

**Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. med. B. Pannen

**Die Beeinflussung der Immunmodulation in  
der moderaten Sepsis durch Pravastatin  
sowie einer moderaten Hyperkapnie**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Johanna Knop  
2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Günter Niegisch

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Statine verbessern die beeinträchtigte intestinale Mikrozirkulation in der Sepsis. Jedoch scheint dieser protektive Effekt durch eine zusätzliche Hyperkapnie aufgehoben zu werden. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass Patienten insbesondere mit *ARDS* nicht von einer zusätzlichen Statintherapie profitieren. Es bleibt jedoch unklar, welchen Einfluss Statine bzw. eine zusätzliche Hyperkapnie auf die systemische wie lokale Immunantwort in einer Sepsis haben, obwohl dies ein wichtiger Erklärungsansatz sein könnte. Ziel dieser Doktorarbeit war es daher zu untersuchen, ob eine Pravastatintherapie die systemische wie lokale Immunantwort verändert und welchen Einfluss eine zusätzliche Hyperkapnie hat.

**Material & Methoden:** 40 männliche Wistar-Ratten wurden in 4 Gruppen randomisiert ( $n = 10$ ). Eine Hälfte der Tiere wurde mit 0,2 mg/kg Pravastatin s.c. oder einem Vehikel s.c. (NaCl 0,9%) vorbehandelt. Nach 18 h wurde durch eine *CASP*-Operation eine moderate Sepsis induziert. 24 h danach wurde für 120 min. eine normokapnische ( $pCO_2 40 \pm 6$  mmHg) oder moderat hyperkapnische ( $pCO_2 72 \pm 10$  mmHg) Beatmung durchgeführt. Nach Ende der Intervention wurden mittels *ELISA* die Zytokinplasmaspiegel (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) bestimmt. Aus dem entnommenen Darm wurde mittels *ELISA* die MPO-Aktivität bestimmt sowie durch Westernblotanalysen die Adhäsionsmolekülexpression von *ICAM-1* und *E-Selectin* gemessen.

**Ergebnisse:** Weder Pravastatin noch eine moderate Hyperkapnie oder deren Kombinationstherapie führte zu einer signifikanten Beeinflussung der Zytokinplasmaspiegel. Weiterhin zeigte sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der Behandlungsgruppen bezüglich der *ICAM-1* und *E-Selectin* Expression sowie der MPO-Aktivität des Darms.

**Schlussfolgerung:** Diese Doktorarbeit zeigt, dass im septischen Tiermodell weder eine Pravastatintherapie noch eine moderate Hyperkapnie die systemische oder lokale Immunantwort moduliert. Demnach könnte der protektive Effekt einer Pravastatintherapie in der Sepsis unabhängig von der Immunantwort vermittelt werden.

## Summary

**Introduction:** In sepsis statins can improve the impaired intestinal microcirculation. However, this protective effect seems to be diminished in the presence of hypercapnia. This could provide a possible explanation for the fact that patients with *ARDS* in particular do not benefit from additional statin therapy. However, it remains unclear what influence statins or additional hypercapnia have on the systemic and local immune response in sepsis. Therefore, the aim of this doctoral thesis was to investigate whether pravastatin therapy alters the systemic and local immune response and how this is influenced by additional hypercapnia.

**Material & Methods:** 40 male Wistar rats were randomised into 4 groups (n = 10). One half of the animals was treated with 0.2 mg/kg pravastatin s.c. and the other half received a vehicle s.c. (NaCl 0.9%). After 18 h a moderate sepsis was induced by *CASP* surgery. 24 h after the surgery, a normocapnic (pCO<sub>2</sub> 40 ± 6 mmHg) or moderately hypercapnic (pCO<sub>2</sub> 72 ± 10 mmHg) ventilation was performed for 120 min. After the end of the intervention the cytokine plasma levels (IL-6, IL-10, TNF-α) were determined by *ELISA*. MPO activity was determined by *ELISA* and adhesion molecule expression of *ICAM-1* and *E-selectin* was measured by *western blot* analysis.

**Results:** Neither pravastatin nor, moderate hypercapnia nor the combination of the respective interventions resulted in a significant change in cytokine plasma levels. Furthermore, there was no significant difference in *ICAM-1* and *E-selectin* expression and intestinal MPO activity within the treatment groups.

**Conclusion:** This doctoral thesis shows that neither pravastatin therapy nor moderate hypercapnia or a combination modulates the systemic or local immune response in a septic animal model. Thus, the protective effect of pravastatin therapy in sepsis could be mediated independent of the immune response.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ANOVA</b>	One way analysis of variance
<b>Aqua dest.</b>	Destilliertes Wasser
<b>ARDS</b>	Acute respiratory distress syndrome
<b>AZ.</b>	Aktenzeichen
<b>BGA</b>	Blutgasanalyse
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CASP</b>	Colon ascendens stent peritonitis
<b>CLP</b>	Cecal ligation and puncture
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>ECL-Reagenz</b>	Enhanced chemoluminescence reagent
<b>EDTA</b>	Ethylendinitrilotetraessigsäure
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
<b>E-Selectin</b>	Endothel-Selektin
<b>et al.</b>	Et aliae oder et alia
<b>etCO<sub>2</sub></b>	Endexpiratorische Kohlenstoffdioxidkonzentration
<b>G</b>	Gauge
<b>g</b>	Gramm
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
<b>h</b>	Stunde

<b>HF</b>	Herzfrequenz
<b>HK NaCl</b>	Hyperkapnie-Vehikel-Gruppe
<b>HK Prava</b>	Hyperkapnie-Pravastatin-Gruppe
<b>ICAM-1</b>	Intercellular adhesion molecule 1
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL</b>	Interleukin
<b>Kg</b>	Kilogramm
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>l</b>	Liter
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MAP</b>	Mittlerer arterieller Druck
<b>mmHg</b>	Millimeter-Quecksilbersäule
<b>mmol</b>	Millimol
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n</b>	Stichprobenanzahl
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NK NaCl</b>	Normokapnie-Vehikel-Gruppe
<b>NK Prava</b>	Normokapnie-Pravastatin-Gruppe
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>pCO<sub>2</sub></b>	Partialdruck des Kohlenstoffdioxids

<b>pO<sub>2</sub></b>	Partialdruck des Sauerstoffs
<b>pg</b>	Pikogramm
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>rpm</b>	Runs per minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s.c.</b>	Subkutan
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SDS-PAGE</b>	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>SEM</b>	Standardfehler
<b>SRSS</b>	Septic rat severity scoring
<b>TBS-T</b>	Tris buffered saline with tween
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>U</b>	Units
<b>V</b>	Volt
<b>vs.</b>	Versus

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsablauf.....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der elektrophoretischen Proteintransferkammer.....	9
Abbildung 3: Zytokinplasmaspiegel.....	15
Abbildung 4: Relative Expression von <i>ICAM-1</i> im <i>Colon</i> .....	16
Abbildung 5: Relative Expression von <i>E-Selectin</i> im <i>Caecum</i> .....	16
Abbildung 6: MPO-Aktivität im <i>Colon</i> .....	17
Abbildung 7: <i>ELISA</i> -Kit MPO <i>TNB</i> -Standardkurve .....	42

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen.....	18
Tabelle 2: Geräte und Hilfsmittel des laborexperimentellen Versuchsteils.....	34
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils .....	36
Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen für den <i>ELISA</i> .....	37
Tabelle 5: Lösungen für die Ganzzellextraktion .....	37
Tabelle 6: Lösungen für die Lowry-Proteinbestimmung .....	38
Tabelle 7: Pipettierschema der Standardreihe für die Lowry-Proteinbestimmung .....	38
Tabelle 8: Lösungen für die Polyacrylamid-Gele des <i>Western Blot</i> .....	39
Tabelle 9: Chemikalien für das Trenngel.....	39
Tabelle 10: Chemikalien für das Sammelgel.....	39
Tabelle 11: Lösungen für Elektrophorese und Transfer des <i>Western Blot</i> .....	41
Tabelle 12: Antikörper und Marker .....	41
Tabelle 13: <i>ELISA</i> -Kits .....	42

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Fragestellungen der Arbeit</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>4</b>
3.1	Tierexperimenteller Teil.....	4
3.1.1	Versuchstiere.....	4
3.1.2	<i>CASP</i> -Operation und Intervention .....	4
3.2	Laborexperimenteller Teil.....	6
3.2.1	<i>ELISA</i> zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel .....	6
3.2.2	<i>Western Blot</i> .....	7
3.2.3	<i>ELISA</i> zur Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität .....	11
3.3	Statistische Auswertung .....	12
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>13</b>
4.1	<i>ELISA</i> zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel.....	13
4.2	Relative Expression der Adhäsionsmoleküle im Darm.....	15
4.3	Myeloperoxidase-Assay im <i>Colon</i> .....	17
4.4	Systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen .....	17
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>19</b>
5.1	Ergebnisdiskussion .....	19
5.2	Klinische Relevanz.....	24
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerung</b> .....	<b>26</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>27</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>33</b>
8.1	Geräte und Hilfsmittel des laborexperimentellen Versuchsteils.	33
8.2	Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils.....	35

8.3	Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils..	36
8.4	Antikörper, Marker und <i>ELISA</i> -Kits des laborexperimentellen Versuchsteils.....	41
8.5	<i>Septic rat severity scoring system</i> .....	43

# 1 Einleitung

Bei der Sepsis kommt es, bedingt durch eine Infektion, zu einer dysregulierten Immunreaktion mit lebensbedrohlichen Organschädigungen<sup>1</sup>. Ursächlich ist eine überschießende, unkontrollierte sowie sich selbst erhaltende Entzündungsreaktion auf dem Boden einer mikrobiellen Pathogenese. Die Steuerung der Immunantwort fehlt, sodass es zum Versagen der körpereigenen Regulationskapazität (*host defense failure*) kommt.

Den zeitlichen Verlauf der systemischen Immunabwehr koordinieren pro- sowie antiinflammatorische Zytokine<sup>2</sup>. Die zu Beginn freigesetzten proinflammatorischen Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$  und IL-6 sind essenziell für die Entwicklung einer Entzündungsantwort<sup>3,4</sup>. Auch auf zellulärer Ebene werden Mediatoren wie die endothelialen Adhäsionsmoleküle *ICAM-1* und *E-Selectin* hochreguliert<sup>5</sup>. Hierdurch wird die Migration von neutrophilen Granulozyten aus der Zirkulation in entzündetes Gewebe eingeleitet, wobei diese mithilfe der Myeloperoxidase reaktive Sauerstoffspezies zur primären Bakterienelimination bilden<sup>6</sup>. Um einer überschießenden Immunreaktion entgegenzuwirken, kommt es durch die Aktivierung antiinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-10, sowie der Freisetzung von Glukokortikoiden und Adrenalin zu einer Immunsuppression<sup>7,8</sup>.

Eine prolongierte proinflammatorische Antwort wird bedingt durch erhöhte IL-6-Plasmaspiegel, einer anhaltenden Akute-Phase-Reaktion und Neutrophilie. Hierdurch kann es jedoch zu Kollateralschäden im Sinne von Zellschädigungen und Mikrozirkulationsstörungen mit Endorganschäden kommen<sup>9,10</sup>. Das resultierende Multiorganversagen ist eine gefürchtete Folge des Krankheitsprozesses und ist mit einer Letalität von bis zu 58% verbunden<sup>11-13</sup>. Insbesondere der Zusammenbruch der Darmbarriere mit einer Translokation von Toxinen und Bakterien in den Lymph- und Blutkreislauf stellt eine bedeutende Komplikation bei kritisch kranken Patienten dar<sup>14,15</sup>. Um die Hyperinflammation zu verringern, verfolgen klinische Studien zunehmend immunmodulatorische Behandlungsstrategien zur Reduktion proinflammatorischer Zytokine. So können z.B. neuere Hämoadsorptionsfilter im Rahmen extrakorporaler Blutreinigungsverfahren IL-6 im Vollblut mindern oder Anti-TNF- $\alpha$ -Therapien mithilfe von Antikörperverfahren die TNF- $\alpha$ -Serumspiegel reduzieren<sup>16,17</sup>.

Als bereits etabliertes Verfahren in der Behandlung kritisch kranker Patienten wird im klinischen Alltag eine permissive Hyperkapnie zugunsten einer lungenprotektiven Beatmung akzeptiert. Bei Patienten in der Sepsis und insbesondere mit *ARDS* reduziert sich unter permissiver Hyperkapnie die Letalität, wobei der zugrundeliegende Mechanismus unklar ist<sup>18-21</sup>. Bekannt ist, dass eine moderate Hyperkapnie u.a. die gastrointestinale Mikrozirkulation durch den Erhalt der Darmpermeabilität unter septischen Bedingungen verbessert<sup>22-24</sup>. Welche genaue Rolle des Weiteren die Auswirkungen einer moderaten Hyperkapnie auf das Immunsystem spielen, ist bisher nicht ausreichend untersucht. Eine moderate Hyperkapnie kann proinflammatorische Zytokine sowohl reduzieren als auch erhöhen<sup>25,26</sup>. Auch in Bezug auf die lokale Entzündungsreaktion kann eine moderate Hyperkapnie die Adhäsionsmolekülexpression sowie die Granulozytenmigration reduzieren und u.a. den septischen Gewebeschaden der Lunge verringern<sup>27,28</sup>. Wohingegen eine moderate Hyperkapnie die MPO-Aktivität der neutrophilen Granulozyten im Darm nicht zu verändern scheint<sup>23</sup>.

