

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

**Die mitochondriale Funktion des Colons und der Leber während  
moderater Hyperkapnie im Vergleich zwischen einer sterilen  
Laparotomie und einer abdominellen Sepsis.**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Stephan Hofmann  
2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Alexander Assmann

## Zusammenfassung

Die Sepsis und ihre potenziellen Folgen wie septischer Schock oder Multiorganversagen sind auch in Zeiten hochmoderner Medizin eine der häufigsten Erkrankungen und Todesursachen weltweit. Aktuell wird die Sepsis als Organdysfunktion mit fehlregulierter Wirtsantwort im Rahmen einer Infektion definiert. Dem Colon als Organ mit dem größtem Microbiom des Organismus und der Leber als Ort der Produktion der akut-Phase Proteine wird eine besondere Bedeutung bei der Regulation der Immunantwort und damit dem Überleben einer Sepsis zugeschrieben. Eine wesentliche Rolle scheint hierbei die organspezifische mitochondriale Dysfunktion zu spielen. Im septischen Tiermodell einer Vorstudie konnte die mikrozirkulatorische Oxygenierung des Colons im Rahmen einer temporären, moderaten Hyperkapnie verbessert werden. Da die Mitochondrien die Hauptverbraucher des Sauerstoffs in der Zelle sind, war Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, welchen Einfluss eine moderate Hyperkapnie auf die Mitochondrienfunktion im Colon und in der Leber nach einer sterilen Laparotomie und bei einer moderaten abdominellen Sepsis hat. 48 männliche Wistar-Ratten wurden in 4 Gruppen (n = 12) randomisiert. Bei 24 Tieren erfolgte die Induktion einer moderaten Sepsis nach Implantation eines Stents im Colon ascendens (CASP). Die Kontrollgruppe (n = 24) Sham erhielt eine sterile Laparotomie. 48 Stunden (h) nach der jeweiligen Operation wurden alle Tiere für 2 h hyperkapnisch (65 – 75 mmHg) oder normokapnisch (35 - 40 mmHg) beatmet. Anschließend erfolgte mittels Respirometrie die Messung der mitochondrialen Funktion in Gewebehomogenaten von Leber und Colon. Hierbei wurden die Komplexe I und II der Atmungskette mit Glutamat/Malat bzw. Succinat sowie ADP stimuliert. Neben der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung (ADP/O-Quotient) wurde auch das Maß der Kopplung zwischen Atmungskettenaktivität und oxidativer Phosphorylierung als bestimmt *Respiratory control index* (RCI). Organschädigungsparameter von Leber und Niere, die Leukozytenzahl im Blut und die Malondialdehyd-Konzentration (MDA) als Marker für oxidativen Stress im jeweiligen Gewebehomogenat wurden zusätzlich bestimmt. Eine moderate Hyperkapnie führte im Colon zu einer verminderten Effizienz der oxydativen Phosphorylierung nach einer sterilen Laparotomie und in der Leber zu einer verbesserten Kopplung von Atmungskettenaktivität und ATP-Synthese (RCI) unter septischen Bedingungen. Die MDA-Konzentration in Leber und Colon zeigte keine Veränderungen unter Hyperkapnie. Eine relevante Organschädigung konnte weder bei normo- noch bei hyperkapnisch beatmeten Tieren nachgewiesen werden. Allerdings geben die vorliegenden Daten Anhalt für einen antiinflammatorischen Effekt der Hyperkapnie bei septischen Tieren, der Grundlage für weitere Studien sein kann.

