

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Beeinflussung der Immunantwort in der  
moderaten Sepsis durch eine moderate  
Hyperkapnie und die Modulation  
des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Sabrina Weiss geb. Schäfer

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der 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

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

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. *Microvas. Res.* **99**, 78-85 (2015).

# Zusammenfassung

**Einleitung:** Eine moderate Hyperkapnie scheint neben vasoaktiven Effekten auch die Immunantwort möglicherweise über die Inhibition des ATP-sensitiven Kaliumkanals ( $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanal) zu beeinflussen. Dies könnte ein weiterer Erklärungsansatz für den protektiven Effekt der Hyperkapnie in der Sepsis sein. Ziel dieser Doktorarbeit war es daher zu untersuchen, welchen Einfluss eine moderate Hyperkapnie auf die systemische wie lokale Immunantwort in der Sepsis hat und ob diese durch die Inhibition des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals verändert werden.

**Methoden:** Dafür wurden 40 männliche Wistar-Ratten in 4 Gruppen randomisiert (n=10). Die Sepsis-Induktion erfolgte durch eine CASP-Operation. Nach 24 Stunden wurden die septischen Tiere nach vorheriger Applikation von Glibenclamid (1mg/kg/KG in 1ml NaCl i.v.) bzw. Vehikel (1ml NaCl 0,9% i.v.) für 120 Minuten entweder normokapnisch ( $p_aCO_2$  35 - 45 mmHg) oder hyperkapnisch ( $p_aCO_2$  65 - 75 mmHg) ventiliert.

Am Ende des Experimentes erfolgte die Blutentnahme zur Messung der Zytokinplasmaspiegel (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) mittels ELISA. Des Weiteren wurde aus dem entnommenen *Colon*- und Lungengewebe eine Western Blot Analyse der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selectin durchgeführt und die MPO-Aktivität bestimmt.

**Ergebnisse:** Weder die moderate Hyperkapnie noch die Gabe von Glibenclamid sowie auch deren Kombination führten zu einer signifikanten Veränderung der Zytokinplasmaspiegel. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen in der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selectin sowie der MPO-Aktivität im *Colon* und in der Lunge festgestellt werden.

**Schlussfolgerung:** Die protektiven Effekte der Hyperkapnie in der Sepsis werden unabhängig von der Immunantwort und des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals vermittelt.

# Summary

**Introduction:** In addition to vasoactive effects, moderate hypercapnia might influence the immune response due to the inhibition of ATP-sensitive potassium channels ( $K^+_{ATP}$  channels). This could explain the protective effect of hypercapnia in sepsis. Thus this doctoral thesis aimed to investigate the influence of moderate hypercapnia on the systemic and local immune response in sepsis and how this is affected by the inhibition of  $K^+_{ATP}$  channels.

**Methods:** 40 male Wistar rats were randomized into 4 groups (n=10). Sepsis was induced by CASP surgery. After 24 hours septic animals were treated with glibenclamide (1mg/kg/KG) in 1ml NaCl i. v. or a vehicle (1ml NaCl 0.9% i.v.) and received either normocapnic ( $p_aCO_2$  35-45 mmHg) or hypercapnic ( $p_aCO_2$  65-75 mmHg) ventilation for 120 minutes. At the end of the intervention the cytokine plasma levels (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10) were determined by ELISA. In addition, the adhesion molecules ICAM-1 and E-selectin in colon and lung tissue were determined by western blot analysis and MPO activity was determined by MPO Assay.

**Results:** Neither moderate hypercapnia, nor glibenclamide, nor the combination of both significantly altered cytokine plasma levels. In addition, there was no significant difference in ICAM-1 and E-Selectin expression and intestinal or pulmonary MPO activity within the treatment groups.

**Conclusion:** The protective effects of hypercapnia in sepsis are mediated independently of the immune response and  $K^+_{ATP}$  channels.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>ANOVA</b>	<i>one way analysis of variance</i>
<b>Aqua dest.</b>	destilliertes Wasser
<b>Az.</b>	Aktenzeichen
<b>BGA</b>	Blutgasanalyse
<b>bzw.</b>	Beziehungsweise
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumin</i>
<b>CASP</b>	<i>colon ascendens stent peritonitis</i>
<b>CLP</b>	<i>cecal ligation and puncture</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>ECL-Reagenz</b>	<i>Enhanced chemiluminescence-Reagenz</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendinitrilotetraessigsäure
<b>ELISA</b>	<i>Enzym-Linked Immunosorbent-Assay</i>
<b>E-Selectin</b>	Endotheliales-Selectin
<b><i>et al.</i></b>	<i>et aliae</i> oder <i>et alia</i>
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	Gauge
<b>Glib</b>	Glibenclamid
<b>h</b>	Stunden
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>HF</b>	Herzfrequenz
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>IL-10</b>	Interleukin-10
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>KG</b>	Körpergewicht

<b>K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-Kanal</b>	ATP-sensitiver Kaliumkanal
<b>l</b>	Liter
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>mA</b>	Milliampere
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mmHg</b>	Millimeter-Quecksilbersäule
<b>mmol</b>	Millimol
<b>MAP</b>	Arterieller Mittedruck
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n</b>	Anzahl
<b>nm</b>	Nanometer
<b>OD</b>	Optische Dichte (in nm)
<b>p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub></b>	Arterieller Partialdruck des Kohlenstoffdioxids
<b>p<sub>a</sub>O<sub>2</sub></b>	Arterieller Partialdruck des Sauerstoffs
<b>pg</b>	Pikogramm
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SDS-Page</b>	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>TMB</b>	Tetramethylbenzidin
<b>TNF-α</b>	Tumornekrosefaktor-α
<b>V</b>	Volt
<b>vs.</b>	<i>Versus</i>
<b>μl</b>	Mikroliter

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>I</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>4</b>
<b>3 Methoden</b> .....	<b>5</b>
3.1 Tierexperimenteller Teil.....	5
3.2 Laborexperimenteller Teil.....	7
3.3 Statistische Auswertung und graphische Darstellung .....	12
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>13</b>
4.1 ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel.....	13
4.2 Relative Expression der Adhäsionsmoleküle in <i>Colon</i> und Lunge .....	16
4.3 MPO-Assay in <i>Colon</i> und Lunge .....	18
4.4 Systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen .....	20
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>21</b>
5.1 Ergebnisdiskussion .....	21
5.2 Klinischer Bezug .....	25
<b>6 Schlussfolgerung</b> .....	<b>28</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>29</b>
<b>8 Anhang</b> .....	<b>35</b>
8.1 Geräte und Materialien des laborexperimentellen Versuchsteils.....	35
8.2 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils ...	36
8.3 Puffer, Lösungen und Geele des laborexperimentellen Versuchsteils .....	38
8.4 Antikörper, Marker und <i>Kits</i> des laborexperimentellen Versuchsteils.....	41

# 1 Einleitung

Die Sepsis ist definiert als lebensbedrohliche Organdysfunktion durch eine gestörte Wirtsantwort auf eine Infektion und geht je nach Schweregrad mit einer Letalität von 23,5 % bis 41,7 % einher<sup>1,2</sup>.

Bei der Entwicklung der Sepsis spielt damit vor allem das Zusammenwirken einer Infektion und die darauffolgende Immunantwort des Körpers eine entscheidende Rolle. Durch die Infektion kommt es zur Aktivierung unterschiedlichster immunologischer Signalwege, was unter anderem die Ausschüttung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zur Folge hat<sup>3,4</sup>. Diese proinflammatorischen Zytokine wie zum Beispiel TNF- $\alpha$  und IL-6 sind dabei für eine adäquate Immunreaktion des Körpers gegen die Infektion unerlässlich. Sie bewirken zum einen eine Mobilisation von neutrophilen Granulozyten und führen zum anderen zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und E-Selectin auf den Endothelzellen. Beide spielen eine Schlüsselrolle bei der Migration der neutrophilen Granulozyten aus dem Blutstrom in das beschädigte Gewebe<sup>5,6</sup>. So konnte gezeigt werden, dass die Blockade von ICAM-1 mit einer erhöhten Mortalität in der Sepsis einhergeht<sup>7</sup>. Zudem sind neutrophile Granulozyten auch durch das lysosomale Enzym Myeloperoxidase (MPO), welches im Rahmen des *oxidative burst* aus den Granula der Abwehrzellen freigesetzt wird, direkt an der Erregerelimination beteiligt<sup>8,9</sup>. Dabei zeigte sich, dass eine erhöhte MPO-Konzentration mit dem Schweregrad der Sepsis korreliert<sup>10</sup>.

Zusammenfassend kommt es durch die proinflammatorische Antwort auf eine Sepsis zu einer Hyperinflammation und einer vermehrten Freisetzung von Mediatoren, die zu einer Gewebhypoxie an den Endorganen mit darauffolgendem Multiorganversagen führen<sup>3,4</sup>.

Um dieser Hyperinflammation entgegenzuwirken, werden weitere Signalwege aktiviert, die unter anderem zu einer Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 führen<sup>4</sup>. Daraus resultiert wiederum eine verstärkte Immunsuppression, die im weiteren Verlauf zu einer inadäquaten Infektabwehr beiträgt<sup>11</sup>. So zeigt eine Studie, dass die Sterblichkeit der Patienten in der Sepsis mit einem Anstieg von IL-10 im Serum korreliert<sup>12</sup>.

Diese Dysbalance in der inflammatorischen Immunantwort stellt eine der großen Herausforderungen in der Therapie der Sepsis dar. Ein möglicher Behandlungsansatz ist diese septische Hyperinflammation abzuschwächen. Aus diesem Grund ist eine zurzeit diskutierte Möglichkeit die Anwendung eines speziellen extrakorporalen Hämoadsorptionsverfahren (Cytosorb®), welches die systemischen Spiegel der Entzündungsmediatoren senkt und zu einer verringerten Letalität der Patienten zu führen scheint <sup>13</sup>. Auch der Einsatz von Corticosteroiden in der Sepsis, die unter anderem über ihre antiinflammatorische Wirkung zu einer Abschwächung der Entzündung führen, wird diskutiert und in den aktuellen Leitlinien bei Sepsis bedingter therapierefraktärer Hypotension empfohlen <sup>1,14</sup>.

Im Rahmen der ARDS-Therapie dieser Patienten wird häufig zu Gunsten einer adäquaten Oxygenierung eine verminderte CO<sub>2</sub>-Elimination in Kauf genommen. Diese sogenannte permissive Hyperkapnie ist darüber hinaus mit einer Vielzahl weiterer Wirkungen unter anderem regionaler Vasodilatation, Verbesserung der Gewebeoxygenierung und Modulation der Inflammation verbunden und könnte somit eine weitere Therapieoption in der Sepsis sein <sup>15-18</sup>. Allerdings sind bislang die genauen immunologischen Folgen der moderaten Hyperkapnie nur unzureichend untersucht. Bisher konnte gezeigt werden, dass es durch eine moderate Hyperkapnie neben einer Verbesserung der intestinalen Mikrozirkulation auch zu einer verminderten systemischen wie lokalen Entzündungsreaktion kommt <sup>17-21</sup>. Demgegenüber stehen allerdings auch Arbeiten, die einen Anstieg der Entzündungsmediatoren durch die Hyperkapnie nachweisen können <sup>22,23</sup>.

Dazu ist bisher auch unklar, über welche Mechanismen eine permissive Hyperkapnie die Inflammation beeinflusst. In diesem Zusammenhang könnte dem ATP-sensitiven Kaliumkanal (K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-Kanal) eine Rolle in der Immunmodulation zukommen und zwar unabhängig von den vasoaktiven Effekten, die während einer Hyperkapnie auch über diesen Kanal vermittelt werden <sup>24,25</sup>.

