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

Veränderungen der mitochondrialen Funktion in der Leber im Verlauf einer Sepsis von 96 Stunden

Dissertation

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

vorgelegt von Henrike Hedda Papenbrock

2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker Erstgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Für meine Familie, die immer an mich geglaubt hat

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Herminghaus, A., Papenbrock, H., Eberhardt, R., Vollmer, C., Truse, R., Schulz, J., Bauer, I., Weidinger, A., Kozlov, A., Stiban, J., Picker, O., Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Medicine Experimental* **7**, 4 (2019).

Zusammenfassung

Sepsis stellt eine große Herausforderung in der intensivmedizinischen Behandlung dar. Die mitochondriale Dysfunktion wird als eine der Hauptursachen für die Entstehung eines Sepsisinduzierten Multiorganversagens angesehen. In der Leber führt eine moderate Sepsis bereits nach 24 Stunden (h) zu einer mitochondrialen Dysfunktion. Dabei nimmt die Krankheitsschwere septischer Tiere ohne laborchemische Zeichen einer Organschädigung zu. Unklar ist jedoch, wie sich die Funktion von hepatischen Mitochondrien im längeren Zeitverlauf einer Sepsis verhält. Ziel dieser Arbeit ist es daher zu untersuchen, ob und zu welchem Zeitpunkt die mitochondriale Funktion im Verlauf einer Sepsis von 96 h beeinträchtigt ist.

Dazu wurden 95 männliche Wistar-Ratten in eine CASP- und in eine Sham-Gruppe randomisiert. Den CASP-Tieren wurde ein Stent in das *Colon ascendens* implantiert und dadurch eine polymikrobielle Sepsis induziert, während der Stent bei den Sham-Tieren an die Wand des *Colon ascendens* angenäht wurde. Neun gesunde Tiere dienten als Kontrolle. Die mitochondriale Funktion in der Leber wurde jeweils 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Operation mittels Respirometrie nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I und Komplex II gemessen. Die Aktivitäten der Leberenzyme (Aspartat-Amino-Transferase, Alanin-Amino-Transferase, Laktatdehydrogenase) sowie die Nierenfunktionsparameter (Kreatinin, Harnstoff) wurden im Blutplasma bestimmt und die Malondialdehyd-Konzentration in der Leber als Biomarker für oxidativen Stress berechnet.

Die Krankheitsschwere septischer Tiere nahm im Verlauf zu mit einem Maximum bei 48 h und bei 96 h. In der frühen postoperativen Phase septischer Tiere kam es zudem zu einem Anstieg der Harnstoffkonzentration, ein wichtiger Parameter der Organschädigung. Nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I stiegen bei CASP-Tieren der *Respiratory Control Index* sowie der ADP/O-Quotient als Parameter der mitochondrialen Funktion nach 24 h gegenüber Kontrolltieren und nach 48 h gegenüber Sham-operierten Tieren an. Nach Stimulation der Atmungskette über Komplex II stieg der *Respiratory Control Index* nach 24 h sowohl bei CASP- als auch bei Sham-operierten Tieren an. Die Malondialdehyd-Konzentration in der Leber stieg nach 24 h in septischen und aseptischen Tieren an und fiel in beiden Gruppen nach 96 h ab.

Zusammenfassend führt eine CASP-Operation zur Induktion einer moderaten Sepsis mit Beeinträchtigung des Gesundheitszustands septischer Tiere. Die mitochondriale Funktion sowie die Malondialdehyd-Konzentration werden bereits durch eine sterile Laparotomie zeitabhängig verändert und durch eine moderate Sepsis nur geringfügig modifiziert. Die gesteigerte Funktion der Lebermitochondrien in der frühen postoperativen Phase kann als Kompensationsmechanismus im Rahmen der Sepsis gesehen werden.

Summary

Sepsis remains a major challenge in intensive care. Mitochondrial dysfunction is considered as the main pathophysiological mechanism leading to sepsis-induced multiorgan failure. In hepatocytes, a sepsis leads to mitochondrial dysfunction 24 hours (h) after sepsis induction, including an increase in animal illness yet without any biochemical signs of organ dysfunction. However, the behavior of hepatic mitochondria in the event of sepsis has not yet been examined over the course of 96 h. The aim of this study is to analyze if and at what time hepatic mitochondrial function is most affected.

For this purpose, 95 male Wistar rats were randomized into a CASP and a Sham group. In the CASP group, a stent of 14 G was implanted in the gut to induce a sepsis whereas in the Sham group the stent was attached to the outside wall of the gut. 9 animals served as the control group and remained untouched and healthy. After stimulating complexes I and II of the mitochondrial respiratory chain, the mitochondrial function was measured using respirometry 24 h, 48 h, 72 h and 96 h after the operation. The activity of liver enzymes (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase) and parameters of kidney function (creatinine and urea) were measured in the blood plasm. The malondialdehyde concentration in the hepatocytes served as a measure for oxidative stress.

Illness of septic animals increased over time peaking at 48 h after sepsis induction. Urea, a key parameter for kidney injury, increased in the early postoperative phase of the CASP group. After stimulating complex I of the mitochondrial respiratory chain of CASP group animals, both respiratory control index and ADP/O ratio, parameters for mitochondrial function, increased 24 h after sepsis induction compared to healthy animals. Versus Sham operated animals, the difference in both parameters peaked at 48 h after sepsis induction. After stimulating complex II of the mitochondrial respiratory chain, the respiratory control index of both CASP and Sham operated animals increased 24 h after sepsis induction compared to healthy animals. Concentration of malondialdehyde in hepatocytes increased 24 h after sepsis induction in both CASP and Sham operated animals and fell again in both groups after 96 h.

Overall, our study confirmed that a CASP operation induces a moderate sepsis while deteriorating the septic animals' state of health. Mitochondrial function and malondialdehyde concentration are both affected by a moderate sepsis and, to a lesser extent, by a laparotomy. The increase in hepatic mitochondrial function seems to partly compensate the effects of the enfolding sepsis during the early postoperative phase.

Abkürzungsverzeichnis

3 MODS	3-(N-Morpholino)-1-	FCMO	Extrakorporale
J-101 S	Propansulfonsäure	ECMO	Membranoxygenierung
ACCP	American College of Chest Physicians	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ADP	Adenosindiphosphat	EGTA	Ethylenglycol- bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraessigsäure
ADP/O- Quotient	Menge an zugefügtem Adenosindiphosphat/Menge an verbrauchtem Sauerstoff	FAD/ FADH2	Flavinadenindinukleotid
ALT	Alanin-Amino-Transferase	G	Gauge
APC	Antigenpräsentierende Zelle	GCS	Glasgow Coma Scale
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome	h	Stunde
AST	Aspartat-Amino-Transferase	II-1	Interleukin-1ß
ATP	Adenosintriphosphat	II-4	Interleukin-4
BSA	Bovines Serumalbumin	II-10	Interleukin-10
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis	iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid- Synthase
CLI	Cecal Ligation an Incision	i.p.	Intraperitoneal
CLP	Cecal Ligation and Puncture	KCl	Kaliumchlorid
Cu	Kupfer	KH2PO4	Kaliumhydrogenphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LDH	Laktatdehydrogenase

LPS	Lipopolysaccharid	RNS	Reaktive Stickstoffspezies
MDA	Malondialdehyd	s.c.	Subkutan
min	Minute	SCCM	Society of Critical Care Medicine
MMDS	Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome	SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
MnSOD	Mangansuperoxiddismutase	SOFA	Sequential Organ Failure Asssessment Score
MOV	Multiorganversagen	SRSS	Septic Rat Severity Score
n	Anzahl Tiere pro Versuchsgruppe	ТВА	Thiobarbitursäure
Na ₄ P ₂ O ₇	Tetrasodiumpyrophosphat	TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
NaCl	Natriumchlorid	qSOFA	quick SOFA
NAD ⁺ / NADH	Nikotinamidadenindinukleotid	ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung & wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
NO	Stickstoffmonoxid		
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern		
PRR	Pathogen Recognition Receptor		
RCI	Respiratory Control Index		
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassu	ing	Ι
Summary		Π
Abkürzungsverz	zeichnisI	Π
Inhaltsverzeichr	nis	V
1. Einleitung.		1
1.1 Bedeutu	ng der Sepsis	1
1.2 Definition	onen der Sepsis	1
1.3 Pathoph	ysiologie der Sepsis	2
1.4 Mikrozii	rkulation und Mitochondrien während der Sepsis	2
1.5 Reaktive	e Sauerstoffspezies während der Sepsis	3
1.6 Die Lebe	er – das Organ mit dem höchsten Energiebedarf	4
1.7 Mitocho	ndriale Funktion während der Sepsis	4
2. Fragestellu	ngen der Arbeit	5
3. Material un	nd Methoden	6
3.1 Tierexpe	erimenteller Versuchsteil	6
3.1.1 M	aterialien und Geräte	6
3.1.2 Vo	ersuchstiere	6
3.1.3 Ve	ersuchsablauf	6
3.1.4 C	ASP- und Sham-Operation	7
3.1.5 Or	rganentnahme	9
3.2 Laborex	perimenteller Versuchsteil	9
		V

	3.	2.1	Materialien und Geräte	9
	3.	2.2	Chemikalien	9
	3.	2.3	Herstellung des Leberhomogenats	9
	3.	2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration in der Leber	.10
	3.	2.5	Bestimmung der mitochondrialen Funktion mittels Respirometrie	.11
	3.	2.6	Bestimmung der Malondialdehyd-Konzentration in der Leber	. 12
	3.	2.7	Laborchemische Untersuchung der Blutproben	.14
	3.3	Statis	tik	.14
4.	Eı	rgebnis	sse	.14
4	4.1	Effek	te von CASP- und Sham-Operation auf den SRSS	.14
4	4.2	Effek	te von CASP- und Sham-Operation auf die Serummarker	.15
4	4.3	Effek den A	te von CASP- und Sham-Operation auf den <i>Respiratory Control Index</i> und ADP/O-Quotienten als Parameter der mitochondrialen Funktion der Leber	. 19
4	4.4	Effek	te von CASP- und Sham-Operation auf die Produktion reaktiver	23
5	D	iskussi	ion	.23
	5 1	Meth	odendiskussion	24
•	5.2	Froeh	misdiskussion	25
•	5.2	2 1	Diskussion der Krankheitsentwicklung anhand von SRSS und Serummarkern	.25
	5	2.1	Diskussion der mitochondrialen Funktion in der Leber	23
	5.	2.2	Diskussion der Produktion reaktiver Sauerstoffenozies in der Leber	·~/ 20
(э. с	2.3	Diskussion der Froduktion reaktiver Sauerstonspezies in der Leder	. 29
6.	S	chlusst	olgerungen	.31

7.	Ausblick	
8.	Literatur- und Quellenverzeichnis	
9.	Anhang	
ç	9.1 Materialien und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils	
ç	9.2 Materialien und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils	40
Ç	9.3 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils	43
ç	9.4 Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils	44
	9.4.1 Isolationspuffer	44
	9.4.2 Respirationspuffer	45
	9.4.3 Lösungen für die Proteinkonzentrationsbestimmung	45
	9.4.4 Lösungen für die MDA-Konzentrationsbestimmung	45
Ç	9.5 Septic Rat Severity Score	46
10.). Abbildungsverzeichnis	47
11.	. Tabellenverzeichnis	47

1. Einleitung

1.1 Bedeutung der Sepsis

Das klinische Krankheitsbild der Sepsis mit der Folge eines möglichen Multiorganversagens (MOV) stellt eine der größten Herausforderungen bei der intensivmedizinischen Behandlung vielversprechender von Patienten dar. Trotz zahlreicher Fortschritte in der Therapieentwicklung ist Sepsis mit einer nahezu unverändert hohen Morbidität und Mortalität verbunden 1-5. Mit einer Mortalitätsrate von 24,3 % gehört Sepsis neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Tumorleiden zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland⁶. Die Inzidenz der Sepsis nimmt in Deutschland und in den USA jährlich um durchschnittlich 4,6 % bzw. 13 % zu^{6,7}, dabei übersteigt die Zahl der durch Sepsis bedingten Krankenhauseintritte in den USA die des Myokard- und des Hirninfarkts⁸. Im Jahr 2013 lagen die Kosten der medizinischen Versorgung von Patienten mit Sepsis bei 7,7 Milliarden Euro in Deutschland (6,49 % der Gesamtkosten) und bei 23,7 Milliarden US Dollar in den USA (6,2 % der Gesamtkosten). Sepsis stellt damit einen der teuersten medizinischen Behandlungsanlässe dar 4,9-11

1.2 Definitionen der Sepsis

Im August 1991 gründeten das *American College of Chest Physicians* (ACCP) und die *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) eine *Consensus Conference*, um einheitliche Definitionen zum Thema Sepsis zu erstellen. Sepsis wurde demnach charakterisiert als *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS), d.h. eine umfassende, sich auf den ganzen Körper ausbreitende Entzündungsreaktion auf eine Infektion. Sepsis mit der Folge eines MOV wurde als schwere Sepsis definiert, während die durch Sepsis induzierte Hypotension trotz adäquater Volumensubstitution als septischer Schock beschrieben wurde ¹². Die Definitionen wurden 2003 entsprechend neuer Erkenntnisse überarbeitet ¹³ und innerhalb der *Surviving Sepsis Campaign* von 2012 erneut aufgegriffen ¹⁴. Im Jahr 2016 wurden sie durch eine *Task Force* inhaltlich evaluiert und erneut aktualisiert ¹⁵. Diese definiert Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine inadäquate Immunreaktion der Wirtszelle auf eine Infektion hervorgerufen wird. Der Grad der Organdysfunktion wird mithilfe des *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA)-Scores ermittelt. Dieser beurteilt anhand eines Punktesystems von 0 (normale Funktion) bis 4 (massiv eingeschränkte Funktion) die Funktion folgender sechs Organe bzw. Organsysteme: Respiration (Horowitz-Index), Blutgerinnung (Thrombozyten),

Leber (Bilirubin), Herz-Kreislauf (Hypotonie), zentrales Nervensystem (Glasgow Coma Scale (GCS)) und Niere (Kreatinin). Ein Wert von mehr als zwei Punkten geht mit einem Mortalitätsrisiko von über 10 % einher. Zur schnelleren Diagnostik einer Sepsis im klinischen Alltag wurde der *quick SOFA* (qSOFA)-Score entwickelt. Dieser beurteilt die Vigilanz (GCS < 15), den systolischen Blutdruck (systolischer Blutdruck < 100 mmHg) und die Atemfrequenz (Atemfrequenz > 22/min). Sofern zwei der genannten Kriterien erfüllt sind, ist eine Organdysfunktion wahrscheinlich ¹⁵⁻¹⁷. Die Definition des septischen Schocks beinhaltet zusätzlich das Vorhandensein einer zellulären bzw. metabolischen Dysfunktion. Zu den klinischen Kriterien zählen eine persistierende Hypotension trotz adäquater Volumensubstitution, die zur Aufrechterhaltung eines mittleren arteriellen Blutdrucks von 65 mmHg die Substitution von Vasopressoren benötigt, und ein Serum-Laktatwert von über 2 mmol/l (18 mg/dl)¹⁵.

