

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

**Einfluss der lokalen Applikation von Nitroglycerin und Carbachol auf die
mitochondriale Funktion des Colons im septischen Rattenmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von
Jeanne Christine Eitner-Pchalek

2023

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/in: PD. Dr. Dr. Andre Heinen

Für meine Eltern und meinen Ehemann

Zusammenfassung

Trotz des medizinischen Fortschrittes der vergangenen Dekade bleibt die Sepsis eine der häufigsten Ursachen für Mortalität im Krankenhaus. Als Hauptursache für die Entwicklung eines septischen Multiorganversagens (MOV) werden Mikrozirkulationsstörungen und mitochondriale Dysfunktionen, insbesondere im Gastrointestinaltrakt, angesehen. Systemisch applizierte Substanzen konnten zwar die Sauerstoffversorgung im Gastrointestinaltrakt verbessern, führten aber häufig zu gravierenden Nebenwirkungen. Eine erste Untersuchung zeigt, dass die lokale Therapie mit Nitroglycerin, im hämorrhagischen Hundemodell, zu einer verbesserten Oxygenierung der Magenschleimhaut führt. In einer *in vitro* Untersuchung unseres Arbeitskreises konnte im gesunden Rattenmodell gezeigt werden, dass Nitroglycerin den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch vermindert und die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung in intestinalen Mitochondrien verbessert. Andere *in vitro* Untersuchungen zeigten außerdem, dass Carbachol die intestinale Barrierefunktion erhalten kann. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die lokale Applikation von Nitroglycerin und Carbachol *in vivo* die mitochondriale Funktion (MF) intestinaler Zellen während einer abdominalen Sepsis im Rattenmodell beeinflusst. Eine Verbesserung der MF intestinaler Zellen könnte prognostisch sehr günstig sein.

An insgesamt 109 männlichen Wistar-Ratten wurde in randomisierter Reihenfolge entweder eine abdominale Sepsis mittels einer *Colon ascendens stent peritonitis* (CASP) - Operation induziert oder eine Sham (sterile Laparotomie) - Operation als Kontrolle durchgeführt. 24 Stunden nach erfolgter CASP- oder Sham - Operation wurde das Colon, entsprechend den Gruppeneinteilungen, mit Nitroglycerin, Carbachol, der Kombination beider Medikamente oder der Trägersubstanz Natriumchlorid (NaCl) behandelt. Im Anschluss wurde Colongewebe entnommen und für die respirometrische Messung aufbereitet. Die Quantifizierung der MF erfolgte über die kontinuierliche Messung der Sauerstoffkonzentration und des Sauerstoffverbrauchs in der Messprobe. Aus diesen Werten wurden anschließend respiratorische Atmungsquotienten ermittelt. Die statistische Datenanalyse wurde mittels Kruskal-Wallis und Dunn's Korrektur durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ betrachtet.

Die Parameter der MF im Colon blieben in allen behandelten Gruppen unverändert gegenüber der Kontrolle sowohl nach CASP- als auch nach Sham-Operation. Folglich veränderte die lokale Applikation von Nitroglycerin und Carbachol die MF weder unter septischen noch unter nicht septischen Bedingungen.

Abstract

Despite medical advances in the past decade, sepsis remains one of the most common causes of in-hospital mortality. Microcirculatory and mitochondrial dysfunction, particularly in the gastrointestinal tract, are considered to be the main causes of septic multiorgan failure. Systemically applied agents could improve oxygenation in the gastrointestinal tract, but often result in serious side effects. A first study shows that local therapy with nitroglycerin leads to improved oxygenation of the gastric mucosa in a hemorrhagic dog model. In an *in vitro* study by our group, nitroglycerin was shown to decrease mitochondrial oxygen consumption and to improve the efficiency of oxidative phosphorylation in intestinal mitochondria in a healthy rat model. Other *in vitro* studies also showed that carbachol can preserve barrier function. The aim of this work was to investigate whether local application of nitroglycerin and carbachol *in vivo* affects mitochondrial function (MF) of intestinal cells during abdominal sepsis in a rat model. Improvement in MF of intestinal cells could be highly beneficial in new therapeutic approaches.

A total of 109 male Wistar rats were randomized to undergo either abdominal sepsis induced by a *colon ascendens stent peritonitis*- (CASP) surgery or sham- surgery (sterile laparotomy) as a control. Twenty-four hours after CASP or Sham surgery, the colon was treated with nitroglycerin, carbachol, a combination of both drugs, or solely the carrier substance of nitroglycerin (NaCl) according to the group classification. Colon tissue was then collected and processed for respirometric measurement. MF was quantified by continuous measurement of oxygen concentration and oxygen consumption in the sample. Respiratory quotients were then calculated from these values. Statistical data analysis was performed using Kruskal-Wallis and Dunn's correction, and results were presented as mean \pm standard deviation. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

The parameters of MF in the colon remained unchanged in all treated groups compared to the control group after both Sham and CASP surgery. Consequently, local application of nitroglycerin and carbachol did not alter MF under either physiological or septic conditions.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ADP/O	ADP-Sauerstoff-Ratio
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
BGA	Blutgasanalyse
BH4	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CASP	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>
c-	centi-
CGRP	<i>Calcitonin-gene-related-peptid</i>
et al.	<i>et alii</i>
FAD/FADH2	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm
h	Stunde(n)
IMR	Intermembranraum
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Meter
m-	milli-
μ-	mikro
M	Molar
min	Minute
MF	Mitochondriale Funktion
mM	Millimolar
MOV	Multiorganversagen
mAChR	Muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor
n	Anzahl
n-	nano-
NaCl	Natriumchlorid
NADH/H+	Nicotinamidadenindinukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RCI	<i>Respiratory Control Index</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s.c.	subkutan
SRSS	<i>Septic rat severity score</i>
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand

u.a.	unter anderem
Q	Ubichinon
QH ₂	Ubichinol
vgl.	vergleiche (mit)
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
ΔO	Sauerstoffverbrauch

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	Tierexperimenteller Versuchsteil	7
2.1.1	Material und Geräte.....	7
2.1.2	Versuchsgenehmigung.....	7
2.1.3	Versuchstiere.....	7
2.1.4	Versuchsgruppen.....	8
2.1.5	CASP- und Sham Operation.....	8
2.1.6	Perfusion des Colons.....	9
2.2	Laborexperimenteller Teil	11
2.2.1	Material und Geräte.....	11
2.2.2	Chemikalien.....	11
2.2.3	Herstellung des Colonhomogenats.....	11
2.2.4	Proteinbestimmung mittels LOWRY-Methode.....	11
2.2.5	Respirometrische Messung	13
2.2.5.1	Oxidative Phosphorylierung.....	13
2.2.5.2	Funktionsweise der Respirometrie	14
2.2.5.3	Ablauf der Respirometrie.....	15
2.2.5.4	Messwerte der Respirometrie.....	16
2.2.5.5	Kontrollmessungen.....	17
2.3	Statistische Auswertung	18
3	ERGEBNISSE	18
4	DISKUSSION	22
4.1	Methodendiskussion	22
4.2	Ergebnisdiskussion.....	25
4.3	Schlussfolgerung	28
5	LITERATURVERZEICHNIS	29
6	ANHANG	37
6.1	Material und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils	37
6.2	Material und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils.....	38
6.3	Chemikalien des laborexperimentellen Versuchsteils	39
6.4	Septic Rat Severity Score.....	41

1 Einleitung

Trotz kontinuierlicher Verbesserung der Krankenversorgung ist die Inzidenz der Sepsis in den letzten Dekaden weiter angestiegen (1-3). Mit 279.530 registrierten Sepsisfällen im Jahr 2013 und einer Mortalitätsrate von 24,3% gehört die Sepsis in Deutschland, neben neoplastischen- und kardiovaskulären Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen (1). Auch bleibt das sepsisbedingte Multiorganversagen (MOV) die häufigste postoperative Komplikation und Haupttodesursache auf nicht kardiologischen Intensivstationen (4,5). Zunehmende invasive Maßnahmen in der Medizin, sowie die demographische Entwicklung, die mit einer steigenden Anzahl an älteren und multimorbiden Patienten korreliert, sind unter anderem als Ursache anzusehen (1). Neben der stationären Akutversorgung gewinnt auch die postakute Phase der Sepsis, durch zahlreiche psychische und physische Residuen der Erkrankung, zunehmend an Bedeutung (6). Die Gründe für die Verschlechterung des Gesundheitszustands nach durchstandener Sepsis sind multifaktoriell. Sie umfassen ein beschleunigtes Fortschreiten bereits bestehender chronischer Erkrankungen, verbleibende Organschäden und eine beeinträchtigte Immunfunktion (7). Patienten, die eine schwere Sepsis überlebt haben, haben somit ein deutlich erhöhtes Risiko ein kognitives oder neurologisches Defizit, motorische Einschränkungen, eine Beatmungs- oder Dialysepflichtigkeit oder auch eine psychische Erkrankung, darunter Depressionen, Angstzustände oder posttraumatische Belastungsstörungen, zu entwickeln (7,8). Im Ergebnis führt dies dazu, dass Sepsisüberlebende im Vergleich zur Normalbevölkerung eine deutlich schlechtere gesundheitsbezogene Lebensqualität aufweisen (9). Die Sepsis verursacht aber nicht nur viel individuelles Leid und schwerwiegende Folgen für Patienten und Angehörige, sie generiert durch die intensive stationäre und ambulante Behandlung auch hohe sozioökonomischen Kosten. Im Jahre 2013 betragen die Gesamtkosten circa 7,7 Milliarden Euro für das deutsche Gesundheitssystem (1). Die Sepsis ist somit zu einem der kostenintensivsten Krankheitsbildern geworden (1). Um zukünftig die hohe Mortalität und Morbidität zu senken wäre eine Verbesserung der Sepsis-Früherkennung, Diagnostik und Therapie wünschenswert.

Die Sepsis wird definiert als lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine inadäquate Immunreaktion der Wirtszelle auf eine Infektion hervorgerufen wird (10). Die dysregulierte Immunantwort als Reaktion auf die Infektion wird dabei als Auslöser für

die kaskadenartige Aktivierung nachgeschalteter Signalwege, die sowohl das kardiovaskuläre, immunologische, hormonelle als auch das metabolische System beeinflussen, angesehen (11). Doch trotz intensiver Forschung und wegweisender Ergebnisse sind die komplexen pathophysiologischen Mechanismen der Sepsis nicht abschließend geklärt (12). Neben makrozirkulatorischen Kreislaufveränderungen wie der Hypovolämie, einer veränderten Vasomotorik und der Myokarddysfunktion werden Alterationen des mikrovaskulären Blutflusses als Folge inflammatorischer Endothelzellveränderungen als eine der Hauptursachen für die Entwicklung eines septischen MOV angesehen (13-17). Als kleinste funktionelle Einheit des kardiovaskulären Systems reguliert die Mikrozirkulation die bedarfsgerechte Versorgung jeder Zelle eines Organs durch den Gas- und Stoffaustausch per Diffusion ins Gewebe (14). Während eines septischen Prozesses können verschiedene Veränderungen des funktionellen Systems der Mikrozirkulation auftreten und zu ausgeprägten Perfusionsstörungen führen. Die Veränderung von Endothelzellen nimmt dabei eine zentrale Rolle ein (14,18). Strukturelle und funktionelle Veränderungen des Endothels mit Fragmentation und Ablösung der Zellen in die Blutbahn, führen zu einer Minderung der Barrierefunktion, zu Störungen der Koagulation, zu vasomotorischen Dysfunktion und Apoptose (19-22).

Verschiedene Versuchsreihen zeigen auf, dass während der Entstehung eines septischen MOV neben Mikrozirkulationsstörungen auch mitochondriale Dysfunktionen von großer Bedeutung sind (23-25). Da es bis heute nicht gelungen ist die mitochondriale Biogenese final in die Pathophysiologie der Sepsis einzugliedern, werden die Auswirkungen der Sepsis auf die mitochondriale Funktion weiterhin kontrovers diskutiert (26). Zum einen wird davon ausgegangen, dass die Gewebshypoxie durch ein vermindertes Sauerstoffangebot entsteht. Dieser Theorie folgend, spielt die Interaktion zwischen einer gestörten Mikrozirkulation und der sich daraus entwickelnden mitochondrialen Dysfunktion eine zentrale Rolle (*Microcirculatory and mitochondrial distress syndrome; MMDS*) (14,27).

Zum anderen wird vermutet, dass der zelluläre Energiestoffwechsel während einer Sepsis, nicht nur aufgrund einer unzureichenden Sauerstoffzufuhr gestört ist, sondern vielmehr eine Beeinträchtigung der Sauerstoffverwertung der Zelle, die eingeschränkte MF verursacht (28). Kann ein ausreichendes Sauerstoffangebot von der Zelle nicht verwertet

werden, führt dies zu Zellfunktionsstörungen und einer schädigenden Hypoxie (28). Gestützt wird diese Theorie durch den Nachweis, dass in Zellexperimenten an Hepatozyten und Enterozyten Endotoxin durch die direkte Entkopplung der mitochondrialen Cytochrom C Oxidase die Adenosintriphosphat (ATP) Generierung, unabhängig vom Sauerstoffangebot, reduziert (29,30). Des Weiteren zeigen Boekstegers et al., dass in Anhängigkeit der Schwere der Sepsis ein kontinuierlicher Anstieg von Sauerstoffpartialdrücken in humanen Skelettmuskelzellen zu beobachten ist und gleichzeitig die Sauerstoffverwertung mit einer Verschlechterung der Sepsis deutlich abnimmt (31).