Des Weiteren gewinnen Statine aufgrund ihrer pleiotropen Wirkmechanismen als therapeutischer Ansatz in der Sepsistherapie eine zunehmende Bedeutung<sup>29,30</sup>. Unabhängig von der Cholesterinsenkung werden antiinflammatorische Wirkungen (wie z.B. antioxidative Eigenschaften, Verbesserung der endothelialen Dysfunktion, erhöhte Bioverfügbarkeit von Stickoxid und Hemmung proinflammatorischer Mediatoren) nachgewiesen<sup>31-33</sup>. Jedoch ist es unklar, inwieweit und über welchen immunologischen Mechanismus eine Statintherapie die Entzündungsantwort in der Sepsis beeinflusst, obwohl dies ein weiterer wichtiger Erklärungsansatz sein könnte. Es gibt Hinweise, dass Statine proinflammatorische Mediatoren sowie die Adhäsionsfähigkeit neutrophiler Granulozyten reduzieren können<sup>33,34</sup>. Dennoch wird der Nutzen einer Statintherapie insbesondere unter moderater Hyperkapnie diskutiert. So hebt sich in einer aktuellen Studie der protektive Effekt einer verbesserten Mikrozirkulation des Darms in der Sepsis durch Pravastatin unter einer zusätzlichen moderaten Hyperkapnie auf<sup>35</sup>. Ähnliche Auswirkungen zeigen Patienten mit *ARDS* welche unter bestehender moderater Hyperkapnie nicht von einer zusätzlichen Statintherapie profitieren<sup>36</sup>.

Zusammenfassend ist bisher nicht beantwortet, welchen Effekt eine Statintherapie mit zusätzlicher moderater Hyperkapnie in der Sepsis auf die systemische Immunantwort als auch auf die lokale Entzündungsreaktion ausübt.

## 2 Fragestellungen der Arbeit

Aufgrund der genannten Zusammenhänge leiten sich folgende Fragestellungen ab:

- 1) Wie wirkt sich eine Statintherapie auf die systemische Zytokinantwort *in vivo* aus? Welchen Einfluss hat eine zusätzliche Hyperkapnie?
  
- 2) Inwieweit hat eine Statintherapie einen Einfluss auf die lokale Entzündungsreaktion gemessen mithilfe der Expression von Adhäsionsmolekülen im Darm und ergeben sich in Kombination mit einer Hyperkapnie modulierende Effekte?
  
- 3) In welchem Ausmaß hat eine Statintherapie einen Einfluss auf die lokale Entzündungsreaktion im Darm gemessen anhand der MPO-Aktivität und ergibt sich eine Beeinflussung durch eine Hyperkapnie?

## 3 Methoden

### 3.1 Tierexperimenteller Teil

#### 3.1.1 Versuchstiere

Nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz in Recklinghausen (Az. 87-51.04.2010.A361) wurden 40 Wistar-Ratten (320 g – 380 g Körpergewicht) in vier Gruppen randomisiert (n = 10). Die Tiere stammten aus der Zuchtanlage der *Central Animal Research Facility* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Studie wurde gemäß der *NIH*-Richtlinien für Tierpflege sowie der *ARRIVE*-Richtlinien durchgeführt<sup>37</sup>. Die Tiere wurden vor Beginn der Operation und Intervention in Käfigen gehalten. Sie erhielten Standard-Rattennahrung und Wasser *ad libitum*. Die eine Hälfte der Tiere erhielt je nach Gruppenzugehörigkeit 18 Stunden vor der *CASP*-Operation 0,2 mg/kg Pravastatin s.c., die andere Hälfte erhielt das gleiche Volumen 1 ml/kg als Vehikel s.c. (NaCl 0,9%).

#### 3.1.2 *CASP*-Operation und Intervention

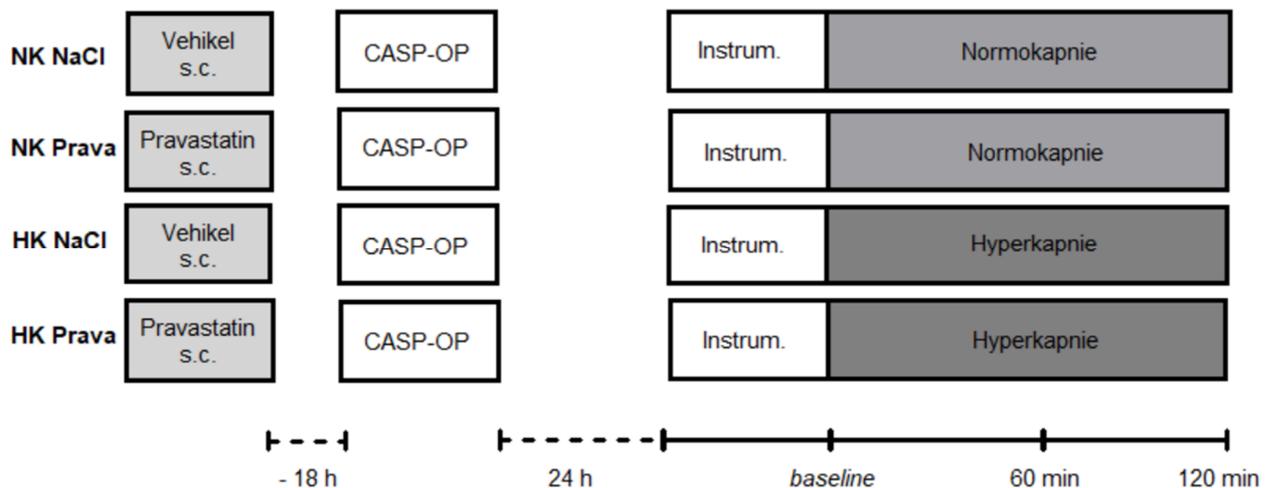
Die Sepsisinduktion erfolgte durch eine *CASP*-Operation nach der Beschreibung von Schulz *et al.* in enger Anlehnung an ein etabliertes tierexperimentelles Sepsismodell nach Lustig *et al.*<sup>35,38</sup>. Die Operation wurde durch eine Tierärztin durchgeführt. Unter inhalativer Allgemeinanästhesie sowie Analgesie wurde über eine mediane Laparotomie der Dickdarm mit einem peripheren 16-*Gauge*-Venenkatheter durchstochen. Hierdurch wurde ein konstanter Stuhlaustritt über den Katheter in die Bauchhöhle zur Sepsisinduktion ermöglicht. Die *CASP*-Operation dauerte circa 15 Minuten. Hinsichtlich ihres Wohlbefindens wurden die Tiere alle 4 Stunden tiermedizinisch untersucht und klinische Zeichen der Sepsis im *septic rat severity scoring system* eingetragen (SRSS) (siehe Abschnitt 8.5).

Die Tiere wurden 24 Stunden nach der *CASP*-Operation erneut anästhesiert sowie relaparotomiert. Nach der Instrumentierungsphase wurden nach 30-minütiger normokapnischer Beatmung die *Baseline*-Messungen durchgeführt und die Intervention gestartet. Es fanden Messungen des arteriellen pCO<sub>2</sub>, pH-Wertes, arteriellen pO<sub>2</sub>, der Herzfrequenz sowie des *MAP* statt. Zudem wurden weitere tierexperimentelle Untersuchungen, wie z.B. die Messung der Gewebeoxygenierung des Darms durchgeführt, welche jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit sind<sup>35</sup>.

Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden die Tiere für die folgenden 120 Minuten entweder normokapnisch (pCO<sub>2</sub> 40 ± 6 mmHg) oder hyperkapnisch

( $p\text{CO}_2$   $72 \pm 10\text{mmHg}$ ) beatmet durch die Zugabe von 10%  $\text{CO}_2$  zur Inspirationsluft. Demzufolge wurden 4 verschiedene Gruppen analysiert: mit Vehikel behandelte normokapnische Tiere (NK NaCl), mit Vehikel behandelte hyperkapnische Tiere (HK NaCl), Pravastatin vorbehandelte normokapnische Tiere (NK Prava) sowie mit Pravastatin vorbehandelte hyperkapnische Tiere (HK Prava) (siehe Abb. 1).

Am Ende der Intervention wurden die Tiere in tiefer Narkose durch Exsanguination euthanasiert. Für den laborexperimentellen Teil wurde zweimal 1 ml EDTA-Blut entnommen. Die erste Blutentnahme wurde vor Beginn der Intervention in der *Baseline*-Phase entnommen, die zweite Blutentnahme erfolgte entsprechend am Ende der Intervention im Rahmen der Exsanguination. Die Blutproben wurden zentrifugiert ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $4000 \times g$ , 10 min), das überständige Plasma abpipettiert und bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Für die Untersuchungen der Zytokinplasmaspiegel betrug pro Gruppe die Stichprobenanzahl  $n = 10$ . Anschließend wurden Gewebestücke aus *Caecum* sowie *Colon* entnommen, in Flüssigstickstoff schockgefroren und abschließend bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Aufgrund interindividueller Unterschiede der Versuchstiere konnte nicht in jedem Fall genügend Material für die Westernblotanalysen und den MPO-ELISA gewonnen werden, sodass die Stichprobenanzahl hier  $n = 7$  betrug.



**Abb. 1: Versuchsablauf**

Die Vehikel- oder Pravastatin-Vorbehandlung wurde 42 h, die CASP-Operation 24 h vor der Intervention durchgeführt. Während der Intervention wurden die Tiere entweder mit einem  $p\text{CO}_2$ -Wert von  $40 \pm 6\text{ mmHg}$  (Normokapnie) oder  $72 \pm 10\text{ mmHg}$  (Hyperkapnie) beatmet. Die CASP-OP entspricht einer *Colon Ascendens-Stent-Peritonitis*. Modifiziert nach Schulz *et al.* <sup>35</sup>

## 3.2 Laborexperimenteller Teil

Die Auflistung der verwendeten Geräte, Hilfsmittel, Lösungen, Puffer, Chemikalien, Reagenzien, Marker, Antikörper sowie *Kits* befindet sich im Anhang (siehe Abschnitt 8.1 - 8.4).

### 3.2.1 *ELISA* zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel

Die Menge der Zytokinplasmaspiegel wurde colormetrisch mit Hilfe eines *ELISA*-Kits nach Anleitung des Herstellers quantifiziert:

Hierzu erfolgte die Inkubation des Blutplasmas einer mit 100µl/*well capture-antibody* in *coating* Puffer (Verdünnung 1:250) beschichteten 96-*well* Mikropipettierplatte bei 4 °C über Nacht. Alle folgend im *Assay* aufgeführten Waschschriffe wurden jeweils mit 300 µl/*well* Waschpuffer durchgeführt. Ebenfalls erfolgten alle Inkubationsschritte unter Ausschluss einer möglichen Verdunstung durch Abdichtung der Mikropipettierplatten mit Klebefolie.

Nach der Inkubationszeit über Nacht wurde die Mikropipettierplatte fünfmalig gewaschen, der Überschuss entfernt und 200 µl/*well* des *Assay-Diluent* hinzugefügt, um die restlichen unspezifischen Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Nach erneuter Inkubationszeit von einer Stunde unter Raumtemperatur wurde die Platte wiederholt fünfmalig gewaschen. Parallel erfolgte die Anfertigung der Standardreihe nach Herstellerangabe. Anschließend wurden jeweils 100µl/*well* des Standards, der Plasmaprobe sowie der Positivkontrolle in doppelter Ausführung pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem fünfmaligen Waschen wurden für die Untersuchung der Zytokine TNF-α und IL-6 100µl/*well* des Detektionsantikörpers verdünnt in *Assay-Diluent* (Verhältnis 1:250) hinzugefügt und für eine Stunde unter Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschschriffe der Platte wurden 100 µl/*well* des *Enzym-Reagenz* verdünnt in *Assay-Diluent* (Verhältnis 1:250) hinzu pipettiert und für weitere 30 Minuten unter Raumtemperatur inkubiert. Für die Untersuchung von IL-10 erfolgten alle Schritte des Assays analog der Zytokine TNF-α sowie IL-6, jedoch wurde nach zweistündiger Inkubationszeit der Plasmaprobe ein *Working Detector* von 100 µl/*well* hinzugefügt und für eine Stunde unter Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend konnte ein siebenmaliger Waschschriffe bei allen Zytokinuntersuchungen durchgeführt werden. Hierbei wurde bei jedem Waschschriffe der Waschpuffer für 30 bis 60 Sekunden in den *wells* belassen. Hiernach wurden

100  $\mu\text{l/well}$  Substratlösung hinzugefügt und die Platte unter Lichtausschluss, dieses Mal ohne Klebefolie, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im letzten Schritt wurden 50  $\mu\text{l/well}$  der Stopplösung hinzugefügt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm im *Microplate Reader* photometrisch gemessen.

### **3.2.2 Western Blot**

Die *Western Blot* - Analyse (auch *Immunoblot* genannt) ermöglicht eine Identifizierung und/oder Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Über Antikörper, die spezifisch an antigene Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins binden, erfolgt die anschließende Detektion. Die Nachweisgrenze für die meisten Proteine liegt für gewöhnlich im Piko- bis Nanogrammbereich<sup>39</sup>.

