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

Einfluss einer sterilen Laparotomie und einer moderaten abdominellen Sepsis auf die Mitochondrienfunktion im Darm im zeitlichen Verlauf bis 96h

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Rebecca Itta geb. Eberhardt

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gezeichnet:

Dekanin/Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Picker, Olaf

Zweitgutachter/in: PD Dr. Akhyari, Payam

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. Herminghaus A., Papenbrock H., Eberhardt R., Vollmer C., Truse R., Schulz J., Bauer I., Weidinger, A., Kozlov, A.-V., Stiban, J., Picker O. Intensive Care Med Exp. 2019; 7 (1): 4 . doi: 10.1186/s40635-018-0219-

Zusammenfassung

Auch heutzutage stellt eine Sepsis mit den Folgen eines möglichen Multiorganversagens eine große Herausforderung in der Intensivmedizin dar. Sowohl eine Störung der Mikrozirkulation als auch eine mitochondriale Dysfunktion, insbesondere des Gastrointestinaltraktes, werden als ein wesentlicher pathophysiologischer Mechanismus der Sepsis angesehen. Allerdings ist bislang nicht untersucht, ob und in welchem Ausmaß Mitochondrien aus Zellen des Gastrointestinaltraktes ihre Funktion während der Sepsis verändern und welchen Einfluss bereits eine isolierte Laparotomie hat. Ziel dieser Studie war es, im Zeitverlauf über 96 h zu untersuchen, inwieweit eine Sepsis mit abdominellem Fokus zu einer mitochondrialen Dysfunktion des Darmes führt und welcher Bedeutung dabei der reinen Laparotomie (Sham OP) zukommt.

Nach Genehmigung der Tierschutzbehörde wurden 95 männliche Wistar-Ratten in 8 Gruppen (n=11-12) randomisiert: Gruppen 1-4 Sham, Gruppen 5-8 CASP. Nicht behandelte Tiere dienten als Kontrolle (n=9). Zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde die mitochondriale Funktion in Gewebehomogenaten des *Colons* mittels Respirometrie gemessen. Dabei wurde der mitochondriale Sauerstoffverbrauch gemessen und zwar für State 2 nach Stimulation mit den Substraten für Komplex I Glutamat/ Malat und Komplex II Succinat und für State 3 nach Stimulation mit ADP. Der „respiratory control ratio“ (RCR= State 3/ State 2) wurde als Maß der Kopplung zwischen Atmungskettenaktivität und oxidativer Phosphorylierung berechnet. Die Effizienz der oxydativen Phosphorylierung wurde durch die ADP/O-Ratio (zugegebene Menge ADP/ Verbrauchter O_2) dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde das Computerprogramm GraphPad Prism v6.01 verwendet. Dabei wurde eine *two-way* ANOVA mit Signifikanzniveau $p<0,05$ und eine Tukey post-hoc Analyse durchgeführt.

Sowohl der RCR als auch die ADP/O-Ratio für beide Komplexe blieben im zeitlichen Verlauf in allen Gruppen unverändert. Die mitochondriale Funktion im *Colon* blieb bis zu 96h nach einer sterilen Laparotomie und bei einer moderaten abdominellen Sepsis im CASP-Modell unverändert.

Abstract

Even today sepsis and its most severe complication multi-organ failure are a major challenge in intensive care. Microcirculation and mitochondrial dysfunction are both considered as major pathophysiological mechanisms of sepsis. However, it has not yet been investigated whether and to which extent mitochondria from cells of the gastrointestinal tract change their function during sepsis and what influence a sterile laparotomy already has on them. The aim of this study was to investigate the effect of a sterile laparotomy and of a moderate abdominal sepsis on the mitochondrial function in colon in a time course over 96 hours.

According to the animal welfare authority, 95 male Wistar rats were randomized into 8 groups (n= 11-12): 1-4 sham, 5-8 CASP. Untreated animals served as control (n= 9). The mitochondrial respiration in colon homogenates was assessed 24, 48, 72, and 96 hours after surgery. Mitochondrial oxygen consumption was determined using a Clark-type electrode. State 2 (oxygen consumption in the presence of the substrates for complexes I and II) and state 3 respiration (ADP dependent) were assessed. The respiratory control ratio (RCR= state 3/ state 2) and ADP/O ratio (ADP added/ oxygen consumed) were calculated for both complexes.

Data are presented as means ± SD, two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Both the RCR and the ADP/O-ratio for both complexes remained unchanged over the time course of 96 hours. The mitochondrial function in the colon remains unchanged up to 96 hours after a sterile laparotomy and by moderate abdominal sepsis.

Abkürzungsverzeichnis

3-MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
ACCP	*American College of Chest Physicians*
ADP	Adenosindiphosphat
ADP/O	ADP-Sauerstoff-Ratio
ALT	Alanin-Aminotransferase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
art.	arteriell
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CASP	*Colon ascendens stent peritonitis*
dL	Deciliter
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
et al.	*et alii*
FAD/ $FADH_2$	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FELASA	*Federation for Laboratory Animal Science Associations*
GM	Glutamat-Malat
h	Stunde(n)
HIF	Hypoxie induzierender Faktor
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MARS	*mixed anti-inflammatory response syndrom*
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
M	Einheit der Stoffmengenkonzentation, entspricht mol/ Liter
mM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mmol/ Liter

µM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht µmol/ Liter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MW	Mittelwert
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NAD^+/ NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NIH	*National intitute of health*
nm	Nanometer
nM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht nmol/ Liter
nL	Nanoliter
O_2	Sauerstoff
OP	Operation
pg	Picogramm
RCR	*Respiratory control ratio*
rcf	*relative centrifugal force*
ROS	*Reactive oxygen species*
rpm	*revolutions per minute* (Umdrehungen pro Minute)
s.c.	subkutan
SCCM	*Society of Critical Care Medicine*
SD	Standardabweichung
SOFA-Score	*Sequential Organ Failure Assessment Score*
SRSS	*Septic rat severity score*
Succ	Succinat
t	Zeit
TBA	2-thiobarbitursäure
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
2. Material und Methoden 6
2.1 Tierexperimenteller Teil 6
2.1.1 Versuchstiere 6
2.1.2 CASP-Chirurgie 7
2.2 Laborexperimenteller Teil 8
2.2.1 Herstellung der Gewebeprobe 8
2.2.2 Respirometrische Messung 9
2.2.3 Bestimmung von Malondialdehyd im *Colon* 12
2.2.4 Blutproben 13
2.3 Statistische Auswertung 13
3. Ergebnisse 14
3.1 ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel 14
3.2 MDA-Assay im *Colon* 16
3.3 Effekte der sterilen Laparotomie und der Sepsis auf die mitochondriale Funktion des *Colon* 16
4. Diskussion 18
5. Literaturverzeichnis 23
6. Anhang 28
6.1 Material und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils 28
6.2 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils 28
6.3 Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils 30
6.4 Material und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils 31
6.5 Septic rat severity scoring system 33

1. Einleitung

Sepsis und der septische Schock gelten weltweit als ein bedeutendes Gesundheitsproblem. Das Krankheitsbild und seine Folgen betreffen jedes Jahr Millionen von Menschen und die Inzidenzrate steigt jährlich weiter (1,2,3,4). Intraabdominelle Infektionen sind die zweithäufigste Ursache der Sepsis und stellen dadurch ein großes Problem im klinischen Alltag dar (5). Trotz stetiger Fortschritte in der Forschung und Entwicklung neuer Medikamente und Behandlungsstrategien bleibt das sepsisbedingte Organversagen die häufigste postoperative Komplikation und Haupttodesursache der Intensivstationen (6). Daher ist es von zentraler Bedeutung eine Sepsis früh zu erkennen und zu therapieren, um die signifikant hohe Mortalität und Morbidität zu senken (7).

Sepsis ist definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine fehlregulierte Wirtsreaktion auf eine mutmaßliche Infektion verursacht wird (8). Im Zuge dieser Sepsisdefinition wurde der *Sequential Organ Failure Assessment Score*, kurz SOFA-Score, zur Risikoeinschätzung im klinischen Alltag entworfen, um Patienten mit erhöhtem Risiko für Organversagen früh und schnell zu identifizieren zu können. Tabelle 1 zeigt die verschiedenen Parameters des Scores, wobei eine Organdysfunktion bei einer akuten Veränderung von ≥ 2 Punkten sehr wahrscheinlich ist.

Organ	Parameter	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte
Lunge	O_2-Partialdruck arteriell / Insp.O_2-Fraktion in mmHg	<400	<300	<200	<100
Blutbild	Thrombozytenabfall/ nL	<150	<100	<50	<20
Leber	Bilirubin in mg/dL	1,2-1,9	2,0-5,9	6-11,9	≥12
Kreislauf	Mittlerer arterieller Druck bzw. Katecholaminbedarf	<70 mmHg	Bedarf niedrig	Bedarf mittel	Bedarf hoch
Gehirn	*Glascow Coma Scale*	13-1	10-12	6-9	<6
Niere	Kreatininwert in mg/dL	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9 bzw. Oligurie	≥5 bzw. Anurie

Tabelle 1: SOFA-Score
O_2 – Sauerstoff, mmHG – Millimeter-Quecksilbersäule, nL – Nanoliter, mg – Milligramm, dL – Deciliter

Der septische Schock zählt als Untergruppe der Sepsis. Hierbei liegt eine starke Kreislaufinstabilität vor, sodass die Mortalität wesentlich erhöht ist (4). Patienten mit einem

septischem Schock können mit persistierender Hypotonie identifiziert werden, die Vasopressoren zur Aufrechterhaltung eines MAP von ≥65mmHg und eines Serumlactatspiegels von >2mmol/L (18mg/dL) trotz adäquater Volumenreanimation erfordert (9,10).

Bei der Pathogenese der Sepsis spielt eine übermäßige bzw. dysregulierte Immunreaktion eine zentrale Rolle. Sie ist Auslöser für eine kaskadenartige Aktivierung verschiedener Signalwege. Trotz der hohen Inzidenz von Sepsis und Multiorganversagen (MODS) ist die Pathogenese immer noch nicht ganz verstanden (11,12). Daher ist es weiterhin eine Herausforderung zuverlässige Sepsisparameter zu bestimmen. Zytokine, als systemische Mediatoren, die auch bei einer lokalen Entzündungsreaktion in das Blutgefäßsystem freigesetzt werden, haben sich zunehmend als frühe Sepsismarker etabliert (13). Aus mehreren Untersuchungen ist hervorgegangen, dass unter den Zytokinen vor allem Interleukin 6 (IL- 6), Interleukin 10 (IL- 10) und der Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-α) bei der Sepsis eine zentrale Rolle spielen (14,15). IL-6 wird im Rahmen einer Entzündungsreaktion frühzeitig sezerniert und ist leicht im Serum nachzuweisen. Es wird daher vor allem zur Beurteilung der Dynamik akut entzündlicher Krankheitsbilder in der Intensivmedizin genutzt.

