

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

**Expression ausgewählter Marker in Caecum, Leber  
und Lunge während einer experimentell induzierten  
Colon ascendens Stent-Peritonitis und deren  
Beeinflussung durch akute Hyperkapnie**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Peter Christian Schulze-Buxloh  
2018

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer

Zweitgutachter: PD Dr. med. Florian Simon

## Zusammenfassung

Die Sepsis und ihre Folgeerscheinungen bleiben eine der führenden Todesursachen bei kritisch kranken Patienten. Hyperkapnie zeigte beim *acute respiratory distress syndrome (ARDS)* eine geringere Mortalität, sodass therapeutische Hyperkapnie auch bei der Sepsis die Mortalität bzw. Organschäden verringern könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde im etablierten *colon ascendens stent peritonitis*-Modell (*CASP*) der Sepsis untersucht, in wie fern sich die Expressionsmuster ausgewählter Entzündungs- und Stressantwortparameter in *Caecum*, Leber und Lunge während einer Sepsis verändern und ob eine Beeinflussung durch Hyperkapnie möglich ist.

Männliche Wistar-Ratten wurden randomisiert vier Gruppen zugeteilt: Normokapnie-Kontrolle (*NKSH*,  $n = 10$ ), Hyperkapnie-Kontrolle (*HKSH*,  $n = 10$ ), Sepsis-Normokapnie (*NKST*,  $n = 10$ ), Sepsis-Hyperkapnie (*HKST*,  $n = 9$ ). Die Tiere in den Gruppen *NKSH* und *HKSH* wurden dabei scheinoperiert (*Sham*). Bei den Tieren der Gruppen *NKST* und *HKST* erfolgte jeweils die *CASP*-Operation zur Induktion einer milden Sepsis. 24 Stunden nach Durchführung der *CASP*- bzw. *Sham*-Operation wurden die Tiere erneut narkotisiert und nach 30-minütiger Baseline-Messung entweder für 120 Minuten hyperkapnisch oder normokapnisch ventiliert. Im Anschluss erfolgte die Entnahme der zu untersuchenden Gewebe in tiefer Narkose.

Analysiert wurde die Expression der *mRNA* von *IL-10*, *IL-6*, *iNOS*, *HO-1* und *miR-223* mittels quantitativer PCR in *Caecum*, Leber und Lunge. Mittels Western-Blot wurde die Proteinexpression von *HO-1* und *iNOS* in Leber und Lunge untersucht. Die Anzahl der im *Caecum* vorhandenen Entzündungszellen wurde mit Hilfe der ASD-Färbung quantifiziert.

Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Berechnung der relativen Expressionsunterschiede der untersuchten *mRNAs* und *microRNA-223* und die statistische Auswertung erfolgte mit der Software REST 2009. Zur statistischen Analyse der Ergebnisse der ASD-Färbung und den Western-Blot Analysen wurden die Untersuchungsgruppen paarweise mit dem t-Test für normalverteilte bzw. Mann-Whitney-U-Test für nicht-normalverteilte Daten ausgewertet. Für alle durchgeführten Vergleiche wurde  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant angesehen. Eine moderate Sepsis führte im *Caecum* und in der Leber nicht zu einer Veränderung der lokalen Markerantwort. In der Lunge führte eine Sepsis zu einer gesteigerten *HO-1* Proteinexpression, die übrigen untersuchten Marker (*IL-6 mRNA*, *IL-10 mRNA*, *iNOS mRNA* und Protein, *miR-223*) waren unverändert. Neutrophile Granulozyten waren während der Sepsis nicht vermehrt im *Caecum* vorzufinden. Hyperkapnie in der *Sham*-Gruppe führte nicht zur Veränderung der lokalen Markerantwort im *Caecum* und in der Leber. Lediglich in der Lunge zeigte sich eine vermehrte *HO-1* Proteinexpression. Außerdem führte zusätzliche Hyperkapnie während der Sepsis im *Caecum* zu einer gesteigerten *IL-6 mRNA*, während *IL-10 mRNA* sowie *iNOS mRNA* Expression. *HO-1 mRNA* und *miR-223* sich unverändert zeigten. In der Leber führte die zusätzliche Hyperkapnie während der Sepsis zu einer verringerten *HO-1 mRNA* Expression. Die übrigen untersuchten Marker waren unverändert. In der Lunge zeigte sich die lokale Markerantwort bei zusätzlicher Hyperkapnie während der Sepsis unverändert. Die Marker *IL-6 mRNA*, *IL-10 mRNA* und *iNOS mRNA* zeigten sich im *Caecum* während der Hyperkapnie unter zusätzlicher Sepsis erhöht. Die Marker *HO-1 mRNA* und *miR-223* waren hiervon nicht betroffen und blieben unverändert. In der Leber zeigte sich ebenfalls eine Steigerung der Expression für *iNOS mRNA* sowie das *HO-1* Protein, während die übrigen Marker unverändert blieben. Es zeigten sich damit unterschiedliche Effekte der Sepsis, der Hyperkapnie sowie deren Kombination auf das Expressionsmuster ausgewählter Marker auf die untersuchten Organe. Die genaue klinische Bedeutung der beobachteten Veränderungen bedarf weitergehender Untersuchungen.

## Summary

Sepsis and its sequelae are the most leading cause of mortality in critically ill patients. Hypercapnia showed a decrease in mortality in *acute respiratory distress syndrome*. Thus, therapeutic hypercapnia might improve survival or ameliorate organ damage in sepsis. The present study investigated the expression patterns of inflammatory and stress markers during induced sepsis using the established *colon ascendens stent peritonitis* (CASP) model. Furthermore, the influence of therapeutic hypercapnia on the expression of these markers was assessed.

Male Wistar rats were randomized into four groups: Normocapnia control (NKSH, n = 10), hypercapnia control (HKSH, n = 10), normocapnia sepsis (NKST, n = 10) and hypercapnia sepsis (HKST, n = 9). The animals of the NKSH and HKSH groups underwent sham surgery (sham). The animals of the NKST and HKST groups underwent CASP surgery inducing a mild sepsis. 24 hours after CASP procedure or sham surgery, animals were anesthetized once again. After 30 minutes of baseline measurement the animals were either hypercapnic or normocapnic ventilated for another 120 minutes. Organs and tissues were harvested for further examination.

The expression levels of IL-10, IL-6, iNOS, and HO-1 mRNA and microRNA (miR)-223 were analysed by quantitative PCR in caecum, liver and lungs. The protein expression levels of HO-1 and iNOS in liver and lungs were assessed by western blot analysis. The number of inflammatory cells in the caecum was examined by ASD staining.

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error. The calculation of relative expression changes of the investigated mRNAs and microRNA-223 and the statistical evaluation was performed with the software REST 2009. The results of ASD staining and western blots were evaluated in pairs with t-test for normal distribution and with Mann-Whitney-U-Test for non-normally distributed data. For all comparisons,  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

Mild sepsis was not associated with alterations of the local marker response in liver and caecum. In lungs, expression of HO-1-protein was increased by sepsis, while expression of all other examined markers (*IL-6 mRNA*, *IL-10 mRNA*, *iNOS mRNA* und Protein, *miR-223*) remained unchanged. The number of ASD-positive cells in caecum was not altered by sepsis. In sham-operated animals, additional hypercapnia did not lead to overall changes in the marker expression patterns in caecum and liver. Only in the lungs, HO-1-protein expression was increased. Additional hypercapnia during sepsis led to an increased IL-6 mRNA expression in caecum while mRNA expression of IL-10, iNOS, and HO-1 as well as miR-223 expression remained unchanged. In the liver, additional hypercapnia during sepsis reduced HO-1 mRNA expression. All other markers remained unchanged. The local marker response in the lungs remained also unchanged during sepsis with additional hypercapnia. IL-6, IL-10 and iNOS mRNA showed increased expression levels during hypercapnia with additional sepsis. HO-1 mRNA and miR-223 were not affected. iNOS mRNA and HO-1 protein were also increased in the liver, while all other markers were not altered.

In conclusion, there were differential effects of sepsis, hypercapnia and their combination on the expression patterns of the chosen markers. The exact clinical significance of the observed alterations needs to be further evaluated.

## Abkürzungsverzeichnis

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>ACCP</b>     | <i>The American College of Chest Physicians</i>        |
| <b>AF</b>       | Atemfrequenz   |
| <b>ALI</b>      | <i>acute lung injury</i>                               |
| <b>ANOVA</b>    | Varianzanalyse   |
| <b>ARDS</b>     | <i>acute respiratory distress syndrome</i>             |
| <b>ASD</b>      | Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase                      |
| <b>BSA</b>      | <i>bovine serum albumine</i>                           |
| <b>CARS</b>     | <i>compensatory antiinflammatory response syndrome</i> |
| <b>CASP</b>     | <i>colon ascendens stent peritonitis</i>               |
| <b>cDNA</b>     | <i>complementary DNA</i>                               |
| <b>cGMP</b>     | zyklisches Guanosinmonophosphat                        |
| <b>CI</b>       | Konfidenzintervall                                     |
| <b>CLP</b>      | <i>cecal ligation and puncture</i>                     |
| <b>DAMP</b>     | <i>damage-associated molecular patterns</i>            |
| <b>DD</b>       | <i>death domain</i>                                    |
| <b>DEPC</b>     | Diethylpyrocarbonat                                    |
| <b>DNA</b>      | <i>desoxyribonucleic acid</i>                          |
| <b>ds-miRNA</b> | <i>double-strand microRNA</i>                          |

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>ECL</b>                        | <i>enhanced chemoluminescence reagent</i> |
| <b>eNOS</b>                       | endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase   |
| <b>etCO<sub>2</sub></b>           | endtidales CO <sub>2</sub>                |
| <b>F<sub>I</sub>O<sub>2</sub></b> | inspiratorischer O <sub>2</sub> -Fluss    |
| <b>GAPDH</b>                      | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase  |
| <b>GCS</b>                        | Glasgow Coma Scale                        |
| <b>GTP</b>                        | Guanosintriphosphat                       |
| <b>HCA</b>                        | <i>hypercapnic acidosis</i>               |
| <b>HCC</b>                        | hepatozelluläres Karzinom                 |
| <b>HKG</b>                        | <i>housekeeping gene</i> , Referenzgen    |
| <b>HKSH</b>                       | Sham-Gruppe (Kontrolle), Hyperkapnie      |
| <b>HKST</b>                       | Stent-Gruppe (Intervention), Hyperkapnie  |
| <b>HO-1, HO-2, HO-3</b>           | Isoenzyme der Hämoxygenase                |
| <b>IL-10</b>                      | <i>Interleukin-10</i>                     |
| <b>IL-10R</b>                     | <i>Interleukin-10 Rezeptor</i>            |
| <b>IL-2</b>                       | <i>Interleukin-2</i>                      |
| <b>IL-6</b>                       | <i>Interleukin-6</i>                      |
| <b>IL-6R</b>                      | <i>Interleukin-6 Rezeptor</i>             |

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>iNOS</b>       | induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase                               |
| <b>JAK</b>        | Janus-Kinase  |
| <b>KISS</b>       | Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System                            |
| <b>LANUV</b>      | Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz                     |
| <b>LPS</b>        | Lipopolysaccharid   |
| <b>LT</b>         | Lymphotoxin   |
| <b>MAD</b>        | mittlerer arterieller Druck   |
| <b>MAPK</b>       | mitogen-activated protein kinase                                      |
| <b>Mef2c</b>      | <i>myocyte-specific enhancer factor 2c</i>                            |
| <b>miRNA*</b>     | komplementärer miRNA-Strang   |
| <b>miRNA, miR</b> | <i>micro-RNA</i>  |
| <b>MODS</b>       | <i>multiorgan dysfunction syndrome</i>                                |
| <b>MOV</b>        | Multiorganversagen  |
| <b>mRNA</b>       | <i>messenger RNA</i>  |
| <b>MW</b>         | Mittelwert; <i>molecular weight</i>                                   |
| <b>NADPH</b>      | Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat                                 |
| <b>NFκB</b>       | <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> |

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| <b>NKSH</b>                        | Sham-Gruppe (Kontrolle), Normokapnie              |
| <b>NKST</b>                        | Stent-Gruppe (Intervention), Normokapnie          |
| <b>nNOS</b>                        | neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase              |
| <b>NO</b>                          | Stickstoffmonoxid                                 |
| <b>NOS</b>                         | NO-Synthase                                       |
| <b>ONOO<sup>-</sup></b>            | Peroxinitrit                                      |
| <b>p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub></b> | Kohlenstoffdioxidpartialdruck im arteriellen Blut |
| <b>PAMP</b>                        | <i>pathogen associated molecular patterns</i>     |
| <b>P<sub>AW</sub></b>              | Atemwegsdruck                                     |
| <b>PCR</b>                         | <i>polymerase chain reaction</i>                  |
| <b>PCT</b>                         | Procalcitonin                                     |
| <b>PMN</b>                         | <i>polymorphonuclear leukocytes</i>               |
| <b>pre-miRNA</b>                   | <i>precursor microRNA</i>                         |
| <b>pri-miRNA</b>                   | <i>primary microRNA</i>                           |
| <b>PRR</b>                         | <i>pathogen recognition receptor</i>              |
| <b>p<sub>sq</sub>O<sub>2</sub></b> | subkutane Sauerstoffsättigung                     |
| <b>PVDF</b>                        | Polyvinylidenfluorid                              |
| <b>qRT-PCR</b>                     | quantitative Realtime-PCR                         |

|                    |  |
|--------------------|--|
| <b>qSOFA-Score</b> | <i>Quick Sepsis-related Organ Failure Assessment-Score</i> |
| <b>Raf</b>         | <i>rapidly accelerated fibrosarcoma Protein</i>            |
| <b>Ras</b>         | <i>rat sarcoma Protein</i>                                 |
| <b>RISC</b>        | <i>RNA-induced silencing complex</i>                       |
| <b>RNA</b>         | <i>ribonucleic acid</i>                                    |
| <b>ROS</b>         | <i>reactive oxygen species</i>                             |
| <b>SCCM</b>        | <i>Society of Critical Care Medicine</i>                   |
| <b>SE</b>          | Standardfehler   |
| <b>SDS-PAGE</b>    | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese        |
| <b>SepNet</b>      | Kompetenznetzwerk Sepsis                                   |
| <b>sGC</b>         | lösliche Guanylatzyklase                                   |
| <b>sIL-6R</b>      | löslicher <i>Interleukin-6</i> Rezeptor                    |
| <b>SIRS</b>        | <i>systemic inflammatory response syndrome</i>             |
| <b>SOFA-Score</b>  | <i>Sepsis-related Organ Failure Assessment-Score</i>       |
| <b>STAT</b>        | <i>signal transducers and activators of transcription</i>  |

|  |  |
|--|--|
| <b>TBS-T</b>                           | <i>Puffer, tris buffered saline with tween</i> |
| <b>TLR</b>                             | <i>toll-like receptor</i>                      |
| <b>TNFR</b>                            | <i>Tumornekrosefaktor-Rezeptor</i>             |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>         | <i>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math></i>  |
| <b>TRAF</b>                            | <i>TNF-receptor associated factor</i>          |
| <b>VALI</b>                            | <i>ventilator-associated lung injury</i>       |
| <b>V<sub>T</sub></b>                   | Tidalvolumen                                   |
| <b>HMGB1</b>                           | <i>high-mobility group box 1</i>               |
| <b>HSP</b>                             | <i>heat shock protein</i>                      |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>          | <i>Interleukin-1<math>\beta</math></i>         |
| <b>MARS</b>                            | <i>mixed antagonist response</i>               |
| <b><math>\mu</math>HbO<sub>2</sub></b> | gastrale mikrovaskuläre Oxygenierung           |
| <b>MAC</b>                             | minimale alveoläre Konzentration               |
| <b>CO-Hb</b>                           | Carboxyhämoglobin                              |
| <b>GTP</b>                             | Guanosintriphosphat                            |
| <b>gp130</b>                           | Glykoprotein 130                               |
| <b>MPO</b>                             | Myeloperoxidase                                |

## Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Zusammenfassung.....  | I   |
| Summary .....   | II  |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | III |
| Inhaltsverzeichnis.....   | VI  |
| 1 Einleitung.....   | 1   |
| 1.1 Definition der Sepsis .....   | 1   |
| 1.1.1 Definition .....  | 1   |
| 1.1.2 Epidemiologie .....   | 3   |
| 1.1.3 Keimspektrum und Pathophysiologie der Sepsis .....                      | 3   |
| 1.1.4 Auswirkungen der Sepsis auf Organsysteme .....                          | 5   |
| 1.2 Hyperkapnie .....   | 6   |
| 1.2.1 Geschichtliches.....  | 6   |
| 1.2.2 Effekte der Hyperkapnie unter nicht-septischen Bedingungen .....        | 7   |
| 1.2.3 Effekte unter septischen Bedingungen: Hyperkapnie und Sepsis .....      | 9   |
| 1.3 Marker der Sepsis.....  | 10  |
| 1.3.1 Hämoxygenase-1 .....  | 10  |
| 1.3.2 Stickstoffmonoxid und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase ..... | 11  |
| 1.3.3 Mikro-RNA .....   | 12  |
| 1.3.4 Interleukin-6 .....   | 14  |
| 1.3.5 Interleukin-10.....   | 14  |
| 1.3.6 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....                                      | 15  |
| 2 Fragestellung .....   | 17  |
| 3 Material .....  | 19  |
| 3.1 Geräte und Hilfsmittel .....  | 19  |
| 3.2 Chemikalien und Lösungen.....   | 20  |
| 3.3 Primer / Assays / Antikörper / Marker .....                               | 22  |
| 3.4 Lösungen .....  | 23  |
| 3.4.1 Allgemeine Lösungen .....   | 23  |
| 3.4.2 Lösungen für RNA-Isolierung.....  | 23  |
| 3.4.3 Lösungen für ASD-Färbung.....   | 24  |
| 3.4.4 Lösungen für Ganzzellextraktion .....                                   | 25  |
| 3.4.5 Lösungen für PAA-Gele des Western-Blot.....                             | 25  |
| 3.4.6 Lösungen für Elektrophorese und Transfer des Western-Blot .....         | 26  |
| 3.4.7 Lowry Reagenzien und Lösungen.....                                      | 27  |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4     | Methoden.....                                    | 28 |
| 4.1   | Sepsisinduktion durch CASP-Operation.....        | 28 |
| 4.2   | Realtime-PCR.....                                | 29 |
| 4.2.1 | RNA-Isolierung.....                              | 29 |
| 4.2.2 | Konzentrationsbestimmung der RNA.....            | 30 |
| 4.2.3 | RNA-Gelelektrophorese.....                       | 30 |
| 4.2.4 | Reverse Transkription.....                       | 31 |
| 4.2.5 | quantitative Realtime-PCR mit TaqMan®-Sonde..... | 33 |
| 4.2.6 | Quantifizierung und Auswertung.....              | 36 |
| 4.3   | Histologische Untersuchungsmethoden.....         | 37 |
| 4.3.1 | ASD-Färbung.....                                 | 37 |
| 4.3.2 | Durchführung der Lichtmikroskopie.....           | 38 |
| 4.4   | Western-Blot.....                                | 38 |
| 4.4.1 | Proteinextraktion.....                           | 38 |
| 4.4.2 | Proteinbestimmung nach Lowry.....                | 39 |
| 4.4.3 | Auftrennung von Proteinen.....                   | 39 |
| 4.4.4 | Western-Blot.....                                | 39 |
| 4.4.5 | Gel-Kontrolle.....                               | 41 |
| 4.4.6 | Probenanalyse / Quantifizierung.....             | 41 |
| 4.5   | Statistische Auswertung.....                     | 41 |
| 5     | Ergebnisse.....                                  | 42 |
| 5.1   | Caecum.....                                      | 42 |
| 5.1.1 | Expression von IL-6 mRNA im Caecum.....          | 42 |
| 5.1.2 | Expression von IL-10 mRNA im Caecum.....         | 43 |
| 5.1.3 | Expression von iNOS mRNA im Caecum.....          | 44 |
| 5.1.4 | Expression von HO-1 mRNA im Caecum.....          | 46 |
| 5.1.5 | Expression von miR-223 im Caecum.....            | 47 |
| 5.1.6 | ASD-Färbung im Caecum.....                       | 48 |
| 5.2   | Leber.....                                       | 51 |
| 5.2.1 | Expression von IL-6 mRNA in der Leber.....       | 51 |
| 5.2.2 | Expression von IL-10 mRNA in der Leber.....      | 51 |
| 5.2.3 | Expression von iNOS mRNA in der Leber.....       | 52 |
| 5.2.4 | Expression von iNOS Protein in der Leber.....    | 53 |
| 5.2.5 | Expression von HO-1 mRNA in der Leber.....       | 53 |
| 5.2.6 | Expression von HO-1 Protein in der Leber.....    | 54 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.3   | Lunge.....   | 56 |
| 5.3.1 | Expression von IL-6 mRNA in der Lunge .....                    | 56 |
| 5.3.2 | Expression von IL-10 mRNA in der Lunge .....                   | 56 |
| 5.3.3 | Expression von iNOS mRNA in der Lunge .....                    | 56 |
| 5.3.4 | Expression von iNOS Protein in der Lunge .....                 | 57 |
| 5.3.5 | Expression von HO-1 mRNA in der Lunge .....                    | 57 |
| 5.3.6 | Expression von HO-1 Protein in der Lunge .....                 | 58 |
| 5.3.7 | Expression von miR-223 in der Lunge.....                       | 59 |
| 6     | Diskussion.....  | 61 |
| 6.1   | Kernaussagen .....   | 61 |
| 6.2   | Diskussion der Methodik .....                                  | 62 |
| 6.2.1 | Experimentelles Modell zur Induktion der Sepsis.....           | 62 |
| 6.2.2 | Induktion der Hyperkapnie.....                                 | 63 |
| 6.2.3 | Auswahl der untersuchten Organe .....                          | 64 |
| 6.3   | Diskussion der Ergebnisse .....                                | 65 |
| 6.3.1 | Das lokale Expressionsmuster von Interleukin-6 .....           | 65 |
| 6.3.2 | Das lokale Expressionsmuster von Interleukin-10 .....          | 67 |
| 6.3.3 | Das lokale Expressionsmuster von iNOS.....                     | 68 |
| 6.3.4 | Das lokale Expressionsmuster von HO-1 .....                    | 70 |
| 6.3.5 | Das lokale Expressionsmuster von miR-223.....                  | 72 |
| 6.3.6 | Neutrophile Granulozyten im Caecum.....                        | 73 |
| 6.4   | Übertragbarkeit auf den Menschen und praktische Relevanz ..... | 74 |
| 7     | Literaturverzeichnis.....                                      | 76 |
| 8     | Anhang.....  | 86 |
| 9     | Abbildungsverzeichnis .....                                    | 87 |
| 10    | Tabellenverzeichnis.....                                       | 88 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition der Sepsis

### 1.1.1 Definition

Das Krankheitsbild der Sepsis sowie deren Diagnostik und Therapie stellt eine der größten Herausforderungen der modernen Medizin dar, deren Inzidenz weltweit steigt (1). Sie bleibt weiterhin eine der führenden Todesursachen bei kritisch kranken Patienten und stellt sich als komplexe Kette systemischer Veränderungen als Antwort auf eindringende Erreger dar, welche inflammatorische und antiinflammatorische Prozesse, humorale und zelluläre Reaktionen und Kreislaufdysfunktionen umfasst (2). *Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)*, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock bezeichnen verschiedene Abstufungen bzw. Phasen der Sepsis. Sie definieren ein Krankheitskontinuum und stellen daher eine große Anforderung an die Diagnose und Abgrenzung der einzelnen Entitäten (3). Die zum Zeitpunkt der Untersuchung gültigen Definitionen und Kriterien wurden 1992 in einer Konsensuskonferenz der *American College of Chest Physicians (ACCP)* und *Society of Critical Care Medicine (SCCM)* festgelegt, um die Diagnose und Abgrenzung von anderen Erkrankungsbildern und -entitäten zu erleichtern (4):

**SIRS:** Akute, entzündliche Allgemeinreaktion des Körpers, unabhängig von der auslösenden Ursache. Systemisch-entzündliche Reaktion auf verschiedene schwere klinische Insulte, charakterisiert durch mindestens zwei der folgenden Symptome:

- Körpertemperatur  $> 38,0\text{ °C}$  oder  $< 36,0\text{ °C}$
- Herzfrequenz  $> 90/\text{min}$
- Tachypnoe (Atemfrequenz  $> 20/\text{min}$ ) oder Hyperventilation ( $p_a\text{CO}_2 < 32\text{ mmHg}$ )
- Veränderung der Leukozytenzahlen  $> 12.000/\mu\text{l}$  oder  $< 4000/\mu\text{l}$ , oder  $> 10\%$  unreife (stabförmige) Formen

**Sepsis:** Die Sepsis ist eine systemische Reaktion auf eine Infektion. Bei Vorliegen eines *SIRS* und nachgewiesenem Infektionsprozess spricht man von einer Sepsis.

**Schwere Sepsis:** Sepsis, assoziiert mit Organdysfunktion, Minderperfusion oder Hypotonie. Minderperfusion und Durchblutungsstörungen beinhalten:

- Laktatazidose
- Oligurie
- akute Veränderung der Bewusstseinslage

**Septischer Schock:** Ein septischer Schock liegt vor, wenn eine Sepsis-induzierte Hypotension trotz adäquater Volumensubstitution weiterhin besteht und mit Hypoperfusions- oder

Organdysfunktionszeichen einhergeht. Von der Sepsis-induzierten Hypotension spricht man, wenn der mittlere arterielle Druck unter 90 mmHg fällt oder  $\geq 40$  mmHg vom Ausgangswert abfällt, während andere Ursachen für eine Hypotension fehlen. Der Entität „septischer Schock“ werden auch Patienten zugeordnet, die mit inotropen Substanzen oder Vasopressoren behandelt werden und daher nicht mehr hypotensiv sind, aber weiterhin Zeichen einer Hypoperfusion oder Organdysfunktion zeigen.

Eine erste Aktualisierung dieser Sepsisdefinition (kurz *Sepsis-2*) erfolgte durch eine Task-Force im Jahr 2001. Man erkannte die Limitierungen der ursprünglichen Definition, da die *SIRS*-Kriterien wenig spezifisch waren. Man erweiterte daher die Liste der diagnostischen Kriterien, ließ die Begriffsdefinitionen aber unangetastet mit dem Ergebnis, dass bis 2016 die Definitionen der Sepsis, schweren Sepsis bzw. septischer Schock und Organdysfunktion unverändert Anwendung fanden (5).

Im Jahr 2016 wurden in der dritten Konsensus-Konferenz die Definitionen zur Sepsis und zum septischen Schock erneuert (kurz *Sepsis-3*) (6). Fortschritte sowie neue Erkenntnisse in der Pathobiologie, dem Management und der Epidemiologie der Sepsis machten eine Überprüfung der Definitionen notwendig. Ein 17-köpfiges Expertenteam definiert Sepsis als „lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Antwort auf eine Infektion“. Mit der Neudefinition wurden auch die Kriterien zur Diagnosestellung kritisch hinterfragt. Bisher lag eine Sepsis vor, wenn mindestens zwei der *SIRS*-Kriterien erfüllt waren. Allerdings waren die *SIRS*-Kriterien lediglich auf den Inflammationsprozess fokussiert. Heute wird die Sepsis als Prozess aus einer frühen Aktivierung pro- und antiinflammatorischer Reaktionen und damit einhergehenden großen Veränderungen in nicht-immunologischen Pfaden verstanden. Daher wurde die Nutzung der *SIRS*-Kriterien als Sepsis-Parameter verworfen. Untersuchungen zeigten, dass sich der *Sepsis-related Organ Failure Assessment-Score (SOFA-Score)* deutlich besser eignet. Ein höherer *SOFA-Score* ist mit einem Anstieg der Sterbewahrscheinlichkeit assoziiert. Beim *SOFA-Score* werden die Atemtätigkeit, die *Glasgow Coma Scale (GCS)*, die Herz-Kreislauf-Funktion, die Leberfunktion, die Gerinnungsfunktion sowie die Nierenfunktion evaluiert. Patienten mit einem *SOFA-Score* von 2 und höher haben damit eine etwa 10 %-ige Mortalität und damit eine 2- bis 25-fach erhöhte Sterbewahrscheinlichkeit als Patienten mit einem *SOFA-Score* von kleiner 2. Aufgrund der komplexen Erfassung des *SOFA-Score* ist der Parameter vor allem für Patienten auf Intensivstationen geeignet. Eine Anwendung der drei Parameter Atemfrequenz, verändertes Bewusstsein und systolischer Blutdruck vereinfacht die Anwendung und lässt sich als sogenannter *quick-SOFA-Score (qSOFA-Score)* zum Screening zum Beispiel in der Notaufnahme einsetzen. Dabei liegt ein Sepsis-Verdacht bei einem *qSOFA-Score* von 2 Punkten und mehr vor. Einen Punkt gibt es bei Verschlechterung des Bewusstseinszustandes im Vergleich zum Ausgangszustand des Patienten bzw. bei einem *GCS* von kleiner 15. Einen weiteren Punkt für eine Atemfrequenz größer 22

Atemzüge pro Minute sowie einen weiteren Punkt für einen systolischen Blutdruck kleiner 100 mmHg. Liegen zwei Punkte vor, sollte mit Hilfe des *SOFA-Score* nach dem Vorliegen von Organdysfunktionen gefahndet werden. Eine schwere Sepsis lag nach alter Definition vor, wenn mindestens 2 *SIRS*-Kriterien und Zeichen der Organdysfunktion vorlagen. Die neue Definition impliziert bereits die Organdysfunktion, sodass der Begriff der schweren Sepsis nun überflüssig geworden ist und wegfällt. Zusammenfassend wird durch die 3., aktualisierte Definition der Sepsis das Organversagen also in den Mittelpunkt gestellt (6).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Je nach angewendeter Sepsisdefinition variieren die Angaben über Prävalenz und Mortalität der Sepsis stark. 2007 wurde in Deutschland eine prospektive 1-Tages Querschnittserhebung des Kompetenznetzwerks Sepsis (*SepNet*) auf 454 deutschen Intensivstationen durchgeführt. Eingeschlossen wurden 3.877 Patienten, bei denen anhand der *ACCP/SCCM*-Kriterien das Vorliegen einer Sepsis erhoben wurde. Hierbei lag die Prävalenz der Sepsis bei 12,4 % (95 %-CI: 10,9-13,8 %). Die 90-Tage-Mortalität der schweren Sepsis betrug 48,4 %. Für die Inzidenz bedeutet dies, dass jährlich in Deutschland etwa 76-110 von 100.000 Menschen neu an einer Sepsis erkranken (1).

### **1.1.3 Keimspektrum und Pathophysiologie der Sepsis**

#### **Keimspektrum**

Das bei einer Sepsis vorliegende Erregerspektrum ist abhängig von der Eintrittspforte und, wenn vorhanden, dem zugrundeliegenden Infektionsfokus. Während in den 1970er- bis 1990er-Jahren überwiegend gramnegative Erreger bei Sepsispatienten isoliert wurden, sind heute grampositive Erreger sowie polymikrobielle Infektionen und die durch Pilze hervorgerufene Sepsis häufiger anzutreffen. Dabei entsteht ein Großteil der Sepsisfälle mit etwa 50-70 % nosokomial. Die primären Lokalisationen von Infektionen, die im Verlauf zu einer Sepsis führen, sind der respiratorische Trakt, der intraabdominale Raum sowie der Urogenitaltrakt (7,8). Mit dem Ziel, die Häufigkeit von Krankenhausinfektionen zu erfassen, diese zu reduzieren und die Effektivität der eingeleiteten Maßnahmen nachzuweisen, werden seit 1996 Daten mit dem *Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS)* des nationalen Referenzzentrums für die Surveillance von nosokomialen Infektionen erfasst. Für den Zeitraum 2000-2005 ermittelte *KISS* für die Sepsiserreger einen Anteil von 40,3 % grampositiven und 59,7 % gramnegativen Bakterien. Dabei waren *Staphylococcus aureus* (16,2 %) und Enterokokken (12,7 %) bei den grampositiven und *Escherichia coli* (14,4 %) und *Pseudomonas aeruginosa* (13,5 %) bei den gramnegativen Bakterien am häufigsten vertreten. In 3-5 % der Fälle fanden sich Pilze als Ursache (7,9,10). Eine andere prospektive Untersuchung von 2007 kam zu ähnlichen Häufigkeitsverteilungen für die verschiedenen Erregerspektren (1). Eine 2016 publizierte Studie zur Inzidenz der schweren Sepsis und des septischen Schocks auf deutschen Intensivstationen zeigte eine hohe Punkt-Prävalenz von 17,9 % zum Untersuchungszeitpunkt am 4.11.2013. Zu diesem Zeitpunkt litten 345 von 1924 Patienten auf den 95 teilnehmenden Intensivstationen an einer

schweren Sepsis oder einem septischen Schock. Die Mortalität auf den Intensivstationen lag dabei bei rund 34,3 %, die Krankenhaussterblichkeit bei rund 40,4 %. Unter Anwendung der neuen *Sepsis-3*-Definitionen findet sich eine noch höhere Mortalität von 44,3 % für die Intensivstationen und eine Krankenhaussterblichkeit von 50,9 % für den septischen Schock. Durch Anwendung der neuen Definition ist also in den nächsten Jahren mit einem Anstieg sowohl der Prävalenz als auch der Mortalität zu rechnen. 57,2 % der Sepsisinfectionen waren dabei nosokomialen Ursprungs, rund die Hälfte davon wurde auf einer Intensivstation erworben. Der Respirationstrakt war in 46,6 % der Fälle, der Abdominaltrakt in 28,7 % und der Urogenitaltrakt in 12,6 % der Fälle der Ursprungsort der Infektion. Dabei waren in 55,5 % der Fälle grampositive Erreger in den Blutkulturen nachzuweisen. Allerdings waren die Blutkulturen septischer Patienten nur in rund einem Drittel der Fälle mit Nachweis von Erregerwachstum positiv (11).

### **Pathophysiologie**

Das angeborene Immunsystem ist die erste Kontaktstelle zwischen Erregern und dem Wirt bei einer Infektion. Es setzt sich aus zellulären und humoralen Bestandteilen zusammen. Zu den zellulären Bestandteilen gehören u.a. Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Zu den humoralen, also löslichen Bestandteilen, gehören beispielsweise Zytokine, Akute-Phase-Proteine und das Komplementsystem. Die Erkennung mikrobieller pathogener Strukturen erfolgt über *pattern recognition receptors (PRRs)*, die auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden. Zu den *PRRs* zählen unter anderem die Transmembranrezeptoren der *toll-like* Rezeptorfamilie, die in erster Linie extrazelluläre und endosomale Kompartimente überwachen. Zu den von *PRRs* erkennbaren pathogenen Strukturen zählen u.a. *Lipopolysaccharid (LPS)*, Lipoteichonsäure, Mannan und virale RNA. Diese Strukturen werden als *pathogen associated molecular patterns (PAMPs)* zusammengefasst. Die Bindung von *PAMPs* an *PRRs* aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden, an deren Ende die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NFκB)* steht. Diese Transkriptionsfaktoren kontrollieren dabei die Expression zahlreicher Effektormoleküle. Hierzu zählen insbesondere die Zytokine, die eine wesentliche Rolle bei der Koordinierung der Immunantwort auf eine Infektion bzw. während der Sepsis spielen (2,7,12). Neben der hier beschriebenen Art der Immunaktivierung via *PAMPs* gibt es weitere Signale wie zum Beispiel durch Zellstress bzw. durch zerstörte Zellen. Dabei handelt es sich um einen nicht-infektiösen Weg, sodass das Vorhandensein von Erregern nicht notwendig ist. Dies beschrieb auch Matzinger 1998 (13). Die Signale, die die Immunantwort über diesen nicht infektiösen Weg in Gang setzen, werden als *damage-associated molecular patterns (DAMPs)* bezeichnet. Im Gegensatz zur Rolle der *PAMPs* in der Sepsis existiert für die *DAMPs* bis heute keine einheitliche Klassifikation zu deren Rolle in der Sepsis. *DAMPs* werden passiv von sterbenden oder abgestorbenen Zellen

freigesetzt. Sie sorgen so für die Initiierung der Immunantwort, um abgestorbene Zellen abzuräumen bzw. die Heilung von Geweben in Gang zu setzen. Man geht davon aus, dass eine Kommunikation zwischen *DAMPs* und *PAMPs* stattfindet. Außerdem ist bekannt, dass eine Fehlfunktion der Kontrollmechanismen der *DAMPs* zu einer unkontrollierten Inflammation führt und schwerwiegende Erkrankungen wie zum Beispiel eine Sepsis hervorrufen können. Die Liste der bekannten *DAMPs* wächst stetig. Die am meisten untersuchten *DAMPs* sind unter anderem *high-mobility group box 1 (HMGB1)*, *heat shock proteins (HSPs)*, ATP und DNA. Aber auch Histone und mitochondriale DNA zählen zur Gruppe der *DAMPs* (14).