### **Ganzzellextraktion/Herstellung von Homogenaten**

Von den tiefgefrorenen Gewebeproben wurden circa 50 mg abgetrennt, in Flüssigstickstoff eingefroren und mit dem Metall-Potter pulverisiert. Das „Gewebepulver“ wurde mit 550  $\mu\text{l}$  gekühltem Lysepuffer für die darauffolgende Homogenisation aliquotiert. Das Homogenat wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 4 °C und 16.000 rpm zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde abpipettiert und in ein neues Küvetten-Reaktionsgefäß zur direkten Weiterverarbeitung überführt oder zur Lagerung unter Bedingungen bei - 20°C eingefroren.

### **Modifizierte Proteinbestimmung nach Lowry**

Für die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Homogenate wurde die biochemische Methode nach Lowry verwendet<sup>40,41</sup>.

Für die Standardreihe mit den entsprechenden Eichgraden wurde eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin angefertigt und auf Eis gestellt (siehe Tabelle 7). Für die Probenreihe wurden die Homogenate in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt. Die Standardreihe als auch die Proben wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in doppelter Ausführung angefertigt.

Im nächsten Schritt wurde der Ansatz angesetzt. Dazu wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  verdünnte Probe oder Standardlösung in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Im Folgenden wurden die Proben und Standardlösungen mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  der Lowry-Lösung 1 (siehe Tabelle 6) versetzt und für 10 Minuten unter Raumtemperatur

inkubiert. Als Nächstes wurden 50 µl der Lowry-Lösung 2 (siehe Tabelle 6) hinzugefügt und unter Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden jeweils in doppelter Ausführung 200µl der Probenansätze und die der Standards in die Kavitäten einer 96-Loch-Mikropipettierplatte pipettiert. Die abschließende photometrische Messung wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm durchgeführt. Die Kalibriergerade wurden akzeptiert, sofern der Korrelationskoeffizient größer als 0,995 war. Anschließend wurde eine Angleichung der Proteinmengen durchgeführt, sodass für den folgenden *Western Blot* jede Probenflasche dieselbe µg-Anzahl an Protein beinhaltet. Pro Probenflasche wurde eine Anzahl von 30 µg bestimmt. Die jeweilige Verdünnung wurde mit Lysepuffer durchgeführt. Die erhobenen Messwerte wurden unter Zuhilfenahme des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft Excel 2013 erfasst und ausgewertet.

### **Proteinauftrennung**

Die aufgeführte Methode der diskontinuierlichen *SDS-PAGE* nach Laemmli <sup>42</sup> dient der Auftrennung der einzelnen Proteine durch ihre elektrophoretische Mobilität innerhalb eines elektrischen Feldes.

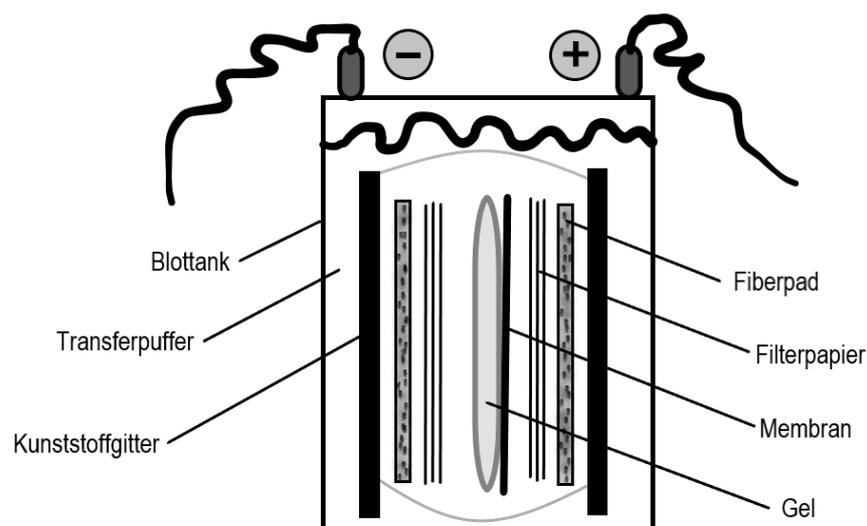
Vorab wurden jeweils 50 µg des Probenlysates mit 50 µg des *Loading Buffers* (siehe Tabelle 11) aliquotiert und bei 95 °C erhitzt, um Schwefelbrücken zu spalten und größere Proteine zu denaturieren. Zur Durchlaufkontrolle der nicht sichtbaren Proteine wurde der *Loading Buffer* mit einem Lauffrontmarker (Bromphenolblau) versehen. Für die Proteinauftrennung wurden jeweils Gele aus hochvernetztem Polyacrylamid (PAA) hergestellt. Der Acrylamid-Prozentsatz wurde anhand der erwarteten Größe der Zielproteine gewählt (siehe Tabelle 9). Im Rahmen der diskontinuierlichen Variante der *SDS-PAGE* wurden die Proteine zuerst in ein Sammelgel mit 10 bis 15 Probenflaschen hinzugegeben und in einer scharfen Bande fokussiert, bevor der Übertritt in das eigentliche Trenngel stattfand. Hierzu wurden die Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt und ein *Running Buffer* (1 %) zwischen die Glasplatten eingefügt. Anschließend wurde in die äußeren Probenflaschen des Sammelgels als Platzhalter lediglich *Loading Buffer* (10 µl) pipettiert. Eine Probenflasche wurde mit einem Größenmarker (7 µl) versehen. Die übrigen Probenflaschen wurden mit den Probenlysaten mit einer Menge von jeweils 5 bis 10 µl je Bahn beladen. Die zu pipettierende Menge an Mikrolitern wurde vorab in der Proteinbestimmung berechnet. Hiernach wurde die restliche Elektrophoresekammer mit *Running Buffer* gefüllt und mit 100 V für circa 95 bis 100 Minuten ein elektrisches

Feld angelegt. Die Eigenladung der Proteine wurde durch die negative Ladung des SDS und der Bildung eines SDS-Protein-Komplexes überdeckt. Hierdurch wurden die Proteine in Abhängigkeit ihrer Größe bzw. der Molekülmasse innerhalb der engmaschigen Matrix des Trenngels aufgetrennt. Das Sammelgel wurde abschließend abgetrennt und verworfen.

### Proteintransfer

Der Proteintransfer auf eine geeignete Oberfläche dient der Sichtbarmachung der Proteinbanden. Hierzu erfolgte ein elektrophoretischer Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran. Die Nitrocellulosemembran wurde vorab für fünf Minuten mit Methanol benetzt. Vor der Zusammenführung der Membran wurden das Gel, die Filterpapiere und *Fiberpads* in Transferpuffer getränkt.

Das Gel und die Membran wurden anschließend übereinandergeschichtet und zwischen jeweils drei Filterpapieren pro Seite unter Druck zweier *Fiberpads* eingespannt und in eine gekühlte, mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer überführt. In der Transferkammer wurden unter geringer Stromstärke von circa 230 mA für 60 Minuten die Proteine auf die Membran übertragen. Nach dem Proteintransfer erfolgte die Gelkontrolle zur Sicherstellung einer erfolgreichen Elektrophorese. Hierzu wurden die Gele mit Coomassie-Brilliantblau-Lösung (siehe Tabelle 3) bedeckt und circa 30 Minuten auf einer Schüttelmaschine inkubiert. Anschließend wurden die Gele mit Wasser gewaschen und über Nacht darin eingelegt, bis die Banden sichtbar wurden.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der elektrophoretischen Proteintransferkammer**

Aufgezeigt ist ein klassischer *Wet-Blot*-Aufbau in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer. Die korrekte Lage der Membran zur Anode und die des Gels zur Kathode ist markiert.

## Proteindetektion

Im ersten Schritt wurden vor der Proteindetektion unspezifische Proteinbindestellen abgesättigt (*blocking*). Dies ist notwendig, damit die Nachweisantikörper dort keine Bindung eingehen und die Sensitivität des *Western Blot* erhöht wird. Das Abblocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen erfolgte durch die Inkubation der Membran in einer Proteinlösung mit Trockenmilchpulver (siehe Tabelle 3) für zwei Stunden unter Raumtemperatur auf einer Schüttelmaschine.

Im zweiten Schritt wurde die Membran in einem Gemisch aus spezifischen Primärantikörpern des Zielproteins (*ICAM-1*, *E-Selectin*) und Trockenmilchpulver bedeckt. Die Membran wurde mit dem Gemisch in einer luftblasenfreien Plastiktüte unter vorsichtigem Schütteln über Nacht bei circa 4 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der überschüssige Antikörper entfernt. Hierzu wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit jeweils eisgekühltem *TBS-T* (siehe Tabelle 11) gewaschen.

Im dritten Schritt wurde der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper unter den gleichen Bedingungen, wie zuvor beschrieben, für mindestens zwei Stunden inkubiert und anschließend dreimalig in *TBS-T* gewaschen. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind in der Tabelle 12 aufgeführt. Zur Normalisierung des Expressionslevels wurde als Ladungskontrolle das Referenzprotein Beta-Aktin auf der gleichen Membran verwendet. Nach erfolgreicher Entwicklung des Zielproteins wurde die Membran für mindestens 10 Minuten in eingekühltem *TBS-T* gewaschen. Anschließend wurde das gleiche Prozedere wie beim Nachweis der Zielproteine durchgeführt.

Der letzte Schritt beinhaltet die Visualisierung der Antikörperbindung an die zu detektierenden Zielproteine. Die Membran wurde circa 60 Sekunden in einer ECL-Lösung inkubiert und anschließend in einer Dunkelkammer unter komplettem Lichtausschluss mit Hilfe einer Entwicklermaschine entwickelt. Durch die entstandene Lichtemission wurde die Kamera belichtet. Je nach zu detektierender Proteinauswahl wurde die Belichtungszeit des Filmes unterschiedlich lange ausgewählt. Anschließend wurde die Auswertung der detektierten Banden mit der Software *GelScan 6.0* durchgeführt.

### 3.2.3 **ELISA zur Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität**

Die MPO-Aktivität wurde colormetrisch mit Hilfe eines *ELISA*-Kits nach Anleitung des Herstellers quantifiziert.

In diesem Assay katalysiert MPO die Bildung von Hypochlorsäure, die mit Taurin unter Bildung von Taurinchloramin reagiert. Taurinchloramin reagiert mit dem Chromophor *TNB* (*5-thionitrobenzoic-acid*) unter Bildung des farblosen Produkts *DTNB* (*5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid*). Eine Einheit der MPO-Aktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die das Substrat hydrolysiert und Taurinchloramin erzeugt und 1,0  $\mu\text{Mol}$  *TNB* pro Minute bei 25 C° verbraucht.

Nach Anfertigung des Standards nach Herstellerangaben wurde die Homogenisierung (analog der Ganzzellextraktion Abschnitt 3.2.2) der Gewebeproben (jeweils 50 $\mu\text{g}$  *Colon*-Gewebe) mit 550 $\mu\text{l}$  MPO-Testpuffer durchgeführt. Die Homogenate wurden bei 13.000 g für 10 Minuten bei 4 ° C zentrifugiert. Für jeden Messzeitpunkt (30, 60 und 120 Minuten) wurden 1–50  $\mu\text{L}$  der Proben in zweifacher Ausführung (Probe und Blindprobe) in die 96-*well*-Platte hinzugefügt. Das Endvolumen von 50 $\mu\text{l}$  wurde mit MPO *Assay Buffer* angeglichen. Optional kann eine Positivkontrolle eingefügt werden. Anschließend wurden alle Proben exklusive der Standardreihe mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch (*TNB*-Reagenz/Standard) aliquotiert und lichtgeschützt unter Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Um sicherzustellen, dass die Werte im linearen Bereich der Standardkurve (siehe Abb. 7) liegen, wurde der *Assay* zu drei Zeitpunkten (30, 60 und 120 Minuten) abgelesen. Zum Endzeitpunkt nach 120 Minuten wurde in jede Kavität 2 $\mu\text{l}$  Stopplösung hinzugefügt und für 10 Minuten inkubiert. Hiernach erfolgte die Messung der Extinktion im *Microplate Reader* bei 412 nm.

Für die Berechnung der MPO-Aktivität wurde zuerst der Hintergrundwert ermittelt. Der Hintergrundwert entspricht dem Leerwert der *TNB*-Standardreihe. Der Hintergrundwert wurde korrigiert, indem der ermittelte Leerwert von allen Messwerten subtrahiert wurde. Anschließend wurde die Änderung der Messwerte zwischen jeder Blindprobe und der entsprechenden Probe ( $\Delta A_{412}$ ) berechnet. Es wurden ausschließlich Werte verwendet, die im linearen Bereich der *TNB*-Standardkurve lagen.