Auch besteht keine Einigkeit bezüglich des Ausmaßes und der Richtung der mitochondrialen Dysfunktion während eines septischen Prozesses. So zeigen einige Publikationen einen Anstieg des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches (32-34) während andere Untersuchungen unter ähnlichen Bedingungen eine Abnahme des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches beschreiben (35-37). Weitere Studien konnten wiederum keinen veränderten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch unter septischen Bedingungen beobachten (38,39). Die Widersprüchlichkeit dieser Ergebnisse lässt eine variable MF unter septischen Bedingungen vermuten.

Der Zusammenhang zwischen sepsisbedingten Veränderungen der Mitochondrienfunktion und -regeneration scheint zeitabhängig zu sein. Singer et al. haben gezeigt, dass sich die MF in der Frühphase einer Sepsis zunächst verbessert und erst im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf verschlechtert (40). Auch Herminghaus et al. wiesen 2019 an Lebermitochondrien der Ratte nach, dass sich die MF im septischen Prozess verändert. So kam es in der frühen Phase, nach induzierter abdominalen Sepsis, zu einem Anstieg der MF und nach 72 Stunden zu einer verminderten MF. Nach 96 Stunden erholte sich die MF erneut. Dass der Schweregrad der Sepsis die MF in der Leber von Ratten unterschiedlich beeinflusst, konnte somit bewiesen werden (41).

Auch das Vorhandensein von sepsisbedingten Unterschieden in der MF zwischen verschiedenen Spezies wurde festgestellt. Während in Studien an Nagetieren eindeutige Veränderungen der MF nachgewiesen wurden, konnte in Sepsismodellen an Schweinen nur geringfügige Veränderungen der MF beschrieben werden (42,43).

Eine gewebsspezifische mitochondriale Atmungsreaktion während einer Sepsis konnte die Studie von Mittal et al. nachweisen. Nach Induktion einer akuten Pankreatitis konnte im Tiermodell sowohl eine signifikant verminderte MF im Pankreas, als auch in der Lunge und im Jejunum nachgewiesen werden, während die MF in der Leber, in der Niere, im Duodenum und im Herzmuskel unverändert blieb (39). King et al. konnten ebenfalls einen verminderten Sauerstoffverbrauch in der Ileumschleimhaut von endotoxämischen Ratten im Vergleich zur Kontrolle nachweisen (30).

Die MF des Colons unter septischen Bedingungen ist bis heute kaum erforscht, obwohl der Dickdarm während einer Sepsis eine zentrale Rolle einnehmen kann. Kommt es während eines septischen Schocks zur Umverteilung des Blutflusses zugunsten lebenswichtiger Organe wie dem Herzen oder Gehirn, erfolgt eine Reduktion des Blutflusses unter anderem in der Leber oder der Splanchnikusregion (44). Die Minderperfusion der Darmmukosa kann zu folgenreichen Permeabilitätsveränderungen der Darmbarriere führen (45,46). Verlagern sich Bakterien und toxische Metabolite ins Blut- und Lymphsystem wird die Ausbreitung einer systemischen Inflammation, bis hin zum septischen Schock mit MOV, begünstigt (47,48). Demzufolge ist eine adäquate mikrovaskuläre Oxygenierung der Darmschleimhaut und die damit verbundene Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität als entscheidend für die Therapie septischer Patienten zu betrachten (49).

Auf der Suche nach möglichen Therapieansätzen konnte gezeigt werden, dass viele systemisch applizierte Substanzen die Sauerstoffversorgung im Gastrointestinaltrakt zwar verbesserten, es aber häufig zu kardiovaskulären Nebenwirkungen kam, welche den Einsatz dieser limitierten (50). Lokal applizierte Medikamente finden bei anderen Krankheitsbildern bereits Anwendung. So wird inhalatives Illoprost zur Therapie der pulmonalen Hypertonie mit deutlich geringeren systemischen Nebenwirkungen eingesetzt (51). Zur topischen, nebenwirkungsarmen Medikamentenanwendung des Gastrointestinaltraktes gibt es bisher nur wenige Daten.

Es gibt Hinweise, dass die intraperitoneale Applikation von Nitroglycerin zur Anastomosenfestigkeit im Darm von Ratten beitragen kann (52). Des Weiteren scheint intraluminal appliziertes Nitroglycerin im Rahmen eines Ischämie-Reperfusion-

Schadens die Beeinträchtigung der Darmmukosa abzuschwächen (53). Basierend auf der Annahme, dass die lokale Nitroglycerinapplikation über eine vasodilatatorische Wirkung zur Öffnung schwacher Mikrozirkulationseinheiten führen könnte, die die Oxygenierung verbessern, haben Truse et al. 2017 eine erste Versuchsreihe in unserem Labor durchgeführt (46). In dieser *in vivo* Studie konnte nachgewiesen werden, dass unter hämorrhagischen Bedingungen im Hundemodell, die topische Gabe von Nitroglycerin die regionale Sauerstoffversorgung des Magens verbessert und dadurch die Integrität der Magenschleimhautbarriere erhalten bleibt. Dies deutet darauf hin, dass der NO-Donator Nitroglycerin direkte Auswirkungen auf die regionale Oxygenierung und Barrierefunktion, möglicherweise über eine Modulation der MF, hat. Systemische Kreislaufvariablen wurden dabei nicht beeinflusst (47). Ob sich lokal appliziertes Nitroglycerin auch auf die intestinale MF auswirkt, wurde in einer weiteren Versuchsreihe evaluiert. Herminghaus et al. zeigten 2018 in einer *in vitro* Versuchsreihe, dass Nitroglycerin den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch vermindert und die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) in Mitochondrien des Colons verbessert. Ein direkter Einfluss auf die Integrität der Schleimhautbarriere konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden (54). Allerdings bleibt die Studienlage bezüglich des Einflusses von Nitroglycerin auf die intestinale Barrierefunktion kontrovers diskutiert. So konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass Nitroglycerin zytoprotektiv wirkt und zusätzlich die Integrität der Darmmukosa aufrecht erhält (55,56). Andere Studien kamen zu der Erkenntnis, dass Nitroglycerin zu einer Dysfunktion von *Tight junctions* (TJ) führen kann und damit die Mucosapermeabilität erhöht (57,58). Inwieweit die lokale Therapie mit Nitroglycerin *in vivo* unter septischen Bedingungen die intestinale Oxygenierung und MF beeinflusst, bleibt zu prüfen.

Deweiteren wurde unter der Annahme, dass Carbachol als Acetylcholin Analogon über die Stimulation des Parasympathikus eine Vasodilatation ermöglicht, in verschiedenen Versuchsreihen untersucht, ob dieser Effekt zu einer verbesserten mikrozirkulatorischen Perfusion führen könnte. Hu et al. konnten zeigen, dass in einem Hundemodell für schwere Brandverletzungen Carbachol als Zusatz zur oralen Volumensubstitution während eines Verbrennungsschocks die Gewebedurchblutung des Magen-Darm-Traktes verbessern konnte (59). Desweiteren scheint intraluminal appliziertes Carbachol im Rattenmodell die intestinale Durchblutung sowie die mukosale Absorption von Wasser und Elektrolyten unter Schockbedingungen zu verbessern (60). Lesko et al. untersuchten

die Wirkung der cholinergen Stimulation auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) kultivierter Dickdarmepithelschichten von Schweinen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Carbachol den TEER positiv beeinflusst und folglich die Regulierung der epithelialen Barrierefunktion im proximalen Dickdarm von Schweinen über muskarinische Signalwege moduliert werden kann (61). Khan et al. konnten 2014 an kultivierten menschlichen intestinalen Epithelzellen nachweisen, dass die Aktivierung des M1 muskarinergen Acetylcholin Rezeptors (mAChR) durch Carbachol die Wiederherstellung der epithelialen Barrierefunktion in Zellmonolayern, nach Ethanol induzierten Epithelschäden, ermöglicht. Nach Schädigung des Epithels konnte durch eine cholinerge Stimulation eine Erholung des TEER erfasst werden. Diese Studie belegt eindeutig, dass Carbachol über die Stimulation des M1 mAChR die Aufrechterhaltung der Darmbarrierefunktion nicht nur unter physiologischen sondern auch unter pathologischen Bedingungen positiv beeinflusst (62).

Möglicherweise könnte Carbachol in Kombination mit Nitroglycerin, durch seine nachweislich barriestabilisierende Wirkung, den potentiell durch Nitroglycerin entstehenden negativen Einfluss auf die TJ reduzieren und die protektiven Effekte einer verbesserten Oxygenierung positiv modulieren. Ob Carbachol zusätzlich die mitochondriale Funktion beeinflusst, ist bislang ungeklärt.

Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern Carbachol, Nitroglycerin oder deren Kombination *in vivo* unter septischen Bedingungen Einfluss auf die MF des Colons nehmen. Eine Verbesserung der MF intestinaler Zellen könnte hinsichtlich der steigenden Inzidenz und den gravierenden sozioökonomischen Folgen prognostisch sehr günstig sein und neue Therapieansätze in der Sepsis bringen.

Die zentrale Fragestellung dieser Doktorarbeit lautet:

Beeinflusst die lokale Applikation von Nitroglycerin und/oder Carbachol *in vivo* die MF intestinaler Zellen während einer abdominalen Sepsis oder nach erfolgter steriler Laparotomie im Rattenmodell?

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimenteller Versuchsteil

2.1.1 Material und Geräte

Im Anhang sind alle Angaben zu den verwendeten Materialien und Geräten hinterlegt.

2.1.2 Versuchsgenehmigung

Durchgeführt wurden die Versuche mit der Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (84-02.04.2015.A538). Der operative, tierexperimentelle Abschnitt des Versuches wurde durch die Tierärztin Frau Claudia Hansen durchgeführt. Dieser Teil umfasste neben der CASP- und Sham Operation auch die darauffolgende Laparotomie der Versuchstiere, die Perfusion des Colons sowie die Organentnahme. Auch die Versorgung der Tiere während des kompletten Versuches wurde von Frau Claudia Hansen übernommen, sodass kein Fachkundenachweis gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes erforderlich war.

2.1.3 Versuchstiere

Die Versuche wurden an ca. drei Monate alten, gesunden und männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Man wählte ausschließlich männliche Versuchstiere aus, um den Einfluss hormoneller Schwankungen auf die Organfunktion zu vermeiden. Im Schnitt wogen die Tiere zwischen 330 und 380 g und sind den Zuchtlaboratorien Janvier, Frankreich, zuzuordnen. Die Versuchstiere lebten bis zum Versuchstag in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT), Düsseldorf. Die Tiere wurden in Makrolon-Einzelkäfigen vom Typ 3 unter klimatisierten Bedingungen (Raumtemperatur $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $50 \pm 5\%$, Luftumwälzrate 16–20-mal pro Stunde) gehalten. Als Einstreu der Käfige diente entkeimtes Weichholzgranulat. Eine künstliche Beleuchtung wechselte alle 12 Stunden zwischen einer Tag- und Nachtphase. Die Versuchstiere erhielten eine standardisierte Ratten - Diät sowie ad libitum entkeimtes Trinkwasser (ozonisiert und mit HCL angesäuert). Vor Versuchsbeginn durchliefen die Tiere eine Adaptationszeit von sieben Tagen. Die Hygieneüberwachung erfolgte gemäß den FELASA-Richtlinien.

2.1.4 Versuchsgruppen

An insgesamt 109 Wistar-Ratten wurde in randomisierter Reihenfolge entweder eine abdominelle Sepsis mittels *Colon ascendens stent peritonitis* (CASP)-Operation induziert oder eine Sham-Operation als Kontrolle durchgeführt. Wie in Abbildung 1 dargestellt, erfolgte eine weitere Randomisierung der Versuchsgruppen entsprechend dem zu perfundierenden Medikament oder der Trägersubstanz. Die randomisierten Gruppen wurden entweder mit Nitroglycerin, Carbachol, der Kombination von Nitroglycerin und Carbachol oder der Trägersubstanz Natriumchlorid (NaCl) behandelt.