## Summary

Even in times of highly modern medicine, sepsis and the consecutive septic shock and multiorgan dysfunction (MODS) remain one of the most common diseases and causes of death worldwide. Currently sepsis is defined as organ-dysfunction with dysregulated host-response in the context of an infection. The gut and its microbiome and the liver producing the acute phase proteins are of particular importance in regulation of the immune answer and therefore in modulation of the outcome of the septic patients. The organ-specific mitochondrial dysfunction seems to be an underlying mechanism of MODS. In a preliminary study using septic animal model (CASP) moderate hypercapnia improved the microcirculatory oxygenation of the colon. The aim of this study was to investigate the influence of moderate hypercapnia on mitochondrial function in the colon and in the liver after sterile laparotomy and in moderate abdominal sepsis. 48 male Wistar rats were randomized into 4 groups (n = 12). In 24 animals, moderate sepsis was induced for 48 h after implantation of a stent in the ascending colon (CASP). The control group (n = 24) Sham received a sterile laparotomy. 48 h after the respective surgery, animals were ventilated hypercapnic (65 - 75 mmHg) or normocapnic (35 - 40 mmHg) for 2 h. The mitochondrial function was measured in tissue homogenates of the liver and colon by means of respirometry. The complexes I and II of the respiratory chain were stimulated with glutamate/malate or succinate and ADP. In addition to the efficiency of oxidative phosphorylation (ADP-O ratio), the extent of coupling between respiratory chain activity and oxidative phosphorylation was also determined as respiratory control index (RCI). In addition, organ damage parameters of liver and kidney as well as the leukocyte count in the blood were measured. The malondialdehyde concentration in the respective tissue homogenate was also determined as a marker for oxidative stress. Moderate hypercapnia resulted in reduced efficiency of oxidative phosphorylation in colon after sterile laparotomy. The coupling of respiratory chain activity and ATP-synthesis (RCI) in liver was improved by moderate hypercapnia only under septic conditions. The MDA-concentration in liver and colon showed no changes during hypercapnia. The available data suggests an anti-inflammatory effect of hypercapnia in septic animals, which could be the base for further studies.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
<b>3-MOPS</b>	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ADP/O-Quotient</b>	Adenosindiphosphat-Sauerstoff-Quotient
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>Aqua dest.</b>	Destilliertes Wasser
<b>BGA</b>	Blutgasanalyse
<b>BSA</b>	bovine serum albumin
<b>CASP</b>	Colon ascendens stent peritonitis
<b>CLP</b>	cecal ligation and puncture
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>dL</b>	Deciliter
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGTA</b>	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Inspiratorische Sauerstofffraktion
<b>GOT</b>	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
<b>GPT</b>	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
<b>h</b>	Stunde
<b>HIF</b>	Hypoxie-induzierter Faktor
<b>HK</b>	Hyperkapnie
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>i.m.</b>	intramuskulär
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>KCL</b>	Kaliumchlorid
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>LDH</b>	Laktat-Dehydrogenase
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MAD</b>	arterieller Mitteldruck
<b>mtDNA</b>	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
<b>MDA</b>	Malondialdehyd
<b>mg</b>	Milligramm

<b>ml</b>	Milliliter
<b>mmHg</b>	Millimeter-Quecksilbersäule
<b>mM</b>	Millimolar
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n</b>	Anzahl
<b>nm</b>	Nanometer
<b>nmol</b>	nanomol
<b>NK</b>	Normokapnie
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>pA</b>	Pikoamper
<b>paO<sub>2</sub></b>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
<b>pCO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
<b>pH</b>	pondus hydrogenii
<b>RCI</b>	respiratory control index
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>rpm</b>	revolutions per minute
<b>s.c.</b>	subcutan
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SIRS</b>	Systemic Inflammatory Response Syndrom
<b>SOFA</b>	Sequential Organ Failure Assessment
<b>SRSS</b>	septic rat severity score
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogramm
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikroliter
<b><math>\mu</math>M</b>	Mikromolar

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Bedeutung der Sepsis .....	1
1.2	Definition der Sepsis .....	1
<b>2</b>	<b>Entstehung der Sepsis</b> .....	<b>3</b>
2.1	Mitochondrien und Sepsis .....	4
2.2	Reaktive Sauerstoffspezies und Sepsis .....	5
2.3	Permissive Hyperkapnie und Sepsis .....	5
<b>3</b>	<b>Fragestellung der Arbeit</b> .....	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>8</b>
4.1	Versuchstiere .....	8
4.2	CASP .....	8
4.3	Organpräparation .....	10
4.4	Proteinbestimmung .....	11
4.5	Atmungskette .....	11
4.6	Respirometrie .....	12
4.7	Malondialdehyd-Assay .....	13
4.8	Organschädigungsparameter .....	14
4.9	Statistik .....	14
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>15</b>
5.1	Septic rat severity score .....	15
5.2	Laborchemische Marker .....	15
5.3	Arterielle Blutgasanalysen .....	16
5.4	Mitochondrienfunktion in der Leber .....	17
5.5	Mitochondrienfunktion im Colon .....	18
5.6	Malondialdehyd-Assay in Leber und Colon .....	19
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>21</b>
6.1	Methodendiskussion .....	21
6.2	Ergebnisdiskussion .....	22
6.2.1	Diskussion der Effekte auf den SRSS .....	22
6.2.2	Diskussion der Effekte auf Labormarker und Blutgasanalysen .....	23
6.2.3	Diskussion der Effekte auf die Mitochondrienfunktion der Leber ..	24
6.2.4	Diskussion der Effekte auf die Mitochondrienfunktion des Colons	27
6.2.5	Diskussion der Effekte auf die reaktiven Sauerstoffspezies .....	28
<b>7</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b> .....	<b>31</b>