Die zuvor beschriebenen Effektormoleküle setzen zu Beginn der Sepsis eine vor allem proinflammatorische Immunantwort in Gang, die zunächst zur Bekämpfung der Pathogene notwendig ist und die sich selbst unterhält und verstärkt. Eine prolongierte proinflammatorische Antwort führt jedoch zu gewebezerstörenden Effekten und richtet somit Schaden an. Diese Phase wurde nach einer älteren Definition der Sepsis als *SIRS* bezeichnet. Sie ist vor allem durch die Freisetzung von proinflammatorischen Faktoren wie *Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )* und *Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )* sowie weiteren Faktoren wie z.B. Leukotriene, Adhäsionsmoleküle, reaktive Sauerstoffspezies (*ROS*) und Stickstoffmonoxid (*NO*) gekennzeichnet (15). Als Antwort darauf setzt eine entgegengerichtete antiinflammatorische Reaktion ein, um eine überschießende, prolongierte und schädliche proinflammatorische Reaktion einzudämmen. Im weiteren Verlauf einer Sepsis findet man daher eine überwiegend antiinflammatorische Reaktion. Diese Phase wird auch als *compensatory antiinflammatory response syndrome (CARS)* bezeichnet. In dieser zweiten Phase spielen folglich vorwiegend antiinflammatorische Mediatoren wie z.B. *Interleukin-10 (IL-10)* eine Rolle. Eine überschießende, prolongierte antiinflammatorische Reaktion wiederum mündet in einer Immunparalyse, sodass die Gefahr einer weiteren Infektion und damit einer Verschlimmerung des Zustandes gegeben ist. Allerdings muss es nicht zwangsläufig zu einem schädlichen Effekt durch die pro- und antiinflammatorische Reaktion kommen. Der Übergang zwischen *SIRS* und *CARS* macht das Vorhandensein eines Systems notwendig, das zwischen den beiden Zuständen steht. Dieses wurde nach dem oben beschriebenen Pathogenesemodell der Sepsis als *mixed antagonist response (MARS)* bezeichnet. Untersuchungen konnten jedoch das Konzept von *SIRS*, *CARS* und *MARS* nicht näher belegen, sodass auch in Folge der *SIRS*-Begriff aus der Sepsisdefinition gestrichen wurde. Nichts desto trotz hilft das Konzept, die ungefähren Immunvorgänge während der Sepsis besser zu verstehen, auch wenn noch lange nicht alle Details der komplexen Vorgänge erforscht und verstanden sind (16).

#### **1.1.4 Auswirkungen der Sepsis auf Organsysteme**

Die häufigste Todesursache von an einer Sepsis erkrankten Patienten ist das multiple Organversagen (*MOV*). Dabei führt eine Sepsis zuerst zur Organdysfunktion (*multiple organ dysfunction syndrome, MODS*), die bei Fortbestehen der Sepsis in die Entstehung eines multiplen Organversagens mündet.

Die Entwicklung eines *MODS* ist bis heute nur unvollständig verstanden. Dabei scheinen unter anderem die Hypoperfusion und Hypoxie der Gewebe eine wichtige Rolle zu spielen. Aber auch Mechanismen wie Thrombenbildung, reduzierte Erythrozytenverformbarkeit, Gewebsödeme und reduzierte Gewebsperfusion scheinen involviert zu sein. Schließlich scheint die Immunantwort selbst über Zellinfiltration mit Neutrophilen gewebserstörende Effekte zu haben. Hier haben die Bildung lysosomaler Enzyme und die Bildung von *ROS* eine zentrale Bedeutung (2,17). Interessanterweise scheint es Bedingungen zu geben, unter denen die beschriebenen, schädlichen Wirkungen auf die Organe jedoch weniger ausgeprägt sind. Beobachtungen während eines *acute respiratory distress syndrome (ARDS)* zeigten sinkende Mortalitätsraten, wenn man höhere  $\text{CO}_2$ -Werte im Rahmen einer lungenprotektiven Beatmung hinnimmt (18). Dieses Konzept wird als Hyperkapnie bezeichnet und im Folgenden näher erläutert.

## 1.2 Hyperkapnie

### 1.2.1 Geschichtliches

Unter Hyperkapnie versteht man allgemein zunächst einen Anstieg des Kohlendioxidpartialdruckes ( $\text{pCO}_2$ ) im Blut. Dieser Anstieg entsteht primär durch eine respiratorische Insuffizienz durch z.B. eine zu geringe Atemfrequenz oder durch eine zu geringe Inspirationstiefe bzw. ein zu geringes Atemzugvolumen. Eine Hyperkapnie kann durch entsprechende moderne Beatmungsverfahren erzeugt werden und wird heute zum Teil therapeutisch eingesetzt. Diese Form der Hyperkapnie wird daher auch als „hingegenommene“ oder „permissive Hyperkapnie“ bezeichnet, neuerdings auch als „therapeutische Hyperkapnie“.

Bereits 1967 beschrieben Ashbaugh et al., dass es im Rahmen eines *ARDS* zum Anstieg des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks ( $\text{p}_a\text{CO}_2$ ) kommt (18). Bis in die 1980er Jahre versuchte man durch entsprechende Beatmungsstrategien (hohe Tidalvolumina, hohe Beatmungsdrücke) diese als schädlich angesehenen hohen  $\text{p}_a\text{CO}_2$ -Drücke zu senken (19). Später erkannte man, dass dieses Beatmungsregime zur Schädigung der Lunge führt, weshalb diese Form des Lungenschadens als *ventilator-associated-lung-injury (VALI)* bezeichnet wird (20). In der Folgezeit wurden die hohen  $\text{p}_a\text{CO}_2$ -Werte zugunsten der lungenprotektiven Beatmung akzeptiert und verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um den Effekt dieser protektiven Beatmung zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die Mortalitätsraten sanken (21,22). Damit wurde deutlich, dass die Akzeptanz hoher  $\text{p}_a\text{CO}_2$ -Werte nicht länger als schädlich anzusehen war. Daher wurde für die aus dieser lungenprotektiven Beatmungsform resultierende Hyperkapnie der Begriff der „permissiven Hyperkapnie“ eingeführt.

In der Folge wurde das Konzept der permissiven Hyperkapnie mit Hilfe experimenteller und klinischer Studien weiter untersucht (23,24). Ziel war dabei, die verantwortlichen Mechanismen aufzudecken, die das bessere Outcome und die geringere Mortalität unter dieser vermeintlich

schlechten Beatmungsform erklären könnten. Im Folgenden werden einige der Effekte näher betrachtet.

### **1.2.2 Effekte der Hyperkapnie unter nicht-septischen Bedingungen Einfluss auf die Gewebsoxygenierung**

Eine Hyperkapnie kann über verschiedene Mechanismen zu einer verbesserten Gewebssättigung mit Sauerstoff führen. Durch den Bohr-Effekt, der die Abhängigkeit der Affinität von Hämoglobin zu Sauerstoff von Kohlenstoffdioxid und pH-Wert beschreibt, kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve. Dies hat eine geringere Sauerstoffaffinität und damit eine leichtere Sauerstoffabgabe an das Gewebe zur Folge. Weiter verursacht die Hyperkapnie eine Vasodilatation der Arteriolen und Kapillaren, was eine erhöhte Gewebserfusion zur Folge hat. Außerdem wird durch Hyperkapnie das Ventilations-Perfusions-Verhältnis verbessert und die kardiale Auswurfleistung gesteigert, was konsekutiv zu einer besseren peripheren Blutversorgung und damit zur verbesserten Gewebsoxygenierung führt (23).

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten z.B. zeigen, dass es unter physiologischen Bedingungen durch Hyperkapnie zu einer konzentrationsabhängigen Verbesserung der gastralen mikrovaskulären Oxygenierung ( $\mu\text{HbO}_2$ ) bei Hunden kommt (25). In dieser Studie wurde bei 6 gesunden Hunden unter Allgemeinanästhesie (Einleitung mit  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Propofol, Aufrechterhaltung mit Sevofluran bei 3,0 % endtidaler Konzentration und einer minimalen alveolären Konzentration (MAC) von 1,5 % und mechanischer Beatmung ( $\text{FiO}_2$  0,3 und  $V_T$   $12,5 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) jeweils eine Messung der gastralen Mukosaoxygenierung durchgeführt. Die Hunde wurden randomisiert zwei Serien zugeordnet. Jeweils gefolgt von 30 min *steady state*-Bedingungen ( $\text{etCO}_2$  35 mmHg) wurde in der ersten Serie (Konzentration/Effekt-Gruppe) der  $\text{etCO}_2$  durch Reduzierung der Beatmungsfrequenz jeweils für 30 min auf die  $\text{etCO}_2$ -Zielwerte von 45, 55, 65 und 70 mmHg eingestellt. In der zweiten Serie (Plateau-Hyperkapnie-Gruppe) wurde die Beatmungsfrequenz nach 30 min *steady state*-Bedingungen direkt so angepasst, dass ein  $\text{etCO}_2$  von 70 mmHg erreicht und für 120 min aufrechterhalten wurde. Durch perorale Applikation und gastrale Positionierung einer  $\mu\text{HbO}_2$ -Sonde wurde die regionale Mukosaoxygenierung während der Experimente gemessen. In der Konzentration/Effekt-Gruppe stieg die regionale Oxygenierung konzentrationsabhängig von  $48 \pm 6 \%$  auf  $59 \pm 3 \%$  bei einem  $\text{etCO}_2$  von 70 mmHg. In der Plateau-Hyperkapnie-Gruppe stieg sie von  $53 \pm 6 \%$  auf  $64 \pm 4 \%$ . Der Anstieg war in beiden Gruppen gegenüber der *steady-state*-baseline-Messung statistisch signifikant.

Dieser Effekt wurde auch in einer weiteren Untersuchung dieser Arbeitsgruppe untersucht, bei der durch eine Blutentnahme eine Hypovolämie induziert wurde (26). Dazu wurden 5 Hunde unter Allgemeinanästhesie (Einleitung mit  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Propofol, Aufrechterhaltung mit Sevofluran bei 3,0 % endtidaler Konzentration und einer MAC von 1,5 %, Relaxation mit  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

Rocuronium) und mechanischer Beatmung ( $FiO_2$  0,3,  $V_T$  12,5 ml·kg<sup>-1</sup>) nach einer 30-minütigen baseline-Messung (etCO<sub>2</sub> von 35 mmHg) randomisiert und wiederholt den folgenden Experimenten unterzogen: Das Schädigungsmodell basierte zunächst auf Induktion einer Hypovolämie durch Blutentnahme. Hier erfolgte die Messung des Einflusses der Hypovolämie auf die mikrovaskuläre Oxygenierung (Kontrollgruppe, KON). Dazu verglichen wurde die prophylaktische (PRO) und therapeutische (THE) Hyperkapnie durch Reduzierung der Atemfrequenz. Im prophylaktischen Arm der Studie wurde zuerst die Hyperkapnie und dann die Hypovolämie initiiert. Im therapeutischen Arm erfolgte zunächst die Induktion der Hypovolämie und erst danach die Induktion der therapeutischen Hyperkapnie. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass eine Hyperkapnie die durch eine Blutung verursachte Verschlechterung der gastral-mikrovaskulären Oxygenierung abmildert. Dabei reduzierte sich wie erwartet die mikrovaskuläre Oxygenierung bei Hypovolämie signifikant in der Kontrollgruppe. In der PRO-Gruppe fand sich durch Hyperkapnie nur ein geringer, nicht-signifikanter Effekt auf die mikrovaskuläre Oxygenierung, während sich die  $\mu HbO_2$ -Werte in der THE-Gruppe durch Hyperkapnie auf baseline-Niveau erholten ohne dabei Signifikanzniveau zu erreichen. Ob nun die lokale pCO<sub>2</sub>-Erhöhung oder die entstehende Azidose oder ein anderer Mechanismus für diesen Effekt verantwortlich war, blieb unklar (26).

Auch eine andere Gruppe fand ähnliche Ergebnisse. So konnten Akca et al. 2002 an gesunden, freiwilligen Probanden zeigen, dass die subkutane Sauerstoffsättigung ( $p_{sq}O_2$ ) gemessen am Oberarm linear mit steigendem  $p_aCO_2$  zunimmt (27).

Insgesamt zeigen die dargestellten Studien, dass Hyperkapnie positive Effekte auf die Gewebsoxygenierung besitzen könnte und somit möglicherweise von therapeutischem Nutzen ist.

### **Effekte auf die Immunfunktion**

Neben den Effekten auf die Gewebsoxygenierung wurde eine Reihe weiterer Effekte der Hyperkapnie beobachtet. Darunter sind auch einige Studien, die den Einfluss auf die Immunfunktion untersucht haben. Eine Hyperkapnie modulierte eine Reihe verschiedener Bestandteile des Immunsystems, darunter Zytokine, die Funktion der Neutrophilen und die adaptive Immunantwort. Diesem Effekt scheint vor allem die Azidose zu Grunde zu liegen. Häufig lässt sich allerdings ein Effekt nicht eindeutig allein dem CO<sub>2</sub> oder der Azidose zuschreiben (28,29).

In einer *in vitro* Studie produzierten isolierte Makrophagen aus dem Bauchfell der Maus bei Inkubation in einer 100 % CO<sub>2</sub> -Atmosphäre signifikant weniger *TNF* und *IL-1* als Antwort auf *LPS* im Vergleich zu Makrophagen, die in Luft oder 100 % Helium inkubiert wurden. Allerdings lag bei einer 100 %-igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre der zytosolische pH-Wert bei 6,1, sodass die Aussagekraft für die *in vivo* Übertragung sehr gering ist (30). In einer weiteren *in vitro* Studie wurden Endothelzellen unter normokapnischen und hyperkapnischen Bedingungen *LPS* ausgesetzt und die Aktivierung des

Transkriptionsfaktors *NFκB* gemessen. Es muss erwähnt werden, dass die hyperkapnische Atmosphäre zu 10 % aus CO<sub>2</sub>, 21 % aus O<sub>2</sub> und der Rest aus Stickstoff zusammengesetzt war. Dabei wurde die *LPS*-induzierte *NFκB*-Aktivierung durch Hyperkapnie deutlich abgeschwächt (31). Interessanterweise scheint es sogar einen direkten Effekt auf die Freisetzung inflammatorischer Zytokine in Vollblutproben zu geben, die unter hypokapnischen bzw. hyperkapnischen Bedingungen inkubiert wurden. Dazu wurden venöse Blutproben von gesunden, freiwilligen Probanden jeweils unter einer hypokapnischen (2 % CO<sub>2</sub>), normokapnischen (5 % CO<sub>2</sub>) sowie hyperkapnischen Atmosphäre (7 % CO<sub>2</sub>) für 24 h bei 37 °C mit und ohne Endotoxin-Stimulation gelagert. Dabei verringerten sich die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine *TNF-α*, *IL-1β* und des antiinflammatorischen Zytokins *IL-10* unter hyperkapnischen Bedingungen signifikant gegenüber normokapnischen und hypokapnischen Bedingungen (32). Auch ein weiterer wichtiger Bestandteil unseres Immunsystems, das Komplementsystem, scheint durch eine Azidose, wie sie ungepuffert auch bei der Hyperkapnie auftritt, beeinflusst zu werden. In einer *in vitro* Studie konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Komplementfaktoren *C3a* und *C5a* unter azidotischen Bedingungen signifikant höher war. Dazu wurden Blutproben gesunder Probanden jeweils mit Salzsäure oder Milchsäure versetzt bzw. einer hyperkapnischen Atmosphäre ausgesetzt. In allen genannten Gruppen kam es dadurch zur signifikant vermehrten Komplementaktivierung (33). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Hecke et al. (34).

Insgesamt zeigen die genannten Studien, dass die Hyperkapnie auf viele Teile des Immunsystems Einfluss zu nehmen scheint, auch wenn in vielen Fällen die Mechanismen unklar bleiben. Es existieren Hinweise, dass diese Effekte über das CO<sub>2</sub> selbst oder auch über die CO<sub>2</sub>-induzierte Azidose vermittelt werden könnten.

### **1.2.3 Effekte unter septischen Bedingungen: Hyperkapnie und Sepsis**

Die genannten Effekte der Hyperkapnie machen sie zu einem interessanten klinischen Instrument. So interessiert die klinische Forschung dabei vor allem, ob diese Effekte therapeutisch genutzt werden können. Vorstellbar ist, dass die Verbesserung der Gewebsoxygenierung bzw. das Abmildern der Minderoxygenierung sowie der Verlauf einer Infektion über Modulierung der Immunantwort durch Hyperkapnie beeinflusst werden können. Daher liegt es nahe, bei einem Krankheitsbild mit hoher Morbidität und Mortalität wie der Sepsis, bei der es u.a. durch Zentralisation und inflammatorische Prozesse zur Destruktion von Gewebe und Dysfunktion von Organen bis hin zum Organversagen kommt, die potenziell positiven Effekte der Hyperkapnie weiter zu untersuchen und möglicherweise in der Therapie einzusetzen.

Klinische Untersuchungen zur Hyperkapnie und Sepsis sind allerdings rar. Häufig handelt es sich um tierexperimentelle Untersuchungen, deren Ergebnisse nur schwer und in Teilaspekten auf die klinische Routine übertragen werden können. Costello et al. konnten in einer experimentellen Studie

an Sprague Dawley-Ratten zeigen, dass eine hyperkapnische Azidose den systemischen Blutdruck während der Frühphase einer durch *colon ligation puncture* (CLP) induzierten Sepsis stabilisieren kann (35). Wang et al. zeigten bereits zuvor, dass eine akute Hyperkapnie, ähnlich wie die Anwendung positiv-inotroper Substanzen, den systemischen Blutdruck stabilisieren kann. Dazu wurde Schafen 1,5 g pro kg Körpergewicht Stuhl in die Bauchhöhle injiziert, um eine Peritonitis und einen daraus resultierenden septischen Schock zu induzieren. Verglichen wurden eine Hyperkapnie-Gruppe (CO<sub>2</sub> wurde dem Atemgasgemisch hinzugefügt, Ziel-p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> von 55-65 mmHg), eine Dobutamingruppe (7 µg/kg/min) und eine Kontrollgruppe. Hyperkapnie hatte ähnliche Effekte auf die hämodynamischen Variablen und den Laktatspiegel wie Dobutamin. Gleichzeitig verbesserte Hyperkapnie die Gewebsoxygenierung stärker als Dobutamin (36). Zu ähnlichen Ergebnissen führte auch eine Studie aus unserer Arbeitsgruppe. Diese konnte zeigen, dass ein hyperkapnisches Beatmungsregime den Abfall der Sauerstoffkonzentration im Gewebe des Splanchnikusgebiets verhindert, der in septischen Tieren unter normokapnischer Beatmung beobachtet wurde (37).

Zusammenfassend gibt es eine Reihe von Faktoren, die durch eine Hyperkapnie beeinflusst werden können. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind zum größten Teil noch unverstanden. Dennoch gibt es genügend Hinweise darauf, dass die Hyperkapnie einen (therapeutischen) Nutzen bei septischen Patienten besitzen könnte. Daher ist es naheliegend, den Einfluss der Hyperkapnie auf Marker der Sepsis in verschiedenen Organen zu untersuchen.

### **1.3 Marker der Sepsis**

#### **1.3.1 Hämoxygenase-1**

Die Hämoxygenase (*HO*) ist ein evolutionsgeschichtlich hoch konserviertes Enzym, das bei fast allen Lebewesen nachweisbar ist und im menschlichen Körper ubiquitär vorkommt. Es findet sich vorwiegend intrazellulär am endoplasmatischen Retikulum (38). *HO* katalysiert den ersten, geschwindigkeitslimitierenden Schritt des Häm-Abbaus. Die Produkte dieser Reaktion sind äquimolare Mengen von Kohlenmonoxid (CO), Eisen (Fe<sup>2+</sup>) und *Biliverdin IX $\alpha$*  (39).

Die Produkte der Hämoxygenase-Reaktion scheinen viele protektive Effekte zu besitzen. Biliverdin besitzt unter anderem antivirale Potenz und antioxidative Eigenschaften (40,41). In einem weiteren Schritt wird es über die Biliverdinreduktase in den Gallenfarbstoff Bilirubin umgewandelt, dem selbst ebenfalls antioxidative Effekte zugeschrieben werden (38,40,42). Bilirubin und Biliverdin scheinen darüber hinaus auch zytoprotektive Effekte zu besitzen (43,44). Weitere Hinweise auf protektive Effekte des Bilirubins liefert eine klinische Studie. Hier konnte gezeigt werden, dass eine höhere Konzentration an Gesamtbilirubin mit einem verringerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei Männern assoziiert ist, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen bisher unklar sind (45). Auch Eisen scheint protektive Effekte hervorrufen zu können. Freies Eisen selbst besitzt oxidierende Eigenschaften. Es bindet an das eisenbindende Protein Ferritin und ist in der Lage, die

Bildung von Ferritin zu induzieren. Ferritin wiederum ist ein wirksames Antioxidant (46–49), sodass das Eisen über diesen Weg protektive Effekte hervorruft.

Ein weiteres Produkt der Hämoxigenasereaktion ist Kohlenmonoxid (CO). CO ist vor allem bekannt als farbloses Gas, das bei der unvollständigen Verbrennung organischer Substanzen entsteht. Durch Bindung an den roten Blutfarbstoff Hämoglobin im Blut entsteht *Carboxyhämoglobin (CO-Hb)*. Die Folgen sind die Reduktion der Sauerstofftransportkapazität, die Hemmung der *Zytochrom-C-Oxidase* der Atmungskette und konzentrationsabhängige Vergiftungserscheinungen, die zum Tode führen können (38). Gleichzeitig wird CO aber auch endogen durch die *Hämoxigenase* gebildet. Endogen gebildetes CO aktiviert die lösliche *Guanylatzyklase (sGC)* und führt auf diese Weise zur Bildung des *second messenger* zyklisches Guanosinmonophosphat (*cGMP*). Somit fungiert CO ähnlich wie Stickstoffmonoxid (NO) als intrazelluläres Signalmolekül (42,50–52).

Bisher sind drei Isoformen der *Hämoxigenase* bekannt, wovon zwei im menschlichen Organismus nachgewiesen sind (*HO-1* und *HO-2*). Eine dritte Isoform (*HO-3*) ist bisher nur in der Ratte beschrieben (53,54). Die *HO-2* wird in vielen verschiedenen Geweben konstitutiv exprimiert. Eine hohe Aktivität der *HO-2* findet man in Hoden, ZNS, Leber, Niere und im Darm (52). Die *HO-1* ist eine induzierbare Isoform der *Hämoxigenase*, wobei in Geweben mit blutabbauender Aktivität, also vor allem in Leber, Milz, Knochenmark und im retikulendothelialen System, auch eine basale *HO-1* Expression existiert. Die *HO-1* wird durch verschiedene endogene und exogene Stimuli induziert (42,53–55). Dazu gehören z.B. Hypoxie und Hyperoxie (56), Ischämie/Reperfusion (57) und inflammatorische Zytokine (58–60).

Es gibt einige Hinweise darauf, dass die *HO-1* auch eine protektive Rolle bei der Sepsis besitzt. So konnte in einer experimentellen Studie an Ratten gezeigt werden, dass eine durch *LPS*-Injektion induzierte Endotoxämie zu einer größeren Schädigung des oberen Intestinaltrakts führt, wenn die Aktivität der *HO-1* durch Zinn-Mesoporphyrin gehemmt wird. Dabei erzeugte die intraperitoneale *LPS*-Injektion einen deutlichen Anstieg der *HO-1 mRNA* in den Mukosaepithelzellen von Duodenum und Jejunum, was ihren Induktionscharakter widerspiegelt (61). Weitere protektive Effekte der *HO-1* wurden auch für weitere Organe und Organsysteme wie z.B. für das respiratorische System (62,63) und die Niere (64) beschrieben. Ebenso gibt es aber auch positive Effekte bei einigen Erkrankungen, darunter die Atherosklerose (65) und Magengeschwüre (66).

### **1.3.2 Stickstoffmonoxid und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase**

Bereits 1980 postulierten Furchgott und Zawadzki, dass Endothelzellen einen labilen Faktor freisetzen, der glatte Muskelzellen in den Gefäßen relaxiert (67). Später konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Faktor um Stickstoffmonoxid (NO) handelt. NO ist ein kleines, bioaktives Molekül, das aufgrund seiner Größe in kurzer Zeit Biomembranen via Diffusion passieren kann. Als wichtiger *second messenger* bewirkt es in den Zellen eine Aktivierung der zytosolischen

Guanylatzyklase, welche eine Bildung von *cGMP* aus *GTP* bewirkt. Erhöhte *cGMP*-Spiegel bewirken eine Veränderung der Proteinphosphorylierung sowie eine Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration durch erhöhten Kalziumausstrom und vermehrte Kalziumspeicherung im endoplasmatischen Retikulum. Diese Mechanismen führen zu einer Relaxation von glatten Muskelzellen, wie sie auch in den Wänden der Blutgefäße enthalten sind und somit letztlich zur Vasodilatation (68,69). Weiterhin wirkt es als Neurotransmitter und beeinflusst das Immunsystem sowie die Hämostase (70).

NO wird durch das Enzym *NO-Synthase (NOS)* gebildet. Dabei wird NO in verschiedenen Zellen produziert, dazu gehören das Gefäßendothel, die Makrophagen und die Neutrophilen. Es existieren drei bekannte Isoformen der NOS. Darunter die zwei konstitutiven, Calcium-abhängigen Isoformen *eNOS (endotheliale NOS)* und die *nNOS (neuronale NOS)*. Eine dritte, induzierbare und Calcium-unabhängige Isoform ist die *iNOS*. Sie wird durch verschiedene Signale und Mediatoren in vielen Zelltypen induziert. Hierzu gehören vor allem Zytokine und inflammatorische Mediatoren (8). Die *iNOS* wird als Reaktion auf eine Inflammation *de novo* synthetisiert und kann auch über längere Zeit größere Mengen NO bilden (71).

Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), die über die NADPH-Oxidase gebildet werden, führen mit NO zur Bildung reaktiver Stickstoffspezies, wie Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ). Diese tragen, genauso wie ROS, zur Abwehr von Bakterien bei. Gleichzeitig kann dieser Prozess aber auch zu Gewebeerstörungen, vermehrter vaskulärer Permeabilität und Organschäden führen. Somit scheint NO eine Rolle bei der Entwicklung septischer Organschäden im Sinne eines *MODS* zu spielen. Es gibt Hinweise darauf, dass NO selbst auch die Funktionen der Leukozyten bzw. der Neutrophilen beeinflusst (8).

### **1.3.3 Mikro-RNA**

Mikro-RNAs sind eine Familie von RNAs, die zwischen 21 bis 25 Nukleotiden umfassen. Diese nicht kodierenden RNA-Abschnitte regulieren in einer sequenzspezifischen Art und Weise die Genexpression. Sie werden zunächst im Zellkern als *pri-miRNA* aus der DNA transkribiert. Während der weiteren Reifung wird zunächst mit Hilfe einer RNase-III namens *Drosha* die *pre-miRNA* gebildet. Sie hat eine Länge von etwa 70 Nukleotiden. Mit Hilfe des Transportproteins *Exportin 5* erfolgt die Translokation vom Nukleus ins Zytoplasma. Hier findet die weitere Reifung der *pre-miRNA* zur *miRNA* statt. Dies geschieht mit Hilfe einer weiteren RNase-III, die *Dicer* genannt wird. Das Produkt ist zunächst eine *ds-miRNA* bestehend aus einem reifen *miRNA*-Strang sowie dem komplementären *miRNA\**-Strang. Letztlich bindet der reife *miRNA*-Strang an den *RNA-induced silencing complex (RISC)*. Dieser Komplex hemmt dann entweder die Translation oder sorgt für eine *mRNA* Spaltung. Auf diese Weise wird die Genexpression mit Hilfe der *miRNAs* reguliert (72).

## Die Micro-RNA-223 und ihre Rolle in der Immunantwort

In den letzten Jahren wurden viele *miRNAs* entdeckt und charakterisiert. Für den Menschen sind mittlerweile über 1.880 *miRNAs* bekannt (73) und können in einer Online-Datenbank unter [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org) eingesehen werden. Die in dieser Arbeit untersuchte Micro-RNA 223 (*miR-223*) wird von Zellen der myeloischen Reihe gebildet und scheint u.a. die Differenzierung und Proliferation von Neutrophilen negativ zu regulieren, in dem der Transkriptionsfaktor *Mef2c* herunter reguliert wird. *Mef2c* ist ein bekannter Promoter der Proliferation myeloischer Progenitorzellen (74). Studien konnten z.B. zeigen, dass ein Ischämie/Reperfusionsschaden der Leber im Mausmodell die *miR-223* Expression verändert. Die Ischämie der Leber führte dabei zu einem Anstieg der *miR-223* Expression und korrelierte positiv mit der Schwere des Schadens (75). Beim hepatozellulären Karzinom (*HCC*) konnten Wong et al. zeigen, dass die Entstehung eines *HCC* mit einem verringerten *miR-223* Serumlevel assoziiert ist (76). Wang et al. haben 2010 untersucht, in wie fern sich unter anderem die *miR-223* als Biomarker der Sepsis eignet. Dabei konnten sie zeigen, dass der *miR-223* Serumspiegel septischer Patienten signifikant niedriger ist als bei einer gesunden Kontrollgruppe und bei Patienten mit *SIRS*. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die *miR-223* daher sogar ein geeigneter Parameter sein könnte, um zwischen *Sepsis* und *SIRS* zu differenzieren (77). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die *miR-223* an der Immunregulation auch während einer Sepsis beteiligt sein könnte. Eine Studie von Benz et al. konnte 2015 jedoch zeigen, dass *miR-223*-Serumspiegel weder das Bestehen einer Sepsis noch das klinische Outcome der Patienten belegen können (78). Diese widersprüchlichen Ergebnisse sind auch abseits der Sepsis zum Beispiel beim *HCC* und bei der chronischen Hepatitis C zu beobachten. Eine Erklärung liegt sicherlich in den unterschiedlichen Studiendesigns, den verschiedenen Normalisierungsmethoden und in bisher unbekanntem Mechanismen, die die *miR-223*-Konzentration beeinflussen können (79).

### 1.3.4 Interleukin-6

*Interleukin-6 (IL-6)* ist bekannt als klassischer Aktivator einer Akute-Phase-Reaktion (80). Die zellulären Antworten auf *IL-6* sind abhängig vom Rezeptor und seiner Untereinheit. *IL-6* führt an seinem *IL-6-Rezeptor (IL-6R)* zu einer Homodimerisierung von *gp130*. Dabei existiert neben einer membranständigen Form auch ein löslicher Rezeptor (*sIL-6R*). Die Signaltransduktion läuft im Weiteren über Janus-Kinasen, die bei Ligandenbindung durch Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert werden. Auf der zytoplasmatischen Seite erfolgt die Assoziation mit *STAT1* und *STAT3* und anschließende Phosphorylierung. Die *STAT*-Dimere translozieren in den Zellkern, binden an entsprechende Enhancer-Regionen verschiedener Zielgene und beeinflussen so deren Transkription. Die *gp130*-Domäne aktiviert außerdem die *Ras/Raf/MAPK*-Kaskade und greift somit in Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung ein (70). Die Signaltransduktion der löslichen Rezeptorform wird auch als *IL-6-trans-Signalling* bezeichnet.

Über diese beschriebenen Wege werden *IL-6* proinflammatorische und antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (81). Gebildet wird *IL-6* vor allem von Monozyten und Makrophagen z.B. bei Infektionen, nach Traumata bzw. Gewebeerletzungen, durch Entzündungen und Verbrennungen. Es bewirkt vor allem in der Leber die Bildung von Akute-Phase-Proteinen und führt zur Entwicklung von Fieber. Neuere Untersuchungen zeigen, dass *IL-6* auch eine wichtige Rolle im Übergang einer Immunantwort vom angeborenen auf das erworbene Immunsystems spielt (80). Es gibt Hinweise darauf, dass *IL-6* dabei auch ein prognostischer Indikator für das Outcome bei schwerer abdomineller Sepsis sein könnte und möglicherweise zwischen überlebenden und nicht-überlebenden Patienten differenzieren kann (82,83). Die Unterscheidung zwischen einer systemischen Entzündungsreaktion im Sinne eines *SIRS* und einer Sepsis mit nachgewiesener Infektion ist von hoher klinischer Relevanz. Hier könnte sich *IL-6* (gemeinsam mit anderen Parametern) als diagnostisches Tool eignen, um ein *SIRS* von einer Sepsis zu unterscheiden (84).

### 1.3.5 Interleukin-10

Bei einer Sepsis laufen neben den initialen proinflammatorischen Reaktionen auch antiinflammatorische Vorgänge ab. Diese antiinflammatorische Antwort wird auch als Kompensationsmechanismus angesehen, der die ablaufende proinflammatorische Immunantwort begrenzen soll. Ein zu den antiinflammatorischen Mediatoren gehörendes Zytokin ist *Interleukin-10 (IL-10)*.

*IL-10* wird von verschiedenen Zellen exprimiert und sezerniert. Dazu gehören unter anderem T-Zellen, Monozyten bzw. Makrophagen, dendritische Zellen und Epithelzellen. Die Steuerung der Expression ist komplex. Vor allem die proximalen Zytokine der Entzündungsantwort wie *TNF- $\alpha$*  und *IL-1* werden als primäre Induktoren der *IL-10*-Synthese angesehen. *IL-10* wirkt auf verschiedene

andere Immunzellen, zu denen vor allem B-Zellen, natürliche Killerzellen, zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen sowie Mastzellen und Granulozyten gehören. (85,86)

Eine der Funktionen von *IL-10* ist die Aufrechterhaltung der Homöostase einer Entzündungsreaktion. Grad und Dauer der Entzündungsreaktion werden durch *IL-10* kontrolliert. Weiter konditioniert *IL-10* die Aktivierung des angeborenen und Antigen-spezifischen Immunsystems und besitzt die Fähigkeit, spezifisch die Expression proinflammatorischer Gene zu blockieren. (87)

Die über *IL-10* in Gang gesetzte Signaltransduktion verläuft ähnlich wie die von *IL-6*. Auch hier handelt es sich um eine *JAK-STAT*-Kaskade, an deren Anfang die Bindung von *IL-10* an den *Interleukin-10-Rezeptor (IL10-R)* steht. Der *Interleukin-Rezeptor* besteht aus zwei Ketten, die mit *IL10-R1* und *IL10-R2* bezeichnet werden. Vor allem die Aktivierung der *IL10-R1*-Kette ist für die weitere Signaltransduktion verantwortlich. Im weiteren Verlauf erfolgt dann zunächst die *JAK* Aktivierung und letztlich die *STAT* Phosphorylierung und Translokation. Dadurch werden weitere Downstream-Aktivitäten in Gang gesetzt. Hierzu zählen z.B. die Induktion der *HO-1*, deren Produkten, wie beispielweise CO, immunsuppressive Funktionen und die Regulation der Antigenpräsentation zugeschrieben werden (88). Weiterhin gibt es Hinweise, dass *IL-10* nicht nur die Zytokinproduktion von Monozyten bzw. Makrophagen moduliert, sondern direkt auf die Funktion von Neutrophilen einwirkt (87).

