfrequenz
BGA	Blutgasanalyse	IL	Interleukin
CASP	<i>colon ascendens stent peritonitis</i>	LPS	Lipopolysaccharide
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure	MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>	miRNA	<i>micro</i> Ribonukleinsäure
CO₂	Kohlenstoffdioxid	mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
C_t	<i>Cycle of Threshold</i>	MPO	Myeloperoxidase
DEPC	Diethylpyrocarbonat	mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	MW	Mittelwert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)	N₂	Stickstoff
dNTP	Desoxyribonukleotide	Na	Natrium
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure	O₂	Sauerstoff
ELISA	<i>Enzym-linked immunosorbent assay</i>	OD	Optische Dichte (in nm)
etCO₂	endexpiratorische CO ₂ Konzentration	p.A.	<i>pro analysi</i>
FA	Formaldehyd-Agarose	PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
FBS	Fetales Bovines Serum	pCO₂	Partialdruck des Kohlenstoffdioxids
FiO₂	inspiratorische Sauerstofffraktion	PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
G	Gauge	pO₂	Partialdruck des Sauerstoffs

PVK	Peripher venöser Katheter
qRT-PCR	<i>Real-Time</i> -quantitative-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
s.c.	subcutan
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SRSS	<i>Septic rat severity scoring</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
U	<i>Units</i>
UV	ultraviolett
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Fragestellungen der Arbeit	3
3. Methoden	4
3.1 Tierexperimenteller Teil	4
3.1.1 Versuchstiere.....	4
3.1.2 CASP-Chirurgie	4
3.1.3 Intervention	5
3.2 Laborexperimenteller Teil.....	7
3.2.1 ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel	7
3.2.2 Myeloperoxidase- <i>Assay</i> in der Leber.....	8
3.2.3 ASD-Färbung Neutrophiler Granulozyten in der Leber	8
3.2.4 qRT-PCR zur Bestimmung der miRNA-223-Expression in der Leber	9
3.3 Statistik	12
4. Ergebnisse	13
4.1 ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel	13
4.2 Myeloperoxidase- <i>Assay</i> in der Leber.....	15
4.3 ASD-Färbung Neutrophiler Granulozyten in der Leber	15
4.4 qRT-PCR zur Bestimmung der miRNA-223-Expression in der Leber	16
4.5 Systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen.....	17
5. Diskussion	18
5.1 Ergebnisdiskussion	18
5.2 Klinischer Bezug.....	22
6. Schlussfolgerung	23
7. Literatur- und Quellenverzeichnis	24
8. Anhang	30
8.1 Material und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils	30
8.2 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils.....	31
8.3 Kits des laborexperimentellen Versuchsteils	33
8.4 Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils	34
8.5 Material und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils.....	37
8.6 Zusammenstellung der nicht eingeschlossenen Versuche	39
8.7 <i>Septic rat severity scoring system</i>	40

1. Einleitung

Die Sepsis ist immer noch eine der Haupttodesursachen auf der Intensivstation und dies trotz neuer Therapiestrategien und Therapieansätze in den letzten Jahren ¹. Das Immunsystem spielt dabei eine entscheidende Rolle. Es bekämpft mikrobielle Pathogene, kann dabei jedoch gleichzeitig zu Kollateralschäden mit beeinträchtigter Organfunktion führen ². In diesem Zusammenhang sind die systemischen und lokalen Entzündungsreaktionen der Sepsis von besonderer Bedeutung.

Durch den zeitabhängigen Anstieg der systemischen pro- und antiinflammatorischen Zytokine kann es durch kardiale Depression, Gewebsödeme und disseminierte intravasale Gerinnung zu einer herabgesetzten Mikrozirkulation mit Endorganschäden kommen ³⁻⁵. Darüber hinaus kann die nun gesteigerte Aktivität der lokalen Immunreaktionen, wie z.B. der Neutrophilen Granulozyten, erhöhten oxidativen Stress zur Folge haben. Dies führt sowohl zu direkter Zellschädigung als auch über die Beeinträchtigung der endothelialen Zell-Zell-Verbindungen zu Gewebsödemem ⁶⁻⁹. Daher können beide Entzündungskaskaden entscheidenden Einfluss auf die Funktion der Organe nehmen.

In Bezug auf die Funktionalität der Organe stellt insbesondere die adäquate Oxygenierung von septischen Patienten ein wichtiges Therapieziel dar. Dazu werden heute Lungenprotektive Beatmungsformen mit niedrigen Tidalvolumina eingesetzt, um Sepsis-induzierte Lungenschäden nicht weiter zu verschlimmern ¹⁰. Diese reduzieren den mechanisch induzierten alveolaren Stress und können die Sterblichkeit von Patienten senken ^{11 12}. Im Rahmen dieses Therapiekonzeptes wird häufig keine physiologische CO₂-Elimination erreicht, sodass es zu einer sogenannten „permissiven Hyperkapnie“ kommt, welche mit einem Abfall des Blut-pHs einhergeht (hyperkapnische Azidose) ¹³.

Es gibt Anzeichen dafür, dass eben diese moderate Hyperkapnie das Überleben von Patienten mit einem *acute respiratory distress syndrome* verlängern kann, wobei die genaue Ursache bisher nicht bekannt ist ¹⁴. Eine moderate Hyperkapnie kann die Oxygenierung und den Energiemetabolismus von Geweben (z.B. des Gastrointestinaltraktes, des zentralen Nervensystems und des Myokards) verbessern ¹⁵⁻¹⁹. Als mögliche Erklärungsansätze dienen die hämodynamischen Veränderungen unter einer moderaten Hyperkapnie, wie der positiv inotrope Effekt, die systemische Vasodilatation, die Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve und die verbesserte Mikrozirkulation im Darm ¹⁸⁻²⁴.

In der letzten Zeit sind jedoch Bedenken hinsichtlich der Sicherheit einer moderaten Hyperkapnie in einer Sepsis aufgekommen ²⁵. Dabei spielen vor allem die Auswirkungen

der moderaten Hyperkapnie auf das Immunsystem eine Rolle, welche möglichen günstigen Effekten einer solchen gegenüberstehen ²⁶.

Hinsichtlich der systemischen Zytokinspiegel in einer Sepsis werden die Auswirkungen einer moderaten Hyperkapnie kontrovers diskutiert. Sowohl *ex-vivo*- als auch *in-vivo*-Studien zufolge senkt eine moderate Hyperkapnie die proinflammatorischen Zytokinspiegel ^{27 28}. Im Gegensatz dazu steht eine *in-vivo*-Studie, in der es unter moderater Hyperkapnie zu einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine in der Lunge gekommen ist ²⁹.

Unklar ist auch, ob und in welchem Ausmaß eine moderate Hyperkapnie die lokale Entzündungsreaktion während einer Sepsis moduliert. So konnte durch eine moderate Hyperkapnie u.a. der Gewebeschaden in der Lunge reduziert werden. Durch sie wird sowohl die Infiltration von Neutrophilen Granulozyten als auch deren Aktivität verringert und damit kann der oxidative Stress vermindert werden ³⁰⁻³². Demgegenüber hatte eine moderate Hyperkapnie keinen Einfluss auf die Myeloperoxidase-Aktivität der Neutrophilen Granulozyten im Darm ³³.

Obwohl die Leber in einer Sepsis eine entscheidende Rolle einnimmt, wurden die Effekte der moderaten Hyperkapnie auf die Neutrophilen Granulozyten in der Leber bisher nicht untersucht. Kommt es im Darm zu einer bakteriellen Translokation, ist die Leber ein zentraler Ausgangspunkt für die Pathogenabwehr. Die Infiltration und Aktivität der Neutrophilen Granulozyten trägt in diesem Zusammenhang allerdings auch zu einer Leberzellschädigung bei und kann daher die klinische Situation des Patienten verschlechtern ^{34 35}.

Darüber hinaus kommt es im Rahmen einer Leberzellschädigung zu Veränderungen von molekularen Prozessen, wie der Transkription und Translation. In diese Veränderungen der Genexpression sind miRNAs, endogene, kleine, nicht-kodierende RNAs, eingebunden ³⁶. Exemplarisch sei hier die miRNA-223 genannt, welche normalerweise als Knochenmarksspezifisch angesehen und als Modulator der zellulären Differenzierung fungiert ³⁷. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass insbesondere die miRNA-223 auch bei verschiedenen Lebererkrankungen, wie dem hepatozellulären Karzinom und der Leberischämie, den oxidativen Stress und den Lebermetabolismus regulieren kann ^{38 39}.

Bisher wurde jedoch nicht untersucht, ob es bei einer Sepsis ebenfalls zu Veränderungen der relativen Expression der miRNA-223 in der Leber kommt, obwohl Expressionsunterschiede der miRNA-223 in einer Sepsis zu Einschränkungen der Organfunktionalität führen können ⁴⁰. Zudem ist fraglich, welche Rolle die moderate Hyperkapnie in diesem Zusammenhang spielt.

Zusammenfassend bleibt insofern unklar, ob und in welchem Ausmaß eine moderate Hyperkapnie, welche geeignet ist, die Oxygenierung der Darmschleimhaut aufrechtzuerhalten¹⁸, ebenfalls die inflammatorische Reaktion des Körpers im Allgemeinen und der Leber im Speziellen beeinflusst.

2. Fragestellungen der Arbeit

Tierexperimentell kann durch die Implantation eines Stents in den ascendierenden Schenkel des *Colons* eine Sepsis induziert werden. Durch eine solche, sogenannte CASP-Operation gelingt es, über die Induktion einer Peritonitis eine abdominale Sepsis hervorzurufen⁴¹. Der venöse Blutfluss des Bauchraums wird dabei vornehmlich über die *Vena portae* abgeleitet und findet nach Passage der Leber Anschluss an den Systemkreislauf. Aufgrund dessen eignet sich eine experimentell erzeugte, abdominale Sepsis hervorragend zur Untersuchung der systemischen Folgen einer Sepsis sowie der lokalen Entzündungsfolgen in der Leber⁴².

Ausgehend von dieser Situation ergeben sich die folgenden Fragestellungen:

1. Führt eine CASP-Operation mit einem kleinen Stentdurchmesser reproduzierbar zur Induktion einer moderaten Sepsis?
2. Kann eine moderate Hyperkapnie die systemische Zytokinantwort *in vivo* beeinflussen?
3. Welches Ausmaß hat die lokale Entzündungsreaktion der Leber gemessen anhand der Myeloperoxidase-Aktivität und der Infiltration von Neutrophilen Granulozyten und inwieweit wird dies durch eine moderate Hyperkapnie moduliert?
4. Führt eine moderate Sepsis zu Veränderungen der relativen Expression der miRNA-223 in der Leber und wird diese durch eine moderate Hyperkapnie beeinflusst?

3. Methoden

3.1 Tierexperimenteller Teil

Angaben bezüglich benutzter Materialien und Geräte befinden sich im Anhang (siehe S. 30 – 31).

3.1.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (Az. 8.87-50.10.34.08.266) und nach erfolgreicher Teilnahme am Kurs zur Versuchstierkunde durchgeführt. Insgesamt wurden die Versuche an 85 männlichen Wistar-Ratten (Gewicht 341 g +/- 66 g) durchgeführt, wobei davon 40 Versuche in die Auswertung eingeflossen sind. Details bezüglich der nicht berücksichtigten Versuche (n = 45) sind im Anhang dargestellt (siehe S. 39).

Vor den Versuchen wurden die Tiere in kleinen Gruppen in Käfigen gehalten und erhielten Standard-Ratten-Nahrung und Wasser *ad libitum*. 24 Stunden vor Beginn der eigentlichen Versuche wurde bei den Tieren in randomisierter Reihenfolge entweder eine CASP- oder eine Sham-Operation durchgeführt. Am Versuchstag erfolgte dann eine weitere Randomisierung, bei der die Tiere entweder in ein normokapnisches oder in ein hyperkapnisches Beatmungsprotokoll eingeteilt wurden (siehe Abb. 1).