<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>37</b>
9.1	Materialien und Geräte tierexperimenteller Versuch .....	37
9.2	Materialien und Geräte laborexperimenteller Versuch .....	38
9.3	Chemikalien und Reagenzien laborexperimenteller Teil .....	39
9.3.1	Substrate Respirometrie: .....	39
9.3.2	Weitere Reagenzien: .....	39
9.4	Puffer und Lösungen .....	40
9.4.1	Isolationspuffer .....	40
9.4.2	Respirationspuffer.....	40
9.4.3	Proteinbestimmung nach Lowry.....	40
9.4.4	MDA-Konzentrationsbestimmung .....	41
9.5	Untersuchungsbogen Septic rat severity score .....	42
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>43</b>
<b>11</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>43</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung der Sepsis

Sepsis und septischer Schock zählen trotz modernster Technik zu den häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen.<sup>1</sup> Zahlen aus den letzten zehn Jahren zeigen eine globale Inzidenz von bis zu 19 Millionen Sepsisfällen im Krankenhaus jährlich.<sup>2</sup> Die *World Health Organization* (WHO) geht von jährlich 6 Millionen Todesfällen weltweit aus.<sup>3</sup> In der deutschen multizentrischen INSEP-Studie aus dem Jahr 2013 betrug die Gesamtmortalität von Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock 40%.<sup>4</sup> Auch der wirtschaftliche Aspekt spielt bei zunehmend besserer Datenlage eine immer größere Rolle. Inzwischen ist die Sepsis ein Hauptkostenpunkt für Krankenhäuser, Tendenz steigend.<sup>5-7</sup> Im Mai 2017 verabschiedete die WHO daher eine Resolution, welche die Verbesserung von Prävention, Diagnosestellung, Wahrnehmung als auch Behandlungsstrategien der Sepsis in den Fokus rückt.<sup>3</sup>

## 1.2 Definition der Sepsis

Bereits 2016 wurde durch die *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) und die *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM) mit der Sepsis-III Leitlinie die Organdysfunktion als prägende Komponente in den Mittelpunkt gestellt und die Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion mit dysregulierter Immunantwort definiert.<sup>8</sup> Die zuvor verwendete Definition des *Systemic Inflammatory Response Syndrom* (SIRS) wurde hierbei verlassen, sodass die klinischen Kriterien des SIRS nicht mehr bindend für die Diagnose Sepsis sind. Der Begriff „schwere Sepsis“ fällt mit der neuen Definition ganz weg. Der in den Leitlinien verankerte *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Score* errechnet das Mortalitätsrisiko mit Hilfe spezifischer Parameter für verschiedene Organsysteme.<sup>9,10</sup> Für jedes Organsystem werden dabei alle 24 h zwischen 0 und 4 Punkte vergeben. Ein Anstieg  $\geq 2$  Punkte spricht für eine Organdysfunktion (siehe Tabelle 1). Eine akute Organdysfunktion soll so schneller erkannt werden, denn insbesondere das konsekutive Multiorganversagen verschlechtert deutlich das Outcome septischer Patienten.<sup>6,11</sup> 2021 wurde die Leitlinie erneut aktualisiert und der 2016 etablierte qSOFA als alleiniges Screeningwerkzeug auf eine Sepsis bei mangelnder Sensitivität nicht mehr empfohlen.<sup>12</sup>

SOFA-Score	0	1	2	3	4
Atmung  PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	≥ 400	< 400	< 300	< 200 (und Beatmung)	< 100 (und Beatmung)
Blutgerinnung  Thrombozytenzahl (x10 <sup>3</sup> /μl)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Leberfunktion  Bilirubin (mg/dl)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	> 12,0
Kreislauffunktion	MAD ≥ 70mmHg	MAD < 70 mmHg	Dopamin < 5 oder Dobutamin (jede Dosis) <sup>a</sup>	Dopamin 5.1 – 15 oder Epinephrin ≤ 0.1 oder Norepinephrin ≤ 0.1 <sup>a</sup>	Dopamin > 15 oder Epinephrin > 0.1 oder Norepinephrin > 0.1 <sup>a</sup>
Zentrales Nervensystem  <i>Glasgow Coma Scale score</i> <sup>b</sup>	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Nierenfunktion  Kreatinin (mg/dl) oder Urinausscheidung (ml/Tag)	< 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 oder < 500 ml/Tag	> 5,0 oder <200 ml/Tag

**Tabelle 1: SOFA-Score<sup>9</sup> zum Erkennen akuter Organdysfunktion in der Sepsis.**

Gesamtpunktzahl zwischen 0 und 24. PaO<sub>2</sub> = arterieller Sauerstoffpartialdruck; FiO<sub>2</sub> = inspiratorische Sauerstofffraktion; MAD = mittlerer arterieller Druck; mmHg = Millimeter-Quecksilbersäule; mg/dl = Milligramm/Deziliter; mm<sup>3</sup> = Kubikmillimeter; <sup>a</sup> Katecholamindosis in μg/kg/min für mindestens eine Stunde; <sup>b</sup> *Glasgow Coma Scale* reicht von 3-15.