Die *TNB*-Standardkurve gibt die Änderung der Extinktion aufgrund des Verbrauches des *TNB*-Reagenz/Standards durch MPO-generiertes Taurin-Chloramin

an. Anschließend wurde die Differenz ( $\Delta A_{412}$ ) jeder Probe mit der Standardkurve verglichen, um die Menge an *TNB* zu bestimmen, die vom Enzymtest verbraucht wird. Die MPO-Aktivität wird angegeben als nmol / min / ml = *Milliunit* / ml.

$$\Delta A_{412} = (A_{412})_{\text{sample blank}} - (A_{412})_{\text{sample}}$$

Die MPO-Aktivität einer Probe kann durch die folgende Gleichung bestimmt werden:

$$\text{MPO Activity} = B \times \text{sample dilution factor} / (\text{reaction time}) \times V$$

B = Menge (nmol) an verbrauchtem *TNB*

*reaction time* = (Minutenzahl, zum Zeitpunkt der Hinzugabe der Stopplösung)

V = Probenvolumen (ml) pro *well*

### 3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messdaten und graphische Visualisierung erfolgte durch die Software GraphPad (GraphPad Prism® Version 6.0, Int., La Jolla, USA). Zur Prüfung der Daten auf Normalverteilung wurde aufgrund der kleinen Strichprobenmenge der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Für die Auswertung und Signifikanzprüfung der nichtparametrischen Messdaten der *ELISA*-Analysen wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-Hoc-Test ausgewählt. Zur Ermittlung von Differenzen der zentralen Tendenz gepaarter Stichproben wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Die deskriptiven Daten wurden angegeben als Median mit der 25./75. Perzentile. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  gewählt. Für die parametrischen Messdaten der *Western Blot*-Analysen wurde die Mehrfachvergleichsmethode der einfaktoriellen ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls-Test Post-Hoc-Test ausgewählt. Die deskriptiven Daten wurden angegeben als Mittelwert mit Standardabweichung. Das Signifikanzniveau wurde ebenfalls mit  $p < 0,05$  gewählt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel

Die Messung der Zytokinplasmaspiegel erfolgte unmittelbar vor der Intervention sowie 120 Minuten nach normo- oder hyperkapnischer Beatmung. Die Behandlung der definierten Behandlungsgruppen mit Vehikel (NaCl 0,9%) oder Pravastatin erfolgte 18 Stunden vor der CASP-Operation.

#### Tumornekrosefaktor-alpha

Die TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel zeigten vor der Intervention („prä“) keine signifikanten Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen. Unter der 120-minütigen Beobachtungsphase („prä“ vs. „post“) fielen die TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel in allen Behandlungsgruppen signifikant ab (Normokapnie Vehikel 41 (26-55) vs. 0 (0-0), Normokapnie Pravastatin 21 (9-53) vs. 0 (0-0), Hyperkapnie Vehikel 48 (15-71) vs. 0 (0-0), Hyperkapnie Pravastatin 8 (0-30) vs. 0 (0-0) pg/ml;  $p < 0,05$ ). Nach 120 Minuten („post“) konnte zwischen den Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Abb.: 3A)

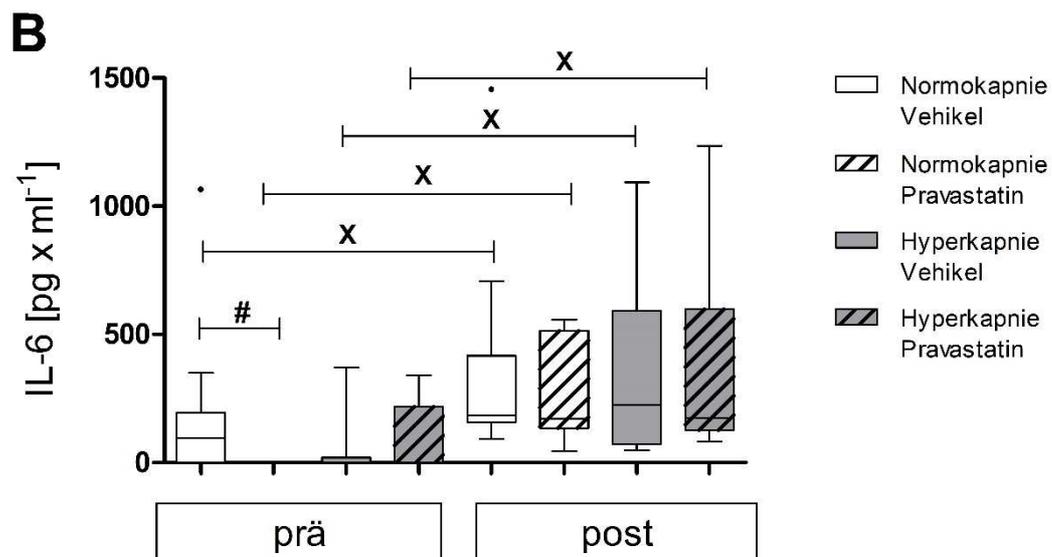
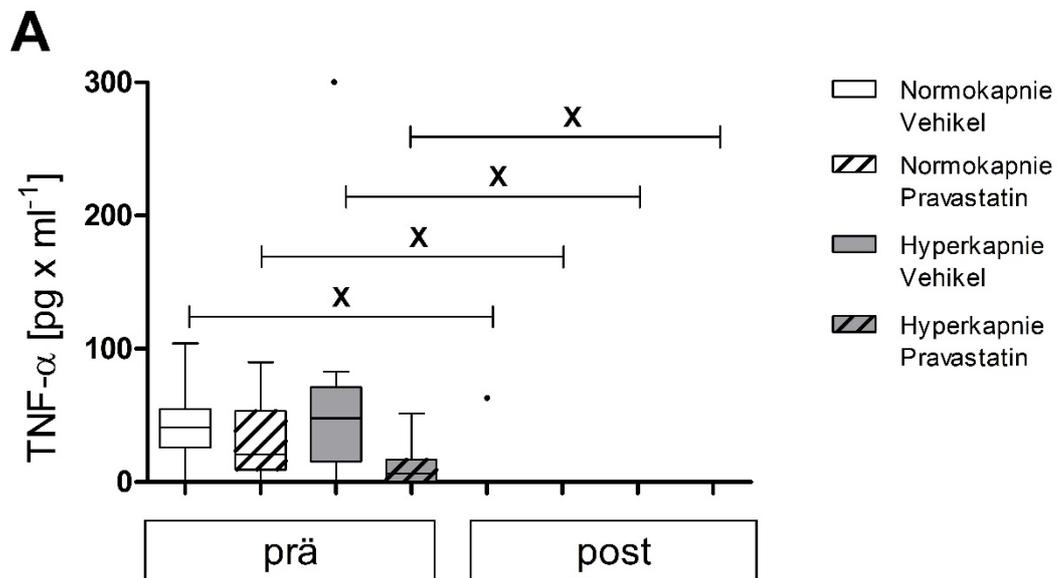
#### Interleukin-6

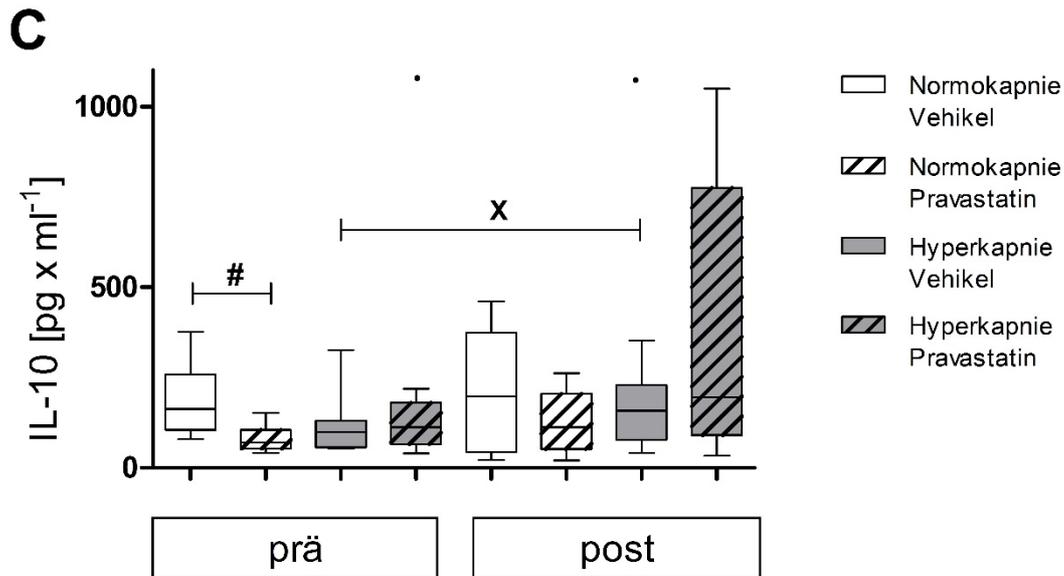
Die IL-6-Plasmaspiegel zeigten vor Intervention („prä“) einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen „Normokapnie Vehikel“ und „Normokapnie Pravastatin“ (98 (0-241) vs. 0 (0-0) pg/ml,  $p = 0,024$ ). Unter der 120-minütigen Beobachtungsphase („prä“ vs. „post“) stiegen die IL-6-Plasmaspiegel in allen Behandlungsgruppen signifikant an (Normokapnie Vehikel 98 (0-241) vs. 226 (159-589), Normokapnie Pravastatin 0 (0-0) vs. 172 (134-515), Hyperkapnie Vehikel 0 (0-20) vs. 225 (72-591), Hyperkapnie Pravastatin 0 (0-219) vs. 175 (127-597) pg/ml;  $p < 0,05$ ). Nach 120 Minuten („post“) konnte zwischen den Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied gezeigt werden (siehe Abb.: 3B).

#### Interleukin-10

Die IL-10-Plasmaspiegel zeigten vor Intervention („prä“) einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen „Normokapnie Vehikel“ und „Normokapnie Pravastatin“ (162 (105-259) vs. 70 (53-105) pg/ml,  $p = 0,015$ ). Unter der 120-minütigen Beobachtungsphase („prä“ vs. „post“) zeigte sich kein Anstieg der IL-10-Plasmaspiegel in den Behandlungsgruppen (Normokapnie Vehikel 162 (105-259) vs. 198 (43-374), Normokapnie Pravastatin 70 (53-105) vs. 113 (52-205), Hyperkapnie Pravastatin

112 (67-214) vs. 195 (91-775) pg/ml) bis auf die Behandlungsgruppe „Hyperkapnie Vehikel“ (99 (56-130) vs. 168 (90-271) pg/ml;  $p < 0,05$ ). Nach 120 Minuten („post“) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (siehe Abb.: 3C).



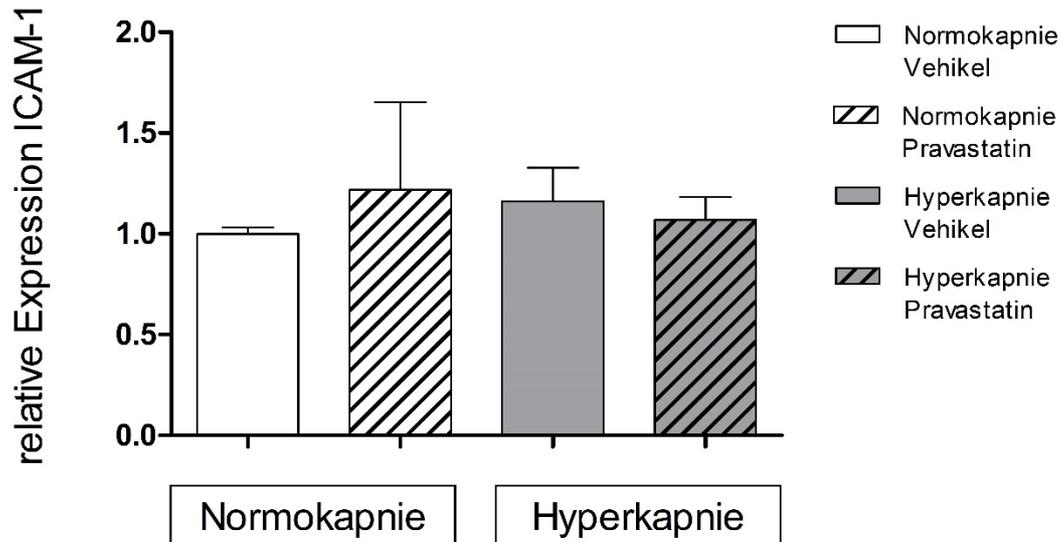


**Abb. 3: Zytokinplasmaspiegel**

(A) TNF-alpha, (B) IL-6, (C) IL-10 Plasmaspiegel vor sowie 120 Minuten nach der Intervention. Tiere mit normo- oder hyperkapnischer Beatmung unter Behandlung mit Vehikel oder Pravastatin. Median mit der 25./75. Perzentile und der 10./90. Perzentile; # =  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis + Dunn's Post-Hoc-Test); X =  $p < 0,05$  prä vs. post (Wilcoxon); n = 10

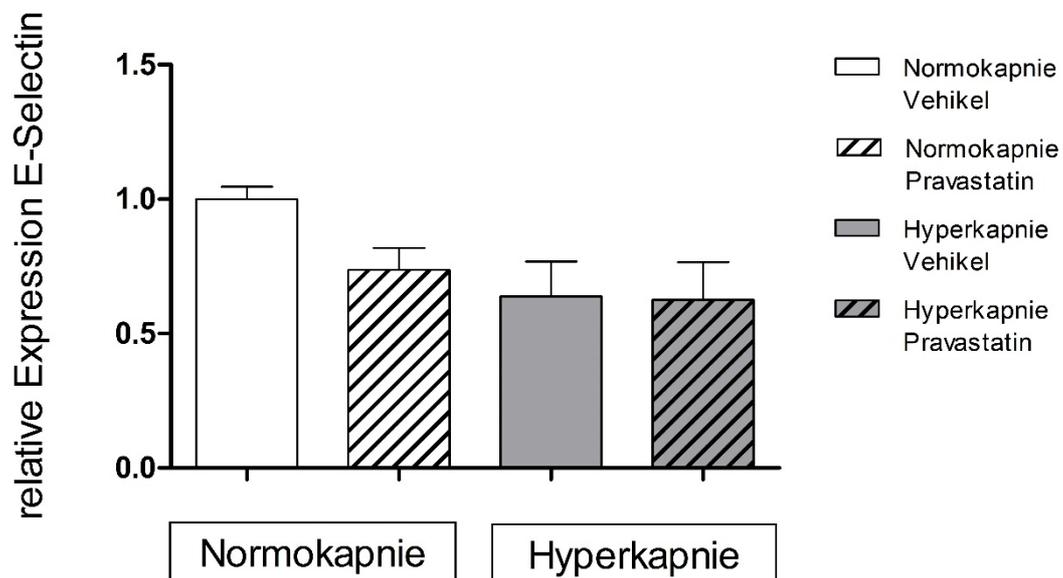
## 4.2 Relative Expression der Adhäsionsmoleküle im Darm

Die Untersuchung der relativen Adhäsionsmolekülexpression von *ICAM-1* im *Colon* und *E-Selectin* im *Caecum* zeigte zwischen allen Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit normokapnisch beatmeten Tieren unter Vehikelbehandlung wirkten sich weder die Hyperkapnie noch eine Vorbehandlung mit Pravastatin auf die relative *ICAM-1*- oder *E-Selectin* Expression aus. Auch eine Kombination aus Pravastatin und Hyperkapnie zeigte keinen signifikanten Effekte (siehe Abb. 4 und 5).