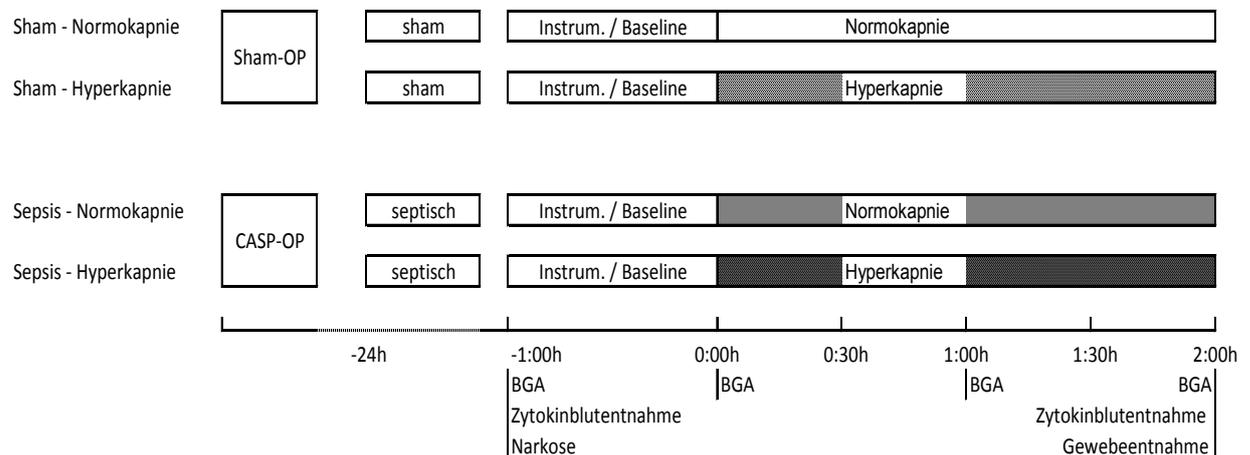


Abb. 1: Versuchsablauf

24 Stunden nach der Sepsisinduktion bzw. Sham-Operation erfolgte der Versuch mit entweder normokapnischer oder hyperkapnischer Beatmung

3.1.2 CASP-Chirurgie

Die Sepsis wurde in Anlehnung an ein bekanntes Modell mittels der CASP-Operation induziert ⁴¹. Dafür erhielten die Tiere unter erhaltener Spontanatmung über eine Maske

3,0 - 3,2 Vol. % Sevofluran bei einem FiO_2 von 0,5. Zur Schmerztherapie wurde Buprenorphin (0,05 mg/kg) alle 12 Stunden subkutan injiziert.

Daraufhin wurden die Tiere in Rückenlage verbracht und auf einer Wärmematte gelagert, ein Bereich von 2 x 3 cm der Bauchwand rasiert und anschließend desinfiziert. Über den desinfizierten Operationsbereich wurde folgend ein Lochtuch aufgebracht und eine zirka 2 cm lange mediane Laparotomie durchgeführt. Das Zökum wurde aufgesucht und auf der gegenüberliegenden Seite des Mesenteriums 1 cm distal der Ileozökalklappe mit einem peripher venösen Katheter 4 mm tief perforiert. Die Nadel des PVK wurde herausgezogen und der Katheter 4 mm über der Darmwand abgeschnitten, sodass ein Katheterstück von insgesamt 8 mm Länge entstand. Der Katheter wurde dann mit einer Naht an der Darmwand fixiert. Daraufhin wurde durch vorsichtige Palpation ca. 0,5 ml Fäzes in den Stent gedrückt, um einen konstanten Austritt in die Bauchhöhle zu gewährleisten. Die Sham-Gruppe wurde in gleicher Weise behandelt, allerdings wurde der PVK nicht in das *Colon*-Lumen eingebracht, sondern auf der *Tunica serosa* befestigt, ohne das *Colon* zu perforieren.

Anschließend wurde das Zökum in beiden Gruppen wieder in seiner Ausgangsposition platziert und der Bauchraum verschlossen. Dafür wurden sowohl die Muskelschicht als auch die Bauchhaut mit einem resorbierbaren Faden vernäht. Die Tiere wurden zum Abschluss gewogen, ihre Temperatur wurde gemessen und sie erwachten in warmen Käfigen von ihrer Anästhesie. Insgesamt dauerte die Operation zirka 15 Minuten.

Die Tiere verblieben anschließend für 24 Stunden – bei ausreichendem Angebot von Wasser und Nahrung – in ihren individuellen Käfigen. In dieser Zeit wurden die Tiere alle vier Stunden von einer Tiermedizinerin untersucht. Die klinischen Zeichen der Sepsis wurden in ein Scoring-System *septic rat severity scoring* (SRSS) eingetragen (siehe Anhang). 12 Stunden nach der CASP-Operation wurde die subkutane Buprenorphingabe (0,05 mg/kg) wiederholt.

3.1.3 Intervention

Nach 24 Stunden wurden alle Tiere noch einmal gewogen, dann durch die intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (60 mg/kg) anästhesiert und auf einer Wärmematte platziert, wodurch eine Körpertemperatur von 37 – 38 °C sichergestellt wurde. Die Tiere wurden tracheotomiert, intubiert und volumenkontrolliert beatmet (70/min, Tidalvolumen 1.8–2.5 ml, Beatmungsdruck < 17 cm x H₂O, $FiO_2 = 0,3$, $pCO_2 45 \pm 5$ mmHg). In die rechte *Vena jugularis externa* wurde ein 24G-Katheter eingebracht, über den die Tiere kontinuierlich 10 mg/kg/h Pentobarbital in 4 ml/h Ringerlösung und alle 2 Stunden 2 mg Pancuronium

um erhielten. Zur kontinuierlichen Messung des arteriellen Blutdrucks wurde die linke *Arteria carotis* vorsichtig vom *Nervus vagus* isoliert und ein 24G-Katheter vorgeschoben, welcher mit einem Gould Statham Druckwandler verbunden wurde. Es wurden 120 µl arterielles Blut für die Blutgasanalyse entnommen (Zeitpunkt -1:00 h). Weitere Blutgasanalysen wurden zu den Zeitpunkten 0:00 h / 1:00 h / 2:00 h durchgeführt (siehe Abb. 1).

Im weiteren Verlauf des Versuchs, dessen Ergebnisse allerdings nicht Bestandteil dieser Doktorarbeit sind, wurde eine erneute Laparatomie durchgeführt, das *Colon ascendens* sanft aus dem Bauchraum mobilisiert, die gegenüberliegende Seite des Mesenteriums aufgesucht und 2 cm distal der Iliozökalklappe eine Sonde zur kontinuierlichen Messung der mikrozirkulatorischen Oxygenierung atraumatisch auf die *Tunica serosa* aufgelegt. Der Darm und die Sonden wurden mit einer sterilen Gaze bedeckt, um einer Austrocknung vorzubeugen (Befeuchtung mit 8 ml/h Ringerlösung)¹⁸.

Nach der kompletten Instrumentierungsphase wurden die Tiere weitere 30 Minuten normokapnisch beatmet und die Baseline-Messungen durchgeführt. Die Tiere wurden je nach ihrer Gruppenzugehörigkeit für 120 Minuten entweder normokapnisch (pCO₂-Zielwert von 45 ± 5 mmHg) oder hyperkapnisch (pCO₂-Zielwert von 75 ± 5 mmHg) durch Zumischung von 10 % CO₂ zur Inspirationsluft beatmet (siehe Abb. 1). Intermittierend wurden Blutgasanalysen abgenommen und die Beatmung entsprechend angepasst. Sowohl die hämodynamischen als auch die respiratorischen Variablen wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Nach Abschluss des Versuchs wurden die Tiere in Narkose durch Exsanguination tierschutzkonform euthanasiert.

Für den laborexperimentellen Teil wurde den Tieren zweimal 1 ml EDTA-Blut aus der *Arteria carotis* entnommen. Die erste Blutentnahme erfolgte im Rahmen der Instrumentierungs-/Baseline-Phase, wobei das entnommene Blut durch das vierfache Volumen Ringerlösung ersetzt wurde. Die zweite Blutentnahme wurde analog am Ende des Experiments im Rahmen der Exsanguination vorgenommen (siehe Abb. 1). Die Blutproben wurden zentrifugiert (4 °C, 4000 x g, 10 min) und das überständige Plasma abpipettiert und bei -70 °C tiefgefroren.

Den Tieren wurden am Ende des Experiments Gewebestücke aus beiden Leberlappen entnommen. Diese wurden umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenfalls bei -70 °C gelagert (siehe Abb. 1).

3.2 Laborexperimenteller Teil

Angaben bezüglich benutzter Materialien und Geräte sowie von Chemikalien, Reagenzien, Kits, Puffern und Lösungen befinden sich im Anhang (siehe S. 31 – 38).

3.2.1 ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel

Die Quantifizierung der Zytokine wurde nach den mitgelieferten Protokollen der ELISA-Kits der Firma BD Biosciences durchgeführt. Alle nachfolgend genannten Waschschrirte erfolgten mit 300 µl/Well Waschpuffer und bei allen Inkubationsschritten wurde die Platte stets mit einer Klebefolie verschlossen, damit kein Teil der Auftragung durch Verdunstung verloren ging.

Für die Untersuchung der Zytokine wurden eine 96-Well Mikrotiterplatte über Nacht bei 4 °C mit 100 µl/Well *Capture* Antikörper in *Coating* Puffer (Verdünnung 1:250) beschichtet. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte das Auftragen von 200 µl/Well *Assay Diluent*, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Die Platte wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wurde fünfmalig gewaschen. Danach erfolgte im Doppelwert das Pipettieren von 100 µl/Well Standard beziehungsweise der zu untersuchenden Plasmaprobe. Die Platte wurde folgend für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Auf einen erneuten fünfmaligen Waschschrirrt folgte bei der Untersuchung der Zytokine TNF- α und IL-6 die Zugabe von 100 µl/Well Detektionsantikörper in *Assay Diluent* (Verdünnung 1:250) und die Inkubation der Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach fünfmaligem Waschen wurden 100 µl/Well Enzym-Reagenz in *Assay Diluent* (Verdünnung 1:250) auf die Platte pipettiert und die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei IL-10 wurde nach der Inkubation für 2 Stunden ebenfalls fünfmalig gewaschen, jedoch erfolgte dann die Auftragung von 100 µl/Well *Working Detector*. Die Platte inkubierte bei IL-10 für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Folgend wurde bei allen Zytokinuntersuchungen ein siebenmaliger Waschschrirrt durchgeführt und anschließend folgte das Pipettieren von 100 µl/Well Substratlösung. Die Platte inkubierte 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zuletzt wurden 50 µl/Well Stopp-lösung hinzugegeben. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm im Photometer gemessen.

3.2.2 Myeloperoxidase-Assay in der Leber

Die Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität wurde in dieser Arbeit durch die H₂O₂-vermittelte Oxidation von TMB durchgeführt⁴³. 50 mg Lebergewebe wurden in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Metallpotter pulverisiert und in 500 µl Phosphatpuffer 1 homogenisiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben 30 Sekunden dem Ultraschallbad ausgesetzt und dann dreimalig in flüssigem Stickstoff gefroren und wieder aufgetaut. Die Proben wurden anschließend erneut 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt.

Im Folgenden wurden die Proben 2 Stunden bei 60 °C im Heizblock inkubiert und bei 4 °C für 12 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 20 µl Überstand mit 10 µl TMB und 70 µl 4,2 mmol/l H₂O₂-Lösung als Substrate für die Myeloperoxidase in einer Mikrotiterplatte vermischt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend mit einer Klebefolie verschlossen und 20 Minuten inkubiert. Zum Schluss wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 655 nm gemessen.