1.3 Pathophysiologie der Sepsis

Das Immunsystem aktiviert während der Sepsis eine Vielzahl von Mechanismen. Typischerweise treten Krankheitserreger über die physiologischen Barrieren von Haut und Schleimhaut in den Organismus ein. Nach Eintritt der Erreger (Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen) werden diese über Oberflächenstrukturen, sogenannte *Pathogen-associated Molecular Patterns* (PAMPs), von *Pathogen Regcognition Receptors* (PRRs) auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs) erkannt. Durch ihre Bindung wird eine intrazelluläre Kaskade aktiviert, die sowohl für die Transkription proinflammatorischer Mediatoren (Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (II-1 β)) als auch antiinflammatorischer Zytokine (Interleukin-10 (II-10), Interleukin-4 (II-4)) verantwortlich ist ¹⁸⁻²¹. Der genaue Pathomechanismus ist jedoch komplex und immer noch nicht vollständig verstanden. Neben der immunologischen Komponente haben auch kardiovaskuläre, hormonale, neuronale sowie metabolische und koagulatorische Faktoren einen Einfluss auf die Entwicklung einer Sepsis ²²⁻²⁴.

1.4 Mikrozirkulation und Mitochondrien während der Sepsis

Als Hauptursachen für die Entstehung eines septischen Schocks werden derzeit eine Verminderung bzw. Fehlverteilung in der Mikrozirkulation ²⁵⁻²⁹ sowie eine eingeschränkte Zellatmung aufgrund einer Störung der mitochondrialen Funktion ^{30,31} angesehen⁵. Das Zusammenspiel sowohl der mikrozirkulatorischen als auch der mitochondrialen Dysfunktion wird als *Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome* (MMDS) bezeichnet ³².

Sobald die Blutzirkulation versagt, z.B. während eines septischen oder hämorrhagischen Schocks, kommt es zu einer Umverteilung des Blutflusses hin zu lebenswichtigen Organen, wie z.B. zum Gehirn und zum Herzen, während der Blutfluss in weniger wichtigen Organen, wie z.B. im Intestinaltrakt, in der Niere und in der Leber, reduziert wird ²⁵. Strategien zur Verbesserung der Mikrozirkulation, wie Volumensubstitution, Vasopressoren und Steroide reichen jedoch in der Therapie von Patienten mit Sepsis nicht aus ³³. Wir unterstützen demnach die Hypothese von Brealey and Singer ³⁴, dass Organversagen weniger Folge eines verminderten Sauerstoffangebots ist, sondern vielmehr auf dem Unvermögen der Zellen beruht, den ihnen angebotenen Sauerstoff innerhalb der Mitochondrien für die Energiegewinnung zu verwerten.

1.5 Reaktive Sauerstoffspezies während der Sepsis

Als Energielieferanten der Zellen verbrauchen Mitochondrien mehr als 90 % des gesamten Sauerstoffs während der oxidativen Phosphorylierung, dem Hauptmechanismus der Energiegewinnung, zur Produktion von Adenosintriphosphat (ATP). Mitochondriale Dysfunktion als Folge von oxidativem Stress trägt maßgeblich dazu bei im Rahmen der Sepsis ein MOV zu entwickeln ^{34,35}. Mitochondrien sind sowohl Produzenten als auch Angriffspunkte von oxidativem Stress. Unklar ist jedoch, ob oxidativer Stress als primäre Ursache der mitochondrialen Dysfunktion anzusehen ist, oder, ob die Mitochondrien selbst oxidativen Stress verursachen, der rückwirkend eine mitochondriale Schädigung auslöst ^{5,30,36}. Während der oxidativen Phosphorylierung entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) durch die physiologisch unvollständige Reduktion von Sauerstoff an den Komplexen der Atmungskette. Neben der Produktion von ROS sind Mitochondrien ebenfalls in der Lage Stickstoffmonoxid (NO) sowie andere reaktive Stickstoffspezies (RNS) zu bilden ³⁷. Unter physiologischen Bedingungen können diese durch antioxidative Mechanismen der Mitochondrien, wie z.B. die Mangansuperoxiddismutase (MnSOD) und Glutathion, neutralisiert und die Entstehung oxidativen Stresses verhindert werden ^{38,39}. Während der Sepsis kommt es jedoch zu einer überschießenden Produktion freier Radikale, sodass oxidativer Stress entsteht, der Schäden in Lipiden, Proteinen und Desoxyribonukleinsäure (DNA) sowohl in Zellen als auch in Mitochondrien hervorruft 30. Dass Mitochondrien während der Sepsis freie Radikale produzieren, konnten Taylor, et al. ⁴⁰ in einem durch Cecal Ligation and Puncture (CLP) ausgelösten septischen Rattenmodell der Leber zeigen. Brealey, et al. 41 untersuchten unter klinischen Bedingungen Skelettmuskelzellen von Patienten mit Sepsis und fanden einen Zusammenhang zwischen dem Sepsis-induzierten MOV und der mitochondrialen Dysfunktion im Sinne einer verminderten ATP-Produktion, einer gesteigerten NO-Produktion sowie einer verminderten Konzentration von Antioxidantien. Darüber hinaus wurde in einem durch Lipopolysaccharide (LPS) ausgelösten *in vitro* Sepsismodell gezeigt, dass die durch Nikotinamidadenindinukleotid (NAD)-Oxidase-4 und induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) gebildeten ROS bzw. RNS die ATP-Produktion von Nierenmitochondrien beeinflussen ⁴². Die beiden Studien von Zapelini, et al. ⁴³ und Lowes, et al. ⁴⁴ bestätigen , dass Antioxidantien die mitochondriale Funktion während der Sepsis verbessern. Trotz dieser Erkenntnisse gilt es weiterhin zu untersuchen, wie die Produktion von ROS, und damit oxidativer Stress, mit der mitochondrialen Dysfunktion im Zeitverlauf von 96 Stunden (h) korreliert.

1.6 Die Leber – das Organ mit dem höchsten Energiebedarf

Die Leber gehört zu den Organen mit dem höchsten Energiebedarf und verfügt über eine hohe Anzahl an Mitochondrien ⁴⁴. Es ist besonders wichtig den Pathomechanismus des Leberversagens während einer Sepsis zu kennen, da es kein therapeutisches Leberersatzverfahren gibt und die Lebertransplantationen durch die geringe Anzahl von Spenderorgangen limitiert sind. Die Funktion der Lunge bei Auftreten eines *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) kann dagegen durch eine extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) und die Funktion der Niere bei akuter oder chronischer Niereninsuffizienz durch verschiedene Dialyseverfahren ersetzt werden ⁴⁵⁻⁴⁸.

1.7 Mitochondriale Funktion während der Sepsis

Die Ergebnisse verfügbarer Studien zur mitochondrialen Funktion während der Sepsis sind kontrovers ⁴⁹. Während einige Untersuchungen eine gesteigerte mitochondriale Funktion zeigen konnten ⁵⁰⁻⁵³, fanden andere Autoren unter ähnlichen Bedingungen eine Abnahme der mitochondrialen Funktion ^{44,54-56}. In anderen Studien konnte wiederum keine Veränderung der mitochondrialen Funktion beobachtet werden ^{40,57-59}. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse ist unter anderem auf die unterschiedliche Herkunft der Mitochondrien, die Art des verwendeten *in vivo* bzw. *in vitro* Sepsismodells sowie das Stadium der Erkrankung zurückzuführen ⁵². Dass der Schweregrad einer Sepsis die mitochondriale Funktion in der Leber von Ratten unterschiedlich beeinflusst, konnte bereits in der in unserem Labor kürzlich durchgeführten Studie bewiesen werden ⁴⁸. Die mitochondriale Funktion ändert sich im zeitlichen Verlauf. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die mitochondriale Funktion oft in der Frühphase kritischer Erkrankungen, wie der Sepsis, ansteigt, während sie im zeitlichen Verlauf kontinuierlich sinkt

^{22,34,48}. In bisherigen Sepsismodellen bei Ratten konnte zudem nachgewiesen werden, dass im septischen Schock gewebeabhängig bereits nach 6 h die mitochondriale Funktion im Pankreas, in der Lunge und im Jejunum signifikant vermindert war. Gleichzeitig blieb die mitochondriale Funktion in der Leber, in der Niere, im Duodenum und im Herzmuskel unverändert ⁵⁹. Andere Arbeitsgruppen konnten hingegen zeigen, dass im septischen Schock die mitochondriale Funktion im Pankreas nach 6 h, in der Niere nach 24 h und in der Lunge nach 48 h vermindert war, wohingegen die mitochondriale Funktion in der Leber innerhalb der ersten 48 h unverändert blieb ⁶⁰. Bislang ist ungeklärt in welchen Organen und zu welchem Zeitpunkt die mitochondriale Funktion primär beeinträchtigt ist. Im Rahmen der eigenen Untersuchungen soll daher bestimmt werden, ob und zu welchem Zeitpunkt die mitochondriale Funktion in einem Sepsismodell mit abdominellem Fokus signifikant beeinträchtigt ist. Hierzu soll die mitochondriale Funktion der Leber als Organ mit dem höchsten Energiebedarf untersucht werden. Die Identifizierung des Zeitpunktes, an dem primär eine Dysfunktion in den Lebermitochondrien vorliegt, könnte Ansatzpunkte für organprotektive Therapien der Sepsis eröffnen.

2. Fragestellungen der Arbeit

Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Inwiefern beeinflusst eine Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)- Operation den klinischen Zustand, gemessen am Septic Rat Severity Score (SRSS) und an den Parametern der Organschädigung, in einem in vivo Rattenmodell im zeitlichen Verlauf von 96 h?
- 2. Wie wirkt sich eine moderate Sepsis auf die Funktion der Lebermitochondrien in einem *in vivo* Rattenmodell im zeitlichen Verlauf von 96 h aus? Gibt es einen Zeitpunkt, an dem die mitochondriale Funktion besonders verändert ist?
- 3. Welches Ausmaß hat eine moderate Sepsis auf die ROS-Produktion in der Leber, indirekt gemessen an der Malondialdehyd (MDA)-Konzentration, in einem *in vivo* Rattenmodell im zeitlichen Verlauf von 96 h?

3. Material und Methoden

3.1 Tierexperimenteller Versuchsteil

3.1.1 Materialien und Geräte

Die Angaben zu den verwendeten Materialien und Geräte befinden sich im Anhang (siehe S. 39-40).

3.1.2 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an 104 männlichen juvenilen Wistar-Ratten (374 ± 23 g) von Janvier, Frankreich der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter vorheriger behördlicher Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen: 84-02.04.2014.A112) durchgeführt. Zu den Versuchen wurden ausschließlich gesunde Tiere herangezogen. Die Versuchstiere wurden konventionell in Käfigen (Makrolon[®]-Einzelkäfigen von Typ 3) unter klimatisierten Bedingungen (Raumtemperatur 22 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 50 ± 5 %, Luftumweltrate 16-20 Mal pro Stunde) gehalten und im 12-h-Tag-Nacht-Wechsel mit weißem Kunstlicht (300-320 Lux) beleuchtet. Die Versuchstiere hatten Zugang zu Nahrung (Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Trinkwasser (ozonisiert und mit Salzsäure angesäuert, pH-Wert von 2,6-3,0) *ad libitum*⁵.

3.1.3 Versuchsablauf

Vor Versuchsbeginn erfolgte die Randomisierung der Versuchstiere in zwei Gruppen mit je vier Untergruppen:

- 1.) CASP-Gruppe (n = 47)
- 1.1.) 24 h nach CASP-Operation (n = 11)
- 1.2.) 48 h nach CASP-Operation (n = 12)
- 1.3.) 72 h nach CASP-Operation (n = 12)
- 1.4.) 96 h nach CASP-Operation (n = 12)
- 2.) Sham-Gruppe (n = 48)
- 2.1.) 24 h nach Sham-Operation (n = 12)

- 2.2.) 48 h nach Sham-Operation (n = 12)
- 2.3.) 72 h nach Sham-Operation (n = 12)
- 2.4.) 96 h nach Sham-Operation (n = 12)

Die Versuchstiere der CASP-Gruppe erhielten eine mediane Laparotomie mit anschließender Freilegung des *Colon ascendens*. In das Lumen des *Colon ascendens* wurde mithilfe einer Venenverweilkanüle ein Stent in einer Größe von 14 Gauge (G) platziert und die Bauchdecke anschließend verschlossen. Die Versuchstiere, die der Sham-Gruppe angehörten, erfuhren ebenfalls eine mediane Laparotomie mit darauffolgender Darmfreilegung, wobei der Stent in dieser Gruppe lediglich auf die Wand des *Colon ascendens* genäht wurde, ohne diese zu durchstoßen. Die Versuchsmessung erfolgte 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach der jeweiligen Operation. Als Kontrollgruppe dienten gesunde Tiere (n = 9), die keine Operation erhielten (siehe Abbildung 1) ⁵.