Aber die alleinige Betrachtung immunologischer Vorgänge reicht zum Verständnis der Sepsispathogenese nicht aus (16). Es spielen zudem die Fehlverteilung der Durchblutung in der Mikrozirkulation sowie eine eingeschränkte Zellatmung aufgrund einer Störung der mitochondrialen Funktion eine große Rolle (17,18,19,20). Kommt es im Körper zu instabilen Kreislaufverhältnissen, wie zum Beispiel beim septischen Schock, wird der Blutfluss zur Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung zugunsten der lebenswichtigen Organe wie Herz oder Gehirn verteilt. Dadurch kommt es zu einem drastischen Abfall der Mikrozirkulation der Organe im Abdomen. Bisher sind therapeutische Maßnahmen zur Verbesserung der Mikrozirkulation meist ineffektiv.

Da über 90% des zellulären Sauerstoffs durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien verbraucht wird, ist ein Zusammenhang zwischen reduzierter Mikrozirkulation und einer mitochondrialen Dysfunktion naheliegend (21). Daher wird den Mitochondrien in der Forschung eine immer größere Rolle beim Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis zugeschrieben. Mitochondrien sind aufgrund der quantitativ bedeutsamsten Produktionsquelle von Adenosintriphosphat (ATP) ein essentieller Teil der zellulären Infrastruktur. Die Erzeugung von Energie in Form von ATP erfolgt an der inneren Mitochondrienmembran über eine Elektronentransportkette, die fünf verschiedene Komplexe beinhaltet. Die Elektronen

werden dabei von Komplex I bis IV geleitet, um im finalen Komplex V unter Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser aus Adenosindiphosphat (ADP) ATP herzustellen. Im Rahmen dieses Prozesses entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), auch als freie Radikale bezeichnet. Der vermehrte Anfall dieser freien Radikale führt zu oxidativem Stress, denn ROS sind hochreaktiv und können somit leicht mit umgebenden Molekülen wie zum Beispiel Proteinen, DNA und Lipiden reagieren. Azevedo et al. konnten zeigen, dass eine erhöhte ROS-Produktion während der Sepsis zur Organdysfunktion beiträgt (22). Noch ist allerdings nicht klar, ob der oxidative Stress zu einer stärkeren mitochondrialen Dysfunktion führt, oder ob es durch die mitochondriale Dysfunktion zu einer erhöhten ROS-Produktion kommt (19,23,24).

Singer kam zu der Erkenntnis, dass die ATP-Synthese bei einer Sepsis zunächst gesteigert werden kann und bei weiterem Fortschreiten der Sepsis und somit einer starken Gewebehypoxie erheblich sinkt (25). Bemerkenswert ist dabei, dass bei überlebenden Sepsispatienten in den Organen nur ein minimaler Anteil an apoptotischen Zellen nachzuweisen ist und die normale Funktion meist wieder erlangt wird (25). Brealy et al. halten es daher für wahrscheinlich, dass ab einem bestimmten Punkt die Funktionen in den Mitochondrien heruntergefahren werden, um die Zelle vor Langzeitschäden zu schützen (20). Sowohl im septischen Tiermodell (26) als auch bei Untersuchungen von Muskelbiopsien bei septischen Patienten (27) wurde ein Zusammenhang zwischen der Stärke der mitochondrialen Dysfunktion und dem klinischen Schweregrad der Sepsis gezeigt.

Des Weiteren ist die mitochondriale Dysfunktion bei der Sepsis auch nicht in allen Organen gleichermaßen ausgeprägt. So wurde in einem septischen Tiermodell von Mittal et al. gezeigt, dass bereits nach 6 Stunden die mitochondriale Funktion im Pankreas, in der Lunge und im Jejunum signifikant vermindert war, während die Mitochondrienfunktion in der Leber, in der Niere, im Duodenum und im Herzmuskel unverändert blieb (28). Andere Arbeitsgruppen zeigten hingegen, dass im septischen Schock die mitochondriale Funktion im Pankreas nach 6 Stunden, in der Niere nach 24 Stunden und in der Lunge nach 48 Stunden vermindert war, wohingegen die Mitochondrien in der Leber innerhalb der ersten 48 Stunden unverändert blieben (29). Dies lässt sich eventuell so begründen, dass die mitochondriale Funktion sowohl in verschiedenen Organen untersucht wurde als auch die Zeitpunkte der Messungen und die Schweregrade der Sepsis unterschiedlich waren. Die mitochondriale Funktion während einer Sepsis ist sehr gewebespezifisch betroffen und variiert stark zwischen den Organen (30,31).

Daher haben Arulkumaran et al. in ihrem Review versucht die Rolle der Mitochondrien bei einer Sepsis genauer zu definieren. Allerdings konnte bei der Zusammenschau einer Reihe von Studien sowohl mit experimentellen Sepsismodellen als auch bei kritisch kranken Patienten die Beziehung zwischen mitochondrialer Funktion und Organdysfunktionen nicht vollständig geklärt werden. Denn es wird immer noch diskutiert, ob Mitochondrien bei einer Sepsis induzierten Organdysfunktion Initiatoren, Verstärker, Zielobjekte oder nur Beobachter sind (32).

Allerdings bleibt die Studienlage bezüglich mitochondrialer Dysfunktion weiterhin kontrovers (33), da bisher immer noch nicht geklärt ist, in welchen Organen und zu welchem Zeitpunkt die mitochondriale Funktion primär beeinträchtigt ist. Vor allem das *Colon* als Ort der Sepsisentstehung und Motor der abdominellen Sepsis wurde in Studien bisher außer Acht gelassen. Die genauere Untersuchung der mitochondrialen Funktion in diesem Organ ist sehr wichtig, denn selbst wenn das *Colon* nicht der Hauptfokus der Infektion ist, kann sich eine Entzündungsreaktion verschlimmern, wenn die Barrierefunktion des Darms beschädigt ist. King et al. konnten einen verringerten Sauerstoffverbrauch der ilealen Schleimhaut bei endotoxämischen Ratten zeigen (34). Des Weiteren beschreiben Saxena et al., dass eine veränderte Mitochondrienfunktion im Sinne einer verminderten ATP-Produktion zu einer Barrierefunktionsstörung führt (35,36). Eine reduzierte Sauerstoffzufuhr kann zu einer Störung der Magen- und Darmbarriere führen (37,38), was wiederum das Eindringen von Bakterien und toxischen Stoffen ins Blut und Lymphsystem zur Folge hat. Daraus kann ein septischer Schock mit zusätzlichem Multiorganversagen resultieren (39,40). Um Strategien für die Verbesserung der Sauerstoffsättigung und für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion zu entwickeln, ist es also sinnvoll die Rolle der Mitochondrien des *Colons* im Rahmen einer Sepsis besser zu verstehen.

Bisher gab es nur wenige Studien, in denen die mitochondriale Funktion während einer Sepsis zeitabhängig untersucht wurde. Singer et al. haben gezeigt, dass sich die mitochondriale Funktion am Anfang schwerwiegender Erkrankungen wie zum Beispiel einer Sepsis zunächst verbessert und erst im Verlauf in späteren Phasen verschlechtert (41). In einer weiteren Studie wurden bei einer durch die Stuhlperitonitis induzierten Sepsis die einzelnen Komplexe der Atmungskette in der Leber und in der Skelettmuskulatur von der Ratte über einen Zeitraum von 72 Stunden analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich Komplex I sowohl in der Leber als auch in der Skelettmuskulatur der septischen Ratten bei zunehmenden Schweregrad verschlechterte (27). Daher ist es interessant, die mitochondriale Funktion über einen

längeren Zeitraum zu untersuchen. Das bessere Verständnis über die Rolle der Mitochondrien im Rahmen einer abdominellen Sepsis könnte Möglichkeiten für neue Therapieansätze bringen.

Zielsetzung und Fragestellung der Doktorarbeit

Ausgehend von diesem Stand ergeben sich die folgenden Fragestellungen:

1. In welchem Ausmaß beeinflusst die CASP-Operation die systemische Entzündungsreaktion gemessen an der Produktion von pro- und antientzündlichen Zytokinen (IL-6, IL-10, TNF-alpha) und wie verändert sich diese Reaktion im Zeitverlauf von 96 Stunden?
2. Führt eine sterile Laparomtomie und eine CASP-Operation bei Ratten zu einer Veränderung der mitochondrialen Funktion im Colon und zu welchem Zeitpunkt ist die Veränderung am stärksten ausgeprägt bei einem Verlauf bis zu 96 Stunden?
3. Welchen Einfluss hat die abdominelle Sepsis bei Ratten auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies im *Colon*?

2. Material und Methoden

2.1 Tierexperimenteller Teil

Im Anhang befinden sich genaue Angaben bezüglich benutzter Materialen und Geräte. Meine Betreuerin Frau Dr. med. Anna Herminghaus hat den tierexperimentellen Teil des Versuchs (CASP-OP, Betreuung der Tiere während des Versuchs, Organentnahme) übernommen, weshalb kein Fachkundennachweis gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes erforderlich war. Die Studie wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Recklinghausen, Deutschland (AZ: 84-02.04.2014.A112, ZETT: G112/14) genehmigt. Alle Experimente wurden nach den NIH-Richtlinien für Tiersorgfaltspflicht durchgeführt.

2.1.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an jungen, gesunden Wistar-Ratten durchgeführt. Für eine tierexperimentelle Induktion einer Sepsis eignet sich das bereits mehrfach in der Literatur beschriebene (42,43) und im Institut gut etablierte CASP Modell (26,44,45). Es wurden ausschließlich männliche Ratten benutzt, um hormonelle Schwankungen ausschließen zu können. Die Tiere sind aus der Zucht Janvier (Frankreich) und stammen aus der „Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftlicher Tierschutzaufgaben“ Düsseldorf. Sie wurden konventionell in Makrolon®-Einzelkäfigen vom Typ 3 unter klimatisierten Bedingungen (Raumtemperatur 22±2°C, relative Luftfeuchtigkeit 50±5%, Luftumwälzrate 16-20mal pro Stunde) gehalten. Eine künstliche Beleuchtung wurde im 12-Stunden Tag-Nacht-Wechsel mit weißem Kunstlicht in einer Intensität von 300-320 Lux durchgeführt. Als Einstreu diente entkeimtes Weichholzgranulat (Familie Rettenmaier & Söhne GmbH und Co KG, Rosenberg), welches zweimal wöchentlich gewechselt wurde. Zur Fütterung wurde ein Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) ad libitum genutzt. Das ad libitum angebotene entkeimte Trinkwasser (ozonisiert und mit HCl angesäuert) hatte eine pH-Wert von 2,6-3,0. Zu den Versuchen wurden ausschließlich Tiere herangezogen, welche keine Krankheitsanzeichen aufwiesen. Vor Versuchsbeginn unterlagen die Versuchstiere einer Adaptationszeit von 7 Tagen. Die Hygieneüberwachung erfolgt gemäß den FELASA- Richtlinien.

Insgesamt wurden 95 männlichen Wistar-Ratten (Gewicht 374±35 g) in den Versuch eingeschlossen. Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurde bei den Tieren in randomisierter Reihenfolge entweder eine CASP- oder Sham-Operation durchgeführt. Wie in Abbildung 1 zu

sehen ist, erfolgte eine weitere Randomisierung zur Aufteilung in die jeweiligen Untergruppen für die verschiedenen Organentnahmezeitpunkte.