**Abb. 4: Relative Expression von *ICAM-1* im *Colon***

Relative Expression von *ICAM-1* im *Colon* bei normo- oder hyperkapnisch beatmeten Tieren unter Behandlung mit Vehikel oder Pravastatin. MW ± SD; (Einfaktorielle ANOVA + Newman-Keuls Post-Hoc-Test), n = 7

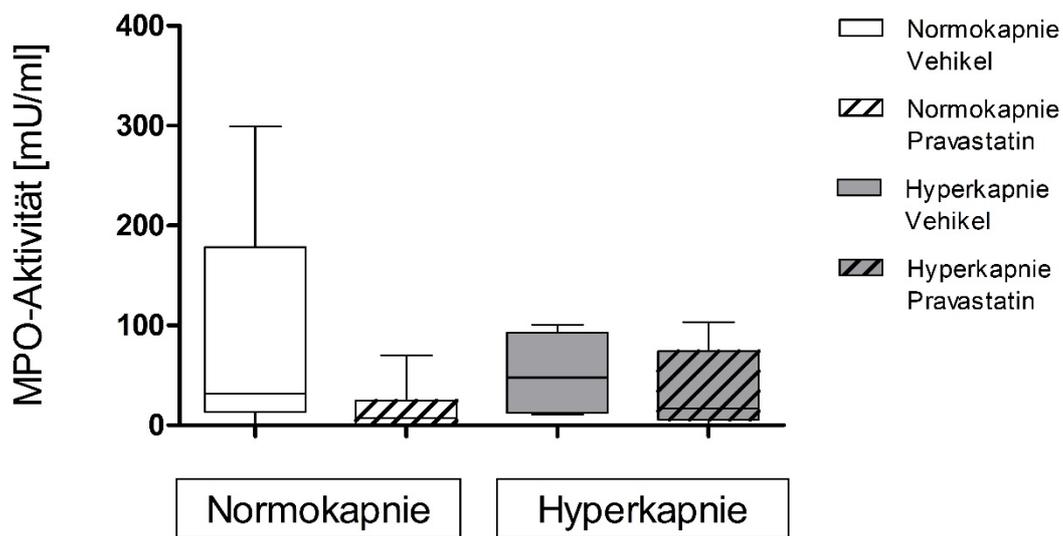


**Abb. 5: Relative Expression von *E-Selectin* im *Caecum***

Relative Expression von *E-Selectin* im *Caecum* bei normo- oder hyperkapnisch beatmeten Tieren unter Behandlung mit Vehikel oder Pravastatin. MW ± SD; (Einfaktorielle ANOVA + Newman-Keuls Post-Hoc-Test), n = 7

### 4.3 Myeloperoxidase-Assay im *Colon*

Im Rahmen der Sepsis zeigte sich kein signifikanter Unterschied der MPO-Aktivität (mU/ml) im *Colon* zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Weder die hyperkapnische Beatmung hatte einen Einfluss auf die MPO-Aktivität, noch wurde ein modulierender Effekt durch eine Pravastatinbehandlung gezeigt (siehe Abb. 6).



**Abb. 6: MPO-Aktivität im *Colon***

Myeloperoxidase-Aktivität im *Colon* bei normo- oder hyperkapnisch beatmeten Tieren unter Behandlung mit Vehikel oder Pravastatin. Median mit der 25./75. Perzentile und der 10./90. Perzentile; (Kruskal-Wallis + Dunn's Post-Hoc-Test), n = 7

### 4.4 Systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen

Durch eine normo- sowie hyperkapnische Beatmung zeigten sich bei den Tieren pCO<sub>2</sub>-Werte gemäß der festgelegten Zielwerte von 40 ± 6 mmHg (Normokapnie) und 72 ± 10 mmHg (Hyperkapnie). Nach 120 Minuten stellte sich bei den hyperkapnisch beatmeten Tieren ein signifikanter Abfall des pH-Wertes in der arteriellen Blutgasanalyse dar. Der Sauerstoffpartialdruck der arteriellen BGA ergab keinen signifikanten Unterschied innerhalb der einzelnen Gruppen. Ebenfalls kam es bis zum Ende der Intervention nach 120 Minuten zu keiner signifikanten Veränderung der Vitalparameter (siehe Tabelle 1).

		<b>Normokapnie</b>		<b>Hyperkapnie</b>	
		<b>Vehikel</b>	<b>Pravastatin</b>	<b>Vehikel</b>	<b>Pravastatin</b>
<i>pCO<sub>2</sub> [mmHg]</i>	<i>Baseline</i>	36 ± 4	37 ± 3	36 ± 3	38 ± 3
	60 min	37 ± 4	37 ± 5	69 ± 6 *	70 ± 6 *
	120 min	40 ± 4	40 ± 6	71 ± 8 *	73 ± 9 *
<i>pH</i>	<i>Baseline</i>	7.4 ± 0	7.4 ± 0	7.4 ± 0	7.4 ± 0.1
	60 min	7.4 ± 0	7.4 ± 0	7.2 ± 0 *	7.2 ± 0.1
	120 min	7.4 ± 0	7.3 ± 0.1	7.1 ± 0 *	7.1 ± 0 *
<i>pO<sub>2</sub> [mmHg]</i>	<i>Baseline</i>	142 ± 23	137 ± 21	137 ± 25	125 ± 28
	60 min	151 ± 22	137 ± 26	140 ± 31	142 ± 35
	120 min	37 ± 25	125 ± 33	133 ± 30	138 ± 47
<i>HF [min<sup>-1</sup>]</i>	<i>Baseline</i>	479 ± 57	428 ± 59	403 ± 46	455 ± 50
	60 min	446 ± 66	388 ± 69	390 ± 44	413 ± 59
	120 min	469 ± 57	417 ± 95	398 ± 47	424 ± 90
<i>MAP [mmHg]</i>	<i>Baseline</i>	129 ± 22	123 ± 23	107 ± 23	115 ± 28
	60 min	124 ± 20	108 ± 23	111 ± 26	124 ± 18
	120 min	126 ± 27	106 ± 35	123 ± 24	120 ± 34

**Tabelle 1: Systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen**

Arterieller Kohlendioxidpartialdruck (pCO<sub>2</sub>), pH, arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>), Herzfrequenz (HF), mittlerer arterieller Druck (MAP) bei normokapnisch bzw. hyperkapnisch beatmeten Tieren mit Vehikel- oder Pravastatinbehandlung. Die Daten sind als absolute Werte dargestellt, MW ± SD, \* = p < 0,05 gegenüber Normokapnie (zweifaktorielle ANOVA, Tukey Post-Hoc-Test), n = 10. Modifiziert nach Schulz *et al.* <sup>35</sup>

## 5 Diskussion

### 5.1 Ergebnisdiskussion

Bezüglich der zu Beginn gestellten Fragestellungen ergaben sich anhand der Ergebnisse folgende Schlussfolgerungen:

- 1) In der moderaten Sepsis ließen sich keine signifikanten Auswirkungen von Pravastatin auf die systemische Zytokinantwort *in vivo* darstellen. Ebenfalls zeigte eine zusätzliche Hyperkapnie keine Veränderung. Demzufolge scheint weder eine Statintherapie noch eine Hyperkapnie die systemische Immunantwort in der Sepsis zu beeinflussen.
- 2) Die Expression der Adhäsionsmoleküle des Darms zeigte weder unter Statintherapie noch unter Hyperkapnie signifikante Unterschiede. Somit scheint die Migration der neutrophilen Granulozyten in der Sepsis nicht beeinflusst zu werden.
- 3) Die MPO-Aktivität im Darm war in den verschiedenen Behandlungsgruppen nicht signifikant verändert. Damit scheinen auch hier die Statintherapie sowie die Hyperkapnie auch die lokale Immunantwort des Darms in der moderaten Sepsis nicht zu beeinflussen.
- 4) Zusammenfassend scheint eine Statintherapie weder allein noch in Kombination mit einer zusätzlichen Hyperkapnie die systemische Immunantwort oder die lokale Entzündungsreaktion im Darm zu beeinflussen. Die protektiven Effekte einer Statintherapie oder einer Hyperkapnie scheinen demnach nicht über die Immunmodulation vermittelt zu werden.

Um die Auswirkungen einer Statintherapie sowie einer Hyperkapnie möglichst genau unter den pathophysiologischen Veränderungen der Sepsis zu untersuchen, bedarf es eines standardisierten Tiermodells. Dabei scheint die *CASP*-Operation aufgrund ihrer klinischen Nähe die derzeit geeignetste Methode zu sein, um eine abdominelle Sepsis zu erzeugen, wie sie z.B. im Rahmen chirurgischer Anastomoseninsuffizienzen auftritt<sup>38,43</sup>.

Im Gegensatz dazu sind die Injektionsmodelle von exogenen Toxinen einfach und schnell durchzuführen. Der fulminante Endotoxinschock mit raschem Anstieg proinflammatorischer Zytokinplasmaspiegel erzeugt höhere Spitzenwerte als bei polymikrobiellen Modellen und bildet nur einen Teilaspekt der humanen Sepsis nach <sup>44-47</sup>. Durch den langsamen und konstanten Prozess der Sepsisentwicklung im *CASP*-Modell kommt es im Vergleich zu den LPS-Modellen zu einem späteren und geringeren Maximum der Zytokinplasmaspiegel. Die geringere Inflammation ist ähnlich der humanen Sepsis und somit entscheidend für die Untersuchung der systemischen Immunantwort <sup>48</sup>.

Ein weiteres operatives Sepsismodell ist die *cecal ligation and puncture (CLP)* nach Wichterman *et al.* <sup>46</sup>. Hierbei werden *Faeces* nach Punktion des *Caecums* in die Bauchhöhle eingebracht. Jedoch scheinen sich vermehrt perizökale Abszessformationen zu bilden, die dem klinischen Bild einer gedeckt perforierten Divertikulitis ähneln und nur selten zu einer Sepsis führen <sup>49-52</sup>. Im *CASP*-Modell wird dahingegen durch den kontinuierlichen Austritt von *Faeces* in die Bauchhöhle die häufige Komplikation einer gastrointestinalen Anastomoseninsuffizienz nach viszeralchirurgischen Operationen simuliert. Hierdurch entsteht eine diffuse Peritonitis, welche früh und stetig zu einer systemischen Sepsis führt. Die Schwere der Sepsis sowie das Letalitätsrisiko sind hierbei durch die Auswahl des Stentdurchmessers steuerbar <sup>24</sup>. Im Vergleich zu dem *CLP*-Modell kommt es daher im *CASP*-Modell zu einer generalisierten Infektion mit Veränderungen der lokalen und systemischen Immunantwort <sup>38,51</sup>.

In der vorliegenden Arbeit zeigte eine Vorbehandlung mit Pravastatin keinen Einfluss auf die Zytokinplasmaspiegel nach Intervention und hatte somit keinen Effekt auf die systemische Immunantwort. Dabei sind die Ergebnisse vergleichbar mit zwei Studien, die durch eine vorherige Statintherapie ebenfalls keine Veränderung der Zytokinplasmaspiegel feststellen konnten. Kruger *et al.* zeigten in einer klinischen Sepsis-Studie an kritisch kranken Patienten, dass eine De-Novo-Statintherapie die IL-6-Konzentration nicht beeinflusst. Zudem stellten sie sowohl bei Patienten unter De-Novo-Statin-Therapie als auch mit bereits bestehender Statintherapie in der Dauermedikation keine Nebenwirkungen fest <sup>53</sup>. Auch bei Simvastatin behandelten Probanden nach LPS-Injektion ließen sich im Rahmen der Sepsis keine signifikanten Veränderungen der IL-6- und IL-1 $\beta$ -Spiegel im Vergleich zur Placebogruppe nachweisen <sup>54</sup>.