CASP- bzw. Sham-Operation	24 h Or		Organentnahme				
CASP- bzw. Sham-Operation	48 h		Organentnahme				
CASP- bzw. Sham-Operation		72 h		Organentnahr		ne	
CASP- bzw. Sham-Operation		96	h		Or	rganentnahn	ne

Abb. 1: Versuchsablauf

Der Versuch erfolgte 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach CASP- bzw. Sham-Operation.

3.1.4 CASP- und Sham-Operation

Als Modell der Sepsisinduktion diente das CASP-Modell, welches in der Literatur durch Zantl, et al. ⁶¹ und Lustig, et al. ⁶² beschrieben und in unserem Labor etabliert wurde ^{48,63}. Die Narkose wurde mit dem volatilen Anästhetikum Sevofluran begonnen. Zusätzlich wurde den Versuchstieren Buprenorphin subkutan (0,05 mg/kg) als Schmerzmedikation injiziert. Eine Venenverweilkanüle (14 G) wurde vorbereitet, indem etwa 3 mm von der Öffnung entfernt eine Kerbe für die Haftung der späteren Naht geschaffen wurde. Die Versuchstiere wurden in Rückenlage auf einer Wärmematte gelagert, um die Körpertemperatur aufrechtzuerhalten.

Während der Operation wurde die Narkose unter Spontanatmung mit Sevofluran (3,0 Vol. %, FiO₂ 0,5) durch eine spezielle Atemmaske aufrechterhalten. Nach Abdomendesinfektion und steriler Abdeckung mit einem Lochtuch erfolgte oberhalb der Symphyse eine etwa 2 cm lange mediane Laparotomie. Anschließend wurde das *Colon ascendens* freigelegt. Der präparierte Stent wurde auf der gegenüberliegenden Seite des Mesenteriums etwa 1 cm distal der iliozökalen Klappe implantiert und mit einem nicht-resorbierbaren Faden (6-0) an der Kerbe fixiert. Nach Entfernung der Nadel wurde der Katheter etwa 3 mm von der Naht entfernt abgeschnitten (siehe Abbildung 2). Anschließend wurde etwas Fäzes in den Stent ausgestrichen, um einen kontinuierlichen Austritt in die Bauchhöhle zu gewährleisten. Der Darm wurde zurück in die Bauchhöhle verlagert und diese mit etwa 5 ml Natriumchlorid (NaCl)-Lösung befeuchtet. Der Verschluss der Bauchdecke erfolgte mit einem resorbierbaren Faden (4-0) für Muskel- und Hautschicht. Nach dem operativen Eingriff wurden die Tiere gewogen und ihre Körpertemperatur rektal gemessen. Mit den Vergleichstieren wurde analog verfahren, wobei der Stent lediglich an die Darmwand des *Colon ascendens* angenäht wurde, ohne diese zu penetrieren (siehe Abbildung 2) ⁵.



Abb. 2: CASP- bzw. Sham-Chirurgie

Dargestellt ist die Technik der CASP- bzw. Sham-Operation. Während der Stent bei der CASP-Operation die Wand das *Colon ascendens* penetriert, wird dieser bei der Sham-Operation lediglich an die Wand des *Colon ascendens* angenäht (Abbildung in Anlehnung an Lustig, et al. ⁶¹).

Nach der Operation verblieben die Versuchstiere unter den zuvor beschriebenen Standardbedingungen in der ZETT, Düsseldorf. Die Tiere standen vom Zeitpunkt der Operation bis zum Eingang in den Versuch unter regelmäßiger Beobachtung. Alle 12 h wurde ihnen ein Opioid in Form von Buprenorphin subkutan (s.c.) (0,05 mg/kg) appliziert. Der Schweregrad

der Sepsis wurde mithilfe des SRSS von einem unabhängigen, jedoch nicht-verblindeten Untersucher bewertet (siehe Anhang S. 46). Der SRSS beinhaltete folgende Beobachtungskriterien: Körpergewicht, äußeres Erscheinungsbild, Spontanverhalten, provoziertes Verhalten, Atemfrequenz, expiratorische Atemgeräusche, Abdomenpalpation und Beschaffenheit des Stuhls. Jedes Item wurde durch die Vergabe von Punkten von 0 bis 3 und 10 zensiert und die Punkte zu einer Summe addiert. Ein kumulatives Ergebnis von über 10 Punkten führte zur Entnahme der Tiere aus dem Versuch und fachgerechten Euthanasie ⁵.

3.1.5 Organentnahme

Nach erneutem Wiegen der Tiere erfolgte zu definierten Zeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h und 96 h) nach CASP- oder Sham-Operation unter tiefer letaler Barbituratnarkose mit intraperitonealer (i.p.) Injektion von Pentobarbital (120 mg/kg) und anschließender Exsanguination die Organentnahme. Durch eine Thorakotomie wurde das Herz freigelegt und punktiert sowie 5 ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Blutproben entnommen. 1 ml der EDTA-Blutproben dienten als Material für laborchemische Untersuchungen. Die weiteren 4 ml EDTA-Blutproben wurden für 10 Minuten bei 4 °C und 4000 rcf zentrifugiert und das überständige Plasma abpipettiert. Anschließend wurde das Plasma bei -80 °C tiefgefroren. Im Anschluss erfolgte mittels Laparotomie die Entnahme von Gewebe eines Leberlappens. Ein Teil des Lebergewebes wurde zur histologischen Aufbereitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenfalls bei -80 °C gelagert. Der andere Teil diente als Grundlage für die Untersuchung der mitochondrialen Funktion ⁵.

3.2 Laborexperimenteller Versuchsteil

3.2.1 Materialien und Geräte

Die Angaben zu den verwendeten Materialien und Geräte befinden sich im Anhang (siehe S. 40-42).

3.2.2 Chemikalien

Die Angaben zu den verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie Pufferlösungen befinden sich im Anhang (siehe S. 43-45).

3.2.3 Herstellung des Leberhomogenats

Nach Entnahme der Leber wurde diese in eine zuvor vorbereitete eisgekühlte Isolationspufferlösung gebracht. Die Isolationspufferlösung beinhaltete 200 mM Mannitol, 50

mM D(+)-Saccharose, 5 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), 5 mM 3-(N-Morpholino)-1-Propansulfonsäure (3-MOPS), 1 mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA) und 0,1 %ges bovines Serumalbumin (BSA). Anschließend wurde 1 g Lebergewebe darin abgewogen. Dieses wurde mit einer Schere in kleine etwa 2-3 mm³ große Stücke zerkleinert. Nach Abgießen des Puffers erfolgte eine Verdünnung von 1:10 ml durch erneute Zugabe des Puffers. Die Lebersuspension wurde in einen eisgekühlten S-Behälter befördert. Anschließend wurde das Gemisch dreimal durch Verwendung eines Laborrührwerks homogenisiert, bevor es in einem 50 ml Falcon konserviert und auf Eis gestellt wurde ⁵.

3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration in der Leber

Die quantitative Bestimmung der Proteine innerhalb des Leberhomogenats erfolgte in Anlehnung an die Proteinbestimmung nach Lowry⁶⁴. Diese beruht auf zwei Reaktionen. In einem ersten Schritt werden Komplexe zwischen Peptidbindungen und Kupfer (Cu)(II)-Ionen, beruhend auf einer Biuretreaktion, gebildet. Im darauffolgenden Schritt wird Cu(II) zu Cu(I) reduziert. Cu(I) reduziert wiederum Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau, welches eine Blaufärbung erzeugt. Die Intensität der Blaufärbung wird via Photometrie bei einer quantifiziert. Wellenlänge von 750 nm Die Messung der einer Extinktion Standardverdünnungsreihe mit definierten Proteinkonzentrationen liefert eine Standardkurve aus Extinktion und Proteinkonzentration. Mithilfe dieser Standardkurve konnte in unserem Versuch die Proteinkonzentration innerhalb der Leberzellsuspension unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt werden. Als Proteinstandard diente BSA. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde Aqua dest. verwendet. In Tabelle 1 ist die Standardverdünnungsreihe entsprechend abgebildet. Nach Fertigstellung der Standardverdünnungsreihe wurde diese auf Eis gestellt.

Standard	0	1	2	3	4	5	6
Proteinkonzentration (μg/ml)	0	6,25	12,5	25	50	75	100

Tabelle 1: Standardverdünnungsreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung

Zunächst wurden die Proben (Leberhomogenat) im Verhältnis von 1:100 mit *Aqua dest*. verdünnt. Jeweils 100 μ l Proteinstandard bzw. verdünnte Probe wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und 500 μ l von Lösung 1 (15 ml Reagenz A: 10 g Natriumkarbonat in 500 ml 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung; 150 μ l Reagenz B: 2 g Kaliumnatriumtatrat in 100 ml *Aqua dest.*; 150 μ l Reagenz C: 1 g Kupfersulfat-Pentahydrat in 100 ml *Aqua dest.*) hinzugegeben. Das Gemisch wurde gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l von Lösung 2 (2 ml Folin-Ciocalteau-Reagenz, 2 ml *Aqua dest.*) in die Reaktionsgefäße befördert und das Gemisch erneut gevortext. Nach einer weiteren Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden zur Doppelbestimmung von den Standards und Proben 200 μ l/Well in eine 96-Well Mikrotitierplatte überführt. Abschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen und die Proteinmenge bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte über die Software SynergyTM 2 Multi-Mode Microplate Reader mit dem Programm Gen51.11.

3.2.5 Bestimmung der mitochondrialen Funktion mittels Respirometrie

Zur Bestimmung der mitochondrialen Funktion wurde der Sauerstoffverbrauch bzw. die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs (Respirationsrate) der mitochondrialen Atmungskette bestimmt. Der Sauerstoffverbrauch wurde polarographisch bei 30 °C mithilfe einer Clark-type Elektrode, die sich in einer wasserummantelten Kammer (0,5 ml) befand, gemessen und graphisch aufgezeichnet (Model 782, StrathKelvin, Glasgow, Schottland). Vor der Messung erfolgte eine Kalibrierung der Clark-type Elektrode mit Aqua dest. als Positivkontrolle sowie mit Natriumsulfit-Lösung als Negativkontrolle. Die Werte der Positivkontrolle lagen zwischen 200 und 600 pA, die der Negativkontrolle zwischen 0 und 50 pA. Das Leberhomogenat wurde mit einem Respirationspuffer vermengt. Dieser beinhaltete 130 mM Kaliumchlorid-Lösung (KCl), 5 mM KH₂PO₄, 20 mM 3-MOPS, 2,5 mM EGTA, 1 µM Tetrasodiumpyrophosphat (Na₄P₂O₇) sowie 0,1 %iges BSA. Die Proteinkonzentration innerhalb der Kammer betrug 4 mg/ml. Durch Zugabe von Glutamat-Malat und Succinat wurde die Atmungskette über die Komplexe I und II stimuliert. Glutamat wird durch das mitochondriale Enzym Glutamat-Dehydrogenase zu α -Ketoglutarat oxidiert, wodurch NAD⁺ zu NADH reduziert wird. Malat wird durch die Malat-Dehydrogenase zu Oxalacetat oxidiert, wobei ebenfalls durch Reduktion von NAD⁺ NADH entsteht. NADH wiederum dient als Substrat für Komplex I. Das durch die Succinat-Dehydrogenase oxidierte Succinat führt zur Reduktion von Flavinadenindinukleotid (FAD) zu FADH₂. FHDH₂ dient als Substrat für Komplex II. Die mitochondriale Respirationsrate unter State 2 wurde nach Addition von entweder Glutamat-Malat (jeweils 2,5 mM) oder Succinat (10 mM) berechnet. Die maximale mitochondriale Respirationsrate unter State 3 wurde durch Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP) (250 μ M) und die Respirationsrate unter State 4 nach Verbrauch von ADP gemessen (siehe Abbildung 3). Als Parameter der Kopplung zwischen Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung wurde der *Respiratory Control Index* (RCI) als Quotient aus State 3 und State 2 herangezogen. Die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung wurde anhand des Quotienten aus hinzugefügter ADP-Menge und Sauerstoffverbrauch (ADP/O-Quotient) bestimmt. Die Sauerstofflöslichkeit betrug 223 μ mol O₂/1 bei 30 °C. Die Respirationsraten wurden als nmol/min/mg Protein angegeben ⁵.



Abb. 3: Respirometrie - Sauerstoffverbrauch während der oxidativen Phosphorylierung State 2: Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von Substrat (Komplex I: Glutamat-Malat; Komplex II: Succinat), State 3: Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von ADP, State 4: Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach ADP-Verbrauch.

3.2.6 Bestimmung der Malondialdehyd-Konzentration in der Leber

Malondialdehyd ist das Endprodukt bei der Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren und stellt damit einen indirekten Marker für oxidativen Stress dar. Die Bestimmung der MDA-Konzentration erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Mihara and Uchiyama⁶⁵. Die MDA-Bestimmung beruht dabei auf einer Reaktion zwischen MDA und zwei Molekülen

Thiobarbitursäure (TBA), die einen rosanen Farbkomplex bilden. Die Intensität der Rosafärbung kann bei einer Wellenlänge von 535 nm und einer Referenzwellenlänge von 520 nm photometrisch quantifiziert werden. Die Messung der Extinktion einer Standardverdünnungsreihe mit definierten MDA-Konzentrationen liefert eine Standardkurve aus Extinktion und MDA-Konzentration. Mithilfe dieser Standardkurve konnte in unserem Versuch die MDA-Konzentration innerhalb der Leber unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt werden. Als MDA-Standard diente Malonaldehydbisdimethylacetal (1,1,3,3- Tetramethoxypropan). Zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde 1,15 %ige KCl-Lösung verwendet. In Tabelle 2 ist die Standardverdünnungsreihe entsprechend abgebildet. Nach Fertigstellung der Standardverdünnungsreihe wurde diese auf Eis gestellt.