Es gibt Evidenz dafür, dass Neutrophile von Gesunden nicht auf *IL-10* reagieren, wohingegen Neutrophile septischer Patienten sehr wohl eine Reaktion auf *IL-10* zeigen. Man konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass bei Gesunden lediglich die *IL10-R2*-Kette des *Interleukin-Rezeptors* exprimiert wird, während Neutrophile septischer Patienten zusätzlich *IL10-R1* aufweisen (89).

*IL-10* ist bei Patienten mit Sepsis erhöht und die Konzentration spiegelt häufig die Schwere des inflammatorischen Prozesses wider. So ist die Konzentration bei Patienten mit septischem Schock höher als bei Patienten mit Sepsis ohne Schock. Dabei korreliert der *IL-10*-Spiegel streng mit den zirkulierenden *TNF- $\alpha$*  Serumkonzentrationen, einem weiteren wichtigen Marker der Sepsis (85,86,90).

### **1.3.6 Tumornekrosefaktor- $\alpha$**

Der *Tumornekrosefaktor- $\alpha$*  (*TNF- $\alpha$* ) gehört zu den pro-inflammatorischen Zytokinen. Er spielt, gemeinsam mit *IL-1*, eine Schlüsselrolle in der Pathogenese eines septischen Schocks. *TNF- $\alpha$*  spielt eine wesentliche Rolle bei der Wirtsantwort. In der Folge kommt es zur Induktion anderer Zytokine, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Nekrose und Apoptose. Außerdem gilt er als der Prototyp eines gewebezerstörenden Zytokins und wird vor allem von aktivierten Makrophagen, Lymphozyten, natürlichen Killerzellen sowie Epithelzellen gebildet. *TNF- $\alpha$*  gehört zur *Tumornekrosefaktor-Superfamilie*, zu der neben dem hier besprochenen *TNF- $\alpha$*  auch *Lymphotoxin- $\alpha$*  (*LT- $\alpha$* ) und

*Lymphotoxin- $\beta$  (LT- $\beta$ )* gehören. Es existieren zwei *TNF-Rezeptoren (TNFR)*: Der *TNF-Rezeptor-1 (TNFR1)* und *TNF-Rezeptor-2 (TNFR2)*. Man nimmt an, dass der größte Teil der biologischen *TNF*-Aktivität durch den *TNFR1* initiiert wird. Es existieren verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden, die an ihrem Ende hauptsächlich entweder zur Induktion einer Inflammation führen, antiapoptotische Effekte hervorrufen oder die Apoptose initiieren. Im ersten Fall verläuft die Signalkaskade über den *TNF-receptor-associated factor (TRAF)* und führt letztlich über *NF $\kappa$ B* zur Expression inflammatorischer und/oder antiapoptotischer Gene. Im zweiten Fall setzt sich die Signalkaskade nach Ligandenbindung intrazellulär über eine *death domain (DD)* fort. Sie führt über die Caspase-Kaskade zur Apoptose. (91,92)

### **Tumornekrosefaktor- $\alpha$ als Sepsismarker**

In der Vergangenheit wurde *TNF- $\alpha$*  als Sepsismarker evaluiert, da er eine zentrale Stellung bei inflammatorischen Prozessen einnimmt. Dazu wurde eine Reihe von Parametern wie klinisches Outcome, Prognose-Scores und weitere Zytokine und Enzyme miteinander verglichen. Konsens dieser Untersuchungen ist, dass *TNF- $\alpha$*  nicht als alleiniger Sepsismarker geeignet ist und andere Parameter wie z.B. das *Procalcitonin (PCT)* sensitiver und spezifischer sind (93–97). Es zeigte sich aber, dass *TNF- $\alpha$*  sich eignet, um Fälle mit eher tödlichem Ausgang vorherzusagen (94).

Auch bei neonatalen bzw. pädiatrischen Patienten eignet sich *TNF- $\alpha$*  nicht als alleiniger Sepsismarker. Kumar et al. postulieren aber, dass die Kombination aus positiver Blutkultur und erhöhten *TNF- $\alpha$* -Werten ein effizienter Prognosefaktor zu sein scheint. Für Ihre Untersuchung postulieren sie einen *TNF- $\alpha$* -cutoff-Wert von  $\geq 50$  pg/ml für eine Sepsisdiagnose. *TNF- $\alpha$* -Werte können ihrer Ansicht nach (noch vor Erhalt mikrobiologischer Resultate der Blutkultur) einen Hinweis auf das Vorliegen einer Bakteriämie liefern (97).

## 2 Fragestellung

Die Sepsis ist ein Krankheitsbild mit großer klinischer Bedeutung. Die Inzidenz ist steigend und die Mortalität bleibt trotz vieler medizinischer und wissenschaftlicher Fortschritte mit rund 50 % auf einem hohen Niveau. Septische Veränderungen lassen sich in vielen Organen nachweisen, weshalb der Tod meist in Folge eines *MOV* eintritt. Diesem Stadium voraus gehen *MODS* und systemische Veränderungen der Vitalparameter. Septische Patienten sind häufig beatmungspflichtig. Unter früher üblichen Beatmungsformen kam es häufig zu Ventilator-assoziierten Lungenschäden (*VALI*). Akute Lungenschäden (*acute lung injury, ALI*) und das *ARDS* werden heutzutage durch permissive Hyperkapnie, einer lungenprotektiven Beatmungsform, erfolgreich unterstützend behandelt und das Outcome dieser Patienten wird dadurch signifikant verbessert. Die Hyperkapnie wirkt dabei immunmodulierend auf *ALI* und *ARDS*. Die Effekte einer Hyperkapnie scheinen vor allem durch die Modulation inflammatorischer Prozesse vermittelt zu werden. Daher könnte die permissive Hyperkapnie die bei einer Sepsis durch inflammatorische Prozesse auftretenden Organveränderungen abmildern oder möglicherweise vollständig verhindern.

Vorhergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine *colon ascendens stent peritonitis- (CASP-)* Operation bei der Ratte reproduzierbar zu einer Induktion einer moderaten polymikrobiellen Sepsis führt, die systemisch mit gesteigerten Plasmazytokinspiegeln und lokal mit einem Anstieg der *Myeloperoxidase- (MPO-)* Aktivität der Leber einhergeht (37). Weiter konnte gezeigt werden, dass der bei septischen Tieren unter normokapnischer Beatmung beobachtete Abfall der mikrovaskulären Oxygenierung der Darmschleimhaut durch Hyperkapnie verhindert werden konnte, ohne dass sich dies in der systemischen Zytokinantwort widerspiegelte. Die Plasmaspiegel der zirkulierenden pro- und antiinflammatorischen Zytokine blieben auch nach 2 Stunden Hyperkapnie unmoduliert (37).

Unklar ist bisher, ob die durch die *CASP*-Operation induzierte Sepsis auch zu lokalen Veränderungen von Markern führt. Daher haben wir im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Veränderungen durch Sepsis und bzw. oder Hyperkapnie auch auf lokaler Ebene in *Caecum*, Leber und Lunge auftreten.

Das *Caecum* ist in dieser Untersuchung der Ort der Sepsisinduktion durch die *CASP*-Operation und daher als Ursprung der Sepsis von Interesse. Von hier breitet sich das zunächst lokale Entzündungsgeschehen weiter aus und führt letztlich zu einer systemischen Infektion im Sinne einer Sepsis. Die im portalvenösen Netz nachgeschaltete Leber ist als lebenswichtiges Stoffwechselorgan die nächste Station. Sie spielt bei der Produktion vieler Proteine und damit auch von Adaptermolekülen des Immunsystems sowie bei der Produktion von Gerinnungsfaktoren eine wesentliche Rolle. Daher sind septische Veränderungen an dieser Stelle von zentraler Bedeutung. Und zuletzt interessieren uns die Veränderungen in der Lunge, die als lebenserhaltendes Organ als erstes die Veränderungen durch hyperkapnische Beatmung erfährt.

Es war daher das Ziel der vorliegenden Arbeit, die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Führt eine durch *CASP*-Operation induzierte Sepsis zu Veränderungen der Expression ausgewählter Marker einer Entzündungs- und Stressreaktion in den Organen *Caecum*, Leber und Lunge verglichen mit scheinoperierten Kontrollen? Insbesondere sind die Marker Hämoxygenase-1, induzierbare NO-Synthase, Mikro-RNA 223, *Interleukin-6* und *Interleukin-10* sowie der *Tumornekrosefaktor- $\alpha$*  von Interesse.
2. Welchen Einfluss hat eine zusätzliche akute Hyperkapnie auf die lokale Entzündungs- und Stressantwort und damit auf die Expressionsmuster zuvor genannten Marker?

In der vorliegenden Arbeit wurden im etablierten *CASP*-Modell der Sepsis an der Ratte untersucht, in wie fern sich die Expressionsmuster ausgewählter Entzündungs- und Stressantwortparameter während einer Sepsis verändern. Dazu wurde die Expression von *mRNA* der jeweiligen Marker und von Mikro-RNA mittels quantitativer PCR untersucht. Mittels Western-Blot erfolgte die Untersuchung der Proteinexpression einiger Marker. Außerdem wurden im *Caecum* die vorhandenen Entzündungszellen durch Anfärben und Auszählen quantitativ erfasst. Mit diesen Methoden wurde weiter untersucht, ob die lokale Zytokin- und Enzym-Antwort der Gewebe von *Caecum*, Leber und Lunge mit Hilfe von akuter, permissiver Hyperkapnie zu beeinflussen ist. Möglicherweise könnte die akute Hyperkapnie septische Organveränderungen abmildern oder sogar verhindern.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterial

|   |   |
|---|---|
| <b>NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer</b>   | Thermo Scientific (Wilmington, USA)   |
| <b>Eismaschine</b><br>AF 80   | Scotsman Ice Systems, (Vernon Hills Illinois, USA)  |
| <b>Elektrophoresekammer</b><br>Agarose Gel Kammern PM-Serie   | LTF Labortechnik (Wasserburg, Deutschland)  |
| <b>Filterpapier</b><br>Whatman Chromatography Paper   | Whatman, GE Healthcare (München, Deutschland)   |
| <b>Folie für 96-Well-Platten</b>  | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)   |
| <b>Gel-Auswertungssoftware</b><br>GelScan 6.0   | Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)  |
| <b>Geldokumentationscomputer</b><br>Kamera, PC, Software, Dunkelkammer                                | Dunkelkammer: DeVision (Decon Science Tec, Hohengandern, Deutschland)<br>Kamera: Coolsnap HQ2 (Photometrics, Tucson, USA)<br>Software: GelPro Analyzer v6.0.0.349 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA) |
| <b>Heizblock</b><br>Neo Block Heizer Duo 2-2504   | neoLab (Heidelberg, Deutschland)  |
| <b>Lichtmikroskop</b><br>Leica DMLB   | Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)  |
| <b>Microplate Reader</b><br>Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader<br>Gen5™ Datenanalyse-Software     | BioTek Instruments GmbH (Bad Friedrichshall, Deutschland)   |
| <b>Mikrowelle</b><br>NN-T251W   | Panasonic (Hamburg, Deutschland)  |
| <b>PCR Wellplatten</b><br>96 Well Multiply® PCR Plate   | Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)   |
| <b>PVDF-Membran für Western-Blot</b><br>Immobilon-P   | EMD Millipore Corporation (Billerica, USA)  |
| <b>Realtime Cycler</b><br>7300 Realtime PCR System<br>Software: 7300 Sequence Detection Software v1.4 | Applied Biosystems (Lincoln, USA)   |
| <b>Stromnetzteil für Elektrophoresekammer</b><br>Consort E143   | Sigma (München, Deutschland)  |
| <b>Thermocycler</b><br>C1000™   | BIO-RAD (München, Deutschland)  |

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| <b>Vortexgerät</b><br>Vortex Genie Mixer 1   | Scientific Industries (New York, USA) |
| <b>Waage</b><br>LA230S   | Sartorius (Göttingen, Deutschland)    |
| <b>Western-Blot-Kit</b><br>Mini-Protean 3 (Transfer-Kammer, Gel-Kassette, Fiberpad, Kühlelement) | BIO-RAD (München, Deutschland)        |
| <b>Zentrifugen</b><br>Klein: Eppendorf 5417R<br>Groß: Eppendorf 5810R                            | Eppendorf (Hamburg, Deutschland)      |

### 3.2 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 2: Chemikalien und Lösungen

|   |   |
|---|---|
| <b>100 % Ethanol</b>  | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)          |
| <b>2-Mercaptoethanol</b>                                    | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)                            |
| <b>3-MOPS</b> (Pufferan® $\geq 99\%$ )                      | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)          |
| <b>Agarose</b><br>Agarose NEEO Ultra-Qualität; Roti®agarose | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)          |
| <b>APS (= Ammoniumpersulfat)</b>                            | Sigma-Aldrich (Sigma, München, Deutschland)               |
| <b>Bromphenolblau Na-Salz</b>                               | Merck (Darmstadt, Deutschland)                            |
| <b>Chloralhydrat</b>  | Merck (Darmstadt, Deutschland)                            |
| <b>Chloroform</b>   | VWR International S.A.S. (Fontenay-sous-Bois, Frankreich) |
| <b>Complete</b><br>Protease Inhibitor Cocktail Tablets      | Roche Diagnostics (Risch, Schweiz)                        |
| <b>Coomassie Brilliant Blue</b>                             | Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)      |
| <b>Diethylpyrocarbonat (DEPC)</b>                           | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)          |
| <b>Dimethylformamid</b>                                     | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)                 |
| <b>DTT (= 1,4-Dithiothreitol)</b>                           | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)          |
| <b>EDTA</b>   | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)                 |
| <b>EDTA-Na-Salz</b>   | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)                 |

|  |  |
|--|--|
| <b>Essigsäure (= Eisessig), 100 % wasserfrei</b> | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)                      |
| <b>Ethanol unvergällt, 75 %</b>                  | Zentralapotheke (Universitätsklinikum Düsseldorf, Deutschland) |
| <b>Ethidiumbromid</b>                            | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)                      |
| <b>Formaldehyd, 37 %</b>                         | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                 |
| <b>Formamid</b>                                  | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)               |
| <b>Glycerol</b>                                  | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)                      |
| <b>Glycerol (for molecular biology)</b>          | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)                      |
| <b>Glycin</b>                                    | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)               |
| <b>Hämatoxylin</b>                               | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)                      |
| <b>HCl (Chlorwasserstoff, Salzsäure)</b>         | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)               |
| <b>High Capacity RNA-to-cDNA MasterMix</b>       | Art.-Nr. 4390778 – Applied Biosystems (Lincoln, USA)           |
| <b>Isopropylalkohol</b>                          | Zentralapotheke (Universität Düsseldorf, Deutschland)          |
| <b>Kaliumaluminiumsulfat</b>                     | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                 |
| <b>Kaliumnatriumtartrat</b>                      | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                 |
| <b>Krist. Citronensäure</b>                      | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                 |
| <b>Kupfersulfat</b>                              | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                 |
| <b>Milchpulver Blotting grade</b>                | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)               |
| <b>Natriumcarbonat</b>                           | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                 |
| <b>Natriumchlorid</b>                            | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                 |
| <b>Natriumhydroxid</b>                           | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                 |
| <b>Natriumjodat</b>                              | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                 |
| <b>Nonidet™ P40</b>                              | Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)                                 |
| <b>Pararosanilin</b>                             | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)                      |
| <b>SDS (= Sodiumdodecylsulfat)</b>               | Merck (Darmstadt, Deutschland)                                 |

|  |  |
|--|--|
| <b>Sigma 7-9</b>   | Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)     |
| <b>Natriumacetat</b>   | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)            |
| <b>Stickstoff, flüssig</b>   | Linde (Duisburg, Deutschland)                        |
| <b>TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x), No AmpErase® UNG</b>  | Art.-Nr. 4352042 – Applied Biosystems (Lincoln, USA) |
| <b>TaqMan® Gene Expression MasterMix</b>   | Art.-Nr. 4369016 – Applied Biosystems (Lincoln, USA) |
| <b>TaqMan® MicroRNA Reverse-Transkriptions-Kit</b> , enthält: <ul style="list-style-type: none"> <li>• dNTP Mix</li> <li>• Multiscribe RT Enzyme</li> <li>• 10x RT Buffer</li> <li>• RNase Inhibitor (20U/µl)</li> </ul> | Art.-Nr. 4366596 – Applied Biosystems (Lincoln, USA) |
| <b>Temed (= Tetramethylethylendiamin)</b>  | Merck (Darmstadt, Deutschland)                       |
| <b>Tris HCL (Trizma)</b>   | Sigma Ultra (Sigma, München, Deutschland)            |
| <b>TRizol® Reagent</b>   | Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA)               |
| <b>Tween</b>   | Merck (Darmstadt, Deutschland)                       |
| <b>Western Blotting Luminol Reagent sc-2048</b><br>Chemilumineszenz Reagenz  | Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)           |
| <b>Xylol</b>   | Merck (Darmstadt, Deutschland)                       |

### 3.3 Primer / Assays / Antikörper / Marker

Tabelle 3: Primer / Assays / Antikörper / Marker

|  |   |
|--|---|
| <b>Anti-Actin</b>                                  | Produkt-Nr. A 2066 – Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), 1:10000                                  |
| <b>Anti-HO1 – polyklonaler Antikörper, Rabbit</b>  | Produkt-Nr. SPA-895 – Stressgen Bioreagents (Victoria, Canada), 1:5000                        |
| <b>Anti-iNOS – polyklonaler Antikörper, Rabbit</b> | Produkt-Nr. KAS-NO001 – Stressgen Bioreagents (Victoria, Canada), 1:1000                      |
| <b>Donkey Anti-Rabbit IgG</b>                      | Produkt-Nr. 711-035-152 – Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (Newmarket, UK), 1:10.000 |
| <b>GAPDH</b>                                       | Assay ID: Rn01462661_g1 – Applied Biosystems (Carlsbad, USA)                                  |

|  |  |
|--|--|
| <b>HO-1</b>  | Assay ID: Rn01536933_m1 – Applied Biosystems (Carlsbad, USA)     |
| <b>IL-10</b>   | Assay ID: Rn00563409_m1 – Applied Biosystems (Carlsbad, USA)     |
| <b>IL-6</b>  | Assay ID: Rn01410330_m1 – Applied Biosystems (Carlsbad, USA)     |
| <b>miR-223</b>   | Artikel.-Nr. #000526 – Applied Biosystems (Carlsbad, USA)        |
| <b>NOS-2 (iNOS)</b>  | Assay ID: Rn00561646_m1 – Applied Biosystems (Carlsbad, USA)     |
| <b>Proteinmarker</b><br>Prestained Protein Molecular Weight Marker | Produkt-Nr. 26612 – Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA) |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>                                     | Assay ID: Rn00562055_m1 – Applied Biosystems (Carlsbad, USA)     |
| <b>U6</b>  | Artikel.-Nr. #001973 – Applied Biosystems (Carlsbad, USA)        |

### 3.4 Lösungen

#### 3.4.1 Allgemeine Lösungen

Tabelle 4: Allgemeine Lösungen

|  |  |
|--|--|
| <b>Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung - PBS (0,15 mol/l, pH 7,2)</b> | 8,0 g/l Natriumchlorid<br>0,2 g/l Kaliumchlorid<br>1,16 g/l Di-Natriumhydrogenphosphat<br>0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat |
| <b>TAE Stocklösung (pH 8,4-8,5)</b>                                  | 0,04 M Sigma 7-9 (MG 121,14)<br>0,001 M EDTA Na-Salz (MG 416,2)<br>Eisessig<br>Wasser ad 1000 ml, dann autoklavieren       |

#### 3.4.2 Lösungen für RNA-Isolierung

Tabelle 5: Lösungen für RNA-Isolierung

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>1 x FA gel running buffer</b> | 100 ml 10x FA gel buffer<br>20 ml 37 % Formaldehyd<br>880 ml DEPC-Wasser   |
| <b>10 x FA gel Puffer (pH 7)</b> | 200 mM 3-MOPS (free acid) (MG: 209,26)<br>50 mM Natrium Acetat (MG: 82,03)<br>10 mM EDTA (MG: 292,2 g)<br>in 1000 ml DEPC-Wasser |

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>Ethidiumbromidlösung</b>     | 5 mg/ml in autoklaviertem PBS  |
| <b>Loading Puffer</b>           | 0,75 ml Formamid<br>0,15 ml 10x FA-Puffer<br>0,24 ml Formaldehyd<br>0,1 ml H <sub>2</sub> O<br>0,1 ml Glycerol<br>0,06 ml Bromphenolblau 1 % |
| <b>Tris HCL, (10 mM pH 7,5)</b> | 0,01 M Tris HCL (MG: 157,6)<br>Wasser ad 1000 ml, dann autoklavieren   |

### 3.4.3 Lösungen für ASD-Färbung

Tabelle 6: Lösungen für ASD-Färbung

|  |   |
|--|---|
| <b>ASD-A (Pararosanilin-HCl 4 %)</b>   | 0,5 g Pararosanilin<br>10 ml Aqua dest.<br>2,5 ml HCl 37 %<br>unter Erwärmung lösen<br>filtrieren<br>bei 4 °C dunkel aufbewahren  |
| <b>ASD-B (Natriumnitrit 4 %)</b>       | 0,1 g Natriumnitrit<br>2,5 ml Aqua dest.  |
| <b>ASD-C (Naphtol-ASD-Chloracetat)</b> | 1 g Naphtol-ASD-Chloracetat<br>10 ml Dimethylformamid<br>Lagerung bei -20 °C  |
| <b>ASD</b>                             | 400 µl ASD-A<br>1200 µl ASD-B in Küvette zusammengeben,<br>1 Minute stehen lassen, Lösung sollte gelb<br>werden (sonst ggf. ASD-B zugeben)<br>200 ml PBS zugeben<br>pH auf 6,3 einstellen<br>400 µl ASD-C zugeben<br>sofort mischen |
| <b>Hämatoxylin nach Mayer</b>          | 1 g Hämatoxylin<br>1000 ml Aqua dest.<br>erwärmen zum Lösen<br>0,2 g Na-Jodat<br>50 g Ka-Al-Sulfat<br>50 g Chloralhydrat<br>1 g kristalline Citronensäure<br>Filtrieren, dunkel aufbewahren   |

### 3.4.4 Lösungen für Ganzzelextraktion

Tabelle 7: Lösungen für Ganzzelextraktion

|                                  |  |  |
|----------------------------------|--|--|
| <b>Lysepuffer (100 ml)</b>       | 10 mM<br>1 mM<br>400 mM<br>10 %<br>0,5 % | Sigma 7-9 pH 8 (MG 121,4)<br>Na-EDTA (MG 416,2)<br>NaCl (MG 58,44)<br>Glycerol<br>NP40                                     |
|                                  |  | DTT und Complete vor Gebrauch frisch zugegeben:<br>40 µl/ml Complete<br>1 mM DTT (MG 154,25)<br>1 µl 1 M Stocklg. auf 1 ml |
| <b>SDS-Stopp-Puffer (100 ml)</b> | 125 mM<br>3 mM<br>20 %<br>9 %<br>0,05 %  | Sigma 7-9 pH 6,8 (MG 121,4)<br>Na-EDTA (MG 416,2)<br>Glycerol<br>SDS<br>Bromphenolblau                                     |

### 3.4.5 Lösungen für PAA-Gele des Western-Blot

Tabelle 8: Lösungen für PAA-Gele des Western-Blot

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>1,5 M Sigma 7-9, pH 8,8</b>  | 54,51 g Sigma 7-9 (= Tris BASE)<br>auf 300 ml mit Aqua dest. auffüllen (etwas Platz für HCl lassen)<br>pH 8,8 mit HCl (10 N) einstellen<br>im Kühlschrank lagern |
| <b>1,25 M Sigma 7-9, pH 6,8</b> | 15,14 g Sigma 7-9 (= Tris BASE)<br>auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen (etwas Platz für HCl lassen)<br>pH 6,8 mit HCl (10 N) einstellen<br>im Kühlschrank lagern |
| <b>10 % SDS</b>                 | 5 g SDS (= Sodiumdodecylsulfat)<br>auf 50 ml mit Aqua dest. auffüllen<br>zum Lösen evtl. leicht erwärmen   |
| <b>10 % APS</b>                 | 1 g APS (= Ammoniumpersulfat)<br>10 ml Aqua dest. hinzugeben<br>im Kühlschrank lagern (bis zu drei Wochen)   |

Tabelle 9: Chemikalien für Trenngel

| <b>Trenngel (2 Gele)</b> | <b>10 %</b> | <b>7,5 %</b> |
|--------------------------|-------------|--------------|
| PAA 30 %                 | 6,6 ml      | 5 ml         |
| Aqua dest.               | 8,2 ml      | 9,8 ml       |
| 1,5 M Sigma 7-9, pH 8,8  | 5 ml        | 5 ml         |
| SDS 10 %                 | 200 µl      | 200 µl       |
| Temed                    | 20 µl       | 20 µl        |
| APS 10 %                 | 100 µl      | 100 µl       |

Tabelle 10: Chemikalien für Sammelgel

| <b>Sammelgel (2 Gele)</b> |         |
|---------------------------|---------|
| PAA 30 %                  | 2,55 ml |
| Aqua dest.                | 10,5 ml |
| 1,25 M Sigma 7-9, pH 6,8  | 1,5 ml  |
| SDS 10 %                  | 150 µl  |
| Temed                     | 30 µl   |
| APS 10 %                  | 150 µl  |

### 3.4.6 Lösungen für Elektrophorese und Transfer des Western-Blot

Tabelle 11: Lösungen für Elektrophorese und Transfer des Western-Blot

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Tris-HCl, pH 6,8</b>     | 15,8 g Tris-HCl (= 500 mM)<br>200 ml Aqua dest.<br>mit NaOH (5 N) pH auf 6,8 einstellen  |
| <b>Tris-HCl, pH 7,4</b>     | 15,8 g Tris-HCl (= 500 mM)<br>200 ml Aqua dest.<br>mit NaOH (5 N) pH auf 7,4 einstellen  |
| <b>Loading Buffer</b>       | 7 ml Aqua dest.<br>1 ml 500 mM Tris-HCl, pH 6,8 (s.o.)<br>2 ml Glycerol<br>1 g SDS<br>30 mg Bromphenolblau (= 0,5 %)<br>1:10 mit Mercaptoethanol mischen |
| <b>Running Buffer (10x)</b> | 30 g Sigma 7-9   |

|   |   |
|---|---|
|   | 144 g Glycin<br>10 g SDS<br>1 l Aqua dest.<br>zum Lösen von SDS leicht erwärmen   |
| <b>Transfer Buffer (1x)</b>   | 1,2 g Sigma 7-9 (12 mM)<br>7,2 g Glycin (96 mM)<br>1000 ml Aqua dest.   |
| <b>Coomassie Staining</b>   | 750 mg Coomassie Blue<br>25 ml Eisessig<br>112,5 ml Ethanol<br>112,5 ml Aqua dest.<br>nach Mischen der Lösung unter Abzug filtrieren      |
| <b>Blotto 5 %</b><br>(= Blocking Solution - zur Absättigung unspezifischer Bindungen) | 50 g Dried skimmed milk<br>1000 ml TBS-T  |
| <b>Blotto 1 %</b>   | Blotto 5 % 1:5 mit TBS-T (pH 8,0) verdünnen<br>Aliquots à 20 ml bei -20 °C einfrieren.<br>Blotto 1 % zur Verdünnung der Antikörper nutzen |
| <b>BSA 5 %</b>  | 50 g BSA<br>ad 1000 ml in TBS-T (pH 8,0)  |
| <b>TBS-T (=TPBS)</b>  | 6 g Sigma 7-9<br>22,2 g NaCl<br>2 ml Tween<br>auf 2 l mit Aqua dest. auffüllen<br>pH 8,0  |

### 3.4.7 Lowry Reagenzien und Lösungen

*Tabelle 12: Lowry Reagenzien und Lösungen*

|                  |   |
|------------------|---|
| <b>Reagenz A</b> | 10 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 500 ml 0,1 M NaOH lösen<br>0,1 M NaOH (MG 40 g/mol) |
| <b>Reagenz B</b> | 2 g KNa-Tartrat ad 100 ml Aqua dest.  |
| <b>Reagenz C</b> | 1 g Cu-Sulfat (CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O)<br>ad 100ml Aqua dest.               |
| <b>Lösung 1</b>  | 20 ml Reagenz A<br>200 µl Reagenz B<br>200 µl Reagenz C<br>⇒ (100:1:1 = A:B:C)              |
| <b>Lösung 2</b>  | 5 ml Folins-Reagenz + 5 ml Aqua dest.   |

## 4 Methoden

### 4.1 Sepsisinduktion durch CASP-Operation

Die in dieser Arbeit von mir untersuchten Gewebe stammen aus dem Tierversuchsvorhaben mit dem AZ 8.87-50.10.34.08.266 (Genehmigung LANUV). Die Tierexperimente wurden nicht von mir selbst, sondern von der erfahrenen Tierärztin Dr. med. vet. Charlotte Kolodzey, geb. Stübs in standardisierter Weise durchgeführt. Zum besseren Verständnis der Studie wird das experimentelle Protokoll kurz beschrieben.

Zur Sepsisinduktion wurde das im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie etablierte *CASP*-Modell verwendet. Dazu wurden männliche Wistar-Ratten (Gewicht  $341 \pm 66$  g) einer *CASP*- oder *Sham*-Operation unterzogen.

Zunächst wurden die Tiere randomisiert zwei *Sham*-Gruppen und zwei Sepsis-Gruppen zugeordnet. Die *Sham*- und die Sepsis-Gruppe wurden jeweils in eine Normokapnie- und eine Hyperkapnie-Gruppe unterteilt.

Anschließend erfolgte die Durchführung des operativen Eingriffs. Dazu wurden die Tiere zunächst unter Allgemeinanästhesie (3,0 – 3,2 % Sevofluran,  $F_iO_2$  0,5) laparotomiert. Die Analgesie erfolgte mit  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Buprenorphin subkutan. Anschließend wurde ein Stent (18 G) in die Colonwand eingesetzt, sodass eine offene Verbindung zwischen Abdomen und Cololumen entstand (vgl. Abbildung 1). Bei den Tieren der *Sham*-Gruppe wurde der Stent lediglich auf die *Tunica serosa* der Darmwand genäht, ohne eine Perforation zu erzeugen. Im Anschluss erfolgte der chirurgische Bauchwandverschluss. Die Analgesie wurde 12 Stunden nach Narkoseende mit  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Buprenorphin wiederholt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

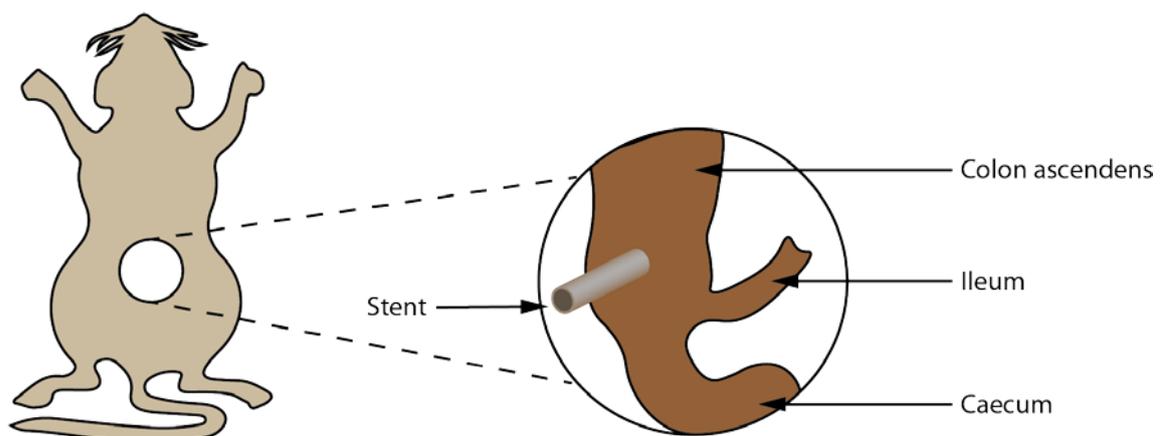


Abbildung 1: Schematische Darstellung des colon ascendens stent peritonitis-Modells (*CASP*) zur Induktion einer Sepsis, modifiziert nach (98)

24 Stunden nach Durchführung der *CASP*- bzw. *Sham*-Operation wurden die Tiere erneut anästhesiert und relaparotomiert. Die Anästhesie wurde mit  $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  Pentobarbital intraperitoneal

durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere auf einer Heizplatte gelagert, um die Körpertemperatur während der Untersuchungen konstant zu halten. Die Beatmung der Tiere erfolgte über einen volumen-kontrollierten und drucklimitierten Beatmungsmodus (Atemfrequenz, kurz AF = 70 min<sup>-1</sup>, V<sub>T</sub> = 1,8 – 2,5 ml, Atemwegsdruck, kurz P<sub>AW</sub> < 170 cmH<sub>2</sub>O). Dabei wurde zunächst die Normokapnie mit einem pCO<sub>2</sub> 45 ± 5 mmHg bei einem Ziel pO<sub>2</sub> > 90 mmHG aufrechterhalten. Das inspiratorische Gasgemisch bestand aus 30 % O<sub>2</sub> und 70 % N<sub>2</sub> (Linde, Leuna, Deutschland). Über die *V. jugularis externa* wurden 10 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> Pentobarbital in 4 ml·h<sup>-1</sup> Ringer Lösung und 2 mg Pancuronium alle 2 Stunden verabreicht.

Nach der Laparotomie wurde zunächst das *Colon* mobilisiert und eine Sonde zur Messung der μHbO<sub>2</sub>-Konzentration atraumatisch auf die Colonwand im Mittel 2 cm distal der Ileozökalklappe aufgebracht. Die Sonde und der Operationssitus wurden mit einer Gaze zur Verhinderung einer Dehydratation abgedeckt. Nach 30 min Baseline-Messung wurde die Intervention (Normokapnie bzw. Hyperkapnie) eingeleitet. Zur Induktion der Hyperkapnie wurde dem zur Beatmung verwendeten Gasgemisch 10 % CO<sub>2</sub> beigemischt (CO<sub>2</sub> 10 %, O<sub>2</sub> 30 %, N<sub>2</sub> 60 %). Der Ziel-pCO<sub>2</sub> lag bei 75 ± 5 mmHg. Die Normokapnie-Gruppe wurde unverändert weiterbeatmet, hier lag der Ziel pCO<sub>2</sub> weiter bei 45 ± 5 mmHg.