Entgegen unseren Ergebnissen verringerten sich in der Studie von Souza Neto *et al.* im *CLP*-Modell unter einer Statintherapie signifikant die Zytokinplasmaspiegel von IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie die Neutrophilenanzahl<sup>34</sup>. Dabei erfolgte jedoch die Statin-Applikation zweimalig per os 18 h sowie 2 h vor Operationsbeginn. In dieser Arbeit wurde hingegen das Pravastatin in subkutaner Applikationsart (0,2 mg · kg<sup>-1</sup> s.c.) analog der Dosis anderer Studien angepasst<sup>55,56</sup>. Durch die subkutane Applikationsart ist es möglich sowohl die Anwendung zu vereinfachen als auch eventuelle Beeinträchtigungen der Resorption im Gastrointestinaltrakt zu vermeiden. Es ist daher wahrscheinlich, dass die abweichenden Ergebnisse von Souza Neto *et al.* durch die zeitversetzte Applikation des Statins sowie durch die Anwendung eines anderen Sepsismodells erklärt werden können<sup>34</sup>. In einer weiteren *in vivo* Studie an Patienten mit beginnender bakterieller Infektion ohne direkten Fokus verringerte eine Statintherapie die systemischen Zytokinplasmaspiegel signifikant im Vergleich zur Placebogruppe<sup>57</sup>. In dieser Arbeit wurde dahingehend ein abdominaler Infektfokus mit beginnender Sepsis im Tiermodell gewählt. Infolgedessen kann einerseits die geringere Ausprägung der Infektion als auch andererseits die Wirkweise von Statinen beim Menschen eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein<sup>57</sup>. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in dieser Arbeit die TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel in allen Behandlungsgruppen nach der Intervention nicht mehr messbar waren. Es gibt diesbezüglich Hinweise auf verschiedene Mechanismen, welche die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in der Sepsis herunterregulieren. Zum einen ist es möglich, dass das sezernierte TNF- $\alpha$  aufgrund einer Verringerung der Halbwertszeit innerhalb von 120 Minuten mittels *ELISA* nicht mehr nachweisbar ist. Zum anderen ist es denkbar, dass komplexe Regulationsmechanismen wie u.a. die Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen die TNF- $\alpha$ -Sekretion unterdrücken<sup>58,59</sup>.

Im Hinblick auf die lokale Immunreaktion während einer Sepsis zeigte diese Arbeit anhand der Adhäsionsmolekülexpression von *ICAM-1* und *E-Selectin* sowie der MPO-Aktivität im Darm keinen Einfluss einer Statintherapie. *In vivo* Studien im Sepsismodell zur Untersuchung der Auswirkungen von Statinen auf lokale Entzündungsreaktionen sind rar. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich nicht mit den Feststellungen anderer Studien, in denen eine Statintherapie zu einer Veränderung der lokalen Immunantwort geführt hat. Merx *et al.* untersuchten *in vitro* die immunmodulatorischen Wirkungen einer Statintherapie. Nach TNF- $\alpha$  Stimulation beeinflussten Statine die Leukozyten-Endothel-Wechselwirkung indem sowohl die

Adhäsionsfähigkeit der Leukozyten als auch die des Endothels verringert wurde<sup>56</sup>. Ein sehr ähnliches *in vitro* Studiendesign wählten Schmidt *et al.* aus und zeigten eine signifikant reduzierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen unter Statinexposition<sup>60</sup>. Auch weitere *in vitro* Studien unter nicht septischen Bedingungen konnten eine reduzierte Adhäsionsmolekülexpression sowie Adhäsionsfähigkeit von neutrophilen Granulozyten unter Statintherapie nachweisen<sup>61-63</sup>. Die Ergebnisse dieser *in vivo* Arbeit lassen sich daher nur eingeschränkt mit diesen Studien vergleichen. Es ist möglich, dass die abweichenden Ergebnisse durch die *in vitro* Untersuchungen sowie die unterschiedliche Art der Sepsisinduktion erklärt werden können. Dabei sind jedoch vor allem *in vivo* Studien geeignet, Ergebnisse in die humanmedizinische Forschung zu übertragen<sup>64</sup>.

Durch die moderate Hyperkapnie konnten in dieser Doktorarbeit keine Effekte auf die systemische Immunantwort nach Intervention gezeigt werden. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von Stübs sowie Beck *et al.*. Auch hier führte eine moderate Hyperkapnie zu keinem Einfluss auf die Konzentration der Zytokinplasmaspiegel<sup>22,24</sup>.

Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse zweier Studien, in denen es zu einer signifikanten Veränderung der Zytokinspiegel unter Hyperkapnie kam. Kimura *et al.* konnten im LPS-Modell eine verringerte Zytokinproduktion nachweisen<sup>25</sup>. Im Vergleich zu dieser Arbeit wurde die Studie jedoch *in vitro* an menschlichen Vollblutproben durchgeführt und die Zellen einer über 24 Stunden erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentration ausgesetzt. Ähnliche Ergebnisse zeigten Norozian *et al.* mit einem Anstieg der Zytokinspiegel in der Lunge unter moderater Hyperkapnie<sup>26</sup>. Auch hier handelte es sich um eine Endotoxin-stimulierte Sepsis und die Tiere wurden gleichermaßen für 24 Stunden einer Hyperkapnie ausgesetzt. Demzufolge unterscheiden sich die Untersuchungen deutlich von dem Versuchsaufbau dieser Arbeit. Es ist demgegenüber nicht auszuschließen, dass es auch in dem von uns gewählten *Setting* unter länger andauernder Hyperkapnie zu signifikanten Unterschieden der Zytokinplasmaspiegel kommen könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zudem durch die Induktion einer zweistündigen moderaten Hyperkapnie keine Auswirkungen auf die Adhäsionsmolekülexpression von *ICAM-1* und *E-Selectin* sowie die MPO-Aktivität im Darm und hatten somit keinen Effekt auf die lokale Immunantwort. Diese Ergebnisse werden gestützt durch eine Untersuchung im experimentellen Sepsismodell. Unter

einer vierstündigen Hyperkapnie zeigte sich dabei ebenfalls keine Veränderung der MPO-Aktivität im Darm <sup>23</sup>.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Doktorarbeit stehen jedoch die Aussagen zwei weiterer Studien. Costello *et al.* zeigten unter Hyperkapnie eine verringerte lokale Immunantwort der Lunge. Im *CLP*-Modell folgte unmittelbar nach der Operation eine dreistündige moderate Hyperkapnie. Es reduzierte sich sowohl die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Lunge als auch der septische Lungenschaden <sup>27</sup>. Vergleichbare Ergebnisse stellten Takeshita *et al.* *in vitro* im LPS-Modell an pulmonalen Epithelzellen dar. Unter direkt folgender 24-stündiger Inkubation mit hyperkapnischem Gas zeigten sie eine verminderte Expression von *ICAM-1* mit reduzierter Zelladhäsivität neutrophiler Granulozyten <sup>28</sup>. Es zeigten sich vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Ergebnisse nicht nur Unterschiede in der Art der Sepsisinduktion, sondern auch in der Auswahl der Organe. Es ist nicht auszuschließen, dass die Lunge als untersuchtes Organ eher lokale Schädigungsmuster durch eine Infektion zeigt als der Darm <sup>27,65</sup>. Auch im Hinblick auf den Beginn der Hyperkapnie zeigten sich Unterschiede. In dieser Arbeit erfolgte die hyperkapnische Beatmung 24 Stunden nach der Sepsisinduktion um möglichst nahe die klinische Praxis zu simulieren. Die meisten Patienten müssen erst beatmet werden, wenn sich im Rahmen einer Sepsis ein akutes Lungenversagen manifestiert hat und nicht unmittelbar nach Infektionsbeginn wie in den Arbeiten von Costello und Takeshita *et al.* <sup>27,28</sup>.

Darüber hinaus zeigte diese Arbeit, dass eine Statintherapie weder allein noch in Kombination mit einer zusätzlichen moderaten Hyperkapnie die lokale Entzündungsreaktion in der Sepsis beeinflusst. Die Auswirkungen einer Statintherapie in Kombination mit einer Hyperkapnie auf die lokale Immunantwort des Darms in der Sepsis werden in dieser Arbeit zum ersten Mal untersucht. Erst eine kürzlich durchgeführte Studie analysierte die Wirkung einer Statintherapie und Hyperkapnie in der Sepsis im Hinblick auf die Gewebeoxygenierung. Dabei hob sich der protektive Effekt der verbesserten Mikrozirkulation unter Pravastatin in Kombination mit einer zusätzlichen Hyperkapnie auf <sup>35</sup>. Auch in einer neulich durchgeführten Metaanalyse profitierten Patienten mit *ARDS* unter moderater Hyperkapnie nicht von einer ergänzenden De-Novo-Statintherapie <sup>36</sup>. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ist anzunehmen, dass die beschriebenen Effekte nicht durch eine Modulation der lokalen

Immunantwort vermittelt wurden. Jedoch ist die Aussagekraft der Ergebnisse aufgrund der geringen Stichprobenanzahl dieser Arbeit eingeschränkt.

## 5.2 Klinische Relevanz

Die Sepsis ist weiterhin eine der Hauptursachen für die Mortalität auf den Intensivstationen <sup>13</sup>. Aufgrund der überschießenden Immunantwort mit folgenden Endorganschäden rückt auch die immunmodulatorische Therapie immer weiter in den Fokus.

Eine permissive Hyperkapnie ist bereits wesentlicher Bestandteil einer lungenprotektiven Beatmung bei kritisch kranken Patienten. Durch reduzierte Tidalvolumina werden beatmungsdruckbedingte Schäden der Lunge gemindert <sup>18</sup>. Derzeit werden jedoch günstig angesehene Effekte einer Hyperkapnie insbesondere auf die Immunantwort in der Sepsis kontrovers diskutiert. Einerseits beeinträchtigte eine moderate Hyperkapnie die Immunantwort auf eine bakterielle Infektion. Es zeigten sich aufgrund einer erhöhten pulmonalen Bakterienlast und Verschlechterung des Lungenschadens unter länger andauernder Hyperkapnie Bedenken hinsichtlich einer sicheren Anwendung bei Patienten mit akuter Lungenentzündung <sup>65</sup>. Ebenfalls zeigte sich, dass eine Hyperkapnie die Bakteriämie steigerte und mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden war <sup>66,67</sup>. Andererseits gab es Beobachtungen hinsichtlich antiinflammatorischer Effekte einer Hyperkapnie, welche sich günstig auf den Verlauf der Sepsis auswirkten. So hat eine moderate Hyperkapnie das Potenzial Sepsis-induzierte Organschäden zu minimieren, die Mikrozirkulation zu verbessern und die Immunantwort zu regulieren <sup>24,26,27</sup>. Die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Arbeit zeigten, dass eine kurzzeitige Hyperkapnie die systemische oder lokale Immunantwort in der moderaten Sepsis nicht beeinflusste. Somit scheint in diesem experimentellen *Setting* eine moderate Hyperkapnie zu keinen relevanten Nebenwirkungen bezogen auf die Immunantwort zu führen und so können die protektiven Effekte der Hyperkapnie genutzt werden <sup>21,24</sup>.

Zudem ist es von großem Interesse die Auswirkungen einer Statintherapie bei kritisch kranken Patienten in der Sepsis zu untersuchen und die therapeutische Indikation neu zu bewerten. Auf der einen Seite reduzierten Statine im Tiermodell die Gesamtmortalität und die Immunantwort <sup>33</sup>. Auf der anderen Seite zeigte sich in Anlehnung an die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Statine keinen direkten Einfluss auf

die systemische oder lokale Inflammation in der moderaten Sepsis hatten<sup>53,54</sup>. Demzufolge scheinen die protektiven Effekte einer Statintherapie in der Sepsis möglicherweise nicht über die Immunantwort vermittelt zu werden.

Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, dass es sich bei dieser Arbeit um eine tierexperimentelle Studie handelt und die Ergebnisse daher mit Vorsicht zu betrachten sind. Es ist jedoch von großem klinischen Interesse auf Grundlage dieser Ergebnisse humanmedizinische Untersuchungen durchzuführen, um so einer verbesserten Therapie in der Sepsis näher zu kommen.