Durch die Inaktivierung des K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-Kanals kommt es über eine Verschiebung des Membranpotentials zu einer Veränderung des Calcium-Einstroms, was wiederum eine Verringerung der Zytokinausschüttung bewirkt <sup>26,27,29</sup>.

Des Weiteren scheint auch die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten durch die Inhibition des K<sup>+</sup>ATP-Kanals im septischen Tier verändert

worden zu sein, da der Einsatz von Glibenclamid sowohl zu einer verminderten Expression von ICAM-1 als auch zu einer Verringerung des oxidativen Stresses führt<sup>28,30</sup>.

## 2 Fragestellung der Arbeit

Von dieser Situation ausgehend ergeben sich folgende Fragestellungen:

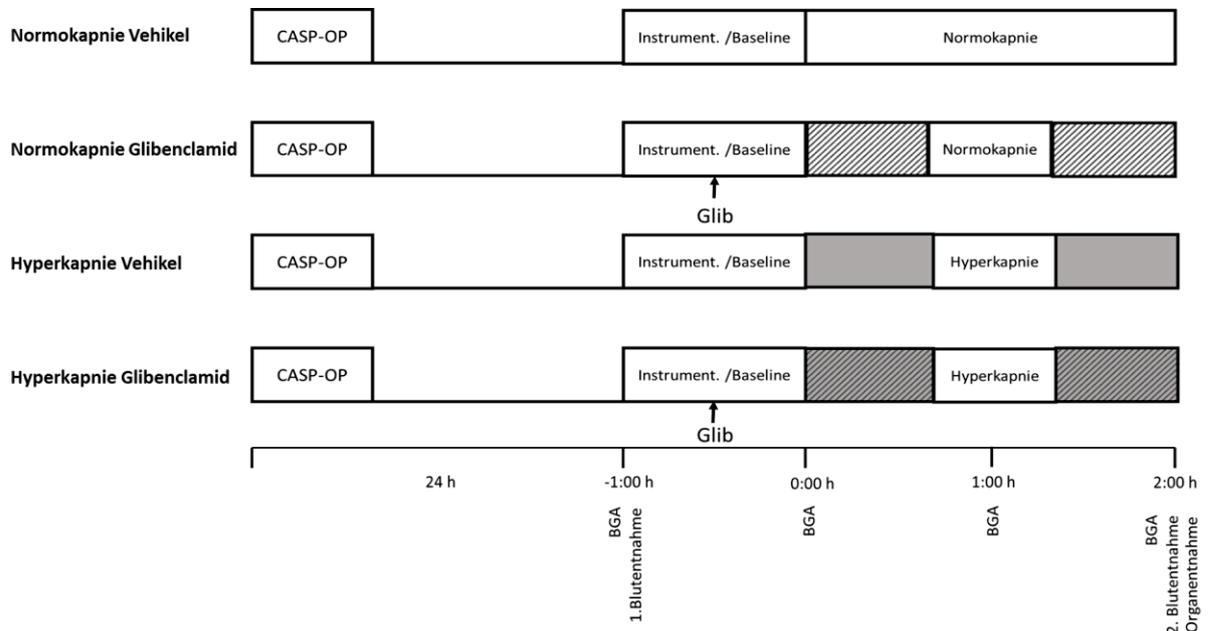
1. Welchen Einfluss hat die moderate Hyperkapnie auf die systemische Immunantwort *in vivo* und kann diese durch die Inhibition des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals verändert werden?
2. Führt die moderate Hyperkapnie zu einer Veränderung der relativen Expression der Adhäsionsmoleküle an *Colon* und Lunge und wird diese durch die Inhibition des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals beeinflusst?
3. Beeinflusst die moderate Hyperkapnie die lokalen Entzündungsreaktionen an *Colon* und Lunge gemessen an der Myeloperoxidase-Aktivität und inwieweit wird dies durch die Inhibition des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals moduliert?

# 3 Methoden

## 3.1 Tierexperimenteller Teil

### 3.1.1 Versuchstiere

Mit der Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (Az.:87-51.04.2010.A361), sowie der erfolgreichen Teilnahme am Kurs zur Versuchstierkunde, erfolgten die Versuche an insgesamt 40 männlichen Wistar-Ratten (Gewicht  $341 \pm 66$  g). Nach der Randomisierung der Tiere in vier Gruppen (n=10), wurde bei den Tieren entweder eine Sepsis induziert oder eine Sham-Operation durch eine Tierärztin durchgeführt. Je nach Gruppenzugehörigkeit erhielten die Tiere im Folgenden entweder eine normokapnische oder hyperkapnische Beatmung mit oder ohne Hemmung des  $K^+_{ATP}$ -Kanals durch Glibenclamid (1 mg/kg/KG) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Versuchsablauf**

24 Stunden nach der CASP-Operation erfolgte die 120-minütige Intervention unter normokapnischer ( $p_aCO_2$  35-45 mmHg) oder hyperkapnischer ( $p_aCO_2$  65-75 mmHg) Beatmung mit bzw. ohne Glibenclamid (1 mg/kg/KG) (Glib).

### 3.1.2 CASP-Chirurgie und Intervention

Die Induktion der Sepsis erfolgte über die CASP-Operation wie sie bei Beck *et al.* beschrieben wurde<sup>31</sup>. Dabei entwickelt sich durch die Implantation eines 16 G Stents in das *Colon ascendens* und dem Austritt von Darminhalt in die Bauchhöhle eine Peritonitis, die daraufhin eine abdominelle Sepsis induziert. 24 Stunden nach der Sepsisinduktion erfolgte eine zweite Intervention zur Messung der Gewebeoxygenierung im Darm. Diese Ergebnisse sind allerdings nicht Bestandteil dieser Doktorarbeit<sup>31</sup>. Im Rahmen der Intervention erhielten die Tiere je nach Gruppenzugehörigkeit Glibenclamid (1 mg/kg/KG) oder NaCl (1 ml) als Vehikel und es erfolgte eine 120-minütige entweder normokapnische ( $p_a\text{CO}_2$  35-45 mmHg) oder hyperkapnische ( $p_a\text{CO}_2$  65-75 mmHg) Ventilation. Währenddessen wurden die systemischen Kreislaufvariablen aufgezeichnet und es fanden regelmäßige Blutgasanalysen statt.

Nach Abschluss der Versuche erfolgte die Euthanasie der Tiere in Narkose durch Exsanguination. Zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel wurde den Tieren zweimal jeweils 1 ml EDTA-Blut entnommen. Die erste Blutentnahme wurde während der Instrumentierungsphase 60 Minuten vor Beginn der hyperkapnischen bzw. normokapnischen Beatmungsperiode durchgeführt. Die zweite Blutentnahme erfolgte zum Ende des Versuchs im Rahmen der Exsanguination. Das Blut wurde zentrifugiert (4 °C, 4000 g, 10 min), das Plasma ab pipettiert und bei -70°C tiefgefroren. Am Ende des Experiments wurden Gewebeproben aus Lunge und *Colon* entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Durch lokale Entzündungsprozesse war die Organentnahme des *Colons* teilweise erschwert, sodass bei einigen Versuchstieren keine ausreichende Probengewinnung möglich war. Aus diesem Grund betrug die Stichprobenzahl im MPO-Assay des *Colons* in den Behandlungsgruppen n=7.

## 3.2 Laborexperimenteller Teil

Alle Angaben zu den verwendeten Geräten und Materialien sowie die Angaben von Chemikalien, Reagenzien, Puffern, Lösungen, Gelen, Antikörpern, Markern und *Kits* befinden sich im Anhang (siehe im Anhang 8.1 – 8.3).

### 3.2.1 ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel wurden *Kits* von der Firma BD Biosciences verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand der mitgelieferten Protokolle. Alle Waschschriffe wurden mit fünfmal 300 µl/ Well Waschpuffer durchgeführt. Während der Inkubationszeiten erfolgte der Verschluss der Mikrotiterplatte mit einer Klebefolie. Eine 96 -Well Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl/Well *capture-antibody* in *coating-buffer* mit einem Verhältnis von 1:250 beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die nicht gebundenen Antikörper konnten am nächsten Tag mit Waschpuffer ausgewaschen werden. Nach der Zugabe von 200 µl/Well *assay-diluent* und einer einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, wurde die Platte erneut gewaschen. Daraufhin konnte die Plasmaprobe mit 100 µl/Well doppelt pipettiert werden. Der Standard wurde nach Herstellerangaben hergestellt und mit 100 µl/Well aufgetragen.

Unter Einhaltung der zweistündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und nach erneutem Waschen, wurde bei der Bestimmung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 100 µl/Well *detection-antibody* in *assay-diluent* (Verdünnung 1:250) hinzugegeben. Nach 60-minütiger Inkubation und wiederholtem Waschen wurde das *enzyme-reagent* in *assay-diluent* (Verdünnung 1:250) mit 100 µl/Well pipettiert und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Untersuchung von IL-10 wurde nach der Zugabe der Plasmaprobe, einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur und dem darauffolgenden Waschen, 100 µl/Well *working-detector* hinzugefügt.

Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss folgte ein siebenmaliger Waschschritt mit 300 µl/Well Waschpuffer, wobei der Waschpuffer im letzten Schritt 30-60 Sekunden im Well belassen wurde. Nach

Zugabe von 100 µl/Well Substratlösung und einer Inkubation von 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur, wurde im letzten Schritt 50 µl/ Well Stopplösung beigemischt. Die Messung der Extinktion erfolgte im Microplate Reader nach 10 Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm.

### 3.2.2 Western Blot Analyse zur Bestimmung der Adhäsionsmoleküle in *Colon* und Lunge

Die quantitative Untersuchung der Adhäsionsmoleküle von ICAM-1 im *Colon* sowie ICAM-1 und E-Selectin in der Lunge erfolgte durch die Western Blot Analyse.

#### *Ganzzellextraktion*

Zur Isolation der Proteine wurden 50-100 mg der tiefgefrorenen Gewebeproben von *Colon* bzw. Lunge mit einem kalten Metall-Potter pulverisiert, mit Lysepuffer (100 µl/10 mg Gewebe) homogenisiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Die entstandene Suspension wurde für fünf Minuten bei 4°C und 16.000 g zentrifugiert, der klare Überstand ab pipettiert und bei -80°C tiefgefroren.

#### *Lowry - Messung*

Die Bestimmung Proteinkonzentration erfolgte anhand der *Lowry*-Messung. Im ersten Schritt wurden 2 µl der Gewebeprobe nach der Ganzzellextraktion mit 198 µl destilliertem Wasser verdünnt. 100 µl dieser verdünnten Probe wurden zunächst für 10 Minuten mit 500 µl *Lowry*-Lösung-1 und anschließend für 30 Minuten mit *Lowry*-Lösung-2 bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur photometrischen Messung des Farbumschlages wurde jeweils 200 µl des Probengemisches pro Well als doppelter Ansatz auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Messung erfolgte bei 750 nm Wellenlänge. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Software unter Bezugnahme einer parallel gemessenen Standardreihe (siehe Tabelle 1) verwendet. Im Anschluss an die Messung erfolgte die Einstellung der einzelnen Proben mit dem Lysepuffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration.

<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 1: Pipettierschema der Standardreihe für die Lowry – Messung**

#### *SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)*

Zur Auftrennung der Proteine wurde die SDS-PAGE durchgeführt, dazu wurden zuerst 50 µl der aufgetauten Probe nach der Ganzzellextraktion mit 50 µl *loading buffer* für fünf Minuten bei 95°C in einem Heizblock erwärmt und kurz mittels Tischzentrifuge zentrifugiert.