Zu den Zeitpunkten 0 und 120 Minuten wurden jeweils 1 ml Blut für Zytokinmessungen und zu den Zeitpunkten -60, -30, 0, 30 und 60 Minuten wurden jeweils 120 μl Blut zur Blutgasanalyse entnommen. Zeitpunkt 0 markiert den Beginn der Intervention (Normokapnie / Hyperkapnie). Der Flüssigkeitsverlust wurde jeweils mit 4 ml Ringer Lösung ausgeglichen. Weiter wurden die Parameter der μHbO<sub>2</sub>-Messung sowie die Herz-Kreislaufparameter und der etCO<sub>2</sub> kontinuierlich gemessen. Diese Untersuchungen zur Mikrozirkulation sind Gegenstand der Dissertation von Frau Charlotte Kolodzey (Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2014).

Nach insgesamt 120 min wurde den Tieren in tiefer Narkose Gewebe (Leber, Lunge, *Caecum*) entnommen, wovon ein Teil nativ in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert wurde. Von den verschiedenen Darmabschnitten wurden weiterhin Proben in Paraffin für weitere Untersuchungen fixiert.

Die durch unsere Mitarbeiterin Dr. med. vet. Charlotte Kolodzey bei diesen Untersuchungen (37) gewonnenen Organe und Gewebe sind die Grundlage für die vorliegende Arbeit.

## **4.2 Realtime-PCR**

### **4.2.1 RNA-Isolierung**

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den gewonnenen Gewebeproben wurden jeweils etwa 50 mg der Probe verwendet. Das Gewebe wurde mit einem Potter pulverisiert und mit 500 μl TRIzol® Reagent versetzt. Das Gemisch wurde mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert und 5 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Dem homogenisierten Gewebe wurden 0,1 ml Chloroform zugegeben und es wurde für 15 sek handgeschüttelt sowie weitere 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation mit 15.300 g bei 4 °C (Eppendorf 5417R, Hamburg, Deutschland) kam es zur Bildung von drei Phasen: Einer RNA-enthaltenden Phase oben, einer DNA- und Protein-Phase mittig sowie einer Phenol-Chloroform-Phase unten. Die obere RNA-enthaltende Phase wurde auf ein neues 2 ml Reaktionsgefäß zur weiteren Verarbeitung überführt und die restlichen Phasen wurden verworfen. Zur RNA-enthaltenden Phase wurden 0,25 ml Isopropylalkohol hinzugefügt. Nach Durchmischen wurde erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30-minütigem Zentrifugieren mit 15.300 g bei 4 °C bildete sich ein weißes Pellet. Der flüssige Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 0,5 ml Ethanol 75 % gewaschen. Anschließend folgten Durchmischen und 5-minütiges Zentrifugieren bei 4 °C. Der Waschvorgang wurde zweimal nacheinander durchgeführt. Nach Abpipettieren des flüssigen Überstandes wurde das weiße, RNA-haltige Pellet bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zum Schluss wurde 80 µl 85 °C heißes, RNase freies Wasser hinzugegeben und die Proben gleichmäßig auf drei 100 µl Reaktionsgefäße verteilt und nach RNA-Konzentrationsbestimmung bei -80 °C gelagert. Die RNA-Isolation aus den Geweben wurde auf Eis durchgeführt und erfolgte unter Beachtung von RNase-Freiheit.

#### **4.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA**

Die Konzentration und Qualität der RNA wurden mit Hilfe des Nanodrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) bestimmt, wobei jeweils für 1 µl der Proben die Absorption bei 260 nm (spezifisch für Nukleinsäuren) sowie 280 nm (spezifisch für Proteine) gemessen wurde. Der Quotient 260/280 nm diente dabei als Qualitätsmerkmal. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 wird dabei als ein Indikator für einen hohen Reinheitsgrad der RNA in der Probe angesehen (99).

#### **4.2.3 RNA-Gelelektrophorese**

Um die Integrität der RNA sicherzustellen und damit die Qualität der Isolierung zu evaluieren, wurde im Anschluss an die RNA-Isolierung und RNA-Konzentrationsbestimmung ein Intaktheitsgel für jede Probe durchgeführt. Der Vorgang bestand aus den folgenden Schritten:

1. 1,2 g Agarose  
+ 10 ml 10-fach FA Gel Puffer  
+ 90 ml DEPC Wasser zusammengeben, in der Mikrowelle ca. 3 min aufkochen
2. + 2 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml)  
+ 1,8 ml Formaldehyd 37 % zugeben, mischen
3. Lösung in Gelform füllen, Kamm einsetzen, aushärten lassen
4. Probenvorbereitung  
2,5 µg RNA in 15 µl Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser ansetzen,

- + 3  $\mu$ l Loading Buffer zugeben
- 10 min auf ca. 70 °C erhitzen
- 5. Elektrophoresekammer mit 1-fach FA Running Buffer füllen
- 6. Proben in die Taschen pipettieren
- 7. Elektrophorese von Kathode (schwarz) zu Anode (rot) bei 100 V, ca. 1 h

Eine intakte RNA und ein hoher RNA-Reinheitsgrad spiegeln sich in der Gelelektrophorese durch zwei scharf voneinander abgegrenzte Banden wider (siehe Abbildung 2), die die cytoplasmatische 28 S- und 18 S-RNA eukaryotischer Zellen darstellen (100). Verunreinigungen oder degradierte RNA-Fragmente würden als Schlieren in der Gelelektrophorese erscheinen.

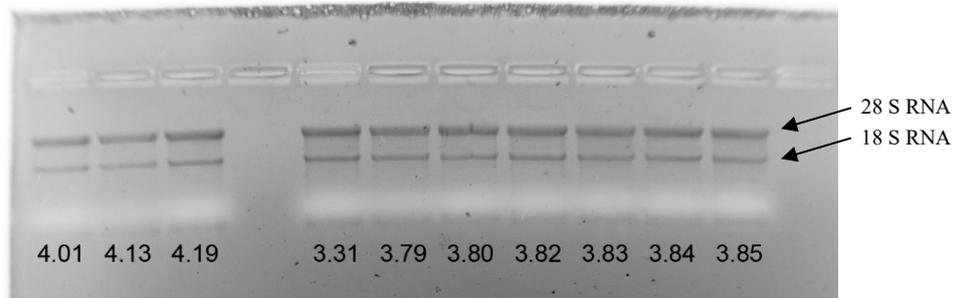


Abbildung 2: Beispiel für ein RNA-Intaktheitsgel

Hier dargestellt sind beispielhaft RNA-Proben aus Lungengewebe. Mit Pfeilen markiert sind die 18 S- und 28 S-ribosomale RNA.

#### 4.2.4 Reverse Transkription

Um mittels Realtime-PCR die Expression der *miRNA* und messenger RNA (*mRNA*) zu quantifizieren, wurde zunächst die aus den Gewebeproben gewonnene RNA in *complementary-DNA* (*cDNA*) umgeschrieben. Dies erfolgte für *mRNA* mit Hilfe des High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix-Protokolls (101) sowie für *miRNA* mit Hilfe des TaqMan® MicroRNA Assay-Protokolls (102). Diese Methoden sind im Folgenden ausführlich beschrieben.

#### Reverse Transkription für mRNA-Untersuchungen

Für die reverse Transkription der *mRNA* wurde die RNA zunächst auf eine Konzentration von 0,0625  $\mu$ g/ $\mu$ l mit 16  $\mu$ l nucleasefreiem Wasser verdünnt. Im Anschluss daran wurden 16  $\mu$ l RNA (entspricht 1  $\mu$ g) und 4  $\mu$ l High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix in ein kleines Reaktionsgefäß pipettiert, gemischt und kurz zentrifugiert. Die reverse Transkription wurde anschließend im Thermocycler (C 1000™ Thermocycler, Bio Rad Laboratories GmbH) mit folgendem, vom Hersteller empfohlenen Protokoll (101) vorgenommen:

*Tabelle 13: Protokoll des Thermocyclers für die reverse Transkription für die mRNA Untersuchungen*

| <b>Zeit (in Minuten)</b> | <b>Temperatur (in °C)</b> |
|--------------------------|---------------------------|
| 5                        | 25                        |
| 30                       | 42                        |
| 5                        | 85                        |
| ∞                        | 12                        |

Die Proben wurden bei  $-80\text{ °C}$  bis zur Durchführung der Realtime-PCR gelagert.

### **Reverse Transkription für miRNA-Untersuchungen**

Für die *cDNA*-Synthese der entsprechenden *miRNA* wurde RNA in einer Konzentration von  $2\text{ ng}/\mu\text{l}$  eingesetzt. Zunächst wurde der Reverse Transkriptase-Master Mix zum Umschreiben einer Probe in *cDNA* hergestellt, der aus folgenden Substanzen bestand:

*Tabelle 14: Chemikalien des Master Mix für die Reverse Transkription der miRNA*

|  |                    |
|--|--------------------|
| <b>100 mM dNTPs</b>  | 0,15 $\mu\text{l}$ |
| <b>MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 50 U/<math>\mu\text{l}</math></b> | 1,00 $\mu\text{l}$ |
| <b>10x Reverse Transkription Puffer</b>                                  | 1,50 $\mu\text{l}$ |
| <b>RNase Inhibitor, 20 U/<math>\mu\text{l}</math></b>                    | 0,19 $\mu\text{l}$ |
| <b>Nuclease-freies Wasser</b>  | 4,16 $\mu\text{l}$ |

Im Anschluss wurden jeweils  $7\text{ }\mu\text{l}$  des Reverse Transkriptase-Master Mixes,  $5\text{ }\mu\text{l}$  der entsprechenden RNA (entspricht  $10\text{ ng}$ ) und  $3\text{ }\mu\text{l}$  des spezifischen Assays (Reverse Transkriptase Primer 5x) in ein kleines Reaktionsgefäß pipettiert, gemischt und kurz zentrifugiert. Jeder Ansatz umfasste somit ein Gesamtvolumen von  $15\text{ }\mu\text{l}$ . Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die reverse Transkription wurde anschließend im Thermocycler (C 1000™ Thermocycler, Bio Rad Laboratories GmbH) mit folgendem, vom Hersteller empfohlenen Protokoll (102) vorgenommen:

*Tabelle 15: Protokoll des Thermocyclers für die reverse Transkription für die miRNA-Untersuchungen*

| <b>Zeit (in Minuten)</b> | <b>Temperatur (in °C)</b> |
|--------------------------|---------------------------|
| 30                       | 16                        |

|          |    |
|----------|----|
| 30       | 42 |
| 5        | 85 |
| $\infty$ | 4  |

Die Proben wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Durchführung der Realtime-PCR gelagert.

#### 4.2.5 quantitative Realtime-PCR mit TaqMan®-Sonde

Die quantitative Realtime-PCR (*qRT-PCR*) ist ein Vervielfältigungsverfahren für Nukleinsäuren, das auf dem Prinzip einer konventionellen PCR beruht. Zusätzlich zur Amplifizierung bietet diese Methode mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung die Möglichkeit der Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit (103).

Der Ablauf einer allgemeinen Polymerase-Kettenreaktion beruht auf einem zyklischen Ablauf von Temperaturänderungen und Vervielfältigung mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Die drei Kernschritte sind das Auftrennen der doppelsträngigen DNA (Denaturierung), das Anlagern von Primern an die nun als Einzelstränge vorliegende DNA (Annealing) sowie die Verlängerung des oligonukleotiden Primers mit Hilfe der Polymerase (Elongation). Bei jedem Durchlauf verdoppelt sich daher (theoretisch) das PCR-Produkt.

Die Primer bestehen aus Basensequenzen, die jeweils spezifisch für den zu untersuchenden DNA-Abschnitt sind. Außerdem liegen zwei gegenläufige Primer-Sequenzen vor, damit das Annealing sowohl am 3'- als auch am 5'-Strang möglich ist.

Bei der *qRT-PCR* Methode kommt eine fluoreszierende Sonde zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurde die *qRT-PCR* mit Hilfe der TaqMan™-Sonde eingesetzt. Die TaqMan™-Sonden sind Oligonukleotide, die spezifisch für die zu untersuchenden *cDNA*-Sequenzen sind. Sie tragen an ihrem 5'-Ende einen *Reporter* und am 3'-Ende einen *Quencher*. Dieses Oligonukleotid bindet spezifisch zwischen Primer und Strangende, dient selbst jedoch nicht als Primer. Die räumliche Nähe von *Reporter* und *Quencher* ist zunächst dafür verantwortlich, dass keine Fluoreszenzaussendung erfolgt. Während des Elongationsprozesses verlängert die Polymerase, vom Primer aus beginnend, den komplementären Strang in 5'-3'-Richtung. Gleichzeitig besitzt die Polymerase eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und baut entsprechende Nukleotide ab, die die weitere Elongation verhindern würden. So wird auch die TaqMan™-Sonde stückweise abgebaut und *Reporter* und *Quencher* entfernen sich räumlich voneinander. Dies bewirkt die Fluoreszenzemission des *Reporters*, die mit Hilfe des Realtime-PCR-Cyclers (7300 Realtime PCR System, Applied Biosystems, Lincoln, USA) detektiert wurde.

Je nach untersuchtem Material (*mRNA* oder *miRNA*) unterscheidet sich der Reaktionsansatz für die *qRT-PCR*. Im Folgenden werden daher die beiden Ansätze getrennt beschrieben:

### Reaktionsansatz für *qRT-PCR* zur Bestimmung der *mRNA* Expression

Jeder Ansatz bestand aus dem MasterMix, dem spezifischen Assay für die Ziel-*mRNA* sowie der Probe bzw. der Negativkontrolle (Wasser):

*Tabelle 16: Chemikalien des Master Mix für die mRNA Expressionsuntersuchung*

|   |            |
|---|------------|
| TaqMan Gene Expression spezifischer Assay 20x                           | 1 $\mu$ l  |
| TaqMan 2x Gene Expression MasterMix                                     | 10 $\mu$ l |
| cDNA der zu untersuchenden Probe bzw. RNase-freies Wasser als Kontrolle | 9 $\mu$ l  |

Zunächst wurden entsprechende Mengen MasterMix und Assay vorbereitet und als Doppelansatz jeweils 11  $\mu$ l pro Probe auf eine 96-Well-Platte (96 Well Multiply® PCR Plate Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Im Anschluss daran wurden jeweils 9  $\mu$ l der verdünnten *cDNA*-Probe bzw. RNase-freies Wasser als Kontrolle hinzu pipettiert. Die optimale Verdünnung der *cDNA* wurde mit Hilfe von Standardkurven vorher festgelegt, um bei der Realtime-PCR eine effektive Probenverdopplung zu erreichen.

Zur späteren Normalisierung der Messwerte wurde ein entsprechender Ansatz mittels *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-* (*GAPDH*-) Assay vorbereitet und angesetzt. Da die Expression von *GAPDH* als Referenzgen unabhängig von einer Intervention bei den Versuchstieren ist, wurde es zur Normalisierung der Messwerte eingesetzt, um interindividuelle Mengenschwankungen zu eliminieren.

### Reaktionsansatz für *qRT-PCR* zur Bestimmung der *miRNA* Expression

Jeder Ansatz bestand aus dem MasterMix, dem spezifischen Assay für die Ziel-*miRNA* sowie der Probe bzw. der Negativkontrolle (Wasser):

*Tabelle 17: Chemikalien des Master Mix für die miRNA Expressionsuntersuchungen*

|  |            |
|--|------------|
| TaqMan MicroRNA Assay 20x                          | 1 $\mu$ l  |
| TaqMan 2x Universal PCR MasterMix, No AmpErase UNG | 10 $\mu$ l |

|   |           |
|---|-----------|
| nuklease-freies Wasser als Kontrolle                                    | 8 $\mu$ l |
| cDNA der zu untersuchenden Probe bzw. RNAse-freies Wasser als Kontrolle | 1 $\mu$ l |

Zunächst wurden die entsprechenden Mengen MasterMix, MicroRNA-Assay und nukleasefreies Wasser vorbereitet und als Doppelansatz jeweils 19  $\mu$ l pro Probe auf eine 96-Well-Platte (96 Well Multiply® PCR Plate Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Im Anschluss daran wurde jeweils 1  $\mu$ l der verdünnten *cDNA*-Probe bzw. RNAse-freies Wasser als Kontrolle hinzu pipettiert. Die optimale Verdünnung der *cDNA* wurde mit Hilfe von Standardkurven vorher festgelegt um bei der Realtime-PCR eine effektive Probenverdopplung zu erreichen.

Zur späteren Normalisierung der Messwerte wurde ein entsprechender Ansatz mittels *U6*-Assay vorbereitet und angesetzt. Die *U6 snRNA (small nuclear RNA)* ist ein kleiner nicht-kodierender RNA-Abschnitt. Da die Expression von *U6* als Referenzgen unabhängig von der Behandlung ist, wird es zur Normalisierung der Messwerte als interne Kontrolle eingesetzt, um interindividuelle Mengenschwankungen zu eliminieren (104,105).

Die jeweils gewählten *cDNA*-Verdünnungen sind in Tabelle 32 im Anhang dargestellt.

### **Amplifikation**

Nach der Vorbereitung der Ansätze wurde die Well-Platte mittels Folie versiegelt und wenige Sekunden bei 11.500 g bei 4 °C zentrifugiert (Eppendorf 5810R, Hamburg, Deutschland). Zur Durchführung der Realtime-PCR wurde die Platte in den Realtime-PCR-Cycler (7300 Realtime PCR System Applied Biosystems, Lincoln, USA) gegeben und die Amplifikation nach dem folgenden Realtime-PCR-Protokoll durchgeführt:

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen für qPCR

| Temperatur<br>(in °C) | Zeit    |
|-----------------------|---------|
| 50                    | 2 min   |
| 95                    | 10 min  |
| 95                    | 15 sek. |
| 60                    | 1 min   |

} 40 Zyklen

#### 4.2.6 Quantifizierung und Auswertung

Nach Ablauf der Realtime-PCR erhält man verschiedene Daten: Neben dem Standardfehler der beiden ermittelten Doppelwerte wird für jede Probe der entsprechende *cycle threshold*, kurz CT-Wert, sowie der Mittelwert der beiden CT-Werte einer Probe angegeben. Beim CT-Wert handelt es sich um die Anzahl der PCR-Zyklen die nötig sind um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Ist die PCR zu 100 % effektiv, verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge.

Generell ist sowohl eine absolute als auch eine relative Quantifizierung des PCR-Produktes möglich. In der vorliegenden Untersuchung wurde die relative Quantifizierung herangezogen. Dabei wurde die Expression des zu untersuchenden Gens auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen, das als Referenzgen bezeichnet wird. Auf diese Weise werden die Expressionsergebnisse normiert, denn Veränderungen der Expression betreffen immer das Zielgen als auch das Referenzgen.

Die mathematische Methode, die dafür verwendet wurde, ist die sog.  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Voraussetzung für die Korrektheit dieser Methode ist eine optimale PCR-Effizienz. Darunter versteht man, dass in jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung des DNA-Produktes stattfindet. In der Praxis werden allerdings in der Regel Effektivitätswerte zwischen 1,5 und 2,0 erreicht. Die Unterschiede in der Effizienz können mathematisch eliminiert werden. Die Effizienzkorrektur wurde mit der Software REST 2009 (relative expression software tool; [www.gene-quantification.de/rest.html](http://www.gene-quantification.de/rest.html)) durchgeführt. Dieses Programm fasst die entsprechenden Gruppen zusammen und bildet gruppenspezifische Mittelwerte (MW). In diesem Fall also vier Gruppen bestehend aus der Kontrollgruppe und der Interventionsgruppe, die jeweils aus einem behandelten und unbehandelten Arm bestanden. Aus den Mittelwerten werden die relativen Expressionsunterschiede (R) errechnet und dabei die Normalisierung auf das Referenzgen und die Varianzen der einzelnen Expressionen mit einberechnet. Die Ergebnisse werden anschließend statistisch ausgewertet und ein entsprechendes Signifikanzniveau (p-Wert) angegeben. Grundlage dieser Berechnung sind die folgenden mathematischen Formeln (106):

$$\Delta CT = CT_{Zielgen} - CT_{Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{Behandlung} - \Delta CT_{Kontrolle}$$

$$R = \frac{(E_{Zielgen})^{CT_{Zielgen}(MW\ Kontrolle - MW\ Behandlung)}}{(E_{Referenzgen})^{CT_{Referenzgen}(MW\ Kontrolle - MW\ Behandlung)}}$$

### 4.3 Histologische Untersuchungsmethoden

#### 4.3.1 ASD-Färbung

Die Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase-Färbung dient dem Nachweis von polymorphkernigen Leukozyten (*PMN*). Diese werden den mononukleären Leukozyten gegenübergestellt, zu denen die Lymphozyten und Monozyten zählen. Zu den *PMNs* zählt man die Granulozyten, deren Hauptzahl die neutrophilen Granulozyten ausmachen. Die Neutrophilen üben über Migration und Phagozytose die erste wichtige Abwehrreaktion aus, weshalb man auch von „der ersten Verteidigungslinie“ oder „der schnellen Eingreiftruppe“ des Immunsystems spricht.

Durch Bakterienbestandteile und Zytokine wie *TNF- $\alpha$*  und *IL-1* werden Neutrophile schnell aktiviert und migrieren aus der Blutbahn ins Gewebe an den Ort der Infektion. In den Granula enthalten die Granulozyten verschiedene bakterizide Enzyme, die der Vernichtung von Bakterien dienen. Dabei spielen sowohl der *oxidative burst* mit Bildung von ROS als auch die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle bei der Abwehr von eingedrungenen Erregern.

Daher ist es von Interesse, das Vorhandensein von *PMNs* direkt im Gewebe nachzuweisen, um eine Aussage über das Ausmaß eines Entzündungsgeschehens machen zu können. *PMNs* lassen sich mit Hilfe der im Folgenden beschriebenen Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase-Färbung (ASD-Färbung) direkt anfärben, können unter dem Lichtmikroskop begutachtet werden und durch Auszählung quantifiziert werden. Die Gewebeproben wurden dafür zunächst in Paraffin fixiert und mit einem Mikrotom wurden 8  $\mu$ m dicke Schnitte erstellt. Anschließend wurde die ASD-Färbung durchgeführt, die folgende Substanzen und Einwirkzeiten umfasst:

- Xylol 8 min, anschließend erneut mit neuem Gefäß
- Xylol 8 min
- 100 % Ethanol 2 min, anschließend erneut mit neuem Gefäß
- 100 % Ethanol 2 min
- 90 % Ethanol 2 min
- 80 % Ethanol 2 min
- 70 % Ethanol 2 min
- Aqua dest. 2 min
- ASD 30 min (auf Schüttler bei Raumtemperatur)
- Hämatoxylin 10 sek.
- Leistungswasser 2 min
- Aqua dest. kurz
- 70 % Ethanol kurz
- 80 % Ethanol kurz
- 90 % Ethanol kurz
- 100 % Ethanol kurz
- Xylol 15 min
- Eindecken mit Deckglas

Färbeergebnis: Neutrophile und ihre Vorstufen werden leuchtend rot dargestellt, die Kerne werden blau gefärbt.

#### **4.3.2 Durchführung der Lichtmikroskopie**

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch systematisches Auszählen von 25 Sichtfeldern pro Präparat. Verwendet wurde ein Lichtmikroskop der Firma Leica (Leica DMLB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Als Vergrößerung wurde Faktor 200 verwendet (20er Objektiv mit 10er Okular). Die Auszählung erfolgte dabei verblindet.

### **4.4 Western-Blot**

#### **4.4.1 Proteinextraktion**

Zur Herstellung der Proteinextrakte wurden zunächst etwa 100 mg der bei der Sektion gewonnenen Gewebe mit dem Metall-Potter pulverisiert und in 1 ml Lysepuffer homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 10 min auf Eis im Lysepuffer inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation (Eppendorf 5810R, Hamburg, Deutschland) bei 4 °C und 16.060 g. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### 4.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Lowry (107) herangezogen. Dabei wurde die unbekannte Konzentration der Probe durch Vergleich mit der bekannten *bovine serum albumin*- (BSA-) Konzentration ermittelt. Folgende Konzentrationen von Rinderserumalbumin wurden verwendet: 0 µg/ml; 12,5 µg/ml; 25 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml; 150 µg/ml; 200 µg/ml. Nach Fertigstellung der Standards wurden diese auf Eis gelagert. Die Proben wurden jeweils 1:100 verdünnt. Für den Ansatz wurden jeweils 100 µl Standard oder verdünnte Probe in Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurden jeweils 500 µl der Lowry-Lösung 1 (siehe Abschnitt 3.4.7, Lowry Reagenzien und Lösungen) hinzupipettiert und gut durchmischt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 50 µl der Lowry-Lösung 2 (siehe Materialteil) hinzugegeben, erneut gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden jeweils zwei Ansätze des Standards und der Proben zur Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte (96 Well Multiply® PCR Plate Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen (Microplate Reader Synergy 2 Multi-Mode und Gen5™ Datenanalyse-Software, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland).

#### 4.4.3 Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe einer Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Proben wurden zunächst 1:2 mit Loading-Buffer verdünnt und 5 min lang bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde neben den Proben zusätzlich ein Marker mit bekanntem Molekulargewicht (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde eine Gleichspannung von 100 V bei 400 mA bei einer Dauer von etwa 85 min verwendet. Tabelle 33 gibt einen Überblick über die für den Nachweis der verschiedenen Proteine verwendeten Trenngele.

#### 4.4.4 Western-Blot

##### Das Prinzip des Western-Blots

Die Methode des Western-Blots dient der Identifizierung und Quantifizierung von spezifischen Proteinen innerhalb eines Proteingemisches aus Lysaten z.B. von Geweben, Serum und Zellkulturen. Zunächst werden die Proteine entsprechend ihrer Molekulargewichte mit Hilfe einer *SDS-PAGE* aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Übertragung und Fixierung der Proteine auf eine *PVDF*- oder Nitrozellulosemembran. Der Nachweis der gesuchten Proteine erfolgt mittels spezifischer Antikörper. An diesen ersten Antikörper wird ein zweiter biotinylierter Antikörper angehängt, der zur Detektion der Proteine dient. Durch Zusatz des *ECL*-Reagenz wird eine Lumineszenz freisetzende, enzymatische Reaktion in Gang gesetzt. Diese Lumineszenz kann entweder mit Hilfe

eines Röntgenfilms oder alternativ – wie in der vorliegenden Untersuchung angewendet – mit einer Kamera und einer entsprechenden Auswertungssoftware detektiert und analysiert werden.

### **Durchführung**

Die hier untersuchten Gewebe stammten aus der Leber, der Lunge sowie dem *Caecum* von Ratten. Der Proteinnachweis im Proteinhomogenisat erfolgte für die Proteine HO-1 und iNOS mittels spezifischer Antikörper im Western-Blot-Verfahren. Dazu wurden die Proteine im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung im Wet-Blot-Verfahren auf eine *PVDF*-Membran (Immobilon-P, EMD Millipore Corporation, Billerica, USA) übertragen. Die Übertragung erfolgte in Form eines „Gel-Sandwiches“ bestehend aus einem Fiberpad (Mini-Protean 3, BIO-RAD, München, Deutschland), drei Filterpapieren (Whatman Chromatography Paper, Whatman/GE Healthcare, München, Deutschland), dem Gel, der Membran, erneut einer Lage Filterpapiere und einem Fiberpad. Hierbei wurden jeweils alle Materialien in einer Wanne mit Transferbuffer feucht gehalten sowie evtl. vorhandene Luftblasen entfernt. Dieses „Gel-Sandwich“ wurde in der Gel-Kassette (Mini-Protean 3, BIO-RAD, München, Deutschland) eingespannt und anschließend in die Transfer-Kammer (Mini-Protean 3, BIO-RAD, München, Deutschland) eingelegt. Dabei wurde die Membranseite des „Sandwiches“ zur Anode hin in die Transfer-Kammer eingelegt, sodass sich die im SDS-Gel negativ geladenen Proteinkomplexe in Richtung Anode und somit in Richtung Blotmembran bewegen konnten. Die Transfer-Kammer wurde in einen mit kaltem Transfer-Puffer gefüllten Tank eingelegt. Zusätzlich wurden ein Kühlelement mit  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sowie ein handelsübliches Magnetrührstäbchen eingebracht und der Tank auf eine Rührplatte gestellt. An den Tank wurde für 60 min eine Stromstärke von 220 mA angelegt. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran in eine 5 % Blocking-Lösung (50 ml Blotto 5 %) gelegt und für 2 h bei Raumtemperatur auf einem handelsüblichen Schüttler inkubiert. Im Anschluss an den Blocking-Vorgang wurde der proteinspezifische Primäantikörper eingebracht. Dieser wurde zuvor nach den Herstellerangaben verdünnt (iNOS 1:1000, HO-1 1:5000). Als Referenzprotein zur Normalisierung wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Der entsprechende Antikörper wurde 1:10.000 verdünnt. Sowohl der *iNOS*- als auch der *HO-1*-spezifische Antikörper wurden in Blotto-1 % verdünnt. Im Anschluss wurde die Membran jeweils für die vom Hersteller empfohlene Dauer im Kühlschrank inkubiert. Nach Entfernung der überschüssigen Primäantikörperlösung wurde die Membran dreimal für 10 min mit eiskaltem TBS-T gewaschen. Danach wurden 2  $\mu\text{l}$  des Sekundäantikörpers mit 10  $\mu\text{l}$  Antibiotin in 20 ml Blotto 1 % nach Herstellerangaben verdünnt und auf die Membran aufgebracht. Der Sekundäantikörper wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abschluss wurde erneut dreimal für jeweils 10 min mit eiskaltem TBS-T gewaschen. Als letzter Arbeitsschritt schloss sich die Detektion mit Hilfe des ECL-Reagenz an (s. Abschnitt 4.4.6, Probenanalyse / Quantifizierung).

#### 4.4.5 Gel-Kontrolle

Damit sichergestellt werden konnte, dass der Proteintransfer vom Gel auf die PVDF-Membran gelungen ist, wurde eine Gel-Kontrolle durchgeführt. Dazu wurde das Gel 30 min in Coomassie Staining-Lösung inkubiert. Daran anschließend folgte die Entfärbung in Leitungswasser über Nacht.

#### 4.4.6 Probenanalyse / Quantifizierung

Um die Detektion durchzuführen, wurde der Blot in ECL-Reagenz übertragen und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die bei der Reaktion zwischen dem am Sekundäntikörper gebundenen Biotin und dem ECL-Reagenz freiwerdende Lumineszenz wurde mit Hilfe einer Kamera (Coolsnap HQ2, Photometrics, Tucson, USA) und der Auswertungssoftware (GelPro Analyzer v6.0.0.349, Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA) detektiert und analysiert. Zur Normierung der Ergebnisse wurde als Referenzprotein *β-Actin* eingesetzt.

#### 4.5 Statistische Auswertung

Die mit Hilfe der Realtime-PCR erhobenen CT-Werte wurden nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet (106). Zwischen den einzelnen Gruppen wurden das Signifikanzniveau, die relative Expression sowie der Standardfehler und das 95%-Konfidenzintervall mit Hilfe der Software REST 2009 (relative expression software tool; [www.gene-quantification.de/rest.html](http://www.gene-quantification.de/rest.html)) bestimmt. Die relative Expression der Gruppe NKSH wurde gleich 1 gesetzt und die übrigen Gruppen darauf bezogen. Für die relative Expression wurde jeweils der Standardfehler angegeben. Als signifikant wurde  $p \leq 0,05$  angesehen.

Zur Normierung der mittels Western-Blot erhobenen Daten wurden zunächst die Quotienten der Proteinmengen aus dem Referenzprotein (*β-Actin*) und dem gesuchten Protein je Probe gebildet. Anschließend wurde der Mittelwert der Proben der jeweiligen Gruppe gebildet. Die auf diese Weise ermittelte mittlere Proteinmenge der Gruppe NKSH wurde gleich 1 gesetzt und die übrigen mittleren Proteinmengen der jeweils anderen drei Gruppen (NKST, HKSH und HKST) darauf bezogen. Auf diese Weise wurde die relative Proteinmenge bezogen auf NKSH ermittelt.

Die statistische Auswertung der mit der ASD-Färbung und den Western-Blots erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe von Sigma Stat (Version 3.5, Statcon, Deutschland). Zur statistischen Erhebung der Daten wurden die Gruppen paarweise mit dem t-Test für normalverteilte bzw. Mann-Whitney-U-Test für nicht-normalverteilte Daten ausgewertet. Aus den im Western-Blot densitometrisch erhobenen Daten wurden die Mittelwerte und Standardfehler ermittelt sowie das Signifikanzniveau zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt. Als signifikant wurde  $p \leq 0,05$  angesehen.

Alle Abbildungen wurden mit Hilfe von Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Caecum

#### 5.1.1 Expression von IL-6 mRNA im Caecum

Bei der Untersuchung des Einflusses der Sepsis auf die *IL-6 mRNA* Expression im *Caecum* unter normokapnischen Bedingungen zeigte sich, dass eine Sepsis keinen Einfluss auf die relative Expression von *IL-6 mRNA* hatte (NKSH:  $1,0 \pm 0,61$ ; NKST:  $0,8 \pm 1,56$ ;  $p = 0,751$ ). Hyperkapnie alleine hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die *IL-6 mRNA* Expression (NKSH:  $1,0 \pm 0,61$ ; HKSH:  $0,9 \pm 0,90$ ;  $p = 0,887$ ). Bei septischen Tieren stellten wir unter Hyperkapnie im Vergleich zur Normokapnie eine Steigerung der relativen *IL-6 mRNA* Expression fest (NKST:  $0,8 \pm 1,56$ ; HKST:  $20,7 \pm 10,79$ ;  $p = 0,002$ ). Unter Hyperkapnie beim Vergleich Sepsis gegen Nicht-Sepsis zeigte sich ebenfalls eine deutliche Erhöhung der relativen *IL-6 mRNA* Expression (HKSH:  $0,9 \pm 0,90$ ; HKST:  $20,7 \pm 10,79$ ;  $p = 0,002$ ). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder die Induktion einer Sepsis noch die Hyperkapnie alleine einen Einfluss auf die *IL-6 mRNA* Expression hatten. Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg bei septischen Tieren unter Hyperkapnie im Vergleich mit normokapnisch beatmeten Tieren.

Tabelle 19: Relative Expression der *IL-6 mRNA* im Caecum

|      | rel. Expr. | SE    | n |
|------|------------|-------|---|
| NKSH | 1,0        | 0,61  | 8 |
| HKSH | 0,9        | 0,90  | 7 |
| NKST | 0,8        | 1,56  | 6 |
| HKST | 20,7       | 10,79 | 6 |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

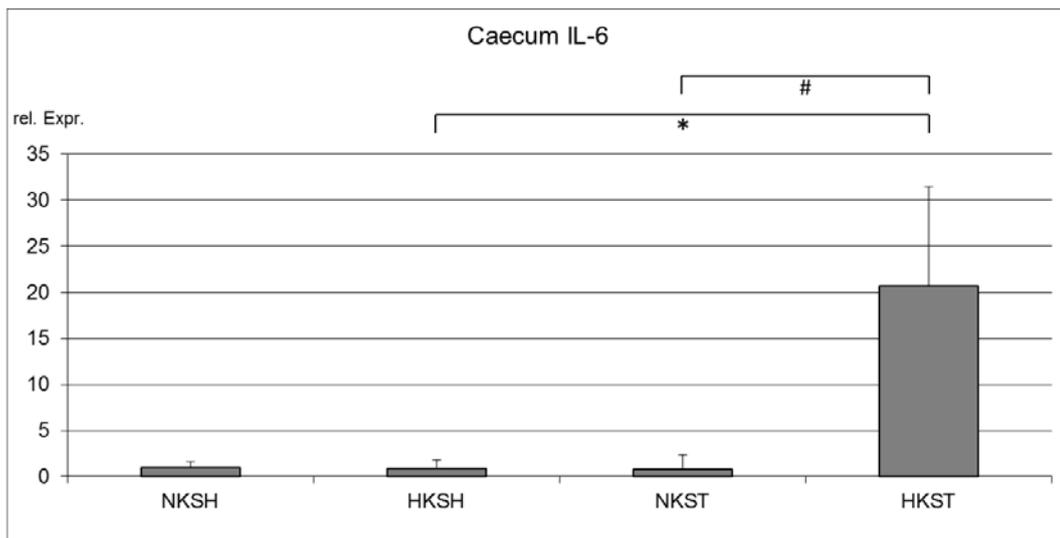


Abbildung 3: Relative Expression von IL-6 mRNA im Caecum.