Tabelle 2	: Standar	dverdünnung	sreihe für	die MDA	-Konzentratio	nsbestimmung
-----------	-----------	-------------	------------	---------	---------------	--------------

Standard	1	2	3	4	5
MDA-Konzentration (nM)	20	10	5	2,5	0

Zur Probenherstellung wurde 50 mg schockgefrorenes Lebergewebe mit 500 µl 1,15 %iger KCl-Lösung homogenisiert. Anschließend wurden jeweils 250 µl Leberhomogenat und 250 µl der zuvor hergestellten Verdünnungsreihe mit 1500 µl 1 %iger Phosphorsäure (H₃PO₄) und 500 µl 0,6 %iger TBA vermengt. Das Gemenge wurde für 45 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend zum Abkühlen auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2000 µl n-Butanol wurde das Gemenge bei 4 °C und 2900 rcf für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand aufgefangen. Die Messung der Lichtabsorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 535 nm und einer Referenzwellenlänge von 520 nm. Aus der Differenz der Absorption beider Wellenlängen die **MDA-Konzentration** berechnet. Anschließend wurde mithilfe der wurde Proteinbestimmung nach Lowry⁶⁴ (siehe Kapitel 3.2.4) die gemessene Menge MDA auf die in der Probe enthaltene Menge Protein zurückgeführt und als nmol MDA/mg Protein angegeben. Die MDA- sowie die Proteinbestimmungen erfolgten über die Software SynergyTM 2 Multi-Mode Microplate Reader mit dem Programm Gen51.11⁵.

3.2.7 Laborchemische Untersuchung der Blutproben

Die gewonnenen Blutproben wurden für 10 Minuten bei 4 °C und 4000 rcf zentrifugiert. Anschließend wurde das überständige Plasma abpipettiert und bei -80 °C tiefgefroren gelagert. Im Zentralinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf erfolgte die Bestimmung folgender Laborparameter: Alanin-Amino-Transferase (ALT), Aspartat-Amino-Transferase (AST), Laktatdehydrogenase (LDH), Kreatinin und Harnstoff⁵. Die Enzyme ALT und AST kommen überwiegend in der Leber vor und weisen bei erhöhten Werten auf einen Leberschaden hin. LDH ist ein Enzym, welches in fast allen Zellen des Körpers zu finden ist. Die höchste Enzymaktivität lässt sich jedoch in der Leber, in der Skelettmuskulatur, im Herzen und in der Niere nachweisen. Als unspezifischer Marker für Zelluntergang ist eine Erhöhung bei vielen Krankheiten zu verzeichnen. Kreatinin, ein abhängig von der Muskelmasse konstant anfallendes Abbauprodukt, und Harnstoff, ein Abbauprodukt von Proteinen, werden über die Niere ausgeschieden. Beide deuten bei erhöhter Ausscheidung über den Urin einen potenziellen Nierenschaden an.

3.3 Statistik

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit der Software Graphpad Prism[®] Version 6.01 unter Anwendung eines Two-way-ANOVA mit einem Tukey Post-hoc-Test für Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit p < 0,05 festgelegt ⁵.

4. Ergebnisse

4.1 Effekte von CASP- und Sham-Operation auf den SRSS

Mithilfe des SRSS wurden die klinischen Zeichen einer abdominellen Inflammation bzw. einer Sepsis bewertet. Der SRSS im Zeitverlauf von 96 h zeigte bei den septischen Tieren zu jedem Messzeitpunkt höhere Werte als bei den Sham-operierten Tieren (24 h: $3,27 \pm 1,29$ vs. $0,92 \pm 1,24$; 48 h: $6,75 \pm 3,08$ vs. $1,67 \pm 1,72$; 72 h: $4,92 \pm 1,56$ vs. $1,67 \pm 1,15$; 96 h: $5,83 \pm 2,52$ vs. $1,83 \pm 1,11$; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere). Der SRSS war bei den septischen Tieren nach 48 h und 96 h höher als nach 24 h. Innerhalb der Gruppe Sham-operierter Tiere gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des SRSS über die Zeit (siehe Abbildung 4) ⁵.





4.2 Effekte von CASP- und Sham-Operation auf die Serummarker

Zur Beurteilung der Nierenfunktion wurden die Konzentrationen von Harnstoff und Kreatinin im Blut gemessen. Die Induktion einer Sepsis führte nach 48 h zu einem Anstieg der Harnstoffkonzentration im Blut im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren und den Kontrolltieren (48 h: $52,17 \pm 36,67$ mg/dl vs. $36,33 \pm 6,34$ mg/dl vs. $32,33 \pm 5,79$; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle). Nach 72 h und nach 96 h sank die Harnstoffkonzentration septischer Tiere auf Werte ähnlich derer von Sham-operierten Tieren und Kontrolltieren (siehe Abbildung 5A). Die Kreatininkonzentration im Blut veränderte sich im Zeitverlauf von 96 h weder bei den septischen Tieren noch bei den Sham-operierten Tieren signifikant (siehe Abbildung 5B)⁵.





Harnstoffkonzentration bei septischen bzw. Sham-operierten Tieren im Zeitverlauf von 96 h (*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Sham; Daten gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung; CASP-24h n = 11; CASP-48h/72h/96h: n = 12; Sham-24h/48h/72h/96h: n = 12; Kontrolle: n = 9) ⁵.





Kreatininkonzentration bei septischen bzw. Sham-operierten Tieren im Zeitverlauf von 96 h (*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Sham; Daten gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung; CASP-24h n = 11; CASP-48h/72h/96h: n = 12; Sham-24h/48h/72h/96h: n = 12; Kontrolle: n = 9) ⁵.

Um die Funktion der Leber zu untersuchen, wurden die Leberenzyme AST, ALT und LDH im Blut gemessen. Die Konzentration von AST stieg 24 h nach Operation sowohl bei den septischen Tieren als auch bei den Sham-operierten Tieren relativ zur Kontrolle an (24 h: 138,3 \pm 37,48 U/l vs. 148,25 \pm 61,92 U/l vs. 67,17 \pm 14,32 U/l; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle). Nach 48 h war die AST-Konzentration lediglich bei den septischen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht (48 h: $124,83 \pm 52,93$ U/l vs. $67,17 \pm 14,32$ U/l; septische Tiere vs. Kontrolle). Im weiteren Verlauf, nach 72 h und nach 96 h, fiel die AST-Konzentration auf Kontrollniveau ab und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen und den Sham-operierten Tieren (siehe Abbildung 6A). Die ALT-Konzentration septischer Tiere sank 24 h nach Operation gegenüber der von Sham-operierten Tieren ab (24 h: $41 \pm 12,21$ U/l vs. $53,92 \pm 16,53$ U/l; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere). Im weiteren Verlauf, zwischen 48 h und 96 h nach Operation, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen und den Sham-operierten Tieren (siehe Abbildung 6B). Weder bei den septischen Tieren noch bei den Sham-operierten Tieren kam es im Verlauf von 96 h zu einer signifikant unterschiedlichen Entwicklung der LDH-Spiegel (siehe Abbildung 6C)⁵.





AST-Konzentration bei septischen bzw. Sham-operierten Tieren im Zeitverlauf von 96 h (*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Sham, Daten gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung; CASP-24h n = 11; CASP-48h/72h/96h: n = 12; Sham-24h/48h/72h/96h: n = 12; Kontrolle: n = 9) ⁵.





ALT-Konzentration bei septischen bzw. Sham-operierten Tieren im Zeitverlauf von 96 h (*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Sham, Daten gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung; CASP-24h n = 11; CASP-48h/72h/96h: n = 12; Sham-24h/48h/72h/96h: n = 12; Kontrolle: n = 9)⁵.





LDH-Konzentration bei septischen bzw. Sham-operierten Tieren im Zeitverlauf von 96 h (*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Sham, Daten gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung; CASP-24h n = 11; CASP-48h/72h/96h: n = 12; Sham-24h/48h/72h/96h: n = 12; Kontrolle: n = 9)⁵.

4.3 Effekte von CASP- und Sham-Operation auf den *Respiratory Control Index* und den ADP/O-Quotienten als Parameter der mitochondrialen Funktion der Leber

Zur Untersuchung der mitochondrialen Funktion in der Leber wurden der RCI und der ADP/O-Quotient bestimmt. Der RCI diente als Maß für die Kopplung von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung und wurde berechnet als Quotient aus der Respirationsrate in Anwesenheit von ADP (State 3) und in Abwesenheit von ADP (State 2). Der ADP/O-Quotient diente als Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung. Durch Stimulation der Atmungskette über Komplex I stieg der RCI 24 h nach dem operativen Eingriff bei den septischen Tieren und bei den Sham-operierten Tieren gegenüber der Kontrolle an (24 h: $12,42 \pm 0,96$ vs. $11,77 \pm$ 0,97 vs. $7,56 \pm 1,89$; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle). Nach 48 h war nur bei den septischen Tieren verglichen mit den Sham-operierten Tieren und den Kontrolltieren ein Anstieg des RCI zu verzeichnen (48 h: $9,65 \pm 1,86$ vs. $7,95 \pm 1,94$; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere). 72 h und 96 h nach der jeweiligen Operation gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen Tieren und den Sham-operierten Tieren (Abbildung 7A). Für Komplex II stieg der RCI 24 h nach CASP- bzw. Sham-Operation ebenfalls in beiden Gruppen im Vergleich zur Kontrolle an (24 h: $10,04 \pm 1,31$ vs. $9,15 \pm 0,56$ vs. 6.81 ± 1.06 ; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle). Im weiteren Verlauf, nach 48 h und nach 72 h, gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des RCI. Zum Zeitpunkt 96 h war ein Anstieg des RCI bei den septischen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu verzeichnen (96 h: $8,03 \pm 1,25$ vs. $6,81 \pm 1,06$; septische Tiere vs. Kontrolle) (Abbildung 7B). Die Respirationsrate während State 2 war unter Stimulation der Atmungskette durch Komplex I sowohl bei den septischen Tieren als auch bei den Sham-operierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren nach 24 h und nach 48 h vermindert (24 h: $1,19 \pm 0,17$ nmol/min/mg vs. $1,14 \pm 0,11$ nmol/min/mg vs. $1,79 \pm 0,31$ nmol/min/mg; 48 h: $1,38 \pm 0,35$ nmol/min/mg vs. $1,43 \pm 0,29$ nmol/min/mg vs. $1,79 \pm 0,31$ nmol/min/mg; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle). Nach 72 h und nach 96 h gab es lediglich bei den septischen Tieren gegenüber den Kontrolltieren einen Abfall der Respirationsrate während State 2 (72 h: $1,44 \pm 0,30$ nmol/min/mg vs. $1,79 \pm 0,31$ nmol/min/mg; 96 h: $1,41 \pm 0,49$ nmol/min/mg vs. $1,79 \pm 0,31$ nmol/min/mg; septische Tiere vs. Kontrolle). Die Respirationsrate während State 2 unter Stimulation der Atmungskette durch Komplex II war nach 24 h und nach 72 h sowohl bei den septischen Tieren als auch bei den Sham-operierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren vermindert (24 h: $2,13 \pm 0,26$ nmol/min/mg vs. $2,12 \pm 0,23$ nmol/min/mg vs. 2,73

 \pm 0,38 nmol/min/mg; 72 h: 2,00 \pm 0,42 nmol/min/mg vs. 2,17 \pm 0,54 nmol/in/mg vs. 2,73 \pm 0,38 nmol/min/mg; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle). Nach 96 h zeigte sich nur bei den septischen Tieren gegenüber den Kontrolltieren ein Abfall der Respirationsrate während State 2 (96 h: 2,20 \pm 0,61 nmol/min/mg vs. 2,73 \pm 0,38 nmol/min/mg; septische Tiere vs. Kontrolle). Die Respirationsrate unter State 3 nach Stimulation der Atmungskette über die Komplexe I und II zeigte in beiden Gruppen (septische Tiere und Sham-operierte Tiere) 72 h nach der jeweiligen Operation einen Abfall gegenüber der Kontrollgruppe (72 h, Komplex I: 9,30 \pm 2,23 nmol/min/mg vs. 9,22 \pm 1,93 nmol/min/mg vs. 13,13 \pm 2,78 nmol/min/mg; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle; 72 h, Komplex II: 14,21 \pm 3,73 nmol/min/mg vs. 13,96 \pm 3,14 nmol/min/mg vs. 18,64 \pm 4,22 nmol/min/mg; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle) ⁵.



Abb. 7A: Mitochondriale Funktion – Respiratory Control Index, Komplex I

RCI nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I bei septischen bzw. Sham-operierten Tieren im Zeitverlauf von 96 h (*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Sham; Daten gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung; CASP-24h n = 11; CASP-48h/72h/96h: n = 12; Sham-24h/48h/72h/96h: n = 12; Kontrolle: n = 9)⁵.



Abb. 7B: Mitochondriale Funktion – Respiratory Control Index, Komplex II

RCI nach Stimulation der Atmungskette über Komplex II bei septischen bzw. Sham-operierten Tieren im Zeitverlauf von 96 h (*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Sham; Daten gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung; CASP-24h n = 11; CASP-48h/72h/96h: n = 12; Sham-24h/48h/72h/96h: n = 12; Kontrolle: n = 9)⁵.