3.2.3 ASD-Färbung Neutrophiler Granulozyten in der Leber

Gefrierschnitte

Zur Verbesserung der Schnitteigenschaften wurde das Lebergewebe einen Tag vor der Durchführung der Gefrierschnitte bei -20 °C gelagert. Es wurden Kryoschnitte mit einer Dicke von 8 µm angefertigt, auf einen Objektträger übertragen und luftgetrocknet. Pro Tier wurden je zwei Schnitte auf einen Objektträger übertragen. Anschließend wurden die Objektträger bei -20 °C gelagert.

ASD-Färbung

Um die Granulozyten, deren Hauptanteil die Neutrophilen Granulozyten ausmachen, im Lebergewebe anzufärben, wurde eine Naphthol-ASD-Chloracetatesterase-Färbung durchgeführt. Durch die Färbung wurden die Granulozyten leuchtend rot und ihre Kerne blau dargestellt.

Die Objektträger wurden 30 Minuten vor der Färbung aufgetaut und das Lebergewebe mit einem DakoPen umrandet. Zur Fixierung wurden anschließend 200 µl Paraformaldehyd je Objektträger für 10 Minuten aufgetragen. Die Objektträger wurden dann 5 Minuten in 0,01 mol/l PBS und 2 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Daraufhin wurden die Objektträger für 30 Minuten in der ASD-Färbelösung auf der Schüttelplatte bei Raumtemperatur inkubiert, 1 Minute in Aqua dest. gewaschen und mit Hämalaun für 30 Sekunden gegengefärbt. Danach wurden sie in Leitungswasser für 2 Minuten gebläut und in Aqua dest. gewaschen. Zum Schluss wurden die Objekte mit Aquatex eingedeckt.

Mikroskopie

Alle Schnitte wurden verblindet im Lichtmikroskop bei 200 x Vergrößerung beurteilt. Es wurden die ASD-positiven Zellen ausgezählt und deren Anzahl in ASD-positive Zellen/mm² Lebergewebe angegeben. Je Tier wurden zwei Schnitte bewertet und der Mittelwert aus beiden Schnitten gebildet.

3.2.4 qRT-PCR zur Bestimmung der miRNA-223-Expression in der Leber

RNA-Isolierung mit Trizol

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Lebergewebe erfolgte nach dem TRIzol®-Reagent-Protokoll der Firma Invitrogen. Dazu wurden 50 mg tiefgefrorenes Lebergewebe im durch flüssigen Stickstoff gekühlten Metallpotter pulverisiert und in 0,5 ml TRIzol® Reagent homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 0,1 ml Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden 15 Sekunden lang handgeschüttelt und dann wiederum für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation der Proben bei 12000 x g und 4 °C. Hierbei bildeten sich drei Phasen aus: Eine obere, wässrige Phase, in der die RNA gelöst war, eine mittlere, weißliche, proteinhaltige Phase und eine untere, rötliche Phase, welche die DNA enthielt.

Die obere wässrige RNA-haltige Phase wurde durch vorsichtiges Abpipettieren in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, ohne dass Bestandteile der anderen Phasen in die Pipettenspitze gelangten. In diesem neuen Reaktionsgefäß folgte die RNA-Ausfällung. Dazu wurden zu der wässrigen Phase 0,25 ml Isopropylalkohol gegeben und vermischt. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C. Die RNA präzipitierte am Boden des Reaktionsgefäßes und wurde als gelartiges Pellet sichtbar. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Es wurde der folgende Waschschrift zweimal durchgeführt: Waschen der RNA mit 0,5 ml 75 %igem unvergälltem Ethanol, kurz Vortexen, dann bei 7500 x g für 5 Minuten und 4 °C Zentrifugieren, Überstand vorsichtig abpipettieren. Daraufhin wurde das RNA-Pellet im offenen Probengefäß bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurde bei diesem Schritt darauf geachtet, dass das Pellet nicht vollständig austrocknete. Als letzter Schritt wurden je nach Pelletgröße 100-150 µl 95 °C heißes, RNase-freies Wasser hinzugegeben, um eine Resuspension zu erreichen. Danach wurden die Proben auf drei 100 µl Reaktionsgefäße verteilt und auf Eis gestellt. Alle Schritte erfolgten unter Beachtung der RNase-Freiheit.

Spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration im Nanodrop

Um die RNA-Konzentration in den Leberproben (in ng/µl) und ihren Reinheitsgehalt zu bestimmen, folgte eine photometrische Messung mittels Nanodrop. Dazu wurde die Extink-

tion bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Ein OD_{260}/OD_{280} -Quotient zwischen 1,8 und 2,0 galt als Maß für eine ausreichende Reinheit. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren.

RNA-Gelelektrophorese

Um die RNA-Intaktheit zu überprüfen, wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Eine Auftrennung in zwei deutlich erkennbare getrennte Banden (18S und 28S ribosomale RNA-Banden) sprach für eine intakte RNA.

1,2 g Agarose wurden mit 10 ml 10x FA Gel Puffer und 90 ml DEPC Wasser zusammengegeben und 3 Minuten in der Mikrowelle aufgeköcht. Als Nächstes wurden 2 μl Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff und 1,8 ml 37 %iges Formaldehyd hinzugegeben. Die Lösung wurde in die Gelform der Elektrophoresekammer gegossen und ein Kamm für vorgesehene Taschen eingesetzt. Anschließend härtete die Lösung aus. In der Zwischenzeit wurden die zu untersuchenden Proben vorbereitet. Dafür wurden 2,5 μg RNA in 15 μl Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser angesetzt und 3 μl *Loading Buffer* hinzugegeben. Daraufhin wurden die Proben 10 Minuten auf $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Die Elektrophoresekammer mit dem gehärteten Agarosegel wurde anschließend mit 1x FA *Running Buffer* gefüllt und die Proben wurden in die Taschen pipettiert. Für die Auftrennung der RNA wurde ein Strom von 80 V für zirka 1 Stunde angelegt. Als Letztes folgte die Fotografie unter UV-Licht.

Reverse Transkription

Die vorliegende RNA wurde als Nächstes in cDNA umgeschrieben. Dabei wurde nicht die gesamte isolierte RNA umgeschrieben, sondern allein die zu untersuchende miRNA-223 und der entsprechende *Housekeeper* U6, die in der Gesamt-RNA enthalten waren. Die nachfolgende cDNA-Synthese orientierte sich am Protokoll des TaqMan MicroRNA Reverse-Transkriptions-Kit der Firma Applied Biosystems.

Um eine RNA umzuschreiben, war der *RT Master Mix* wie folgt zusammengesetzt:

Komponente	Volumen (in μl)
100 dNTP Mix	0,15
<i>Multiscribe RT Enzyme</i>	1,00
10x <i>RT Buffer</i>	1,50
RNase Inhibitor (20 U/ μl)	0,19
Nuclease-freies Wasser	4,16
Total	7,00

Zu dem hergestellten *RT Master Mix* wurden 5 μl RNA-Probe (in einer Konzentration von 2 ng/ μl) und entweder 3 μl *RT Primer* 5x für miRNA-223 oder für U6 hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 15 μl pro Reaktionsgefäß entstand. Der Inhalt der Reakti-

onsgefäße wurde vermischt und kurz zentrifugiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Es folgte die reverse Transkription der Proben im *Thermocycler* unter folgenden Reaktionsbedingungen:

- 30 Minuten bei 16 °C
- 30 Minuten bei 42 °C
- 5 Minuten bei 85 °C
- ∞ bei 12 °C

Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die nachfolgende qRT-PCR orientierte sich am Protokoll des TaqMan MicroRNA *Assay* der Firma Applied Biosystems.

Für den Reaktionsansatz einer Probe wurden benötigt:

Komponente	Volumen (in µl)
TaqMan MicroRNA <i>Assay</i> 20x	1
TaqMan 2x Universal-PCR- <i>Master Mix</i>	10
Nuclease-freies Wasser	8
cDNA der zu untersuchenden Probe	1
Total	20

Zur Erstellung des Reaktionsansatzes wurden zuerst TaqMan MicroRNA *Assay* 20x, TaqMan 2x Universal-PCR-*Master Mix* und Nuclease-freies Wasser entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden Proben zusammen pipettiert, vermischt und zentrifugiert. Aus diesem Mix wurden für jede Probe jeweils 19 µl in eine PCR-Wellplatte pipettiert. Anschließend wurde 1 µl zu untersuchende cDNA in das Well gegeben. Für die miRNA-223 wurde unverdünnte cDNA und für den *Housekeeper* U6 1:5 verdünnte cDNA eingesetzt. Die Proben wurden immer im Doppelwert bestimmt. Als Negativkontrolle diente RNase-freies Wasser. Die PCR-Wellplatte wurde mit Folie versiegelt, bei 4 °C zentrifugiert und dann im 7300 *Real-Time-Cycler* gemessen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Reaktionen im 7300 *Real-Time-Cycler* liefen wie folgt ab:

- 2 Minuten bei 50 °C
- 10 Minuten bei 95 °C
- 15 Sekunden bei 90 °C
- 1 Minute bei 60 °C

Die letzten beiden Schritte wurden 40 x wiederholt.

Relative Quantifizierung

Ziel der Untersuchung war es, die Expressionslevel der miRNA-223 in der Leber bei Sham-Tieren wie auch bei septischen Tieren unter dem Einfluss von Normokapnie beziehungsweise Hyperkapnie zu untersuchen. Hierfür war nicht die absolute Expression der miRNA entscheidend, sondern die relative Quantifizierung. Diese lässt eine Aussage darüber zu, ob die miRNA-223 durch induzierte Sepsis und/oder Hyperkapnie vermehrt oder vermindert vorliegt.

Die Expressionsunterschiede der miRNA-223 zwischen den Gruppen wurden mittels der Delta-Delta-CT-Methode berechnet. Der C_t -Wert entspricht dem Zeitpunkt, an welchem das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant über der Hintergrundstrahlung lag. Dazu war es erforderlich, die Expression des Zielgens auf die Expression eines *Housekeeper*-Gens (nicht reguliertes, homogen exprimiertes Referenzgen) zu beziehen, in diesem Fall U6. Danach wurde die Expression in den Proben der Interventionsgruppen auf die Kontrollgruppe, hier Normokapnie-Sham, bezogen. Die relativen Expressionsunterschiede ergaben sich zum Schluss aus der Ratio ⁴⁴:

$$\begin{aligned}\Delta C_t &= C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta C_t &= C_t \text{ Behandlung} - C_t \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta C_t}\end{aligned}$$

3.3 Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit der Software GraphPad Prism® Version 6.0. Die statistische Auswertung der *Real-Time*-PCR-Ergebnisse erfolgte mittels des Programms GenEx Version 5. Zur Prüfung der Daten auf Normalverteilung wurde der D'Agostino-Pearson-Test angewendet.

Bei den nicht-parametrischen Daten wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit einem Dunn's Post-hoc-Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Median mit der 25./75. Perzentile dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

Bei den parametrischen Daten wurde eine einfaktorielle bzw. zweifaktorielle ANOVA durchgeführt, gefolgt von einem Dunnet's Post-hoc-Test für Unterschiede innerhalb einer Gruppe und einem Tukey Post-hoc-Test für Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Ergebnisse sind als $MW \pm SEM$ (miRNA-223) bzw. $MW \pm SD$ (systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde ebenfalls mit $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel

Bereits zum ersten Messzeitpunkt, also 24 Stunden nach Start der Versuche, waren die Zytokinplasmaspiegel von TNF- α , IL-6 und IL-10 der septischen Tiere signifikant höher als bei den Sham-operierten Tieren (TNF- α : 0 (0–16) pg/ml vs. 0 (0–0) pg/ml; IL-6: 0 (0–153) pg/ml vs. 0 (0–0) pg/ml; IL-10: 202 (86–794) pg/ml vs. 40 (0–141) pg/ml ($p < 0,05$); septische vs. Sham-Tiere).