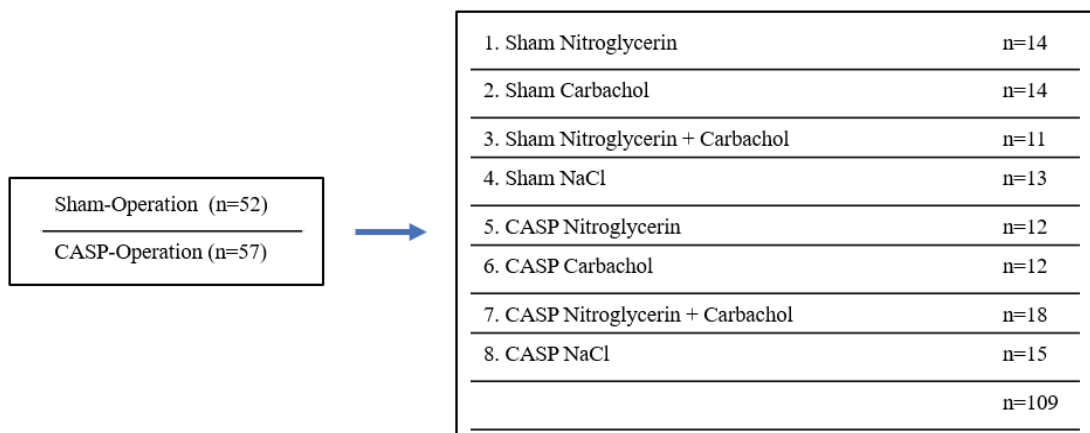


Abb. 1: Einteilung der Versuchsgruppen

CASP - *colon ascendens stent peritonitis*; n – Anzahl; NaCl - Natriumchlorid

2.1.5 CASP- und Sham Operation

Zur Induktion einer Sepsis diente das CASP-Modell nach Träger et al., Lustig et al. und Zantl et al. (63-65). Dieses Verfahren fand in unserem Labor bereits in mehreren Versuchsreihen Anwendung (66,67). Das Modell einer induzierbaren, abdominalen Sepsis beruht auf der Bildung einer artifiziellen, kontinuierlichen Fistel zwischen Darmlumen und Peritonealhöhle, vergleichbar mit einer postoperativen intestinalen Anastomoseninsuffizienz mit Ausbildung einer kotigen Peritonitis (65). 30 Minuten vor Beginn der Operation wurde das Versuchstier durch die Gabe von Buprenorphin subkutan (0,1 mg/kg) analgetisch abgedeckt. Die Narkose wurde durch Sevofluran, einem volatilen Anästhetikum eingeleitet. Nach Erreichen des gewünschten Narkosestadiums, wurde das Versuchstier in Rückenlage auf einer Wärmematte auf dem zuvor vorbereiteten Operationsfeld positioniert. Es folgte die mediane Laparotomie etwa 1 cm kaudal des *Xyphoids* über eine Länge von 2 cm. Das *Colon ascendens* wurde anschließend ausgelagert. Den CASP-

Gruppen wurden je zwei Venenverweilkatheter, der Größe 14G, als Stents antimensesenterial in die Darmwand implantiert und mit einem nicht resorbierbaren Faden fixiert (s. Abb. 2). Der erste Katheter wurde mittig der großen Krümmung des *Caecums* implantiert und der zweite Katheter oberhalb des Übergangs von *Caecum* zum *Colon ascendens* fixiert. Durch das Ausstreichen des Colons wurde der Katheter mit Fäzes gefüllt und so die artifizielle Fistel auf ihre Durchlässigkeit geprüft. Durch den kontinuierlichen Austritt von Fäzes in die Bauchhöhle entwickelte sich im weiteren Verlauf die abdominelle Sepsis. Die Kontrollgruppen erhielten eine analoge Operation, wobei nur ein Venenverweilkatheter der Größe 14 G verwendet wurde und dieser nicht perforierend implantiert, sondern lediglich auf die Darmwand aufgenäht wurde (s. Abb. 2). Anschließend wurde der Darm beider Versuchsgruppen wieder in die Bauchhöhle verlagert. Die Bauchhöhle wurde mit 5 ml körperlwarmer Kochsalzlösung befüllt, bevor der Verschluss der Bauchdecke mittels resorbierbarer Fäden erfolgte. Die Tiere wurden nach der Operation in vorgewärmte Einzelkäfige überführt und hatten wieder uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser. Alle acht Stunden nach erfolgter CASP- oder Sham-Operation wurden die Tiere durch eine subkutane Buprenorphin Injektion (0,1 mg/kg) analgetisch abgedeckt. Die Überwachung und Dokumentation des Sepsis-Schweregrades erfolgte alle 12 Stunden mittels Scoring-Protokoll (SRSS, Septic Rat Severity Score, s. Anhang). Versuchstiere, die einen Wert von über zehn Punkten erreichten, wurden umgehend durch die Applikation von Pentobarbital intraperitoneal (800 mg/kg) schmerzlos euthanasiert.

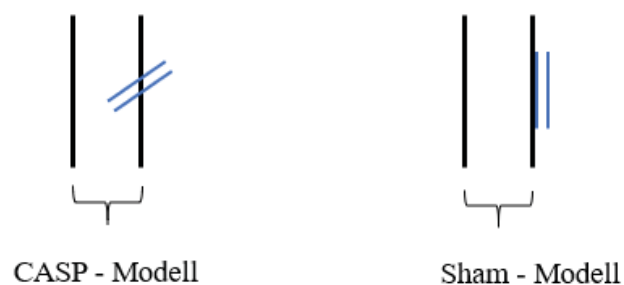


Abb. 2: Modelle der CASP- und Sham-Chirurgie

CASP – Colon ascendens stent peritonitis

2.1.6 Perfusion des Colons

Die Versuchstiere beider Gruppen wurden nach 24 Stunden erneut laparotomiert. Zuvor erhielten die Tiere Buprenorphin subkutan (0,1 mg/kg) zur Analgesie und Pentobarbital intraperitoneal (60 mg/kg) zur Narkoseeinleitung. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einer Wärmematte auf dem zuvor desinfizierten Operationsfeld gelagert und erhielten

eine Tracheotomie zur maschinellen Beatmung. Die normokapnische Beatmung wurde durch regelmäßige Blutgasanalysen überwacht. Die hämodynamische Überwachung der Tiere erfolgte über eine invasive Blutdruckmessung mittels Druckaufnehmer über die *Arteria carotis communis*. Die Temperatur der Versuchstiere wurde rektal kontrolliert und konstant erhalten. Es folgte die erneute Laparotomie entlang der bereits bestehenden Nähte. Anschließend wurden der Zäkumkopf sowie das *Colon ascendens* freigelegt. Nach 30-minütiger Stabilisierungsphase wurde am Übergang vom Zäkumkopf zum *Colon ascendens* ein Venenverweilkatheter der Größe 24 G in das Darmlumen eingelegt. Entsprechend der Gruppeneinteilung wurde über den Katheter zunächst entweder ein in NaCl gelöster Bolus des jeweiligen Medikamentes, oder nur die Trägersubstanz NaCl injiziert. Im Anschluss an die Bolusgabe, wurde ein Perfusor an den Katheter angeschlossen, so dass die Medikamente oder die Trägersubstanz lokal und kontinuierlich über 60 Minuten verabreicht werden konnten. Die entsprechenden Mengenangaben der verabreichten Medikamente und der Trägersubstanz sind in Tabelle 1 dargestellt. Nach erfolgter Perfusion wurden die Versuchstiere unter fortlaufender Narkose durch Exsanguination getötet. Zur weiteren Aufbereitung und respirometrischen Messung wurden etwa 3 cm Colon entnommen.

<p><u>Natriumchlorid 0,9%</u> Bolus: 1 mL Infusion: 0.02 mL/g KG/h</p>
<p><u>Nitroglycerin</u> Bolus: 0.025 µg/g KG in 1 mL NaCl Infusion: 0,02 mL/g KG/h (Konz.: 25 µg/ml)</p>
<p><u>Carbachol</u> Bolus: 0.06 µg/g KG in 1 mL NaCl Infusion: 0,02 mL/g KG/h (Konz.: 60 µg/ml)</p>
<p><u>Nitroglycerin + Carbachol</u> Bolus: 0.025 µg/g KG + 0.06 µg/g KG in 1 mL NaCl Infusion: 0,01 mL/g KG/h+0,01 mL/g KG/h (Konz.: 50 µg/ml +120 µg/ml)</p>

Tabelle 1: Dosierungsangaben der applizierten Medikamente und Trägersubstanzen

mL - Milliliter; g - Gramm; h - Stunde; µg - Mikrogramm; KG - Körpergewicht; Konz. - Konzentration der Lösung

2.2 Laborexperimenteller Teil

2.2.1 Material und Geräte

Im Anhang sind alle Angaben zu den verwendeten Materialien und Geräten hinterlegt.

2.2.2 Chemikalien

Im Anhang sind alle Angaben zu den verwendeten Chemikalien, Reagenzien sowie Pufferlösungen hinterlegt.

2.2.3 Herstellung des Colonomogenats

Das entnommene Colongewebe wurde nach grober Reinigung durch Ausstreichen in ein Becherglas mit 4 Grad kaltem Isolationspuffer (pH 7,15) gegeben. Während der gesamten Aufbereitung wurde das Colongewebe auf Eis gekühlt. Zunächst wurde das Gewicht der Probe mittels Präzisionswaage bestimmt. Die entnommene Colonprobe wurde zur Reinigung in eine mit Isolationspuffer gefüllte Petrischale gelegt. Das Colon wurde längs aufgeschnitten und mit Hilfe einer, in Isolationspuffer getränkten-, Kompresse von Kot und Schleimhautresten befreit. Anschließend wurde das gereinigte Colon gewichtsadaptiert für fünf Minuten in Trypsin-EDTA (0,05%) eingelegt. Trypsin ist eine Endopeptidase, die den Zellverband durch Aufspaltung der Zelladhäsionsmoleküle lockert. Die Gewebeprobe wurde nach Ablauf der fünf-minütigen Trypsinierung erneut in Isolationspuffer gegeben, wobei dieser zusätzlich mit bovinem Serumalbumin (BSA) und einem Protease-Inhibitor (cOmplete™) versetzt wurde, um eine übermäßigen Proteolyse zu verhindern. Das Colongewebe wurde anschließend, im Puffer liegend, mit einer Schere zerkleinert. Mittels Potter – Elvehjem-Verfahren wurden die Colonstücke unter ständiger Kühlung homogenisiert. Dieses Verfahren findet Anwendung, wenn die Zellorganellen trotz Homogenisierung der Zellen, erhalten bleiben sollen. Dabei wird ein Glaszylinder, der einen rotierenden Homogenisierungsstab (2000 rpm) ummantelt, fünfmal auf und ab bewegt. Das Colonomogenat wurde abschließend durch eine Kompresse in ein Zentrifugenröhrchen gefiltert und auf Eis gelagert.

2.2.4 Proteinbestimmung mittels LOWRY-Methode

Um den Sauerstoffverbrauch, bezogen auf die Gesamtproteinmenge im Colonomogenat angeben zu können, wurde die Proteinkonzentration vor jeder gemessenen Probe photometrisch bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Lowry-Methode (68). Diese

basiert auf zwei chemischen Reaktionen. Im ersten Schritt kommt es zur Komplexbildung zwischen den Peptidbindungen der Proteine und den zweiwertigen Kupferionen. Es erfolgt ein dunkel-violetter Farbumschlag. Im zweiten Schritt werden die zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Kupferionen reduziert, wobei die entstandenen einwertigen Kupferionen das zugegebene Folin-Ciocalteu-Reagenz (Phosphomolybdat-Phosphowolframat) zu Molybdänblau reduzieren. Die Extinktion des blauen Farbstoffes, bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750 \text{ nm}$, ist dabei proportional zur Proteinkonzentration. Die enthaltene Proteinmenge im Colonomogenat wurde unter Zuhilfenahme einer Kalibrierungsgeraden bestimmt. Zur Kalibrierung diente eine Standardreihe aus Bovinem Serum Albumin (BSA 1 mg/ml, pH 7,0) mit bekannten Proteinmengen (s. Tabelle 2).

Standard	0	1	2	3	4	5	6
Proteinkonzentration $\mu\text{g/mL}$	0	62,5	125	250	500	750	1000

Tabelle 2: Standardverdünnungsreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung

μg - Mikrogramm; mL - Milliliter

Das Colonomogenat wurde im Verhältnis 1:100 mit *Aqua dest.* verdünnt. Je 500 μL Lösung 1 (s. Anhang) wurden in Mikroreaktionsgefäße pipettiert und anschließend 100 μL aus der Standardreihe oder der verdünnten Colonproben hinzugegeben. Es folgte eine zehn - minütige Inkubationsphase bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 μL Lösung 2 (s. Anhang) hinzugefügt und die Proben weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden jeweils zweimal 200 μL aus den Mikroreaktionsgefäßen der Standardreihe und den verdünnten Colonproben auf eine *96-Wells*-Mikrotiterplatte pipettiert. Abschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750 \text{ nm}$ an einem *Synergy 2 Multi - Mode Microplate Reader* mit dem Programm Gen51.11 photometrisch gemessen. Aus drei technischen Replikaten der verdünnten Colonproben wurde anhand der Ergebnisse ein Mittelwert bestimmt.