Der ADP/O-Quotient stieg nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I in der Frühphase der Sepsis nach 24 h bei septischen Tieren gegenüber der Kontrolle an (24 h: $3,55 \pm 0,31$ vs. $3,11 \pm 0,30$; septische Tiere vs. Kontrolle). Nach 48 h war ein Anstieg gegenüber den Sham-operierten Tieren zu dokumentieren (48 h: $3,30 \pm 0,52$ vs. $2,78 \pm 0,52$; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere). Im Verlauf des Experiments, nach 72 h, fiel der ADP/O-Quotient in beiden Gruppen gegenüber der Kontrolle ab (72 h: $2,69 \pm 0,44$ vs. $2,65 \pm 0,29$ vs. $3,11 \pm 0,30$; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle). Zum Zeitpunkt 96 h gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen Tieren und den Sham-operierten Tieren (siehe Abbildung 8A). Nach Stimulation der Atmungskette über Komplex II waren weder bei den septischen Tieren noch bei den Sham-operierten Tieren signifikante Veränderungen hinsichtlich des ADP/O-Quotienten im Zeitverlauf von 96 h sichtbar (siehe Abbildung 8B) ⁵.



Abb. 8A: Mitochondriale Funktion – ADP/O-Quotient, Komplex I ADP/O-Quotient nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I bei septischen bzw. Sham-operierten Tieren im Zeitverlauf von 96 h (*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Sham; Daten gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung; CASP-24h n = 11; CASP-48h/72h/96h: n = 12; Sham-24h/48h/72h/96h: n = 12; Kontrolle: n = 9)⁵.





ADP/O-Quotient nach Stimulation der Atmungskette über Komplex II bei septischen bzw. Shamoperierten Tieren im Zeitverlauf von 96 h (*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Sham; Daten gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung; CASP-24h n = 11; CASP-48h/72h/96h: n = 12; Sham-24h/48h/72h/96h: n = 12; Kontrolle: n = 9)⁵.

4.4 Effekte von CASP- und Sham-Operation auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in der Leber

Als Indikator für die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren und Biomarker für oxidativen Stress wurde die MDA-Konzentration in der Leber gemessen. Die MDA-Konzentration stieg sowohl bei den septischen Tieren als auch bei den Sham-operierten Tieren nach 24 h gegenüber der Kontrolle an (24 h: $0,49 \pm 0,08$ nmol/mg Protein vs. $0,51 \pm 0,11$ nmol/mg Protein vs. $0,29 \pm 0,13$ nmol/mg Protein; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle). Im weiteren Versuchsverlauf bis 72 h fiel die MDA-Konzentration innerhalb beider Gruppen (septische Tiere und Sham-operierte Tiere) auf Kontrollniveau ab. Nach 96 h war bei den septischen und den Sham-operierten Tieren gegenüber der Kontrolle ein Abfall der MDA-Konzentration zu verzeichnen (96 h: $0,10 \pm 0,04$ nmol/mg Protein vs. $0,14 \pm 0,05$ nmol/mg Protein vs. $0,29 \pm 0,13$ nmol/mg Protein; septische Tiere vs. Sham-operierte Tiere vs. Kontrolle) (siehe Abbildung 9) ⁵.



MDA-Konzentration



MDA-Konzentration bei septischen bzw. Sham-operierten Tieren im Zeitverlauf von 96 h (*p < 0,05 vs. Kontrolle; #p < 0,05 vs. Sham; Daten gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung; CASP-24h n = 11; CASP-48h/72h/96h: n = 12; Sham-24h/48h/72h/96h: n = 12; Kontrolle: n = 9) ⁵.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob und in wieweit sich die mitochondriale Funktion in der Leber im längeren Verlauf einer abdominellen Sepsis primär signifikant verändert. Hierzu wurde die mitochondriale Funktion der Leber 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Sepsisinduktion untersucht. Die mitochondriale Funktion in Leberzellen während der Sepsis wird dabei kontrovers diskutiert. Während einige Studien eine gestörte ^{44,54-56} Funktion beschreiben, konstatieren andere eine unveränderte ^{40,57-59} bzw. eine verbesserte ⁵⁰⁻⁵³ mitochondriale Funktion während der Sepsis.

5.1 Methodendiskussion

Das in unserem Versuch verwendete CASP-Modell, ein tierexperimentelles Sepsismodell, diente zur Abbildung pathophysiologischer Veränderungen im Hinblick auf die mitochondriale Funktion während einer Sepsis. In diesem Modell wird ein Stent einer zuvor definierten Größe in das Colon ascendens implantiert. Dieser sorgt für einen kontinuierlichen Austritt von Fäzes in die Bauchhöhle, was dem klinischen Bild einer Anastomoseninsuffizienz entspricht ⁶². Es resultiert eine diffuse Peritonitis, gefolgt von einer frühen und kontinuierlich ansteigenden systemischen Infektion und Sepsis⁶⁶. Der kontinuierliche Austritt von Fäzes gemäß eines konstanten abdominellen Sepsisfokus war entscheidend für die klinische Nähe unseres Experiments. In anderen Sepsismodellen, wie z.B. dem LPS-Modell, wird durch eine einmalige Injektion von LPS die Pathophysiologie einer Endotoxämie nachgestellt⁶⁷. In diesem Modell wird LPS, Bestandteil gram-negativer Bakterien, in die Bauchhöhle injiziert ⁶⁷. Demgegenüber ist die humane Sepsis polymikrobiellen Ursprungs und schließt in ihre Entstehung sowohl gram-positive und gram-negative als auch aerobe und anaerobe Bakterien ein ^{68,69}. Darüber hinaus unterscheiden sich die humane Sepsis bzw. das CASP-Modell und das LPS-Modell hinsichtlich ihrer Zytokinspiegel. Während einer Endotoxämie, ausgelöst durch eine LPS-Injektion, kommt es zu einem frühen und starken Anstieg proinflammatorischer Zytokine. Die Zytokinspiegel im Rahmen der humanen Sepsis bzw. des CASP-Modells erreichen hingegen später ihren Höhepunkt und fallen niedriger aus ^{67,70,71}. Das CLP-Modell bzw. das CLI-Modell bei denen durch Ligation und anschließende Punktion bzw. Inzision des Zökums unterhalb der iliozökalen Klappe ein abdomineller Sepsisfokus geschaffen wird ⁷², waren ebenfalls nicht als Sepsis-Modelle für unseren Versuch geeignet. Im Gegensatz zum CASP-Model, bei dem eine diffuse Peritonitis entsteht, entwickelt sich durch das CLP-Modell das klinische Bild eines intraabdominellen Abszesses mit geringeren Zeichen einer systemischen Inflammation ⁶⁶. Das CLI-Modell führt hingegen zur Auslösung einer schweren Sepsis mit hohen Mortalitätsraten ⁷³. Mithilfe des in unserem Versuch angewandten CASP-Modells konnte unter Verwendung eines 14 G Stents eine milde Sepsis hervorgerufen werden. Die septischen Tiere wiesen zu jedem Messzeitpunkt einen höheren SRSS im Vergleich zu den Sham-operierten Tieren auf (siehe Abbildung 4). Zudem zeigten sie nur milde Zeichen einer Organschädigung in der frühen postoperativen Phase mit einer vollständigen Erholung innerhalb von 96 h (siehe Abbildungen 5A bis 6C). Die Entwicklung eines milden Sepsis-Modells war für unseren Versuch von besonderer Bedeutung, da die mitochondriale Funktion im Zeitverlauf untersucht werden sollte, um in der Folge therapeutische Interventionen auf Wirksamkeit überprüfen zu können ⁵. Darüber hinaus diente der Versuch der Feststellung eines Zeitpunktes, an dem die mitochondriale Funktion von Leberzellen während der Sepsis zwar signifikant beeinträchtigt ist, aber noch kein Multiorganversagen vorliegt.

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Diskussion der Krankheitsentwicklung anhand von SRSS und Serummarkern

Anhand des SRSS wurde im Rahmen unserer Studie die Krankheitsentwicklung von Ratten nach CASP- bzw. Sham-Operation beurteilt. Die septischen Tiere wiesen zu jedem Zeitpunkt einen höheren SRSS verglichen mit den Sham-operierten Tieren auf. Folglich führt die CASP-Operation reproduzierbar zur Induktion einer moderaten Sepsis mit klinisch kränkeren Tieren innerhalb dieser Gruppe. Das angewandte CASP-Modell war demnach geeignet Veränderungen der mitochondrialen Funktion während einer Sepsis zu untersuchen. Dass die Implantation eines Stents in das Colon ascendens (CASP-Operation) eine negative Beeinflussung auf die Krankheitsentwicklung hinsichtlich des SRSS zufolge hat, konnten bereits Herminghaus, et al. ⁴⁸ beweisen. In dieser Studie führte die Implantation eines Stents mit einem größeren Durchmesser zu einem höheren SRSS. Die Gütekriterien Validität, Reliabilität und Objektivität des SRSS sind jedoch schwach. Die Krankheitsentwicklung von Tieren während der Sepsis kann ähnlich wie bei Menschen sehr heterogen ausfallen und erschwert daher die Definition und Einteilung einer Sepsis anhand klinischer Kriterien¹⁵. Darüber hinaus gibt es weitere Limitationen in Bezug auf die Beurteilung des SRSS. Sie beinhalten die subjektive Bewertung der Items durch den Untersucher sowie die fehlende Verblindung des Untersuchers selbst.

Zur Beurteilung der Organschädigung im Verlauf einer Sepsis wurden in unserer Studie die Nierenfunktionsparameter Kreatinin und Harnstoff sowie die Leberfunktionsparameter ALT, AST und LDH herangezogen. Die Kreatininwerte bei den septischen Tieren und den Shamoperierten Tieren veränderten sich im zeitlichen Verlauf von bis zu 96 h nicht signifikant und lagen innerhalb des physiologischen Referenzbereichs ⁷⁴. Demgegenüber zeigten die Harnstoffwerte nach 48 h einen Anstieg bei den septischen Tieren verglichen mit den Shamoperierten Tieren mit nur geringfügiger Abweichung vom Referenzwert für Harnstoff (CASP 48h: 52,17 \pm 36, 67 mg/dl; Referenz: 40,5 \pm 9,8 mg/dl) ⁷⁴. Der Verlauf der Nierenfunktionsparameter deutet darauf hin, dass die Induktion einer milden Sepsis nach 48 h zu einer geringen Schädigung der Niere bezogen auf den Harnstoffwert führt. Da der Wert für Harnstoff jedoch nur geringfügig vom Referenzwert für Harnstoff abweicht ⁷⁴, bleibt trotz statistischer Signifikanz die biologische Signifikanz fraglich. Unsere Ergebnisse stimmen mit denen von Herminghaus, et al. 48 überein, bei denen die Kreatinin- und Harnstoffwerte in einem in vivo Rattenmodell 24 h nach CASP-Operation ebenfalls ohne signifikante Veränderungen verglichen mit den Sham-operierten Tieren im physiologischen Referenzbereich lagen. In dieser Studie wurden die physiologischen Nierenfunktionsparameter auf den frühen Messzeitpunkt, 24 h nach Sepsisinduktion, zurückgeführt. Zu einem späteren Zeitpunkt wäre demnach Organschädigung möglich. In einer anderen Studie fanden Brealey, et al. ⁵⁴ gesteigerte Nierenfunktionsparameter in der Frühphase der Sepsis schon nach 24 h, die sich im Verlauf nach 72 h normalisierten. Die Unterschiede im Anstiegsverhalten von Harnstoff, mit einem verzögerten Anstieg in unserem Modell, können auf Unterschiede im Studiendesign zurückgeführt werden. Brealey, et al. ⁷⁵ wandten das fäkale Pellet-Modell zur Sepsisinduktion an. In diesem Modell wird Tieren Fäzes i.p. appliziert und damit ein polymikrobieller abdomineller Sepsisfokus geschaffen. Bakterienzahl sowie Bakterienzusammensetzung sind in diesem Modell jedoch nur ungenau abschätzbar^{67,76}. Es folgt eine relevante Organschädigung verbunden mit einer hohen Mortalität ⁵⁴. Sepsis wurde dagegen in unserer Studie mithilfe des CASP-Modells mit einem 14 G Stent induziert, ein Modell zur Auslösung einer milden Sepsis mit geringer Ausprägung einer Organschädigung. Die Werte für ALT und LDH blieben im zeitlichen Verlauf von 96 h innerhalb des physiologischen Referenzbereichs ⁷⁴. Für AST, welches sowohl in der Leber als auch in der Skelett- und Herzmuskulatur zu finden ist, stiegen die Werte in der frühen postoperativen Phase nach 24 h sowohl bei den septischen als auch bei den Sham-operierten Tieren gegenüber der Kontrolle an. Nach 48 h blieb lediglich der AST-Wert septischer Tiere gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Werte für AST glichen sich nach 72 h und nach 96 h wieder denen der Kontrollgruppe an. Eine moderate Sepsis führt demnach in

der frühen postoperativen Phase, nach 24 und nach 48 h, zu einer leichten Leberzellschädigung, die im Verlauf reversibel ist. Zeichen einer Leberzellschädigung fanden auch Trumbeckaite, et al. ⁶⁰, die in einem *in vivo* Sepsismodell bei Ratten erhöhte AST-Werte sowohl nach 24 h als auch nach 48 h nachweisen konnten. Andere Autoren wiederum gehen davon aus, dass Leberversagen während der Sepsis ohne morphologische Veränderungen, wie z.B. Apoptose oder Nekrose ^{77,78}, abläuft. Leberversagen während der Sepsis beruhe demnach eher auf funktionellen, nicht auf zellulären Veränderungen ²².

In Zusammenschau der Resultate erreicht die Krankheitsentwicklung septischer Tiere nach 48 h ihren Höhepunkt. Zu diesem Zeitpunkt werden zudem erstmals leichte Leberzellschäden sichtbar. Die weitere Erholung der septischen Tiere in Bezug auf den SRSS bzw. die Reversibilität der Leberzellschädigung in der späten postoperativen Phase deuten auf einen Rückgang der anfänglich gesteigerten Inflammation hin ⁵. Eine veränderte mitochondriale Funktion wird in der Literatur unter anderem als Hauptursache für die Entstehung des Sepsis-induzierten Multiorganversagen angesehen ^{27,41}. Veränderungen der Krankheitsentwicklung septischer Tiere im Hinblick auf den Krankheitszustand und die Parameter der Organschädigung könnten dementsprechend durch Veränderungen der mitochondrialen Funktion während der Sepsis erklärt werden.