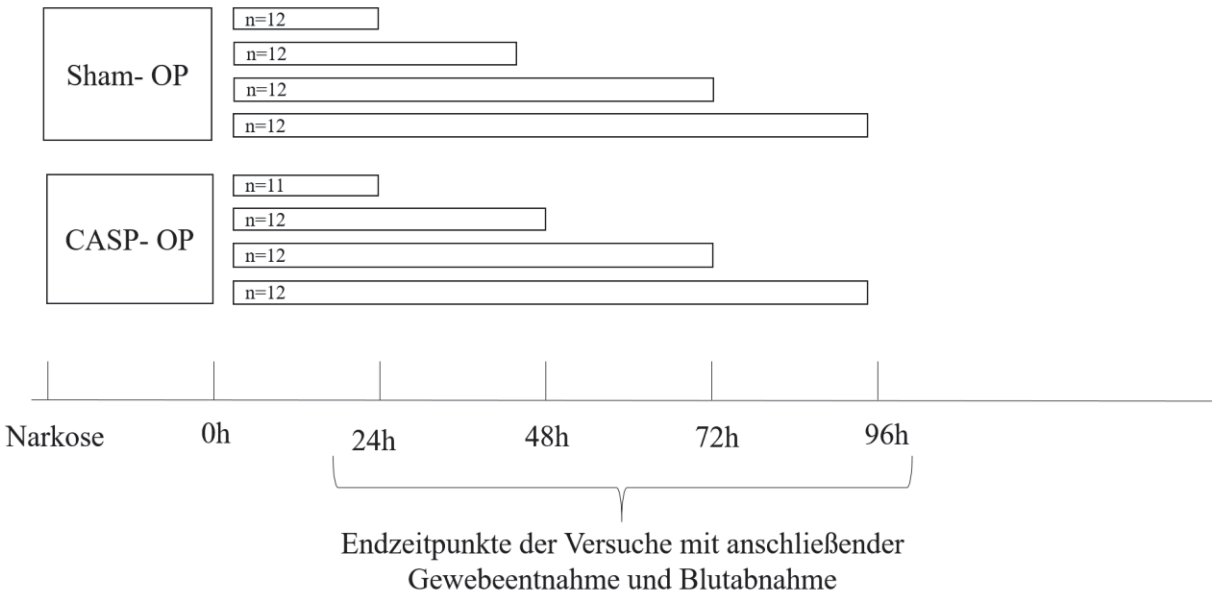


Abb. 1: Versuchsablauf und Gruppeneinteilung
n – Anzahl, h – Stunden, CASP– *colon ascendens stent peritonitis*

2.1.2 CASP-Chirurgie

In Anlehnung an das gut etablierte CASP-Model von Traeger, Stübs, Lustig et al. wurde die Sepsis induziert (42,43,45). Zunächst wurden die Tiere unter erhaltener Spontanatmung mittels Sevofluran in (3,0 vol. %, FiO_2 0,5) in Kurznarkose versetzt. Für die Analgesie wurde das hochpotente Opioidanalgetikum Buprenorphin (0,05mg/kg) subkutan injiziert.

Danach wurde das Versuchstier auf eine Wärmematte gelagert und die Operationsfläche für den weiteren Eingriff vorbereitet. Es erfolgte eine mediane Laparotomie über eine Länge von circa 2cm. Nach Aufsuchen des Zökums wurde 0,5cm distal der Ileozökalklappe eine Venenverweilkanüle (G14) durch die antimesenterische Darmwand gestochen. Die Nadel wurde zurückgezogen und die verbleibende Plastikumhüllung auf eine Länge von insgesamt 8 mm gekürzt. Zur Fixierung wurde der Katheter an die Darmwand genäht. Um die Durchlässigkeit und Füllung des Stents sicherzustellen, wurde ein kleiner Tropfen Faeces durch die nun entstandene Verbindung in die Bauchhöhle gepresst. Der kontinuierliche Austritt der Ingesta führte im weiteren Verlauf zur Peritonitis und mündete anschließend in eine Sepsis.

Die Tiere der Sham-Gruppe wurden in gleicher Weise operiert, allerdings wurde der Stent nicht in das *Colon*-Lumen eingebracht, sondern auf die Darmwand aufgenäht ohne diese zu penetrieren.

Bei beiden Gruppen wurde das Zökum wieder in die Ausgangssituation gelegt und anschließend wurden die Muskelschichten und die Bauchhaut vernäht. Bevor die Tiere zum Aufwachen in ihre Käfige gelegt wurden, wurden sie gewogen und die Temperatur gemessen. Insgesamt dauerte die Operation circa 15 Minuten. Die Tiere verblieben für die restliche Zeit des Versuchs in ihren gewärmten Käfigen und wurden dabei in regelmäßigen Abständen überwacht. Wasser und Nahrung stand jederzeit ausreichend zur Verfügung. Zur Einschätzung der klinischen Zeichen der Sepsis wurde mit Hilfe eines numerischen Punktesystems der *Septic Rat Severity Score* (SRSS) erhoben (siehe Anhang). Der Score wurde von einem nicht verblindeten Untersucher alle 12 Stunden erhoben und alle Tiere mit einem Wert über 10 Punkte wurden euthanasiert. Bis zum Versuchsende (maximal 96 Stunden) wurde die subkutane Buprenorphingabe (0,05mg/kg) alle 12 Stunden wiederholt.

Je nach Versuchsgruppe wurden die Ratten nach 24, 48, 72 oder 96 Stunden unter tiefer, letaler Barbituratnarkose (Pentobarbital i.p. 120mg/kg) fachgerecht und schmerzfrei durch Exsanguination getötet. Kurz davor wurden im Rahmen des Experiments Gewebestücke des *Colons* entnommen. Davon wurde ein Teil umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C tiefgefroren. Das restliche Gewebe wurde in 4°C kalten Isolationspuffer gelagert und umgehend für die Untersuchung der mitochondrialen Funktion aufbereitet. Des Weiteren erfolgte am Ende des Experiments im Rahmen der Exsanguination eine Blutentnahme durch Punktion des Herzens.

Neun weitere Tiere dienten für alle untersuchten Zeitpunkte als gesunde Kontrollen. Ohne eine vorherige Operation wurden sie mit Pentobarbital (120mg/kg) euthanisiert. Es erfolgte eine Blutentnahme mittels kardialer Punktion und eine Laparotomie zur Gewinnung von *Colon*-Gewebe. Das Gewebe wurde wie bereits oben beschrieben umgehend nach der Entnahme in 4°C kalten Isolationspuffer gelegt.

2.2 Laborexperimenteller Teil

Im Anhang befinden sich genauere Angaben bezüglich benutzter Chemikalien, Reagenzien, Kits, Puffern, Lösungen, Materialen und Geräten.

2.2.1 Herstellung der Gewebeprobe

Die im Isolationspuffer auf Eis gelagerte Gewebeprobe wurde während der gesamten Aufbereitung und den Messvorgängen gekühlt. Mit Hilfe einer Präzisionswaage wurde zunächst das Gewicht bestimmt. Im nächsten Schritt wurde das *Colon* in der Längsachse aufgeschnitten und mit vorsichtigem Tupfen von Kot-, Schleim und Fettgewebsresten befreit.

Zur Lockerung der Zellverbände erfolgte eine fünfminütige Inkubation mit Trypsin. Die Gewebeprobe wurde danach in einen Isolationspuffer, der zusätzlich 20mg/ml bovines Serumalbumin und Proteaseinhibitoren (cOmplete™) enthielt, gegeben. Anschließend wurde die Probe auf 2-3mm³ Stücken zerkleinert und fünfmal mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisierungsstab bei 2000rpm homogenisiert.

Die Proteinbestimmung des Gewebes erfolgte nach der Lowry Methode (46). Zur externen Standardisierung wurde bovines Serumalbumin verwendet. Die Messung der Proben erfolgte per Dreifachbestimmung im Verdünnungsverhältnis Homogenat zu Wasser 1:100. Nach Zugabe der einzelnen Lösungen und den vorgeschriebenen Inkubationszeiten gemäß Protokoll wurde eine photometrische Messung mittels Doppelbestimmung durchgeführt. Anhand der Ergebnisse wurde aus den drei technischen Replikaten der Mittelwert errechnet.

2.2.2 Respirometrische Messung

Als Maß für die Mitochondrienfunktion im Darm wurde nun mittels Respirometrie die Aktivität der einzelnen Teilschritte der zellulären Atmung untersucht. Dazu wurde das Respirometriesystem der Firma *Strathkelvin Instruments* mit der Clark- Elektrode verwendet. Nach Erwärmung des Respirometers auf 30°C, erfolgte eine Eichung der Elektrode über eine Zwei-Punkt-Kalibrierung. Zunächst erfolgte mit Wasser die Positivkontrolle und anschließend mit einer Sodiumsulfatlösung die Negativkontrolle. Für die Löslichkeit des Sauerstoffs wurde gemäß des *Strathkelvin Instruments* Handbuchs ein Wert von 223µmol 0_2*l^{-1} bei 30°C angenommen. Die respiratorischen Werte wurden in nmol/min/mg Protein angegeben.

Die von der Elektrode erfassten Sauerstoffkonzentrationswerte wurden an das Computerprogramm Strathkelvin 782 System weitergeleitet. Die Atmungsgeschwindigkeit wurde über die Ableitung der errechneten Sauerstoffkonzentration nach Zeit in mg Protein normiert. Mit dieser Methode war eine hochauflösende Sauerstoffmessung möglich. Zur Übersicht des gesamten Versuchsablaufs mit den applizierten Substraten dient Abbildung 2.

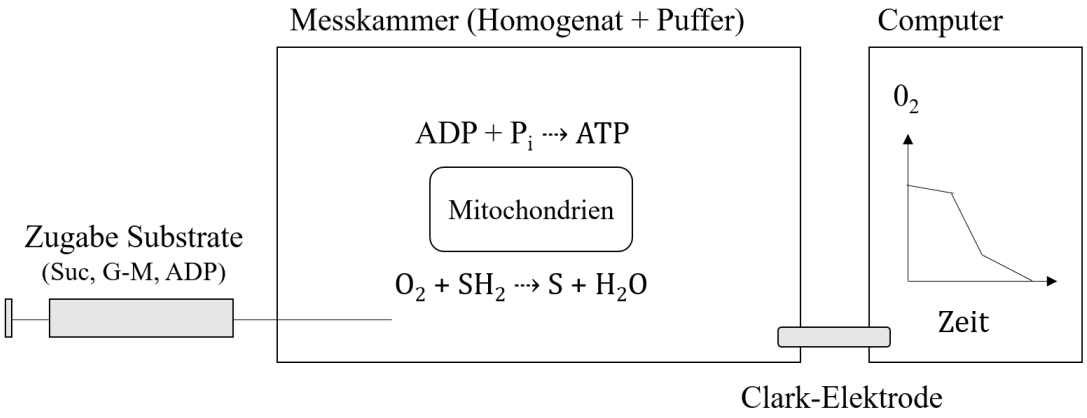


Abb. 2: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Arbeitsweise des Respirometers
Suc – Succinat, G-M – Glutamat-Malat ADP – Adenosindiphosphat, P_i – anorganisches Phosphat, ATP – Adenosintriphosphat, O_2 – Sauerstoff, H_2 – Wasserstoff, S – Substrat, H_20 – Wasser

Das Gewebehomogenat wurde in eine bestimmte Menge Respirationspuffer gegeben mit dem Ziel eine Proteinkonzentration von 6mg/ml zu erreichen. Die Probe aus Homogenat und Puffer wurde dann unter Sichtkontrolle in die Messkammer pipettiert. Ein elektromagnetischer Rührer sorgte für eine optimale Durchmischung der Probe. Während der Messung wurde die Kammer mit einem Stopfen verschlossen. Durch eine dünne Kapillare im Inneren des Stopfens wurden während der Messung die einzelnen Substrate mittels einer Spritze in die Kammer injiziert. Die Sauerstoffkonzentration wurde durch die Clark-Elektrode gemessen (siehe Abbildung 2). Die Sauerstoffkonzentration wurde stetig während des gesamten Messvorgangs aufgezeichnet. Die Werte aus dem Messvorgang ließen sich in die verschiedenen mitochondrialen Respirationsstadien einteilen, die durch Nicholls und Ferguson 1992 folgendermaßen beschrieben wurden (47):

***State 1*:** Die ADP- und Substratlevel sind gering und dadurch ist die mitochondriale Atmung gering.

***State 2*:** Das Substratlevel ist hoch, während die mitochondriale Atmung aufgrund des ADP Mangels weiterhin gering ist.