## **6 Schlussfolgerung**

Diese Doktorarbeit zeigt, dass im septischen Tiermodell weder eine Pravastatintherapie noch eine moderate Hyperkapnie die Zytokinplasmaspiegel sowie die Adhäsionsmolekülexpression und MPO-Aktivität im Darm verändert. Somit wird die Immunantwort während einer Sepsis weder systemisch noch lokal durch Statine oder eine Hyperkapnie moduliert. Unter Berücksichtigung der eingeschränkten Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Tiermodellen auf den Menschen scheint es demnach hinsichtlich der Auswirkungen auf die Immunantwort sicher zu sein, eine Statintherapie bei septischen Patienten unter permissiver Hyperkapnie einzusetzen und so die protektiven Effekte zu nutzen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Singer, M., *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801-810 (2016).
2. Gustot, T. Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Curr. Opin. Crit. Care* **17**, 153-159 (2011).
3. Tracey, K.J. & Lowry, S.F. The role of cytokine mediators in septic shock. *Adv. Surg.* **23**, 21-56 (1990).
4. Skibsted, S., *et al.* Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock* **39**, 427-432 (2013).
5. Reinhart, K., Bayer, O., Brunkhorst, F. & Meisner, M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit. Care Med.* **30**, S302-312 (2002).
6. Springer, T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-434 (1990).
7. Madden, K.S., Sanders, V.M. & Felten, D.L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annual review of pharmacology and toxicology* **35**, 417-448 (1995).
8. van der Poll, T., Coyle, S.M., Barbosa, K., Braxton, C.C. & Lowry, S.F. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J. Clin. Invest.* **97**, 713-719 (1996).
9. Gentile, L.F., *et al.* Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg* **72**, 1491-1501 (2012).
10. Aird, W.C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* **101**, 3765-3777 (2003).
11. Angus, D.C. & van der Poll, T. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* **369**, 840-851 (2013).
12. 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).

13. Fleischmann, C., *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 259-272 (2016).
14. Clark, J.A. & Coopersmith, C.M. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the "motor" of critical illness. *Shock* **28**, 384-393 (2007).
15. Klingensmith, N.J. & Coopersmith, C.M. The Gut as the Motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness. *Crit. Care Clin.* **32**, 203-212 (2016).
16. Schädler, D., *et al.* A multicenter randomized controlled study of an extracorporeal cytokine hemoadsorption device in septic patients. *Critical Care* **17**, P62 (2013).
17. Qiu, P., *et al.* Antitumor necrosis factor therapy is associated with improved survival in clinical sepsis trials: a meta-analysis. *Crit. Care Med.* **41**, 2419-2429 (2013).
18. Amato, M.B., *et al.* Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **338**, 347-354 (1998).
19. Ijland, M.M., Heunks, L.M. & van der Hoeven, J.G. Bench-to-bedside review: hypercapnic acidosis in lung injury--from 'permissive' to 'therapeutic'. *Crit Care* **14**, 237 (2010).
20. Contreras, M., Masterson, C. & Laffey, J.G. Permissive hypercapnia: what to remember. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **28**, 26-37 (2015).
21. Hickling, K.G., Walsh, J., Henderson, S. & Jackson, R. Low mortality rate in adult respiratory distress syndrome using low-volume, pressure-limited ventilation with permissive hypercapnia: a prospective study. *Crit. Care Med.* **22**, 1568-1578 (1994).
22. Beck, C., *et al.* The beneficial effects of acute hypercapnia on microcirculatory oxygenation in an animal model of sepsis are independent of K(+)ATP channels. *Microvasc Res* **99**, 78-85 (2015).
23. Morisaki, H., *et al.* Hypercapnic acidosis minimizes endotoxin-induced gut mucosal injury in rabbits. *Intensive Care Med* **35**, 129-135 (2009).

24. Stubbs, C.C., *et al.* Acute, short-term hypercapnia improves microvascular oxygenation of the colon in an animal model of sepsis. *Microvasc. Res.* **90**, 180-186 (2013).
25. Kimura, D., Totapally, B.R., Raszynski, A., Ramachandran, C. & Torbati, D. The effects of CO<sub>2</sub> on cytokine concentrations in endotoxin-stimulated human whole blood. *Crit. Care Med.* **36**, 2823-2827 (2008).
26. Norozian, F.M., *et al.* Therapeutic hypercapnia enhances the inflammatory response to endotoxin in the lung of spontaneously breathing rats. *Crit. Care Med.* **39**, 1400-1406 (2011).
27. Costello, J., *et al.* Hypercapnic acidosis attenuates shock and lung injury in early and prolonged systemic sepsis. *Crit. Care Med.* **37**, 2412-2420 (2009).
28. Takeshita, K., *et al.* Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced nuclear factor-[kappa]B activation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 124-132 (2003).
29. Liao, J.K. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J. Clin. Invest.* **110**, 285-288 (2002).
30. Page, V.J., *et al.* Statin use and risk of delirium in the critically ill. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 666-673 (2014).
31. Davignon, J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* **109**, III39-43 (2004).
32. Kwak, B., Mulhaupt, F., Myit, S. & Mach, F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat. Med.* **6**, 1399-1402 (2000).
33. Merx, M.W., *et al.* HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis. *Circulation* **109**, 2560-2565 (2004).
34. Souza Neto, J.L., *et al.* Effects of simvastatin in abdominal sepsis in rats. *Acta Cir. Bras.* **21 Suppl 4**, 8-12 (2006).
35. Schulz, J., *et al.* Effect of Pravastatin Pretreatment and Hypercapnia on Intestinal Microvascular Oxygenation and Blood Flow During Sepsis. *Shock* **53**, 88-94 (2020).

36. Nagendran, M., *et al.* Statin therapy for acute respiratory distress syndrome: an individual patient data meta-analysis of randomised clinical trials. *Intensive Care Med.* **43**, 663-671 (2017).
37. Reynolds, P., *et al.* Shock supports the use of animal research reporting guidelines. *Shock* **38**, 1-3 (2012).
38. 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).
39. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. Western-Blot. in *Der Experimentator: Immunologie* 133-150 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014).
40. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
41. Smith, P.K., *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85 (1985).
42. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
43. Traeger, T., *et al.* Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp*, e2299 (2010).
44. 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).
45. Michie, H.R., *et al.* Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* **318**, 1481-1486 (1988).
46. Wichterman, K.A., Baue, A.E. & Chaudry, I.H. Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *J. Surg. Res.* **29**, 189-201 (1980).
47. Chen, P., Stanojic, M. & Jeschke, M.G. Differences between murine and human sepsis. *Surg. Clin. North Am.* **94**, 1135-1149 (2014).
48. Rittirsch, D., Hoesel, L.M. & Ward, P.A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* **81**, 137-143 (2007).

49. Hubbard, W.J., *et al.* Cecal ligation and puncture. *Shock (Augusta, Ga.)* **24 Suppl 1**, 52-57 (2005).
50. Singleton, K.D. & Wischmeyer, P.E. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res* **35**, 486-491 (2003).
51. Maier, S., *et al.* Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* **21**, 505-511 (2004).
52. Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E. & Libert, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* **19**, 198-208 (2011).
53. Kruger, P., *et al.* A multicenter randomized trial of atorvastatin therapy in intensive care patients with severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* **187**, 743-750 (2013).
54. Pleiner, J., *et al.* Simvastatin prevents vascular hyporeactivity during inflammation. *Circulation* **110**, 3349-3354 (2004).
55. McGown, C.C., Brown, N.J., Hellewell, P.G., Reilly, C.S. & Brookes, Z.L. Beneficial microvascular and anti-inflammatory effects of pravastatin during sepsis involve nitric oxide synthase III. *Br. J. Anaesth.* **104**, 183-190 (2010).
56. Merx, M.W., *et al.* Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation* **112**, 117-124 (2005).
57. Novack, V., *et al.* The effects of statin therapy on inflammatory cytokines in patients with bacterial infections: a randomized double-blind placebo controlled clinical trial. *Intensive Care Med.* **35**, 1255-1260 (2009).
58. Ertel, W., *et al.* Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* **85**, 1341-1347 (1995).
59. Munoz, C., *et al.* Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J. Clin. Invest.* **88**, 1747-1754 (1991).
60. Schmidt, A., Goepfert, C., Feitsma, K. & Buddecke, E. Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF-alpha activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **164**, 57-64 (2002).

61. Chung, H.K., *et al.* Statin inhibits interferon-gamma-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Exp. Mol. Med.* **34**, 451-461 (2002).
62. Stalker, T.J., Lefer, A.M. & Scalia, R. A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *Br. J. Pharmacol.* **133**, 406-412 (2001).
63. Weitz-Schmidt, G., *et al.* Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat. Med.* **7**, 687-692 (2001).
64. Marshall, J.C., *et al.* PRECLINICAL MODELS OF SHOCK AND SEPSIS: WHAT CAN THEY TELL US? *Shock* **24** (2005).
65. O'Croinin, D.F., *et al.* Sustained hypercapnic acidosis during pulmonary infection increases bacterial load and worsens lung injury. *Crit. Care Med.* **36**, 2128-2135 (2008).
66. Gates, K.L., *et al.* Hypercapnia impairs lung neutrophil function and increases mortality in murine pseudomonas pneumonia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **49**, 821-828 (2013).
67. Tiruvoipati, R., Pilcher, D., Buscher, H., Botha, J. & Bailey, M. Effects of Hypercapnia and Hypercapnic Acidosis on Hospital Mortality in Mechanically Ventilated Patients. *Crit. Care Med.* **45**, e649-e656 (2017).

## 8 Anhang

### 8.1 Geräte und Hilfsmittel des laborexperimentellen Versuchsteils

<b>Eismaschine</b>	AF 80, Scotsman, Mailand, Italien
<b>Elektrophoresekammer</b>	Polyacrylamid Gel Kammern, LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
<b>Filterpapier</b>	Chromatographiepapier, Whatman, GE Healthcare, München, Deutschland
<b>Folie für Wellplatten</b>	Klebefolie, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
<b>Gel-Auswertungssoftware</b>	GelScan 6.0, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Geldokumentation</b>	Dunkelkammer: DeVision, Decon Science Tec, Hohengandern, Deutschland) Kamera: Coolsnap HQ2, Photometrics, Tucson, USA Software: GelPro Analyzer v6.0.0.349, Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA
<b>Heizblock</b>	Neo Block Heizer Duo 2-2504, neoLab, Heidelberg, Deutschland
<b>Homogenisierstation</b>	Dispergierstation T 8.10 mit Metallpotter, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
<b>Mikrotiterplatten</b>	Nunc-Immuno Platte - Maxi Sorp Surface 96 well, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark Klebefolie, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
<b>Multi-Detektions-Plattenlesegerät</b>	Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader Gen5™, Datenanalyse-

	Software BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
<b>pH-Meter</b>	Digital-pH-Meter 646, Laborausrüstung Klees, Düsseldorf, Deutschland
<b><i>PVDF-Membran für Western Blot</i></b>	Immobilon-P, EMD Millipore Corporation, Billerica, USA
<b>Schüttelapparat</b>	GFL 3011, GFL, Burgwedel, Deutschland
<b>Statistiksoftware und graphische Darstellung</b>	GraphPad Prism Version 6, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
<b>Stromnetzteil für Elektrophoresekammer</b>	Consort E143, Sigma, München, Deutschland
<b>Vortexgerät</b>	Vortex Genie Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
<b>Waage</b>	LA230S, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
<b><i>Western Blot-Kit Mini-Protean 3</i></b>	(Transfer-Kammer, Gel-Kassette, Fiberpad, Kühlelement), BIO-RAD, München, Deutschland
<b>Zentrifuge groß</b>	Eppendorf Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>Zentrifuge klein</b>	Eppendorf Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2: Geräte und Hilfsmittel des laborexperimentellen Versuchsteils

## 8.2 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils

<b>100 % Ethanol</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>APS (= Ammoniumpersulfat)</b>	Sigma-Aldrich, Sigma, München, Deutschland
<b>Aqua dest.</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Bromphenolblau Natrium-Salz</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Complete</b>	Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
<b>Coomassie Brilliant Blue</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>DTT (= 1,4-Dithiothreitol)</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>EDTA</b>	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
<b>EDTA-Natrium-Salz</b>	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
<b>Essigsäure (= Eisessig), 100 % wasserfrei</b>	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
<b>Folin-Reagenz (1,2-Naphthochinon-5-Sulfonat)</b>	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
<b>Glycerol</b>	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
<b>Glycin</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>HCl (Chlorwasserstoff, Salzsäure)</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Isopropylalkohol</b>	Zentralapotheke, Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf, Deutschland
<b>Kaliumnatriumtartrat</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Kupfersulfat</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland

<b>Methanol</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Milchpulver Blotting grade</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumcarbonat</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumchlorid</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumhydroxid</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Nonidet™ P40</b>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<b>SDS (Sodiumdodecylsulfat)</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Sigma 7-9</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Stickstoff, flüssig</b>	Linde, Duisburg, Deutschland
<b>Temed (Tetramethylethyldiamin)</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Tris HCL (Trizma)</b>	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
<b>Tween</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>Western Blotting Luminol Reagent sc-2048</b>	Chemilumineszenz Reagenz, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils

### 8.3 Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils

<b>Assay Diluent</b>	FBS 10 % in PBS, pH 7,0
<b>Coating Puffer</b>	<p><b>TNF-<math>\alpha</math>:</b> Natriumkarbonat = 0,1 mol/l, pH 9,5 1,8 g Natriumkarbonat, 4,2 g Natriumhydrogenkarbonat in 0,5 l Aqua dest.</p> <p><b>IL-10:</b> Natriumphosphat = 0,2 mol/l, pH 6,5 11,8 g Di-Natriumhydrogenphosphat, 16,1 g Natriumdihydrogenphosphat in 1 l Aqua dest.</p> <p><b>IL-6:</b> Natriumkarbonat = 0,1 mol/l, pH 9,5</p>

	1,59 g Natriumkarbonat, 7,13 g Natriumhydrogenkarbonat in 1 l Aqua dest.
<b>PBS (0,15 mmol/l, pH 7,2)</b>	8,0 g/l Natriumchlorid 0,2 g/l Kaliumchlorid 1,16 g/l Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat
<b>Stopplösung ELISA</b>	Schwefelsäure (1 mol/l)
<b>Substratlösung ELISA</b>	Tetramethylbenzidin Substrat Reagent Set, BD Biosciences, San Diego, USA
<b>Waschpuffer</b>	Tween-20 0,05 % in PBS