Auch zum zweiten Messzeitpunkt, also nach weiteren 120 Minuten mit entweder normokapnischer oder hyperkapnischer Beatmung, wiesen die septischen Tiere signifikant höhere Zytokinplasmaspiegel als die Sham-operierten Tiere auf (siehe Abb. 2).

Weder bei den Sham-operierten Tieren noch bei den septischen Tieren führte eine hyperkapnische Beatmung im Allgemeinen zu einer unterschiedlichen Entwicklung der Zytokinplasmaspiegel.

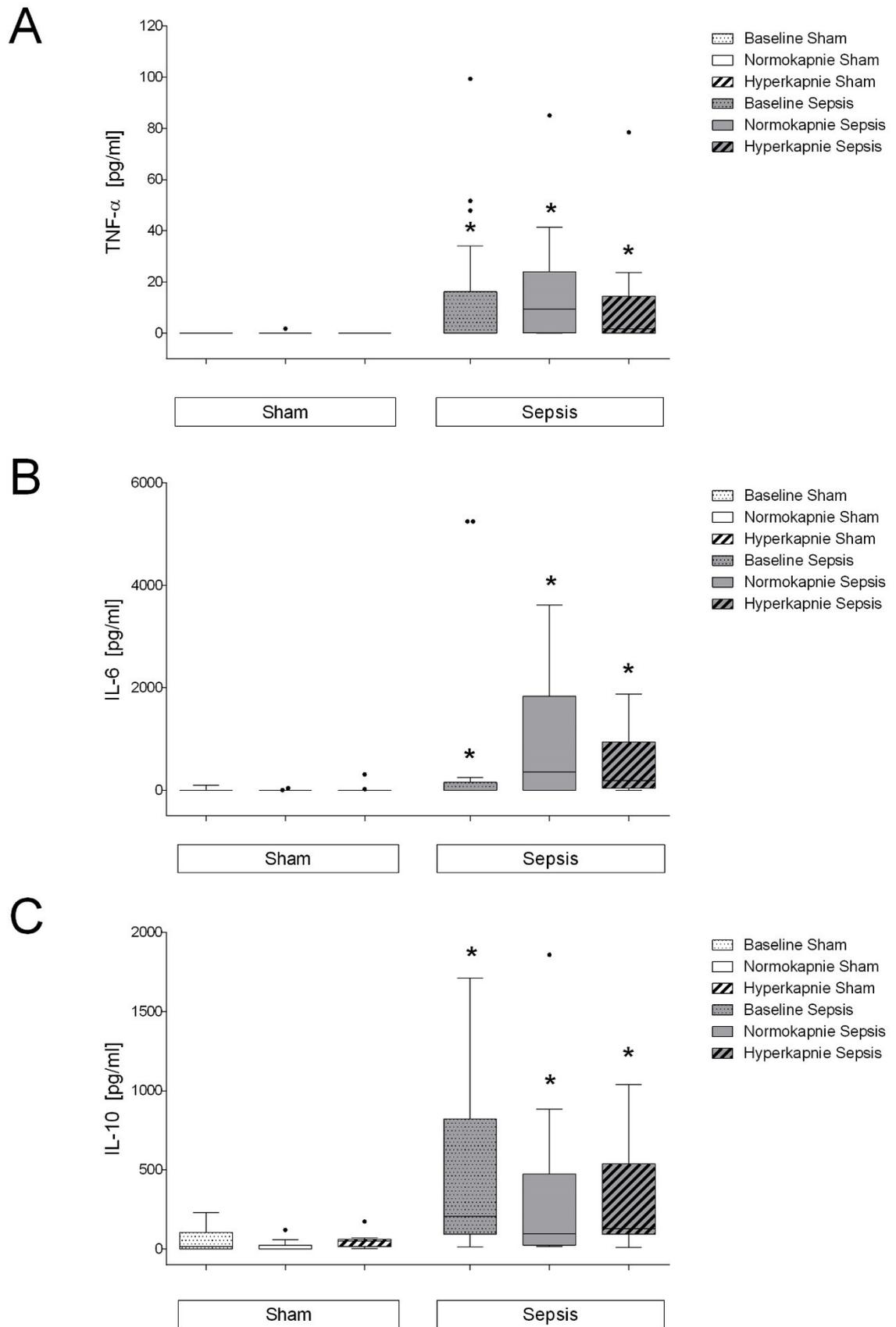


Abb. 2: Zytokinplasmaspiegel

(A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-10 Plasmaspiegel bei Sham-operierten bzw. septischen Tieren mit normokapnischer oder hyperkapnischer Beatmung. Median mit der 25./75. Perzentile und der 10./90. Perzentile; * $p < 0,05$ vs. Sham (Kruskal-Wallis + Dunn's Post-hoc-Test); $n = 10$ / Baseline $n = 20$

4.2 Myeloperoxidase-Assay in der Leber

Die Induktion der Sepsis führte zu einem signifikanten Anstieg der Myeloperoxidase-Aktivität (Units/g Lebergewebe) in der Leber (Normokapnie Sham 0,87 (0,73–1,31) vs. Normokapnie Sepsis 1,57 (1,42–2,18) ($p < 0,05$); Hyperkapnie Sham 0,98 (0,73–1,26) vs. Hyperkapnie Sepsis 1,76 (1,44–1,86) ($p < 0,05$)).

Es zeigten sich jedoch weder bei den Sham-operierten Tieren noch bei den septischen Tieren signifikante Unterschiede der Myeloperoxidase-Aktivität, wenn die Tiere normokapnisch oder hyperkapnisch beatmet wurden (siehe Abb. 3).

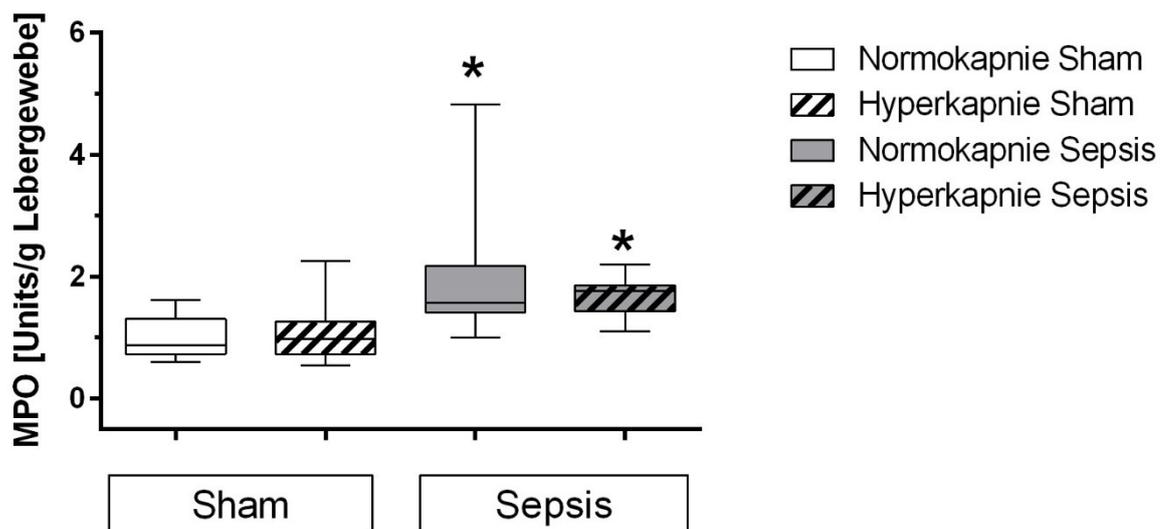


Abb. 3: MPO-Aktivität in der Leber

MPO-Aktivität bei Sham-operierten bzw. septischen Tieren mit normokapnischer oder hyperkapnischer Beatmung in der Leber. Median mit der 25./75. Perzentile und der 10./90. Perzentile;

* $p < 0,05$ vs. Sham (Kruskal-Wallis + Dunn's Post-Hoc-Test); $n = 10$

4.3 ASD-Färbung Neutrophiler Granulozyten in der Leber

Der Sepsis-induzierte Anstieg der Myeloperoxidase-Aktivität in der Leber war nicht begleitet von einem Anstieg der Neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe. In der ASD-Färbung (Neutrophile Granulozyten/mm² Lebergewebe) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Normokapnie Sham 0,26 (0,05–0,91); Hyperkapnie Sham 0,18 (0,06–0,35); Normokapnie Sepsis 0,32 (0,08–0,94); Hyperkapnie Sepsis 0,25 (0,06–0,65)) (siehe Abb. 4).

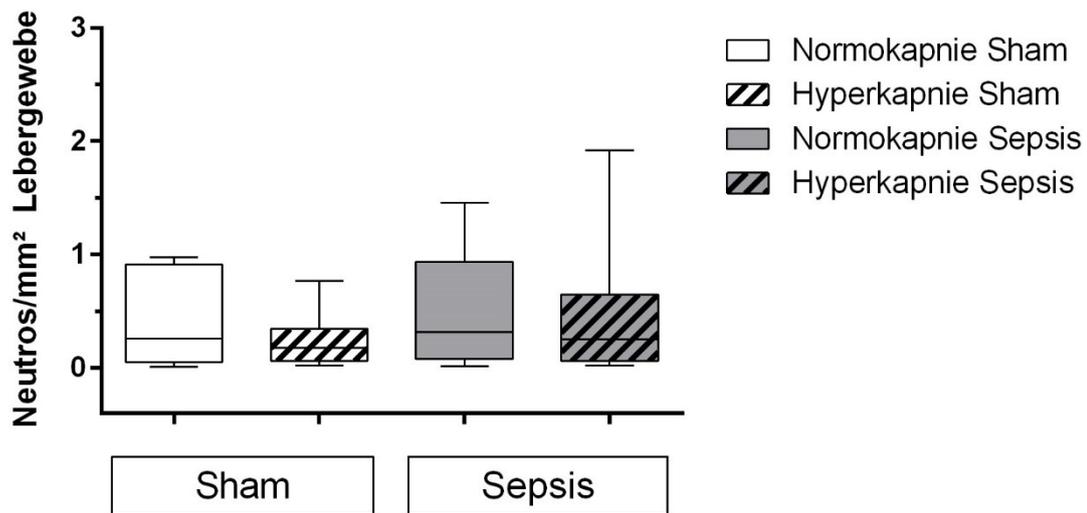


Abb. 4: ASD-Färbung Leber

Anzahl der Neutrophilen Granulozyten bei Sham-operierten bzw. septischen Tieren mit normokapnischer oder hyperkapnischer Beatmung in der Leber. Median mit der 25./75. Perzentile und der 10./90. Perzentile; n = 10

4.4 qRT-PCR zur Bestimmung der miRNA-223-Expression in der Leber

Bei der Untersuchung der relativen Expression von miRNA-223 im Lebergewebe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der septischen Tiere im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren. Auch die Hyperkapnie wirkte sich nicht, weder bei den Sham-operierten noch bei den septischen Tieren, auf die relative Expression der miRNA-223 aus (relative Expression miRNA-223: Normokapnie Sham $1 \pm 0,37$; Hyperkapnie Sham $0,93 \pm 0,14$; Normokapnie Sepsis $0,87 \pm 0,26$; Hyperkapnie Sepsis $0,94 \pm 0,3$) (siehe Abb. 5).