Zwischen zwei Glasplatten wurde ein 7,5% iges Trenngel angefertigt und durch ein Sammelgel überschichtet. Durch das Einfügen eines Kammes in das angefertigte Sammelgel entstanden je nach Größe des Kammes 10 oder 15 Probenaschen, die mit einem Größenmarker bzw. einer Probe versehen wurden. Die Ermittlung der benötigten Probenmenge fand zuvor durch die *Lowry*-Messung statt.

Nach dem Zusammenbau und Befüllen der Elektrophoresekammer mit *running buffer* wurde eine Spannung von 100 V für 90 Minuten angelegt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese lagen die Proteine ihrer Größe entsprechend in unterschiedlichen Höhen auf dem Trenngel vor. Das gesamte Gel wurde aus den Glasplatten abgelöst und das Sammelgel verworfen.

### *Elektrotransfer*

Für den Elektrotransfer wurden pro Gel sechs Filterpapiere und zwei Fiberpads sowie eine Nitrozellulosemembran benötigt. Filterpapiere und Fiberpads wurden in dem Transferpuffer eingeweicht und die Nitrozellulosemembran fünf Minuten in Methanol eingelegt.

Es erfolgte die Zusammensetzung der Materialien zu einem sogenannten Gel-Sandwich. Das Gel-Sandwich bestand aus drei Filterpapieren auf einer Gel-Kassette, gefolgt von einem Fiberpad und dem Gel. Auf das Gel wurden daraufhin wieder eine Nitrozellulosemembran, ein Fiberpad und drei Filterpapiere gesetzt. Die Gel-Kassette konnte luftblasenfrei verschlossen und in eine mit kaltem Transferpuffer befüllte Transferkammer eingesetzt werden, in der sich zusätzlich ein Kühlelement sowie ein Rührfisch befand. Der Elektrotransfer erfolgte für 60 Minuten bei 170 mA, dabei fand die Übertragung der SDS-Protein-Komplexe des Sammelgels auf die Nitrozellulosemembran statt.

Zur Visualisierung der Proteine erfolgte im Anschluss an den Elektrotransfer das Einfärben des Gels mit Coomassie-Blue. Zum Färben wurde das Gel 30 Minuten in Coomassie-Staining-Lösung auf einem Schüttler eingelegt. Im Anschluss daran mit kaltem Wasser abgespült und über Nacht in Wasser eingelegt, so dass die Proteinbanden auf dem Gel gut zu erkennen waren. Das Sichtbarwerden der Proteinbanden auf dem Gel gilt als Zeichen für einen erfolgreichen Elektrotransfer.

### *Immunoblot*

Nach dem Elektrotransfer wurden die Membranen für 2 Stunden in Blotto 5 % bei Raumtemperatur gelegt. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation der Membranen über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln mit einem verdünnten ICAM-1 bzw. E-Selectin spezifischen Primärantikörper. Die verwendete Verdünnung mit Blotto 1 % richtete sich nach den Herstellerangaben des jeweiligen Antikörpers. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Membranen drei Mal für jeweils 10 Minuten mit kaltem Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte eine zweistündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit 1:10000) bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligem Waschen

der Membran mit dem kalten Waschpuffer für jeweils 10 Minuten, konnte die Membran detektiert werden.

Im Anschluss an die erste Detektion wurden die Membran mit einem als *housekeeper* dienenden Primärantikörper ( $\beta$ -Aktin) und daraufhin mit *anti-rabbit* als Sekundärantikörper behandelt und erneut detektiert. Hierzu wurden dieselben Schritte wie oben beschrieben durchgeführt.

Vor der Detektion wurden die gewaschenen Membranen eine Minute in einem ECL-Reagenz geschwenkt. Die dabei entstandene Chemolumineszenz konnte mit einer digitalen Kamera nach Herstellerangaben detektiert werden. Die Auswertung fand mittels GelScan 6.0 statt. Dabei wurden die zu untersuchenden Proteinbanden auf die  $\beta$ -Aktinbanden normiert und untereinander verglichen.

### 3.2.3 MPO-Assay in *Colon* und Lunge

Zur Bestimmung der MPO-Aktivität in *Colon* und Lunge erfolgte die Messung der  $H_2O_2$ -abhängigen Oxidation von TMB. Hierzu wurden 50 mg von *Colon*- bzw. Lungengewebe in 500  $\mu$ l Phosphatpuffer homogenisiert und für 30 Sekunden in ein Ultraschallbad gegeben.

Die Gewebeproben konnten anschließend in drei Zyklen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und wieder aufgetaut werden, bevor sie erneut im Ultraschallbad behandelt wurden. Nach einer zweistündigen Inkubation im Heizblock bei 60°C erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 4000 g für 12 Minuten und 4°C. Nachfolgend wurden 20  $\mu$ l des Überstandes zusammen mit 10  $\mu$ l TMB und 70  $\mu$ l 4,2 mmol/l  $H_2O_2$ -Lösung auf eine Mikrotiterplatte pipettiert.

Im Anschluss an den Verschluss der Mikrotiterplatte mittels Klebefolie, folgte eine 20-minütige Inkubationszeit. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 655 nm gemessen.

### 3.3 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Zur statistischen Auswertung und graphische Darstellung wurde die Software GraphPad Prism® Version 6.0 verwendet. Die Normalverteilung der Daten wurde anhand des Shapiro-Wilk-Test überprüft.

Die Auswertung der nicht-parametrischen Daten der ELISA-Messung erfolgte durch den Kruskal-Wallis-Test und anschließend mit dem Dunn's Post-Hoc-Test. Zur Analyse der gepaarten Daten wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ausgeführt. Die Daten wurden als Median und der 25./75. Perzentile angegeben. Das Signifikanzniveau betrug  $p < 0,05$ .

Die parametrischen Daten wurden durch eine einfaktorielle bzw. zweifaktorielle ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls-Test Post-Hoc-Test ausgewertet. Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  gewählt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel

Der ELISA zur Bestimmung der Zytokinplasmaspiegel erfolgte vor („prä“) und nach („post“) der zweistündigen Intervention mit und ohne Inhibition des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals durch Glibenclamid unter normo- oder hyperkapnischer Beatmung.

#### 4.1.1 Tumornekrosefaktor-alpha

Die Messung des TNF- $\alpha$  im Plasma zeigte vor der Intervention („prä“) keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Innerhalb der Gruppe „Hyperkapnie-Vehikel“ stieg die TNF- $\alpha$ -Konzentration während der 120-minütigen Intervention signifikant an (Hyperkapnie Vehikel prä: 0 (0-0) vs. post: 5 (1-23) pg/ml;  $p < 0,05$ ). Nach der Behandlung („post“) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen gemessen (siehe Abbildung 2A).