2.2.5 Respirometrische Messung

2.2.5.1 Oxidative Phosphorylierung

Die Hauptaufgabe der Mitochondrien ist die Bereitstellung des Energieträgers ATP (Adenosintriphosphat). Die Gesamtheit der Mechanismen der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) umfasst die Bildung der Elektronentransportkette über die Enzymkomplexe (Komplex I - IV) der Atmungskette sowie die daran angeschlossene Phosphorylierungsreaktion zur ATP Gewinnung. Der Elektronentransport in der Atmungskette liefert dabei die Energie zur Bildung eines Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran. Dieser Protonengradient wird von der nachgeschalteten ATP-Synthase zur ATP Synthese genutzt. An den Enzymkomplexen der Atmungskette werden Elektronen über die Reduktionsäquivalente Nicotinamidadenindinukleotid (NADH/H⁺) und Flavin-Adenindinukleotid (FAD/H₂) des Citratzyklus weitergeleitet und schließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen. Der Komplex I (NADH-Dehydrogenase) der Atmungskette nimmt die Elektronen des NADH Moleküls aus der mitochondrialen Matrix auf und überträgt diese auf Ubichinon (Q). Ubichinon wird zu Ubichinol (QH₂) reduziert. Die dabei entstandene Redoxenergie wird zum Export von vier Protonen aus der Matrix in den mitochondrialen Intermembranraum (IMR) genutzt. Komplex II wird von der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus gebildet. Bei der Oxidation von Succinat zu Fumarat werden die freiwerdenden Elektronen zunächst auf FAD, das zu FADH₂ reduziert wird, übertragen. Das FADH₂ Molekül gibt sein Elektronenpaar ebenfalls an Ubichinon ab. Komplex II enthält keinen Protonenkanal und befördert dementsprechend auch keine H⁺-Ionen in den IMR. Der elektrochemische Protonengradient wird somit ausschließlich über Komplex I, III und IV aufgebaut. Komplex III (Cytochrom-C-Reduktase) katalysiert die Übertragung der Elektronen vom QH₂ zum Cytochrom C. Dabei wird der Export von vier Protonen in den mitochondrialen IMR möglich. An Komplex IV (Cytochrom-C-Oxidase) werden die Elektronen von Cytochrom C auf Sauerstoff, unter Bildung von Wasser, übertragen. Cytochrom C wird dabei oxidiert und die zwei freiwerdenden Elektronen genutzt um ein Sauerstoffmolekül, unter Verbrauch von vier Protonen aus der mitochondrialen Matrix, zu zwei Wassermolekülen zu reduzieren. Die angeschlossene ATP-Synthase besteht aus zwei unterschiedlichen Domänen, einer F₀ - und einer F₁ - Untereinheit. Durch die F₀ - Untereinheit der ATP-Synthase strömen Protonen vom IMR in die mitochondriale Matrix zurück und erzeugen so eine Drehbewegung, die Konformationsänderungen in der

F_1 - Untereinheit bewirken. Diese bedingen die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat. Der Protonenfluss durch die ATP-Synthase setzt das fest gebundene ATP frei. Die Kopplung zwischen dem Ablauf der Reaktionen der Atmungskette und der ATP-Synthase wird als zelluläre Atmungskontrolle bezeichnet. Ein Überschuss an ATP oder ein Mangel an ADP hemmen die ATP-Synthase und damit den Protonenrückstrom durch die F_0 - Untereinheit der ATP-Synthase. Infolgedessen nimmt der Elektronenfluss der Atmungskette zum Sauerstoff ab, die oxidierten Moleküle $NADH^+$ und FAD werden nicht mehr reduziert und es stellt sich ein Substratmangel im Citratzyklus ein. Umgekehrt führt eine hohe ADP-Konzentration zu einer Aktivierung der Atmungskette und einer gesteigerten ATP-Synthase.

2.2.5.2 Funktionsweise der Respirometrie

Die Quantifizierung der mitochondrialen Funktion erfolgte über die kontinuierliche Messung der Sauerstoffkonzentration und des Sauerstoffverbrauchs (Respirationsrate) in der Messprobe. Die Messung erfolgte mittels MT200-Respirometers der Firma *Strathkelvin Instruments*. Die Temperatur wurde während der Messung konstant bei 30°C gehalten. Als Temperiergerät diente ein ED Wasserbad. Das Kernstück des Respirometers bildet eine polarographische Sauerstoffelektrode nach Clark, die die Sauerstoffkonzentration in der Messkammer misst (L. Clark, Antioch College, Yellow Springs, Ohio, USA, 1953). Der Sauerstoffsensor besteht aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode, die über eine Kaliumchlorid-Lösung in Verbindung stehen. Der Sensor ist vom Messmedium durch eine selektive, sauerstoffdurchlässige Membran getrennt. Der enthaltene Sauerstoff in der Probe kann durch die Membran diffundieren und wird an der Kathode reduziert. An der Silber-Anode findet eine Oxidation statt. Der infolge dieser elektrochemischen Reaktionen gemessene Stromfluss verhält sich proportional zu der Sauerstoffkonzentration der Messprobe. Mit Hilfe eines elektromagnetischen Rührers wurde ein Sauerstoffdefizit am Sensor verhindert und eine konstante Diffusion des Sauerstoffs durch die Membran sichergestellt. Während der Messungen wurde die Messkammer mithilfe eines Stopfens luftdicht verschlossen, um Veränderungen der Sauerstoffkonzentration durch Diffusionsströme zu verhindern. Im Inneren des Stopfens befand sich eine dünne Kapillare, über die mithilfe einer Applikationskanüle, Substrate in die Messkammer gegeben werden konnten. Die mittels Clarkelektrode kontinuierlich erfassten Sauerstoffkonzentrationswerte in Abhängigkeit vom Stromfluss, wurden computergestützt mit Hilfe des Strathkelvin 782 System Programmes ausgewertet und graphisch dargestellt.

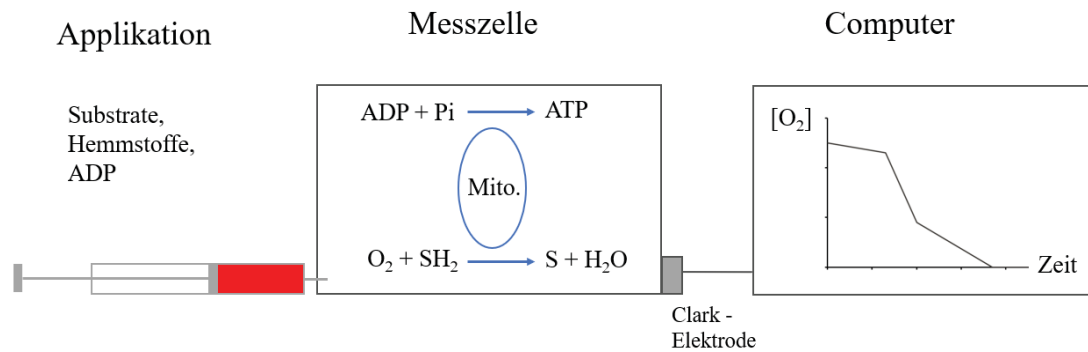


Abb.3: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise des Respirometers

Substrate - Glutamat/Malat, Succinat; Hemmstoffe – Rotenon; ADP – Adenosindiphosphat; Pi - anorganisches Phosphat; ATP – Adenosintriphosphat; Mito.- Mitochondrien; O₂ – Sauerstoff; S – Substrat; H₂ – Wasserstoff; H₂O - Wasser

2.2.5.3 Ablauf der Respirometrie

Vor Beginn der ersten Messung erfolgte die Eichung des Sensors mittels Zwei-Punkt-Kalibrierung. Zur Positivkontrolle diente eine durch Schütteln mit Sauerstoff angereicherte *Aqua dest.* Probe (Zielwerte 500-700 pA). Die Negativkontrolle wurde mittels Natriumsulfidlösung durchgeführt. Durch die Natriumsulfidlösung wurde der Sauerstoff in der Messprobe gebunden und die Sauerstoffkonzentration entsprach praktisch dem Nullwert (Zielwerte 0-50 pA). Um konstant mit einer Proteinendkonzentration von 6mg/ml zu messen, wurde das Colonomogenat vor jeder Messung mit 30 Grad warmen Respirationpuffer (siehe Anhang) gemischt. Die mitochondriale Atmungsaktivität wurde nach Zugabe von Substraten und ADP über die Zeit gemessen. Der Sauerstoffverbrauch in der Colonprobe wurde zunächst über eine Minute, ohne die Zugabe von Substraten oder ADP, gemessen. Nach Ablauf der ersten Minute wurden über die Kapillare im Inneren des Stopfens Substrate des Citratzyklus appliziert. In getrennten Messvorgängen wurde zur Stimulation von Komplex I und II der Atmungskette entweder Glutamat (2,5 mM) und Malat (2,5 mM) oder Succinat (5 mM) appliziert. Um beide Komplexe getrennt voneinander überprüfen zu können wurde neben Succinat auch noch Rotenon (0,5 µM), ein Hemmstoff des Komplex I appliziert, der eine selektive Beurteilung der Succinat-Dehydrogenase ermöglicht. Nach einer weiteren Minute wurde ADP (50 µM) der Messkammer hinzugefügt. Die Messdauer betrug insgesamt sechs Minuten. Nach jeder Messung wurde die Messkammer mittels *Aqua dest.* und Ethanol gereinigt.

2.2.5.4 Messwerte der Respirometrie

Während der Messungen wurden die verschiedenen Zustände der Respiration (*respiratory states*) erfasst (s. Abb. 4). Aus diesen Werten wurden anschließend respiratorische Atmungsquotienten (*respiratory ratios*) ermittelt. Die State 2 Atmungsphase gibt die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches nach Zugabe der Substrate des Citratzyklus an. Durch die Oxidation der Substrate für Komplex I und II und die Reduktion der Reduktionsäquivalente zu NADH/H⁺ und FADH² wird die Atmungskette aktiviert. Nach Verbrauch der Substrate stellt sich zunächst der basale Sauerstoffverbrauch der Atmungskette ein. Nach Zugabe von ADP wird die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit über State 3 angegeben. Das angereicherte ADP in der Messkammer signalisiert eine ATP Verarmung und regt so zur maximalen Stimulation der mitochondrialen Atmung an (Atmungskontrolle). Der Sauerstoffverbrauch steigt durch die energieaufwendige Phosphorylierung von ADP zu ATP. Der dabei gemessene ADP-abhängige Sauerstoffverbrauch wurde als Delta O angegeben. Nach Verbrauch des zugegebenen ADP wurde State 4 erreicht. Dieser Zustand entspricht annähernd der basalen Geschwindigkeit der Atmungskette und endet nach vollständigem Verbrauch des Sauerstoffes. Als Maß für die Kopplung zwischen Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung diente der respiratorische Kontrollquotient (RCI), der sich aus dem Verhältnis von State 3 zu State 2 errechnet.

$$\text{RCI} = \text{State 3/State 2}$$

Liegt eine Schädigung der mitochondrialen Innenmembran vor, wird der Protonenrückfluss in den Matrixraum möglich und es kommt zur Substratoxidation ohne ATP Synthese. Je kleiner der RCI desto größer ist folglich der Entkopplungsgrad zwischen Atmungskette und ATP Synthese. Die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung wurde anhand des Quotienten aus der zugegebener ADP Menge und dem Sauerstoffverbrauch über State 3 bestimmt.

Im Falle einer Abkopplung der Atmungskette von der ATP-Synthese ist die ADP/O-Ratio gleich 0. Die Respirationsraten wurden in nmol/min/mg Protein angegeben. Die Löslichkeit des Sauerstoffs wurde entsprechend des Strahlkelvin Handbuchs mit 223 µmol O₂/l bei 30°C angenommen.

$$\text{ADP/O-Ratio} = \text{zugegebenes ADP}/\Delta\text{O}_2$$

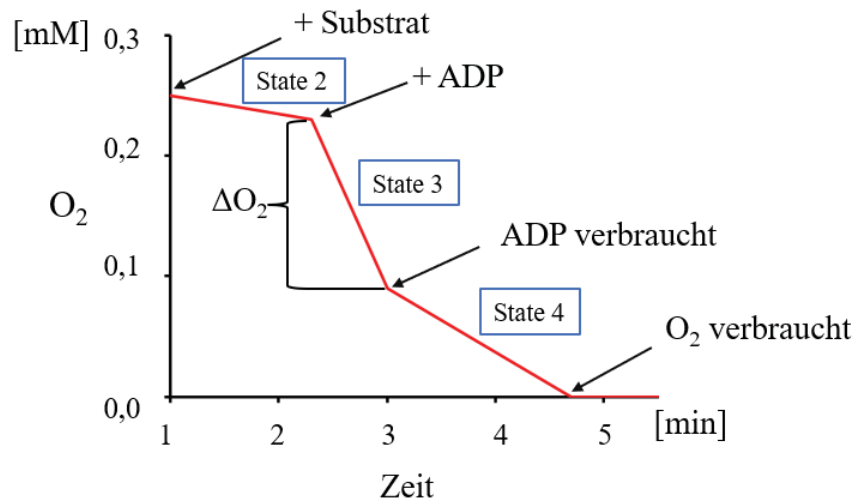


Abb. 4: Schematische Darstellung der Messkurve

mM - Millimolar, O_2 - Sauerstoff, ΔO_2 - Sauerstoffverbrauch in State 3, ADP - Adenosindiphosphat, min - Minute

2.2.5.5 Kontrollmessungen

Die Kontrollmessungen wurden mit Cytochrom C ($2,5 \mu\text{M}$) und Oligomycin ($0,05 \mu\text{g/ml}$) nach jeder Messung, mit jeweils Succinat oder Glutamat-Malat als Substrat, durchgeführt. Cytochrom C ist an der Außenseite der Mitochondrienmembran als Elektronentransportprotein Bestandteil der Atmungskette. Ein Integritätsverlust der äußeren Mitochondrienmembran, durch eine Beschädigung des Gewebes während der Aufbereitung, würde so zu einer Diffusion des Cytochrom C ins Interstitium führen. Das Cytochrom C würde als Elektronenüberträger fehlen und die Atmungskettenaktivität entsprechend abnehmen. Wird unter diesen Umständen Cytochrom C, bei maximaler Atmungsaktivität (State 3 Atmung) appliziert, steigen sowohl die Atmungsaktivität als auch die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit stark an. Cytochrom C gilt somit als Marker für die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran (69). Blieben die Respirationskurven durch die Zugabe des Cytochrom C unverändert, wurde im Anschluss das Antibiotikum Oligomycin als Atmungsinhibitor hinzugegeben. Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase der Atmungskette, indem es ihren Protonenkanal, der für die Phosphorylierung von ADP zu ATP notwendig ist, blockiert. Der Elektronentransport in der Atmungskette dient folglich nur noch der Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Dadurch sinkt der Sauerstoffverbrauch und es stellt sich eine basale Atmungsaktivität (State 2-Atmung) ohne ATP-Synthese ein. Bleibt nach Zugabe von Oligomycin der Abfall der Atmungskettenaktivität aus, ist dies ein Hinweis auf eine bereits bestehende Protonenleckatmung.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte im Rahmen einer einfachen Varianzanalyse, mittels Kruskal-Wallis-Tests weil sich die erhobenen Daten nicht normal verteilt zeigten. Zur Signifikanztestung wurde ein Post-hoc-Test nach Dunn's durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ angesehen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

3 Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob die lokale Applikation von Nitroglycerin, Carbachol oder deren Kombination die MF des Colons unter septischen und nicht septischen Bedingungen beeinflusst, wurden der RCI und der ADP/O Quotient bestimmt. Der RCI diene als Maß für die Kopplung zwischen der Atmungskette und der OXPHOS und errechnet sich aus dem Verhältnis State 3 zu State 2. Die Effizienz der OXPHOS wurde über den ADP/O Quotienten errechnet.