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

(#) NKST vs. HKST,  $p = 0,002$ ; (\*) HKSH vs. HKST,  $p = 0,002$

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie,  $n = 8$ ; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 7$ ;

NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie,  $n = 6$ ; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 6$ ;

rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

### 5.1.2 Expression von IL-10 mRNA im Caecum

Bei den Untersuchungen der Expression von IL-10 mRNA im Caecum zeigte sich, dass eine Sepsis allein keinen Einfluss auf die Expression von IL-10 mRNA im Caecum hatte (NKSH:  $1,0 \pm 0,33$ ; NKST:  $1,1 \pm 0,59$ ;  $p = 0,769$ ). Auch Hyperkapnie alleine hatte keinen Effekt auf die Expression von IL-10 mRNA im Caecum (NKSH:  $1,0 \pm 0,33$ ; HKSH:  $1,1 \pm 0,41$ ;  $p = 0,759$ ). Die Hyperkapnie führte aber im Vergleich zur Normokapnie bei septischen Tieren zu einer deutlichen Steigerung der IL-10 mRNA Expression im Caecum (NKST:  $1,1 \pm 0,59$ ; HKST:  $6,4 \pm 2,85$ ;  $p = 0,017$ ). Beim Vergleich Sepsis gegenüber Nicht-Sepsis zeigte sich unter hyperkapnischen Bedingungen ebenfalls eine deutliche Steigerung der Expression von IL-10 mRNA (HKSH:  $1,1 \pm 0,41$ ; HKST:  $6,4 \pm 2,85$ ;  $p = 0,004$ ). Auch hier lässt sich festhalten, dass weder Hyperkapnie noch Sepsis alleine die IL-10 mRNA Expression beeinflussten. Unter Hyperkapnie ließ sich bei septischen Tieren ein deutlicher Expressionsanstieg von IL-10 mRNA nachweisen.

Tabelle 20: Relative Expression der IL-10 mRNA im Caecum

|      | rel. Expr. | SE   | n |
|------|------------|------|---|
| NKSH | 1,0        | 0,33 | 8 |
| HKSH | 1,1        | 0,41 | 7 |
| NKST | 1,1        | 0,59 | 6 |
| HKST | 6,4        | 2,85 | 6 |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

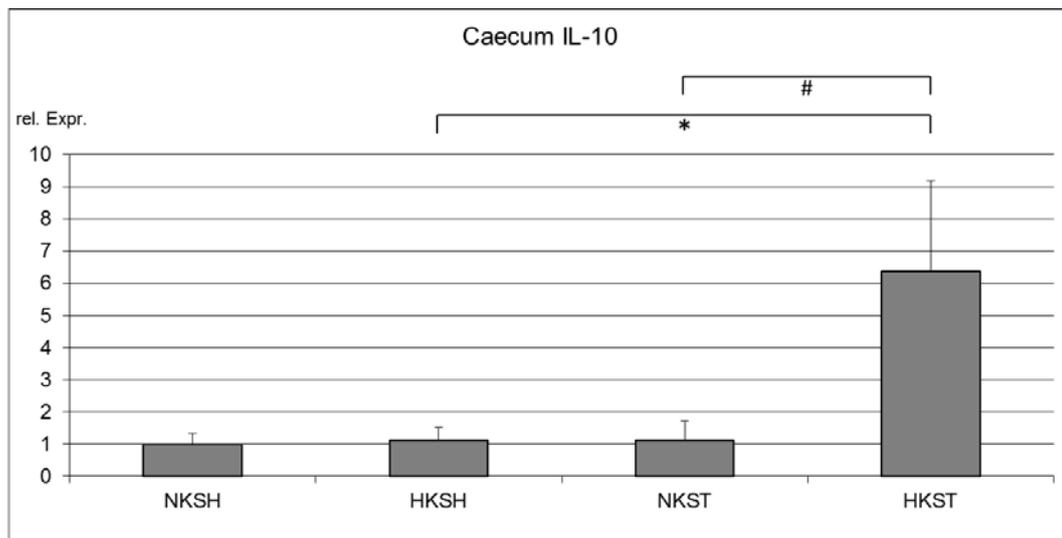


Abbildung 4: Relative Expression von IL-10 mRNA im Caecum

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

(#) NKST vs. HKST,  $p = 0,017$ ; (\*) HKSH vs. HKST,  $p = 0,004$

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie,  $n = 8$ ; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 7$ ;

NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie,  $n = 6$ ; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 6$ ;

rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

### 5.1.3 Expression von iNOS mRNA im Caecum

Für die Untersuchungen der *iNOS mRNA* Expression im *Caecum* zeigten sich analoge Ergebnisse zu den Untersuchungen der *IL-10* und *IL-6 mRNA* Expression im *Caecum*. Sepsis alleine führte nicht zu einer Steigerung der *iNOS mRNA* Expression (NKSH:  $1,0 \pm 0,75$ ; NKST:  $2,4 \pm 0,82$ ;  $p = 0,225$ ). Auch Hyperkapnie alleine führte hier nicht zu einer Steigerung der coecalen *iNOS mRNA* Expression (NKSH:  $1,0 \pm 0,75$ ; HKSH:  $0,8 \pm 0,19$ ;  $p = 0,668$ ). Auch bei der Untersuchung der *iNOS mRNA* Expression ließ sich durch Hyperkapnie während Sepsis ein deutlicher Anstieg der *iNOS mRNA* Expression im *Caecum* nachweisen. (NKST:  $2,4 \pm 0,82$ ; HKST:  $25,5 \pm 9,93$ ;  $p < 0,001$ ). Auch beim Vergleich Sepsis versus Nicht-Sepsis unter Hyperkapnie-Bedingungen zeigte sich eine Steigerung

der *iNOS mRNA* Expression (HKSH:  $0,8 \pm 0,19$ ; HKST:  $25,5 \pm 9,93$ ;  $p < 0,001$ ). Zusammenfassend bleibt auch hier festzuhalten, dass Hyperkapnie und Sepsis alleine jeweils zu keiner Expressionsänderung beitragen konnten. Die Hyperkapnie bei septischen Tieren führte zu einer deutlichen Steigerung der *iNOS mRNA* Expression.

Tabelle 21: Relative Expression der *iNOS mRNA* im Caecum

|      | rel. Expr. | SE   | n |
|------|------------|------|---|
| NKSH | 1,0        | 0,75 | 8 |
| HKSH | 0,8        | 0,19 | 7 |
| NKST | 2,4        | 0,82 | 6 |
| HKST | 25,5       | 9,93 | 6 |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

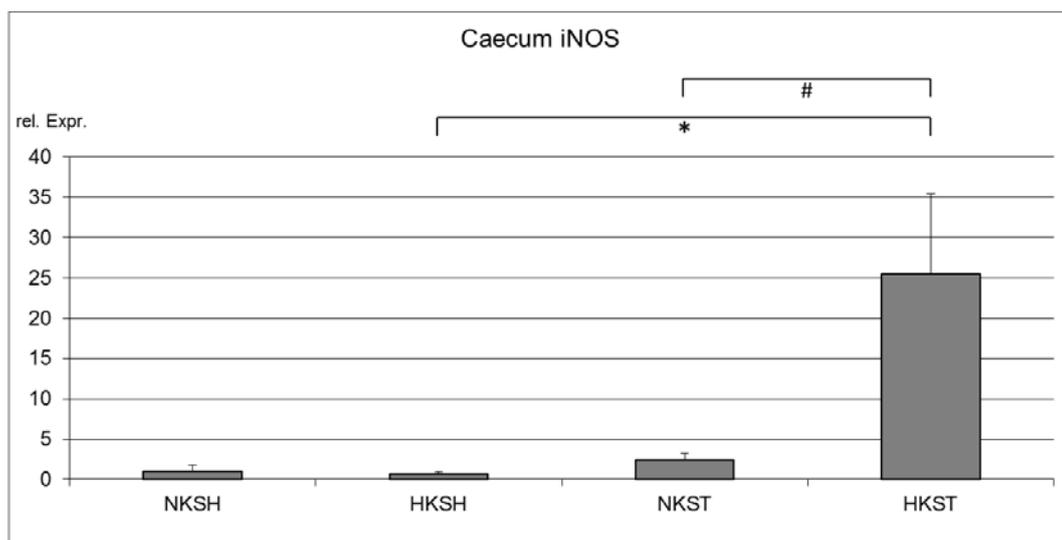


Abbildung 5: Relative Expression von *iNOS mRNA* im Caecum

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

(#) NKST vs. HKST,  $p < 0,001$ ; (\*) HKSH vs. HKST,  $p < 0,001$

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie,  $n = 8$ ; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 7$ ;

NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie,  $n = 6$ ; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 6$ ;

rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

### 5.1.4 Expression von HO-1 mRNA im Caecum

Bei der Untersuchung der *HO-1 mRNA* Expression im *Caecum* zeigten sich sowohl bei der Sepsis alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,39$ ; NKST:  $1,6 \pm 0,40$ ;  $p = 0,241$ ) wie auch bei der Hyperkapnie alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,39$ ; HKSH:  $0,8 \pm 0,26$ ;  $p = 0,636$ ) keine relevanten Veränderungen. Auch die Hyperkapnie während Sepsis (NKST:  $1,6 \pm 0,40$ ; HKST:  $1,5 \pm 0,51$ ;  $p = 0,87$ ) führte zu keiner relevanten Veränderung der Expression. Gleiches zeigte sich auch für den Vergleich septischer mit nicht-septischer Tiere unter hyperkapnischen Bedingungen. Auch hier ließ sich keine relevante Veränderung detektieren (HKSH:  $0,8 \pm 0,26$ ; HKST:  $1,5 \pm 0,51$ ;  $p = 0,173$ ). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die *HO-1 mRNA* Expression im *Caecum* in den hier durchgeführten Untersuchungen keiner relevanten Veränderung unterlag.

Tabelle 22: Relative Expression der HO-1 mRNA im Caecum

|      | rel. Expr. | SE   | n |
|------|------------|------|---|
| NKSH | 1,0        | 0,39 | 8 |
| HKSH | 0,8        | 0,26 | 7 |
| NKST | 1,6        | 0,40 | 6 |
| HKST | 1,5        | 0,51 | 6 |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

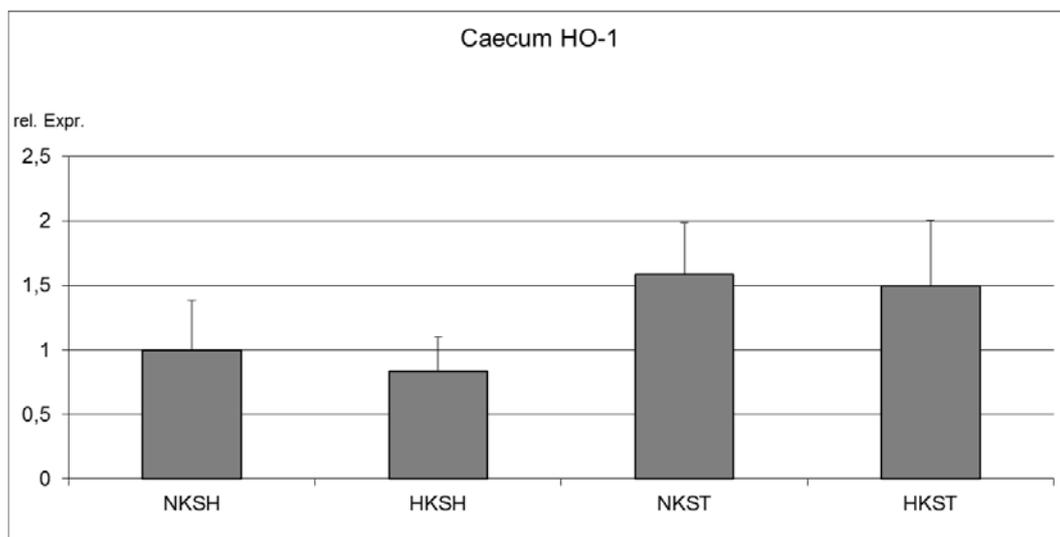


Abbildung 6: Relative Expression von HO-1 mRNA im Caecum

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, n = 8; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, n = 7; NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, n = 6; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, n = 6; rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

### 5.1.5 Expression von miR-223 im Caecum

Die Untersuchungen zur *miR-223* Expression zeigten, dass weder Sepsis (NKSH:  $1,0 \pm 0,33$ ; NKST:  $1,4 \pm 0,57$ ;  $p = 0,596$ ) noch Hyperkapnie (NKSH:  $1,0 \pm 0,33$ ; HKSH:  $0,7 \pm 0,44$ ;  $p = 0,538$ ) alleine eine Veränderung der *miR-223* Expression hervorrufen konnten. Auch die Hyperkapnie während Sepsis (NKST:  $1,4 \pm 0,57$ ; HKST:  $1,5 \pm 0,75$ ;  $p = 0,945$ ) zeigte keine wesentliche Veränderung in der *miR-223* Expression. Ebenso verhielt es sich beim Vergleich Sepsis gegen Nicht-Sepsis unter Hyperkapnie. Auch hier zeigten sich keine relevanten Änderungen (HKSH:  $0,7 \pm 0,44$ ; HKST:  $1,5 \pm 0,75$ ;  $p = 0,369$ ). Damit zeigte sich auch für die *miR-223* insgesamt, dass keine relevanten Veränderungen für die *miR-223* Expression auftraten.

Tabelle 23: Relative Expression der *miR-223* im Caecum

|             | rel. Expr. | SE   | n |
|-------------|------------|------|---|
| <b>NKSH</b> | 1,0        | 0,33 | 8 |
| <b>HKSH</b> | 0,7        | 0,44 | 7 |
| <b>NKST</b> | 1,4        | 0,57 | 6 |
| <b>HKST</b> | 1,5        | 0,75 | 6 |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

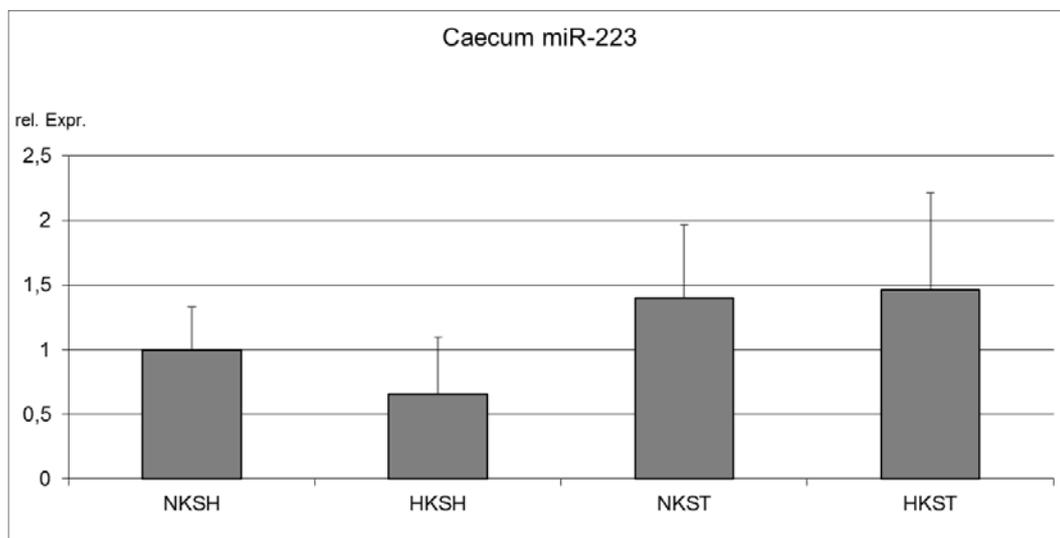


Abbildung 7: Relative Expression von *miR-223* im Caecum

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, n = 8; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, n = 7; NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, n = 6; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, n = 6; rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

### 5.1.6 ASD-Färbung im Caecum

Untersucht wurden in Paraffin fixierte und mit ASD gefärbte histologische Schnittpräparate aus dem *Caecum*. Unter dem Lichtmikroskop wurden dabei die ASD-positiven Zellen ausgezählt. Pro Präparat wurden 25 Sichtfelder begutachtet. Dabei ergaben sich insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ermittelt werden. Für den Effekt der Sepsis (NKSH:  $31,0 \pm 6,4$ ; NKST:  $22,6 \pm 3,4$ ) lag der p-Wert bei 0,312. Für die Hyperkapnie alleine (NKSH:  $31,0 \pm 6,4$ ; HKSH:  $24,5 \pm 4,0$ ) betrug der p-Wert 0,417. Ebenso ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die Hyperkapnie während der Sepsis (NKST:  $22,6 \pm 3,4$ ; HKST:  $25,6 \pm 3,1$ ) mit einem p von 0,525 sowie für den Vergleich der Sepsis gegen Nicht-Sepsis unter Hyperkapnie-Bedingungen (HKSH:  $24,5 \pm 4,0$ ; HKST:  $25,6 \pm 3,1$ ). Auch hier lag der p-Wert mit 0,829 im nicht signifikanten Bereich.

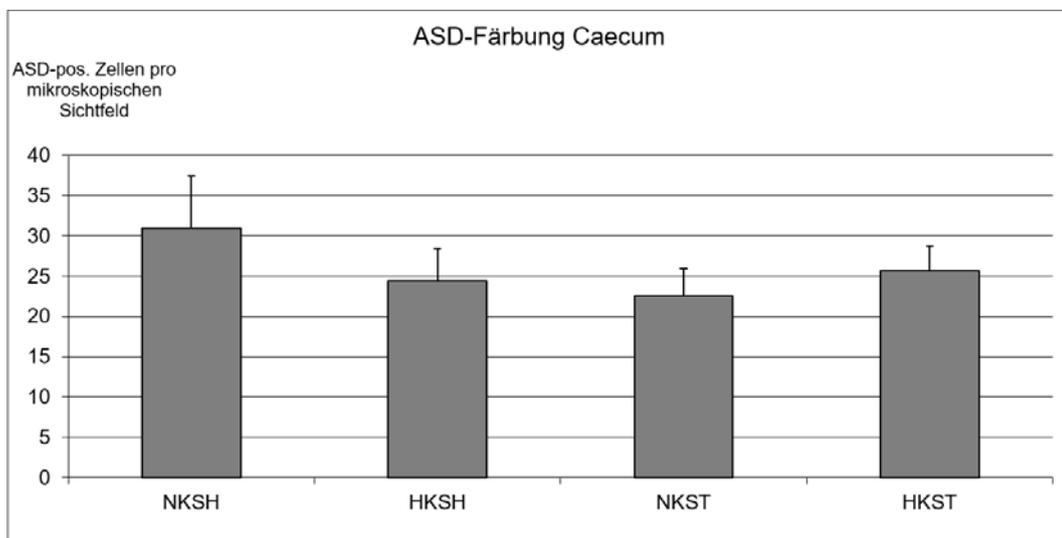
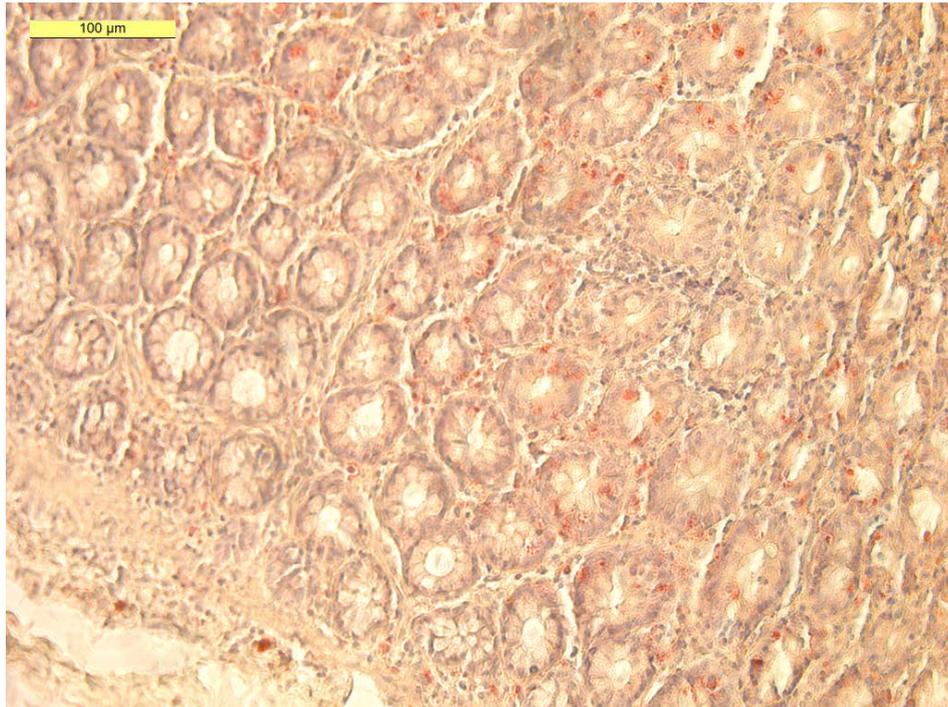


Abbildung 8: Anzahl der ASD-positiven Zellen pro mikroskopischen Sichtfeld

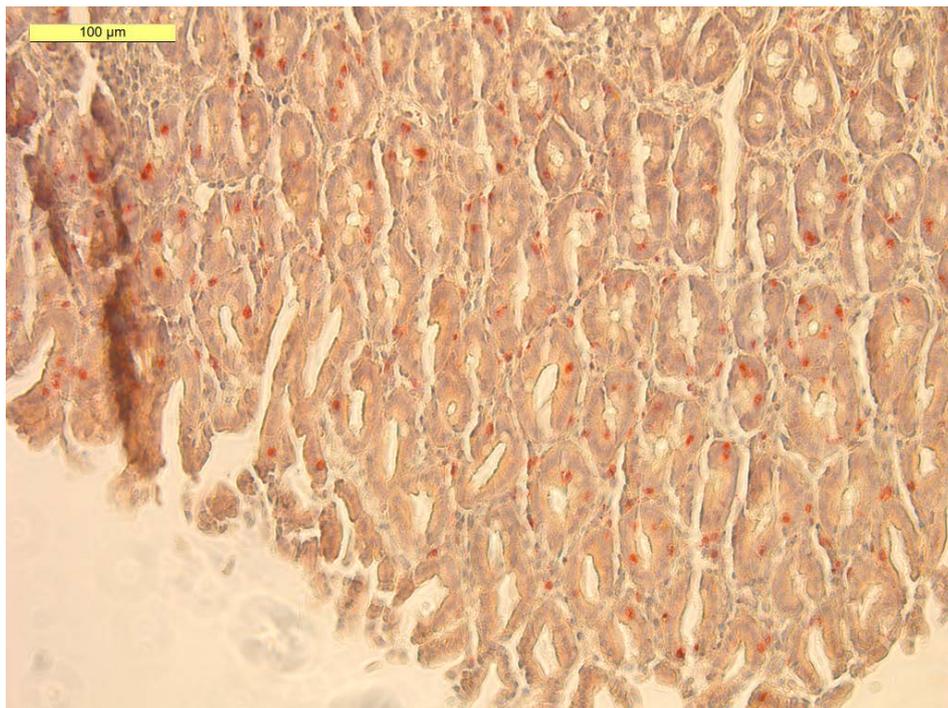
Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie,  $n = 8$ ; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 7$ ;

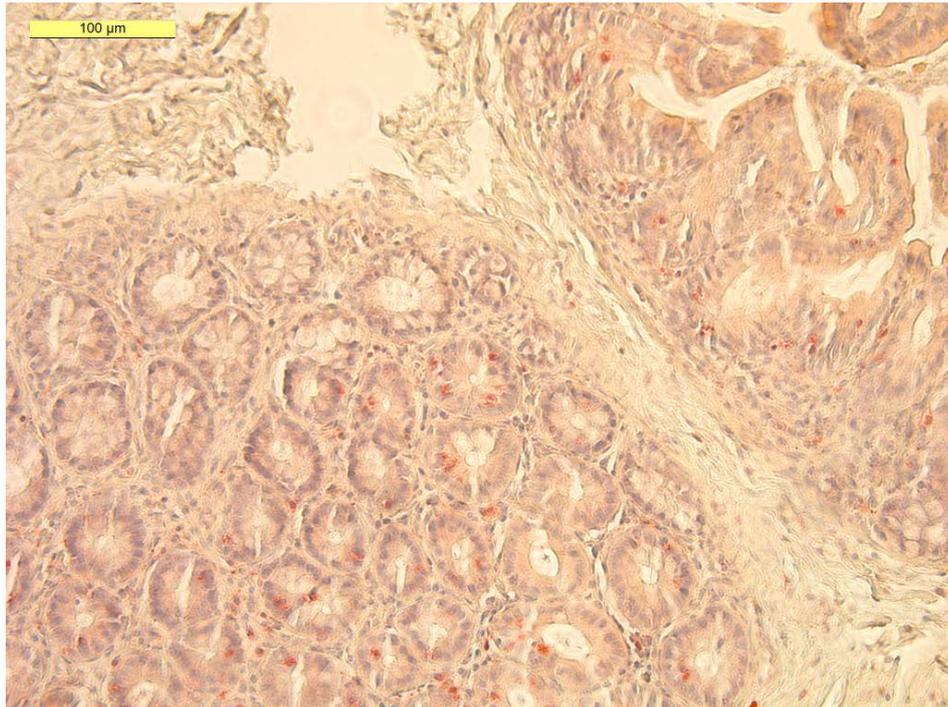
NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie,  $n = 6$ ; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 6$



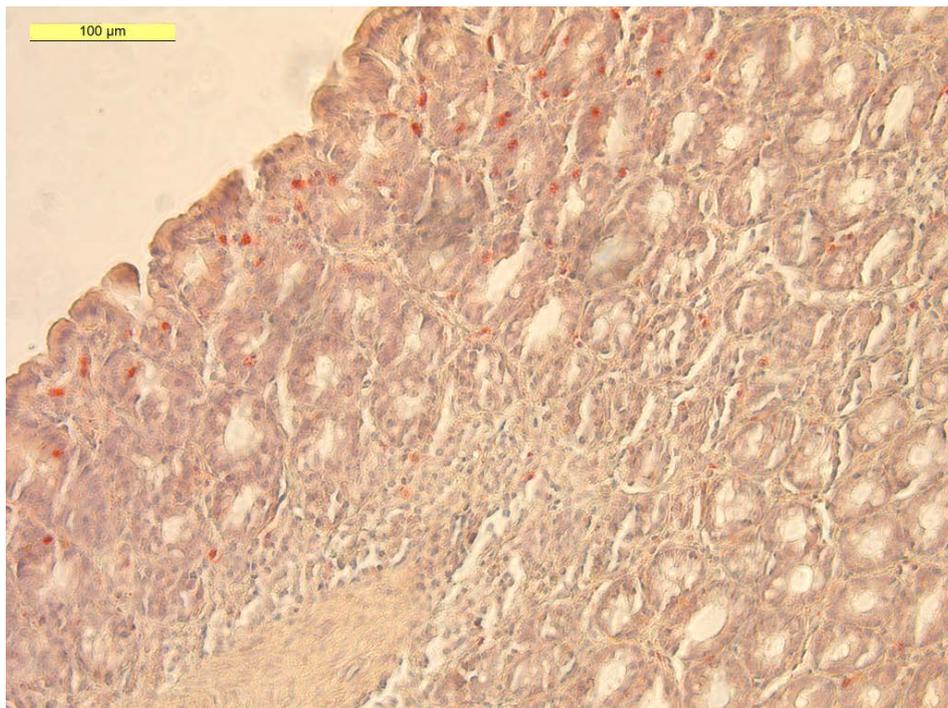
*A: NKSH 200-fache Vergrößerung*



*B: NKST 200-fache Vergrößerung*



C: HKSH 200-fache Vergrößerung



D: HKST 200-fache Vergrößerung

Abbildung 9: Bilder A-D, Beispielhafte Darstellungen der ASD-Färbung

Dargestellt sind Ausschnitte aus dem Caecum aus allen untersuchten Gruppen. Durch die ASD-Färbung zeigen sich die Neutrophilen rötlich. Ihre Kerne sind blau gefärbt.  
NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie;  
NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie

## 5.2 Leber

### 5.2.1 Expression von IL-6 mRNA in der Leber

Die Expression der *IL-6 mRNA* in der Leber lag unterhalb der Detektionsgrenze.

### 5.2.2 Expression von IL-10 mRNA in der Leber

Bei den Untersuchungen der *IL-10 mRNA* Expression in der Leber zeigte sich, dass weder Sepsis alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,29$ ; NKST:  $1,6 \pm 1,99$ ;  $p = 0,353$ ) noch Hyperkapnie alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,29$ ; HKSH:  $1,4 \pm 0,37$ ;  $p = 0,301$ ) eine relevante Veränderung der Expression hervorriefen. Aber auch die Hyperkapnie während Sepsis (NKST:  $1,6 \pm 1,99$ ; HKST:  $2,2 \pm 5,39$ ;  $p = 0,63$ ) und eine Sepsis unter Hyperkapnie im Vergleich zur Nicht-Sepsis (HKSH:  $1,4 \pm 0,37$ ; HKST:  $2,2 \pm 5,39$ ;  $p = 0,487$ ) zeigten keinerlei Veränderung der Expression.

Tabelle 24: Relative Expression der *IL-10 mRNA* in der Leber

|      | rel. Expr. | SE   | n  |
|------|------------|------|----|
| NKSH | 1,0        | 0,29 | 10 |
| HKSH | 1,4        | 0,37 | 9  |
| NKST | 1,6        | 1,99 | 10 |
| HKST | 2,2        | 5,39 | 9  |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

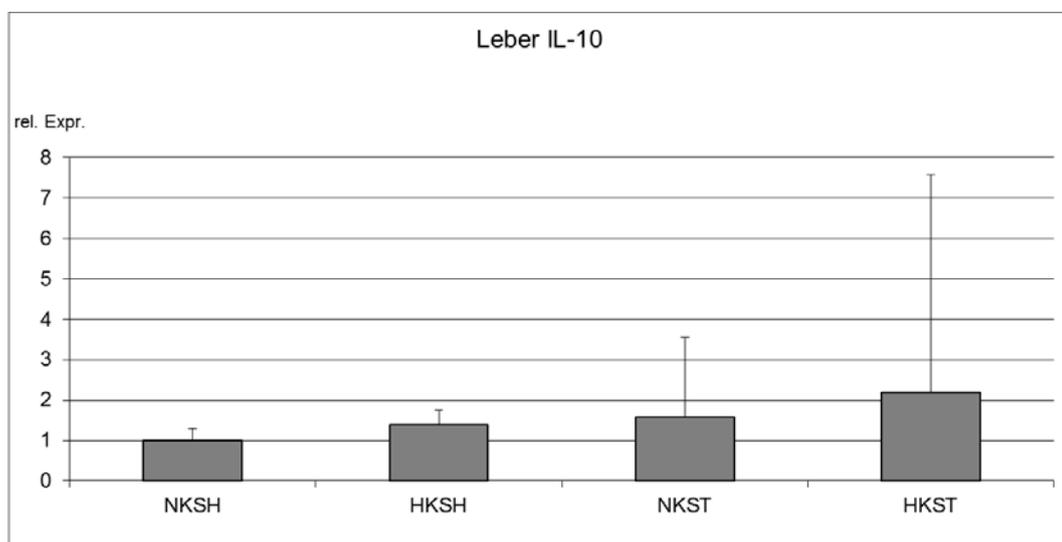


Abbildung 10: Relative Expression von *IL-10 mRNA* in der Leber

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, n = 10; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, n = 9; NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, n = 10; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, n = 9; rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

### 5.2.3 Expression von iNOS mRNA in der Leber

Für die iNOS mRNA Expression in der Leber zeigte sich bei der Sepsis alleine keine signifikante Steigerung. Es zeigte sich aber ein starker Trend für eine Steigerung der Expression (NKSH:  $1,0 \pm 0,30$ ; NKST:  $2,8 \pm 6,46$ ;  $p = 0,06$ ). Hyperkapnie alleine hatte auch keinen Einfluss auf die iNOS mRNA Expression in der Leber (NKSH:  $1,0 \pm 0,30$ ; HKSH:  $1,1 \pm 0,49$ ;  $p = 0,766$ ). Ebenso hatte die Hyperkapnie während einer Sepsis keinen Einfluss auf die Expression (NKST:  $2,8 \pm 6,46$ ; HKST:  $4,1 \pm 12,34$ ;  $p = 0,572$ ). Interessanterweise zeigte sich beim Vergleich Sepsis gegen Nicht-Sepsis unter Hyperkapnie-Bedingungen eine relevante Steigerung der iNOS mRNA Expression (HKSH:  $1,1 \pm 0,49$ ; HKST:  $4,1 \pm 12,34$ ;  $p = 0,017$ ). Zusammenfassend bleibt also festzuhalten, dass lediglich die Sepsis unter hyperkapnischen Bedingungen im Vergleich zur Nicht-Sepsis unter hyperkapnischen Bedingungen zu einer relevanten iNOS mRNA Expressionssteigerung in der Leber führte.

Tabelle 25: Relative Expression der iNOS mRNA in der Leber

|             | rel. Expr. | SE    | n  |
|-------------|------------|-------|----|
| <b>NKSH</b> | 1,0        | 0,30  | 10 |
| <b>HKSH</b> | 1,1        | 0,49  | 10 |
| <b>NKST</b> | 2,8        | 6,46  | 10 |
| <b>HKST</b> | 4,1        | 12,34 | 9  |

*NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe*

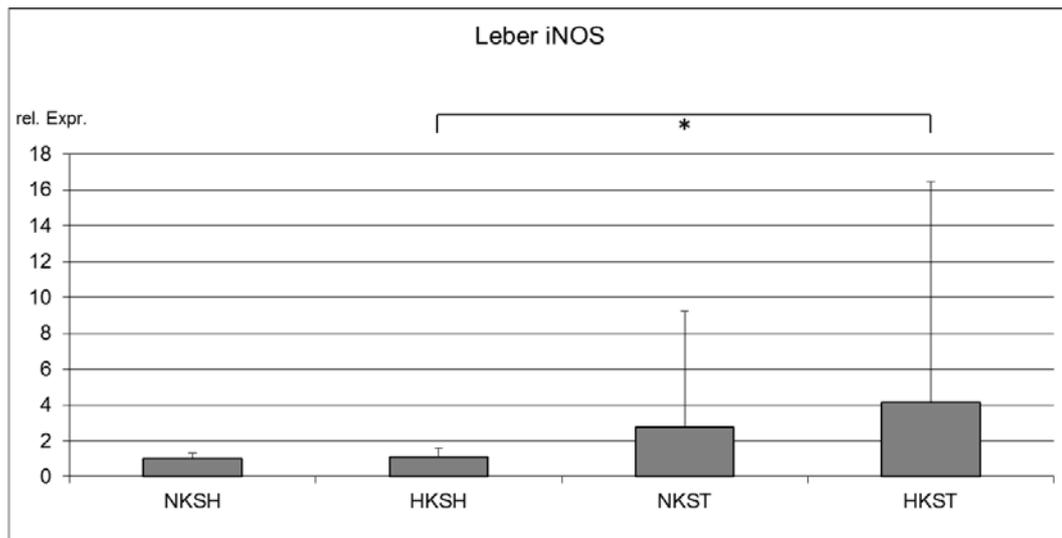


Abbildung 11: Relative Expression von iNOS mRNA in der Leber

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

(\* ) HKSH vs. HKST,  $p = 0,017$

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie,  $n = 10$ ; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 9$ ;

NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie,  $n = 10$ ; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 9$ ;

rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

#### 5.2.4 Expression von iNOS Protein in der Leber

Bei der Untersuchung von iNOS in der Leber war iNOS Protein nicht ausreichend detektierbar.