5.2.2 Diskussion der mitochondrialen Funktion in der Leber

Der RCI und der ADP/O-Quotient dienten in unserem Versuch als Parameter zur Einschätzung der mitochondrialen Funktion im Sinne der Kopplung von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung sowie der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten insgesamt einen Anstieg des RCI und des ADP/O-Quotienten in der frühen postoperativen Phase der Sepsis nach 24 h und nach 48 h unter Stimulation der Atmungskette über Komplex I. Nach 24 h stiegen der RCI und der ADP/O-Quotient bei den septischen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren und nach 48 h gegenüber den Sham-operierten Tieren an, um sich anschließend - nach einer kurzen Phase der Erschöpfung (ADP/O-Quotient, Komplex I nach 72 h) - in der Spätphase der Sepsis (96 h) zu normalisieren. Die hohen RCI-Werte nach 24 h bzw. nach 48 h sind dabei auf niedrige Werte während State 2 und unveränderte Werte während State 3 zurückzuführen (siehe Abschnitt 4.3). Eine mögliche Ursache des Sepsis-induzierten Multiorganversagens ist der hypermetabolische Zustand während der Sepsis. Hypermetabolismus ist gekennzeichnet durch einen erhöhten Protein- und Fettkatabolismus, eine Hyperglykämie und Insulinresistenz sowie einen erhöhten Energieverbrauch ⁷⁹. Der Sauerstoffverbrauch in der hypermetabolischen Phase ist meist gesteigert und mit einem

erhöhten Grundumsatz verbunden ^{80,81}. Als Energielieferanten der Zellen verbrauchen Mitochondrien etwa 90 % des Gesamtsauerstoffs für die ATP-Produktion während der oxidativen Phosphorylierung. Die gesteigerte Aktivität der Mitochondrien könnte demnach auf einen gesteigerten Metabolismus während der Sepsis zurückgeführt werden. Eine gesteigerte Funktion der Lebermitochondrien in der Frühphase der Sepsis nach 16 h fanden auch Kozlov, et al. 52,53 in einem septischen Rattenmodell. Die Ergebnisse unserer Studie mit einer gesteigerten mitochondrialen Funktion in der Frühphase der Sepsis decken sich mit den Erkenntnissen von Singer and Brealey⁸² und Singer, et al.²². Veränderungen der Mitochondrien während der Sepsis könnten demnach als Kompensationsmechanismus interpretiert werden. Mitochondrien versuchen in der metabolischen Phase den Energiebedarf der Zellen zu gewährleisten indem sie kompensatorisch ihre Aktivität steigern ⁵. Darüber hinaus könnte die hohe Aktivität der Mitochondrien in der Frühphase der Sepsis auch mit dem Überleben robuster Mitochondrien innerhalb der zerstörten Leberzellen erklärt werden ⁵¹. Geschädigte Mitochondrien können bereits durch Autophagie und geschädigte Zellen durch Apoptose bzw. Nekrose eliminiert und durch neue Mitochondrien ersetzt worden sein ^{53,83}. Welcher der beiden Mechanismen für die gesteigerte mitochondriale Funktion in der frühen postoperativen Phase verantwortlich ist, ist jedoch unklar. Im Gegensatz zu den vorherigen Resultaten, zeigen die Ergebnisse von Llesuy, et al. 58 und Trumbeckaite, et al. 60 eine unveränderte Funktion der Lebermitochondrien im frühen Zeitverlauf einer Sepsis. Kantrow, et al. ⁵¹ fanden wiederum eine verringerte mitochondriale Funktion in einem durch LPS ausgelösten septischen Rattenmodel nach 16 h. Die Unterschiede hinsichtlich der mitochondrialen Funktion dieser Studien im Vergleich zu unserem Experiment können unter anderem durch die Aufbereitung der Mitochondrien und die verschiedenen Modelle der Sepsisinduktion erklärt werden. Entgegen unserer Studie verwendeten Llesuy, et al. 58, Trumbeckaite, et al. 60 und Kantrow, et al. ⁵¹ isolierte Lebermitochondrien zur Bestimmung der mitochondrialen Funktion. In Leberhomogenaten wird die gesamte Population der Mitochondrien im entsprechenden Gewebe betrachtet, wohingegen einige Mitochondrien durch den Isolierungsprozess (Homogenisierung und Zentrifugation) zerstört werden können ^{5,59,84}. Des Weiteren erfolgte die Sepsisinduktion bei Llesuy, et al. ⁵⁸ und Kantrow, et al. ⁵¹ mittels CLP und bei Trumbeckaite, et al. ⁶⁰ mittels intraduktaler Applikation von Taurocholat im Gegensatz zu dem in unseren Experiment verwendeten CASP-Modell. Nach Stimulation der Atmungskette über Komplex II war nach 24 h bei den septischen Tieren und den Sham-operierten Tieren verglichen mit den Kontrolltieren ein Anstieg des RCI zu verzeichnen. Der ADP/O-Quotient nach Stimulation der Atmungskette über Komplex II änderte sich im Verlauf von 96 h nicht signifikant verglichen

mit den Sham-operierten Tieren und den Kontrolltieren. Die Unterschiede des RCI und des ADP/O-Quotienten hinsichtlich der Substrate Glutamat-Malat und Succinat mit einem tendenziell geringeren Effekt nach Stimulation der Atmungskette durch Komplex II bleiben unklar. Eine gesteigerte ROS-Produktion mit insbesondere schädigendem Einfluss auf Komplex II könnte ursächlich sein ⁴⁰. Nicht nur die septischen Tiere, sondern auch die Shamoperierten Tiere wiesen nach Stimulation der Atmungskette mit Glutamat-Malat und Succinat in der frühen postoperativen Phase höhere RCI-Werte im Vergleich zu Kontrolltieren auf. Demnach hat nicht nur eine milde Sepsis, sondern ebenso eine sterile Laparotomie und damit operativer Stress - zumindest in der frühen postoperativen Phase - einen Einfluss auf die Funktion der Lebermitochondrien⁵. Die Ergebnisse decken sich mit früheren Resultaten von Herminghaus, et al. 48, die nachweisen konnten, dass eine sterile Laparotomie und in größerem Ausaß eine moderate Sepsis die mitochondrialen Funktion in der frühen postoperativen Phase beeinflussen. Mittal, et al. 59 beschrieben hingegen ein von der Operationstechnik unabhängiges Verhalten der Lebermitochondrien in einem septischen Rattenmodell. Die chirurgische Prozedur in unserem Experiment könnte demnach traumatischer gewesen sein. Im Gegensatz zu der von Mittal, et al. ⁵⁹ durchgeführten bloßen Laparotomie wurde bei den Sham-operierten Tieren in unserem Experiment noch zusätzlich ein Stent an der Wand der Kolonwand fixiert.

Die bisherigen Studien, in denen eine gesteigerte mitochondriale Funktion beobachtet wird, sind zeitlich begrenzt und überschreiten eine Zeitdauer von 72 h derzeit nicht. In unserem Versuch wird erstmals die mitochondriale Funktion während der Sepsis in einem Zeitverlauf untersucht, der über 72 h hinausgeht. Die Dauer der Sepsis spielt eine entscheidende Rolle bei der Beurteilung der mitochondrialen Funktion. Mitochondrien scheinen in der Lage zu sein auf kritische Erkrankungen, wie z.B. die Sepsis, zu reagieren und entsprechend initial die mitochondriale Funktion im Sinne eines Kompensationsmechanismus zu steigern. Nach einer kurzzeitigen Phase der Erschöpfung (siehe ADP/O-Quotient, Komplex I nach 72 h) scheinen sie sich anschließend zu erholen ⁵.

5.2.3 Diskussion der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in der Leber

In unserer Studie wurde oxidativer Stress in Form von ROS indirekt anhand der MDA-Konzentration als Endprodukt der Lipidperoxidation gemessen. Im Verlauf einer moderaten Sepsis war nach 24 h sowohl bei den septischen Tieren als auch bei den Sham-operierten Tieren ein Anstieg der MDA-Konzentration gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf sank die MDA-Konzentration in beiden Gruppen auf Kontrollniveau ab, um nach 96 h gegenüber der Kontrolle abzufallen. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen unter physiologischen Bedingungen bei der Reduktion von Sauerstoff während der Energiegewinnung in den Mitochondrien vor allem an den Komplexen I und III der Atmungskette^{36,85}. Die gesteigerte MDA-Konzentration, entsprechend einer gesteigerten ROS-Produktion in der Frühphase der Sepsis, könnte durch eine gesteigerte mitochondriale Funktion erklärt werden ⁵. Dies deckt sich ebenfalls mit den gesteigerten RCI-Werten in unserer Studie. In gut funktionierenden Mitochondrien ist der Verlust von Protonen über die innere Mitochondrienmembran relativ gering, sodass sich ein hohes Transmembranpotential einstellt ^{52,53}. Ein erhöhtes mitochondriales Transmembranpotential wiederum ist ursächlich für eine gesteigerte ROS-Produktion^{86,87}. Folglich haben hochaktive Mitochondrien ein höheres Transmembranpotential und führen demnach zu einer gesteigerten ROS-Produktion. Ähnlich unserer Studie fanden auch Taylor, et al. ⁴⁰ eine gesteigerte ROS-Produktion in metabolisch aktiven Lebermitochondrien in der Frühphase der Sepsis nach 16 h in einem durch CLP ausgelösten septischen Rattenmodell. Nethery, et al.⁸⁸ zeigten in einem septischen Rattenmodell ebenfalls eine gesteigerte ROS-Produktion in den Mitochondrien des Diaphragmas 18 h nach LPS-Injektion. Ben Shaul, et al.⁸⁹ und Giralt, et al.⁹⁰ fanden eine gesteigerte ROS-Produktion in den Mitochondrien des Herzens und der Leber 24 h nach LPS-Injektion. Auch Llesuy, et al. 58 konnten vermehrt oxidativen Stress, gemessen an der Chemilumineszenz von Lebergewebe, in einem septischen Rattenmodell 24 h nach Sepsisinduktion nachweisen. Entsprechend der gesteigerten ROS-Produktion zu Beginn könnte die abfallende ROS-Produktion in der Leber nach 96 h durch ein sinkendes mitochondriales Transmembranpotential aufgrund reduzierter mitochondrialer Aktivität erklärt werden. Dies deckt sich jedoch nicht mit der in unserer Studie gemessenen, unveränderten bis erhöhten mitochondrialen Funktion in der späten postoperativen Phase. Ferner sind vergleichbare Studien selten, die den Verlauf der ROS-Produktion während der Sepsis untersuchen. Um konkrete Aussagen über einen Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Funktion und der ROS-Produktion im Verlauf einer moderaten Sepsis zu treffen, sind demnach weitere Langzeitstudien zur ROS-Produktion während der Sepsis, vor allem zu späteren Messzeitpunkten, notwendig⁵. Neben den Mitochondrien gibt es weitere Quellen von ROS, die für die zeitlich veränderte ROS-Produktion im Verlauf unserer Studie verantwortlich sein könnten. Dazu gehören unter anderen Oxidasen und Oxygenasen im Zytosol, im endoplasmatischen Retikulum und in den Peroxisomen⁵¹. Einen weiteren Erklärungsansatz für den Verlauf der ROS-Produktion mit einer gesteigerten Produktion in der frühen und einer abfallenden Produktion in der späten postoperativen Phase könnte das antioxidative System liefern. Mitochondrien verfügen über Antioxidantien, wie die MnSOD oder Glutathion, mithilfe

derer sie in der Lage sind ROS zu neutralisieren ^{38,39} und damit die Entstehung oxidativen Stresses zu verhindern. In verschiedenen Krankheitszuständen, wie z.B. der Sepsis, kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien^{30,91}. Eine gesteigerte ROS-Produktion gefolgt von einer Reduktion der Glutathion-Konzentration in der Leber fanden auch Victor, et al. ⁹² in einem septischen Rattenmodell. Durch die gesteigerte ROS-Produktion in der frühen postoperativen Phase der Sepsis könnten nun kompensatorisch antioxidative Mechanismen der Mitochondrien hochreguliert werden und die fallende ROS-Produktion in der späten postoperativen Phase erklären. In der Studie von Portolés, et al. ⁹³ konnte ein ähnliches Verhältnis der Oxidantien zu den Antioxidantien gefunden werden mit einem Anstieg der Oxidantien und einem Abfall der Antioxidantien in der akuten Phase des Endotoxinschocks sowie einem Abfall der Oxidantien und einem Anstieg der Antioxidantien in der Erholungsphase. Studien zu antioxidativen Therapien mit MitoQ, MitoE und Melatonin haben zudem gezeigt, dass bei Hinzugabe von Antioxidantien die ROS-Produktion umgekehrt sinkt 44,94. Der genaue Mechanismus hinter der gesteigerten antioxidativen Abwehr ist jedoch noch nicht hinreichend bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Die ROS-Produktion der septischen Tiere bzw. der Sham-operierten Tiere verhält sich gegenüber der Kontrolle ähnlich mit einem Anstieg in der frühen postoperativen Phase und einem Abfall in der späten postoperativen Phase. Folglich haben eine milde Sepsis und operativer Stress einen ähnlichen Effekt auf die ROS-Produktion und den oxidativen Stress 5

6. Schlussfolgerungen

Es ergeben sich folgende Schlussfolgerungen aus den zuvor diskutierten Fragen:

- Eine moderate Sepsis führt zu einer Beeinträchtigung des klinischen Zustandes im Hinblick auf den SRSS. Die Parameter der Organschädigung zeigen lediglich in der frühen postoperativen Phase einer moderaten Sepsis eine Veränderung gegenüber den Kontrolltieren.
- Eine moderate Sepsis verändert die mitochondriale Funktion in der Leber ähnlich einer sterilen Laparotomie mit einer gesteigerten Funktion in der frühen postoperativen Phase. Die gesteigerte Funktion kann möglicherweise einer kompensatorischen Reaktion auf die Inflammation entsprechen.