Der RCI für Komplex I und Komplex II blieb in allen behandelten Gruppen unverändert gegenüber der Kontrolle sowohl nach CASP-als auch nach Sham-Operation.

Auch die ADP/O-Ratio blieb für beide Komplexe in allen behandelten Gruppen unverändert gegenüber der Kontrolle sowohl in CASP-als auch Sham operierten Tieren.

Die Ergebnisse der respirometrischen Messung sind für die Sham operierten Tiere in Abbildung 5 und Tabelle 3 dargestellt. Die Ergebnisse für die CASP-operierten Tiere sind Abbildung 6 und Tabelle 4 zu entnehmen.

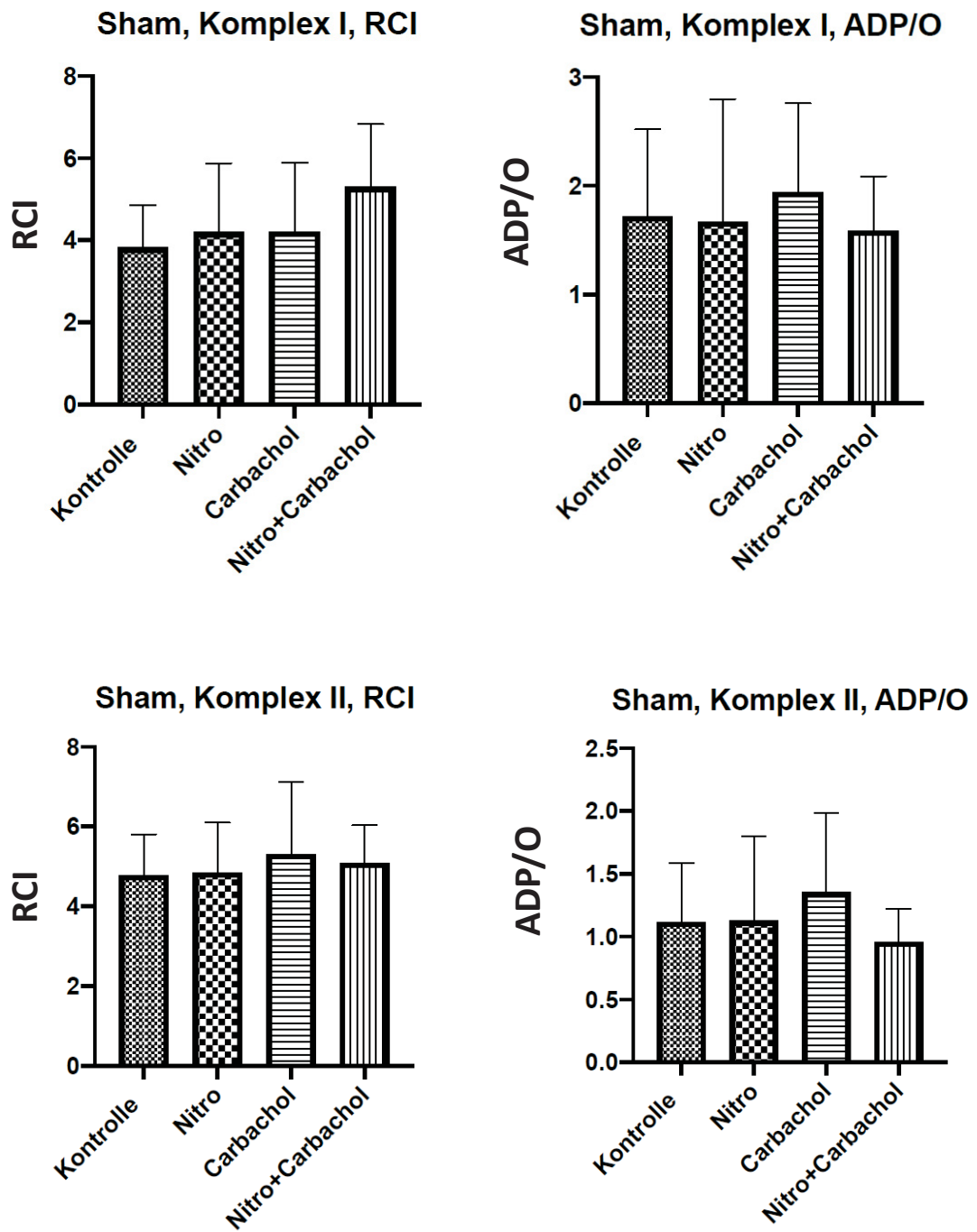


Abbildung 5: RCI und ADP/O-Ratio für Komplex I und Komplex II in Sham-operierten Tieren

RCI für Komplex I und Komplex II sowie die ADP/O-Ratio für Komplex I und Komplex II der Atmungskette im Colonhomogenat unter nicht septischen Bedingungen, nach lokaler Applikation von Nitroglycerin, Carbachol, Nitroglycerin+Carbachol oder der Kontrollsubstanz Natriumchlorid. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (Nitroglycerin n=14, Carbachol n=14, Nitroglycerin+Carbachol n=11, Kontrolle n=13)

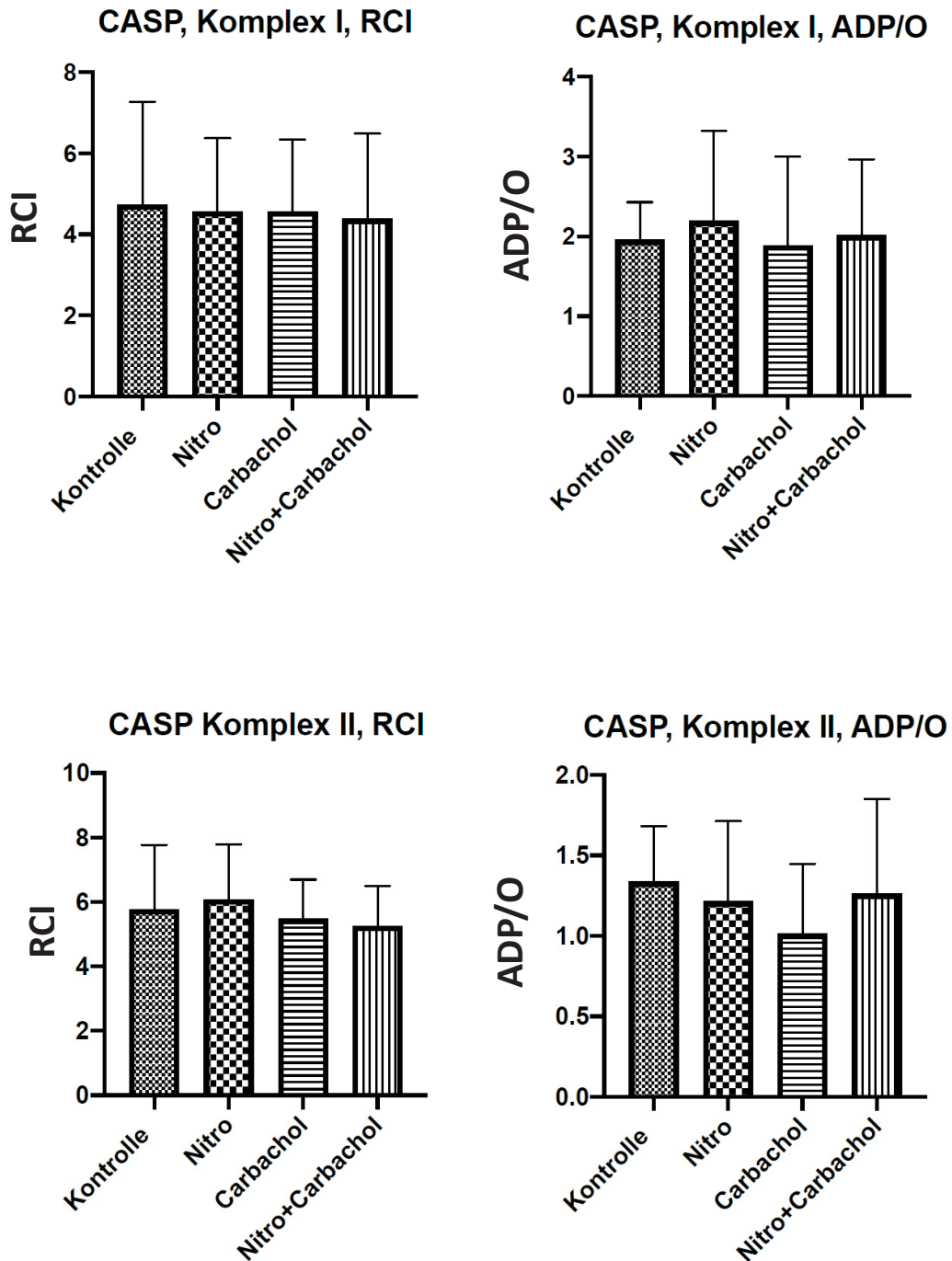


Abbildung 6: RCI und ADP/O-Ratio für Komplex I und Komplex II in CASP-operierten Tieren

RCI für Komplex I und Komplex II sowie die ADP/O-Ratio für Komplex I und Komplex II der Atmungskette im Colonhomogenat unter septischen Bedingungen, nach lokaler Applikation von Nitroglycerin, Carbachol, Nitroglycerin+Carbachol oder der Kontrollsubstanz Natriumchlorid. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung (Nitroglycerin n=12, Carbachol n=12, Nitroglycerin+Carbachol n=18, Kontrolle n=15).

SHAM-Tiere	Kontrolle	Nitroglycerin	Carbachol	Nitroglycerin + Carbachol
RCI Komplex I	3,83±1,02	4,20±1,68	4,22±1,68	5,31±1,52
ADP/O Komplex I	1,72±0,80	1,67±1,13	1,94±0,82	1,55±0,49
RCI Komplex II	4,77±1,03	4,85±1,26	5,30±1,82	5,04±1,82
ADP/O Komplex II	1,12±0,47	1,13±0,68	1,35±0,63	0,94±0,23

Tabelle 3: RCI und ADP/O-Ratio für Komplex I und Komplex II in Sham operierten Tieren

In vivo Effekte von lokal appliziertem Nitroglycerin, Carbachol, Nitroglycerin+Carbachol sowie der Kontrollsubstanz Natriumchlorid auf die MF in Colonhomogenaten von Sham-operierten Tieren. Alle Werte sind Mittelwerte ± Standartabweichung (Nitroglycerin n=14, Carbachol n=14, Nitroglycerin+Carbachol n=11, Kontrolle n=13).

CASP-Tiere	Kontrolle	Nitroglycerin	Carbachol	Nitroglycerin + Carbachol
RCI Komplex I	4,74±2,53	4,56±1,81	4,56±1,77	4,39±2,10
ADP/O Komplex I	1,96±0,47	2,20±1,13	1,88±1,12	2,01±0,95
RCI Komplex II	5,78±2,01	6,08±1,70	5,48±1,22	5,25±1,25
ADP/O Komplex II	1,33±0,35	1,22±0,50	1,01±0,43	1,26±0,59

Tabelle 4: RCI und ADP/O-Ratio für Komplex I und Komplex II in CASP operierten Tieren

In vivo Effekte von lokal appliziertem Nitroglycerin, Carbachol, Nitroglycerin+Carbachol sowie der Kontrollsubstanz Natriumchlorid auf die MF in Colonhomogenaten von CASP-operierten Tieren. Alle Werte sind Mittelwerte ± Standartabweichung (Nitroglycerin n=12, Carbachol n=12, Nitroglycerin+Carbachol n=18, Kontrolle n=15).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die lokale Applikation von Nitroglycerin und/oder Carbachol *in vivo* die MF des Colons im septischen Rattenmodell beeinflusst. Zur Induktion einer Sepsis diente das CASP-Modell, die Kontrollgruppen erhielten eine analoge Operation. Durch die erfolgte Forschungsarbeit im Rahmen dieser Dissertation kann folgende zentrale Aussage getroffen werden:

Die lokale Applikation von Nitroglycerin und/oder Carbachol *in vivo* hat keinen Einfluss auf die MF des Colons unter septischen und nicht septischen Bedingungen im Rattenmodell.