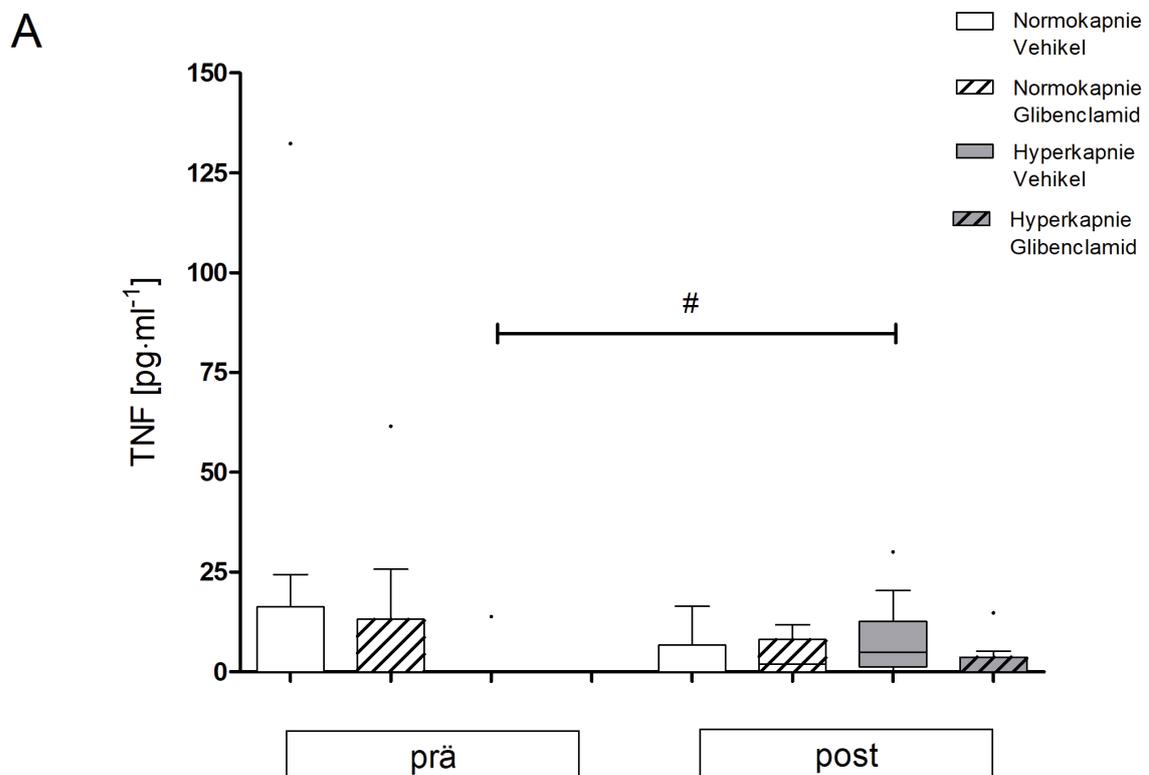
#### 4.1.2 Interleukin-6

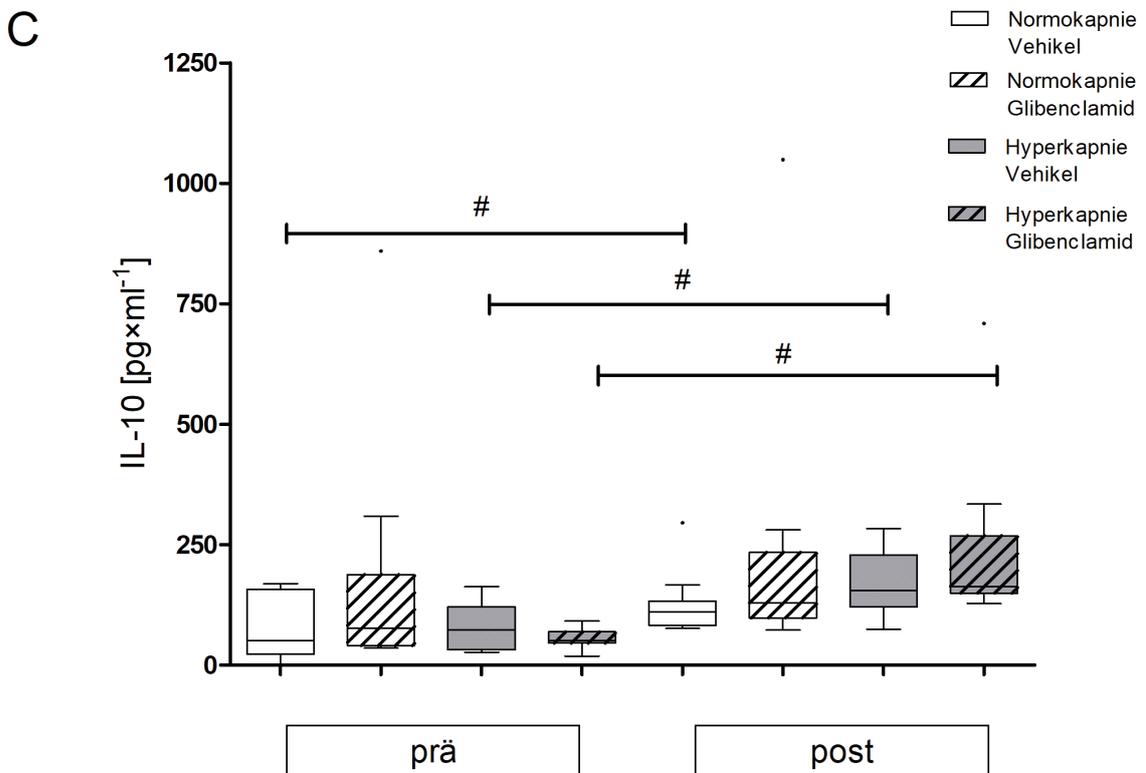
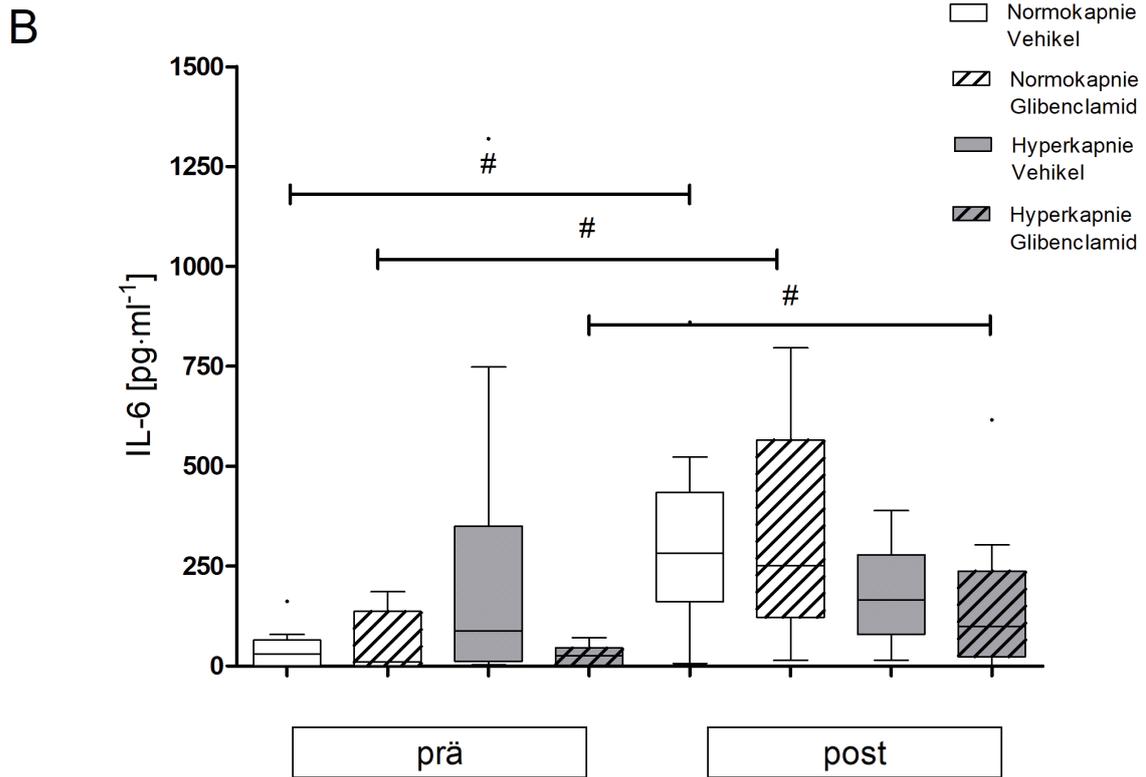
Die IL-6-Plasmaspiegel zeigten vor der Intervention („prä“) keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Während der Intervention kam es in den Gruppen „Normokapnie Vehikel“, „Normokapnie Glibenclamid“ und „Hyperkapnie Glibenclamid“ zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration im Plasma (Normokapnie Vehikel prä: 30 (0-64) vs. post: 282 (161-434), Normokapnie Glibenclamid prä: 11 (0-136) vs. post: 251 (121-566), Hyperkapnie Glibenclamid prä: 27 (2-45) vs. post: 98 (24-237) pg/ml;  $p < 0,05$ ). Nach der Intervention („post“) führte weder die moderate Hyperkapnie, die Gabe von Glibenclamid noch deren Kombination zu einer signifikanten Veränderung der Zytokinplasmaspiegel zwischen den Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 2B).

#### 4.1.3 Interleukin-10

Die erste Messung der IL-10-Plasmaspiegel vor der Intervention („prä“) zeigte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Während der

zweistündigen normokapnischen bzw. hyperkapnischen Ventilation und der Gabe von Glibenclamid bzw. einem Vehikel konnte in den Gruppen „Normokapnie Vehikel“, „Normokapnie Glibenclamid“, „Hyperkapnie Vehikel“ und „Hyperkapnie Glibenclamid“ ein signifikanter Anstieg gemessen werden (Normokapnie Vehikel prä: 51 (23-157) vs. post: 110 (83-133); Normokapnie Glibenclamid prä: 77 (41-188) vs. post: 129 (98-234); Hyperkapnie Glibenclamid prä: 51 (46-69) vs. post: 163 (150-269) pg/ml;  $p < 0,05$ ). Nach der Intervention („post“) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 2C).



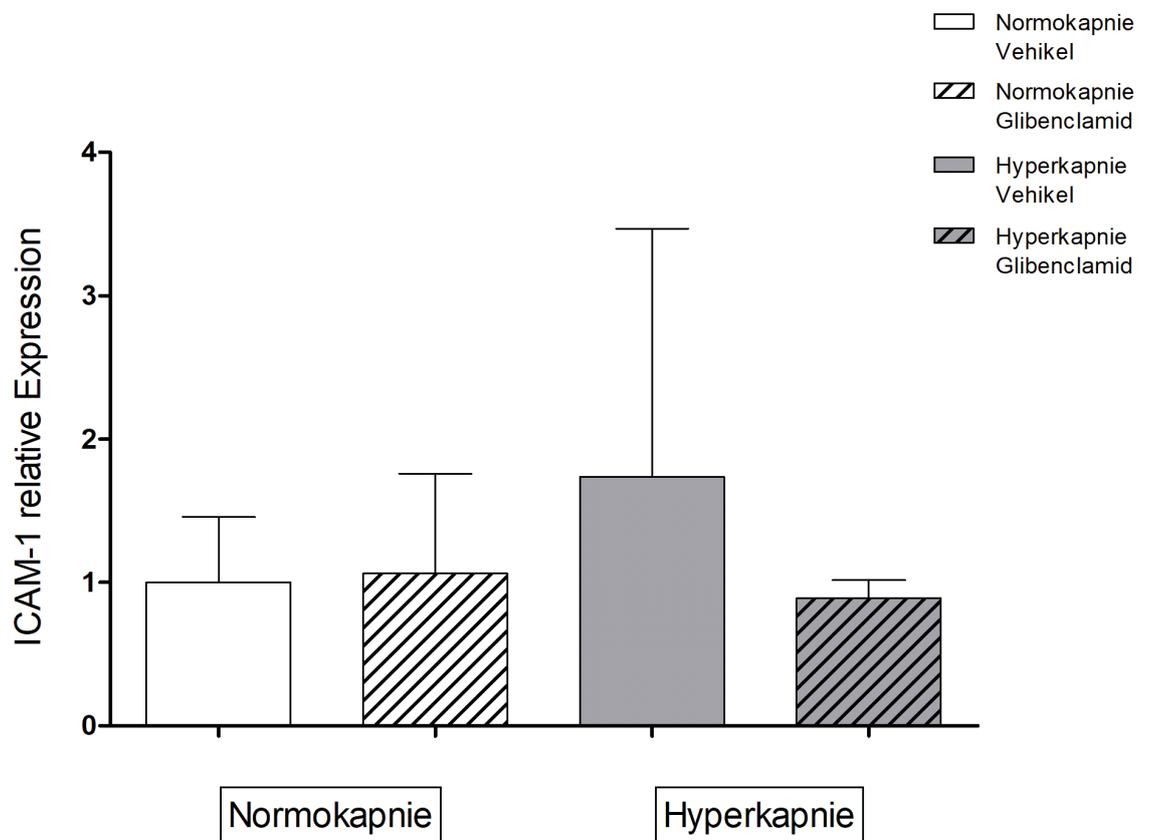


**Abbildung 2: Zytokinplasmaspiegel**

(A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-6, (C) IL-10 Plasmaspiegel bei normokapnisch bzw. hyperkapnisch beatmeten Tieren mit oder ohne Glibenclamid Behandlung. Median mit der 25./75. Perzentile und der 10./90. Perzentile; (Kruskal-Wallis + Dunn`s Post-Hoc-Test); #  $p < 0,05$  prä vs. post (Wilcoxon);  $n=10$

## 4.2 Relative Expression der Adhäsionsmoleküle in *Colon* und Lunge

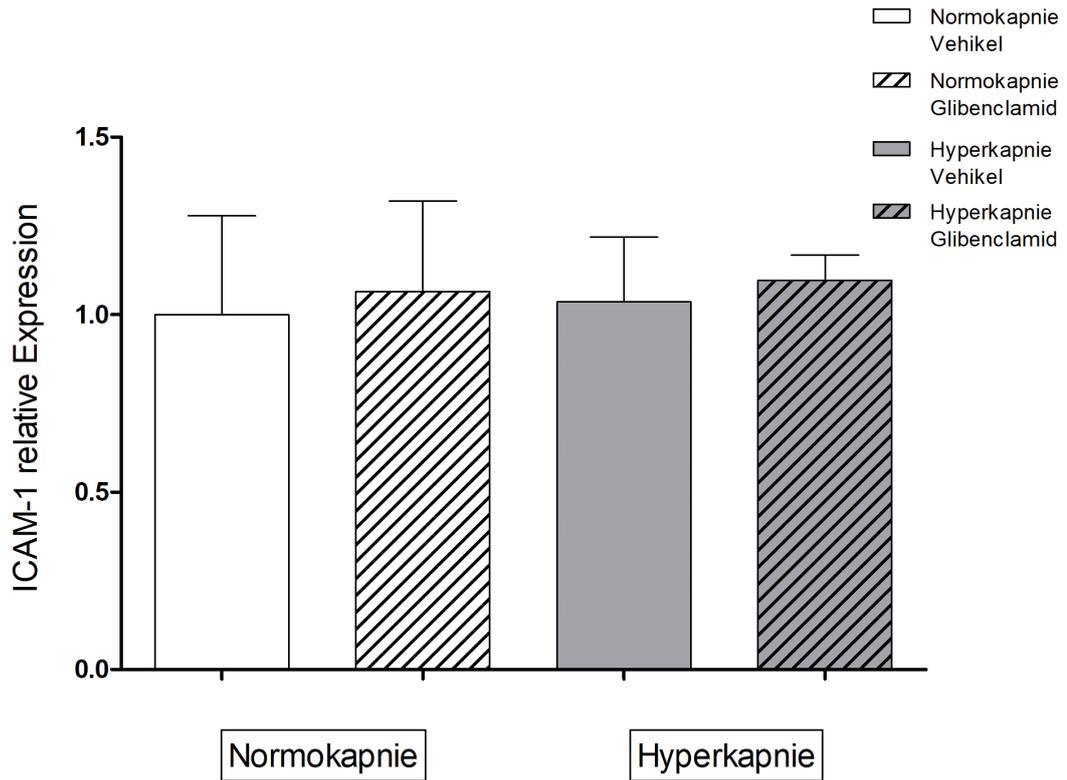
Die Messungen der relativen Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 im *Colon* sowie ICAM-1 und E-Selectin in der Lunge zeigten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der unterschiedlichen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 3 und 4).