## 2 Entstehung der Sepsis

Mit der neuen Definition der Sepsis und dem Fokus auf Dysregulation der Immunantwort und Organdysfunktion rückt die Reaktion des Körpers auf ein inflammatorisches Signal zum Beispiel auf Bakterien, Pilze oder Viren in den Vordergrund. Sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) und *damage associated molecular patterns* (DAMPs), die Teil unseres angeborenen Immunsystems sind, aktivieren Toll-like-Rezeptoren, welche die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen stimulieren (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-1, Interleukin-6).<sup>13</sup> Dies führt normalerweise zu einer adäquaten Immunantwort. Eine Entgleisung initiiert einen Zytokinsturm, bei dem Zytokine ungebremst ausgeschüttet werden.<sup>14</sup> Die systemische Aktivität des Immunsystems hat dabei einen direkten Einfluss auf das Myokard, so vermindert TNF- $\alpha$  dessen Kontraktilität.<sup>15</sup> In der Folge werden Endothelzellen ebenfalls durch Zytokine aktiviert und induzieren die Stickstoffmonoxid-Synthase, ein Enzym das die Bildung von Stickstoffmonoxid katalysiert und an glatten Muskelzellen der Arteriolen eine Vasodilatation bewirkt. Eine zunehmende Permeabilität des Kapillarendothels durch Dysfunktion der *Tight junctions* führt außerdem zu einer großen Flüssigkeitsverschiebung aus dem Gefäßsystem, auch *capillary leakage* genannt.<sup>16</sup> Diese Mechanismen bilden die wesentliche Ursache die zur Symptomatik des septischen Schocks beitragen. Ein weiterer Effekt der Immunantwort ist eine vermehrte Bildung des *Tissue factors* auf Endothelzellen und Monozyten der über eine Störung des Protein-C/S-Systems zu Mikrothrombosierungen und Perfusionsstörungen insbesondere im kapillären Endstromgebiet führt.<sup>17</sup> Das kapilläre Endstromgebiet des Gastrointestinaltrakts hat durch seine große Blutvolumenreserve und die Möglichkeit einer Verschiebung in andere Organsysteme eine entscheidende Bedeutung. Aber auch die Integrität des eigenen mikrozirkulatorischen Netzwerkes ist unerlässlich, denn Infektionen des Abdomens zählen zu den häufigsten, die eine Sepsis induzieren können.<sup>7,18</sup> Der Darm als großes Resorptionsorgan hat neben Stoffwechselfunktionen unter anderem eine entscheidende Barrierefunktion, welche eng mit der Entstehung der abdominalen Sepsis verknüpft ist.<sup>19–21</sup> Als selektive Barriere können unter anderem Wasser, gelöste Nährstoffe und immunmodulierende Faktoren, z.B. Immunglobuline das Darmlumen verlassen und in den Blutkreislauf übertreten. Bakterien und ihre Toxine sowie schädliche Antigene können eine intakte Barriere nicht überwinden.<sup>22</sup> Tatsächlich scheint diese Barriere in der Sepsis gestört.<sup>23</sup> Zusätzlich gibt es Hinweise, dass eine

gestörte Mitochondrienfunktion diese wichtige Barrierefunktion negativ beeinflusst.<sup>24,25</sup> Metabolischer Stress, ausgelöst zum Beispiel durch einen gestörten Protonentransport über die innere Mitochondrienmembran, kann die Barrierefunktion der Darmmukosa negativ beeinflussen und zur Translokation von Bakterien führen.<sup>26</sup>

Die Leber als großes Stoffwechselorgan und das Versagen ihrer vielfältigen Aufgaben hängt mit der Schwere der Sepsis und dem Outcome des Patienten ebenfalls unmittelbar zusammen.<sup>27,28</sup> Neben der Synthese von Proteinen für Stoffwechsel, Immunmodulation und Blutgerinnung ist eine der Hauptaufgaben der Leber die Entgiftung. Um diese Funktionen zu erfüllen ist eine entsprechende Perfusion nötig, wofür der Körper 25 % des Herzzeitvolumens bereitstellt.<sup>29</sup> Der ursächliche Pathomechanismus des Leberversagens im Rahmen des septischen Multiorganversagens ist bisher nicht eindeutig verstanden. Mitochondriale Dysfunktion und Störung der Mikrozirkulation scheinen hierbei jedoch eine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>30-32</sup>