4.1 Methodendiskussion

Um eine adäquate Untersuchung der MF zu gewährleisten, war es in unserer Versuchreihe von besonderer Relevanz, dass das gewählte Tiermodell möglichst genau die pathophysiologischen Veränderungen während einer schweren Sepsis in der Humanmedizin widerspiegelt. Dabei scheinen vor allem Langzeitmodelle durch vergleichbare Ergebnisse bei einer Sepsis im Menschen sehr repräsentativ zu sein (35). Das von uns angewandte CASP-Modell ist ein hoch standardisiertes Verfahren zur Induktion einer polymikrobiell abdominalen Sepsis bei Nagern (64). Dabei führt das Einbringen eines Stents, in den aufsteigenden Dickdarm, zum kontinuierlichen Austritt von Faeces in die Bauchhöhle. In unserem Institut für experimentelle Anästhesiologie hat sich das Verfahren bereits etabliert und vermehrt Anwendung gefunden (67,70). In einem alternativen Modell wird die Sepsis durch das CLP-Verfahren (*cecal ligation and puncture*) ausgelöst. Dabei wird das Zökum nach erfolgter Ligatur mittels Venenverweilkatheter punktiert. Es entsteht eine intraabdominale Abszessbildung mit einer im Vergleich zum Menschen weniger starken und prolongierten Entzündungsphase. Die lokale Kontrolle eines septischen Fokus führt im CLP-Modell meist zu geringen Zeichen einer systemischen Infektion und keiner ausreichenden Veränderung der intestinalen Mikrozirkulation (71). Da für unsere Versuchreihe eine unkontrollierte systemische Erregerausbreitung, im Sinne eines dauerhaften Sepsisfokus relevant war, kam dieses Verfahren für uns nicht in Betracht (72). Ein weiteres standardisiertes Modell ist die LPS (Lipopolysaccharid) Injektion. Auf Grund eines einmaligen, starken, inflammatorischen Stimulus, in Form einer intravenösen oder intra-

peritonealen Endotoxin-Bolusinjektion, wird ein schneller und hoher aber nur vorübergehender Anstieg von inflammatorischen Mediatoren im Organismus getriggert (71). Dies steht im Gegensatz zur klinischen Situation, in welcher ein infektiöser Fokus über einen längeren Zeitraum besteht (73). Da im Vergleich zur polymikrobiellen humanen Sepsis nicht die Gesamtheit der komplexen Reaktionsmechanismen repräsentiert wird und diese entscheidend für die Veränderungen der Mikrozirkulation sind, haben wir uns auch gegen dieses Sepsismodell entschieden (74). Im Vergleich zu den anderen Modellen ahmt das von uns genutzte CASP-Verfahren, durch den kontinuierlichen Austritt von Faezes in die Bauchhöhle, die Entwicklung einer diffusen Peritonitis mit früher und stetig zunehmender Infektion und Entzündung nach. Die CASP-Operation spiegelt folglich den klinischen Verlauf einer Anastomoseninsuffizienz nach erfolgter Darmoperation sehr gut wider, entsprechend ist von einer guten klinischen Vergleichbarkeit auszugehen (65). Trotz dessen sollte eine Übertragung von Ergebnissen von Tier auf Mensch immer sorgfältig geschehen.

Die Kontrollgruppen erhielten eine analoge Operation, wobei nur ein Venenverweilkatheter der Größe 14 G verwendet wurde und dieser nicht perforierend implantiert, sondern lediglich auf die Darmwand aufgenäht wurde. Die Sham-Operation wurde vollzogen um systematische Fehler, durch die bloßen Operationsbegleiterscheinungen, zu vermeiden. Herminghaus et al. zeigten aber bereits 2015, dass im Leberhomogenat sowohl bei scheinoperierten- als auch bei CASP-Tieren der RCI für Komplex I und II 24 Stunden nach der Operation im Vergleich zu nicht operierten Kontrolltieren erhöht war. Eine Hochregulierung der MF im Lebergewebe durch operativen Stress konnte somit nachgewiesen werden (70). Da in unserer Versuchsreihe jedes Tier einer CASP- oder Scheinoperation unterzogen wurde, kann in unserer Kontrollgruppe von keiner unbeeinflussten Kreislaufsituation ausgegangen werden, sondern lediglich von einer nicht septischen.

Bezüglich der lokalen Therapie mit Nitroglycerin lagen nach eingehender Literaturrecherche keine Daten zum Vergleich vor, so dass sich die Dosierung an einer Vorstudie unserer Arbeitsgruppe orientierte. Dabei zeigten Truse et al. in einer Hundemodellstudie, dass die topische Gabe von Nitroglycerin die regionale Sauerstoffversorgung des Magens verbessert und die Integrität der Magenschleimhautbarriere erhalten bleibt (46). Die Dosierung des Carbachols wurde analog zu einer Untersuchung von Bao et al. gewählt. In

dieser Studie konnte anhand eines Darmperfusionsmodells eine verbesserte gastrointestinale Durchblutung durch lokal appliziertes Carbachol, im Rattenmodell, nachgewiesen werden (60). Die entsprechenden Mengenangaben der verabreichten Medikamente und der Trägersubstanz sind in Tabelle 1 dargestellt.

Zur lokalen Applikation der Medikamente bzw. der Kontrollsubstanz wählten wir ein Perfusionsmodell des Colons in Anlehnung an die von Bao et al. 2010 beschriebene Methode (60). Die topische Applikation der Medikamente bzw. der Kontrollsubstanz erfolgte über eine Kanüle der Größe 24 G, welche 2 cm distal des zuvor platzierten Colon Stents eingebracht wurde. Darüber wurde der jeweilige Bolus und anschließend die fortlaufende Infusion über eine Stunde verabreicht. Durch die kontinuierliche Spülung des Colons versprachen wir uns eine ausreichende Permeabilität und Absorption der Medikamente durch die intestinalen Zellen und somit eine effektive Gewebedosis im zu untersuchenden Gewebe.

Zur Messung der MF wählten wir die Methode der Respirometrie, die in unserem Labor bereits in mehreren Versuchsreihen Anwendung fand (41,54,70). Dabei erfolgt die Quantifizierung der MF über die kontinuierliche Messung der Sauerstoffkonzentration und des Sauerstoffverbrauchs über die Zeit im homogenisierten Gewebe. Die gegen Ende jeder respiratorischen Messung ermittelten respiratorischen Atmungsquotienten beziehen sich dabei aber nur auf einen Teilaspekt der MF und spiegeln diese nicht in ihrer Komplexität wider. Zur Untersuchung der MF können Gewebehomogenate oder alternativ isolierte Mitochondrien dienen. Wir untersuchten in unserer Forschungsreihe die MF im Colonhomogenat um mögliche Beschädigungen der Mitochondrien während des aufwendigen mechanischen Isolierungsprozesses zu vermeiden. Im Rahmen des Isolierungsprozesses kann es zudem zum Verlust von Mitochondrien kommen, wobei nur einzelne Fraktionen wie zum Beispiel nur ganz unversehrte Mitochondrien isoliert werden. Eine Verfälschung der Forschungsergebnisse wäre in diesem Fall nicht auszuschließen (75). Pecinová et al. zeigten bereits 2011, dass Colonomogenate gegenüber isolierten Mitochondrien vergleichbare qualitative mitochondriale Parameter bieten. Um in unserer Versuchsreihe mögliche Messfehler, die mit einem Integritätsverlust der Mitochondrienmembran oder mit einer Störung des Membranpotentials einhergehen, zu detektieren, führten wir nach jeder Messung Kontrollmessungen, die in Kapitel 2.2.5.5 beschrieben sind durch.

4.2 Ergebnisdiskussion

In dieser Forschungsarbeit konnte durch die lokale Applikation von Nitroglycerin und/oder Carbachol keine Beeinflussung der MF im septischen und nicht septischen Rattenmodell nachgewiesen werden. Generell zeigen viele Studien, die die MF während eines septischen Prozesses untersuchten, Widersprüchlichkeiten in ihren Ergebnissen auf. So zeigen einige Publikationen einen Anstieg des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches (32-34) während andere Untersuchungen unter ähnlichen Bedingungen eine Abnahme des mitochondrialen Sauerstoffverbrauches beschreiben (35-37). Geller et al. und Mittal et al. konnten wiederum, vergleichbar mit den Ergebnissen unserer Forschungsarbeit, keinen veränderten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch unter septischen Bedingungen beobachten (38,39). Die Diskrepanz dieser Ergebnisse ist unter anderem auf die unterschiedliche Herkunft der Mitochondrien, auf das verwendete *in vivo*, *in vitro* Sepsismodell, die Methodik zur Quantifizierung der MF sowie das jeweilige Stadium der Erkrankung zurückzuführen (34). Eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander scheint somit nicht gegeben zu sein.

Es bleibt außerdem zu berücksichtigen, dass durch die Ermittlung von Atmungsquotienten mittels Respirometrie nur ein Teilaspekt des komplexen mitochondrialen Metabolismus unter septischen Bedingungen untersucht wurde. Inwieweit Nitroglycerin und/oder Carbachol trotz unveränderter respiratorischer Parameter zu einer Beeinflussung des mitochondrialen Stoffwechsels unter septischen Bedingungen führen, müsste in weiterführenden Studien untersucht werden.

Studiendaten zur MF des Colons unter septischen Bedingungen liegen bis heute kaum vor. Herminghaus et al zeigten als erste 2019, dass die MF des Colons weder durch die sterile Laparotomie, noch durch die CASP-Operation, im zeitlichen Verlauf über 96 Stunden moduliert wird (41). Die mitochondriale Atmung im Dickdarm scheint somit von der abdominalen Infektion weitgehend unbeeinflusst zu bleiben. Dieses Ergebnis ist eher unerwartet, da davon auszugehen ist, dass das Colon als Ort der Sepsisentstehung und Motor der abdominalen Sepsis, stärker von einer mikrozirkulatorischen Dysfunktion und damit von einer beeinträchtigten Sauerstoffversorgung während eines septischen Prozesses betroffen ist. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass das Kolonepithel aufgrund seiner integralen Rolle bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase, eine Reihe von Adaptionsmechanismen entwickelt hat, um unter anderem die Barrierefunktion auch unter ungünstigen Bedingungen zu bewahren (76,77). Karhausen et al. konnten nachweisen, dass unter Hypoxie eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierbarer Faktor (HIF) im Kolonepithel die Regulation von barrierschützenden Genen konstitutiv induziert. Durch die verstärkte Aktivierung des HIF wird folglich die Anpassung an eine eingeschränkte Sauerstoffverfügbarkeit

gewährleistet, wodurch es Epithelzellen auch unter Entzündung und Hypoxie möglich ist effektiv als Barriere zu fungieren (78). In anderen Studien konnte außerdem beobachtet werden, dass sich die Mitochondrien des Dickdarms an den Energiebedarf der Zelle unter septischen Bedingungen anpassen können (79,80). So können die unmerklichen Veränderungen des O₂-Verbrauchs auf einen geringeren ATP-Bedarf in diesem Gewebe unter septischen Bedingungen zurückzuführen sein (77). Dies könnte ansatzweise eine Erklärung für die unveränderte MF des Colons während eines septischen Prozesses oder nach erfolgter steriler Laparotomie sein.

Truse et al. führten 2017 eine *in vivo* Versuchsreihe durch, in der gezeigt wurde, dass unter hämorrhagischen Bedingungen im Hundemodell, die topische Gabe von Nitroglycerin die regionale Sauerstoffversorgung des Magens verbessert und die Integrität der Magenschleimhautbarriere erhalten bleibt (46). Um zu prüfen, ob der NO-Donator Nitroglycerin neben einer regional gesteigerten Oxygenierung auch möglicherweise Einfluss auf die MF nimmt, führten Herminghaus et al. 2018 eine *in vitro* Versuchsreihe im gesunden Rattenmodell durch. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die lokale Nitroglycerinapplikation die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) in Mitochondrien des Colons verbessert (54). Die Forschungsergebnisse unserer Versuchsreihe stehen zunächst im Widerspruch zu der oben genannten Vorstudie. In unserer Versuchsreihe fand aber ein septisches Rattenmodell *in vivo* Anwendung und auch die Kontrolltiere erhielten eine Sham-Operation. Eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der *in vitro* Versuchreihe im gesunden Rattenmodell und unseren Forschungsergebnissen ist somit nicht möglich. Im Vergleich zur Vorstudie wird in unserer *in vivo* Versuchsreihe zudem der Darm während der Medikamentenapplikation, unter annähernd physiologischen Bedingungen gehalten und so die Integrität des Gewebes bewahrt. Es ist somit von einer funktionsfähigen Darmbarriere, einer intakten Blutversorgung und einer vollständigen Nachahmung der normalen Verdauungs- und Absorptionsdynamik des Darms auszugehen (81).

Das Absorptionsverhalten der Medikamente *in vitro* lässt generell nur eingeschränkt eine Vorhersage über Permeabilität und Löslichkeit, die als wichtigste Determinanten der intestinalen Absorption gelten, in einem Modell unter *in vivo* Bedingungen, zu.

Es wird vermutet, dass die Löslichkeit der Arzneimittel im Dickdarm aufgrund mehrerer Faktoren, einschließlich des geringeren Wassergehalts, der unregelmäßigen Motilität und des Mangels an Gallensalzen, stärker eingeschränkt ist (82,83). Darüber hinaus ist der Gastrointestinaltrakt mit einer großen Anzahl von Bakterien besiedelt, von denen die meisten im Dickdarm lokalisiert sind. Die Stabilität eines Arzneimittels in der Mikrobiota scheint von klinischer Relevanz, da gezeigt wurde, dass der Metabolismus der Bakterien ein Medikament in ein pharmakologisch aktives, inaktives oder toxisches, umwandeln

kann. Viele Arzneimittel sind zudem Substrate für Dickdarmbakterien die zu einem Abbau dieser führen können und somit erheblichen Einfluss auf ihre Bioverfügbarkeit nehmen (84,85). Dies könnte eine Erklärung für eine reduzierte Bioverfügbarkeit und somit für den fehlenden Effekt nach topischer Applikation von Nitroglycerin und/oder Carbachol im Colon unter septischen und nicht septischen Bedingungen sein.