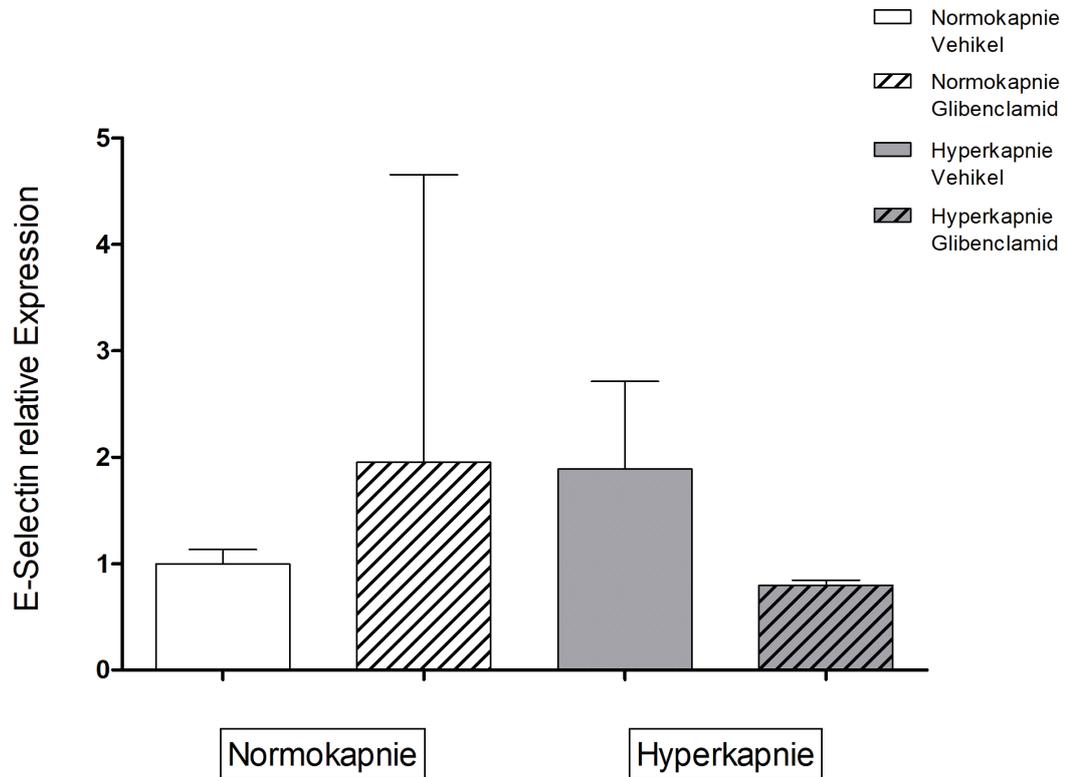
**Abbildung 3: Relative Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 im *Colon***

ICAM-1 als relative Expression im *Colon* bei normo- oder hyperkapnisch beatmeten Tieren mit und ohne die Behandlung mit Glibenclamid. MW  $\pm$  SD; (Einfaktorielle ANOVA vs. Newman-Keuls Post Hoc-Test); n=10

A



B

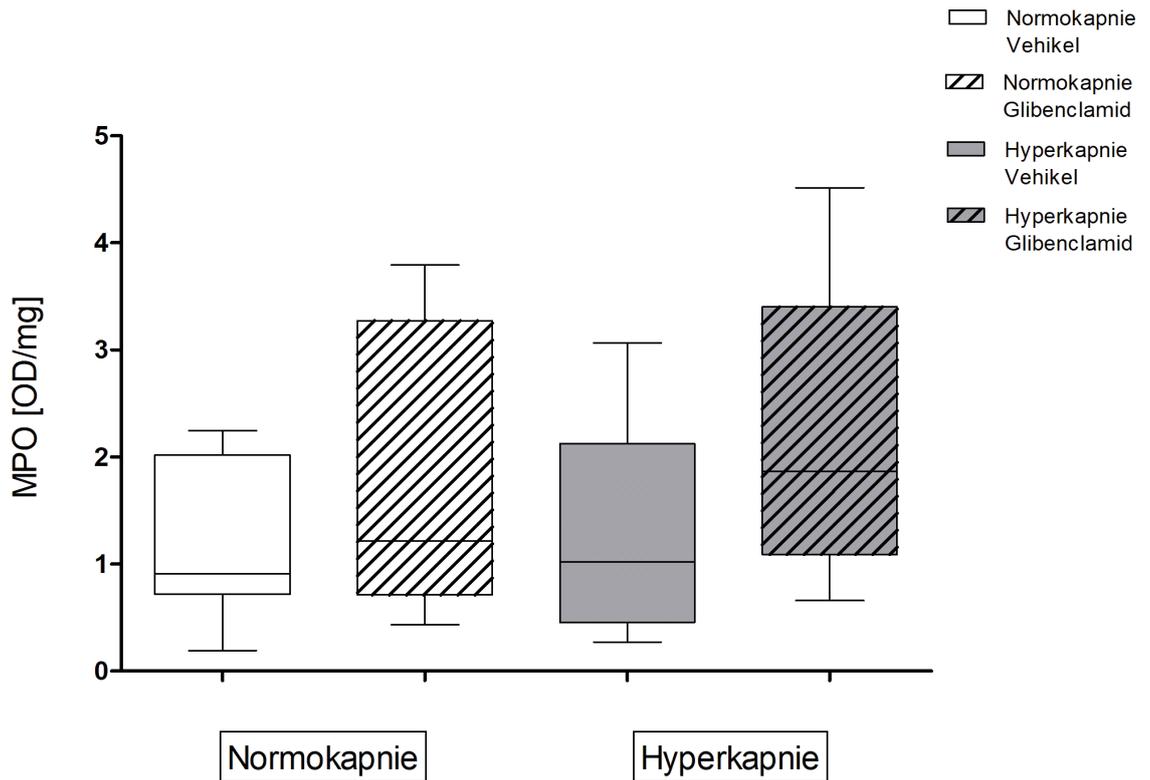


**Abbildung 4: Relative Expression der Adhäsionsmoleküle in der Lunge**

(A) ICAM-1, (B) E-Selectin als relative Expression in der Lunge bei normo- oder hyperkapnisch beatmeten Tieren mit und ohne die Behandlung mit Glibenclamid. MW  $\pm$  SD; (Einfaktorielle ANOVA vs. Newman-Keuls Post-Hoc-Test); n=10

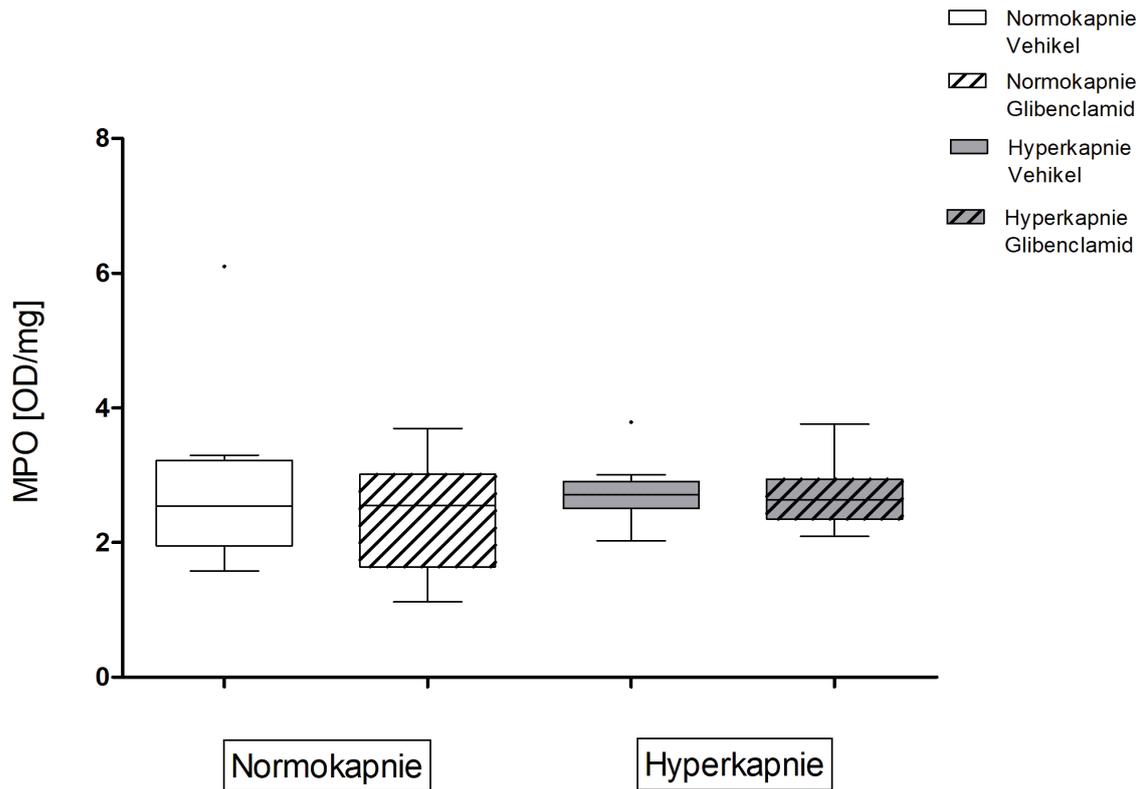
### 4.3 MPO-Assay in *Colon* und Lunge

Bei der Messung der MPO-Aktivität im *Colon* und in der Lunge zeigt sich kein Unterschied zwischen den normokapnisch und hyperkapnisch beatmeten Tieren mit und ohne Glibenclamid-Behandlung (siehe Abbildung 5 und 6).



**Abbildung 5: MPO-Aktivität im *Colon***

MPO-Aktivität im *Colon* bei normokapnisch bzw. hyperkapnisch beatmeten Tieren mit oder ohne Behandlung mit Glibenclamid. Median mit der 25./75. Perzentile und der 10./90. Perzentile; (Kruskal-Wallis + Dunn`s Post-Hoc-Test); n=7



**Abbildung 6: MPO-Aktivität in der Lunge**

MPO-Aktivität in der Lunge bei normokapnisch bzw. hyperkapnisch beatmeten Tieren mit oder ohne Behandlung mit Glibenclamid. Median mit der 25./75. Perzentile und der 10./90. Perzentile; (Kruskal-Wallis + Dunn`s Post-Hoc-Test); n=10

## 4.4 Systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen

Die Tiere entwickelten während der Behandlung die vorgegebenen Zielwerte von entweder einem  $p_a\text{CO}_2$  von 35-45 mmHg (Normokapnie) oder 65-75 mmHg (Hyperkapnie). Unter der induzierten Hyperkapnie zeigte sich ein signifikanter Abfall des pH-Wertes in der arteriellen Blutgasanalyse. Weder der arterielle Sauerstoffpartialdruck noch die Kreislaufparameter zeigten klinisch relevante Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 2).