#### 5.2.5 Expression von HO-1 mRNA in der Leber

Bei der Untersuchung der HO-1 mRNA Expression in der Leber konnten wir sowohl für die Sepsis alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,30$ ; NKST:  $1,4 \pm 0,20$ ;  $p = 0,218$ ) als auch für die Hyperkapnie alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,30$ ; HKSH:  $0,6 \pm 0,19$ ;  $p = 0,1$ ) keine relevante Änderung der Expression detektieren. Die Hyperkapnie während Sepsis (NKST:  $1,4 \pm 0,20$ ; HKST:  $0,7 \pm 0,18$ ;  $p = 0,031$ ) führte zu einer relevanten Reduktion der HO-1 mRNA Expression in der Leber. Hingegen führte die Sepsis unter Hyperkapnie im Vergleich zur Nicht-Sepsis (HKSH:  $0,6 \pm 0,19$ ; HKST:  $0,7 \pm 0,18$ ;  $p = 0,536$ ) zu keiner relevanten Veränderung der Expression. Es lässt sich festhalten, dass Hyperkapnie während einer Sepsis eine Verringerung der HO-1 mRNA Expression hervorrief.

Tabelle 26: Relative Expression der HO-1 mRNA in der Leber

|      | rel. Expr. | SE   | n  |
|------|------------|------|----|
| NKSH | 1,0        | 0,30 | 10 |
| HKSH | 0,6        | 0,19 | 9  |
| NKST | 1,4        | 0,20 | 10 |
| HKST | 0,7        | 0,18 | 9  |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler,  $n$  = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

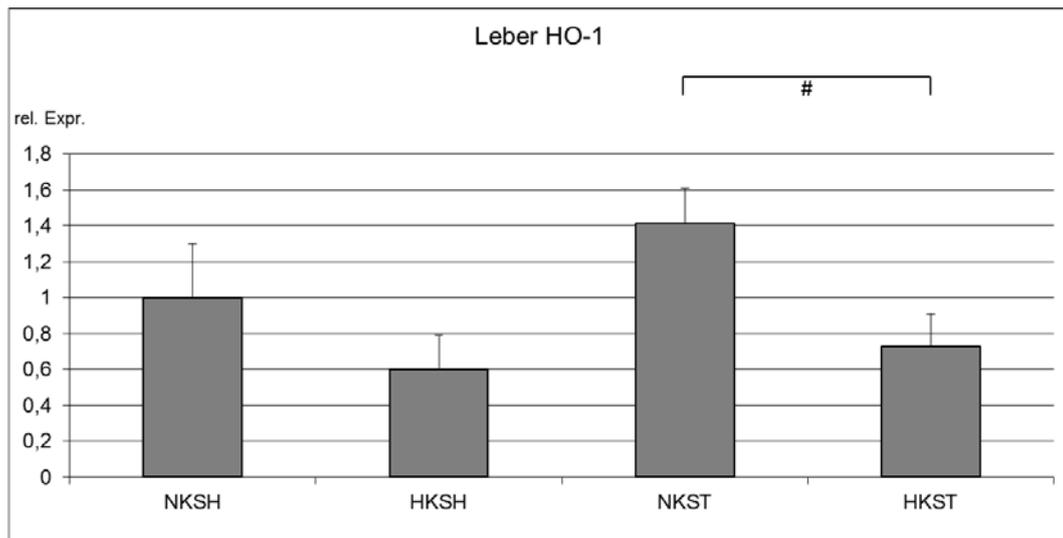


Abbildung 12: Relative Expression von HO-1 mRNA in der Leber

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

(#) NKST vs. HKST,  $p = 0,031$

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie,  $n = 10$ ; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 9$ ;

NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie,  $n = 10$ ; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 9$ ;

rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

### 5.2.6 Expression von HO-1 Protein in der Leber

Die HO-1 Proteinexpression in der Leber zeigte einen starken Trend zur vermehrten HO-1 Proteinexpression bei der Sepsis alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,038$ ; NKST:  $1,2 \pm 0,066$ ;  $p = 0,053$ ). Bei der Hyperkapnie alleine zeigte sich keine Änderung des Expressionsmusters von HO-1 Protein (NKSH:  $1,0 \pm 0,038$ ; HKSH:  $0,9 \pm 0,068$ ;  $p = 0,400$ ). Die Expression von HO-1 Protein unter Hyperkapnie während Sepsis im Vergleich zur Normokapnie während der Sepsis war ebenfalls unverändert (NKST:  $1,2 \pm 0,066$ ; HKST:  $1,1 \pm 0,069$ ;  $p = 0,888$ ). Im Vergleich Sepsis gegenüber Nicht-Sepsis unter Hyperkapnie zeigte sich eine leichte Zunahme der HO-1 Proteinexpression in der Leber (HKSH:  $0,9 \pm 0,068$ ; HKST:  $1,1 \pm 0,069$ ;  $p = 0,044$ ). Es lässt sich festhalten, dass weder Sepsis noch Hyperkapnie alleine einen Einfluss auf die HO-1 Proteinexpression nahmen. Eine geringe Erhöhung der Proteinbildung trat jedoch beim Vergleich zwischen septischen und nicht-septischen Tieren während hyperkapnischer Bedingungen auf.

Tabelle 27: HO-1 Protein in der Leber

|      | mean | SE    | n |
|------|------|-------|---|
| NKSH | 1,0  | 0,038 | 8 |
| HKSH | 0,9  | 0,068 | 8 |
| NKST | 1,2  | 0,066 | 8 |
| HKST | 1,1  | 0,069 | 8 |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

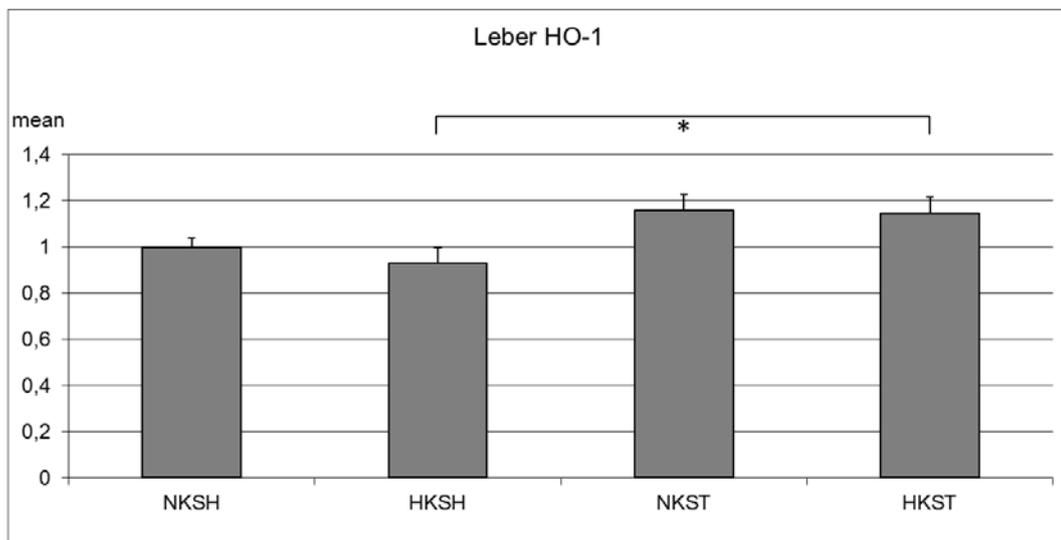


Abbildung 13: Relative Expressionsmenge von HO-1 Protein in der Leber

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler. (\*) HKSH vs. HKST,  $p = 0,044$ . NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie,  $n = 8$ ; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 8$ ; NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie,  $n = 8$ ; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 8$ ; mean = relative Proteinmenge bezogen auf NKSH

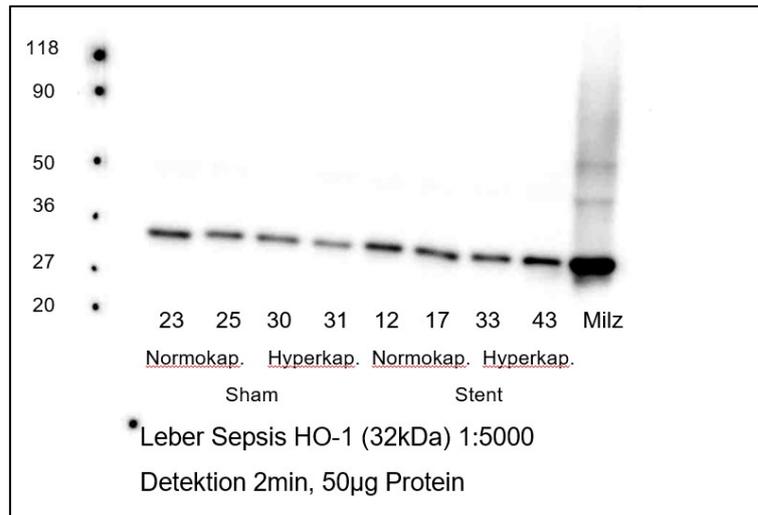


Abbildung 14: HO-1-Proteinexpression in der Leber

Exemplarisch dargestellt ein Western blot mit Leberhomogenaten (50 µg Gesamtprotein) von je 2 Versuchstieren pro Gruppe. Als Positivkontrolle ist Homogenat aus Milzgewebe aufgetragen.

## 5.3 Lunge

### 5.3.1 Expression von IL-6 mRNA in der Lunge

Die Expression der *IL-6 mRNA* in der Lunge lag unterhalb der Detektionsgrenze.

### 5.3.2 Expression von IL-10 mRNA in der Lunge

Die Expression der *IL-10 mRNA* in der Lunge lag unterhalb der Detektionsgrenze.

### 5.3.3 Expression von iNOS mRNA in der Lunge

Analog zu den Untersuchungen der *HO-1 mRNA* Expression in der Lunge zeigte sich für die *iNOS mRNA* Expression der Lunge, dass Sepsis (NKSH:  $1,0 \pm 0,26$ ; NKST:  $1,2 \pm 0,45$ ;  $p = 0,588$ ) zu keiner relevanten Änderung geführt hat. Die Hyperkapnie alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,26$ ; HKSH:  $1,5 \pm 0,35$ ;  $p = 0,156$ ) führte zumindest tendenziell zu einer Steigerung der Expression. Sowohl die Hyperkapnie während einer Sepsis (NKST:  $1,2 \pm 0,45$ ; HKST:  $1,4 \pm 0,50$ ;  $p = 0,58$ ) als auch eine induzierte Sepsis unter Hyperkapnie (HKSH:  $1,5 \pm 0,35$ ; HKST:  $1,4 \pm 0,50$ ;  $p = 0,924$ ) zeigten keinerlei Auswirkung auf die Expression.

Tabelle 28: Relative Expression der iNOS mRNA in der Lunge

|             | rel. Expr. | SE   | n  |
|-------------|------------|------|----|
| <b>NKSH</b> | 1,0        | 0,26 | 10 |
| <b>HKSH</b> | 1,5        | 0,35 | 10 |
| <b>NKST</b> | 1,2        | 0,45 | 10 |
| <b>HKST</b> | 1,4        | 0,50 | 9  |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

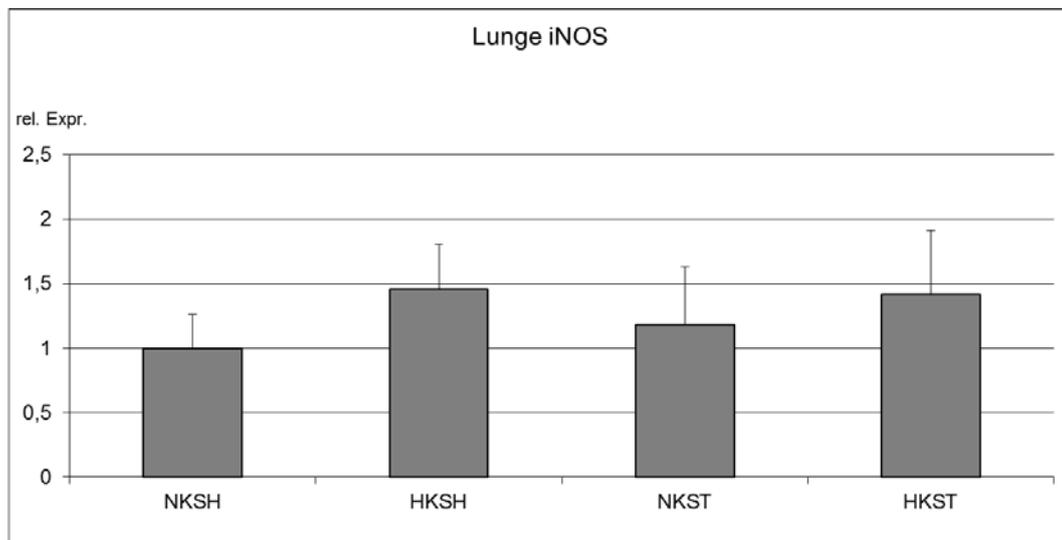


Abbildung 15: Relative Expression von iNOS mRNA in der Lunge

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, n = 10; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, n = 10; NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, n = 10; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, n = 9; rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

### 5.3.4 Expression von iNOS Protein in der Lunge

Bei der Untersuchung von iNOS in der Lunge war iNOS Protein nicht ausreichend detektierbar.

### 5.3.5 Expression von HO-1 mRNA in der Lunge

Untersuchungen der HO-1 mRNA Expression in der Lunge zeigten für die Sepsis alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,17$ ; NKST:  $1,1 \pm 0,30$ ;  $p = 0,449$ ) als auch für die Hyperkapnie alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,17$ ; HKSH:  $1,1 \pm 0,30$ ;  $p = 0,315$ ) keine relevante Änderung der Expression. Für die Hyperkapnie während Sepsis zeigte sich (NKST:  $1,1 \pm 0,13$ ; HKST:  $0,9 \pm 0,27$ ;  $p = 0,39$ ) ebenso keine Veränderung der Expression wie auch für den Vergleich Sepsis gegen Nicht-Sepsis unter

Hyperkapnie (HKSH:  $1,1 \pm 0,3$ ; HKST:  $0,9 \pm 0,27$ ;  $p = 0,292$ ). Insgesamt ließen sich also keine Änderungen der Expression für *HO-1 mRNA* in der Lunge nachweisen.

Tabelle 29: Relative Expression der *HO-1 mRNA* in der Lunge

|             | rel. Expr. | SE   | n  |
|-------------|------------|------|----|
| <b>NKSH</b> | 1,0        | 0,17 | 10 |
| <b>HKSH</b> | 1,1        | 0,30 | 10 |
| <b>NKST</b> | 1,1        | 0,13 | 10 |
| <b>HKST</b> | 0,9        | 0,27 | 9  |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

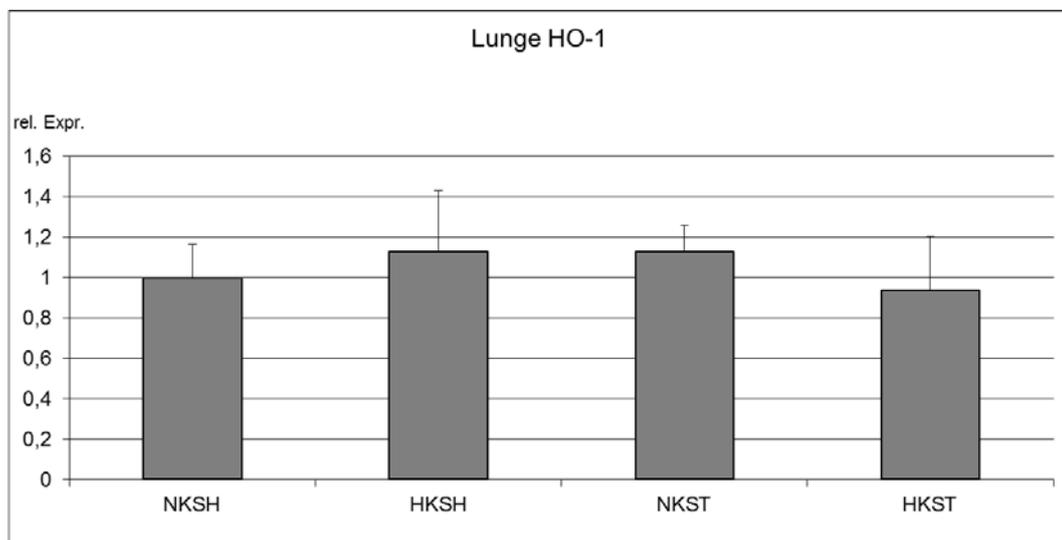


Abbildung 16: Relative Expression von *HO-1 mRNA* in der Lunge

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie,  $n = 10$ ; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 10$ ; NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie,  $n = 10$ ; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 9$ ; rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

### 5.3.6 Expression von HO-1 Protein in der Lunge

In der Lunge zeigte sich für die *HO-1* Proteinexpression bereits für die Sepsis alleine (NKSH:  $1,0 \pm 0,051$ ; NKST:  $1,8 \pm 0,157$ ;  $p = 0,001$ ) eine relevante Steigerung der Expression. Ebenso führte die Hyperkapnie alleine zu einer Zunahme der Expression von *HO-1* Protein (NKSH:  $1,0 \pm 0,051$ ; HKSH:  $1,4 \pm 0,169$ ;  $p = 0,021$ ). Hingegen konnte weder unter Hyperkapnie während einer Sepsis (NKST:  $1,8 \pm 0,157$ ; HKST:  $1,7 \pm 0,253$ ;  $p = 0,601$ ) noch im Vergleich Sepsis gegen Nicht-Sepsis unter Hyperkapnie (HKSH:  $1,4 \pm 0,169$ ; HKST:  $1,7 \pm 0,253$ ;  $p = 0,423$ ) eine relevante Veränderung

der *HO-1* Proteinexpression hervorrufen. Zusammenfassend zeigte sich also eine vermehrte *HO-1* Proteinexpression sowohl durch eine Sepsis als auch durch die Hyperkapnie alleine, jedoch nicht durch deren Kombination.

Tabelle 30: *HO-1* Protein in der Lunge

|             | mean | SE    | n |
|-------------|------|-------|---|
| <b>NKSH</b> | 1,0  | 0,051 | 8 |
| <b>HKSH</b> | 1,4  | 0,169 | 8 |
| <b>NKST</b> | 1,8  | 0,157 | 8 |
| <b>HKST</b> | 1,7  | 0,253 | 7 |

*NKSH* = Sham-Gruppe, Normokapnie, *HKSH* = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, *NKST* = Stent-Gruppe, Normokapnie, *HKST* = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, *SE* = Standardfehler, *n* = Anzahl Proben, *rel. Expr.* = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

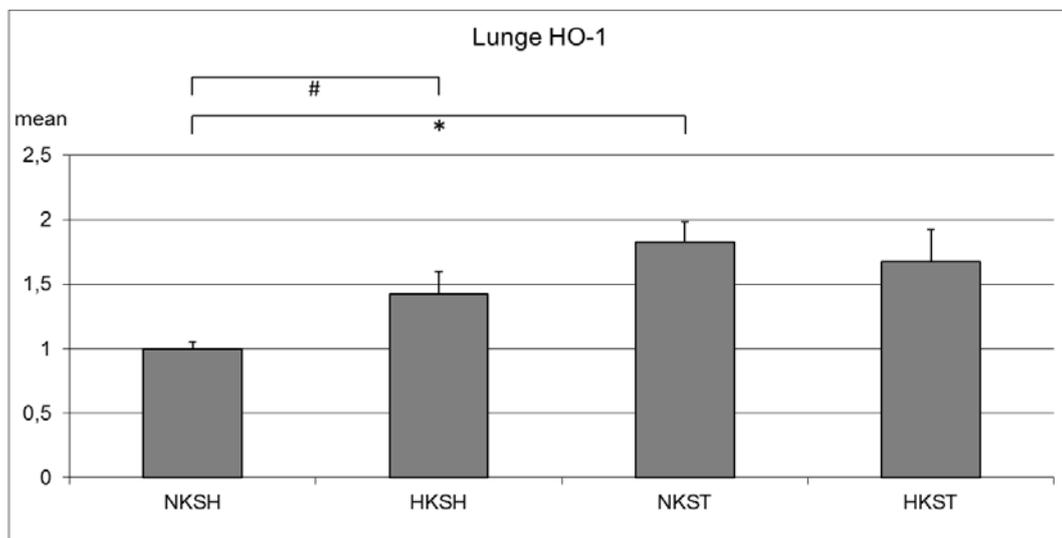


Abbildung 17: Relative Expressionsmenge von *HO-1* Protein in der Lunge

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für *NKSH* gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

(\*) *NKSH* vs. *NKST*,  $p < 0,001$ , (#) *NKSH* vs. *HKSH*,  $p = 0,03$

*NKSH* = Sham-Gruppe, Normokapnie,  $n = 8$ ; *HKSH* = Sham-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 8$ ;

*NKST* = Stent-Gruppe, Normokapnie,  $n = 8$ ; *HKST* = Stent-Gruppe, Hyperkapnie,  $n = 7$ ;

mean = relative Proteinmenge bezogen auf *NKSH*

### 5.3.7 Expression von *miR-223* in der Lunge

Für die Expression von *miR-223* zeigte sich, dass sowohl eine Sepsis alleine (*NKSH*:  $1,0 \pm 0,32$ ; *NKST*:  $0,7 \pm 0,20$ ;  $p = 0,295$ ) als auch die Hyperkapnie alleine (*NKSH*:  $1,0 \pm 0,32$ ; *HKSH*:  $0,8 \pm 0,13$ ;  $p = 0,317$ ) keinen Einfluss auf die Expression nahmen. Auch hyperkapnische Bedingungen während der Sepsis (*NKST*:  $0,7 \pm 0,20$ ; *HKST*:  $0,7 \pm 0,07$ ;  $p = 1,0$ ) hatten ebenso wenig Einfluss

wie die Induktion einer Sepsis unter Hyperkapnie im Vergleich zur Nicht-Sepsis unter Hyperkapnie (HKSH:  $0,8 \pm 0,13$ ; HKST:  $0,7 \pm 0,07$ ;  $p = 0,848$ ). Insgesamt konnte damit also kein Einfluss von Sepsis oder Hyperkapnie auf die *miR-223* Expression gefunden werden.

Tabelle 31: Relative Expression der *miR-223* in der Lunge

|             | rel. Expr. | SE   | n  |
|-------------|------------|------|----|
| <b>NKSH</b> | 1,0        | 0,32 | 10 |
| <b>HKSH</b> | 0,8        | 0,13 | 10 |
| <b>NKST</b> | 0,7        | 0,20 | 10 |
| <b>HKST</b> | 0,7        | 0,07 | 9  |

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, SE = Standardfehler, n = Anzahl Proben, rel. Expr. = relative Expression bezogen auf die erstgenannte Gruppe

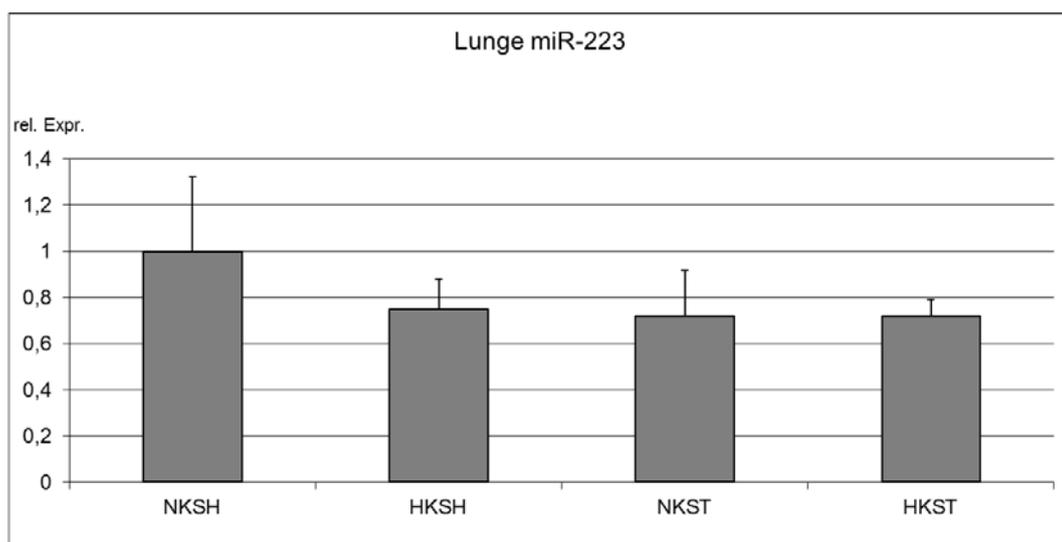


Abbildung 18: Relative Expression von *miR-223* in der Lunge

Dabei wurde der Mittelwert der relativen Expression für NKSH gleich 1 gesetzt und die übrigen Werte der anderen Gruppen darauf bezogen. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler.

NKSH = Sham-Gruppe, Normokapnie, n = 10; HKSH = Sham-Gruppe, Hyperkapnie, n = 10; NKST = Stent-Gruppe, Normokapnie, n = 10; HKST = Stent-Gruppe, Hyperkapnie, n = 9; rel. Expr. = relative Expression bezogen auf NKSH

## 6 Diskussion

### 6.1 Kernaussagen

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung führen zu den folgenden Schlussfolgerungen im Hinblick auf die eingangs gestellten Fragestellungen:

1. *Führt eine durch CASP-Operation induzierte Sepsis zu Veränderungen ausgewählter Marker einer Entzündungs- und Stressreaktion in den Organen Caecum, Leber und Lunge? Insbesondere sind die Marker Hämoxxygenase-1, induzierbare NO-Synthase, Mikro-RNA 223, Interleukin-6 und Interleukin-10 sowie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  von Interesse.*

Eine moderate Sepsis führte in *Caecum* und Leber nicht zu einer Veränderung der lokalen Markerantwort. In der Lunge führte eine Sepsis auf Proteinebene zu einer gesteigerten *HO-1* Expression, die übrigen untersuchten Marker (*IL-6 mRNA*, *IL-10 mRNA*, *iNOS mRNA* und Protein, *miR-223*) waren ebenfalls unverändert. Neutrophile Granulozyten waren während der Sepsis nicht vermehrt im *Caecum* vorzufinden.

2. *Welchen Einfluss hat eine zusätzliche akute Hyperkapnie auf die lokale Entzündungs- und Stressantwort und damit auf die zuvor genannten Marker?*

Eine Hyperkapnie führte in der *Sham*-Gruppe nicht zur Veränderung der lokalen Markerantwort in *Caecum* und Leber. In der Lunge zeigte sich eine vermehrte *HO-1* Proteinexpression durch zusätzliche Hyperkapnie in der *Sham*-Gruppe. Die übrigen untersuchten Marker in der Lunge waren davon nicht betroffen.

Zusätzliche Hyperkapnie während der Sepsis führte im *Caecum* zu einer gesteigerten *IL-6-mRNA*, *IL-10 mRNA* sowie *iNOS mRNA* Expression. *HO-1 mRNA* und *miR-223* zeigten sich unverändert. In der Leber führte die zusätzliche Hyperkapnie während der Sepsis zu einer geringeren *HO-1 mRNA* Expression. Die übrigen untersuchten Marker waren unverändert. In der Lunge zeigte sich die lokale Markerantwort bei zusätzlicher Hyperkapnie während der Sepsis ebenfalls unverändert.

Die Marker *IL-6 mRNA*, *IL-10 mRNA* und *iNOS mRNA* zeigten sich im *Caecum* während der Hyperkapnie unter zusätzlicher Sepsis erhöht. Die Marker *HO-1 mRNA* und *miR-223* waren hiervon nicht betroffen und blieben unverändert. In der Leber ließ sich ebenfalls eine verstärkte Expression von *iNOS mRNA* sowie *HO-1* Protein unter zusätzlicher Sepsis während Hyperkapnie nachweisen. Die übrigen Marker blieben unverändert.

*TNF- $\alpha$  mRNA* war in allen untersuchten Organen und Gruppen unterhalb der Detektionsgrenze und wurde daher nicht weiter untersucht.

## 6.2 Diskussion der Methodik

### 6.2.1 Experimentelles Modell zur Induktion der Sepsis

Um den Einfluss von Hyperkapnie auf verschiedene Zytokine und Enzyme in verschiedenen Geweben zu untersuchen, benötigt man ein standardisiertes Sepsistiermodell. Es existieren dazu verschiedene experimentelle Ansätze. Die etablierten experimentellen Modelle zur Untersuchung der Pathophysiologie der Sepsis können in drei Kategorien eingeteilt werden: Injektion von exogenen Toxinen (z.B. *LPS*-Injektion), Veränderung der endogenen Barriere, z.B. durch Darmperforation (*CLP*) oder durch *colon ascendens stent peritonitis* (*CASP*) und Injektion exogener Bakterien.

Die *LPS*-Injektion induziert lediglich eine monomikrobielle Sepsis im Tier, die mit einem frühen und transienten Anstieg proinflammatorischer Mediatoren einhergeht und wesentlich schwerer verläuft als bei einem an einer Sepsis erkrankten Menschen. Ähnlich verhält es sich bei der Injektion von exogenen Bakterien als Sepsisinduktion (108).

Die Modelle der *LPS*-Injektion und Injektion exogener Bakterien entsprechen nur in Teilaspekten der Pathogenese einer menschlichen Sepsis. Ergebnisse sind daher nur begrenzt auf die klinische Praxis übertragbar. Das Erregerspektrum einer menschlichen Sepsis variiert in Abhängigkeit von der Eintrittspforte bzw. der zu Grunde liegenden Lokalinfection. Etwa 50 bis 70 % der Sepsisfälle entstehen nosokomial, wobei das Risiko einer nosokomialen Sepsis mit 0,5 % für Normalstationen und 2,5 % für Intensivstationen angegeben wurde (9).

Beim *CLP*-Modell, bei dem das *Caecum* zunächst abgebunden und dann durchstochen wird, entwickelt sich ein intraabdomineller Abszess. Da ein Abszess zunächst ein lokal begrenzter Prozess bleibt, eignet sich dieses Modell daher nicht, um die systemische und die lokale Inflammationsantwort an den vom Sepsisfokus entfernten Geweben und Organen zu untersuchen (109).

Daher wurde im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie das *CASP*-Modell der Sepsis etabliert, bei dem durch einen Stent im *colon ascendens* eine diffuse Peritonitis induziert wird, aus der nach etwa 24 Stunden eine Sepsis entsteht. Im Verlauf dieser Peritonitis kommt es zu einer unkontrollierten Disseminierung von Erregern. Damit einhergehend ist ein reproduzierbarer Anstieg der systemischen Zytokine (37). Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass die Zytokinlevel proportional zur Schwere der Sepsis sind (110). Durch Variation der Stent-Größe ist die Schwere der Sepsis beeinflussbar. So zeigten u.a. Stübs et al., dass die Überlebensrate streng vom Stent-Durchmesser abhängt. Die Überlebensrate betrug dabei 36% 24 Stunden nach Sepsisinduktion für den größten untersuchten Stent mit 12 G. Für den kleinsten Stent mit 18 G betrug die Überlebensrate 91% 24 Stunden nach Sepsisinduktion (37). In den vorliegenden Untersuchungen wurde durch Verwendung eines 18 G-Stents eine moderate Sepsis induziert. Eine moderate Sepsis ist für eine

ausreichende Überlebensrate notwendig und stellt stabilere Untersuchungsbedingungen her als bei einer schweren Sepsis. Außerdem erlaubt der gewählte Ansatz, eine Intervention dahingehend zu untersuchen, ob das Krankheitsbild dadurch verbessert oder möglicherweise sogar verschlechtert wird.

### **6.2.2 Induktion der Hyperkapnie**

Die Induktion der Hyperkapnie erfolgte durch exogene Zufuhr von CO<sub>2</sub> zum Atemgasgemisch mit einem Ziel-pCO<sub>2</sub> von 75 ± 5 mmHg. Das Atemgasgemisch bestand dabei aus 10% CO<sub>2</sub>, 30% O<sub>2</sub> und 60% N<sub>2</sub>. Die normokapnische Kontrollgruppe wurde mit einem Ziel-pCO<sub>2</sub> von 45 ± 5 mmHg und einem Atemgasgemisch bestehend aus 30% O<sub>2</sub> und 70% N<sub>2</sub> ventiliert. Für beide Gruppen galt ein Ziel-pO<sub>2</sub> von > 90 mmHg. Die mechanische Beatmung erfolgte volumenkontrolliert und drucklimitiert mit einer Atemfrequenz von 70 Atemzügen pro Minute und einem Tidalvolumen von 1,8 – 2,5 ml. Der Atemwegsdruck wurde mit < 17 cmH<sub>2</sub>O festgelegt. 24 Stunden nach Durchführung der *CASP*- bzw. *Sham*-OP wurden die Tiere erneut narkotisiert und im Anschluss an die Instrumentierphase zunächst für 30 Minuten normokapnisch ventiliert (Baseline). Im Anschluss erfolgte je nach Gruppenzugehörigkeit (Normokapnie / Hyperkapnie) die 120-minütige normokapnische bzw. hyperkapnische Ventilation nach dem zuvor beschriebenen Verfahren. Die erzeugte Hyperkapnie wurde nicht gepuffert.

Diese Art der Hyperkapnieinduktion unterscheidet sich im Verfahren von dem, das beim Menschen angewandt wird. Hier werden die Tidalvolumina geringer gewählt, sodass konsekutiv die Beatmungsdrücke sinken und eine alveoläre Hypoventilation zum Anstieg des pCO<sub>2</sub>-Spiegels führt (21,23). Es wird also kein exogenes CO<sub>2</sub> zugeführt. Durch geringere Beatmungsdrücke und kleinere Tidalvolumina kommt es beim Menschen zu einer geringeren Dehnung der Pneumozyten. Die Folge ist, dass die lokale Reaktion im verwendeten Modell anders erfolgt, als dies beim Menschen der Fall ist. Neben den Effekten des CO<sub>2</sub>-Anstiegs erzeugt die verringerte Pneumozytendehnung beim Menschen nämlich zusätzlich Effekte (20,111,112). Diese müssen bei der Übertragung der Untersuchungsergebnisse auf den menschlichen Organismus zusätzlich berücksichtigt werden. Auf den pCO<sub>2</sub>-Wert im Blut hat die Art der Hyperkapnieinduktion jedoch keinen Einfluss. Beide Wege führen zuverlässig zu einem Anstieg des pCO<sub>2</sub>. Aus vielen Untersuchungen ist bekannt, dass erhöhte Beatmungsdrücke negative Auswirkungen auf lokaler Ebene verursachen. Dazu gehören Veränderungen in der Permeabilität bis hin zum Lungenödem. Diese Veränderungen führen oft zum *VALI*. Damit einhergehend ist ein Anstieg verschiedener inflammatorischer Zytokine. Daher ist es denkbar, dass durch eine geringere Zelldehnung bei Verwendung kleinerer Tidalvolumina weniger Zellstress auftritt (19,113,114).