Der lokale Einfluss von Carbachol auf die MF wurde bislang nicht untersucht, so dass eine unzureichende Studienlage die adäquate Vergleichbarkeit zwischen Vorstudien und den vorliegenden Forschungsergebnissen einschränkt. Mögliche Erklärungsansätze für die unbeeinflusste MF nach lokaler Carbacholapplikation bedingen somit die Auseinandersetzung mit der Wirkungsweise von Carbachol.

Carbachol entwickelt einen Großteil seiner vasodilatatorischen Wirkung Endothel-abhängig über muskarinerge M1- und M3- Acetylcholin Rezeptoren. Calciumabhängig wird die Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) aktiviert, die über eine erhöhte Stickstoffmonoxid (NO) Produktion eine Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße induziert (86,87). Carbachol entfaltet seine vasodilatatorische Wirksamkeit auch Endothel-unabhängig, über die Aktivierung präsynaptischer muskarinerge M1 und M3 Rezeptoren auf vaskulären Nervenzellen. Eine vermehrte Freisetzung von *Calcitonin-gene-related-peptide* (CGRP) bewirkt dabei eine Relaxation der vaskulären glatten Muskulatur. Tangsucharit et al. zeigten in Versuchen mit unterschiedlichen Dosierungen von Acetylcholin im Rattenmodell, dass ausschließlich höhere Mengen von Acetylcholin zu einer Aktivierung des Endothel-unabhängigen Weges führten (87,88). Es ist also nicht auszuschließen, dass die in unserer Versuchsreihe verwendete Carbachol Konzentration nicht ausreichte, um eine potentielle Modulation der MF zu bewirken. Anders als Nitroglycerin, welches unabhängig von der NO-Synthase, zu NO metabolisiert, bewirkt Carbachol über die Aktivierung der NO-Synthase die NO-Bildung. Die NO-Synthase katalysiert über die Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff die Bildung von L-Citrullin, Wasser und NO, welches unter anderem entscheidend ist für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase. Tetrahydrobiopterin (BH4) ist ein wesentlicher Cofaktor für die Aktivität aller Isoformen der NO-Synthase. Niedrige BH4-Spiegel werden mit dem Auftreten von endothelialen Dysfunktionen in Verbindung gebracht. Mehrere biochemische Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung der NO-Synthase in Gegenwart suboptimaler BH4-Konzentrationen zu einer Entkopplung der Sauerstoffreduktion und der Argininoxidation führt, wodurch Superoxid statt NO gebildet wird (89). Es wird somit postuliert, dass BH4 als Redox-Schalter fungiert, der die Freisetzung von Superoxid verringert und die NO-Bildung fördert (89). In experimentellen Ischämie-Reperfusionen-Modellen konnte das exogene Zuführen von BH4 die mikrozirkulatorische Perfusion verbessern (90,91). Auch in Sepsismodellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Zugabe von BH4 zu einer Verbesserung

der Mikrozirkulation führt (92-94). Ob sich ein gesteigertes BH4 Angebot auf die Carbacholwirkung hinsichtlich der Modulation der MF auswirkt, wäre ein interessanter Ansatz und in Folgestudien zu prüfen.

4.3 Schlussfolgerung

Anhand der vorliegenden Ergebnisse scheinen Nitroglycerin und/oder Carbachol die MF im Rattenmodell weder unter septischen- noch unter nicht septischen Bedingungen zu beeinflussen. Eine mögliche Ursache könnte das durch entzündliche Prozesse beeinflussbare Absorptionspotential im Dickdarm sein. Auch eine veränderte Wirkungsweise von Nitroglycerin und/oder Carbachol unter entzündlichen oder septischen Bedingungen könnte zu einer eingeschränkten Bioverfügbarkeit führen und somit eine effektive Absorption, die zu einer messbaren Beeinflussung der MF führt, verhindern. Zur genaueren Abklärung müssen allerdings weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass viele Studien, die die MF während eines septischen Prozesses untersuchten, Divergenzen in ihren Ergebnissen zeigten. Die Widersprüchlichkeit dieser Ergebnisse lässt eine variable MF unter septischen Bedingungen vermuten und bedingt somit eine weitere intensive Forschung.

5 Literaturverzeichnis

1. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, et al. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(10):159-166.
2. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(3):259-272.
3. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Crit Care Med.* 2012;40(3):754-761.
4. Eissa D, Carton EG, Buggy DJ. Anaesthetic management of patients with severe sepsis. *Br J Anaesth.* 2010;105(6):734-743.
5. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med.* 2013;41(5):1167-1174.
6. Prescott HC, Angus DC. Enhancing Recovery From Sepsis: A Review. *JAMA.* 2018;319(1):62-75.
7. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA.* 2010;304(16):1787-1794.
8. Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med.* 2010;38(5):1276-1283.
9. Schmidt KF, Schwarzkopf D, Baldwin LM, Brunkhorst FM, Freytag A, Heintze C, et al. Long-Term Courses of Sepsis Survivors: Effects of a Primary Care Management Intervention. *Am J Med.* 2020;133(3):381-385 e385.
10. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-810.
11. Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med.* 2007;35(10):2408-2416.
12. Grip J, Jakobsson T, Tardif N, Rooyackers O. The effect of plasma from septic ICU patients on healthy rat muscle mitochondria. *Intensive Care Med Exp.* 2016;4(1):20.

13. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32(9):1825-1831.
14. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care.* 2005;9 Suppl 4:S13-19.
15. De Backer D, Donadello K, Sakr Y, Ospina-Tascon G, Salgado D, Scolletta S, et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. *Crit Care Med.* 2013;41(3):791-799.
16. De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent JL. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence.* 2014;5(1):73-79.
17. Lipinska-Gediga M. Sepsis and septic shock-is a microcirculation a main player? *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2016;48(4):261-265.
18. Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;202(3):361-370.
19. Vallet B, Wiel E. Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S36-41.
20. Dhillon SS, Mahadevan K, Bandi V, Zheng Z, Smith CW, Rumbaut RE. Neutrophils, nitric oxide, and microvascular permeability in severe sepsis. *Chest.* 2005;128(3):1706-1712.
21. Buwalda M, Ince C. Opening the microcirculation: can vasodilators be useful in sepsis? *Intensive Care Med.* 2002;28(9):1208-1217.
22. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Karl IE. Endothelial cell apoptosis in sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30(5 Suppl):S225-228.
23. Garrabou G, Moren C, Lopez S, Tobias E, Cardellach F, Miro O, et al. The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis.* 2012;205(3):392-400.
24. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* 2011;107(1):57-64.
25. Balestra GM, Legrand M, Ince C. Microcirculation and mitochondria in sepsis: getting out of breath. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2009;22(2):184-190.
26. Jeger V, Djafarzadeh S, Jakob SM, Takala J. Mitochondrial function in sepsis. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(5):532-542.
27. Elbers PW, Ince C. Mechanisms of critical illness--classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Crit Care.* 2006;10(4):221.

28. Fink MP. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit Care*. 2002;6(6):491-499.
29. Rosser DM, Manji M, Cooksley H, Bellingan G. Endotoxin reduces maximal oxygen consumption in hepatocytes independent of any hypoxic insult. *Intensive Care Med*. 1998;24(7):725-729.
30. King CJ, Tytgat S, Delude RL, Fink MP. Ileal mucosal oxygen consumption is decreased in endotoxemic rats but is restored toward normal by treatment with aminoguanidine. *Crit Care Med*. 1999;27(11):2518-2524.
31. Boekstegers P, Weidenhofer S, Kapsner T, Werdan K. Skeletal muscle partial pressure of oxygen in patients with sepsis. *Crit Care Med*. 1994;22(4):640-650.
32. Takeyama N, Itoh Y, Kitazawa Y, Tanaka T. Altered hepatic mitochondrial fatty acid oxidation and ketogenesis in endotoxic rats. *Am J Physiol*. 1990;259(4 Pt 1):E498-505.
33. Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys*. 1997;345(2):278-288.
34. Kozlov AV, Staniek K, Haindl S, Piskernik C, Ohlinger W, Gille L, et al. Different effects of endotoxic shock on the respiratory function of liver and heart mitochondria in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(3):G543-549.
35. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(3):R491-497.
36. Larche J, Lancel S, Hassoun SM, Favory R, Decoster B, Marchetti P, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(2):377-385.
37. Nin N, Cassina A, Boggia J, Alfonso E, Botti H, Peluffo G, et al. Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care Med*. 2004;30(12):2271-2278.
38. Geller ER, Jankauskas S, Kirkpatrick J. Mitochondrial death in sepsis: a failed concept. *J Surg Res*. 1986;40(5):514-517.
39. Mittal A, Hickey AJ, Chai CC, Loveday BP, Thompson N, Dare A, et al. Early organ-specific mitochondrial dysfunction of jejunum and lung found in rats with experimental acute pancreatitis. *HPB (Oxford)*. 2011;13(5):332-341.
40. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*. 2004;364(9433):545-548.

41. Herminghaus A, Papenbrock H, Eberhardt R, Vollmer C, Truse R, Schulz J, et al. Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Med Exp.* 2019;7(1):4.
42. Correa TD, Vuda M, Blaser AR, Takala J, Djafarzadeh S, Dunser MW, et al. Effect of treatment delay on disease severity and need for resuscitation in porcine fecal peritonitis. *Crit Care Med.* 2012;40(10):2841-2849.
43. Rgueira T, Djafarzadeh S, Brandt S, Gorrasi J, Borotto E, Porta F, et al. Oxygen transport and mitochondrial function in porcine septic shock, cardiogenic shock, and hypoxaemia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2012;56(7):846-859.
44. Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care.* 2004;8(6):462-468.
45. Vollmer C, Weber APM, Wallenfang M, Hoffmann T, Mettler-Altman T, Truse R, et al. Melatonin pretreatment improves gastric mucosal blood flow and maintains intestinal barrier function during hemorrhagic shock in dogs. *Microcirculation.* 2017;24(4).
46. Truse R, Hinterberg J, Schulz J, Herminghaus A, Weber A, Mettler-Altman T, et al. Effect of Topical Iloprost and Nitroglycerin on Gastric Microcirculation and Barrier Function during Hemorrhagic Shock in Dogs. *J Vasc Res.* 2017;54(2):109-121.
47. Russell DH, Barreto JC, Klemm K, Miller TA. Hemorrhagic shock increases gut macromolecular permeability in the rat. *Shock.* 1995;4(1):50-55.
48. Haussner F, Chakraborty S, Halbgebauer R, Huber-Lang M. Challenge to the Intestinal Mucosa During Sepsis. *Front Immunol.* 2019;10:891.
49. Trzeciak S, McCoy JV, Phillip Dellinger R, Arnold RC, Rizzuto M, Abate NL, et al. Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis. *Intensive Care Med.* 2008;34(12):2210-2217.
50. Schwarte LA, Schwartges I, Scheeren TWL, Schober P, Picker O. The differential effects of recombinant brain natriuretic peptide, nitroglycerine and dihydralazine on systemic oxygen delivery and gastric mucosal microvascular oxygenation in dogs. *Anaesthesia.* 2012;67(5):501-507.
51. Ewert R, Glaser S, Bollmann T, Schaper C. Inhaled iloprost for therapy in pulmonary arterial hypertension. *Expert Rev Respir Med.* 2011;5(2):145-152.
52. Cihan AO, Bicakci U, Tander B, Rizalar R, Kandemir B, Ariturk E, et al. Effects of intraperitoneal nitroglycerin on the strength and healing attitude of anastomosis of rat intestines with ischemia-reperfusion injury. *Afr J Paediatr Surg.* 2011;8(2):206-210.

53. Khanna, Khanna A, Rossman J, Caty M, Fung H-L. Beneficial effects of intraluminal nitroglycerin in intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *The Journal of surgical research*. 2003;114(1):15-24.
54. Herminghaus A, Eberhardt R, Truse R, Schulz J, Bauer I, Picker O, et al. Nitroglycerin and Iloprost Improve Mitochondrial Function in Colon Homogenate Without Altering the Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:291.
55. Alican I, Kubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol*. 1996;270(2 Pt 1):G225-237.
56. Kubes P. Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *Am J Physiol*. 1992;262(6 Pt 1):G1138-1142.
57. Takizawa Y, Kishimoto H, Kitazato T, Tomita M, Hayashi M. Effects of nitric oxide on mucosal barrier dysfunction during early phase of intestinal ischemia/reperfusion. *Eur J Pharm Sci*. 2011;42(3):246-252.
58. Wu LL, Chiu HD, Peng WH, Lin BR, Lu KS, Lu YZ, et al. Epithelial inducible nitric oxide synthase causes bacterial translocation by impairment of enterocytic tight junctions via intracellular signals of Rho-associated kinase and protein kinase C zeta. *Crit Care Med*. 2011;39(9):2087-2098.
59. Hu S, Che JW, Tian YJ, Sheng ZY. Carbachol promotes gastrointestinal function during oral resuscitation of burn shock. *World J Gastroenterol*. 2011;17(13):1746-1752.
60. Bao C, Hu S, Zhou G, Tian Y, Wu Y, Sheng Z. Effect of carbachol on intestinal mucosal blood flow, activity of Na⁺-K⁺-ATPase, expression of aquaporin-1, and intestinal absorption rate during enteral resuscitation of burn shock in rats. *J Burn Care Res*. 2010;31(1):200-206.
61. Lesko S, Wessler I, Gabel G, Petto C, Pfannkuche H. Cholinergic modulation of epithelial integrity in the proximal colon of pigs. *Cells Tissues Organs*. 2013;197(5):411-420.
62. Khan RI, Yazawa T, Anisuzzaman AS, Semba S, Ma Y, Uwada J, et al. Activation of focal adhesion kinase via M1 muscarinic acetylcholine receptor is required in restitution of intestinal barrier function after epithelial injury. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(4):635-645.
63. Traeger T, Koerner P, Kessler W, Cziupka K, Diedrich S, Busemann A, et al. Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp*. 2010(46).
64. Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, Maier S, Grundling M, Grisk O, et al. Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock*. 2007;28(1):59-64.

65. Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, et al. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun*. 1998;66(5):2300-2309.
66. Schoneborn S, Vollmer C, Barthel F, Herminghaus A, Schulz J, Bauer I, et al. Vasopressin V1A receptors mediate the stabilization of intestinal mucosal oxygenation during hypercapnia in septic rats. *Microvasc Res*. 2016;106:24-30.
67. Stubs CC, Picker O, Schulz J, Obermiller K, Barthel F, Hahn AM, et al. Acute, short-term hypercapnia improves microvascular oxygenation of the colon in an animal model of sepsis. *Microvasc Res*. 2013;90:180-186.
68. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275.
69. Kuznetsov AV, Schneeberger S, Seiler R, Brandacher G, Mark W, Steurer W, et al. Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(5):H1633-1641.
70. Herminghaus A, Barthel F, Heinen A, Beck C, Vollmer C, Bauer I, et al. Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver. *Mitochondrion*. 2015;24:122-128.
71. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*. 1980;29(2):189-201.
72. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock*. 2004;21(6):505-511.
73. Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg*. 2001;88(1):22-30.
74. Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010;36(8):1286-1298.
75. Pecinova A, Drahota Z, Nuskova H, Pecina P, Houstek J. Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion*. 2011;11(5):722-728.
76. Colgan SP, Campbell EL, Kominsky DJ. Hypoxia and Mucosal Inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2016;11:77-100.
77. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev*. 1997;77(3):731-758.

78. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest.* 2004;114(8):1098-1106.
79. Carre JE, Singer M. Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777(7-8):763-771.
80. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 2011;435(2):297-312.
81. Sadio A, Amaral AL, Nunes R, Ricardo S, Sarmiento B, Almeida R, et al. A Mouse Intra-Intestinal Infusion Model and its Application to the Study of Nanoparticle Distribution. *Front Physiol.* 2016;7:579.
82. Yang L. Biorelevant dissolution testing of colon-specific delivery systems activated by colonic microflora. *J Control Release.* 2008;125(2):77-86.
83. Sutton SC, Evans LA, Fortner JH, McCarthy JM, Sweeney K. Dog colonoscopy model for predicting human colon absorption. *Pharm Res.* 2006;23(7):1554-1563.
84. Sousa T, Paterson R, Moore V, Carlsson A, Abrahamsson B, Basit AW. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs. *Int J Pharm.* 2008;363(1-2):1-25.
85. Sousa T, Yadav V, Zann V, Borde A, Abrahamsson B, Basit AW. On the colonic bacterial metabolism of azo-bonded prodrugs of 5-aminosalicylic acid. *J Pharm Sci.* 2014;103(10):3171-3175.
86. Gericke A, Sniatecki JJ, Goloborodko E, Steege A, Zavaritskaya O, Vetter JM, et al. Identification of the muscarinic acetylcholine receptor subtype mediating cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(10):7479-7484.
87. Tangsucharit P, Takatori S, Zamami Y, Goda M, Pakdeechote P, Kawasaki H, et al. Muscarinic acetylcholine receptor M1 and M3 subtypes mediate acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric arteries. *J Pharmacol Sci.* 2016;130(1):24-32.
88. Takenaga M, Kawasaki H, Wada A, Eto T. Calcitonin gene-related peptide mediates acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilation in mesenteric resistance blood vessels of the rat. *Circ Res.* 1995;76(6):935-941.
89. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Whittsett J, Joseph J, Kalyanaraman B. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem J.* 2002;362(Pt 3):733-739.
90. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Effects of supplementation of BH4 after prolonged ischemia in skeletal muscle. *Microsurgery.* 2007;27(3):200-205.

91. Maglione M, Hermann M, Hengster P, Schneeberger S, Mark W, Obrist P, et al. Tetrahydrobiopterin attenuates microvascular reperfusion injury following murine pancreas transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6(7):1551-1559.
92. Tymk K, Li F, Wilson JX. Septic impairment of capillary blood flow requires nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase but not nitric oxide synthase and is rapidly reversed by ascorbate through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Crit Care Med*. 2008;36(8):2355-2362.
93. Fitzal F, Redl H, Strohmaier W, Werner ER, Bahrami S. A 4-amino analogue of tetrahydrobiopterin attenuates endotoxin-induced hemodynamic alterations and organ injury in rats. *Shock*. 2002;18(2):158-162.
94. Secor D, Li F, Ellis CG, Sharpe MD, Gross PL, Wilson JX, et al. Impaired microvascular perfusion in sepsis requires activated coagulation and P-selectin-mediated platelet adhesion in capillaries. *Intensive Care Med*. 2010;36(11):1928-1934.

6 Anhang

6.1 Material und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils

Beatmungsgerät	Inspira Advanced Safety Ventilator MA1 55-7059, Harvard Apparatur GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
Buprenorphin	Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
Druckaufnehmer	Gould Statham Druckwandler P23ID, GOULD, Elk Grove, USA
Futtermittel für Ratten	Familie Rettenmaier&Söhne GmbH und Co KG, Rosenberg
Nahtmaterial resorbierbar	VicrylPlus® 4-0, Ethicon Inc, Bridgewater, New Jersey, USA
Nahtmaterial nicht resorbierbar	Prolene® 6-0, Ethicon Inc, Bridgewater, New Jersey, USA
Pentobarbital	Narcoren®, Pentobarbital-Natrium, Zentralapotheke Universitätsklinikum Düsseldorf
Sevofluran	Sevorane®, AbbVie GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
Thermometer	GTH 1160, Greisinger Electronic GmbH, Temperaturmessung, Regenstauf, Deutschland
Venenverweilkanüle 14G	Vasofix®Safety 14Gx2 B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Venenverweilkanüle 24G	Introcane Safety®-Winged 24Gx3/4, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Wärmematte	Julabo 6, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Weichholzgranulat als Einstreu	Ssniff Spezialdiät GmbH, Soest

6.2 Material und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils

96-Well-Platte	96 Well Multiply® PCR Plate, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Analyseprogramm zur Respirometrie	Strahlkelvin 782 System Version 4.4 HID, Strahlkelvin Instruments, Motherwell, Großbritannien
Borosilikatglas	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
ED Wasserbad	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Eismaschine	AF80, Scotsman, Mailand, Italien
Eppendorf Reference® Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcons Cellstar Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Folie für Wellplatte	Klebefolie, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Gewebehomogenisator Potter-Elvehjem	Pro Scientific, Swedesboro, New Jersey, USA
Glaszylinder	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Homogenisierstation	Dispergierstation T 8.10 mit Metallpotter, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Injekt Spritze “micorsynrings” MS-R25	Ito Corporation Exmire, Fuji, Japan
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	Synergy 2 Plate Reader mit Gen5™ Data Analysis Software Version 1.1.1, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Laborausrüstung Klees, Düsseldorf, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Respirometriesystem	MT200-Respirometer, Strahlkelvin Instruments, Motherwell, Großbritannien
Vortexgerät	Vortex Genie Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA

6.3 Chemikalien des laborexperimentellen Versuchsteils

Reagenzien	
ADP (Adenosintriphosphat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Carbachol	Merck, Darmstadt, Deutschland
cComplete™ (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche Diagnostics GmbH, Heilighaus, Deutschland
Cytochrom C	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethylenglykoltetraacetat	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Folin & Ciocalteu's phenol reagent	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glutamat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumnatrium-Tartrat-Tetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lowry Lösung 1	
• Reagenz A	<u>15 ml Reagenz A</u> (10g Natriumcarbonat in 500 ml 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung lösen)
• Reagenz B	<u>150 µl Reagenz B</u> (2g Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat in 100 ml <i>Aqua dest.</i> lösen)
• Reagenz C	<u>150 µl Reagenz C</u> (1g Kupfersulfatpentahydrat in 100 ml <i>Aqua dest.</i> lösen)
Lowry Lösung 2	2 ml Folin-Ciocalteu's Reagenz 2 ml <i>Aqua dest.</i>
Malat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mannitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
MOPS MG (3-(N-Morpholino) - propansulfonsäure)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdiphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nitroglycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rotenon	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Sodiumsulfidlösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Trypsin- EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Gibco®, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Puffer	
Isolationspuffer	200mM Mannitol 50mM Sucrose 5mM KH ₂ PO ₄ 5mM MOPS 0,1%ig BSA 1mM EGTA
Isolationspuffer, mit erhöhtem BSA Gehalt	20mg BSA/ml
Respirationspuffer	130mM KCl 5mM Kaliumdihydrogenphosphat 20mM MOPS 2,5mM EGTA 0,1%ig BSA 1µL Natriumdiphosphat
Respirationspuffer, mit erhöhtem BSA Gehalt	20mg BSA/ml

6.4 Septic Rat Severity Score

Tiernummer	Versuchsgruppe	Gewicht	Stentgröße	Tütennummer

Klinische Untersuchung:

Untersuchung	Untersuchungsergebnis	Zeit:	11-12 Uhr	16-17 Uhr	20 Uhr	22-23 Uhr	5-6 Uhr
<u>Körpergewicht</u>	1. präop. Gewicht (pG) ___ g 2. Momentanwert (mW) ___ g 3. $\Delta = \% \text{ des mW vom pG}$ ___ $\Delta\%$	$\Delta\% < 5 \Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Delta\% < 10 \Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Delta\% < 15 \Rightarrow 3 \text{ P}$ $\Delta\% > 15 \Rightarrow 10 \text{ P}$					
<u>Erscheinung</u>	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	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$					
<u>Spontanverhalten</u>	1. Ratte (R) erkundet Käfig, aktiv 2. R sitzt auf einer Stelle, Ganzkörperbewegung vorhanden 3. buckelige Haltung, schwankender Gang 4. immobil, Seitenlage	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$ $\Rightarrow 10 \text{ P}$					
<u>Provoziertes Verhalten</u>	1. R flieht bei Käfigöffnung, starker Muskeltonus 2. R flieht erst bei Annäherung der Hand 3. R flieht erst bei Berührung 4. Fluchtreflex erloschen	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$ $\Rightarrow 10 \text{ P}$					
<u>Atemfrequenz</u>	1. präop. Wert (pW) ___ /min 2. Momentanwert (mW) ___ /min 3. $\Delta = \% \text{ des mW vom pW}$ ___ $\Delta\%$	$\Delta\% < 10 \Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Delta\% < 20 \Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Delta\% < 50 \Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Delta\% > 50 \Rightarrow 3 \text{ P}$					
<u>Expiratorisches Atemgeräusch</u>	Nein Ja	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$					
<u>Abdomen-palpation (AP)</u>	1. kein Druckschmerz bei AP, weiches Abdomen 2. geringe Reaktion auf AP, weiches Abdomen 3. abdominelle Resistenz 4. deutl. Schmerzzeichen auf AP, hartes Abdomen	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$ $\Rightarrow 10 \text{ P}$					
<u>Kotbeschaffenheit</u>	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)	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$ $\Rightarrow 10 \text{ P}$					

Auswertung:

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

Tötung des Tieres durch Überdosierung Pentobarbital (800 mg/kg) i.p. notwendig bei 10 und mehr Punkten	Nein <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/>
Bei Erreichen einer Punktzahl ≥ 6 Punkten	Umgehende Information Tierarzt / Versuchsleiter (siehe Aufkleber „Notfallkontakt“)
1. Opioidgabe prä CASP OP	0,1 mg/kg Buprenorphin s.c., entspricht ca. 1,2 ml
2. Opioidgabe 8 h nach CASP OP	0,1 mg/kg Buprenorphin s.c., entspricht ca. 1,2 ml
3. Opioidgabe 16 h nach CASP OP	0,1 mg/kg Buprenorphin s.c., entspricht ca. 1,2 ml
4. Opioidgabe prä Narkoseinduktion	0,1 mg/kg Buprenorphin s.c., entspricht ca. 1,2 ml

Name und Unterschrift:

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Olaf Picker bedanken, der mir die Möglichkeit bot meine Promotionsarbeit unter seiner Leitung zu erstellen. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein besonderer und großer Dank gebührt meiner wissenschaftlichen Betreuerin PD. Dr. Anna Herminghaus für ihre exzellente und stetige Betreuung sowie unermüdliche Unterstützung bei allen Problemlagen. Ihre konstruktiven Anregungen und ihre Motivation waren von unschätzbarem Wert.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für experimentelle Anästhesiologie bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Inge Bauer für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemstellungen. Ich möchte mich zudem bei den technischen Assistentinnen Frau Claudia Dohle und Birgitt Berke bedanken, die mir insbesondere während der Einarbeitungszeit mit ihrem Wissen und ihren Fertigkeiten zur Seite standen.

Auch meinen Eltern und meinem Ehemann gilt mein Dank für den unermüdlichen Rückhalt, die beständige Motivation und Geduld.

Abschließend danke ich meiner Mitdotorandin Charlotte Schlimgen für die stets motivierende und engagierte Begleitung in all den Jahren.