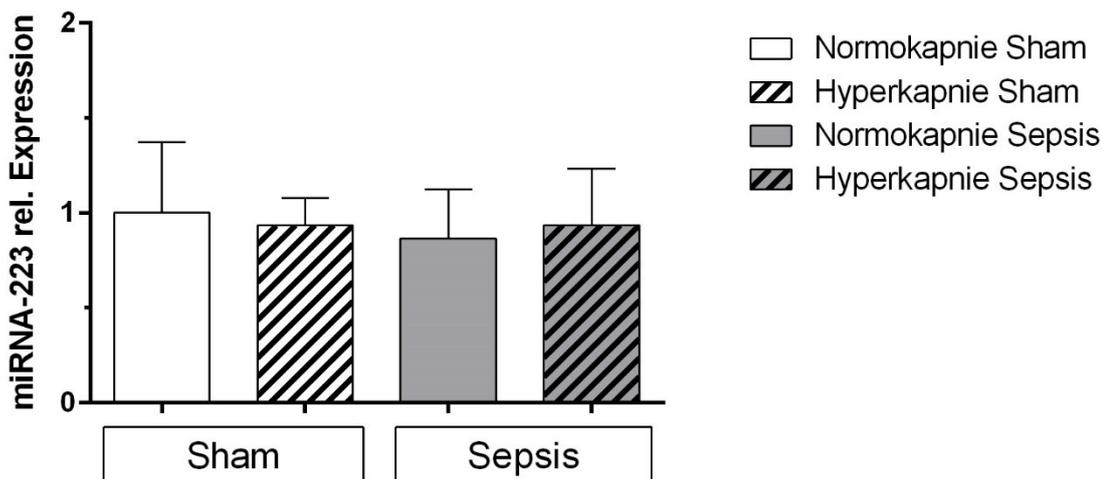


Abb. 5: Relative Expression von miRNA-223 in der Leber

Relative Expression von miRNA-223 bei Sham-operierten bzw. septischen Tieren mit normokapnischer oder hyperkapnischer Beatmung. MW ± SEM; n = 10

4.5 Systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen

Die normokapnisch-beatmeten und die hyperkapnisch-beatmeten Tiere entwickelten pCO₂-Werte im Rahmen der vorgegebenen Zielwerte 45 ± 5 mmHg und 75 ± 5 mmHg. Dabei kam es bei den hyperkapnisch ventilerten Tieren zu einem signifikanten Abfall des pH-Wertes im Blut. In der Blutgasanalyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im pO₂. Bis zum Ende des Versuchs zeigten die Tiere zwischen den Gruppen keine Unterschiede der Herzfrequenz und des Blutdrucks (siehe Tabelle 1).

		Normokapnie Sham	Hyperkapnie Sham	Normokapnie Sepsis	Hyperkapnie Sepsis
pCO ₂ [mmHg]	0:00 h (Baseline)	43 ± 3	46 ± 5	43 ± 7	44 ± 3
	1:00 h	43 ± 3	71 ± 6*#	44 ± 7	71 ± 7*#
	2:00 h	46 ± 12	78 ± 13*#	43 ± 9	75 ± 6*#
pH	0:00 h (Baseline)	7.38 ± 0.03	7.35 ± 0.05	7.36 ± 0.04	7.36 ± 0.05
	1:00 h	7.36 ± 0.03	7.17 ± 0.05*#	7.32 ± 0.05*	7.17 ± 0.05*#
	2:00 h	7.32 ± 0.1*	7.14 ± 0.06*#	7.31 ± 0.05*	7.14 ± 0.05*#
pO ₂ [mmHg]	0:00 h (Baseline)	116 ± 26	117 ± 22	119 ± 27	120 ± 24
	1:00 h	114 ± 23	127 ± 11	110 ± 29	135 ± 21
	2:00 h	96 ± 38*	104 ± 18	110 ± 32	121 ± 19
HF [min ⁻¹]	0:00 h (Baseline)	414 ± 69	376 ± 69	441 ± 64	409 ± 57
	1:00 h	391 ± 69	365 ± 73	425 ± 69	395 ± 70
	2:00 h	404 ± 72	361 ± 73	430 ± 76	401 ± 42
MAP [mmHg]	0:00 h (Baseline)	107 ± 36	94 ± 31	93 ± 34	82 ± 19
	1:00 h	99 ± 34	92 ± 32	88 ± 34	85 ± 20
	2:00 h	105 ± 34	92 ± 32	89 ± 36	92 ± 23

Tabelle 1: Systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen

Blutgasanalysen, Herzfrequenz (HF) und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) bei Sham-operierten bzw. septischen Tieren mit normokapnischer oder hyperkapnischer Beatmung. MW ± SD; * p < 0.05 vs. Baseline (zweifaktorielle ANOVA + Dunnett); # p < 0,05 vs. Normokapnie (zweifaktorielle ANOVA + Tukey); n = 10

5. Diskussion

5.1 Ergebnisdiskussion

Die Ergebnisse führen zu folgenden Schlussfolgerungen im Hinblick auf die eingangs gestellten Fragen, die im Folgenden diskutiert werden:

1. Durch die Implantation eines 18G-Stent ins *Colon* kommt es zu einem Anstieg der pro- und antiinflammatorischen Zytokine im Plasma ohne begleitende hämodynamische Reaktion. Die CASP-Operation führt demnach reproduzierbar zu einer Induktion einer moderaten systemischen Sepsis.
2. Die zusätzliche moderate Hyperkapnie hat *in vivo* keinen Einfluss auf die Zytokinplasmaspiegel einer moderaten systemischen Sepsis. Insofern scheint eine moderate Hyperkapnie die systemische Entzündungsantwort nicht zu beeinträchtigen.
3. Durch das moderate CASP-Modell kommt es zu einem Anstieg der Myeloperoxidase-Aktivität in der Leber, wobei sich die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten nicht verändert. Die moderate Hyperkapnie hat weder einen Einfluss auf die Myeloperoxidase-Aktivität noch auf die Gesamtzahl der Neutrophilen Granulozyten in der Leber. Demzufolge scheint eine moderate Hyperkapnie auch die lokale Entzündungsreaktion der Leber nicht zu beeinträchtigen.
4. Die relative Expression der miRNA-223 in der Leber wird durch die moderate Sepsis nicht verändert und auch die moderate Hyperkapnie hat keinen Einfluss auf die Expression.

Um die Auswirkungen der moderaten Hyperkapnie in einer abdominalen Sepsis möglichst unter klinisch relevanten Bedingungen zu studieren, ist es essentiell, die pathophysiologischen Vorgänge der abdominalen Sepsis so weit wie möglich im Modell abzubilden. Hierfür eignet sich das CASP-Modell im Besonderen, da es den Vorgang der Anastomoseninsuffizienz nachbildet⁴⁵. Diese tritt – trotz Verbesserungen der operativen Techniken in der Viszeralchirurgie – je nach Operation in bis zu 14 % der Fälle auf und ist immer noch einer der Hauptgründe für eine postoperative Sepsis⁴⁶. Im Rahmen der CASP-Operation kommt es durch den kontinuierlichen Austritt von Fäzes in die Bauchhöhle über eine diffuse Peritonitis letztlich zu einer systemischen Sepsis⁴⁵. Im Vergleich zu anderen Sepsismodellen, z.B. der einmaligen LPS-Injektion, ist in diesem Modell insbesondere der kontinu-

ierliche Austritt von Fäzes, im Sinne eines dauerhaften Sepsisfokus, entscheidend für die klinische Nähe des experimentellen Ansatzes. Darüber hinaus unterscheidet sich der Zytokinverlauf bei einer reinen Endotoxämie, wie z.B. im LPS-Modell, deutlich von der humanen Sepsis. Die Zytokinspiegel erreichen im Rahmen der humanen Sepsis oder des CASP-Modells später ihren Höhepunkt und sind sichtlich niedriger als im LPS-Modell ⁴⁷.

Auch andere Sepsismodelle, die auf der Einbringung von Fäzes in die Bauchhöhle beruhen, wie z.B. das CLP-Modell, bei dem erst das Zökum abgebunden und dann durchstochen wird, kamen nicht in Betracht. Durch das CASP-Modell wird eine diffuse Peritonitis induziert, die früh und stetig zu einer systemischen Sepsis führt, wohingegen es beim CLP-Modell häufig zu einem intraabdominellen Abszess kommt. Die lokale Kontrolle eines septischen Fokus wie bei einem Abszess führt zu geringen Zeichen einer systemischen Infektion ⁴⁸. Daher war auch das CLP-Modell im Rahmen dieser Arbeit nicht geeignet, die Auswirkungen der moderaten Hyperkapnie auf die systemische Inflammation zu untersuchen.

Nach der CASP-Operation kommt es bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tieren reproduzierbar zu einem Anstieg der systemischen Zytokine. Dieser Anstieg ist prinzipiell vergleichbar mit anderen Studien, bei denen ebenfalls ein Zytokinanstieg proportional zur Schwere der Sepsis beobachtet wird ^{41 45}. Dies deckt sich zudem mit den Ergebnissen der Letalitätsreihe im Rahmen der Etablierung des CASP-Modells, bei der es bei den 18G-Tieren im Vergleich zu den 16G-Tieren zu einer signifikant niedrigeren Letalität nach 24 Stunden kam ¹⁸. Durch die unterschiedliche Größe der Stents sind die systemischen Zytokinspiegel, wie beabsichtigt, niedriger als z.B. in der Studie von Lustig et al., in der mit einem 16G-Stent eine fulminante Sepsis induziert wurde ⁴⁵. Der wesentlich schwächere Verlauf der Erkrankung in den eigenen Letalitätsreihen bei gleicher Stentgröße wie bei Lustig et al. deutet darauf hin, dass weitere Faktoren, wie z.B. die Erfahrung des Operateurs, für das Ausmaß der Entzündungsreaktion verantwortlich sind. Demzufolge führt also eine Verringerung der Stentgröße reproduzierbar zur Auslösung einer moderateren Sepsis und zwar begleitet von einem moderaten Anstieg der systemischen Zytokinspiegel.

Die Ergebnisse der systemischen Zytokinspiegel stützen hingegen nicht die Resultate von anderen Studien, bei denen die moderate Hyperkapnie zu einer Veränderung der Zytokinspiegel führte ^{27 29}. Jedoch gibt es hier deutliche Unterschiede im Studiendesign. Die Ergebnisse dieser Arbeit fokussieren sich auf die Zytokinplasmaspiegel im Rahmen einer abdominalen Sepsis *in vivo*. Andere Studien haben entweder vornehmlich *ex-vivo*-Studien an Blut- oder Makrophagen-Kulturen durchgeführt oder es handelte sich um *in-vivo*-Studien, bei denen eine rein LPS-induzierte Endotoxämie herbeigeführt wurde. Dabei wur-

den des Weiteren hauptsächlich die Zytokinpiegel in unterschiedlichen Organsystemen untersucht, wie z.B. Milz oder Lunge^{27 29 49}. Eine aktuelle Studie kommt nach einer Sepsis *in vivo* ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine moderate Hyperkapnie nicht zu Veränderungen der Zytokinplasmaspiegel führt⁵⁰.

Zwischen den Studien bestehen darüber hinaus Unterschiede hinsichtlich der Dauer der Hyperkapnie. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Tiere für 2 Stunden einer moderaten Hyperkapnie ausgesetzt. In den *ex-vivo*-Studien waren es 6 Stunden bei Wang et al. bzw. 24 Stunden bei Kimura et al.^{27 49}. Im Rahmen des *in-vivo*-Endotoxämie-Modells wurden die Tiere ebenfalls für 24 Stunden einer Hyperkapnie ausgesetzt. Es ist daher denkbar, dass es erst dann zu Veränderungen der systemischen Zytokinplasmaspiegel während einer Sepsis kommt, wenn die Tiere für eine längere Zeit der moderaten Hyperkapnie ausgesetzt werden.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit die lokalen Folgen einer Sepsis auf die Leber untersucht. Ein Leberversagen in einer Sepsis führt zu einem schlechteren *Outcome* der Patienten, wobei in diesem Zusammenhang besonders frühe Leberschäden ein Prädiktor sind^{51 52}. In der Pathophysiologie der frühen Leberzellschädigung ist die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten ein entscheidender Schritt, da sie zum hepatischen Zelluntergang beitragen können³⁵.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es durch das moderate CASP-Modell zu einem Anstieg der Myeloperoxidase-Aktivität in der Leber kommt. Die Aktivierung der hepatischen Neutrophilen Granulozyten, aber auch von Kupffer'schen Sternzellen, durch Entzündungsmediatoren in einer Sepsis geht einher mit der Sezernierung von Myeloperoxidase^{53 54}. Die Myeloperoxidase wurde aufgrund ihrer Fähigkeit oxidativen Stress hervorzurufen primär sowohl als Effektor der Pathogenabwehr als auch der Inflammation und des Zelluntergangs betrachtet⁵⁴.