		Normokapnie		Hyperkapnie	
		Vehikel	Glibenclamid	Vehikel	Glibenclamid
$p_a\text{CO}_2$ [mmHg]	Baseline	40 ± 7	37 ± 3	40 ± 5	41 ± 4
	60 min	42 ± 3	40 ± 2	70 ± 7*	70 ± 8*
	120 min	43 ± 6	42 ± 6	72 ± 10*	75 ± 8*
pH	Baseline	7,36 ± 0,02	7,36 ± 0,05	7,39 ± 0,04	7,38 ± 0,04
	60 min	7,33 ± 0,02	7,36 ± 0,03	7,18 ± 0,05*	7,19 ± 0,03*
	120 min	7,33 ± 0,02	7,36 ± 0,06*	7,16 ± 0,06*	7,17 ± 0,04*
$p_a\text{O}_2$ [mmHg]	Baseline	105 ± 25	113 ± 23	109 ± 24	116 ± 16
	60 min	93 ± 26	102 ± 22	119 ± 23	122 ± 17
	120 min	80 ± 21	85 ± 17*	94 ± 22	97 ± 21
HF [min <sup>-1</sup> ]	Baseline	432 ± 67	419 ± 61	428 ± 26	416 ± 41
	60 min	412 ± 63	411 ± 57	392 ± 34	405 ± 43
	120 min	417 ± 73	437 ± 58	394 ± 39	416 ± 37
MAP [mmHg]	Baseline	107 ± 21	94 ± 10	112 ± 14	115 ± 19
	60 min	97 ± 26	92 ± 10	106 ± 20	115 ± 19
	120 min	93 ± 22	92 ± 11	109 ± 23	120 ± 16

**Tabelle 2: Systemische Kreislaufvariablen und Blutgasanalysen**

Effekt von Hyperkapnie und Glibenclamid auf die arterielle Blutgasanalyse und Kreislaufparameter wie Herzfrequenz und mittleren arteriellen Blutdruck ab Baseline für 120 Minuten. Die Daten sind als absolute Werte dargestellt, MW ± SD, \* =  $p < 0,05$  gegenüber Normokapnie (zweifaktorielle ANOVA, Tukey Post-hoc-Test); n = 10

# 5 Diskussion

## 5.1 Ergebnisdiskussion

Im Hinblick auf die eingangs gestellten Fragen führen die Ergebnisse zu folgenden Schlussfolgerungen:

1. Die systemischen Zytokinplasmaspiegel in der moderaten Sepsis zeigten keine signifikanten Veränderungen durch die moderate Hyperkapnie. Auch die Inhibition des  $K^+_{ATP}$ -Kanals hat dies nicht beeinflusst. Demzufolge scheint weder die moderate Hyperkapnie noch die Inhibition des  $K^+_{ATP}$ -Kanals einen Einfluss auf die systemische Immunantwort in der moderaten Sepsis zu haben, und auch die protektiven Effekte der Hyperkapnie scheinen unabhängig von der Immunantwort.
2. Die relative Expression der Adhäsionsmoleküle in *Colon* und Lunge wurde weder durch die moderate Hyperkapnie noch durch die Inhibition des  $K^+_{ATP}$ -Kanals verändert. Damit scheint auch die Migration der neutrophilen Granulozyten nicht durch eine Hyperkapnie beeinflusst zu werden.
3. Die Messung der Myeloperoxidase-Aktivität in *Colon* und Lunge zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Insofern scheint weder die moderate Hyperkapnie noch Modulation des  $K^+_{ATP}$ -Kanals die Aktivität der neutrophilen Granulozyten an *Colon* und Lunge in der moderaten Sepsis zu verändern.
4. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die moderate Hyperkapnie wahrscheinlich keine immunologische Wirkungen auf systemische sowie organbezogenen Prozesse in *Colon* und Lunge hat. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des  $K^+_{ATP}$ -Kanals keinen Einfluss auf die Entzündungsprozesse hat und auch die

protektiven Effekte der Hyperkapnie unabhängig von der Immunantwort und des  $K^+_{ATP}$ -Kanals vermittelt werden.

Zur Induktion einer Sepsis ist die durchgeführte CASP-Operation nach Lustig *et al.* genutzt worden, da sie das klinische Bild einer Anastomoseninsuffizienz, die eine typische Komplikation viszeralchirurgischer Eingriffe darstellt, nachbildet <sup>32</sup>. Bei dieser Operation führt die Implantation eines 16 G Stents in das *Colon ascendens* zu einem kontinuierlichen Austritt von *Faeces* in die freie Bauchhöhle. Im Folgenden entwickelt sich auf dem Boden einer bakteriellen Peritonitis eine abdominale Sepsis <sup>32,33</sup>.

In einer Untersuchung zum CASP-Modell mit identischen Rahmenbedingungen von Stübs *et al.* wurde gezeigt, dass nach Implantation eines 16 G Stents etwa 35% der Tiere innerhalb von 48 Stunden verstarben <sup>18</sup>. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Tiere auch in der hier vorliegenden Arbeit eine abdominale Sepsis entwickelt haben. Da allerdings bei den Tieren keine Kreislaufinstabilität beobachtet wurde und auch der Anstieg der Zytokinplasmaspiegel in der eigenen Untersuchung eher gering ausgeprägt ist, kann bei dem hier vorliegenden Versuchsmodell von einer moderaten Sepsis ausgegangen werden.

Im Gegensatz zu anderen Modellen, wie zum Beispiel einer monobakteriellen Infektion durch eine einmalige LPS-Injektion, kommt es bei der CASP-Operation durch die Stentimplantation zu einer kontinuierlichen polybakteriellen Besiedlung der freien Bauchhöhle. So zeigen die Zytokinplasmaspiegel bei dieser Methode im Vergleich zur LPS-Injektion einen ähnlichen Verlauf wie in der humanen Sepsis. Zudem ist der Anstieg der Zytokinplasmaspiegel verzögerter und fällt niedriger aus, als nach einer einmaligen Endotoxin Injektion <sup>34</sup>.

Auch andere Sepsis-Modelle, wie die CLP-Ligatur scheinen zur Untersuchung der systemischen und pulmonalen Auswirkungen nicht in gleichem Maße geeignet. Bei der CLP-Ligatur führt das Durchstechen des *Zökums* nach vorherigem abbinden des selbigem wie beim CASP-Modell zu einem Austritt von Bakterien aus dem Darm und damit zu einer bakteriellen Peritonitis. Durch die häufige Ausbildung von abdominalen Abszessen kommt es allerdings vermehrt zu lokalen Reaktionen und die systemische Inflammation fällt deutlich milder aus <sup>35</sup>. Zusammenfassend scheint

somit insbesondere das hier verwandte CASP-Modell für die Abbildung einer Situation, vergleichbar einer chirurgischen Anastomoseninsuffizienz, geeignet.

In dieser Arbeit zeigte die Induktion einer zweistündigen moderaten Hyperkapnie im Vergleich zu den normokapnisch ventilierten Vergleichsgruppen keine Veränderung bei der Messung der systemischen Zytokinplasmaspiegel.

Diese Ergebnisse stützen die Aussage einer vorangegangenen Studie von Stübs *et al.*, in der auch unter Verwendung eines kleineren Stents bei ansonsten vergleichbaren Studiendesigns keine Unterschiede der Zytokinkonzentration im Plasma durch die Hyperkapnie gemessen werden konnte <sup>18</sup>.

Im Gegensatz dazu zeigten andere Arbeiten einen Effekt einer Hyperkapnie auf die Zytokinkonzentration im Plasma. Dabei handelt es sich jedoch entweder um *in vitro* Studien mit humanen Plasmazellen und alveolarem Epithel oder *in vivo* Studien mit der Bestimmung der Zytokinpiegel in unterschiedlichen Organsystemen und nicht im Blut <sup>22,23,36</sup>. Die hier vorliegende Arbeit wurde als eine *in vivo* Untersuchung durchgeführt, bei der die Zytokinbestimmung aus dem Plasma erfolgte, wie sie auch als Diagnose- und Verlaufsparemeter in der Klinik angewendet wird <sup>37</sup>. Ein weiterer Unterschied ist der gewählte Zeitpunkt der Hyperkapnie. In der Arbeit von Laffey *et al.* erfolgte die Induktion der Hyperkapnie bereits kurz nach der lokalen Applikation des LPS <sup>20</sup>. Im Vergleich dazu, wurde die hyperkapnische Ventilation in dieser Arbeit erst 24 Stunden nach der Sepsisinduktion durchgeführt, um ein möglichst realistisches Bild der postoperativen abdominalen Sepsis abzubilden. Auch im klinischen Alltag wird eine Anastomoseninsuffizienz häufig erst im Verlauf entdeckt und macht durch eine zunehmend septische Entwicklung der Erkrankung einen Intensivaufenthalt nötig, der eine invasive Beatmung mit sich bringen kann.

Weiterhin zeigten sich auch bei der Untersuchung der lokalen Folgen an *Colon* und Lunge durch die Hyperkapnie keine Unterschiede bezüglich der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selectin und der MPO-Aktivität. Demgegenüber steht eine kombinierte *ex vivo* und *in vivo* Studie. *Ex Vivo* kam es durch die alleinige Exposition von CO<sub>2</sub> auf humanen pulmonalen Endothelzellen zu einer vermehrten Expression von ICAM-1 und E-Selectin. Gleiches zeigte sich dort auch nach der Inkubation der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  sowie LPS und folgender CO<sub>2</sub>-Gabe. In

dem *in vivo* Teil der Studie wurden Kaninchen intratracheal mit LPS behandelt und daraufhin 4 Stunden hyperkapnisch ventilert. Im Anschluss konnte eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selectin beobachtet werden <sup>38</sup>.

Im Vergleich zu dieser Arbeit wurden die Tiere allerdings über einen Zeitraum von vier Stunden hyperkapnisch beatmet. Des Weiteren unterscheiden sich die Arbeiten deutlich hinsichtlich des Studiendesigns. Durch die lokale Applikation von Endotoxinen kommt es zu einer schnelleren und fulminanteren Form der pulmonalen Schäden, als durch eine Leckage im intestinalen System und die sich darauf entwickelnden Endorganschäden <sup>34</sup>. Demzufolge könnte zum einem die längere Hyperkapnie Zeit als auch die andere Form der Sepsisinduktion ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Auch die Ergebnisse der MPO-Aktivität aus dieser Arbeit lassen sich nur bedingt mit anderen Arbeiten vergleichen. So wählten auch Nichol *et al.* ein anderes Studiendesign, mit einer deutlich kürzeren Hyperkapnie-Zeit und einer intratracheale Endotoxingabe zur Beurteilung der MPO-Aktivität durch die Hyperkapnie <sup>39</sup>. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich hingegen mit den Ergebnissen einer anderen Studie, in der die moderate Hyperkapnie ebenfalls nicht zu einer Veränderung der MPO-Aktivität geführt hat <sup>40</sup>.

Zusätzlich wurde in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Inhibition des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals durch Glibenclamid keine Auswirkungen auf die Zytokinplasmaspiegel hat und auch keine immunologischen Veränderungen an *Colon* und Lunge hervorgerufen werden.

Um den Einfluss des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals auf die systemische und lokale Immunantwort in der moderaten Sepsis unter normo- und hyperkapnischen Bedingungen zu untersuchen wurde Glibenclamid mit einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht kurz vor der Intervention verabreicht. Die Wirksamkeit des Medikaments mit dieser Dosierung konnte bereits in einer anderen Studie gezeigt werden <sup>29</sup>. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt dieser geringen Dosierung zu untersuchen, umso eine bessere Übertragbarkeit auf den klinischen Alltag gewährleisten zu können.