In der frühen postoperativen Phase bis 48 h kommt es zu einem Anstieg der mitochondrialen Funktion im Sinne eines Kompensationsmechanismus. Nach 72 h ist die mitochondriale Funktion möglicherweise aufgrund von ausgeschöpften Reserven vermindert, erholt sich jedoch in der späten postoperativen Phase der Sepsis nach 96 h.

 Die ROS-Produktion in der Leber, indirekt gemessen an der MDA-Konzentration, wird durch eine sterile Laparotomie und eine moderate Sepsis ähnlich beeinflusst mit einem Anstieg in der frühen postoperativen Phase und einem Abfall in der späten postoperativen Phase.

7. Ausblick

Anhand der vorliegenden Ergebnisse scheint die mitochondriale Funktion entgegen der eigentlich erwarteten beeinträchtigten Funktion initial mit einer Überaktivierung im Sinne eines Kompensationsmechanismus auf Sepsis zu reagieren und sich anschließend zu normalisieren. Eine verminderte mitochondriale Funktion könnte jedoch zu einem späteren Zeitpunkt, über die 96 h hinaus, auftreten bzw. durch eine schwerere Form der Sepsis ausgelöst werden. Dies wäre ein möglicher Ansatzpunkt weiterer Studien.

Die Tatsache, dass eine sterile Laparotomie und eine moderate Sepsis die mitochondriale Funktion ähnlich beeinflussen, lässt darauf schließen, dass schon der operative Stress einen Einfluss auf die mitochondriale Funktion hat. In weiteren Studien könnte demnach untersucht werden, ob die mitochondrialen Veränderungen im Rahmen der Laparotomie auf die Entstehung eines SIRS zurückzuführen sind.

Die gesteigerte ROS-Produktion in der Leber in der frühen postoperativen Phase der Sepsis und die verminderte Produktion in der späten postoperativen Phase kann unter anderem durch den Verlauf der mitochondrialen Funktion erklärt werden. Es gilt jedoch weiterhin zu untersuchen, ob zudem ein Zusammenhang zwischen der ROS-Produktion und der Produktion antioxidativer Mechanismen besteht.

Unsere Ergebnisse basieren auf tierexperimentellen Versuchen. Um die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf den Menschen zu ermöglichen, sind weitere Arbeiten an menschlichen Mitochondrien notwendig.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Marshall, J.C., *et al.* Outcome measures for clinical research in sepsis: a report of the 2nd Cambridge Colloquium of the International Sepsis Forum. *Critical Care Medicine* 33, 1708-1716 (2005).
- 2. Levy, M.M., *et al.* Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. *Lancet Infectious Diseases* **12**, 919-924 (2012).
- 3. Vincent, J.-L., *et al.* Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit. *The Lancet Respiratory Medicine* **2**, 380-386 (2014).
- 4. Fleischmann, C., *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospitaltreated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **193**, 259-272 (2016).
- 5. Herminghaus, A., *et al.* Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Medicine Experimental* 7, 4 (2019).
- 6. Fleischmann, C., *et al.* Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis: An Analysis of Hospital Episode (DRG) Statistics in Germany From 2007 to 2013. *Deutsches Ärzteblatt International* **113**, 159-166 (2016).
- 7. Gaieski, D.F., Edwards, J.M., Kallan, M.J. & Carr, B.G. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Critical Care Medicine* **41**, 1167-1174 (2013).
- 8. Seymour, C.W., *et al.* Severe sepsis in pre-hospital emergency care: analysis of incidence, care, and outcome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **186**, 1264-1271 (2012).
- 9. Coopersmith, C., *et al.* A comparison of critical care research funding and the financial burden of critical illness in the United States. *Critical Care Medicine* **40**, 1072-1079 (2012).
- 10. Torio, C. & Andrews, R. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer: HCUP Statistical Brief# 160. 2006-2013. *Agency for Healthcare Research and Quality* (2015).
- 11. Statistisches Bundesamt Deutschland (Destatis). Gesundheitsausgaben im Jahr 2013 bei 314,9 Milliarden Euro. Pressemitteilung Nr. 132 14.04.2015. Zugriff am 28.07.2018 unter https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2015/04/P D15_132_23611.html
- Bone, R.C., *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest Journal* 101, 1644-1655 (1992).
- 13. Levy, M.M., *et al.* 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Intensive Care Medicine* **29**, 530-538 (2003).
- 14. Dellinger, R.P., *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Medicine* **39**, 165-228 (2013).

- 15. Singer, M., *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **315**, 801-810 (2016).
- 16. Vincent, J.L., *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Medicine* **22**, 707-710 (1996).
- 17. Vincent, J.L. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. *Critical Care Medicine* **26**, 1793-1800 (1998).
- 18. Remick, D.G. Pathophysiology of sepsis. *The American Journal of Pathology* **170**, 1435-1444 (2007).
- 19. van der Poll, T. & Opal, S.M. Host-pathogen interactions in sepsis. *The Lancet Infectious Diseases* **8**, 32-43 (2008).
- 20. Stearns-Kurosawa, D.J., Osuchowski, M.F., Valentine, C., Kurosawa, S. & Remick, D.G. The pathogenesis of sepsis. *Annual Review of Pathology* **6**, 19-48 (2011).
- 21. Hotchkiss, R.S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* **13**, 862-874 (2013).
- 22. Singer, M., De Santis, V., Vitale, D. & Jeffcoate, W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet* **364**, 545-548 (2004).
- 23. Angus , D.C. & van der Poll , T. Severe Sepsis and Septic Shock. *New England Journal of Medicine* **369**, 840-851 (2013).
- 24. Deutschman, Clifford S. & Tracey, Kevin J. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. *Immunity* **40**, 463-475 (2014).
- 25. Spronk, P.E., Zandstra, D.F. & Ince, C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Critical Care* **8**, 462 (2004).
- 26. Ince, C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care* 9, S13 (2005).
- 27. Balestra, G.M., Legrand, M. & Ince, C. Microcirculation and mitochondria in sepsis: getting out of breath. *Current Opinion in Anaesthesiology* **22**, 184-190 (2009).
- 28. De Backer, D., *et al.* Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome*. *Critical Care Medicine* **41**, 791-799 (2013).
- 29. De Backer, D., Orbegozo Cortes, D., Donadello, K. & Vincent, J.-L. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence* **5**, 73-79 (2014).
- 30. Galley, H.F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British Journal* of Anaesthesia **107**, 57-64 (2011).
- 31. Garrabou, G., *et al.* The effects of sepsis on mitochondria. *Journal of Infectious Diseases* **205**, 392-400 (2012).
- 32. Spronk, P., Kanoore-Edul, V. & Ince, C. Microcirculatory and mitochondrial distress syndrome (MMDS): a new look at sepsis. in *Functional Hemodynamic Monitoring* 47-67 (2005).
- 33. De Backer, D., *et al.* Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. *Annals of Intensive Care* **1**, 27 (2011).
- 34. Brealey, D. & Singer, M. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Current Infectious Disease Report* **5**, 365-371 (2003).

- 35. Crouser, E.D. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. *Mitochondrion* **4**, 729-741 (2004).
- 36. Arulkumaran, N., et al. Mitochondrial Function in Sepsis. Shock 45, 271-281 (2016).
- 37. Poyton, R., Ball, K. & Castello, P. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **20**, 332-340 (2009).
- 38. Zhang, H., Go, Y.-M. & Jones, D.P. Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**, 119-126 (2007).
- 39. Jones, D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology Cell Physiology* **295**, C849-C868 (2008).
- 40. Taylor, D.E., Ghio, A.J. & Piantadosi, C.A. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **316**, 70-76 (1995).
- 41. Brealey, D., *et al.* Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet* **360**, 219-223 (2002).
- 42. Quoilin, C., Mouithys-Mickalad, A., Lécart, S., Fontaine-Aupart, M.P. & Hoebeke, M. Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics* 1837, 1790-1800 (2014).
- 43. Zapelini, P.H., *et al.* Antioxidant treatment reverses mitochondrial dysfunction in a sepsis animal model. *Mitochondrion* **8**, 211-218 (2008).
- 44. Lowes, D.A., Webster, N.R., Murphy, M.P. & Galley, H.F. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *British Journal of Anaesthesia* **110**, 472-480 (2013).
- 45. Brodie, D. & Bacchetta, M. Extracorporeal membrane oxygenation for ARDS in adults. *New England Journal of Medicine* **365**, 1905-1914 (2011).
- 46. Fleming, G.M. Renal replacement therapy review: past, present and future. *Organogenesis* 7, 2-12 (2011).
- 47. Soto-Gutierrez, A., *et al.* A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Engineering Part C: Methods* **17**, 677-686 (2011).
- 48. Herminghaus, A., *et al.* Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver. *Mitochondrion* **24**, 122-128 (2015).
- 49. Jeger, V., Djafarzadeh, S., Jakob, S.M. & Takala, J. Mitochondrial function in sepsis. *European Journal of Clinical Investigation* **43**, 532-542 (2013).
- 50. Takeyama, N., Itoh, Y., Kitazawa, Y. & Tanaka, T. Altered hepatic mitochondrial fatty acid oxidation and ketogenesis in endotoxic rats. *American Journal of Physiology* **259**, E498-505 (1990).
- 51. Kantrow, S.P., Taylor, D.E., Carraway, M.S. & Piantadosi, C.A. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **345**, 278-288 (1997).
- 52. Kozlov, A.V., *et al.* Different effects of endotoxic shock on the respiratory function of liver and heart mitochondria in rats. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* **290**, G543-549 (2006).

- 53. Kozlov, A.V., *et al.* Opposite effects of endotoxin on mitochondrial and endoplasmic reticulum functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **352**, 91-96 (2007).
- 54. Brealey, D., *et al.* Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **286**, R491-497 (2004).
- 55. Nin, N., *et al.* Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care Medicine* **30**, 2271-2278 (2004).
- 56. Larche, J., *et al.* Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsisinduced myocardial dysfunction and mortality. *Journal of the American College of Cardiology* **48**, 377-385 (2006).
- 57. Geller, E.R., Jankauskas, S. & Kirkpatrick, J. Mitochondrial death in sepsis: a failed concept. *Journal of Surgical Research* **40**, 514-517 (1986).
- 58. Llesuy, S., *et al.* Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Radicical Biology and Medicine* **16**, 445-451 (1994).
- 59. Mittal, A., *et al.* Early organ-specific mitochondrial dysfunction of jejunum and lung found in rats with experimental acute pancreatitis. *HPB : The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* **13**, 332-341 (2011).
- 60. Trumbeckaite, S., *et al.* Experimental acute pancreatitis induces mitochondrial dysfunction in rat pancreas, kidney and lungs but not in liver. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology* **13**, 216-224 (2013).
- 61. Zantl, N., *et al.* Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infections and Immunity* **66**, 2300-2309 (1998).
- 62. Lustig, M.K., *et al.* Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock* **28**, 59-64 (2007).
- 63. Stubs, C.C., *et al.* Acute, short-term hypercapnia improves microvascular oxygenation of the colon in an animal model of sepsis. *Microvascular Research* **90**, 180-186 (2013).
- 64. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* **193**, 265-275 (1951).
- 65. Mihara, M. & Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* **86**, 271-278 (1978).
- 66. Maier, S., *et al.* Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* **21**, 505-512 (2004).
- 67. Rittirsch, D., Hoesel, L.M. & Ward, P.A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* **81**, 137-143 (2007).
- 68. Villa, P., *et al.* Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **2**, 549-553 (1995).
- 69. Hubbard, W.J., *et al.* Cecal ligation and puncture. *Shock* 24, 52-57 (2005).
- 70. Remick, D.G., Newcomb, D.E., Bolgos, G.L. & Call, D.R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* **13**, 110-116 (2000).
- 71. Dyson, A. & Singer, M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Critical Care Medicine* **37**, S30-S37 (2009).

- 72. Wichterman, K.A., Baue, A.E. & Chaudry, I.H. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research* **29**, 189-201 (1980).
- 73. Scheiermann, P., *et al.* Comparing hemodynamics, blood gas analyses and proinflammatory cytokines in endotoxemic and severely septic rats. *International Immunopharmacology* **11**, 719-723 (2011).
- 74. Zur, B. Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. Univ. Diss., Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2005).
- 75. Brealey, D., *et al.* Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comperative Physiology* **286**, R491-497 (2004).
- 76. Deitch, E.A. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* 24, 19-23 (2005).
- 77. Watanabe, E., *et al.* Sepsis induces extensive autophagic vacuolization in hepatocytes: a clinical and laboratory-based study. *Laborytory Investigation* **89**, 549-561 (2009).
- 78. Nurnberger, S., *et al.* Impairment of endoplasmic reticulum in liver as an early consequence of the systemic inflammatory response in rats. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* **303**, G1373-1383 (2012).
- 79. Tappy, L. & Chioléro, R. Substrate utilization in sepsis and multiple organ failure. *Critical Care Medicine* **35**, S531-S534 (2007).
- 80. Kreymann, G., *et al.* Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Critical Care Medicine* **21**, 1012-1019 (1993).
- 81. Hart, D.W., Chinkes, D.L. & Gore, D.C. Increased tissue oxygen extraction and acidosis with progressive severity of sepsis 1, 2. *Journal of Surgical Research* **112**, 49-58 (2003).
- 82. Singer, M. & Brealey, D. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Biochemical Society Symposia* **66**, 149-166 (1999).
- 83. Suliman, H.B., Carraway, M.S. & Piantadosi, C.A. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **167**, 570-579 (2003).
- 84. Kozlov, A.V., *et al.* Effect of Estrogen on Mitochondrial Function and Intracellular Stress Markers in Rat Liver and Kidney following Trauma-Hemorrhagic Shock and Prolonged Hypotension. *Molecular Medicine* **16**, 254-261 (2010).
- 85. Singer, M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* **5**, 66-72 (2014).
- 86. Liu, S.S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. *Bioscience Reports* **17**, 259-272 (1997).
- 87. Lee, I., Bender, E. & Kadenbach, B. Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Molecular and Cellular Biochemistry* **234**, 63-70 (2002).
- 88. Nethery, D., *et al.* PLA2 dependence of diaphragm mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Applied Physiology* **89**, 72-80 (2000).
- 89. Ben Shaul, V., *et al.* The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicology Lettters* **123**, 1-10 (2001).
- 90. Giralt, M., Gasull, T., Blanquez, A. & Hidalgo, J. Effect of endotoxin on rat serum, lung and liver lipid peroxidation and on tissue metallothionein levels. *Revista Española de Fisiologia* **49**, 73-78 (1993).
- 91. Weidinger, A. & Kozlov, A. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* **5**, 472-484 (2015).