## **2.1 Mitochondrien und Sepsis**

Um Adenosintriphosphat (ATP) zu generieren sind Mitochondrien für mehr als 90% des gesamten zellulären Sauerstoffverbrauchs verantwortlich.<sup>33</sup> Eine veränderte mitochondriale Aktivität / Dysfunktion kann zu einem fatalem Missverhältnis von Sauerstoffverbrauch und ATP-Produktion führen. Welche Rolle Mitochondrien in der Genese des Sepsis-induzierten Organversagens spielen, ob sie dieses initiieren, verstärken, Ziel sind oder doch unbeteiligt bleiben, wird kontrovers diskutiert.<sup>34</sup> Die Aktivität der Mitochondrien variiert je nach Gewebe und im zeitlichen Verlauf einer Sepsis.<sup>35</sup> Studienergebnisse zur Mitochondrienfunktion in der Leber im septischen Setting sind widersprüchlich. Es wird eine verschlechterte<sup>33,36</sup>, verbesserte<sup>37,38</sup> oder eine unveränderte<sup>39,40</sup> Mitochondrienfunktion beschrieben. Daten zum Colon hingegen sind kaum verfügbar, lediglich eine Studie beschreibt die Mitochondrienfunktion im Colon im zeitlichen Verlauf der Sepsis.<sup>41</sup> Außerdem gelang auch ein früher Nachweis von mitochondrialer Dysfunktion im Jejunum, nicht jedoch im Duodenum oder anderen Darmabschnitten.<sup>40</sup>

## 2.2 Reaktive Sauerstoffspezies und Sepsis

Während der Körper zur Energiegewinnung Sauerstoff benötigt, entstehen im Zyklus der Atmungskette im Mitochondrium reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Hyperoxid Anion ( $O_2^-$ ) oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Etwa 1 – 2 % des Sauerstoffs bilden die Grundlage für die Entstehung der ROS, der restliche Teil wird zu Wasser reduziert.<sup>42</sup> Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion und Schutz der Zelle durch Antioxidantien. Ein Ungleichgewicht beider Systeme bezeichnet man als oxidativen Stress.<sup>43</sup> Reaktive Sauerstoffspezies sind bedeutsam für die normale Zellfunktion und haben unter anderem wichtige Funktionen in zellulären Signalwegen, können jedoch auch Schaden an Lipiden, Proteinen und Nucleinsäuren verursachen. Insbesondere eine beschädigte mitochondriale DNA (mtDNA) führt in einen Kreislauf zunehmender ROS-Produktion und weiterer Schädigung der mtDNA. Dieser mitochondriale Schaden durch die Sauerstoffradikale ist eng assoziiert mit dem septischen Multiorganversagen.<sup>44</sup>

## 2.3 Permissive Hyperkapnie und Sepsis

Lokale Hypoxämie durch gestörte Mikrozirkulation verbunden mit Organversagen ist eines der Hauptmerkmale des septischen Schockes.<sup>45</sup> Die Wiederherstellung einer ausreichenden Oxygenierung mit entsprechendem Gasaustausch ist demnach im septischen Zustand unverzichtbar. Beim beatmeten Patienten werden dazu unter anderem lungenprotektive Beatmungsstrategien angewendet.<sup>46</sup> Hierbei wird auf geringe Tidalvolumina und möglichst geringe Spitzendrücke geachtet um eine weitere Schädigung der Lunge durch hohe Beatmungsdrücke zu vermeiden.<sup>47</sup> Diese schonende Art der Beatmung geht häufig mit einer nicht ausreichenden Elimination des anfallenden  $CO_2$  einher und wird permissive Hyperkapnie genannt.<sup>48</sup>

Eine Hyperkapnie kann in verschiedenen Geweben zu einer Verbesserung der Oxygenierung führen.<sup>49–52</sup> Zudem steigert eine moderate Hyperkapnie das Herzzeitvolumen und verbessert damit die Gewebeoxygenierung.<sup>53,54</sup> Eine vorherige Studie der Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bei moderater Sepsis und temporärer Hyperkapnie die Mikrozirkulation im Colon verbessert werden kann.<sup>51</sup> Daraus resultiert die Frage nach der Rolle der Mitochondrien als Hauptsauerstoffverbraucher der Zelle bei diesem Phänomen. Die zeitabhängigen Veränderungen der Mitochondrienfunktion in Leber und Colon im zeitlichen Verlauf bis 96 h wurden im Vorfeld untersucht und ergaben in der früheren postoperativen Phase, bis 48 h nach Sepsisinduktion oder

steriler Laparotomie eine erhöhte mitochondriale Respirationsleistung der Leber.<sup>41</sup> 24 h nach der Operation war die Kopplung zwischen der Atmungskette und der oxydativen Phosphorylierung sowohl bei Sham (Kontrollgruppe) als auch bei CASP-Tieren erhöht. 48 h postoperativ war die Kopplung und die Effizienz der oxydativen Phosphorylierung nur bei septischen Tieren erhöht. Im weiteren zeitlichen Verlauf normalisierte sie die mitochondriale Funktion in der Leber. Die Mitochondrienfunktion im Colon wurde im Wesentlichen nicht moduliert. Hieraus ergeben sich folgende Fragstellungen, die in der Folge näher beleuchtet werden sollen.