Im Gegensatz dazu führten Pompermayer *et al.* eine *in vivo* Studie an Ratten durch, in der die Tiere nach einer intestinalen Ischämie und anschließender

Reperfusion eine subkutane Applikation von Glibenclamid mit einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht erhielten. Dabei kam es durch die Gabe von Glibenclamid zu einem signifikanten Anstieg der pro- und antiinflammatorischen Zytokine im Plasma und in der Lunge <sup>26</sup>. Neben dem unterschiedlichen operativen Studiendesign könnte die deutlich höhere Dosierung des Medikaments ein Grund für die abweichenden Ergebnisse sein. Im Gegensatz zu dieser Arbeit und der von Pompermayer *et al.* und wurde in einer *ex vivo* Studie an humanen Zellen eine LPS-induzierte Endotoxämie herbeigeführt und im nächsten Schritt mit Glibenclamid behandelt, was unter anderem zu einer verminderten Bildung von TNF- $\alpha$  führte <sup>27</sup>.

Weiterhin wurde in einer Untersuchung von Spiller *et al.* sowohl in der Lunge als auch im *Colon* eine Verminderung von ICAM-1 nach einer Behandlung mit Glibenclamid nachgewiesen <sup>28</sup>. Auch hier sind auf Grund der unterschiedlichen Versuchsabläufe die Arbeiten allerdings nur bedingt vergleichbar. So wurde bei Spiller *et al.* Glibenclamid in einer Dosierung von 40  $\mu$ mol/kg Körpergewicht subkutan eine Stunde vor der Sepsisinduktion durch eine CLP-Operation verabreicht. Sechs Stunden postoperativ erfolgte die Messung der Expression von ICAM-1, so dass der längere Wirkzeitraum des Glibenclamids und der frühere Zeitpunkt in der Sepsisentwicklung ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnte <sup>28</sup>.

## 5.2 Klinischer Bezug

Ein wichtiger Bestandteil der Sepsistherapie ist die lungenprotektive Beatmung. Das Ziel dieser Beatmungsform ist die Verringerung von Ventilator-induzierten Lungenschäden bei gleichzeitiger Reduktion von weiteren Multiorganschäden. Bei schwerstkranken Patienten wird dabei zur Verhinderung einer Aggravierung des Lungenschadens der Beatmungsdruck limitiert, was zu einer Reduktion der Tidalvolumina führt. Ein Nebeneffekt der so eingestellten niedrigen Tidalvolumina ist ein CO<sub>2</sub>-Anstieg mit einem konsekutiven pH-Wert Abfall im Blut, der als permissive Hyperkapnie bezeichnet wird. Es konnte gezeigt werden, dass das Überleben von ARDS Patienten durch die Anwendung geringer Atemzugvolumina mit niedrigem inspiratorischem Plateaudruck, deutlich verbessert wird <sup>15,16</sup>.

Obwohl diese lungenprotektive Beatmung bereits standardmäßig in der Sepsistherapie angewendet wird, sind die Folgen der sich entwickelnden permissiven Hyperkapnie auf die Mikrozirkulation und die Immunfunktion der Patienten noch weitestgehend unklar.

Auf der einen Seite führt die moderate Hyperkapnie zu einer verbesserten intestinalen Mikrozirkulation und Oxygenierung der Darmmukosa. Dies ist mit einem verbessertem Patienten-*Outcome* in der Sepsis assoziiert <sup>17,18,40</sup>. Des Weiteren konnte auch eine Verringerung von Wundinfektionen nach Darmoperationen beobachtet werden <sup>41</sup>. Auf der anderen Seite stehen mögliche Hyperkapnie induzierte Nebenwirkungen, wie eine verstärkte Immunsuppression im Rahmen einer bakteriellen Pneumonie durch die Hyperkapnie <sup>42</sup>. Eine Studie von Tiruvoipati, R. *et al.* zeigte sogar eine erhöhte Mortalität der hyperkapnisch ventilierten Patienten innerhalb der ersten 24 Stunden ihres intensivmedizinischen Aufenthaltes <sup>43</sup>.

Diese tierexperimentelle Arbeit konnte zeigen, dass die kurze moderate Hyperkapnie in der Sepsis weder systemische, pulmonale oder intestinale Folgen auf die adaptive Immunantwort zu haben scheint. Dies lässt vermuten, dass durch eine kurzzeitige permissive Hyperkapnie keine negativen Folgen auf die Immunfunktion zu erwarten sind und somit die protektiven Effekte einer Hyperkapnie, wie die verbesserte intestinale Mikrozirkulation, in der Sepsis genutzt werden könnten <sup>17,18,40</sup>. Allerdings müssen weitere, vor allem humanmedizinische Untersuchungen zeigen, ob eine moderate Hyperkapnie andere Teile sowohl der lokalen als auch systemischen Immunantwort, welche in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, verändern können.

Ein weiterer Aspekt, der in dieser Arbeit betrachtet wurde, ist die Auswirkung einer Inhibition des  $K^+_{ATP}$ -Kanals durch Glibenclamid auf das Infektionsgeschehen. Der Sulfonylharnstoff Glibenclamid ist als orales Antidiabetikum häufig in der Hausmedikation von Patienten anzutreffen. Auf Grund von Arbeiten die zeigen, dass es durch die Gabe von Glibenclamid zu einer verminderten Entzündungsreaktion kommt, wird die protektive Rolle des Medikaments in einer Infektion bereits diskutiert <sup>29</sup>. Allerdings ist die Datenlage, bezüglich immunologischer Auswirkungen durch die perioperative Weitergabe von

Glibenclamid während einer abdominalen Sepsis auf der Intensivstation, noch unzureichend.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass weder die alleinige Verabreichung von Glibenclamid noch die Kombination des Medikaments mit einer kurzen moderaten Hyperkapnie Folgen auf die systemische Immunantwort in der moderaten Sepsis hat. Des Weiteren weisen auch *Colon* und Lunge keine Hinweise auf eine vermehrte Infiltration und Aktivität von neutrophilen Granulozyten auf. Demzufolge scheint durch die Applikation von Glibenclamid bei einer beginnenden Sepsis erst einmal unbedenklich, jedoch konnte auch kein protektiver Effekt gezeigt werden.

Wie beschrieben, handelt es sich in der hier vorliegenden Arbeit jedoch um ein Tiermodell, so dass man die Limitation der Studie in Hinblick auf die Übertragbarkeit des Menschen bedenken muss. Aus diesem Grund müssen klinische Untersuchungen folgen, die Hinweise auf die immunologische Bedeutung der Hyperkapnie und der Inhibition des  $K^+_{ATP}$ -Kanals in der humanitären Sepsis geben.

## 6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass im septischen Tiermodell weder die moderate Hyperkapnie noch die Inhibition des  $K^+$ <sub>ATP</sub>-Kanals durch Glibenclamid, systemische sowie lokale immunologische Auswirkungen haben, da weder eine Veränderung der Zytokinplasmaspiegel noch der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selectin sowie der MPO-Aktivität an *Colon* und Lunge beobachtet wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die protektiven Effekte der Hyperkapnie unabhängig der Immunantwort vermittelt werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die lungenprotektive Beatmung mit konsekutiver permissiver Hyperkapnie sowohl allein als auch unter einer Glibenclamid Therapie auf die Immunantwort unbedenklich zu sein scheint.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Brunkhorst, F.M. *et al.* S3 Leitlinie: Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge. AWMF-Registrierungsnummer: 079-001 (2018). Verfügbar unter [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/079-001I\\_S3\\_Sepsis-Praevention-Diagnose-Therapie-Nachsorge\\_2020-03\\_01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/079-001I_S3_Sepsis-Praevention-Diagnose-Therapie-Nachsorge_2020-03_01.pdf)
2. Fleischmann-Struzek, C. *et al.* Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive care medicine* **44**, (11) 1826-1835 (2018).
3. Weber, G. F. & Swirski, F. K. Immunopathogenesis of abdominal sepsis. *Langenbecks Arch Surg* **399**, 1–9 (2014).
4. Chaudhry, H. *et al.* Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. *In Vivo* **27**, 669–684 (2013).
5. Sumagin, R. & Sarelius, I. H. TNF- $\alpha$  activation of arterioles and venules alters distribution and levels of ICAM-1 and affects leukocyte-endothelial cell interactions. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **291**, H2116–H2125 (2006).
6. Kim, I. *et al.* Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 7614–7620 (2001).

7. Zhao, Yan-jun *et al.* Blockade of ICAM-1 improves the outcome of polymicrobial sepsis via modulating neutrophil migration and reversing immunosuppression. *Mediators of Inflammation*. (2014), doi: 10.1155/2014/195290.
8. Klebanoff, J. *et al.* Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. **77**, 598-625 (2005).
9. Arnold, J. & Flemming, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Arch. Biochem. Biophys*. **500**, 92-106 (2010).
10. Schrijver, I. T. *et al.* Myeloperoxidase can differentiate between sepsis and non-infectious SIRS and predicts mortality in intensive care patients with SIRS. *Intensive Care Med Exp*. **5**, 43 (2017).
11. Hörner, C. *et al.* Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Anaesthesist*. **53**, 10-28 (2004).
12. 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*. **181**, 176–180 (2000).
13. Brouwer, W.P. *et al.* Hemoadsorption with CytoSorb shows a decreased observed versus expected 28-day all-cause mortality in ICU patients with septic shock: a propensity-score-weighted retrospective study. *Crit Care*. **23**, 317-326 (2019).
14. Hemming *et al.* Immune Effects of Corticosteroids in Sepsis. *Front. Immunol*. **9**, 1736 (2018).
15. Cortés, I., Peñuelas, O. & Esteban, A. Acute respiratory distress syndrome: evaluation and management. *Minerva Anesthesiol* **78**, 343–357 (2012).

16. Villar, J., Kacmarek, R. M., Pérez-Méndez, L. & Aguirre-Jaime, A. A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilatory strategy improves outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial. *Crit. Care Med.* **34**, 1311–1318 (2006).
17. Schwartges, I., Schwarte, L. A., Fournell, A., Scheeren, T. W. L. & Picker, O. Hypercapnia induces a concentration-dependent increase in gastric mucosal oxygenation in dogs. *Intensive Care Med* **34**, 1898–1906 (2008).
18. Stübs, C. C. M. *et al.* Acute, short-term hypercapnia improves microvascular oxygenation of the colon in an animal model of sepsis. *Microvasc. Res.* **90**, 180–186 (2013).
19. Ismaiel, N. M. & Henzler, D. Effects of hypercapnia and hypercapnic acidosis on attenuation of ventilator-associated lung injury. *Minerva Anesthesiol* **77**, 723–733 (2011).
20. Laffey, J. G. *et al.* Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 46–56 (2004).
21. Horie, S. *et al.* Hypercapnic acidosis attenuates pulmonary epithelial stretch-induced injury via inhibition of the canonical NF- $\kappa$ B pathway. *Intensive Care Med Exp* **4**, (2016).
22. Norozian, F. M. *et al.* Therapeutic hypercapnia enhances the inflammatory response to endotoxin in the lung of spontaneously breathing rats\*: *Critical Care Medicine* **39**, 1400–1406 (2011).
23. Liu, Y. *et al.* Modulatory effects of hypercapnia on *in vitro* and *in vivo* pulmonary endothelial–neutrophil adhesive responses during inflammation. *Cytokine* **44**, 108–117 (2008).