***State 3*:** Nach Zugabe von ADP ist die mitochondriale Atmungskapazität hoch.

***State 4*:** Das vorhandene ADP wird in ATP umgewandelt, sodass das ADP Level gering ist und die mitochondriale Atmung nimmt wieder ab.

***State 5*:** In diesem Stadium liegt ein Sauerstoffmangel vor und die mitochondriale Atmung wird durch diesen limitiert.

Als Substrate für Komplex I wurden Glutamat und Malat verwendet. Das mitochondriale Enzym Glutamatdehydrogenase oxidiert Glutamat zu α-Ketoglutarat, wobei NAD^+ zu NADH reduziert wird und so als Substrat für Komplex I die Atmungskette in Gang setzt. Succinat ist Produkt des Citratzyklus und dient als Substrat für Komplex II, indem die Oxidation von Succinat zu Fumarat an die Reduktion von FAD zu $FADH_2$ gekoppelt ist. Danach erfolgt die Zugabe von ADP, der Vorstufe von ATP, dem Hauptenergiespeicher der Zelle. Durch die Umwandlung von ADP zu ATP wird die exogene mitochondriale Atmung an den endogenen Prozess der oxidativen Phosphorylierung gekoppelt. Die Energietransformation entsteht durch einen aufgebauten Protonengradienten, welcher Energie für die oxidative Phosphorylierung durch die ATP-Synthase zur Verfügung stellt.

Die Messung startete mit der Registrierung des *State* 1, also dem Sauerstoffverbrauchs ohne Zugabe von Substraten oder ADP. In getrennten Messvorgängen wurde nach einer Minute für Komplex I 2,5mM Glutamat und 2,5mM Malat und für Komplex II 5mM Succinat in die Messkammer injiziert. Danach stellte sich die basale Geschwindigkeit der Atmungskette, *State 2*, ein (siehe Abbildung 3). Nach einer weiteren Minute wurden 125µM ADP in die Kammer injiziert und so in den Zellen eine Verarmung der energiereichen Metabolite simuliert. Im *State* 3 wurde die Atmungskette zur maximalen ATP-Synthese stimuliert und der ADP-abhängige Sauerstoffverbrauch gemessen (ΔO). Beim Erreichen von *State 4* war das vorhandene ADP in ATP umgewandelt und dauerte noch an bis der vorhandene Sauerstoff nahezu vollständig verbraucht war. Nach 6 Minuten wurde die Messung beendet, da zu diesem Zeitpunkt bereits *State 5* erreicht war. Die Respirationsraten wurden in nmol/min/mg mitochondriales Protein wiedergegeben.

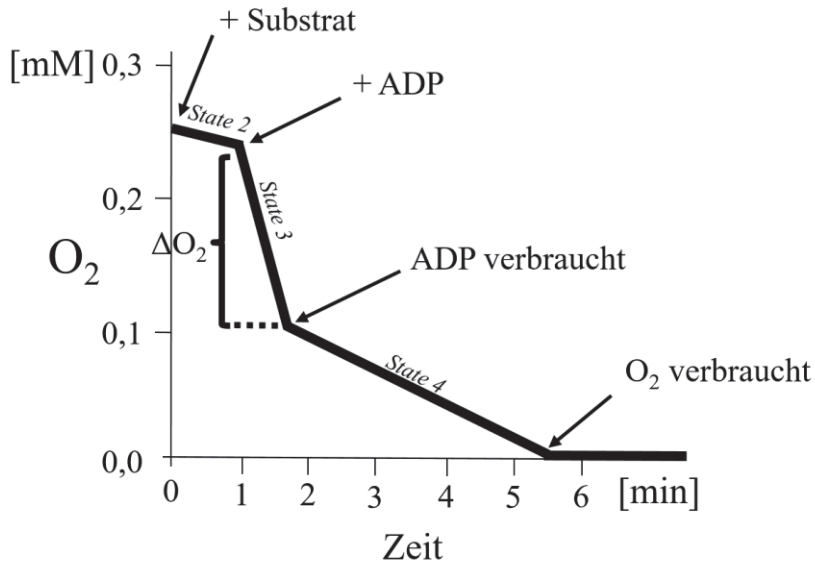


Abb. 3: Messkurve (schematische Darstellung)
mM – Millimolar, O_2 – Sauerstoff, ΔO_2 - Sauerstoffverbrauch während *State 3,* ADP – Adenosindiphosphat, min – Minute

Aus dem Verhältnis von *State 3* zu *State 2* wurde der respiratorische Kontrollquotient RCR (*respiratory control ratio*) als Maß für die Kopplung zwischen Elektronentransportkette und oxidativer Phosphorylierung berechnet. Je höher die Kopplung, desto größer ist der errechnete RCR-Wert. Das bedeutet eine höhere Substratoxidation in Verbindung mit einer größeren ATP-Produktion aufgrund eines nur sehr kleinen Protonenlecks. Im Gegensatz dazu entstehen niedrigere Werten bei einem größeren Protonenleck. Der RCR kann Werte zwischen 1 und unendlich annehmen (47).

RCR= [State 3] / [State 2]

Des Weiteren wurde die sogenannte ADP-Sauerstoff-Ratio aus dem Verhältnis von zugegebener ADP-Menge und dem Sauerstoffverbrauch berechnet, welches ein Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung darstellt.

ADP/O = zugegebenes ADP / ΔO_2

2.2.3 Bestimmung von Malondialdehyd im *Colon*

Das bei oxidativem Stress im *Colon* entstehende Malondialdehyd (MDA) ist ein indirekter Indikator zur Bestimmung der Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies (48). Zur Messung der MDA-Konzentration wurde der Thiobarbitursäure (TBA)-Assay durchgeführt (49). Dazu wurde zunächst ein Homogenat aus 50mg tiefgefrorenem *Colon* und 500µl Kaliumchlorid (1,5%ig) hergestellt. Nach Zugabe von 1500µL Phosphorsäure (1%ig) und 500µL TBA (0,6%ig) wurden die Messproben für 45 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach

Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 2000µL Butanol hinzugefügt und danach für 15 Minuten bei 4°C mit 3500rpm zentrifugiert. Der Absorptionsgrad des Überstands wurde bei 535nm und 520nm als Referenzwellenlänge gemessen. Die Malondialdehydkonzentration in nmol/mg wurde mittels Proteinbestimmung nach der Lowry Methode (46) in nmol MDA/mg Protein standardisiert.

2.2.4 Blutproben

Die Blutproben wurden für 10 Minuten bei 4°C mit 4000rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde abpippetiert und bei -80°C tiefgefroren. Damit wurden im Zentralinstitut für klinische Chemie und Labormedizin der Universitätsklinik Düsseldorf folgende Organschädigungsparameter bestimmt: Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Laktatdehydrogenase (LDH), Kreatinin und Harnstoff. Des Weiteren wurde die Konzentration der systemischen Entzündungsmarker für Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) bestimmt. Dafür wurden die BD OptEIA™ Rat ELISA Sets verwendet und nach Anleitung der mitgelieferten Protokolle durchführt.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der in der Excel Tabelle gelisteten Daten wurde mit dem Computerprogramm GraphPad Prism v6.01 (GraphPad Software, Inc., USA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels *two-way* ANOVA. Dabei wurde das Signifikanzniveau $p<0,05$ gewählt. Anschließend wurde eine Tukey post-hoc Analyse durchgeführt, um die Signifikanzen der einzelnen Gruppen zu untersuchen. Die im Ergebnissteil zu sehenden Balkendiagramme wurden ebenfalls mit dem Programm GraphPad Prism v6.01 erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel

Im Rahmen des Versuchs wurden sowohl bei CASP- und Sham-Tieren als auch bei den gesunden Kontrollen die pro- und antiinflammatorischen Entzündungsmarker im Plasma bestimmt. Die Ergebnisse der Zytokinplasmaspiegel sind in Abbildung 4 dargestellt. Dabei wurden die Gruppen der einzelnen Zeitreihen gegenübergestellt und es erfolgte ein Vergleich von CASP, Sham- und Kontrollgruppe in den einzelnen Zeitreihen.

Das Plasmalevel des proinflammatorischen IL-6 stieg 48h nach CASP-OP im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und den Sham-Tieren auf ein Maximum an. Danach fielen die Werte wieder auf das Niveau von den gesunden Kontrollen zurück. In der Sham-Gruppe blieb IL-6 im gesamten Untersuchungszeitraum unverändert (siehe Abbildung 4A, (50)).

Die Werte des antiinflammatorischen IL-10 waren 24 und 48h nach der CASP-OP im Vergleich zu Kontroll- und Shamgruppe signifikant erhöht. Zu den Zeitpunkten 72 und 96h nach der CASP-OP waren die Werte analog zu denen der Kontrollgruppe. Die IL-10 Werte der Sham-Gruppe blieben über den gesamten Zeitraum von 96h unverändert (siehe Abbildung 4B, (50)).

Der TNF-α-Spiegel zeigte eine signifikante Erhöhung bei 48h nach CASP-OP gegenüber der Sham-Gruppe und bei 96h nach CASP-OP verglichen mit der Sham-Gruppe. Des Weiteren gab es sowohl bei den Sham- als auch bei den CASP-Tieren einen Peak nach 96 Stunden verglichen mit der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4C, (50)).