Allerdings ist der Anstieg von Myeloperoxidase in der Leber auch ein entscheidender Faktor für die Migration von Neutrophilen Granulozyten in diese. So konnte in einem hepatischen Ischämie-Reperusionsmodell gezeigt werden, dass eine Zunahme von Myeloperoxidase in der Leber zu einer vermehrten Adhäsion und Infiltration von Neutrophilen Granulozyten aus den Sinusoiden in die Leber führt⁵⁵. Traeger et al. konnten nachweisen, dass ein drastisches CASP-Modell mit einem 16G-Stent geeignet ist, diese Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in die Leber hervorzurufen, ähnlich wie das Endotoxin- oder das CLP-Modell⁴².

Der Anstieg der Myeloperoxidase in der Leber führte im moderaten CASP-Modell dieser Arbeit nicht zu einer erhöhten Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in die Leber. Die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe differierte nicht zwischen den Sham-operierten Tieren und den septischen Tieren. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und den Ergebnissen von Traeger et al. lässt sich durch die unterschiedliche Ausprägung der Sepsis erklären. Im Rahmen der moderaten Sepsis kommt es nach 24 Stunden zu einem Anstieg der Myeloperoxidase und damit zum Beginn der Leberinflammation. Zu diesem Zeitpunkt kommt es aber noch nicht zu einer erhöhten Infiltration der Neutrophilen Granulozyten. Die erhöhte Infiltration würde möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt erwartet, wenn die Tiere eine ausgeprägte Sepsis mit hämodynamischer Instabilität entwickelt haben ⁴⁵.

In *in-vitro*-Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine moderate Hyperkapnie die Migration und Aktivität von Neutrophilen Granulozyten in geschädigtem Gewebe hemmen kann ^{56 57}. Dies konnte auch in nicht-septischen Tiermodellen gezeigt werden. Nach einer intratrachealen Gabe von Endotoxin vermindert eine moderate Hyperkapnie im Rahmen einer frühen Pneumonie sowohl das Einwandern von Neutrophilen Granulozyten in die Lunge als auch die Aktivität der Myeloperoxidase in dieser ^{30 31}. Das gleiche Bild zeigt sich bei einer frühen systemischen Sepsis. Eine moderate Hyperkapnie reduziert in den ersten 3 Stunden einer CLP-induzierten Sepsis die Anzahl von Neutrophilen Granulozyten in der Lunge und damit den Lungenschaden ⁵⁸. Im Gegensatz dazu hat eine moderate Hyperkapnie in der frühen LPS-induzierten Sepsis keinen Einfluss auf die Myeloperoxidase-Aktivität und die Neutrophilen Granulozyten im Darm ³³.

Im Modell dieser Arbeit wurden die Tiere erst nach einer 24-stündigen Sepsisentwicklung hyperkapnisch beatmet. Dabei zeigen sich in den Ergebnissen weder hinsichtlich der Myeloperoxidase-Aktivität noch hinsichtlich der Anzahl der Neutrophilen Granulozyten in der Leber Unterschiede zu den normokapnisch ventilierten Tieren. Das angewandte Modell ist von besonderem klinischen Interesse, da viele Patienten bereits eine manifeste Infektion entwickelt haben, bevor sie auf die Intensivstation aufgenommen und protektiven Beatmungsstrategien zugeführt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit den Resultaten von Costello et al., bei denen es im Rahmen einer länger anhaltenden Sepsis und bei hyperkapnischer Beatmung ebenfalls zu keinem Unterschied in der Anzahl der Neutrophilen Granulozyten in der Lunge kam ⁵⁸.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine moderate Sepsis Veränderungen der relativen Expression der miRNA-223 in der Leber hervorruft. Die miRNA-

223 wird normalerweise als Knochenmarksspezifisch angesehen. Sie spielt dort eine entscheidende Rolle in der Granulopoese⁵⁹. In einer schweren CLP-induzierten Sepsis konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es bei miRNA-223-Knockout-Mäusen zu einer myokardialen Depression kommt. Diese geht mit einer erhöhten Letalität im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen einher. Als mögliche Erklärungsansätze werden eine erhöhte proinflammatorische Zytokinproduktion und eine erhöhte Myeloperoxidase-Aktivität im Herzgewebe als Zeichen eines vergrößerten Zellschadens angesehen⁴⁰. Johnnidis et al. konnten in einer Studie demonstrieren, dass es bei miRNA-223-Knockout-Mäusen nach einer schweren Endotoxämie zusätzlich zu größeren Muskel-, Nieren- und Leberschäden kommt. Es zeigten sich auch mehr Hepatozytennekrosen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen³⁷.

Demgegenüber zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine moderate Sepsis nicht zu Veränderungen in der relativen Expression von miRNA-223 in der Leber führt. Dies unterstützt die Hypothese, dass die miRNA-223 ihre feinregulierende Rolle bezüglich der Entzündungsantwort vor allem in einer schweren Sepsis ausübt³⁷. Zudem deckt sich dies mit klinischen Hinweisen, die zeigen, dass miRNA-223-Serumspiegel bei nicht-überlebenden septischen Patienten im Vergleich zu überlebenden Patienten signifikant reduziert sind⁶⁰.

Die Auswirkungen einer moderaten Hyperkapnie auf die relative Expression der miRNA-223 in der Leber wurden in dieser Arbeit erstmals untersucht. Diese Arbeit zeigt, dass die moderate Hyperkapnie in einer moderaten Sepsis keine Auswirkungen auf die relative Expression der miRNA-223 in der Leber hat.

5.2 Klinischer Bezug

Lungen-protective Beatmungsformen, die integraler Bestandteil der Therapie von Patienten mit einer Sepsis und einem ARDS sind, können durch niedrige Tidalvolumina zu einer permissiven Hyperkapnie führen¹². In einer anderen Untersuchung am Modell dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese moderate Hyperkapnie nicht nur geduldeter Nebeneffekt von Lungen-protectiven Beatmungsformen sein kann, sondern auch die Chance bietet, die Oxygenierung der intestinalen Mukosa zu verbessern und auf diese Weise möglicherweise auch die intestinale Barrierefunktion¹⁸. Dies ist von besonderem klinischen Interesse, da die Integrität der Darmmukosa entscheidend ist, um den Progress der Sepsis nicht durch übertretende Bakterien und bakterielle Toxine weiter voranzutreiben⁶¹.

In der letzten Zeit sind allerdings Bedenken hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen einer moderaten Hyperkapnie während einer Sepsis aufgekommen. So führte eine moderate Hyperkapnie zu einem vermehrten Bakterienwachstum und einer verminderten Reparatur

von pulmonalen epithelialen Schäden^{62 63}. In anderen Untersuchungen reduzierte eine moderate Hyperkapnie im Langzeitverlauf der Sepsis den *Oxidative Burst* von Neutrophilen Granulozyten und schwächte die systemische Zytokinantwort ab, am ehesten im Sinne einer antiinflammatorischen Wirkung²⁶. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass eine kurzzeitige moderate Hyperkapnie im Rahmen einer moderaten systemischen Sepsis auch nach 24 Stunden keinen Einfluss auf die systemische Zytokinantwort und die Aktivität der Neutrophilen Granulozyten in der Leber hat. Daher scheint die kurzzeitige moderate Hyperkapnie in einer moderaten Sepsis keine beeinträchtigenden systemischen oder hepatischen Effekte zu induzieren, die einer möglicherweise günstigen Wirkung auf die intestinale Oxygenierung gegenüberstehen.

Darüber hinaus müssen jedoch weitere Untersuchungen zeigen, welche Effekte eine prolongierte moderate Hyperkapnie bei fulminanter Sepsis hat, und zwar sowohl auf die systemischen Zytokinspiegel als auch auf die lokale Inflammation der Leber sowie insbesondere des Darms, welcher eines der zentralen Organe in einer Sepsis darstellt.

6. Schlussfolgerung

Diese Arbeit zeigt, dass mittels einer CASP-Operation mit kleinem Stent reproduzierbar eine moderate Sepsis induziert und eine Inflammation der Leber getriggert werden kann. Eine zusätzliche moderate Hyperkapnie, die geeignet ist, die mikrozirkulatorische Oxygenierung der intestinalen Mukosa aufrechtzuerhalten, hat keinen Einfluss auf die systemischen und lokalen Entzündungsfolgen in einer moderaten Sepsis. Allem Anschein nach ist also eine permissive Hyperkapnie in diesem Zusammenhang für die Immunfunktion un-schädlich.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Levy, M. M. *et al.* The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med* **36**, 222–231 (2010).
2. Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe sepsis and septic shock. *N. Engl. J. Med.* **369**, 840–851 (2013).
3. Gentile, L. F. *et al.* Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg* **72**, 1491–1501 (2012).
4. Flynn, A., Chokkalingam Mani, B. & Mather, P. J. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail Rev* **15**, 605–611 (2010).
5. Aird, W. C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* **101**, 3765–3777 (2003).
6. Olanders, K. *et al.* The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on ICAM-1 expression, endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor levels in rats. *Shock* **18**, 86–92 (2002).
7. Guo, R.-F. & Ward, P. A. Role of oxidants in lung injury during sepsis. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 1991–2002 (2007).
8. Fink, M. P. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care* **9**, 143–151 (2003).
9. Hotchkiss, R. S. *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.* **27**, 1230–1251 (1999).
10. Cortés, I., Peñuelas, O. & Esteban, A. Acute respiratory distress syndrome: evaluation and management. *Minerva Anestesiol* **78**, 343–357 (2012).
11. Matthay, M. A., Ware, L. B. & Zimmerman, G. A. The acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Invest.* **122**, 2731–2740 (2012).

12. Villar, J., Kacmarek, R. M., Pérez-Méndez, L. & Aguirre-Jaime, A. A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilatory strategy improves outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial. *Crit. Care Med.* **34**, 1311–1318 (2006).
13. Ismaiel, N. M. & Henzler, D. Effects of hypercapnia and hypercapnic acidosis on attenuation of ventilator-associated lung injury. *Minerva Anesthesiol* **77**, 723–733 (2011).
14. Kregenow, D. A., Rubenfeld, G. D., Hudson, L. D. & Swenson, E. R. Hypercapnic acidosis and mortality in acute lung injury. *Crit. Care Med.* **34**, 1–7 (2006).
15. Vannucci, R. C., Towfighi, J., Heitjan, D. F. & Brucklacher, R. M. Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. *Pediatrics* **95**, 868–874 (1995).
16. Nomura, F., Aoki, M., Forbess, J. M. & Mayer, J. E. J. Effects of hypercarbic acidotic reperfusion on recovery of myocardial function after cardioplegic ischemia in neonatal lambs. *Circulation* **90**, II321–327 (1994).
17. Schwartges, I., Schwarte, L. A., Fournell, A., Scheeren, T. W. L. & Picker, O. Hypercapnia induces a concentration-dependent increase in gastric mucosal oxygenation in dogs. *Intensive Care Med* **34**, 1898–1906 (2008).
18. Stübs, C. C. M. *et al.* Acute, short-term hypercapnia improves microvascular oxygenation of the colon in an animal model of sepsis. *Microvasc. Res.* (2013). doi:10.1016/j.mvr.2013.07.008
19. Gnaegi, A., Feihl, F., Boulat, O., Waeber, B. & Liaudet, L. Moderate hypercapnia exerts beneficial effects on splanchnic energy metabolism during endotoxemia. *Intensive Care Med* **35**, 1297–1304 (2009).
20. Ramirez, J. *et al.* Oxygen-carrying capacity during 10 hours of hypercapnia in ventilated dogs. *Crit. Care Med.* **28**, 1918–1923 (2000).