24. Wang, X. *et al.* Hypercapnic acidosis activates KATP channels in vascular smooth muscles. *Circ. Res.* **92**, 1225–1232 (2003).
25. Nakahata, K. *et al.* Mild hypercapnia induces vasodilation via adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in parenchymal microvessels of the rat cerebral cortex. *Anesthesiology* **99**, 1333–1339 (2003).
26. Pompermayer, K. *et al.* Effects of the treatment with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Eur. J. Pharmacol.* **556**, 215–222 (2007).
27. Schmid, D. *et al.* Glibenclamide reduces proinflammatory cytokines in an ex vivo model of human endotoxaemia under hypoxaemic conditions. *Life Sciences* **89**, 725–734 (2011).
28. Spiller, F. *et al.* Hydrogen sulfide improves neutrophil migration and survival in sepsis via K<sup>+</sup>ATP channel activation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 360–368 (2010).
29. Zhang, G. *et al.* A Protective Role of Glibenclamide in Inflammation-Associated Injury. *Mediators Inflamm.* (2017).  
doi:10.1155/2017/35787022017.
30. Dalaal, M. *et al.* Glibenclamide ameliorates ischemia-reperfusion injury via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in the rat hippocampus. *Brain Research* **1358**, 257-262 (2011).
31. Beck, C. *et al.* The beneficial effects of acute hypercapnia on microcirculatory oxygenation in an animal model of sepsis are independent of K<sup>(+)</sup>ATP channels. *Microvas. Res.* **99**, 78-85 (2015).
32. 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).

33. Traeger, T. *et al.* Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) - a Standardized Model for Polymicrobial Abdominal Sepsis. *J Vis Exp* (2010). doi:10.3791/2299
34. 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).
35. 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).
36. 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).
37. Xiao, Z. *et al.* Inflammatory mediators in intra-abdominal sepsis or injury – a scoping review. *Crit Care.* **19**, 373 (2015).
38. Liu, Y. *et al.* Modulatory effects of hypercapnia on *in vitro* and *in vivo* pulmonary endothelial–neutrophil adhesive responses during inflammation. *Cytokine* **44**, 108–117 (2008).
39. Nichol, A. D. *et al.* Hypercapnic Acidosis Reduces Oxidative Reactions in Endotoxin-induced Lung Injury. *Anesthes.* **113**, 116–125 (2010).
40. De Backer, D. *et al.* Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. *Crit. Care Med.* **41**, 791–799 (2013).
41. Aka, O. *et al.* Hypercapnia and surgical site infection: a randomized trial. *British Journal of Anaesthesia* **111**, 759-67 (2013).

42. 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).
43. Tiruvoipati, R. *et al.* Effects of Hypercapnia and Hypercapnic Acidosis on Hospital Mortality in Mechanically Ventilated Patients *Crit. Care Med* **45**, 649-656 (2017).

## 8 Anhang

### 8.1 Geräte und Materialien des laborexperimentellen Versuchsteils

Eismaschine	AF 80, Scotsman, Mailand, Italien
Elektrophoresekammer	Polyacrylamid Gel Kammern, LTF Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Filterpapier	Chromatographiepapier, Whatman, GE Healthcare, München, Deutschland
Klebefolie für Wellplatten	Klebefolie, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Gel-Auswertungssoftware	GelScan 6.0, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Geldokumentation	Dunkelkammer: DeVision, Decon Science Tec, Hohengandern, Deutschland) Kamera: Coolsnap HQ2, Photometrics, Tucson, USA Software: GelPro Analyzer v6.0.0.349, Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA
Heizblock	Neo Block Heizer Duo 2-2504, neoLab, Heidelberg, Deutschland
Homogenisierstation	Dispergierstation T 8.10 mit Metallpotter, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikrotiterplatten	Nunc-Immuno Platte - Maxi Sorp Surface 96 Well, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark Klebefolie, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader Gen5™, Datenanalyse-Software BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Deutschland
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Laborausrüstung Klees, Düsseldorf, Deutschland
PVDF-Membran für Western-Blot	Immobilon-P, EMD Millipore Corporation, Billerica, USA

Schüttler	GFL 3011, GFL, Burgwedel, Deutschland
Statistiksoftware und graphische Darstellung	GraphPad Prism Version 6, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
Stromnetzteil für Elektrophoresekammer	Consort E143, Sigma, München, Deutschland
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK255H, Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortexgerät	Vortex Genie Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Western-Blot-Kit Mini-Protean 3	(Transfer-Kammer, Gel-Kassette, Fiberpad, Kühlelement), BIO-RAD, München, Deutschland
Zentrifuge groß	Eppendorf Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge klein, Tischzentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## 8.2 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils

100 % Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
APS (= Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Sigma, München, Deutschland
Aqua dest.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau Natrium-Salz	Merck, Darmstadt, Deutschland
Complete	Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
DTT (= 1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

EDTA	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
EDTA-Natrium-Salz	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
Essigsäure (= Eisessig), 100 % wasserfrei	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
Ethanol unvergällt, 75 %	Zentralapotheke, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
Folin-Reagenz (1,2-Naphthochinon-5-Sulfonat)	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
Glycerol	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HCl (Chlorwasserstoff, Salzsäure)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropylalkohol	Zentralapotheke, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
Kaliumnatriumtartrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver Blotting grade	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
PAA 30 % (Rotiphorese® Gel)	Roth, Karlsruhe
SDS 10 % (Sodiumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sigma 7-9	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff, flüssig	Linde, Duisburg, Deutschland
Temed (Tetramethylethyldiamin)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCL (Trizma)	Sigma Ultra, Sigma, München, Deutschland
Tween	Merck, Darmstadt, Deutschland

Western Blotting Luminol Reagent sc-2048	Chemilumineszenz Reagenz, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
--	---

### 8.3 Puffer, Lösungen und Geele des laborexperimentellen Versuchsteils

1,25 M Sigma 7-9, pH 6,8	15,14 g Sigma 7-9 + 100 ml Aqua dest. pH 6,8 mit HCl (10 N) einstellen Lagerung im Kühlschrank
1,5 M Sigma 7-9, pH 8,8	54,51 g Sigma 7-9 + 300 ml Aqua dest. auffüllen pH 8,8 mit HCl (10 N) einstellen Lagerung im Kühlschrank
10 % APS	1 g APS + 10 ml Aqua dest. Lagerung im Kühlschrank
10 % SDS	5 g SDS + 50 ml Aqua dest. Zum Lösen leicht erwärmen
Assay Diluent	FBS 10 % in PBS pH 7,0
Blotto 1 %	Blotto 5 % 1:5 mit TBS-T pH 8,0 verdünnen Aliquots à 20 ml bei -20 °C einfrieren
Blotto 5 %	50 g Milchpulver ad 1000 ml TBS-T
BSA 5 %	50 g BSA ad 1000 ml TBS-T pH 8,0

Coating Buffer	<p>TNF-<math>\alpha</math>: (Natriumkarbonat = 0,1 mol/l, pH 9,5)  1,8 g Natriumkarbonat  + 4,2 g Natriumhydrogenkarbonat in 0,5 l Aqua dest.</p> <p>IL-10: (Natriumphosphat = 0,2 mol/l, pH 6,5)  11,8 g Di-Natriumhydrogenphosphat,  + 16,1 g Natriumdihydrogenphosphat in 1 l Aqua dest.</p> <p>IL-6: (Natriumkarbonat = 0,1 mol/l, pH 9,5)  1,59 g Natriumkarbonat,  + 7,13 g Natriumhydrogenkarbonat in 1 l Aqua dest.</p>
Loading Buffer	<p>7 ml Aqua dest.  + 1 ml 500 mM Tris-HCl pH 6,8  + 2 ml Glycerol  + 1 g SDS  + 30 mg Bromphenolblau (=0,5 %)  Fertige Lösung im Verhältnis 10:1 mit 2-Mercaptoethanol mischen</p>
Lösung 1	<p>20 ml Reagenz A  + 200 <math>\mu</math>l Reagenz B  + 200 <math>\mu</math>l Reagenz C</p>
Lösung 2	<p>5 ml Folins-Reagenz + 5 ml Aqua dest.</p>
Lysepuffer (100 ml)	<p>10 mM Sigma 7-9 pH 8 (121,4 mg)  + 1 mM Na-EDTA (416,2 mg)  + 400 mM NaCl (58,44 mg)  + 10 % Glycerol  + 0,5 % NP40</p> <p>+ 40 <math>\mu</math>l/ml Complete (1 Tablette in 2 ml Aqua dest. aliquotieren)  + 1 <math>\mu</math>l/ml DTT ( hierzu 1 mM DTT (154,25 mg) in 1 ml Aqua dest. aliquotieren)  → DTT und Complete vor Gebrauch frisch zugeben</p>
PBS (0,15 mmol/l, pH7,2)	<p>8,0 g/l Natriumchlorid  + 0,2 g/l Kaliumchlorid  + 1,16 g/l Dinatriumhydrogenphosphat  + 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat</p>

Phosphatpuffer (50 mmol/l, pH 6,0)	0,681 g Kaliumdihydroxyphosphat ad 100 ml Aqua dest. + 0,5 % Hexadecyltrimethylammonium bromide
Reagenz A	10 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in 500 ml 100 mM NaOH lösen
Reagenz B	2 g KNa-Tartrat + 100 ml Aqua dest.
Reagenz C	1 g Cu-Sulfat (CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O) + 100 ml Aqua dest.
Running Buffer (10 fach konzentriert)	30 g Sigma 7-9 + 144 g Glycin + 10 g SDS + 1 l Aqua dest. zum Lösen leicht erwärmen
Sammelgel (2 Gele)	2,55 ml PAA 30 % + 10,5 ml Aqua dest. + 1,5 ml 1,25 M Sigma 7-9 pH 6,8 + 150 µl SDS 10 % + 30 µl Temed + 150 µl APS 10 %
SDS-Stopp-Puffer (100 ml)	125 mM Sigma 7-9 pH 6,8 (121,4 mg) + 3 mM Na-EDTA (416,2 mg) + 20 % Glycerol (20ml) + 9 % SDS (9g) + 0,05 % Bromphenolblau (0,05g)
Stopplösung ELISA	Schwefelsäure (1 mol/l)
Substratlösung ELISA	Tetramethylbenzidin Substrat Reagent Set, BD Biosciences, San Diego, USA
Tris-HCl, pH 6,8	15,8 g 500 mM Tris-HCl + 200 ml Aqua dest. mit NaOH (5 N) pH auf 6,8 einstellen
Tris-HCl, pH 7,4	15,8 g 500mM Tris-HCl + 200 ml Aqua dest. mit NaOH (5 N) pH auf 7,4 einstellen
Waschpuffer	Tween-20 0,05 % in PBS
Working Detector IL-10	Detektionsantikörper 1:250 in Assay Diluent verdünnen. Enzym-Reagenz 1:250 in der Detektionsantikörper- Lösung verdünnen.

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

Anti-Actin	Produkt-Nr. A 2066, 42 kDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, 1:10.000
Anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper	Produkt-Nr. 711-035-152, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Newmarket, UK, 1:10.000
ELISA-Kit	BD Opt EIA, BD Biosciences, San Diego, USA TNF- $\alpha$ ELISA Set für Ratte Artikel-Nr. #558535, IL-10 ELISA Set für Ratte Artikel-Nr. #555134 IL-6 ELISA Set für Ratte Artikel-Nr. #550319
E-Selectin; polyklonaler Antikörper	Produkt-Nr. 3631-100, 67 kDa, Biovision Inc., Milpitas, USA, 1:500
ICAM-1; polyklonaler Antikörper	Produkt-Nr. (M-19): sc-1511, 85-110 kDa, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA, 1:200
Proteinmarker	Produkt-Nr. 00101489, Spectra TM Multicolor High Range Protein Ladder, Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
MPO-Standard, von Humanen Leukozyten (0,033 mg Protein, 382 Units / mg)	Sigma Life Science, St. Louis, USA