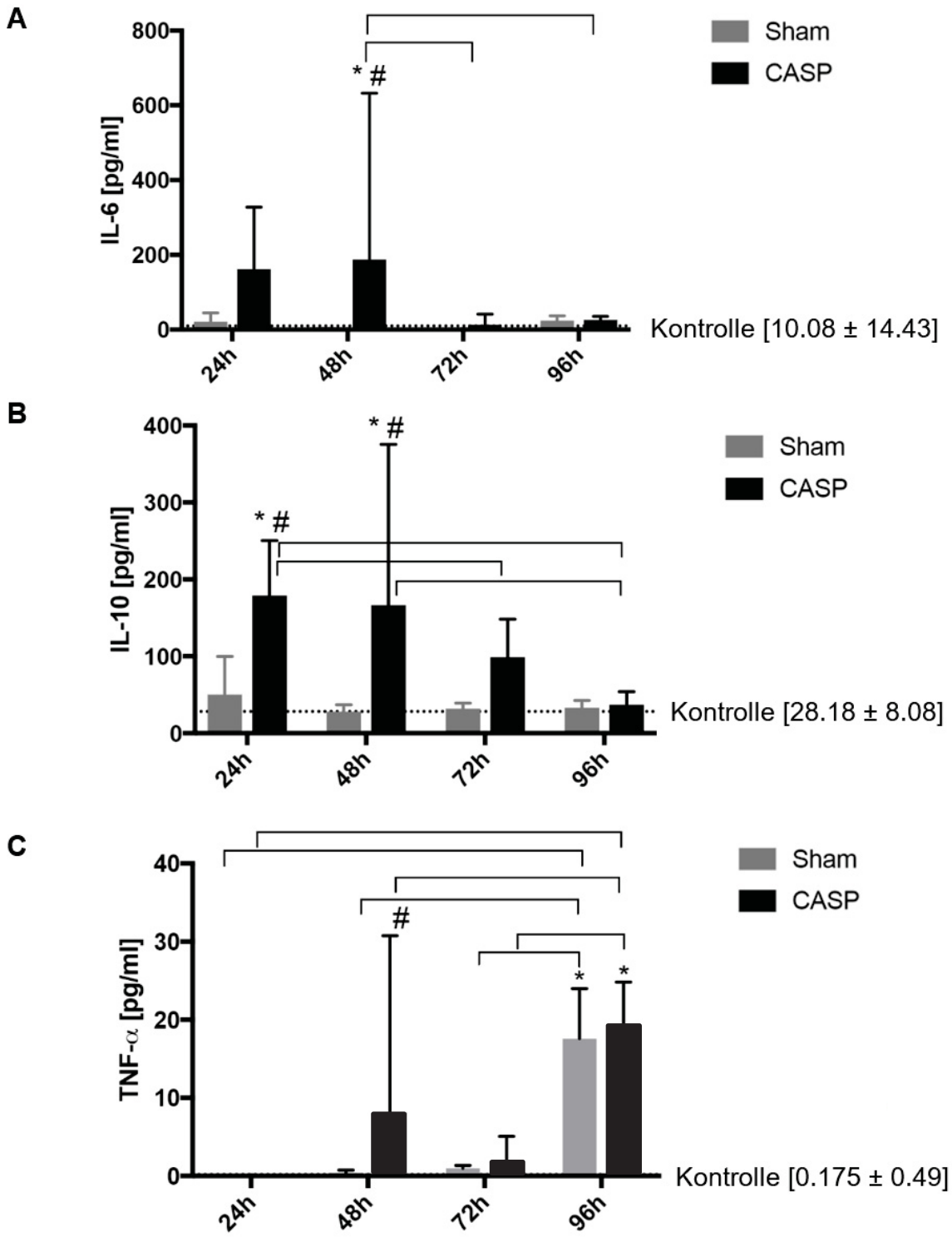


Abb. 4: Zytokinplasmaspiegel (50)
(A) IL-6, (B) IL-10, (C) TNF-α Plasmaspiegel bei septischen bzw. Sham-operierten Tieren. Die Werte wurden 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Operation ermittelt. Sham-Gruppen sind als grauer Balken und CASP-Gruppen als schwarzer Balken dargestellt. Gesunde, nicht-operierte Ratten, die zur Kontrolle dienten, sind als horizontal gestrichelte Linie dargestellt. Die Werte sind als Mittelwert ± SD dargestellt (Sham n=12, CASP 24h n=11, restliche CASP-Gruppen n=12, Kontrollgruppe n=9). * = $p<0,05$ vs.Kontrolle; # = $p<0,05$ vs. Sham; Π = zwischen den Gruppen.

3.2 MDA-Assay im *Colon*

Um den oxidativen Stress zu messen, wurden die Produkte der Lipidperoxidation durch den Nachweis von MDA bestimmt. Abbildung 5 zeigt, dass die MDA-Konzentrationen der CASP operierten Tiere im Vergleich zu den Sham- Tieren nicht signifikant angestiegen sind und die Werte lagen dabei alle in einem ähnlichen Spektrum (50). Nur bei den Sham-Tieren der 96h-Gruppe zeigte sich ein Anstieg der Konzentration verglichen mit der Kontrollgruppe.

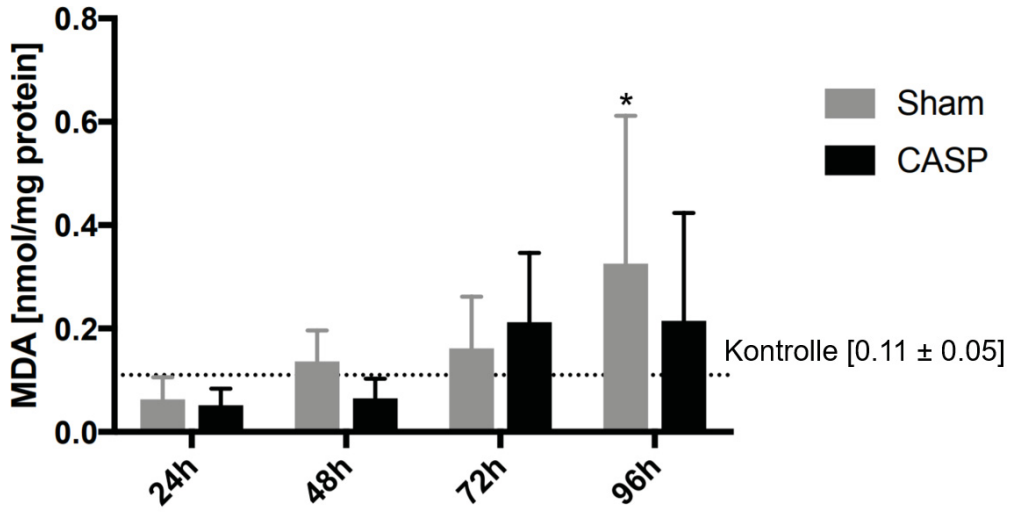


Abb. 5: MDA-Konzentration in nnmol/mg Protein (50)
Sham-Gruppen sind als grauer Balken und CASP-Gruppen als schwarzer Balken dargestellt. Gesunde, nicht-operierte Ratten, die zur Kontrolle dienten, sind als horizontal gestrichelte Linie dargestellt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± SD (Sham n=12, CASP 24h n=11, restliche CASP-Gruppen n=12, Kontrollgruppe n=9). * = p<0,05 gegenüber gesunden Kontrollen.

3.3 Effekte der sterilen Laparotomie und der Sepsis auf die mitochondriale Funktion des *Colon*

Die Ergebnisse der respirometrischen Messung sind in Abbildung 6 dargestellt. Der RCI für Komplex I und II blieb im zeitlichen Verlauf über 96h sowohl bei Sham-operierten als auch bei septischen Tieren unverändert (Abb. 6A und 6B, (50)). Es zeigten sich nur minimale Unterschiede zwischen den einzelnen CASP-Gruppen im zeitlichen Verlauf.

Die ADP/O-Ratio für beide Komplexe blieb sowohl in CASP als auch SHAM operierten Tieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe unverändert (Abb. 6C und 6D, (50)).

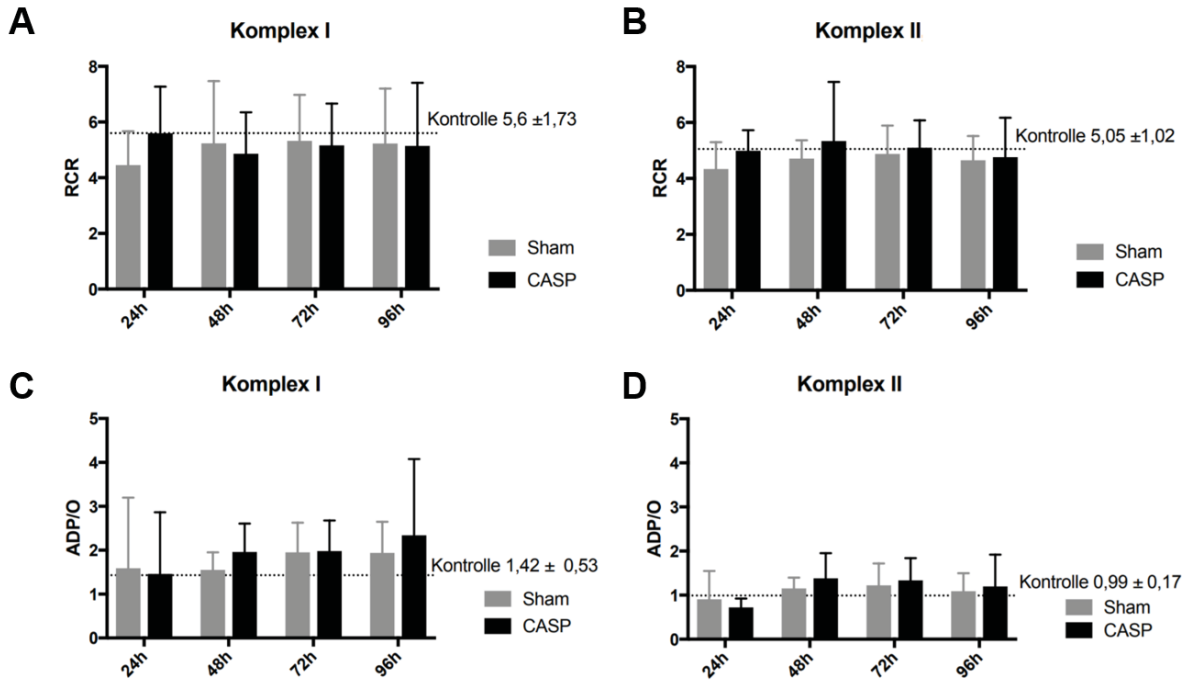


Abb. 6: Respiratory control ration (RCR) und ADP/O- Ratio (50)
RCR (State 3 / State 2) für Komplex I (A) und Komplex II (B) sowie ADP/O-Ratio für Komplex I (C) und Komplex II (D). Sham-Gruppen sind als grauer Balken und CASP-Gruppen als schwarzer Balken dargestellt. Gesunde, nicht-operierte Ratten, die zur Kontrolle dienten, sind als horizontal gestrichelte Linie dargestellt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± SD (Sham n=12, CASP 24h n=11, restliche CASP- Gruppen n=12, Kontrollgruppe n=9).

4. Diskussion

Das Ziel der hier vorliegenden Studie war die Untersuchung der zeitabhängigen Veränderungen der mitochondrialen Atmung bei einer abdominellen Sepsis.

Zu den eingangs gestellten Fragen konnten folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Bei einer moderaten abdominellen Sepsis bei der Ratte (CASP-Modell) steigen sowohl die pro- als auch die antiinflammatorischen Zytokine in der früheren postoperativen Phase bis 48h an und fallen danach auf das Niveau von den Kontrolltieren ab. Bei TNF-alpha kommt es nach 96h zu einem erneuten Peak sowohl bei Sham- als auch bei den CASP-Tieren.
2. Die mitochondriale Funktion im *Colon* wurde weder durch die sterile Laparotomie, noch durch die moderate abdominelle Sepsis im Zeitverlauf bis 96h verändert.
3. Die CASP-Operation führte zu keiner vermehrten ROS-Produktion im *Colon*. Dies steht im Einklang mit der unveränderten mitochondrialen Funktion.