- 92. Victor, V.M., Espulgues, J.V., Hernandez-Mijares, A. & Rocha, M. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infectious Disorders Drug Targets* **9**, 376-389 (2009).
- 93. Portolés, M.T., Ainaga, M.J. & Pagani, R. The induction of lipid peroxidation by E. coli lipopolysaccharide on rat hepatocytes as an important factor in the etiology of endotoxic liver damage. *Biochimica et Biophysica Acta. G, General Subjects* **1158**, 287-292 (1993).
- 94. Lowes, D.A., Thottakam, B.M., Webster, N.R., Murphy, M.P. & Galley, H.F. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against organ damage in a lipopolysaccharide–peptidoglycan model of sepsis. *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 1559-1565 (2008).

9. Anhang

9.1 Materialien und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils

Buprenorphin s.c.	Temgesic®, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland
Darmannaht	monofil, nicht resorbierbarer Faden 6-0 Ethikon Prolene®, Ethikon Inc, Somerville, USA; EH7403
Desinfektionsmittel	Kodan® Tinktur forte, farblos, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Einmalkanüle	Sterican® 20 G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalkanüle	Sterican® 27 G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalspritze	Injekt® 5 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, 4606051V
Einmalspritze	Injekt® 10 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, 4606108V
Einmalspritze	Omnifix®-F 1 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalskalpell	Skalpellklinge, B.Braun Aesculap AG; Tuttlingen, Deutschland
Hautnaht	polyfil, resorbierbarer Faden, 4-0 Ethicon Vicryl Plus®, Johnson-Johnson, Neuss, Deutschland, VCP304H
Lochtuch	Foliodrape®, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland, No. 254307
Maske	Henry Schein Medical GmbH, Hamburg, Deutschland, No. 730-240

Muskelnaht	polyfil, resorbierbarer Faden, 4-0 Ethicon Vicryl Plus®, Johnson-Johnson, Neuss, Deutschland, VCP304H
Pentobarbital i.p.	Narcoren® Pentobarbital-Injektionslösung für Tiere, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland
Peripher venöser Katheter	14 G PP Braunüle MT®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, 4206142
Ringerlösung	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, Zul Nr. 6737462.00.01
Sevofluran	Sevorane®, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
Thermometer zur rektalen Temperaturkontrolle	Microlife® Vet-Temp, Microlife AG, Widnau, Schweiz, MT1831
Waage	Präzisionswaage EMB 2200-0, KERN & Sohn GmbH, Deutschland
Wärmematte	Julabo 6, Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland

9.2 Materialien und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils

EDTA-Röhrchen	Minicollect® EDTA, Greiner Bio One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Einmalkanüle	Sterican® 20 G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalkanüle	Sterican® 27 G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einmalspritze	Injekt® 5 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Einmalspritze	Injekt® 10 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland		
Einmalspritze	Omnifix®-F 1 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland		
Eismaschine	AF 80, Scotsman, Mailand, Italien		
Falcon	Falcon [™] 15 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland		
Falcon	Falcon [™] 50 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland		
Laborrührwerk	IKA® EUROSTAR 20 digital 2000 rpm, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland		
Mikrotitierplatten	Mikrotestplatte 96-Well F, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland		
Multi-Detektions- Plattenlesegerät	BioTek Synergy 2 mit Software Gen5 TM Version 1.11, BioTek, Winooski, USA (Protein- sowie MDA- Konzentrationsbestimmung)		
Respirometer	MT200 und SI782, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland		
Respirometer Software	782 System Version 4.4 HID, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland		
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland		
Pipette	Pipette Pasteur 7 ml, VWR International, Darmstadt, Deutschland		
Pipette	Pipettensatz Eppendorf Research® 100 µl bis 5000 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland		

Pipetus	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitze	10 μl Graduated Tip, Starlabgroup, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze	200 μl Bevelled Tip, Starlabgroup, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze	1000 μl Graduated Tip, Starlabgroup, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze	10 ml Costar Stripette, Corning Incorporated, New York, USA
Reaktionsgefäß	Safe-Lock-Tubes 0,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß	Safe-Lock-Tubes 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß	Safe-Lock-Tubes 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Statistiksoftware und graphische Darstellung	GraphPad Prism Version 6.0, GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA
Tiefkühlschrank	Forma 900 Ultratiefkühlschrank, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Trockenschrank	UT 6060, Hereaus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Vortexgerät	Vortex Genie Touch Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland

Zentrifuge groß	Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge klein	Eppendorf Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

9.3 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils

Die nachfolgend genannten Chemikalien und Reagenzien waren in p.a. Qualität.

1-Butanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,1,3,3-Tetramethoxypropan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
2-Thiobarbitursäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
3-MOPS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Adenosindiphosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aqua dest.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EGTA	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Folin-Ciocalteau-Reagenz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Linda, Duisburg, Deutschland
L-Glutamat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Malat	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Mannitol	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat, wasserfrei	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Phosphorsäure 85%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodium succinate	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Sodium sulfite	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tetrasodiumpyrophosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat Merck, Darmstadt, Deutschlan

9.4 Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils

9.4.1 Isolationspuffer

Isolationspuffer	200 mM Mannitol
	50 mM D(+)-Saccharose
	5 mM Kaliumdihydrogenphosphat
	5 mM 3-MOPS
	0,1 %iges BSA
	1 mM EGTA
	4 M KOH
	Mannitol und Aqua dest. zusammengeben und bei >
	90°C etwa 30 bis 60 Minuten erhitzen. Anschließend
	der Reihe nach die weiteren Substanzen hinzugeben.
	Den pH-Wert mit Kaliumhydroxid auf 7,15 titrieren.

9.4.2 Respirationspuffer

Respirationspuffer	130 mM Kaliumchlorid		
	5 mM Kaliumdihydrogenphosphat		
	20 mM 3-MOPS		
	2,5 mM EGTA		
	1 μM Tetrasodiumpyrophosphat		
	0,1 %iges BSA		
	4 M KOH		
	Die Substanzen zusammengeben und mit Aqua dest. auf		
	1 l auffüllen. Den pH-Wert mit Kaliumhydroxid auf 7,4		
	titrieren.		
	1		

9.4.3 Lösungen für die Proteinkonzentrationsbestimmung

Lowry Lösung 1	<u>15 ml Reagenz A</u> (10 g Natriumkarbonat in 500 ml 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung lösen)				
	<u>150 μl Reagenz B</u> (2 g Kalium-Natrium-Tatra in 100 ml Aqua dest. lösen)				
	<u>150 μl Reagenz C</u> (1 g Kuper(II)-Sulfat-Pentahydrat in 100 ml Aqua dest. lösen)				
Lowry Lösung 2	2 ml Folin-Ciocalteau-Reagenz				
	2 ml Aqua dest.				

9.4.4 Lösungen für die MDA-Konzentrationsbestimmung

1,15%ige KCl-Lösung	0,575 g in 50 ml Aqua dest.
1 %ige Phosphorsäure-Lösung	0,5 ml 85 % ige Phosphorsäure in 42 ml Aqua dest.
0,6 %ige 2-Thiobarbitursäure- Lösung	0,3 g in 50 ml Aqua dest.

Septic Rat Severity Score 9.5

Untersuchungsbogen

Experiment:

Stentdurchmesser: _____ G

 Ratte-Nr:
 OP Datum:
 Uhrzeit:

Klinische Untersuchung:

Untersuchung	Untersuchungsergebnis	Beurteilung	Körper- gewicht	Erschei -nung	Klinik	Spontan- verhalten	Provoz. Verhalten
Körnergewicht	1 präop Gewicht (pG)	$\Lambda^{0}_{0} < 5 \rightarrow 0 P$					
18	2. Momentanwert (mW) g	$\Delta\% < 15 \Rightarrow 2 P$					
	3. $\Delta = \%$ des mW vom pG $\Delta \%$	Δ % < 20 \Rightarrow 3 P					
		$\Delta \% > 20 \Rightarrow 10 P$					
Erscheinung	1. normale Erscheinung, Fell anliegend, sauber geputzt 2. geringes Pflegedefizit Fell gesträubt	$\Rightarrow 0 P$ $\Rightarrow 1 P$					
	3. zunehmendes Pflegedef., Ränder an Auge/Anus	$\Rightarrow 2P$					
	4. deutliches Pflegedef., Augen verklebt, Einstreu	\Rightarrow 3 P					
Spontanverhalten	haftet am Anus	$\rightarrow 0 P$					
spontanvernation	2. R sitzt auf einer Stelle, Ganzkörperbewegung	$\Rightarrow 1P$					
	vorhanden						
	3. buckelige Haltung, schwankender Gang	\Rightarrow 3 P					
	4. immobil, Seitenlage	$\Rightarrow 10 P$					
Provoziertes	1. R flicht bei Käfigöffnung, starker Muskeltonus	$\Rightarrow 0 P$					
Verhalten	2. K flight erst bei Annaherung der Hand	$\Rightarrow 1 P$					
	4. Fluchtreflex erloschen	$\Rightarrow 2P$ $\Rightarrow 3P$					
Atemfrequenz	1. präop, Wert (pW) /min	$\Delta \% < 10 \implies 0 P$					
1	2. Momentanwert (mW) /min	$\Delta\% < 20 \Longrightarrow 1 P$					
	3. $\Delta = \%$ des mW vom pW $\Delta \%$	$\Delta\% < 50 \Longrightarrow 2 P$					
		$\Delta\% > 50 \Rightarrow 3 P$					
Exspiratorisches	Nein	$\Rightarrow 0 P$					
Atemgerausch	Ja	$\Rightarrow 1 P$					
Abdomen- nalnation (AP)	2 geringe Reaktion auf AP, weiches Abdomen	$\Rightarrow 0 P$ $\Rightarrow 1 P$					
pulputon (. ii)	3. deutliche Schmerzzeichen auf AP, abd. Resistenz	$\rightarrow 2P$					
	4. deutl. Schmerzzeichen auf AP, hartes Abdomen	$\Rightarrow 3 P$					
Kotbeschaffenheit	1. viel normaler Kot im Käfig, koten während der	$\Rightarrow 0 P$					
	Untersuchung 2. viel Kot im Käfig, Kot blutig, dünnflüssig oder schleimig	$\Rightarrow 1 P$					
	3. wenig Kot im Käfig, unabh. von Beschaffenheit	$\Rightarrow 2 P$					
	4. kein Kot im Käfig (seit letzter Untersuchung)	\Rightarrow 3 P					

Auswertung:

Pro Kategorie	Erklärung: bewertet wird jeweils nur einmal die maximal erreichte Punktzahl pro		
erreichte	Kategorie. Ist in wenigstens zwei Kategorien die maximal erreichbare Punktzahl von	 	
Punktzahl	3 Punkten erreicht, werden alle 3-Punkte Werte auf 4 Punkte aufgewertet		

Nein 🗆

Ja 🗆

Insgesamt erreichte Punktzahl (Addition der einzelnen Kategorien):

Opferung des Tieres notwendig bei 10 und mehr Punkten	

Unterschrift des Untersuchers:

10. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Versuchsablauf	7
Abb. 2: CASP- bzw. Sham-Chirurgie	8
Abb. 3: Respirometrie - Sauerstoffverbrauch während der oxidativen Phosphorylierung	12
Abb. 4: Septic Rat Severity Score (SRSS)	15
Abb. 5A: Harnstoffkonzentration im Blut	16
Abb. 5B: Kreatininkonzentration im Blut	16
Abb. 6A: AST-Konzentration im Blut	17
Abb. 6B: ALT-Konzentration im Blut	18
Abb. 6C: LDH-Konzentration im Blut	18
Abb. 7A: Mitochondriale Funktion – Respiratory Control Index, Komplex I	20
Abb. 7B: Mitochondriale Funktion – Respiratory Control Index, Komplex II	21
Abb. 8A: Mitochondriale Funktion – ADP/O-Quotient, Komplex I	22
Abb. 8B: Mitochondriale Funktion – ADP/O-Quotient, Komplex II	22
Abb. 9: MDA-Konzentration in der Leber	23

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standardverdünnungsreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung	10
Tabelle 2: Standardverdünnungsreihe für die MDA-Konzentrationsbestimmung	13

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die während der letzten Jahren an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren.

Ein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Olaf Picker für die Überlassung des sehr interessanten Themas dieser Arbeit. Außerdem bedanken möchte ich mich für die Unterstützung und gute Beratung in allen Phasen der Dissertation.

Ein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Inge Bauer für die Hilfe und Unterstützung bei den ein oder anderen Fragen und Problemstellungen.

Besonders möchte ich mich auch bei meiner Betreuerin Frau Dr. Anna Herminghaus bedanken. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die besonders gute und geduldige Einarbeitung und die großartige Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich zudem bei den technischen Assistentinnen Claudia Dohle, Nadine Lottmann und Birgitt Berke, die mir jederzeit mit ihrem Wissen und ihren technischen Fertigkeiten zur Seite standen.

Zu guter Letzt ein überaus großes Dankeschön an meine Familie und meinen Freund - für ihre bedingungslose Liebe, ihre Geduld und all die lieben verständnisvollen Worte.