### **3 Fragestellung der Arbeit**

1. Welchen Einfluss hat eine moderate Hyperkapnie auf die mitochondriale Funktion im Colon und in der Leber nach einer sterilen Laparotomie und unter septischen Bedingungen im CASP-Modell bei der Ratte?
2. Inwieweit moduliert eine moderate Hyperkapnie nach einer sterilen Laparotomie und im septischen Rattenmodell die ROS-Produktion in der Leber und im Colon?
3. Kann eine moderate Hyperkapnie die Organschädigungsparameter und/oder die Entzündungsreaktion in einer abdominellen Sepsis bei der Ratte beeinflussen?

## 4 Methoden

### 4.1 Versuchstiere

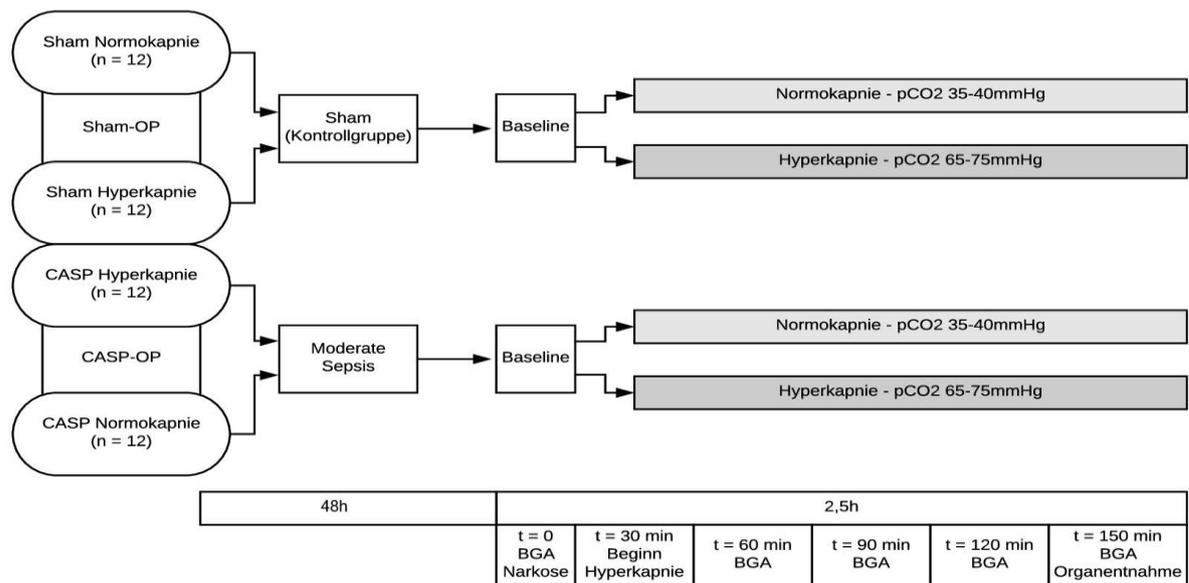
Der tierexperimentelle Teil wurde nach Zusage durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen: 84-02.04.2014.A112) durch meine Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus mit entsprechendem Sachkundenachweis durchgeführt. Eine Auflistung aller genutzten Geräte und Materialien findet sich im Anhang.

Die Versuche wurden an 48 männlichen Wistar-Ratten im Alter von 3 Monaten (Körpergewicht ca. 350 g  $\pm$  35 g) durchgeführt. Alle Tiere hatten jederzeit Zugang zu Wasser und einem Standard Rattenfutter. Über regelmäßige Gabe von Buprenorphin (0,05 mg/kg) s.c. in Abständen von 12 h, wurde bis zum Exitus der Tiere eine durchgehende Analgesie sichergestellt. Die Erkrankungsschwere der Tiere wurde in einem Untersuchungsbogen alle 12 h durch einen nicht verblindeten Untersucher dokumentiert. Hierbei wurden neben Gewicht, Erscheinung, Spontan- und provoziertem Verhalten auch Atemfrequenz, ein expiratorisches Atemgeräusch, die Abdomenpalpation sowie die Beschaffenheit des Stuhlgangs numerisch bewertet und zu einer Gesamtpunktzahl addiert als *septic rat severity score*.