Um eine abdominale Sepsis vergleichbar mit klinischen Bedingungen zu induzieren, ist eine Simulation der pathophysiologischen Vorgänge im Modell sehr wichtig. Zur Untersuchung der Pathophysiologie einer intraperitonealen Sepsis ist das CASP-Modell eine gute Wahl, da hier operativ ein septischer Fokus gesetzt wird. Während der kurzen Operation wurde ein Stent in das *Colon ascendens* implantiert und so eine Verbindung zwischen Darmlumen und Peritoneum hergestellt. Ein ähnliches Verfahren ist das CLP-Modell (*cecal ligation and puncture*), wobei das Zökum nach erfolgter Ligatur mittels Venenverweilkatheter punktiert wird. Durch die Punktion entsteht ein intraabdomineller Abszess (51). Allerdings wäre dies für unsere Studie ungeeignet, da durch die lokale Kontrolle des septischen Fokus eine zu geringe systemische Infektion entsteht (52). Eine weitere Methode ist die die LPS-Injektion (Lipopolysaccharid), die sehr einfach und weit verbreitet ist. Das injizierte Endotoxin stimuliert die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und führt so zu Symptomen der Sepsis (51). Allerdings bleibt hier der Bezug zur Klinik durch das Fehlen eines dauerhaften septischen Fokus aus. Eine humane Sepsis zeichnet sich außerdem durch erhöhte Zytokinspiegel aus, die bei den alternativen Verfahren nicht gezeigt werden konnten (52,53). Im Vergleich dazu kommt das CASP-Modell dem klinischen Setting durch den kontinuierlichen Austritt von Fäzes in die Bauchhöhle und die damit verbundene Einschwemmung von Bakterien in den systemischen Kreislauf sehr nahe. Es ist vergleichbar mit der Entstehung einer Anastomoseninsuffizienz nach einer Darmoperation. Das Verfahren

wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben und angewendet (42,43,54). Auch in unserem Institut für experimentelle Anästhesie der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf ist es bereits gut etabliert (26,45).

Nach Auswertung des SRSS-Score war bei allen CASP-Gruppen eine klinische Sepsis vorhanden (50). Eine milde Sepsis war in dieser Studie vorgesehen, um Änderungen im zeitlichen Verlauf bis 96h ohne allzu hohes Sterberisiko zu untersuchen. Es erfolgte keine Modulation der systemischen Infektion, dementsprechend wurden keine Antibiotika verabreicht und auf eine zusätzliche Volumentherapie verzichtet. Das Schmerzmittel Buprenorphin erhielten alle Tiere im gleichen Rhythmus. Sollte dies einen Einfluss haben, würde er sich bei allen Tiere gleichermaßen zeigen.

Zur Auswahl der vier Zeitpunkte diente zunächst die Studie von Stübs et al., da hier gezeigt werden konnte, dass sich nach 24 Stunden bereits eine Sepsis entwickelt hat, allerdings ohne jegliche Organschädigung (45). Die weiteren Zeitpunkte wurden in 24h-Intervallen gewählt, da dieser Zeitverlauf bisher noch nicht untersucht wurde und sich die Frage stellte, wie sich die Mitochondrienfunktion im längeren Verlauf verändert.

Eine Übertragung von Ergebnissen von Tier auf Mensch sollte immer sorgfältig geschehen. Brealy et al. konnten allerdings zeigen, dass vor allem Langzeitmodelle durch vergleichbare Ergebnisse bei einer Sepsis im Menschen sehr repräsentativ sind (27). Die Mitochondrienfunktion zwischen den einzelnen Organen einer Spezies ist ebenfalls schwer zu vergleichen, aber es gibt Hinweise darauf, dass die Mitochondrienfunktion in gleichen Organen verschiedener Spezies ähnlich ist (33).

Zur Untersuchung der Mitochondrienfunktion können Gewebehomogenate oder isolierte Mitochondrien dienen. Der Vorteil der hier verwendeten in vitro Messung an Gewebehomogenaten besteht darin, dass der Isolationsprozess und seine Folgen vermieden werden. Der mechanische Isolationsprozess kann zur Beschädigung der Mitochondrien führen. Des Weiteren kann es zum Verlust von Mitochondrien kommen, wodurch eine Verfälschung der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann, wenn zum Beispiel nur besonders beschädigte oder ganz unversehrte Mitochondrien isoliert werden (55,56,57).

Die immunologischen Zeichen einer Entzündung in Form von erhöhten Zytokinspiegeln werden regelmäßig im intensivmedizinischen Setting untersucht. Die Wahl bei dieser Studie fiel auf IL-6 und TNF-α als proinflammatorische Zytokine und IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin, da diese in der Klinik Anwendung finden und bereits in vielen

Studien auf ihre Verbindung zur Sepsis untersucht wurden (58,59,60,61,62). In unserer Studie waren die Werte der pro- und antiinflammatorischen Zytokine vor allem in der früheren postoperativen Phase bis zu 48 Stunden erhöht (50). Dies ist deckungsgleich mit mehreren vorangegangenen Studien sowohl bei Tiermodellen (42,43) als auch bei Humanstudien (58,59,60,61,62). IL-10 als Schüsselenzym der antiinflammatorischen Reaktion stellt eines der wichtigsten Zytokine in der Pathophysiologie der Sepsis dar (58). Außerdem dient IL-10 zur Vorhersage der Schwere einer Sepsis und des Mortalitätsrisikos (58,59). Erhöhte IL-6- und TNF-α-Werte sind vor allem mit der anfänglichen Entwicklung einer Sepsis assoziiert (60) und zeigen bei günstigem Outcome einer Sepsis im Verlauf abnehmende Werte (61). Dieser Verlauf zeigte sich auch in unserer Studie (50). Stark erhöhte IL-6 Werte korrelieren in den anderen Studien vor allem mit einer sehr schweren Sepsis und einem hohen Mortalitätsrisiko (58,62), was bei der hier vorliegenden Studie nicht zu erwarten war. Bei TNF-α zeigte sich neben dem hohen Wert nach 48h bei den CASP-Tieren ein weiterer Peak nach 96h in beiden Gruppen. In der Arbeit von Osuchowski et al. wurden ebenfalls Anstiege der proinflammatorischen Zytokine in der späten Phase bei chronischer Sepsis beschrieben (63). Allerdings lag bei Osuchowski et al. ein letales Sepsismodell vor. Im Gegensatz dazu ist das gewählte Sepsismodell dieser Studie ein eher mildes mit niedriger Mortalitätsrate. Des Weiteren zeigen die Werte in den Studienmodellen von Osuchowski et al. eine starke Streuung und korrelieren mehr mit dem Schweregrad der Sepsis als mit den einzelnen Beobachtungszeitpunkten (63,64,65). Abschließend kann daher aktuell nicht geklärt werden, weshalb es in beiden Gruppen nach 96h zu einem Anstieg gekommen ist.

Im Rahmen der Sepsis wird die Bestimmung der Zytokinspiegel zwar zur Früherkennung genutzt, aber eine mitochondriale Dysfunktion kann schon vor Anstieg der untersuchten Parameter auftreten und so von klinischen Tests übersehen werden. Mitochondrien haben durch ihre Produktion des universellen Energieträgers ATP eine tragende Rolle im Körper. Da es bisher keine Daten in der Literatur zur mitochondrialen Funktion des *Colons* während einer Sepsis gibt, wurde in dieser Studie der Fokus auf die zeitabhängige und organspezifische Untersuchung der mitochondrialen Atmung bis zu 96h nach steriler Laparotomie und CASP-Operation gelegt. Die mitochondriale Funktion im *Colon* als Fokus der abdominellen Bauchinfektion blieb unverändert im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und den Sham-Tieren im Zeitraum bis zu 96 Stunden (50). In der Studie von Mittal et al. konnte im Jejunum 6 Stunden nach Auslösung einer Pankreatitis eine mitochondriale Dysfunktion für Komplex I und II gezeigt werden (28). Allerdings ist die Vergleichbarkeit zu dieser Studie in gewissen Maßen eingeschränkt, da ein anderes Sepsismodell, ein anderer

Zeitpunkt und ein anderer Teil des Darms untersucht wurde. Man nimmt an, dass das *Colon* zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion viele Anpassungsmechanismen entwickelt hat, um sich an die schwierige metabolische Umgebung zu adaptieren (66). Einer der Mechanismen ist zum Beispiel die Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren-Faktors (HIF), wodurch es Epithelzellen unter Sauerstoffarmut möglich ist effektiv eine Barrierefunktion aufzubauen (67). Die Beziehung zwischen Hypoxie und Inflammation ist sehr wechselseitig. Einerseits kann ein Sauerstoffmangel eine Entzündung auslösen, andererseits können durch die Inflammation die Zielorgane ischämisch werden (68). Dies könnte ansatzweise eine Erklärung für die unveränderte mitochondriale Funktion im *Colon* unter entzündlichen Bedingungen sein. Eine andere Erklärung für die nur geringfügigen Veränderungen im Sauerstoffverbrauch des *Colons* könnte möglichweise ein geringerer ATP-Bedarf in diesem Organ sein (21). Es konnte nämlich gezeigt werden, dass Mitochondrien die Fähigkeit besitzen ihre ATP-Produktion an den zellulären Energiebedarf anzupassen (69,70). Allerdings gibt es bisher nur wenige Daten, die die Wirkung von Sepsis auf den zellulären ATP-Bedarf beschreiben. Der ATP-Bedarf wurde bei dieser Studie nicht untersucht, wodurch sich darüber keine endgültige Aussage treffen lässt.

Als Nebenprodukt der ATP-Produktion in den Mitochondrien entstehen freie Sauerstoffradikale, die wiederum zur Induktion von oxidativem Stress in den Zellen führen können (24,71). Die Auslösung einer abdominalen Infektion durch die CASP-Operation führte nicht zu einer vermehrten Produktion von ROS im *Colon*. Es ließ sich allerdings im Verlauf über 96h sowohl in der CASP- als auch in der SHAM-Gruppe ein leichter Anstieg verzeichnen, wobei lediglich bei den Sham-Tieren der 96h-Gruppe eine statistische Signifikanz auftrat. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte eventuell der erhöhte TNF-α-Spiegel in der 96h-Gruppe sein. Corda et al. haben gezeigt, dass TNF-α die ROS- Produktion erhöhen kann (72). Da die signifikante Erhöhung der ROS-Produktion allerdings nur bei den SHAM-Tieren auftrat, muss es noch weitere Einflussfaktoren geben.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich laut den Ergebnissen dieser Studie sagen, dass die Mitochondrienfunktion im Darm im zeitlichen Verlauf über 96 Stunden weitestgehend nicht moduliert wird. Dies ist eher unerwartet, da das *Colon* bei dem hier gewählten Sepsismodell den Fokus und Motor der Entzündungsreaktion darstellt. Außerdem ist es ein Organ, welches stark von der mikrozirkulatorischen Dysfunktion und einer beeinträchtigten Sauerstoffversorgung betroffen ist. Eine mögliche Erklärung ist die gute Anpassung des Darms an verschiedene Sauerstoffkonzentrationen und eine allgemein geringere metabolische Aktivität (21,66). Zur genaueren Abklärung dieses Phänomens müssen allerdings weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, da die komplexe Rolle der Mitochondrien im Zusammenhang mit Sepsis bzw. MODS noch nicht gänzlich verstanden sind.