Tabelle 4: Chemikalien und Lösungen für den *ELISA*

<b>Lysepuffer (100 ml)</b>	10 mM Sigma 7-9 pH 8 (MG 121,4) 1 mM Na-EDTA (MG 416,2) 400 mM NaCl (MG 58,44) 10 % Glycerol (10 ml) 0,5 % NP40 (0,5 ml)  DTT und Complete vor direkt vor Gebrauch frisch ansetzen und hinzufügen: 40 µl/ml Complete (1 Tablette Complete in 2ml Aqua dest. aliquotieren) 1 µl/ml DTT (1 mM DTT (MG 154,25) in 1ml Aqua dest. aliquotieren)
----------------------------	---

Tabelle 5: Lösungen für die Ganzzellextraktion

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

Tabelle 6: Lösungen für die Lowry-Proteinbestimmung

<b>Eppendorf Tube- Nummer</b>	<b>Konzentration BSA/Probe µg/ml</b>	<b>BSA µl</b>	<b>Aqua dest. µl</b>
0	0	0	500
1	12,5	31,2	468,7
2	25	62,5	437,5
3	50	125	375
4	100	250	250
5	150	375	125
6	200	500	0

Tabelle 7: Pipettierschema der Standardreihe für die Lowry-Proteinbestimmung

<b>1,5 M Sigma 7-9, pH 8,8</b>	54,51 g Sigma 7-9 (= Tris BASE) auf 300 ml mit Aqua dest. auffüllen (etwas Platz für HCl lassen) pH 8,8 mit HCl (10 N) einstellen, im Kühlschrank lagern
<b>1,25 M Sigma 7-9, pH 6,8</b>	15,14 g Sigma 7-9 (= Tris BASE) auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen (etwas Platz für HCl lassen) pH 6,8 mit HCl (10 N) einstellen, im Kühlschrank lagern

<b>10 % SDS</b>	5 g <i>SDS</i> (= Sodiumdodecylsulfat) auf 50 ml mit Aqua dest. Auffüllen, zum Lösen evtl. leicht erwärmen
<b>10 % APS</b>	1 g APS (= Ammoniumpersulfat) 10 ml Aqua dest. Hinzugeben, im Kühlschrank lagern (bis zu drei Wochen)

Tabelle 8: Lösungen für die Polyacrylamid-Gele des *Western Blot*

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

Tabelle 9: Chemikalien für das Trenngel

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

Tabelle 10: Chemikalien für das Sammelgel

<b>Tris-HCl, pH 6,8</b>	15,8 g Tris-HCl (= 500 mM) 200 ml Aqua dest. mit NaOH (5 N) pH auf 6,8 einstellen
<b>Tris-HCl, pH 7,4</b>	15,8 g Tris-HCl (= 500 mM) 200 ml Aqua dest. mit NaOH (5 N) pH auf 7,4 einstellen
<b>Loading Buffer</b>	<i>SDS</i> -Stopp-Puffer (100 ml): 125 mM Sigma 7-9 pH 6,8 (MG 121,4) 3 mM Na-EDTA (MG 416,2) 20 % Glycerol (20 ml) 9 % <i>SDS</i> (9 g) 0,05 % Bromphenolblau (0,05 g)  <i>SDS</i> -Stopp-Puffer 10:1 mit Mercaptoethanol mischen
<b>Running Buffer (10x)</b>	30 g Sigma 7-9 144 g Glycin 10 g <i>SDS</i> 1 l Aqua dest. zum Lösen von <i>SDS</i> leicht erwärmen
<b>Transfer Buffer (1x)</b>	1,45 g Sigma 7-9 (12 mM) 7,2 g Glycin (96 mM) 1000 ml Aqua dest.
<b>Blotto 5 %</b> (= Blocking Solution - zur Absättigung unspezifischer Bindungen)	50 g Dried skimmed milk 1000 ml <i>TBS-T</i>
<b>Blotto 1 %</b>	Blotto 5 % 1:5 mit <i>TBS-T</i> (pH 8,0) verdünnen Aliquots à 20 ml bei - 20 °C einfrieren  Blotto 1 % zur Verdünnung der Antikörper nutzen
<b>BSA 5 %</b>	50 g BSA ad 1000 ml in <i>TBS-T</i> mit NaOH (5 N) pH auf 8,0 einstellen
<b><i>TBS-T</i> (=TPBS)</b>	6 g Sigma 7-9

	22,2 g NaCl 2 ml Tween auf 2 l mit Aqua dest.
<b>Coomassie Staining</b>	750 mg Coomassie Blue 25 ml Eisessig 112,5 ml Ethanol 112,5 ml Aqua dest. nach Mischen der Lösung unter Abzug filtrieren

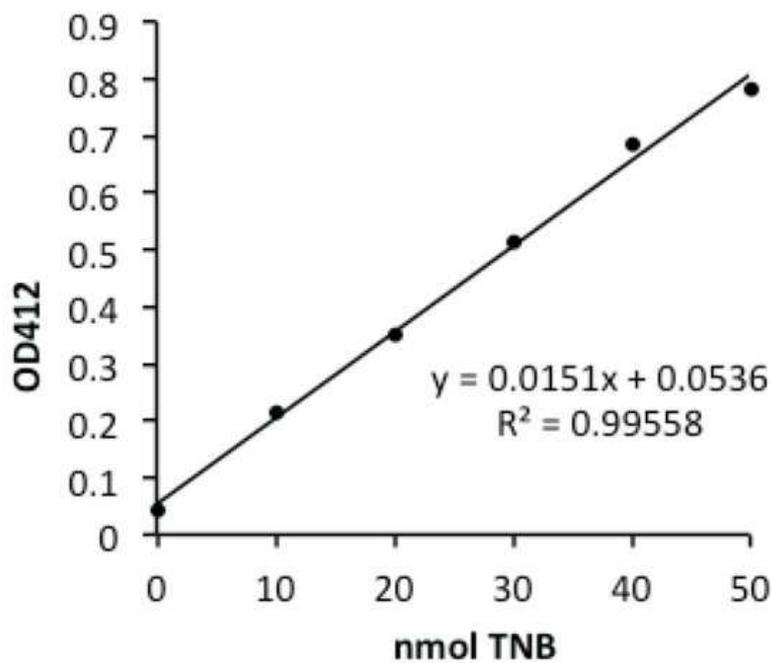
Tabelle 11: Lösungen für Elektrophorese und Transfer des *Western Blot*

#### 8.4 Antikörper, Marker und *ELISA*-Kits des laborexperimentellen Versuchsteils

<b>Anti-Actin; polyklonaler Antikörper</b>	Produkt-Nr. A 2066, 42 kDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 1:10.000
<b>Anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper</b>	Produkt-Nr. 711-035-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Newmarket, UK, 1:10.000
<b><i>E-Selectin</i>; polyklonaler Antikörper</b>	Produkt-Nr. 3631-100, 67 kDa, Biovision Inc., Milpitas, USA, 1:500
<b><i>ICAM-1</i>; polyklonaler Antikörper</b>	Produkt-Nr. (M-19): sc-1511, 85-110 kDa, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA, 1:200
<b>Proteinmarker</b>	Produkt-Nr. 00101489, Spectra TM Multicolor High Range Protein Ladder, Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
<b>Working Detector IL-10</b>	Detektionsantikörper 1:250 in Assay Diluent verdünnen Enzym-Reagenz 1:250 in der Detektionsantikörper-Lösung verdünnen

Tabelle 12: Antikörper und Marker

<b>IL-10 <i>ELISA</i> Set für Ratte</b>	Artikel-Nr. #555134, BD Opt EIA, BD Biosciences, San Diego, USA
<b>IL-6 <i>ELISA</i> Set für Ratte</b>	Artikel-Nr. #550319, BD Opt EIA, BD Biosciences, San Diego, USA
<b>Myeloperoxidase Colometric Activity Assay Kit</b>	Artikel-Nr. #K744-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>TNF-<math>\alpha</math> <i>ELISA</i> Set für Ratte</b>	Artikel-Nr. #558535, BD Opt EIA, BD Biosciences, San Diego, USA

Tabelle 13: *ELISA*-KitsAbb. 7: *ELISA*-Kit MPO *TNB*-Standardkurve, Sigma-Aldrich Chemie GmbH

## 8.5 Septic rat severity scoring system

### Untersuchungsbogen

Experiment: \_\_\_\_\_

Stentdurchmesser: \_\_\_\_\_ G

Ratte-Nr: \_\_\_\_\_ OP Datum: \_\_\_\_\_ Uhrzeit: \_\_\_\_\_

Klinische Untersuchung:

Untersuchung	Untersuchungsergebnis	Beurteilung	Körpergewicht	Erscheinung	Klinik	Spontanverhalten	Provoz. Verhalten
Körpergewicht	1. präop. Gewicht (pG) ___ g 2. Momentanwert (mW) ___ g 3. $\Delta = \% \text{ des mW vom pG}$ ___ $\Delta\%$	$\Delta\% < 5 \Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Delta\% < 15 \Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Delta\% < 20 \Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Delta\% > 20 \Rightarrow 3 \text{ P}$	_____				
Erscheinung	1. normale Erscheinung, Fell anliegend, sauber geputzt 2. geringes Pflegedefizit, Fell gestäubt 3. zunehmendes Pflegedef., Ränder an Auge/Anus 4. deutliches Pflegedef., Augen verklebt, Einstreu haftet am Anus	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$		_____			
Spontanverhalten	1. Ratte (R) erkundet Käfig, aktiv 2. R sitzt auf einer Stelle, Ganzkörperbewegung vorhanden 3. buckelige Haltung, schwankender Gang 4. immobil, Seitenlage	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$				_____	
Provoziertes Verhalten	1. R flieht bei Käfigöffnung, starker Muskeltonus 2. R flieht erst bei Annäherung der Hand 3. R flieht erst bei Berührung 4. Fluchtreflex erloschen	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$					_____
Atemfrequenz	1. präop. Wert (pW) ___ /min 2. Momentanwert (mW) ___ /min 3. $\Delta = \% \text{ des mW vom pW}$ ___ $\Delta\%$	$\Delta\% < 10 \Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Delta\% < 20 \Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Delta\% < 50 \Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Delta\% > 50 \Rightarrow 3 \text{ P}$				_____	
Expiratorisches Atemgeräusch	Nein Ja	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$			_____		
Abdomenpalpation (AP)	1. kein Druckschmerz bei AP, weiches Abdomen 2. geringe Reaktion auf AP, weiches Abdomen 3. deutliche Schmerzzeichen auf AP, abd. Resistenz 4. deutl. Schmerzzeichen auf AP, hartes Abdomen	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$			_____		

Kotbeschaffenheit	1. viel normaler Kot im Käfig, koten während der Untersuchung 2. viel Kot im Käfig, Kot blutig, dünnflüssig oder schleimig 3. wenig Kot im Käfig, unabh. von Beschaffenheit 4. kein Kot im Käfig (seit letzter Untersuchung)	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$			_____		
-------------------	---	--	--	--	-------	--	--

### Auswertung:

Pro Kategorie erreichte Punktzahl	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	_____	_____	_____	_____
-----------------------------------	--	-------	-------	-------	-------

Insgesamt erreichte Punktzahl (Addition der einzelnen Kategorien): \_\_\_\_\_

Opferung des Tieres notwendig bei 12 und mehr Punkten	Nein <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/>
---	--

Unterschrift des Untersuchers: \_\_\_\_\_

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei Herrn Prof. Dr. Olaf Picker für die Möglichkeit bedanken in Seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit erstellen zu dürfen.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Klinik für Anästhesiologie bedanken. Insbesondere geht mein Dank an Frau Prof. Dr. Inge Bauer. Deine Tür stand und steht auch jetzt weiterhin für alle wissenschaftlichen Mitarbeiter und Doktoranden für Fragen, Problemlösungen und weitere Anregungen offen. Ebenso möchte ich mich herzlich bei Frau Claudia Dohle für die Einarbeitung in das „Laborleben“ bedanken. Durch Deine Routine und Erfahrung gelang mir der Einstieg in das experimentelle Arbeiten sehr leicht.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Franziska Barthel und Herrn Dr. Christopher Beck für die wissenschaftliche Betreuung während der Zeit im Labor bedanken. Durch Eure Unterstützung und Hilfsbereitschaft habe ich mich in allen Phasen der Erstellung der Arbeit gut aufgehoben und stets motiviert gefühlt.

Ein großes Dankeschön geht insbesondere an Herrn Dr. Jan Schulz, welcher sich mit größter Geduld und Engagement für die gesamte Erstellung der Arbeit eingesetzt hat. Ohne Deine Unterstützung, Deine präzise Kritik und unermüdliche Bekräftigung wäre diese Arbeit nicht fertig zu stellen gewesen.

Und dann danke ich von ganzem Herzen meiner Mitdotorandin Frau Sabrina Weiss für die witzige, kluge und liebenswerte Begleitung in all den Jahren seit Beginn der Laborzeit und bis heute anhaltend. Es bedarf hier keiner großen Worte um Dir zu sagen – Danke.