21. Blackburn, J. P. *et al.* Myocardial carbon dioxide response curves. *Br J Anaesth* **42**, 559 (1970).
22. Akça, O. *et al.* Hypercapnia improves tissue oxygenation. *Anesthesiology* **97**, 801–806 (2002).
23. Hickling, K. G. & Joyce, C. Permissive hypercapnia in ARDS and its effect on tissue oxygenation. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* **107**, 201–208 (1995).
24. Walley, K. R., Lewis, T. H. & Wood, L. D. Acute respiratory acidosis decreases left ventricular contractility but increases cardiac output in dogs. *Circ. Res.* **67**, 628–635 (1990).
25. Swenson, E. R. Therapeutic hypercapnic acidosis: pushing the envelope. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 8–9 (2004).
26. Vadász, I., Hubmayr, R. D., Nin, N., Sporn, P. H. S. & Sznajder, J. I. Hypercapnia: a nonpermissive environment for the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **46**, 417–421 (2012).
27. Kimura, D., Totapally, B. R., Raszynski, A., Ramachandran, C. & Torbati, D. The effects of CO₂ on cytokine concentrations in endotoxin-stimulated human whole blood. *Crit. Care Med.* **36**, 2823–2827 (2008).
28. Wang, Z., Su, F., Bruhn, A., Yang, X. & Vincent, J.-L. Acute hypercapnia improves indices of tissue oxygenation more than dobutamine in septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 178–183 (2008).
29. Norozian, F. M. *et al.* Therapeutic hypercapnia enhances the inflammatory response to endotoxin in the lung of spontaneously breathing rats. *Crit. Care Med.* **39**, 1400–1406 (2011).
30. Laffey, J. G. *et al.* Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 46–56 (2004).

31. Nichol, A. D. *et al.* Hypercapnic acidosis reduces oxidative reactions in endotoxin-induced lung injury. *Anesthesiology* **113**, 116–125 (2010).
32. Nardelli, L. M. *et al.* Effects of acute hypercapnia with and without acidosis on lung inflammation and apoptosis in experimental acute lung injury. *Respir Physiol Neurobiol* **205**, 1–6 (2015).
33. Morisaki, H. *et al.* Hypercapnic acidosis minimizes endotoxin-induced gut mucosal injury in rabbits. *Intensive Care Med* **35**, 129–135 (2009).
34. Dhainaut, J. F., Marin, N., Mignon, A. & Vinsonneau, C. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit. Care Med.* **29**, S42–47 (2001).
35. Jaeschke, H. & Hasegawa, T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int.* **26**, 912–919 (2006).
36. Kerr, T. A., Korenblat, K. M. & Davidson, N. O. MicroRNAs and liver disease. *Transl Res* **157**, 241–252 (2011).
37. Johnnidis, J. B. *et al.* Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* **451**, 1125–1129 (2008).
38. Wong, Q. W.-L. *et al.* MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology* **135**, 257–269 (2008).
39. Yu, C.-H., Xu, C.-F. & Li, Y.-M. Association of MicroRNA-223 expression with hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Dig. Dis. Sci.* **54**, 2362–2366 (2009).
40. Wang, X. *et al.* Loss of duplexmiR-223 (5p and 3p) aggravates myocardial depression and mortality in polymicrobial sepsis. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 701–711 (2014).
41. Traeger, T. *et al.* Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp* (2010). doi:10.3791/2299

42. Traeger, T. *et al.* Kupffer cell depletion reduces hepatic inflammation and apoptosis but decreases survival in abdominal sepsis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **22**, 1039–1049 (2010).
43. Schierwagen, C., Bylund-Fellenius, A. C. & Lundberg, C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J Pharmacol Methods* **23**, 179–186 (1990).
44. Pfaffl, M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 92–95 (2004).
45. Lustig, M. K. *et al.* Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock* **28**, 59–64 (2007).
46. Turrentine, F. E. *et al.* Morbidity, mortality, cost, and survival estimates of gastrointestinal anastomotic leaks. *J. Am. Coll. Surg.* **220**, 195–206 (2015).
47. Rittirsch, D., Hoesel, L. M. & Ward, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 137–143 (2007).
48. Maier, S. *et al.* Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* **21**, 505–511 (2004).
49. Wang, N. *et al.* Elevated CO₂ selectively inhibits interleukin-6 and tumor necrosis factor expression and decreases phagocytosis in the macrophage. *FASEB J.* **24**, 2178–2190 (2010).
50. Beck, C. *et al.* The beneficial effects of acute hypercapnia on microcirculatory oxygenation in an animal model of sepsis are independent of K(+)ATP channels. *Microvasc. Res.* **99**, 78–85 (2015).
51. Brienza, N. *et al.* Jaundice in critical illness: promoting factors of a concealed reality. *Intensive Care Med* **32**, 267–274 (2006).
52. Kramer, L. *et al.* Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients--a prospective multicenter study. *Crit. Care Med.* **35**, 1099–1104 (2007).

53. Arnhold, J. & Flemmig, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Arch. Biochem. Biophys.* **500**, 92–106 (2010).
54. Brown, K. E., Brunt, E. M. & Heinecke, J. W. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver. *Am. J. Pathol.* **159**, 2081–2088 (2001).
55. Klinke, A. *et al.* Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* **117**, 1350–1358 (2011).
56. Coakley, R. J., Taggart, C., Greene, C., McElvaney, N. G. & O'Neill, S. J. Ambient pCO₂ modulates intracellular pH, intracellular oxidant generation, and interleukin-8 secretion in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 603–610 (2002).
57. Takeshita, K. *et al.* Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced nuclear factor- κ B activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 124–132 (2003).
58. Costello, J. *et al.* Hypercapnic acidosis attenuates shock and lung injury in early and prolonged systemic sepsis. *Crit. Care Med.* **37**, 2412–2420 (2009).
59. Fukao, T. *et al.* An evolutionarily conserved mechanism for microRNA-223 expression revealed by microRNA gene profiling. *Cell* **129**, 617–631 (2007).
60. Wang, H. *et al.* Serum microRNA signatures identified by Solexa sequencing predict sepsis patients' mortality: a prospective observational study. *PLoS ONE* **7**, e38885 (2012).
61. Clark, J. A. & Coopersmith, C. M. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the 'motor' of critical illness. *Shock* **28**, 384–393 (2007).
62. O'Croinin, D. F. *et al.* Sustained hypercapnic acidosis during pulmonary infection increases bacterial load and worsens lung injury. *Crit. Care Med.* **36**, 2128–2135 (2008).
63. O'Toole, D. *et al.* Hypercapnic acidosis attenuates pulmonary epithelial wound repair by an NF- κ B dependent mechanism. *Thorax* **64**, 976–982 (2009).

8. Anhang

8.1 Material und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils

Aufzeichnung hämodynamischer und respiratorischer Variablen	Powerlab, ADInstruments, Castle Hill, Australien Software: Chart v5 für Windows, AD Instruments GmbH, PowerLab®, Spechbach, Deutschland
Beatmungsgerät	Inspira asv, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Blutgasanalysegerät	ABL 715, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Buprenorphin s.c.	Temgesic®, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland
Darmannaht	monofil, nicht resorbierbarer Faden 6-0 Ethicon Prolene®, Ethicon Inc, Somerville, USA, EH7403
EDTA Röhrchen	EDTA Mikrogefäß, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
etCO₂ Messgerät	Capnograph Typ 340, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Gould Statham Druckwandler	P23ID, GOULD, Elk Grove, USA
Hyperkapnisches Atemgas	Linde Gruppe, Leuna, Deutschland
Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Lochtuch	Foliodrape®, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland, No. 254307
Maske	Henry Schein Medical GmbH, Hamburg, Deutschland, No. 730-240
Normokapnisches Atemgas (Sauerstoff + Stickstoff)	Linde Gruppe, Leuna, Deutschland
Pancuronium	Pancuronium Inresa, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland

Pentobarbital	Narcoren®, Pentobarbital-Injektionslösung für Tiere, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland
Peripher venöser Katheter	18G PP Braunüle MT® (REF 4206142) B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Resorbierbarer Faden	4-0 Ethicon Vicryl Plus®, Johnson-Johnson, Neuss, Deutschland, VCP304
Ringerlösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland, Zul.-Nr.: 6737462.00.01
Sevofluran	Sevorane®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Thermometer zur rektalen Temperaturkontrolle	GTH 1160, Greisinger Electronic GmbH, Temperaturmessung, Regenstauf, Deutschland
Trachealnaht	Resorba®, Nürnberg, Deutschland, Polyester 1.5 EP, 4-0 USP
Tubus	16G FEP Vasofix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, REF 4268172S-01 ohne Stahlmandrin
Wärmematte	Julabo 6, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland

8.2 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils

Die nachfolgend benannten Chemikalien, Reagenzien und Lösungen waren in p.A. Qualität.

3-MOPS 200 mmol/l Pufferran® > 99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose NEEO Ultra-Qualität (Roti®agarose)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau Na-Salz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Chloroform	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Frankreich
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DEPC	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
EDTA-Na-Salz	Sigma Ultra, München, Deutschland
Essigsäure (= Eisessig), 100 % wasserfrei	Sigma Ultra, München, Deutschland
Ethanol unvergällt 75 %	Zentralapotheke, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Ultra, München, Deutschland
FBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Linde, Duisburg, Deutschland
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol (für molekulare Biologie)	Sigma Ultra, München, Deutschland
H₂O₂	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Hexadecyltrimethylammonium bromide	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropylalkohol	Zentralapotheke, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
Kaliumaluminiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydroxyphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Konzentrierte Salzsäure 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Naphthol-ASD-Chloroazetat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenkarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Jodat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit 4 % in Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pararosanilin-HCl 4 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
RNase freies Wasser	Promega, Mannheim, Deutschland
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodium acetate	Sigma Ultra, München, Deutschland
Tetramethylbenzidin (16 mmol/l) 0,0039 g TMB / 1 ml DMSO Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Tris HCl	Sigma Ultra, München, Deutschland
TRIzol® Reagent	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Tween-20	Merck, Darmstadt, Deutschland

8.3 Kits des laborexperimentellen Versuchsteils

ELISA-Kit	BD Opt EIA, BD Biosciences, San Diego, USA TNF- α ELISA Set für Ratte; Artikel-Nr. #558535 IL-10 ELISA Set für Ratte; Artikel-Nr. #555134 IL-6 ELISA Set für Ratte; Artikel-Nr. #550319
miRNA-223 Primer 5x	Artikel.-Nr. #000526, Applied Biosystems, Carlsbad, USA

MPO-Standard, von Humanen Leukozyten (0,033 mg Protein, 382 Units / mg)	Sigma Life Science, St. Louis, USA
RealTime Master Mix (enthält dNTP Mix, Multiscribe RT Enzyme, 10x RT Puffer, RNase Inhibitor)	TaqMan® MicroRNA Reverse-Transkriptions-Kit Part. Artikel-Nr. #4366596, Applied Biosystems, Carlsbad, USA
TaqMan MicroRNA Assay 20x	Artikel-Nr. #4427975, Applied Biosystems, Carlsbad, USA
TaqMan 2x Universal PCR Master Mix	TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase®, Artikel-Nr. #4364341, Applied Biosystems, Carlsbad, USA
U6 Primer 5x	Artikel.-Nr. #001973, Applied Biosystems, Carlsbad, USA

8.4 Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils

1 x FA gel running buffer	100 ml 10x FA gel buffer 20 ml Formaldehyd 880 ml DEPC-Wasser
10 x FA gel buffer (pH 7,0)	200 mmol/l 3-MOPS 50 mmol/l Natriumacetat 10 mmol/l EDTA in 1000 ml DEPC-Wasser
ASD Färbelösung	400 µl ASD-A Stammlösung 1,2 ml ASD-B Stammlösung Beide wurden gemischt und so viel ASD-B hinzugegeben, bis die Lösung gelb wurde. 1 Minute stehen gelassen, mit 200 ml 0,01 mol/l PBS aufgefüllt und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 6,3 eingestellt. Dann wurden 400 µl ASD-C Stammlösung hinzugegeben und alles kurz gemischt.