5. Literaturverzeichnis

1. **Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N.K., Hartog, C.S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D.C., Reinhart, K.** Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis: current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015, 193 (3), 259-72.

2. **Fleischmann, C., Thomas-Rueddel, D.O., Hartmann, M., Hartog, C.S., Welte, T., Heublein, S., Dennler, U., Reinhart, K.** Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arzebl Int.* 2016, 113(10), 159-66.

3. **Martin, G.S., Mannino, D. M. , Eaton, S., Moss, M.** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine.* 2003, 348 (16), 1546–1554.

4. **Angus, D.C., Van der Poll, T.** Severe sepsis and septic shock. *N.Engl. J.Med.* 2013, 369, 840-851.

5. **Martin, G.S.** Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012, 10, 701-706.

6. **Gaieski, D.F., Edwards, J.M.,, Kallan, M.J., Carr, B.G.** Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med.* 2013, 41(5), 1167-1174.

7. **Vincent, J-L., Marshall, J.C., Namendys-Silva, S.A., et al.** Assessment of the worldwide burden of critical illness: the Intensive Care Over Nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med.* 2014, 2(5), 380-386.

8. **Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.S., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard G.R., Chiche, J.-D., Coopersmith, C.M., Hotchkiss, R.S., Levy, M.M., Marshall, J.C., Martin, G.S., Opal, S.M., Rubenfeld, G.D., et al.** The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016, 315, 801-10.

9. **Rhodes A., Evans, L., Alhazzani, W., Lewy, M.M., Antonelli, M., Ferrer, R. Kumar, A., Sevransky, J.E. et al.** Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 2017, 43(3), 304-377.

10. **Levy, M.M., Evans, L.E., Rhodes, A.** The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Critial Care Medizin.* 2018, 44(6), 925-928.

11. **Abraham, E., Singer, M.** Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med.* 2007, 35, 2408-16.

12. **Exline, M.C., Crouser, E.D.** Mitochondrial mechanisms of sepsis-induced organ failure. *Front Biosci J Virtual Libr.* 2008, 13, 5030-41.

13. **Oppenheim, J.J.** Cytokines, past, present, and future. *Int J Hematol.* 2002, 74, 3–8.

14. **Bauss, F., Droge, W., Mannel, D.N.** Tumor necrosis factor mediates endotoxic effects in mice. *Infect. Immun.* 1987, 55, 1622-25.

15. **Feng, M., Sun, T., Zhao, Y., Zhang, H.** Detection of Serum Interleukin-6/10/18 Levels in Sepsis and Its Clinical Significancee. *J Clin Lab Anal.* 2016, 30(6), 1037-1043.

16. **Deutschman, C.S., Tracey, K.J.** Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity* . 2014, 40, 463–75.

17. **Balestra, G.M., Legrand, M., Ince, C.** Microcirculation and mitochondria in sepsis: getting out of breath. *Curr Opin 4 Anaesthesiol.* 2009, 22, 184-190.

18. **Garrabou, G., Morén, C., López, S., Tobías, E., Cardellach, F., Miró, O., Casademont, J.** The effects of sepsis on mitochondria. 2012, 205, 392-400.

19. **Galley, H.F.** Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* 2011, 107, 57-64.

20. **Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenkski, R., Davies, N.A., Cooper, C.E., Singer, M.** Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet.* 2002, 316, 219-223.

21. **Rolfe, D.F., Brown, G.C.** Cellular energy utilization and molecular origin of standarf metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.* 1997, 77, 731-58.

22. **Azevedo, L.C., Janiszewski, M. und Soriano, F.G., Laurindo, F.R.** Redox mechanisms of vascular cell dysfunction in sepsis. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* 2006, 6, 159-164.

23. **Weidinger, A., Müllebener, A., Paier-Pourani, J. et al.** Vicious inducible nitric oxide synthase-mitochondrial reactive oxygen species cycle accelerates inflammatory response and causes liver injury in rats. *Antioxid Redox Signal.* 2015, 22, 572-586.

24. **Rocha, M., Herance, R., Rovira, S., Hernández-Mijares, A., Victor, V.M.** Mitochondrial dysfunction and antioxidant therapy in sepsis. *Infect Disord Drug Targets* . 2012, 12, 161–178.

25. **Singer, M.** The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence.* 2014, 5(1), 66-72.

26. **Herminghaus A., Barthel, F., Heinen, A., Beck, C., Vollmer, C., Bauer, I., Weidinger, A., Kozlov, A.V., Picker, O.** Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver. *Mitochondrion.* 2015, 24, 122-128.

27. **Brealey, D., Karyampudi, S., Jacques, T.S., Novelli, M., Stidwill, R., Taylor, V., Smolenski, R.T., Singer, M.** Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004, 268 (3), R491-497.

28. **Mittal, A., Hickey, A.J., Chai, C.C., Loveday, B.P., Thompson, N., Dare, A., Delahunt, B., Cooper, G.J., Windsor, J.A., Phillips, A.R.** Early organ-specific mitochondrial dysfunction of jejunum and lung found in rats with experimental acute pancreatitis. *HPB (Oxford).* 2011, 13 (5), 332-341.

29. **Thrumbeckaite, S., Kuliaviene, I., Deduchovas, O., Kincius, M., Baniene, R., Virketyte, S., Bukauskas, D., Jansen, E., Kupčinskas, L., Borutaite, V., Gulbinas, A.** Experimental acute pancreatitis induces mitochondrial dysfunction in rat pancreas, kidney and lungs but not in liver. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP Al.* 2013, 13, 216–224.

30. **Protti, A., Fortunato, F., Caspani, M.L. et al.** Mitochondrial changes in platelets are not related to those in skeletal muscle during human septic shock. *PLoS ONE.* 9.

31. **Singer, M., Brealey, D.** Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Biochem. Soc. Symp.* 1999, 66, 149-166.

32. **Arulkumaran, N., Deutschman, C.S., Pinsky, M.R., Zuckerbraun, B., Schumacker, P.T., Gomez, H., Gomez, A., Murray, P, Kellum, J.A.** Mitochondrial function in Sepsis. *Shock.* 2016, 45 (3), 271-281.

33. **Jeger, V., Diafarzahdeh, S., Jakob, S.M., Takala, J.** Mitochondrial function in sepsis. *Eur J Clin Invest.* 2013, 43(5), 532-42.

34. **King, C.J., Tytgat, S., Delude, R.L., Fink, M.P.** Ileal mucosal oxygen consumption is decreased in endotoxemic rats but is restored toward normal by treatment with aminoiguanidine. *Crit Care Med.* 1999, 27, 2518-24.

35. **Saxena, A., Lopes, F., Poon, K.K.H., McKay, D.M.** Absence of the NOD2 protein renders epithelia more susceptible to barrier dysfunction due to mitochondrial dysfunction. *Am J Phyiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017, 313, G26- G28.

36. **Saxena, A., Lopes, F., McKay, D.M.** Reduced intestinal epithelial mitochondrial function enhances in vitro interleukin-8 production in response to commensal Escherichia coli. *Inflammation Research.* 2018, 67, 829- 837.

37. **Truse, R., Hinterberg, J., Schulz, J., Herminghaus, A., Weber, A., Mettler-Altmann, T., Bauer, I., Picker, O., Vollmer, C.** Effect of topical iloprost and nitroglycerin on gastric microcirculation and barrier function during hemorrhagic shock in dogs. *J Vasc Res.* 2017, 54, 109–21.

38. **Vollmer, C., Weber, A.P.M., Wallenfang, M., Hoffmann, T., Mettler-Altmann, T., Truse, R.** Melatonin pretreatment improves gastric mucosal blood flow and maintains intestinal barrier function during hemorrhagic shock in dogs. *Microcirculation.* 2017, 24.

39. **Bonanno, F.G.** Clinical pathology of the shock syndromes. *J Emerg Trauma Shock .* 2011, 4, 233–43.

40. **Russell, D.H., Barreto, J.C., Klemm, K., Miller, T.A.** Hemorrhagic shock increases gut macromolecular permeability in the rat. *Shock.* 1995, 4, 50–55.

41. **Singer, M., De Santis, V., Vitale, D., Jeffcoate W.** Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet.* 2004, 364, 545-548.

42. **Traeger, T., Koerner, P., Kessler, W., Cziupka, K., Diedrich, S., Busemann, A., Heidecke, C.-D., Maier, S.** CASP - a standardized modell for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp.* 2010, 46, 2299.

43. **Lustig, M.K., Bac, V.H., Pavlovic, D., Maier, S., Gründling, M., Grisk, O., Wendt, M., Heidecke, C-D., Lehmann, C.** Colon ascendens stent peritonitis - a model of sepsis adopetd to the rat: physiological, mimcrocirculatory and laboratory changes. *Shock.* 2007, 28-1, 59-64.

44. **Schöneborn, S., Vollmer, C., Barthel, F., Herminghaus, A., Schult, J., Bauer, I., Beck, C., Picker, O.** Vasopressin V1A receptors mediate the stabilization of intestinal mucosal oxygenation during hypercapnia in septic rats. *Microvas Research.* 2016, 106, 24-30.

45. **Stübs, C.C.M., Picker, O., Schulz, J., Obermiller, K., Barthel, F., Hahn, A.-M., Bauer, I., Beck, C.** Acute, short-term hypercapnia improves microvascular oxygenation of the colon in an animal model of sepsis. *Microvas Res.* 2013, 90, 180-186.

46. **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr., A.L., Randall, R.J.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951, 193, 265-275.

47. **Gnaiger, E.** Mitochondrial Pathways and Respiratory control - an introduction to OXPHOS Analysis. *Mitochondrial Physiology Network 19.12.* 2014.

48. **Tsikas, D.** Assessment of lipid peroxidation by measurin malondialdehyde (MDA and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017, 524, 13-30.

49. **Khoubnasabjafari, M., Ansarin, K., Jouyban, A.** Critical review of malondialdehde analysis in biological samples. *Curr.Pharmac.Anal.* 2016, 12(1), 4-17.

50. **Herminghaus A., Papenbrock H., Eberhardt R., Vollmer C., Truse R., Schulz J., Bauer I., Weidinger, A., Kozlov, A.-V., Stiban, J., Picker O.** Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Med Exp. .* 2019, 7(1), 4.

51. **Wichterman, K., Baue, A., Chaudry, I.** Sepsis and septic shoc: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980, 29: 189-201.

52. **Maier, S., Traeger, T., Entleutner, M., Westerholt, A., Kleist, B., Hüser, N., Holzmann, B., Stier, A., Pfeffer, K., Heidecke, C.-D.** Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock Augusta Ga.* 2004, 21, 505-511.

53. **Rittirsch, D., Hoesel, L.M., Ward, P.A.** The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 2007, 81, 137–143.

54. **Zantl, N., Uebe, A., Neumann, B., Wagner, H., Siewert, J.R., Holzmann, B., Heidecke C.D., Pfeffer, K.** Essential role of gamma interferon in survival of CASP, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun.* 1998, 66 (5), 2300-9.

55. **Kozlov, A.V., Duvigneau, J.C., Hyatt, T.C., Raju, R., Behling, T., Hartl, R.T., Staniek, K., Miller, I., Gregor, W., Redl, H., Chaudry, I.H.** Effect of estrogen on mitochondrial function and intracellular stress markers in rat liver and kidney following trauma-hemorrhagic shock and prolonged hypotension. *Mol Med. .* 2010, 16, 254- 261.