### 4.2 CASP

Zur Sepsisinduktion wurde das etablierte CASP-Modell genutzt. Nach inhalativer Narkoseeinleitung via Sevofluran (3 % in 50 % Sauerstoff) und Analgesie mittels eines potenten Opiodanalgetikums (Buprenorphin, 0,05 mg/kg s.c.) konnte über eine spezielle Atemmaske unter erhaltener Spontanatmung die Narkose aufrechterhalten werden. Nach Positionierung des Tieres auf einer Wärmematte in Rückenlage wurde das Abdomen steril abgewaschen. Anschließend konnte ein steriles Lochtuch aufgebracht werden und die Laparotomie erfolgte über circa 2 cm. Nach Aufsuchen des Caecum im rechten Unterbauch wurde das Colon ascendens 0,5 cm distal der Ileozökalklappe mit einer peripheren Venenverweilkanüle der Größe 14 G perforiert. Nach Entfernen der Nadel wurde der Katheter als Stent im Colon belassen und anschließend angenäht, um den kontinuierlichen Austritt von Fäces ins Abdomen sicherzustellen. Tiere der Kontrollgruppen erhielten unter einer identischen Narkose eine sterile Laparotomie bei der ein peripherer Venenkatheter lediglich auf der Tunica

serosa des Colon ascendens via Naht fixiert wurde ohne das Colon zu perforieren. Abschließend wurde das Abdomen mit resorbierbarem Faden verschlossen. Nach Ende der Narkose wurden alle Tiere unter ausreichendem Angebot von Nahrung und Wasser regelmäßig überwacht. Nach 48 h wurden alle Tiere erneut narkotisiert (Pentobarbital 60mg/kg i.p.) und in Rückenlage auf einer Wärmematte positioniert. Unter kontinuierlicher rektaler Temperaturmessung konnte eine Normothermie sichergestellt werden. Zur Sicherung der Atemwege wurde eine Tracheotomie mit anschließender Intubation durchgeführt. Die Beatmung erfolgte volumenkontrolliert. (70/min, Tidalvolumen 1,8 – 2,5 ml, Beatmungsdruck < 17 cm x H<sub>2</sub>O, FiO<sub>2</sub> = 0,3). Das Gasgemisch zur normokapnischen Beatmung bestehend aus O<sub>2</sub> (30 %) und N<sub>2</sub> (70 %) wurde zur Induktion der moderaten Hyperkapnie durch Zumischung eines weiteren Gasgemisches (CO<sub>2</sub> (10 %), O<sub>2</sub> (30 %), N<sub>2</sub> (60 %)) ergänzt. Um eine kontinuierliche Messung des arteriellen Blutdrucks zu gewährleisten, wurde ein Katheter in die linke Arteria carotis communis eingebracht und dieser mit einem Druckaufnehmer verbunden. Für das Aufrechterhalten der Narkose (Pentobarbital 10 mg/kg/h, Pancuraonim 2 mg) wurde auf der Gegenseite in der Vena jugularis interna ein 24 G-Katheter platziert. Nach 2 h hyper- oder normokapnischer Beatmung (siehe Abb. 1) und Blutgasanalysen (BGA) zum Beginn der Baseline sowie nach 30, 60, 90, 120 und 150 min (siehe Abb. 1) erfolgte die Exsanguination. Anschließend erfolgte die Organentnahme des rechten Leberlappens sowie des Colon ascendens zur weiteren Präparation.



**Abb. 1: Versuchsablauf tierexperimenteller Teil**

Randomisierte Zuordnung in die entsprechende Versuchsgruppe (n=12) und anschließende Sham- oder CASP-OP. 48h postoperativ Start der Baseline sowie 2h Beatmung unter Normo- oder Hyperkapnie. Anschließend erfolgte Exsanguination und Organentnahme.

### 4.3 Organpräparation

Leber- und Colongewebe wurden nach der Entnahme unverzüglich in eine 4°C messende Isolationspufferlösung (siehe 9.4.1, Isolationspuffer) überführt. Anschließend wurden 1,1 - 1,2 g Leber abgewogen, mechanisch zerkleinert und im Verhältnis 1:10 erneut in einem Isolationspuffer gelagert. Das Colonpräparat wurde nach Entfernen grober Kotstücke im Ganzen abgewogen und anschließend in einer mit Isolationspuffer und auf Eis liegenden Petrischale präpariert. Dabei wurde erst ein Längsschnitt durchgeführt und anschließend die Schleimhaut mit einer feuchten Kompresse gesäubert. Um die Zellverbände zu lockern, wurde das Enzym Trypsin auf das gesäuberte Präparat gegeben und fünf Minuten inkubiert. Im Verhältnis 1:4 wurden das Colonpräparat anschließend wieder in einen mit 20 mg/ml Albumin ergänzten Isolationspuffer überführt und der Proteaseninhibitor Complete (Verhältnis 1:100) hinzugefügt. Im Anschluss wurde das präparierte Colon ebenfalls mechanisch zerkleinert. Das zur Messung der Mitochondrienfunktion nötige Homogenat beider Organe konnte mittels Homogenisator bei 2000 revolutions per minute (rpm) gewonnen werden.