ASD-A Stammlösung	0,5 g Pararosanilin-HCl auf 10 ml Aqua dest. 2,5 ml konzentrierte Salzsäure Bestandteile wurden unter Erwärmung gelöst, abgekühlt und gefiltert.
ASD-B Stammlösung	0,1 g Natriumnitrit in 2,5 ml Aqua dest.
ASD-C Stammlösung	1 g Naphthol-ASD-Chloroazetat 10 ml Dimethylformamid
Assay Diluent	FBS 10 % in PBS, pH 7,0
Coating Puffer	TNF-α : (Natriumkarbonat = 0,1 mol/l, pH 9,5) 1,8 g Natriumkarbonat, 4,2 g Natriumhydrogenkarbonat in 0,5 l Aqua dest. IL-10 : (Natriumphosphat = 0,2 mol/l, pH 6,5) 11,8 g Di-Natriumhydrogenphosphat, 16,1 g Natriumdihydrogenphosphat in 1 l Aqua dest. IL-6 : (Natriumkarbonat = 0,1 mol/l, pH 9,5) 1,59 g Natriumkarbonat, 7,13 g Natriumhydrogenkarbonat in 1 l Aqua dest.
Ethidiumbromidlösung	5 mg/ml in autoklaviertem PBS
Hämalaun	1 g Hämatoxylin in 1 l Aqua dest. 0,2 g Natrium-Jodat 50 g Kaliumaluminiumsulfat 50 g Chloralhydrat 1 g Citronensäure-Monohydrat
Loading Buffer	0,75 ml Formamid 0,15 ml 10 x FA-buffer 0,24 ml Formaldehyd 0,1 ml H ₂ O 0,1 ml Glycerol 0,06 ml 1 %iges Bromphenolblau

Paraformaldehyd 4 %	4 g Paraformaldehyd wurden in 50 ml Aqua dest. bis 60 °C erwärmt, mit Natriumhydroxid geklärt, dann wurden 20 ml phosphatgepufferte Stammlösung hinzugegeben, alles auf pH 7,4 titriert und auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und anschließend gefiltert.
PBS (0,15 mmol/l, pH 7,2)	8,0 g/l Natriumchlorid , 0,2 g/l Kaliumchlorid, 1,16 g/l Dinatriumhydrogenphosphat, 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat
Phosphatgepufferte Stammlösung	800 ml Dinatriumhydrogenphosphat 0,5 mol/l 200 ml Natriumdihydrogenphosphat 0,5 mol/l
Phosphatpuffer 1 (50 mmol/l, pH 6,0)	0,681 g Kaliumdihydroxyphosphat / 100 ml Aqua dest. + 0,5 % Hexadecyltrimethylammonium bromide
Phosphatpuffer 2 (80 mmol/l, pH 5,4)	1,09 g Kaliumdihydroxyphosphat / 100 ml Aqua dest.
Stopplösung ELISA	Schwefelsäure (1 mol/l)
Substratlösung ELISA	Tetramethylbenzidin Substrat Reagent Set, BD Biosciences, San Diego, USA
TAE Stocklösung (pH 8,4-8,5)	Sigma 7-9 0,04 mol/l EDTA Na-Salz 1 mmol/l Eisessig Wasser ad 1 l, dann autoklavieren.
Tris HCL	0.01 mol/l Tris HCL, pH 7,5 Wasser ad 1 l, dann autoklavieren.
Waschpuffer	Tween-20 0,05 % in PBS
Working Detector IL-10	Detektionsantikörper 1:250 in Assay Diluent verdünnen. Enzym-Reagenz 1:250 in der Detektionsantikörper-Lösung verdünnen.

8.5 Material und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils

Aquatex Eindeckmittel	Merck, Darmstadt, Deutschland
DakoPen	DakoCytomation Pen, Dako, Hamburg, Deutschland
Eismaschine	AF 80, Scotsman, Mailand, Italien
Elektrophoresekammer	Agarose Gel Kammern PM-Serie, LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Filter	Schleicher & Schuell Faltenfilter, Dassel, Deutschland
Folie für Wellplatten	Klebefolie, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Geldokumentation	Dunkelkammer: DeVision, Decon Science Tec, Hohengandern, Deutschland Kamera: Coolsnap HQ2, Photometrics, Tucson, USA Software: GelPro Analyzer v6.0.0.349, Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA
Heizblock	Neo Block Heizer Duo 2-2504, neoLab, Heidelberg, Deutschland
Homogenisierstation	Dispergierstation T 8.10 mit Metallpotter, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Kryostat	Leica CM 3050S, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica DMLB mit Kalibrierungsobjektträger, Kamera: Leica DFC 420C Software: Leica Application Suite V 2.5; Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotiterplatten	Nunc-Immuno Platte - Maxi Sorp Surface 96 Well, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark Klebefolie, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	BioTek Synergy 2 mit Software Gen5™ Version 1.11, BioTek, Winooski, USA

Mikrowelle	NN-T251W, Panasonic, Hamburg, Deutschland
Nanodrop™ 1000 Spektrophotometer	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Objektträger	HistoBond® Objektträger, Marienfeld, Landa-Königshofen, Deutschland
PCR-Wellplatten	96 Well Multiply® PCR Plate, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Laborausrüstung Klees, Düsseldorf, Deutschland
Real-Time-Cycler	7300 Real-Time-PCR-System, Applied Biosystems, Lincoln, USA Software: 7300 Sequence Detection Software v1.4
Schüttelapparat	GFL 3011, GFL, Burgwedel, Deutschland
Statistiksoftware und graphische Darstellung	GraphPad Prism Version 6, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA miRNA-223: GenEx Version 5, MultiD, Göteborg, Schweden
Stromnetzteil für Elektrophoresekammer	Consort E143, Sigma, München, Deutschland
Thermocycler	C1000 Thermalcycler, BIO-RAD, München, Deutschland
Tissue Tek®	Tissue-Tek® O.C.T™, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK255H, Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortexgerät	Vortex Genie Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge groß	Eppendorf Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge klein	Eppendorf Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

8.6 Zusammenstellung der nicht eingeschlossenen Versuche

<u>Anzahl</u>	<u>Begründung</u>
13	Nicht beendete Versuche bei Gewebespektrometrie Fehlern
11	Protokollentwicklung und -anpassung
5	Tiere sind bei Narkoseinduktion verstorben
5	Beatmungsfehler (z.B. Beatmungsgerätfehler, Mukuspfropf in Tubus)
3	pCO ₂ außerhalb des Zielbereichs
2	Tiere sind im Rahmen der Sepsis verstorben
2	Tiere sind in der Baselinephase verstorben
2	Behandlungsfehler
1	Tier ist bei der CASP-OP verstorben
1	abdominelle Blutung bei Gewebespektrometrie

8.7 Septic rat severity scoring system

Untersuchungsbogen

Experiment: _____ OP Datum: _____

Stentdurchmesser: _____ G Ratte-Nr: _____ Stentimplantation: _____ Uhr

Klinische Untersuchung:

	Ergebnis	Beurteilung	Uhrzeit												
Körpergewicht	1. präop. Gewicht (pG) _____ g 2. Momentanwert (mW) _____ g 3. $\Delta = \% \text{ des mW vom pG } \underline{\Delta\%}$ 5%= _____ g 15%= _____ g	$\Delta\% < 5 \Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Delta\% < 15 \Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Delta\% < 20 \Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Delta\% > 20 \Rightarrow 3 \text{ P}$													
Erscheinung	1. normale Erscheinung, Fell anliegend, sauber geputzt 2. geringes Pflegedefizit, Fell gestäubt 3. zunehmendes Pflegedef., Ränder an Auge/Anus 4. deutliches Pflegedef., Augen verklebt, Einstreu haftet am Anus	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$													
Verhalten spontan	1. Ratte (R) erkundet Käfig, aktiv 2. R sitzt auf einer Stelle, Ganzkörperbewegung vorhanden 3. buckelige Haltung, schwankender Gang 4. immobil, Seitenlage	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$													
Verhalten provoziert	1. R flieht bei Käfigöffnung, starker Muskeltonus 2. R flieht erst bei Annäherung der Hand 3. R flieht erst bei Berührung 4. Fluchtreflex erloschen	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$													
Atemfrequenz	1. präop. Wert (pW) _____ 1/s 2. Momentanwert (mW) _____ 1/s 3. $\Delta = \% \text{ des mW vom pW } \underline{\Delta\%}$	$\Delta\% < 10 \Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Delta\% < 20 \Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Delta\% < 50 \Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Delta\% > 50 \Rightarrow 3 \text{ P}$													
Exp. Atemgeräusch	Nein Ja	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$													
Abd.-palpation	1. kein Druckschmerz bei AP, weiches Abdomen 2. geringe Reaktion auf AP, weiches Abdomen 3. deutliche Schmerzzeichen auf AP, abd. Resistenz 4. deutl. Schmerzzeichen auf AP, hartes Abdomen	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$													
Kotbeschaffenheit	1. viel normaler Kot im Käfig, koten während der Untersuchung 2. viel Kot im Käfig, Kot blutig, dünnflüssig oder schleimig 3. kein Kot im Käfig	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$													

Auswertung:

Erklärung: bewertet wird jeweils nur einmal die maximal erreichte Punktzahl pro Kategorie. Ist in wenigstens zwei Kategorien die maximal erreichbare Punktzahl von 3 Punkten erreicht, werden alle 3-Punkte Werte auf 4 Punkte aufgewertet. Die Gabe von Schmerzmittel wird durch Umkreisung dokumentiert. Opferung des Tieres bei 12 und mehr Punkten!															
Untersucher															

Obduktionsbefund:

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Olaf Picker für die Überlassung des Themas dieser Arbeit bedanken. Im Besonderen möchte ich mich für die großartige Unterstützung sowie für die ausgezeichnete, schnelle und präzise Beratung sowohl in der Vergangenheit aber auch in der Gegenwart bedanken.

Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. Inge Bauer für ihre Hilfsbereitschaft und Anregungen in allen Phasen der Dissertation. Danke, dass die Tür immer offen stand und steht.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Christopher Beck für die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation bedanken.

Meiner „Mit-Doktorandin“ Frau Dr. Charlotte Stübs gilt ein besonderer Dank für ihre tierexperimentelle Unterstützung sowie die wirklich tolle Zusammenarbeit und Zeit im Labor.

Bei den Mitarbeitern der experimentellen Anästhesie möchte ich mich für die gute Einarbeitung und die fortwährende Unterstützung bedanken. Hier im Besonderen bei Frau Birgitt Berke, die mit Rat und Tat immer zur Stelle ist.

Meinen Freunden von Münster über Essen bis nach Düsseldorf danke ich für die stetige Motivation und ihren Zuspruch in jeder Lebenslage.

Ein großes „Danke“ meiner Familie für ihr bedingungsloses Vertrauen und ihre Unterstützung. Danke, dass ich immer zu euch kommen kann und es für euch nur Lösungen und keine Probleme gibt.

Zuletzt ein unermessliches Dankeschön an meine Freundin für ihren Beitrag an dieser Arbeit. Danke für deine Geduld bei allen Korrektur- und Formatierungsfragen, danke für deine Zuversicht und danke für den uneingeschränkten Rückhalt.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

, Jan Schulz

Unterschrift