56. **Pecinová, A., Drahota, Z., Nůsková, H., Pecina, P., Houštěk, J.** Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion.* 2011, 11, 722– 728.

57. **Azevedo, L.C.P.** Mitochondrial Dysfunction in Sepsis. *Drug Targets, 2010, 10, 214-223.* 2010, 10, 214- 223.

58. **Wu, H.P., Chen, C.K., Chung, K., Tseng, J.C., Hua, C.C., Liu, Y.C., Chuang, D.Y., Yang, C.H.** Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflamm. Res.* 2009, 58 (7), 385- 393.

59. **Gogos, C.A., Drosou, E., Bassaris, H.P., Skoutelis, A.** Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.* 2000, 181 (1), 176- 180.

60. **Mera, S., Tatulescu, D., Cismaru, C., Bondor, C., Slavcovici, A., Zanc, V., Carstina, D., Oltean, M.** Multiplex cyctokine profiling in patients with sepsis.

61. **Kumar, A.T., Sudhir, U., Punith, K., Kumar, R., Ravi Kumar, V.N., Rao, M.Y.** Cytokine profile in elderly patients with sepsis. *Indian J. Crit. Care Med.* 2009, 13 (2), 74-78.

62. **Kellum, J.A., Kong, L., Fink, M.P., Weissfeld, L.A., Yealy, D.M., Pinsky, M.R., Fine, J., Krichevsky, A., Delude, R.L., Angus, D.C., GenIMS Investigators.** Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: results of the genetic and inflammatory markers of sepsis (GenIMS) study. *Arch Intern Med.* 2007, 167 (15), 1655- 63.

63. **Osuchowski, M.F., Welch, K., Yang, H., Siddiqui, J., Remick, D.G.** Chronic sepsis mortality characterized by an individualized inflammatory response. *J Immunol Baltim Md .* 179, 623–630.

64. **Osuchowski, M.F., Connett, J., Welch, K., Granger, J., Remick, D.G.** Stratification is the key: inflammatory biomarkers accurately direct immunomodulatory therapy in experimental sepsis. *Crit Care Med .* 2009, 37, 1567–1573.

65. **Osuchowski, M.F., Welch, K., Siddiqui, J., Remick, D.G.** Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol Baltim Md.* 2006, 177, 1967–1974.

66. **Colgan, S.P., Campbell, E.L., Kominsky, D.J.** Hypoxia and Mucosal Inflammation. *Annu Rev Pathol .* 2016, 11, 77–100.

67. **Karhausen, J., Furuta, G.T., Tomaszewski, J.E., Johnson, R.S., Colgan, S.P., Haase, V.H.** Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest .* 2004, 114, 1098–1106.

68. **Lei, Q., Qiang, F., Chao, D., Di, W., Guoquian, Z., Bo, Y., Lina, Y.** Amelioration of hypoxia and LPS-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by emodin through the suppression of the NF-κB and HIF-1α signaling pathways. *Int J Mol Med .* 2014, 34, 1629–1639.

69. **Carré, J.E., Singer, M.** Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta .* 2008, 1777, 763–771.

70. **Brand, M.D., Nicholls, D.G.** Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J .* 435, 297–312.

71. **Murphy, M.P.** How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J .* 2009, 417, 1–13 .

72. **Corda, S., Laplace, C., Vicaut, E., Duranteau, J.** Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol .* 2001, 24, 762–768.

6. Anhang

6.1 Material und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils

Beatmungsgerät	Inspira asv, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Buprenorphin	Temgesic®, Reckitt Benkiser, Mannheim, Deutschland
Lochtuch	Foliodrape®, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Maske	Henry Schein Medical GmbH, Hamburg, Deutschland
Pentobarbital	Narcoren®, Pentobarbital- Injektionslösung für Tiere, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland
Venenverweilkanüle	G14 PP Braunüle MT® (REF 4206142) B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sevofluran	Sevorane®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Thermometer	GTH 1160, Greisinger Electronic GmBH, Temperaturmessung, Regenstauf, Deutschland
Wärmematte	Julabo 6, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland

6.2 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils

ADP (Adenosintriphosthat)	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis MO, USA
Aqua dest.	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA *fatty acid free* (*bovine serum albumine*)	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis MO, USA
cOmplete™ (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche Life Science, Mannheim, Germany

Ethylenglykoltetraacetat	Carl Roth GmBH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Folin	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis MO, USA
Flüssiger Stickstoff	Linde, Duisburg, Deutschland
Glutamat	Fluka, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis MO, USA
Malat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mannitol	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis MO, USA
MDA (Tetramethoxypropan)	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis MO, USA
MOPS MG (3-(N-Morpholino) - propansulfonsäure)	Carl Roth GmBH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
n-Butanol	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland
Phosphorsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutshland
Salzsäure 37%	Carl Roth GmBH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Succinat	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis MO, USA
Sucrose	Carl Roth GmBH + Co.KG, Karlsruhe,

	Deutschland
Thiobarbitursäure (TBA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetrasodiumpyrophosphat	Sigma-Aldrich Corporation, St.Louis MO, USA
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin- EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
ELISA-Kits	BD OptEIA™ Rat IL-10 ELISA Set, BD Biosciences, Missisauga, Canada BD OptEIA™ Rat IL-6 ELISA Set, BD Biosciences, Missisauga, Canada BD OptEIA™ Rat TNF-α ELISA Set, BD Biosciences, Missisauga, Canada

6.3 Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils

Assay Diluent	FBS 10%ig in PBS, pH 7,0	
Coating Puffer	4,2g 1,8g	Natriumhydrogencarbonat Natriumcarbonat
***Colon*- Isolationspuffer (pH 7,15)**	200mM 50mM 5mM 5mM 0,1%ig 1mM Vor Gebrauch wurden zusätzlich 20mg BSA/ml hinzugefügt.	Mannitol Sucrose KH_2PO_4 MOPS BSA *fatty acid free* EGTA
***Colon*- Respirationspuffer (pH 7,4)**	130mM 5mM 20mM 2,5mM 0,1%ig 1µL	KCl Kaliumdihydrogenphosphat MOPS EGTA BSA *fatty acid free* Natriumdiphosphat

	Vor Gebrauch wurden zusätzlich 20mg BSA/ml hinzugefügt.
Lowry **Reagenz A** **Reagenz B** **Reagenz C**	 10g Natriumcarbonat 0,5L Natriumhydroxid 2g Kupfersulfat-Pentahyrat 1g Kaliumtartrat
PBS **(0,15mmol/l, pH 7,2)**	16g/l Natriumchlorid 2,32g/l Dinatriumhydrogenphosphat 0,4g/l Kaliumdihydrogenphosphat 0,4g/l Kaliumchlorid
Stopp Lösung ELISA	Schwefelsäure 1mol/l
Waschpuffer	Tween-20 0,05%ig in PBS

6.4 Material und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils

Borosilikatglas	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eismaschine	AF80, Scotsman, Mailand, Italien
Eppendorf Reference® Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcons Cellstar Tubes 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Folie für Wellplatten	Klebefolie, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Gewebehomogenisator Potter-Elvehjem	Pro Scientific, Swedesboro, New Jersey, U.S.A.
Homogenisatorgefäß	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Homogenisierstation	Dispergierstation T 8.10 mit Metallpotter, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vakuum-Inkubator Vacutherm VT 6060 M	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Injekt Spritze „microsynringes“ MS-R25	Ito Corporation Exmire, Fuji, Japan
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	BioTek Synergy 2 mit Software Gen5™ Version 1.11, Winooski, USA
PCR-Wellplatten	96 Well Multiply® PCR Plate, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Laborausrüstung Klees, Düsseldorf, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Respirometriesystem	Mitocell S200, Strathkelvin Instruments, Glascow, Schottland
Vortexgerät	Vortex Genie Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	5810R und 517R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

6.5 Septic rat severity scoring system

Untersuchungsbogen

Experiment: _____ OP Datum: _____

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

Klinische Untersuchung:

	Ergebnis	Beurteilung	Uhrzeit
Körpergewicht	1. präop. Gewicht (pG) _____ g 2. Momentanwert (mW) _____ g 3. Δ= % des mW vom pG ___Δ% 5%= _____g 15%=_____g	Δ% < 5 ⇒ 0 P Δ% < 15 ⇒ 1 P Δ% < 20 ⇒ 2 P Δ% > 20 ⇒ 3 P	
Erscheinung	1. normale Erscheinung, Fell anliegend, sauber geputzt 2. geringes Pflegedefizit, Fell gesträubt 3. zunehmendes Pflegedef., Ränder an Auge/Anus 4. deutliches Pflegedef., Augen verklebt, Einstreu haftet am Anus	⇒ 0 P ⇒ 1 P ⇒ 2 P ⇒ 3 P	
Verhalten spontan	1. Ratte (R) erkundet Käfig, aktiv 2. R sitzt auf einer Stelle, Ganzkörperbewegung vorhanden 3. buckelige Haltung, schwankender Gang 4. immobil, Seitenlage	⇒ 0 P ⇒ 1 P ⇒ 2 P ⇒ 3 P	
Verhalten provoziert	1. R flieht bei Käfigöffnung, starker Muskeltonus 2. R flieht erst bei Annäherung der Hand 3. R flieht erst bei Berührung 4. Fluchtreflex erloschen	⇒ 0 P ⇒ 1 P ⇒ 2 P ⇒ 3 P	
Atemfrequenz	1. präop. Wert (pW) ____1/s 2. Momentanwert (mW) ___1/s 3. Δ= % des mW vom pW ___Δ%	Δ% < 10 ⇒ 0 P Δ% < 20 ⇒ 1 P Δ% < 50 ⇒ 2 P Δ% > 50 ⇒ 3 P	
Exp. Atemgeräusch	Nein Ja	⇒ 0 P ⇒ 1 P	
Abd.-palpation	1. kein Druckschmerz bei AP, weiches Abdomen 2. geringe Reaktion auf AP, weiches Abdomen 3. deutliche Schmerzzeichen auf AP, abd. Resistenz 4. deutl. Schmerzzeichen auf AP, hartes Abdomen	⇒ 0 P ⇒ 1 P ⇒ 2 P ⇒ 3 P	
Kotbeschaffenheit	1. viel normaler Kot im Käfig, koten während der Untersuchung 2. viel Kot im Käfig, Kot blutig, dünnflüssig oder schleimig 3. kein Kot im Käfig	⇒ 0 P ⇒ 1 P ⇒ 2 P	

Auswertung:

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

Obduktionsbefund:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Hilfe die Fertigstellung dieser Dissertation nicht zustande gekommen wäre:

Ein großer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Olaf Picker, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Dr. med. Anna Herminghaus danke ich besonders für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevolle Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Inge Bauer und Frau Claudia Dohle für ihr offenes Ohr bedanken bei allen Fragen rund um das Labor.

Vielen Dank an das gesamte Kollegium des Instituts für experimentelle Anästhesiologie für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich jederzeit unterstützen und Rückhalt geben.

Zu guter Letzt danke ich meinem Mann, der mir während der gesamten Zeit viel Verständnis und Geduld entgegen gebracht hat. Außerdem war eine große Hilfe bei der Gestaltung des Layout und der Formatierung.