Außerdem spielt die Dauer der Hyperkapnie eine Rolle. Hier wurde lediglich über einen Zeitraum von 120 Minuten hyperkapnisch ventiliert. Beim Menschen wird häufig eine mehrere Tage bis

Wochen umfassende hyperkapnische Beatmung angewendet. Der Organismus hat damit mehr Zeit, auf die gestiegenen  $p\text{CO}_2$  Werte zu reagieren und wird versuchen, den pH-Wert im Blut auszugleichen, indem die verschiedenen Puffersysteme wie z.B. der Bicarbonatpuffer, der Proteinpuffer und der Phosphatpuffer in Gang gesetzt werden. Zusätzlich werden über die Lungen und die Nieren saure Äquivalente aus dem Körper entfernt.

Zusammenfassend muss betont werden, dass in unserer Untersuchung die Hyperkapnie nicht gepuffert wurde. Die beschriebenen Effekte können damit nicht eindeutig durch  $\text{CO}_2$  oder durch die  $\text{CO}_2$ -Steigerung entstandene Azidose erklärt werden.

Die zuvor genannten Aspekte und vor allem die Art der Hyperkapnie-Induktion ( $\text{CO}_2$ -Beimischung und 120-minütige Hyperkapnieventilation) müssen bei der Übertragbarkeit des Tiermodells auf den menschlichen Organismus berücksichtigt werden.

### **6.2.3 Auswahl der untersuchten Organe**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Veränderungen der Expressionsmuster einzelner Marker in bestimmten Organen zu untersuchen. Weiter sollte untersucht werden, ob sich dieses Expressionsmuster durch zusätzliche Hyperkapnie beeinflussen lässt. Als zu untersuchende Organe wählten wir zum einen das *Caecum*, da hier die Sepsisinduktion nach dem *CASP*-Modell erfolgte. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass der Verdauungstrakt durch seine lokale Zytokinantwort auf eine Sepsis diese weiter unterhalten kann. Bereits 1986 postulierte Carrico et al. den Verdauungstrakt als „Motor“ eines multiplen Organversagens und heute ist bekannt, dass eine Fehlfunktion des Verdauungstraktes bei kritisch Kranken häufig ist. Auf diese Weise fördert und unterhält der Verdauungstrakt den Krankheitsprozess (115–119). Die Leber als weiteres Organ ist dem Verdauungstrakt im portalvenösen Kreislauf direkt nachgeschaltet. Als zentrales Stoffwechselorgan ist sie unter anderem an der Produktion der Akut-Phase-Proteine beteiligt. Während einer Sepsis spielt die Leber damit eine wichtige Rolle als Organ der Abwehr einerseits und als betroffenes Organ im Rahmen möglichen Organversagens andererseits. Eine vorbestehende Lebererkrankung ist ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Sepsis. Außerdem ist eine bestehende Leberfunktionseinschränkung nach einer Sepsis ein unabhängiger Faktor für die Entstehung eines Multiorganversagens und auch für den sepsisassoziierten Tod (120–122). Als weiteres Zielorgan wurde die Lunge ausgewählt. Auch dieses Organ ist bei einer Sepsis von zentralem Interesse. Zum einen besteht bei schwerwiegenden Verläufen mit Multiorganversagen (*MOV*) auch die Gefahr eines akuten Lungenversagens oder *ARDS*. Zum anderen ist die Lunge das erste betroffene Organ bei der Applikation einer permissiven bzw. therapeutischen Hyperkapnie, weshalb die lokalen Veränderungen auch hier von besonderem Interesse sind. Zur Hyperkapnie – ob nun permissiv oder therapeutisch angesehen – sind in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden (123–125). Auch die Effekte einer Hyperkapnie während der Sepsis waren Gegenstand vieler

Studien. Dabei wurden hauptsächlich die systemischen Effekte untersucht. Untersuchungen zu organspezifischen Expressionsmustern sind jedoch rar. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Sepsis auch eine Veränderung der lokalen Markerantwort beeinflusst. So zeigte eine Studie, dass eine Sepsis zu einer verzögerten Wundheilung der Haut im Bereich des Ohres führte und dort die lokale *TNF- $\alpha$*  Expression reduziert war (126). Daher ist es von Interesse, lokale Expressionsmuster in bestimmten Organen während der Sepsis und ihre mögliche Beeinflussbarkeit durch Hyperkapnie zu untersuchen.

### **6.3 Diskussion der Ergebnisse**

#### **6.3.1 Das lokale Expressionsmuster von Interleukin-6**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expression der *Interleukin-6 (IL-6) mRNA* in der Leber und Lunge unterhalb der Detektionsgrenze lag. Im *Caecum* als Ort der Sepsisinduktion zeigte sich *IL-6 mRNA* unter Hyperkapnie während einer Sepsis deutlich erhöht gegenüber Hyperkapnie ohne Sepsis. Eine erhöhte Expression ließ sich auch während der Sepsis unter Hyperkapnie gegenüber Normokapnie detektieren. Weder Hyperkapnie alleine noch die Sepsis allein führten zur einer erhöhten *IL-6 mRNA* Expression in den untersuchten Geweben.

Eine Untersuchung zur lokalen Zytokinantwort von *IL-6* untersuchte dabei den Effekt von therapeutischer Hyperkapnie auf die inflammatorische Antwort der Lunge bei spontanatmenden Ratten. Die Untersucher zeigten, dass therapeutische Hyperkapnie bei Endotoxinämie in Ratten unter anderem zu einer signifikant höheren *IL-6* Expression der Lunge führt als bei den Tieren ohne Endotoxinämie (127). Bei unserer Untersuchung lag die *IL-6 mRNA* Expression in allen Gruppen in der Lunge unterhalb der Detektionsgrenze. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der zuvor formulierten Studie. Es muss jedoch bedacht werden, dass es einige Unterschiede zwischen unserer Studie und der zitierten Arbeit gibt. Das Untersuchungsmodell ist verschieden (Sepsismodell versus Endotoxinmodell). Außerdem ist die Induktion der Hyperkapnie ebenfalls verschieden (veränderte CO<sub>2</sub>-Atmosphäre). In unserer Studie wurde die *IL-6 mRNA* untersucht und in der zitierten Arbeit die entsprechende Proteinexpression. Ein weiterer und wesentlicher Unterschied ist außerdem die Dauer der Hyperkapnieapplikation (120 Minuten gegenüber 24 Stunden in der oben genannten Studie von Norozian et al.). Zieht man die übrigen Ergebnisse unserer *IL-6*-Untersuchungen aus den anderen Organen hinzu, so zeigte sich im *Caecum* bereits nach 120 Minuten Hyperkapnie während der Sepsis ein signifikanter Anstieg der *IL-6 mRNA* Expression. Es lässt sich nur vermuten, dass nach 24 Stunden moderater Sepsis noch keine lokalen Veränderungen in entfernten Organen aufgetreten sind, die durch die Sepsis verursacht wurden. Auch scheint eine kurzfristige Hyperkapnie von 120 Minuten Dauer keine für unsere Untersuchung messbaren Effekte auf die Lunge zu haben. Weitere Arbeiten zur lokalen *IL-6* Expression existieren nicht.

Es ist daher aktuell nur möglich, auf beschriebene systemische Veränderungen zu blicken. Es gibt zahlreiche Studien zur Untersuchung des Plasmaspiegels von *IL-6* als Marker einer Sepsis. Allgemein anerkannt ist, dass eine Sepsis zu erhöhten *IL-6*-Spiegeln führt (82–84). Jedoch gibt es wiederum nur wenige Arbeiten, die den Effekt einer zusätzlichen Hyperkapnie untersucht haben. Im Rahmen der Gesamtstudie wurden bei denselben Versuchstieren auch die systemischen Zytokinspiegel untersucht. Es zeigte sich, dass 24 Stunden nach Sepsisinduktion der *IL-6*-Plasmaspiegel signifikant erhöht war. Auch nach weiteren 120 Minuten mit entweder normokapnischer oder hyperkapnischer Beatmung zeigten sich weiterhin signifikant erhöhte *IL-6*-Plasmaspiegel. Dabei führte eine kurzzeitige Hyperkapnie weder in der Kontrollgruppen (*Sham*) noch in der Sepsisgruppe (Stent) zu einer relevanten *IL-6*-Plasmaspiegelveränderung (37).

Vergleicht man dies mit den Ergebnissen aus dem *Caecum* für die *IL-6* Expression zeigt sich, dass eine Hyperkapnie während der Sepsis zu einer lokalen Steigerung der *IL-6 mRNA* Expression im Vergleich zur Hyperkapnie alleine und zur Sepsis unter Normokapnie führt. Die zuvor beschriebenen systemischen Veränderungen lassen sich also – zumindest für die Hyperkapnie – lokal im *Caecum* nachvollziehen. Warum die Sepsis alleine nicht zu einer erhöhten lokalen Expression von *IL-6 mRNA* im *Caecum* führt, ist unklar. Dass die Hyperkapnie zwar lokal, jedoch nicht systemisch, zu einer Veränderung führt, kann eventuell mit der kurzen Hyperkapniedauer von 120 Minuten erklärt werden. Eine längerdauernde Hyperkapnie könnte zu späteren Zeitpunkten zur Hochregulation des *IL-6*-Proteins führen.

Generell wird *IL-6* vor allem von Monozyten und Makrophagen z.B. bei Infektionen, nach Traumata bzw. Gewebeverletzungen, durch Entzündungen und Verbrennungen gebildet. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch septische Veränderungen in den Organen zu einer erhöhten *IL-6* Expression führen. Interessanterweise scheint eine Hyperkapnie unter septischen Bedingungen zu einer vermehrten *Interleukin-6* Expression zu führen. Dieses Ergebnis zeigt sich im *Caecum*, dem Organ, das als erstes im Sinne eines septischen Herdes einer Inflammation ausgesetzt ist. Die Mechanismen sind unklar. Es lässt sich jedoch mutmaßen, dass die Hyperkapnie während der Sepsis zu einer schnelleren Aktivierung des Immunsystems führt, indem lokal vermehrt *Interleukin-6* gebildet wird. *Interleukin-6* bewirkt systemisch gesehen vor allem in der Leber die Bildung von Akute-Phase-Proteinen und führt zur Entwicklung von Fieber und damit zu einer wichtigen Abwehrreaktion unseres Körpers. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die verantwortlichen Mechanismen genauer erklären zu können.

### 6.3.2 Das lokale Expressionsmuster von Interleukin-10

Die *Interleukin-10 mRNA* Expression in der Lunge lag unterhalb der Detektionsgrenze. In der Leber konnte zwar *IL-10 mRNA* detektiert werden, jedoch waren keine statistischen Unterschiede durch Sepsis und Hyperkapnie zu ermitteln. Im *Caecum* zeigte sich *IL-10 mRNA* sowohl unter Hyperkapnie während einer Sepsis (HKST vs. NKST) als auch als im Vergleich Sepsis gegenüber Nicht-Sepsis während der Hyperkapnie erhöht. Sowohl Hyperkapnie alleine als auch die Sepsis allein führten zu keinem Anstieg der *IL-10 mRNA* Expression. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit der Antwort zur *Interleukin-6 mRNA* Expression im *Caecum*.

Die Literaturrecherche ergab keine Studien zur lokalen *IL-10*-Antwort einzelner Organe auf eine Sepsis. Ebenso existieren bisher keine Untersuchungen zu den Effekten einer Hyperkapnie auf die lokale Antwort. Hingegen gibt es zahlreiche Untersuchungen zu den Effekten einer Sepsis auf die *IL-10*-Serumspiegel. Vergleicht man die Ergebnisse mit den im Rahmen der großen Gesamtstudie bei diesen Versuchstieren erhobenen Daten zu den Plasmazytokinspiegeln von *IL-10*, so zeigt sich, dass 24 h nach *CASP*-OP signifikant höhere *IL-10*-Plasmaspiegel auftraten als in scheinoperierten Tieren. Die hyperkapnische Intervention führte auch hier – ähnlich wie bei *IL-6*- zu keiner Beeinflussung der Plasmaspiegel (37). Bezüglich der lokalen *IL-10*-Antwort ist ein anderes Expressionsmuster zu erkennen. Hier sehen wir einen Anstieg der Expression von *IL-10 mRNA* im *Caecum* unter septischen Bedingungen bei zusätzlicher Hyperkapnie. Weder Hyperkapnie noch Sepsis alleine führten hier zu einer vermehrten *IL-10-mRNA* Expression. *IL-10*, das zu den antiinflammatorischen Zytokinen gehört, wirkt modulierend auf die Immunantwort ein. *IL-10* wird von verschiedenen Zellen exprimiert und sezerniert. Dazu gehören unter anderem T-Zellen, Monozyten bzw. Makrophagen, dendritische Zellen und Epithelzellen. *IL-10* ist außerdem bei Patienten mit Sepsis erhöht und die Konzentration spiegelt häufig die Schwere des inflammatorischen Prozesses wider. So ist die Konzentration bei Patienten mit septischem Schock höher als bei Patienten mit Sepsis ohne Schock. Dabei korreliert der *IL-10*-Spiegel streng mit den zirkulierenden *TNF- $\alpha$* -Serumkonzentrationen (85,86,90). Eine Studie zeigte, dass *IL-10<sup>-/-</sup>*-Knockout-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Mortalität nach intraperitonealer Injektion von *E. coli* aufweisen. Dieser Effekt wurde durch Vorbehandlung mit *TNF- $\alpha$* -Antikörpern verhindert (128). Andere Arbeiten kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sowohl bei intraperitonealer *LPS* Injektion mit nachfolgender Endotoxinämie (129) als auch bei septischer Peritonitis durch *CLP* (130,131) führte die Neutralisierung von *IL-10* zu einer erhöhten Letalität. Ähnliche Effekte vermuten wir auch auf lokaler Ebene. Unsere Ergebnisse unterstützen einen auch auf Gewebeebene mutmaßlichen protektiven Effekt einer Hyperkapnie während der Sepsis. Modellbedingt ist es in Lunge und Leber vermutlich noch zu keinen septischen Veränderungen gekommen, sodass hier keine Unterschiede bzw. nicht ausreichend *IL-10 mRNA* als Marker gebildet wurde. Im *Caecum* hingegen scheinen erste Inflamationsprozesse initiiert worden zu sein. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse vom

proinflammatorischen Zytokin *IL-6* unterstützt. Zeitgleich scheint – wie zu vermuten ist – eine antiinflammatorische, modulierende Zytokinausschüttung einzusetzen, die sich hier in Form von *IL-10* zumindest unter Hyperkapnie detektieren lässt. Die Studie von Gao et al. unterstützt diese These. Sie untersuchte die Effekte der Hyperkapnie auf die Entzündungsantwort bei Patienten mit Einlungen-Ventilation im Rahmen einer Lobektomie. Hier führte die Hyperkapnie zu einer signifikanten Steigerung der *IL-10*-Serumspiegel (132). In anderen Organ-Schädigungsmodellen, wie bei Ischämie-/Reperfusion, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Hyperkapnie organoprotektive Effekte hat. So verbessert Hyperkapnie auch die mikrovaskuläre Oxygenierung der Darmwand, allerdings zeigten sich die *IL-10*-Spiegel in dieser Untersuchung unverändert (37).

Ein zu erwartender Anstieg der lokalen *IL-10 mRNA* Expression während der Sepsis unter Normokapnie ist in unseren Untersuchungen ausgeblieben. Ein möglicher Grund kann der Untersuchungszeitpunkt (24 Stunden nach Sepsisinduktion) sein. Eine mögliche Hochregulation der *mRNA* Expression könnte hier bereits wieder auf Ausgangsniveau abgefallen sein. Eine weitere Ursache liegt vielleicht auch in der Schwere der Sepsis. In anderen Studien wurde – wie bereits erwähnt – gezeigt, dass die *IL-10*-Serumkonzentration mit der Schwere korreliert. Daher könnte der fehlende Anstieg hier auch mit einer noch nicht lang genug dauernden Sepsisphase oder einer zu moderaten Sepsisschwere erklärt werden. Möglicherweise liegt aber auch zum Untersuchungszeitpunkt eine erhöhte *IL-10*-Proteinmenge vor. Eine Untersuchung der *IL-10* Konzentration, z. B. mit ELISA, könnte daher hier weitere Anhaltspunkte liefern.

### **6.3.3 Das lokale Expressionsmuster von iNOS**

Die Expression der *iNOS mRNA* im *Caecum* zeigte sich durch Hyperkapnie und Sepsis alleine nicht verändert. Lediglich die zusätzliche Hyperkapnie unter septischen Bedingungen führte zu einer Steigerung der *iNOS* Expression, ähnlich wie für die *IL-10*- und *IL-6 mRNA* im *Caecum* gezeigt. Auch die Sepsis unter Hyperkapnie im Vergleich zu *Sham* unter Hyperkapnie führte zu einer gesteigerten *mRNA* Produktion von *iNOS* im *Caecum*. Auch in der Leber führte die Sepsis unter Hyperkapnie im Vergleich zur Nicht-Sepsis unter Hyperkapnie zu einer gesteigerten *mRNA* Produktion von *iNOS*. In der Lunge konnte im Vergleich dazu kein Unterschied festgestellt werden.

Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur *iNOS* und zu *NO* während einer Sepsis. Dabei werden *NO* sowohl schädliche als auch nützliche Effekte zugeschrieben, je nachdem welches Kompartiment man betrachtet. *NO* führt durch seine vasodilatierenden Eigenschaften systemisch zu einer Hypotonie. Diese wiederum ist ein Risikofaktor für die Entwicklung eines *MODS* (71). Es ist bekannt, dass es durch Hemmung von *iNOS* möglich ist, eine durch *LPS*-Injektion verursachte Hypotension abzumildern. Dies konnte in einem Versuch mit Schafen gezeigt werden (133). Die selektive Hemmung der *iNOS* verhinderte auch in einem *in vivo LPS*-Modell der Sepsis bei Ratten eine Hypotension (134). Und auch bei Anwendung des *NOS*-Inhibitors *NG-Monomethyl-L-Arginin (L-*

*NMMA*) beim Menschen im septischen Schock konnte eine Hypotension abgemildert werden (135). *NO* werden weitere schützende bzw. nützliche Effekte zugeschrieben. Die *NO*-Ausschüttung in der Niere führt zu einer lokalen Mehrdurchblutung, einem Effekt, der während des septischen Schocks unter Umständen die Nieren schützt. *NO* hemmt dort außerdem die lokale Plättchenaggregation und wirkt somit antithrombotisch (71). Die systemischen Effekte der Sepsis auf die *iNOS* wurden in dieser Untersuchung nicht weiter untersucht. Auf Organebene konnten wir keinen Effekt der Sepsis auf die *iNOS Expression* sehen. In der Leber konnten wir eine starke Tendenz zur Induktion der *iNOS mRNA Expression* durch die Sepsis sehen. Möglicherweise treten weitere Effekte erst zu einem späteren Zeitpunkt auf, wenn es durch eine länger andauernde oder evtl. schwerere Sepsis auch zu vermehrten und schwerwiegenden Organschäden kommt.

Schaut man sich Untersuchungen zu lokalen Veränderungen der *iNOS*-Expression an, so gibt es auch hier einige Arbeiten, die einige interessante Aspekte liefern. Eine Sepsis kann einen akuten Lungenschaden (*ALI*) verursachen. Daran beteiligt sind unter anderem Neutrophile. Bei *iNOS*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen konnte mittels intravitaler Mikroskopie gezeigt werden, dass die Leukozytenzahl in der Lunge bei einer durch *CLP* induzierten Sepsis signifikant reduziert ist. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass die *iNOS* zum *ALI* beiträgt (136). Eine Hemmung der *iNOS* könnte damit einen sepsis-assoziierten Lungenschaden reduzieren. Für die Leber wurde ebenfalls ein schützender Effekt der *iNOS*-Hemmung beschrieben. In der Studie von Mustafa et al. wurde der Effekt einer Kalziumkanalblockade auf den durch *LPS*-Injektion verursachten Leberschaden untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Kalziumblockade zu einer verminderten *iNOS mRNA Expression* in den Leberzellen führte und dies mit einer signifikanten Verringerung der Serummarker für Leberschädigung einherging (137). Allerdings muss bei dieser Studie beachtet werden, dass die *LPS*-Endotoxinämie keinesfalls dem Bild einer Sepsis gleicht und damit anderen pathophysiologischen Mechanismen unterliegt. Insgesamt scheint *iNOS* eine wichtige Rolle beim sepsisinduzierten Organversagen der Leber zu spielen. Für weitere Organe (hier unter anderem Niere, Milz und Lunge) konnte gezeigt werden, dass eine durch *LPS* induzierte Endotoxinämie zur vermehrten *iNOS mRNA Expression* besagter Organe führt. Somit ist die *iNOS* ein mögliches therapeutisches Ziel zur Abmilderung sepsisinduzierter Organschäden. Eine Übersichtsarbeit kommt auch für den sepsisbedingten Nierenschaden zu einem ähnlichen Ergebnis. Auch hier wird die *iNOS* als vielversprechendes Ziel für neue Behandlungsmethoden angesehen (138). Daher war es Ziel der vorliegenden Untersuchung, die möglicherweise modulierenden Effekte einer Hyperkapnie auf die *iNOS* zu untersuchen. In der Literatur konnte lediglich eine Arbeit gefunden werden, die die Effekte der Hyperkapnie auf die *iNOS* untersucht hat. Ketabchi et al. konnten zeigen, dass Hyperkapnie die hypoxiebedingte pulmonale Vasokonstriktion in Abhängigkeit von *iNOS* beeinflusst (139). Damit gibt es Hinweise, dass eine Hyperkapnie modulierend auf die *iNOS* einwirkt. In unserer Untersuchung hatte die Hyperkapnie alleine keinen Effekt auf die Expression der *iNOS mRNA* in

*Caecum*, Lunge oder Leber. Unter septischen Bedingungen konnte eine vermehrte *iNOS mRNA* Expression in der Leber sowie im *Caecum* im Vergleich Normokapnie versus Hyperkapnie nachgewiesen werden. Damit war dies die erste Untersuchung, die den Einfluss einer Hyperkapnie auf die *iNOS* während einer Sepsis untersucht hat. In der Lunge selbst konnten keinerlei Änderungen der *iNOS mRNA* Expression festgestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass die Lunge eine Sonderstellung einnimmt. Sie ist durch ihre offene Verbindung zur Außenwelt ständig mit Pathogenen in Kontakt. Daher ist anzunehmen, dass eine basale *iNOS-mRNA* Expression vorliegt und daher Veränderungen durch Sepsis und/oder Hyperkapnie relativ gesehen weniger ins Gewicht fallen. Auch auf Proteinebene waren keine Unterschiede zu detektieren. Hier sollte auch der methodische Ansatz in Betracht gezogen werden. Eventuell ist die Schwere der Sepsis nicht hoch genug, oder die Dauer der Sepsisinduktion zu kurz gewählt. Um diese Fragen zu klären, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die den Einfluss der Hyperkapnie auf septische Organschäden und die Modulation der *iNOS*-Antwort weiter betrachten, um mögliche therapeutische Ziele und Mechanismen zu identifizieren.

#### **6.3.4 Das lokale Expressionsmuster von HO-1**

Die *HO-1* wurde in dieser Untersuchung auf Ebene des Proteins mittels Western-Blot und auf Ebene der *mRNA* mittels PCR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Hyperkapnie während einer Sepsis zu einer Reduktion der *HO-1 mRNA* im Vergleich zur Normokapnie in der Leber führt. Auf Proteinebene zeigt sich in der Leber eine signifikante Steigerung der *HO-1*-Proteinproduktion unter Hyperkapnie beim Vergleich Sepsis zur Nicht-Sepsis. Weder für die Lunge noch für das *Caecum* zeigte sich auf *mRNA*-Ebene eine Veränderung des Expressionsmusters. Auf Proteinebene führte die Hyperkapnie in der Lunge bei *Sham*-Tieren zu einer vermehrten *HO-1* Expression. Ebenso führt unter Normokapnie eine Sepsis im Vergleich zu den gesunden Tieren zu einer gesteigerten *HO-1* Proteinbildung.

Es gibt zahlreiche Arbeiten, die einen möglichen protektiven Effekt der *HO-1* auf verschiedene Organsysteme beschreiben (61–66). Daher war es Ziel, auch die möglicherweise modulierenden Effekte einer Hyperkapnie auf die *HO-1* zu untersuchen.

Die Sepsis alleine hatte in unserer Untersuchung keinen Einfluss auf das Expressionsmuster der *HO-1 mRNA*. Auf Proteinebene konnten wir zeigen, dass eine Sepsis zu einer gesteigerten *HO-1* Expression in der Lunge führt. In der Leber verfehlte die Induktion der *HO-1* Proteinexpression durch die *CASP-OP* nur knapp das Signifikanzniveau ( $p = 0,053$ ). Allgemein führt ein gesteigerter Zellstress zu einer gesteigerten *HO-1* Expression, sodass dieses Ergebnis im Einklang ist mit einer Reihe von Untersuchungen mit unterschiedlichen Stressbedingungen wie zum Beispiel Sepsis, hämorrhagischer Schock, Hitzeschock und oxidativer Stress durch Glutathiondepletion (41,42,63,65,140–142). Dass letztlich in den untersuchten Organen kein Anstieg der *HO-1 mRNA*

Expression unter der Sepsis allein zu detektieren war, könnte an fehlenden septischen Veränderungen der Organe bei milder Sepsis liegen. Ein weiterer Faktor ist der Untersuchungszeitpunkt. Die Veränderung der *HO-1*-Proteinexpression in der Lunge und die tendentiell gesteigerte Proteinexpression in der Leberuntersuchung legen nahe, dass die *HO-1 mRNA* Expression bereits auf Ausgangsniveau abgefallen sein könnte.

Schaut man sich Untersuchungen zum systemischen *HO-1*-Spiegel an, so konnte gezeigt werden, dass der *HO-1*-Plasmaspiegel bei kritisch Kranken im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht war. Dabei korrelierte der Plasmaspiegel mit dem Grad der Organschädigung (143). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass die (zusätzliche) Induktion bzw. vermehrte Expression von HO-1 mit einer Abmilderung der Sepsis bzw. mit einer Verringerung sepsisbedingter Organschäden einherging (144–147). Es konnte z.B. auch gezeigt werden, dass *HO-1* bei einer polymikrobiellen Sepsis durch *CLP* zu einer verbesserten Immunantwort gegen *E. faecalis* führte ohne eine Immunparalyse zu verursachen. Die Autoren konnten zeigen, dass bei *HO-1*-Knockoutmäusen *CLP* zu einer erhöhten Bakteriämie und vermehrten Organschäden führte. Daraus leiteten die Autoren ab, dass eine *HO-1*-Überexpression zu einer verbesserten Überlebensrate bei einer polymikrobiellen Sepsis führen könnte. Dies konnte durch eine entsprechende Untersuchung gezeigt werden. Beim Vergleich von Wildtyp-Mäusen mit Mäusen, die *HO-1* überexprimieren, konnte eine signifikant höhere Überlebensrate sowie eine signifikant reduzierte Bakteriämie nachgewiesen werden. Damit scheinen *HO-1* und die Hämabbauprodukte eine wesentliche Rolle bei der Steuerung der Abwehr gegen bakterielle Erreger zu spielen (148).

Ein Anstieg der *HO-1*-Proteinbildung durch Hyperkapnie wäre damit eine therapeutische und organprotektive Maßnahme. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Hyperkapnie bei scheinoperierten Tieren zu einer vermehrten *HO-1*-Proteinbildung in der Lunge führt. Somit könnte die Hyperkapnie einen Ansatz darstellen, um *HO-1*-vermittelte protektive Effekte zu erzeugen. Unsere Ergebnisse sind im Einklang mit einer Untersuchung von Wu et al. Hier führte eine hyperkapnische Azidose durch Zusatz von 10% CO<sub>2</sub> zum Atemgasgemisch zu einer Zunahme der *HO-1* Expression und –aktivität in der Lunge nach Ischämie/Reperfusion. Dies war mit einer Verringerung des Ischämie-Reperfusionsschadens vergesellschaftet. Diese protektiven Effekte wurden durch Zugabe des *HO-1*-Inhibitors *ZnPP IX* teilweise aufgehoben. Es fanden sich keine weiteren Arbeiten, die die Effekte der Hyperkapnie auf Expression und/oder Aktivität der *HO-1* untersucht haben. Insbesondere existierten auch keine Arbeiten zu den Effekten einer Hyperkapnie auf die *HO-1* während einer Sepsis. Es ist bekannt, dass die *HO-1* durch verschiedene endogene und exogene Stimuli induziert wird (42,53–55). Hierzu gehören Hypoxie und Hyperoxie (56), Ischämie/Reperfusion (57) und auch verschiedene, inflammatorische Zytokine (58–60). Unsere Untersuchung legt nahe, dass auch eine Hyperkapnie zur *HO-1*-Induktion beiträgt. Es sind daher

weitere Untersuchungen notwendig, um die dahinterstehenden Mechanismen und die möglichen therapeutischen Optionen aufzufindig zu machen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse zur HO-1 Expression auf *mRNA* und Proteinebene könnten sich durch den Untersuchungszeitpunkt erklären lassen. Es ist denkbar, dass nach 24 Stunden die Expression der *mRNA* wieder auf annähernd Ausgangsniveau abgefallen war. Betrachtet man unser Ergebnis genauer, so fällt auf, dass es durch Sepsis in der Lunge unter Normokapnie zu einem Anstieg der *HO-1*-Proteinexpression gekommen ist, nicht jedoch bei der Sepsis unter Hyperkapnie. In der Lunge hatte jedoch auch die Hyperkapnie alleine eine Steigerung der HO-1-Proteinexpression zur Folge. Da die Sepsis bereits zu einem Anstieg der HO-1-Proteinexpression in der Lunge geführt hat, ist eventuell kein weiterer Anstieg durch zusätzliche Hyperkapnie während Sepsis nachweisbar. Bei der Leber war dieser Effekt durch die Sepsis nur unter Hyperkapnie nachweisbar. Ein Grund kann eine unterschiedlich hohe Basalexpression in diesen Organen sein, so dass die Effekte von Sepsis und Hyperkapnie auf die Expressionsmenge weniger zu einer Gesamtveränderung des Expressionsmusters beitragen. Denkbar ist auch, dass die Leber auf Veränderungen durch die Hyperkapnie anders reagiert, als die Lunge selbst, da diese viel früher (bereits auf Gewebeebene) mit erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen konfrontiert wird. Im restlichen Organismus wurden die Hyperkapnieeffekte über den pH-Wert bzw. den pCO<sub>2</sub> im Blut vermittelt. Hierfür bedarf es mehr Zeit.

### **6.3.5 Das lokale Expressionsmuster von miR-223**

In unserer Untersuchung zeigte sich die lokale *miR-223* Expression für alle Gruppen in Lunge und *Caecum* unverändert. Weder eine Sepsis noch die Hyperkapnie alleine und ebenso wenig deren Kombination hatten einen Einfluss auf die lokale *miR-223* Expression.

*miR-223* wird vor allem von Stammzellen der myeloischen Reihe exprimiert. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen und bei der Aufrechterhaltung der Granulozytenfunktion. Während der Granulozytendifferenzierung ist *miR-223* hochreguliert (149). Wir haben ebenfalls die Granulozytenrekrutierung im *Caecum* untersucht (siehe folgender Abschnitt). Dort zeigte sich kein Unterschied in der Granulozytenzahl zwischen allen untersuchten Gruppen. Da keine Veränderungen der Granulozytenzahl zu detektieren waren, zeigte sich erwartungsgemäß die lokale *miR-223* Expression ebenfalls unverändert. Als mögliche Ursache ist zum einen der Untersuchungszeitpunkt zu nennen. Möglicherweise sind die Änderungen im lokalen Expressionsmuster nicht mehr oder noch nicht nachweisbar (24 Stunden nach Sepsisinduktion). Ein weiterer Faktor ist die Schwere der Sepsis. In unserer Untersuchung wurde ein Sepsismodell mit milder Sepsis bevorzugt. Unter Umständen führt dies in Kombination mit dem kurzen Untersuchungszeitraum (noch) nicht zu einer ausreichenden Veränderung der *miR-223* Expression.

Auf systemischer Ebene konnten Wang et al. bereits zeigen, dass der *miR-223* Serumspiegel septischer Patienten signifikant niedriger ist als bei einer gesunden Kontrollgruppe und bei Patienten mit *SIRS*. Die Autoren schlussfolgerten, dass *miR-223* geeignet sein könnte um zwischen *Sepsis* und *SIRS* zu differenzieren (77). Widersprüchlich dazu zeigte aber die Studie von Benz et al., dass *miR-223*-Serumspiegel weder das Bestehen einer Sepsis noch das klinische Outcome der Patienten belegen können (78). Damit bleibt die Rolle der *miR-223* in der Sepsis weiterhin unklar. Auf lokaler Ebene konnten Yu et al. zeigen, dass die *miR-223* in einem Ischämie-/Reperfusionmodell der Leber bei der Maus signifikant und um das 3-fache im Vergleich zur *Sham*-Gruppe erhöht ist und positiv mit den Lebertransferasen korreliert (75). Schaut man sich hierzu im Vergleich nochmals die Studie von Benz et al. an, so wird das Ergebnis von Yu et al. relativiert. Benz et al. zeigten zum einen, dass zwar die *miR-223* Expression in der Lunge signifikant hochreguliert war. Aber im Kontrast dazu war sie in der Niere signifikant herunterreguliert während in der Leber, dem Gehirn, dem Herz und der Muskulatur keine Veränderungen der *miR-223* während einer durch *CLP* induzierten Sepsis in der Maus zu detektieren war. Die Serumlevel der *miR-223* waren in dieser Untersuchung auch nur während der Sepsis durch *LPS*-Injektion erhöht. Bei der Sepsis durch *CLP*, die vergleichbar mit der hier verwendeten *CASP*-Methode ist und die deutlich stärker eine polymikrobielle Sepsis des Menschen reflektiert als die *LPS* Injektion, zeigten sich die *miR-223* Serumspiegel unverändert (79). Unsere Untersuchung konnte daher auf lokaler Ebene das Ergebnis von Benz et al. mittels *CASP*-Modell reproduzieren.

Es existieren keine Untersuchungen zur lokalen oder systemischen Veränderungen der *miR-223* Expression unter Hyperkapnie. Unsere Untersuchungen lassen vermuten, dass eine Hyperkapnie auf lokaler Ebene keine Veränderung des *miR-223* Expressionsmusters hervorruft bzw. Veränderungen evtl. erst zu einem späteren Zeitpunkt zu detektieren sein könnten. Systemische *miR-223*-Spiegel und ein möglicher Effekt einer Hyperkapnie wurden bisher noch nicht untersucht. Auch Untersuchungen zum Effekt der Hyperkapnie auf die Beeinflussung der *miR-223*-Serumspiegel während einer Sepsis gibt es bisher nicht und sollten in Zukunft durchgeführt werden, um weitere Fragen zu klären.

### **6.3.6 Neutrophile Granulozyten im Caecum**

Zusätzlich zu den Markern der lokalen Immunantwort im *Caecum* wurde in diesem Organ auch die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten untersucht. Die Infiltration des *Caecums* mit neutrophilen Granulozyten zeigte sich unverändert und hing nicht von der Intervention ab. Dies ist im Einklang mit einer andere Studie unserer Arbeitsgruppe, die die Granulozyteninfiltration der Leber der hier verwendeten Tiere untersuchte (150). Der Grund für dieses Ergebnis könnte der Untersuchungszeitpunkt bei moderater Sepsis sein. Zu diesem Zeitpunkt sind zwar bereits systemische als auch lokale Zytokinveränderungen nachweisbar. Zu einer erhöhten Migration von Neutrophilen Granulozyten ist es nicht gekommen.

In *in vitro*-Studien wurde bereits nachgewiesen, dass eine moderate Hyperkapnie die Migration und Aktivität von Neutrophilen hemmen kann (31,151). Dies lässt sich auch bei einer durch *CLP* induzierten Sepsis unter moderater Hyperkapnie nachweisen. So reduziert diese innerhalb der ersten 3 Stunden die Neutrophilenzahl in der Lunge und damit einhergehend reduziert sich der Lungenschaden (35). Dieser Effekt ist jedoch eher nicht im *Caecum* für die fehlende Neutrophilenrekrutierung verantwortlich. Dies belegen zumindest die Ergebnisse der Zytokin- und Proteinuntersuchung von *IL-10*. Daher müssen weitere Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Eine weitere mögliche Ursache kann die Ausprägung der Sepsis sein. Bei diesem Sepsismodell ist eine Peritonitis zu erwarten. Da für eine moderate Sepsis ein kleiner Stent gewählt wurde, können unter Umständen die lokalen Gewebeveränderungen recht moderat ausfallen. Es sollten weitere Untersuchungen am septischen Tiermodell mit septischen Organschäden durchgeführt werden, um die potenziell positiven Effekte der Hyperkapnie systematisch zu überprüfen.

#### **6.4 Übertragbarkeit auf den Menschen und praktische Relevanz**

Die hier gefundenen Ergebnisse stammen allesamt aus einem Modell der Sepsis bei Ratten. Daher erschweren einige Faktoren die Übertragbarkeit auf den Menschen. Als erstes spiegelt die hier induzierte Sepsis nur einen kleinen Teil der Sepsisfälle wider, die typischerweise beim Menschen vorkommen. Das hier verwendete Sepsismodell ist am ehesten vergleichbar mit einer Sepsis beim Menschen, die in Folge einer intraabdominellen Nahtinsuffizienz in der Darmchirurgie auftritt. Andere ebenfalls sehr häufige *Foci* für die Entwicklung einer Sepsis wie z.B. die Lunge bei einer Pneumonie oder der Urogenitaltrakt bei einer urogenen Sepsis werden mit diesem Modell nicht abgebildet. Hier liegt in der Regel ein anderes mikrobielles Spektrum vor und auch die Dynamik und der Verlauf dieser Sepsisformen unterscheiden sich von dem hier verwendeten Modell.

Der zweite Faktor, der die Übertragbarkeit auf den Menschen einschränkt, ist die generelle Tatsache, dass es sich um ein Tiermodell handelt. Die hier verwendeten Tiere waren Wistar Ratten, die auf einen 1906 von Donaldson am Wistar Institute in den USA ausgewählten Rattenstamm zurückgehen. Es sind also spezielle Züchtungen für Labor- und Forschungszwecke. Bei Labortieren werden interindividuelle Unterschiede weitestgehend eliminiert, was die wissenschaftliche Untersuchung und Auswertbarkeit erleichtert, da die interne Validität gesteigert wird. Darunter leidet jedoch die externe Validität, denn Menschen sind interindividuell sehr verschieden. Häufig bestehen beim Menschen verschiedene mehr oder minder schwere Grunderkrankungen, die die jeweilige Person für verschiedene Erkrankungen oder Verläufe wesentlich empfänglicher machen. Außerdem spielen auch geschlechtsspezifische Unterschiede eine Rolle. In der durchgeführten Untersuchung fanden nur männliche Ratten Verwendung. Geschlechterspezifische Unterschiede wurden daher nicht berücksichtigt und erschweren eine Übertragbarkeit auf den Menschen ebenfalls.

Ob und in welcher Weise die hier gefundenen Ergebnisse außerdem eine praktische Relevanz haben, müssen weitere Untersuchungen – auch klinische Untersuchungen beim Menschen – erst zeigen.

Unsere Untersuchungen tragen weiter zum Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge einer Sepsis und deren Beeinflussbarkeit durch Hyperkapnie bei. Jedoch werfen unsere teils widersprüchlichen Beobachtungen auch neue Fragen auf, die es durch weitere Untersuchungen zu beantworten gilt. Festhalten kann man aber, dass die Hyperkapnie weder eindeutig nur positiven noch nur negative Effekte besitzt, sondern komplex in die Homöostase unserer Sepsismarker eingreift.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Engel C, Brunkhorst FM, Bone H-G, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, u. a. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* April 2007;33(4):606–18.
2. Gustot T. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr Opin Crit Care.* April 2011;17(2):153–9.
3. Hagel S, Brunkhorst F. Sepsis. *Intensivmed.* 1. Februar 2011;48(1):57–73.
4. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* Juni 1992;20(6):864–74.
5. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, u. a. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 28. März 2003;29(4):530–8.
6. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, u. a. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 23. Februar 2016;315(8):801–10.
7. Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K. [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist.* August 2006;55(8):835–45.
8. Fortin CF, McDonald PP, Fülöp T, Lesur O. SEPSIS, LEUKOCYTES, AND NITRIC OXIDE (NO). *Shock.* April 2010;33(4):344–52.
9. Lepper PM, Trautmann M. Sepsis. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S, Herausgeber. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* Springer Berlin Heidelberg; 2009. S. 780–6.
10. Moerer O, Quintel M. [Sepsis in adult patients - definitions, epidemiology and economic aspects]. *Internist (Berl).* Juli 2009;50(7):788, 790–4, 796–8.
11. SepNet Critical Care Trials Group. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med.* Dezember 2016;42(12):1980–9.
12. Bochud P-Y, Calandra T. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ.* 1. Februar 2003;326(7383):262–6.
13. Matzinger P. An innate sense of danger. *Seminars in Immunology.* 1. Oktober 1998;10(5):399–415.
14. Kang J-W, Kim S-J, Cho H-I, Lee S-M. DAMPs activating innate immune responses in sepsis. *Ageing Research Reviews.* November 2015;24, Part A:54–65.
15. Kovach MA, Standiford TJ. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* Juni 2012;25(3):321–7.
16. Novotny AR, Reim D, Assfalg V, Altmayr F, Friess HM, Emmanuel K, u. a. Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology.* Juni 2012;217(6):616–21.

17. Müller-Werdan U, Werdan K. [End-organ damage in inflammation and sepsis]. *Internist (Berl)*. Juli 2003;44(7):864–71.
18. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *The Lancet*, Saturday 12 August 1967. *Crit Care Resusc*. März 2005;7(1):60–1.
19. Max M, Dembinski R. Permissive Hyperkapnie und Bauchlage – Therapiestrategien des ARDS. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 1999;36(1):S035–8.
20. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*. Januar 1998;157(1):294–323.
21. Hickling KG, Walsh J, Henderson S, Jackson R. Low mortality rate in adult respiratory distress syndrome using low-volume, pressure-limited ventilation with permissive hypercapnia: a prospective study. *Crit Care Med*. Oktober 1994;22(10):1568–78.
22. Amato MBP, Barbas CSV, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, u. a. Effect of a Protective-Ventilation Strategy on Mortality in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(6):347–54.
23. Ijland MM, Heunks LM, van der Hoeven JG. Bench-to-bedside review: Hypercapnic acidosis in lung injury - from „permissive“ to „therapeutic“. *Crit Care*. 2010;14(6):137.
24. Contreras M, Masterson C, Laffey JG. Permissive hypercapnia: what to remember. *Curr Opin Anaesthesiol*. Februar 2015;28(1):26–37.
25. Schwartges I, Schwarte LA, Fournell A, Scheeren TWL, Picker O. Hypercapnia induces a concentration-dependent increase in gastric mucosal oxygenation in dogs. *Intensive Care Med*. Oktober 2008;34(10):1898–906.
26. Schwartges I, Picker O, Beck C, Scheeren TWL, Schwarte LA. Hypercapnic acidosis preserves gastric mucosal microvascular oxygen saturation in a canine model of hemorrhage. *Shock*. Dezember 2010;34(6):636–42.
27. Akca OMD, Doufas AGMD, Morioka NMD, Iscoe SPD, Fisher JMD, Sessler DIMD. Hypercapnia Improves Tissue Oxygenation. *Anesthesiology* October 2002. 2002;97(4):801–6.
28. Nichol AD, O’Cronin DF, Howell K, Naughton F, O’Brien S, Boylan J, u. a. Infection-induced lung injury is worsened after renal buffering of hypercapnic acidosis. *Crit Care Med*. November 2009;37(11):2953–61.
29. Curley G, Contreras M, Nichol AD, Higgins BD, Laffey JG. Hypercapnia and Acidosis in Sepsis. *Anesthesiology*. Februar 2010;112(2):462–72.
30. West MA, Hackam DJ, Baker J, Rodriguez JL, Bellingham J, Rotstein OD. Mechanism of decreased in vitro murine macrophage cytokine release after exposure to carbon dioxide: relevance to laparoscopic surgery. *Ann Surg*. August 1997;226(2):179–90.
31. Takeshita K, Suzuki Y, Nishio K, Takeuchi O, Toda K, Kudo H, u. a. Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. Juli 2003;29(1):124–32.
32. Kimura D, Totapally BR, Raszynski A, Ramachandran C, Torbati D. The effects of CO<sub>2</sub> on cytokine concentrations in endotoxin-stimulated human whole blood. *Crit Care Med*. Oktober 2008;36(10):2823–7.

33. Emeis M, Sonntag J, Willam C, Strauss E, Walka MM, Obladen M. Acidosis activates complement system in vitro. *Mediators Inflamm.* 1998;7(6):417–20.
34. Hecke F, Hoehn T, Strauss E, Obladen M, Sonntag J. In-vitro activation of complement system by lactic acidosis in newborn and adults. *Mediators Inflamm.* Februar 2001;10(1):27–31.
35. Costello J, Higgins B, Contreras M, Chonghaile MN, Hassett P, O’Toole D, u. a. Hypercapnic acidosis attenuates shock and lung injury in early and prolonged systemic sepsis. *Crit Care Med.* August 2009;37(8):2412–20.
36. 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.* 15. Januar 2008;177(2):178–83.
37. Stübs CCM, Picker O, Schulz J, Obermiller K, Barthel F, Hahn A-M, u. a. Acute, short-term hypercapnia improves microvascular oxygenation of the colon in an animal model of sepsis. *Microvascular Research.*
38. Hoetzel A, Schmidt R. [Carbon monoxide--poison or potential therapeutic?]. *Anaesthesist.* Oktober 2006;55(10):1068–79.
39. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oktober 1968;61(2):748–55.
40. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 27. Februar 1987;235(4792):1043–6.
41. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* August 2003;24(8):449–55.
42. Bauer I, Pannen BHJ. Bench-to-bedside review: Carbon monoxide--from mitochondrial poisoning to therapeutic use. *Crit Care.* 2009;13(4):220.
43. Nakagami T, Toyomura K, Kinoshita T, Morisawa S. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochim Biophys Acta.* 3. Oktober 1993;1158(2):189–93.
44. Chiu H, Brittingham JA, Laskin DL. Differential induction of heme oxygenase-1 in macrophages and hepatocytes during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat: effects of hemin and biliverdin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1. Juni 2002;181(2):106–15.
45. Djoussé L, Levy D, Cupples LA, Evans JC, D’Agostino RB, Ellison RC. Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the Framingham offspring study. *Am J Cardiol.* 15. Mai 2001;87(10):1196–200; A4, 7.
46. Eisenstein RS, Blemings KP. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. *J Nutr.* Dezember 1998;128(12):2295–8.
47. Eisenstein RS, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN. Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1. Februar 1991;88(3):688–92.
48. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, u. a. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem.* 5. September 1992;267(25):18148–53.

49. Soares MP, Seldon MP, Gregoire IP, Vassilevskaia T, Berberat PO, Yu J, u. a. Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J Immunol.* 15. März 2004;172(6):3553–63.
50. Morita T, Mitsialis SA, Koike H, Liu Y, Kourembanas S. Carbon monoxide controls the proliferation of hypoxic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 26. Dezember 1997;272(52):32804–9.
51. Furchgott RF, Jothianandan D. Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels.* 1991;28(1–3):52–61.
52. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:517–54.
53. McCoubrey WK Jr, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem.* 15. Juli 1997;247(2):725–32.
54. Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, u. a. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene.* 21. Juli 2004;336(2):241–50.
55. Braggins PE, Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 15. Dezember 1986;141(2):528–33.
56. Takahashi S, Takahashi Y, Ito K, Nagano T, Shibahara S, Miura T. Positive and negative regulation of the human heme oxygenase-1 gene expression in cultured cells. *Biochim Biophys Acta.* 28. Oktober 1999;1447(2–3):231–5.
57. Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito AJ, Shen XD, u. a. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* Dezember 1999;104(11):1631–9.
58. Rizzardini M, Terao M, Falciani F, Cantoni L. Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver. Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. *Biochem J.* 1. März 1993;290 ( Pt 2):343–7.
59. Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca<sup>2+</sup>, and phospholipase A2 in endothelial cells. *Am J Physiol.* Mai 1999;276(5 Pt 2):H1493-1501.
60. Terry CM, Clikeman JA, Hoidal JR, Callahan KS. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha on heme oxygenase-1 expression in human endothelial cells. *Am J Physiol.* März 1998;274(3 Pt 2):H883-891.
61. Fujii H, Takahashi T, Nakahira K, Uehara K, Shimizu H, Matsumi M, u. a. Protective role of heme oxygenase-1 in the intestinal tissue injury in an experimental model of sepsis. *Crit Care Med.* März 2003;31(3):893–902.
62. Ryter SW, Kim HP, Nakahira K, Zuckerbraun BS, Morse D, Choi AMK. Protective functions of heme oxygenase-1 and carbon monoxide in the respiratory system. *Antioxid Redox Signal.* Dezember 2007;9(12):2157–73.

63. Pang Q-F, Zhou Q-M, Zeng S, Dou L-D, Ji Y, Zeng Y-M. Protective effect of heme oxygenase-1 on lung injury induced by erythrocyte instillation in rats. *Chin Med J*. 5. September 2008;121(17):1688–92.
64. Cheng C-F, Lian W-S, Chen S-H, Lai P-F, Li H-F, Lan Y-F, u. a. Protective effects of adiponectin against renal ischemia-reperfusion injury via prostacyclin-PPAR $\alpha$ -heme oxygenase-1 signaling pathway. *J Cell Physiol*. Januar 2012;227(1):239–49.
65. Durante W. Protective role of heme oxygenase-1 against inflammation in atherosclerosis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:2372–88.
66. Uc A, Zhu X, Wagner BA, Buettner GR, Berg DJ. Heme oxygenase-1 is protective against nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric ulcers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. April 2012;54(4):471–6.
67. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 27. November 1980;288(5789):373–6.
68. Zingarelli B, Hasko G, Salzman AL, Szabo C. Effects of a novel guanylyl cyclase inhibitor on the vascular actions of nitric oxide and peroxynitrite in immunostimulated smooth muscle cells and in endotoxic shock. *Critical Care Medicine* September 1999. 1999;27(9):1701–7.
69. Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta*. 18. August 1993;1178(2):153–75.
70. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer; 2007. S. 801–2.
71. Cauwels A. Nitric oxide in shock. *Kidney International*. 2007;72(5):557–65.
72. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. Juli 2004;5(7):522–31.
73. Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol*. August 2009;9(4):514–20.
74. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, u. a. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 28. Februar 2008;451(7182):1125–9.
75. Yu C-H, Xu C-F, Li Y-M. Association of MicroRNA-223 expression with hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Dig Dis Sci*. November 2009;54(11):2362–6.
76. Wong QW-L, Lung RW-M, Law PT-Y, Lai PB-S, Chan KY-Y, To K-F, u. a. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology*. Juli 2008;135(1):257–69.
77. Wang J, Yu M, Yu G, Bian J, Deng X, Wan X, u. a. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 26. März 2010;394(1):184–8.
78. Benz F, Tacke F, Luedde M, Trautwein C, Luedde T, Koch A, u. a. Circulating MicroRNA-223 Serum Levels Do Not Predict Sepsis or Survival in Patients with Critical Illness,

- Circulating MicroRNA-223 Serum Levels Do Not Predict Sepsis or Survival in Patients with Critical Illness. *Disease Markers*, *Disease Markers*. 24. Februar 2015;2015, 2015:e384208.
79. Benz F, Roy S, Trautwein C, Roderburg C, Luedde T. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *International Journal of Molecular Sciences*. 9. Januar 2016;17(1):78.
80. Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol*. 15. September 2005;175(6):3463–8.
81. Wiersinga WJ. Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets. *Curr Opin Crit Care*. Oktober 2011;17(5):480–6.
82. Pierrakos C, Vincent J-L. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*. 2010;14(1):R15.
83. Patel RT, Deen KI, Youngs D, Warwick J, Keighley MR. Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. *Br J Surg*. September 1994;81(9):1306–8.
84. Selberg O, Hecker H, Martin M, Klos A, Bautsch W, Köhl J. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med*. August 2000;28(8):2793–8.
85. Scumpia PO, Moldawer LL. Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med*. Dezember 2005;33(12 Suppl):S468-471.
86. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med*. Januar 2002;30(1 Suppl):S58-63.
87. Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: Lessons from neutrophils. *European Journal of Immunology*. 2010;40(9):2360–2368.
88. Grütz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol*. 1. Januar 2005;77(1):3–15.
89. Tamassia N, Calzetti F, Menestrina N, Rossato M, Bazzoni F, Gottin L, u. a. Circulating neutrophils of septic patients constitutively express IL-10R1 and are promptly responsive to IL-10. *Int Immunol*. 1. April 2008;20(4):535–41.
90. Marchant A, Devière J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M. Interleukin-10 production during septicemia. *Lancet*. 19. März 1994;343(8899):707–8.
91. Rahman MM, McFadden G. Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLoS Pathog*. 24. Februar 2006;2(2):e4.
92. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. Mai 2005;115(1):1–20.
93. Schrag B, Roux-Lombard P, Schneiter D, Vaucher P, Mangin P, Palmiere C. Evaluation of C-reactive protein, procalcitonin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 as diagnostic parameters in sepsis-related fatalities. *Int J Legal Med*. 1. Juli 2012;126(4):505–12.

94. Heper Y, Akalin EH, Mistik R, Akgöz S, Töre O, Göral G, u. a. Evaluation of serum C-reactive protein, procalcitonin, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-10 levels as diagnostic and prognostic parameters in patients with community-acquired sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1. August 2006;25(8):481–91.
95. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, u. a. Diagnostic Value of Procalcitonin, Interleukin-6, and Interleukin-8 in Critically Ill Patients Admitted with Suspected Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 8. Januar 2001;164(3):396–402.
96. Kurt ANC, Aygun AD, Godekmerdan A, Kurt A, Dogan Y, Yilmaz E. Serum IL-1beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis. *Mediators Inflamm*. 2007;2007:31397.
97. Kumar S, Rizvi M. Prognostic serum tumor necrosis factor- $\alpha$  in paediatric patients with sepsis. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 1. Juli 2009;3(06).
98. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal Models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*. Oktober 2005;4(10):854–65.
99. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*. April 2006;27(2–3):126–39.
100. Lottspeich F. *Bioanalytik*. Heidelberg.: Spektrum; 2012.
101. Applied biosystems, Herausgeber. High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix-Protokoll. 2010.
102. Applied biosystems, Herausgeber. TaqMan® MicroRNA Assays-Protokoll. 2011.
103. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit*. 2007;37(2):120–126.
104. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. Mai 2008;14(5):844–52.
105. Zhu H-T, Dong Q-Z, Wang G, Zhou H-J, Ren N, Jia H-L, u. a. Identification of Suitable Reference Genes for qRT-PCR Analysis of Circulating microRNAs in Hepatitis B Virus-Infected Patients. *Mol Biotechnol*. 1. Januar 2012;50(1):49–56.
106. Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum. Sonderausgabe PCR*, 10(2004):92–5.
107. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 11. Januar 1951;193(1):265–75.
108. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. Oktober 2009;119(10):2868–78.
109. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Hüser N, u. a. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock*. Juni 2004;21(6):505–11.

110. Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, Maier S, Gründling M, Grisk O, u. a. Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock*. Juli 2007;28(1):59–64.
111. Chen Z-L, Song Y-L, Hu Z-Y, Zhang S, Chen Y-Z. An estimation of mechanical stress on alveolar walls during repetitive alveolar reopening and closure. *J Appl Physiol*. 1. August 2015;119(3):190–201.
112. Bein T, Weber-Carstens S, Goldmann A, Müller T, Staudinger T, Brederlau J, u. a. Lower tidal volume strategy ( $\approx 3$  ml/kg) combined with extracorporeal CO<sub>2</sub> removal versus 'conventional' protective ventilation (6 ml/kg) in severe ARDS. *Intensive Care Med*. Mai 2013;39(5):847–56.
113. Tian Y, Gawlak G, O'Donnell JJ, Mambetsariev I, Birukova AA. Modulation of Endothelial Inflammation by Low and High Magnitude Cyclic Stretch. *PLoS ONE*. 2016;11(4):e0153387.
114. Curley G, Hayes M, Laffey JG. Can „permissive“ hypercapnia modulate the severity of sepsis-induced ALI/ARDS? *Crit Care*. 2011;15(2):212.
115. Suliburk J, Helmer K, Moore F, Mercer D. The gut in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. Enzyme systems fighting multiple organ failure. *Eur Surg Res*. 2008;40(2):184–9.
116. Pritts T, Hungness E, Wang Q, Robb B, Hershko D, Hasselgren P-O. Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia - role of transcription factors and regulation by the stress response. *The American Journal of Surgery*. April 2002;183(4):372–83.
117. Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry D, Maier RV. Multiple-organ-failure syndrome. *Arch Surg*. Februar 1986;121(2):196–208.
118. Clark JA, Coopersmith CM. Intestinal crosstalk – a new paradigm for understanding the gut as the “motor” of critical illness. *Shock*. Oktober 2007;28(4):384–93.
119. Klingensmith NJ, Coopersmith CM. The Gut as the Motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness. *Crit Care Clin*. April 2016;32(2):203–12.
120. Yan J, Li S, Li S. The role of the liver in sepsis. *Int Rev Immunol*. 2014;33(6):498–510.
121. Canabal JM, Kramer DJ. Management of sepsis in patients with liver failure. *Curr Opin Crit Care*. April 2008;14(2):189–97.
122. Kramer L, Jordan B, Druml W, Bauer P, Metnitz PGH, Austrian Epidemiologic Study on Intensive Care, ASDI Study Group. Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients--a prospective multicenter study. *Crit Care Med*. April 2007;35(4):1099–104.
123. O’Croinin D, Ni Chonghaile M, Higgins B, Laffey JG. Bench-to-bedside review: Permissive hypercapnia. *Crit Care*. Februar 2005;9(1):51–9.
124. Kavanagh BP, Laffey JG. Hypercapnia: permissive and therapeutic. *Minerva Anesthesiol*. Juni 2006;72(6):567–76.
125. Swenson ER. Sepsis and Therapeutic Hypercapnia. *Anesthesiology*. Februar 2010;112(2):269–71.

126. Sommer K, Sander AL, Albig M, Weber R, Henrich D, Frank J, u. a. Delayed Wound Repair in Sepsis Is Associated with Reduced Local Pro-Inflammatory Cytokine Expression. *PLoS One*. 25. September 2013;8(9).
127. Norozian FM, Leoncio M, Torbati D, Meyer K, Raszynski A, Totapally BR. Therapeutic hypercapnia enhances the inflammatory response to endotoxin in the lung of spontaneously breathing rats. *Crit Care Med*. Juni 2011;39(6):1400–6.
128. Sewnath ME, Olszyna DP, Birjmohun R, Kate FJW ten, Gouma DJ, Poll T van der. IL-10-Deficient Mice Demonstrate Multiple Organ Failure and Increased Mortality During *Escherichia coli* Peritonitis Despite an Accelerated Bacterial Clearance. *The Journal of Immunology*. 15. Mai 2001;166(10):6323–31.
129. Standiford TJ, Strieter RM, Lukacs NW, Kunkel SL. Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. *J Immunol*. 15. August 1995;155(4):2222–9.
130. Kato T, Murata A, Ishida H, Toda H, Tanaka N, Hayashida H, u. a. Interleukin 10 reduces mortality from severe peritonitis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. Juni 1995;39(6):1336–40.
131. van der Poll T, Marchant A, Buurman WA, Berman L, Keogh CV, Lazarus DD, u. a. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol*. 1. Dezember 1995;155(11):5397–401.
132. Gao W, Liu D-D, Li D, Cui G. Effect of Therapeutic Hypercapnia on Inflammatory Responses to One-lung Ventilation in Lobectomy Patients. *Anesthesiology*. 1. Juni 2015;122(6):1235–52.
133. Meyer J, Traber LD, Nelson S, Lentz CW, Nakazawa H, Herndon DN, u. a. Reversal of hyperdynamic response to continuous endotoxin administration by inhibition of NO synthesis. *J Appl Physiol*. Juli 1992;73(1):324–8.
134. Strunk V, Hahnenkamp K, Schneuing M, Fischer LG, Rich GF. Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. *Anesth Analg*. März 2001;92(3):681–7.
135. Petros A, Lamb G, Leone A, Moncada S, Bennett D, Vallance P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res*. Januar 1994;28(1):34–9.
136. Razavi HM, Wang LF, Weicker S, Rohan M, Law C, McCormack DG, u. a. Pulmonary Neutrophil Infiltration in Murine Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1. August 2004;170(3):227–33.
137. Mustafa SB, Olson MS. Effects of calcium channel antagonists on LPS-induced hepatic iNOS expression. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1. August 1999;277(2):G351–60.
138. Heemskerk S, Masereeuw R, Russel FGM, Pickkers P. Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*. 11. Januar 2009;5(11):629–40.
139. Ketabchi F, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Egemnazarov B, u. a. Effects of hypercapnia and NO synthase inhibition in sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir Res*. 2012;13(1):7.

140. Maamoun H, Zachariah M, McVey JH, Green FR, Agouni A. Heme oxygenase (HO)-1 induction prevents Endoplasmic Reticulum stress-mediated endothelial cell death and impaired angiogenic capacity. *Biochem Pharmacol.* 1. März 2017;127:46–59.
141. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:3221–47.
142. Rensing H, Bauer I, Datene V, Pätou C, Pannen BH, Bauer M. Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-II and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med.* Dezember 1999;27(12):2766–75.
143. Saukkonen K, Lakkisto P, Kaunisto MA, Varpula M, Voipio-Pulkki L-M, Varpula T, u. a. Heme oxygenase 1 polymorphisms and plasma concentrations in critically ill patients. *Shock.* Dezember 2010;34(6):558–64.
144. Li Y, Li Q, Chen H, Wang T, Liu L, Wang G, u. a. Hydrogen Gas Alleviates the Intestinal Injury Caused by Severe Sepsis in Mice by Increasing the Expression of Heme Oxygenase-1. *Shock.* Juli 2015;44(1):90–8.
145. Li Y, Xie K, Chen H, Wang G, Yu Y. Hydrogen gas inhibits high-mobility group box 1 release in septic mice by upregulation of heme oxygenase 1. *J Surg Res.* 1. Juni 2015;196(1):136–48.
146. Fujioka K, Kalish F, Zhao H, Lu S, Wong S, Wong RJ, u. a. Induction of Heme Oxygenase-1 Attenuates the Severity of Sepsis in a Non-Surgical Preterm Mouse Model. *Shock.* Februar 2017;47(2):242–50.
147. Cao T, Jin S, Fei D, Kang K, Jiang L, Lian Z, u. a. Artesunate Protects Against Sepsis-Induced Lung Injury Via Heme Oxygenase-1 Modulation. *Inflammation.* April 2016;39(2):651–62.
148. Chung SW, Liu X, Macias AA, Baron RM, Perrella MA. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice. *J Clin Invest.* Januar 2008;118(1):239–47.
149. Aziz F. The emerging role of miR-223 as novel potential diagnostic and therapeutic target for inflammatory disorders. *Cellular Immunology.* Mai 2016;303:1–6.
150. Schulz JW. Auswirkungen einer moderaten Hyperkapnie auf die Immunmodulation des Organismus im septischen Tiermodell. Promotion an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2016.
151. Coakley RJ, Taggart C, Greene C, McElvaney NG, O’Neill SJ. Ambient pCO<sub>2</sub> modulates intracellular pH, intracellular oxidant generation, and interleukin-8 secretion in human neutrophils. *J Leukoc Biol.* April 2002;71(4):603–10.

## 8 Anhang

Tabelle 32: Übersicht verwendete cDNA-Verdünnungen

| Organ  | Zielgen | gewählte Verdünnung |
|--------|---------|---------------------|
| Leber  | iNOS    | 1:50                |
|        | GAP     | 1:10                |
| Lunge  | GAP     | 1:50                |
|        | HO-1    | 1:50                |
|        | miR-223 | 1:50                |
|        | iNOS    | 1:10                |
|        | U6      | 1:20                |
|        |         |                     |
| Caecum | GAP     | 1:100               |
|        | HO-1    | 1:50                |
|        | IL-10   | 1:10                |
|        | IL-6    | 1:10                |
|        | miR-223 | 1:20                |
|        | iNOS    | 1:50                |
|        | U6      | 1:20                |

Tabelle 33: Übersicht der verwendeten Gele für die Western-Blots

| Marker | Organ | % Gel |
|--------|-------|-------|
| HO-1   | Leber | 10 %  |
|        | Lunge | 10 %  |
| iNOS   | Leber | 7,5 % |
|        | Lunge | 7,5 % |

## 9 Abbildungsverzeichnis

|               |  |    |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1:  | Schematische Darstellung des colon ascendens stent peritonitis-Modells (CASP) zur Induktion einer Sepsis (98)..... | 28 |
| Abbildung 2:  | Beispiel für ein RNA-Intaktheitsgel.....   | 31 |
| Abbildung 3:  | Relative Expression von IL-6 mRNA im Caecum.....   | 43 |
| Abbildung 4:  | Relative Expression von IL-10 mRNA im Caecum.....  | 44 |
| Abbildung 5:  | Relative Expression von iNOS mRNA im Caecum.....   | 45 |
| Abbildung 6:  | Relative Expression von HO-1 mRNA im Caecum.....   | 46 |
| Abbildung 7:  | Relative Expression von miR-223 im Caecum.....   | 47 |
| Abbildung 8:  | Anzahl der ASD-positiven Zellen pro mikroskopischen Sichtfeld.....   | 48 |
| Abbildung 9:  | Bilder A-D, Beispielhafte Darstellungen der ASD-Färbung.....   | 50 |
| Abbildung 10: | Relative Expression von IL-10 mRNA in der Leber.....   | 51 |
| Abbildung 11: | Relative Expression von iNOS mRNA in der Leber.....  | 53 |
| Abbildung 12: | Relative Expression von HO-1 mRNA in der Leber.....  | 54 |
| Abbildung 13: | Relative Expressionsmenge von HO-1 Protein in der Leber.....   | 55 |
| Abbildung 14: | HO-1-Proteinexpression in der Leber.....   | 56 |
| Abbildung 15: | Relative Expression von iNOS mRNA in der Lunge.....  | 57 |
| Abbildung 16: | Relative Expression von HO-1 mRNA in der Lunge.....  | 58 |
| Abbildung 17: | Relative Expressionsmenge von HO-1 Protein in der Lunge.....   | 59 |
| Abbildung 18: | Relative Expression von miR-223 in der Lunge.....  | 60 |

## 10 Tabellenverzeichnis

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Tabelle 1:  | Geräte und Verbrauchsmaterial.....  | 19 |
| Tabelle 2:  | Chemikalien und Lösungen.....   | 20 |
| Tabelle 3:  | Primer / Assays / Antikörper / Marker .....   | 22 |
| Tabelle 4:  | Allgemeine Lösungen.....  | 23 |
| Tabelle 5:  | Lösungen für RNA-Isolierung.....  | 23 |
| Tabelle 6:  | Lösungen für ASD-Färbung .....  | 24 |
| Tabelle 7:  | Lösungen für Ganzzellextraktion .....   | 25 |
| Tabelle 8:  | Lösungen für PAA-Gele des Western-Blot .....  | 25 |
| Tabelle 9:  | Chemikalien für Trenngel.....   | 26 |
| Tabelle 10: | Chemikalien für Sammelgel .....   | 26 |
| Tabelle 11: | Lösungen für Elektrophorese und Transfer des Western-Blot .....                                 | 26 |
| Tabelle 12: | Lowry Reagenzien und Lösungen .....   | 27 |
| Tabelle 13: | Protokoll des Thermocyclers für die reverse Transkription für die mRNA<br>Untersuchungen.....   | 32 |
| Tabelle 14: | Chemikalien des Master Mix für die Reverse Transkription der miRNA.....                         | 32 |
| Tabelle 15: | Protokoll des Thermocyclers für die reverse Transkription für die miRNA-<br>Untersuchungen..... | 32 |
| Tabelle 16: | Chemikalien des Master Mix für die mRNA Expressionsuntersuchung.....                            | 34 |
| Tabelle 17: | Chemikalien des Master Mix für die miRNA Expressionsuntersuchungen.....                         | 34 |
| Tabelle 18: | Reaktionsbedingungen für qPCR .....   | 36 |
| Tabelle 19: | Relative Expression der IL-6 mRNA im Caecum .....   | 42 |
| Tabelle 20: | Relative Expression der IL-10 mRNA im Caecum .....  | 44 |
| Tabelle 21: | Relative Expression der iNOS mRNA im Caecum .....   | 45 |
| Tabelle 22: | Relative Expression der HO-1 mRNA im Caecum .....   | 46 |
| Tabelle 23: | Relative Expression der miR-223 im Caecum.....  | 47 |
| Tabelle 24: | Relative Expression der IL-10 mRNA in der Leber.....  | 51 |
| Tabelle 25: | Relative Expression der iNOS mRNA in der Leber.....   | 52 |
| Tabelle 26: | Relative Expression der HO-1 mRNA in der Leber.....   | 53 |
| Tabelle 27: | HO-1 Protein in der Leber .....   | 55 |
| Tabelle 28: | Relative Expression der iNOS mRNA in der Lunge.....   | 57 |
| Tabelle 29: | Relative Expression der HO-1 mRNA in der Lunge.....   | 58 |
| Tabelle 30: | HO-1 Protein in der Lunge .....   | 59 |
| Tabelle 31: | Relative Expression der miR-223 in der Lunge .....  | 60 |
| Tabelle 32: | Übersicht verwendete cDNA-Verdünnungen.....   | 86 |
| Tabelle 33: | Übersicht der verwendeten Gele für die Western-Blots .....                                      | 86 |

## Danksagung

Ich danke Herrn Klinikdirektor Univ.-Prof. Dr. B. Pannen sowie Frau Prof. Dr. I. Bauer und Herrn Oberarzt Prof. Dr. O. Picker für die Möglichkeit, meine Arbeit in der experimentellen Anästhesiologie anfertigen zu dürfen. Ich danke ganz besonders meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Inge Bauer für Ihre immerwährende Unterstützung, die auch in den anstrengenden Phasen meiner Arbeit stets ein offenes Ohr und einen guten Rat für mich hatte.

Im Besonderen möchte ich auch unserer ehemaligen Tiermedizinerin Dr. Charlotte Kolodzey danken, durch deren Arbeit die vorliegende Dissertation überhaupt erst ermöglicht wurde und die mir vor allem zu Beginn meiner Untersuchungen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem gilt Franziska Barthel mein ganz besonderer Dank, die mich zum zügigen Abschluss der Untersuchungen enorm unterstützt hat und es immer wieder verstand, mich mit einem positiven Wort zu motivieren. Weiter möchte ich mich bei Dr. Jan Schulz bedanken, der mir die Einarbeitung im Labor enorm erleichtert hat.

Ich danke den technischen Assistentinnen Yvonne Grueber, Claudia Dohle, Birgitt Berke und Antje Nebert für Ihre tatkräftige Unterstützung in allen technischen Angelegenheiten und für Ihre unermüdlichen Erklärungen und Anleitungen.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Ehefrau, die mich in jeder Phase dieser Arbeit nach Kräften unterstützt haben.