## 4.4 Proteinbestimmung

Unter weiterhin kontinuierlicher Lagerung auf Eis wurde nun zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration im gewonnenen Homogenat die Methode von Lowry<sup>55</sup> genutzt. Als Proteinstandard wurde 1 mg/ml *bovine serum albumin* (BSA) verwendet. Die Standardreihe wurde in folgender Verdünnung pipettiert.

Standard	BSA-Konzentration (mg/ml)
1	0
2	0,0625
3	0,125
4	0,25
5	0,5
6	0,75
7	1

**Tabelle 2: Standardreihe nach Lowry**

Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Homogenaten von Leber und Colon. Proteinstandard BSA = bovine serum albumin; mg/dl = Milligram/Deziliter.

Anschließend wurden sowohl 100 µl der Standardreihe mit BSA als auch Organproben in 500 µl der Lösung 1 (siehe 9.4.3, Lösung 1) pipettiert. Alle Ansätze wurden nun 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 50 µl Lösung 2 (siehe 9.4.3, Lösung 2) in alle Proben hinzugefügt und anschließend weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Doppelbestimmung der Proben auf einer 96-Well-Platte und die Messung der Extinktion bei 750 nm.

## 4.5 Atmungskette

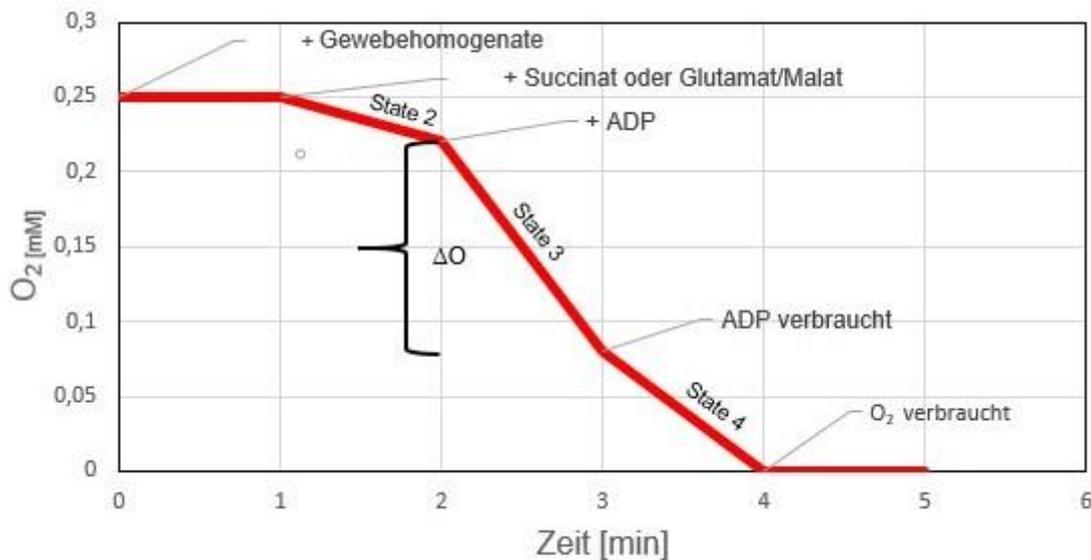
Die Atmungskette ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und besteht aus den Komplexen I-IV und der ATP-Synthase. Sie ist als letzter Teil des oxidativen Stoffwechsels verantwortlich für die Herstellung von ATP. Dazu werden die Elektronen der Reduktionsäquivalente unter anderem aus dem Zitratzyklus und aus anderen katabolen Stoffwechselwegen über mehrere Redoxsysteme (Komplexe I-IV) weitergeleitet, bis sie im Komplex IV auf Sauerstoff übertragen werden und dabei H<sub>2</sub>O

entsteht. Durch die einzelnen Elektronenübergänge bildet sich ein elektrochemischer Gradient, der Protonen in den Intermembranraum der Mitochondrien befördert. Dieser Gradient treibt die ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte ATP-Synthase (Komplex V) an. Die ATP-Synthase baut den Protonengradienten wieder ab, indem diese aus dem Intermembranraum wieder zurück in die Matrix des Mitochondriums fließen und dabei aus ADP und anorganischem Phosphat ATP entsteht.

#### **4.6 Respirometrie**

Vor der eigentlichen Messung erfolgte die Kalibrierung des Respirometers mittels Aqua dest. (Positivkontrolle mit Referenzwerten von 500-700 pA) und in Aqua dest. gelöstem Natriumsulfid (Negativkontrolle mit Referenzwerten <50 pA). Um die Leistungsfähigkeit der Atmungskette zu bestimmen, wurden nun die Gewebehomogenate der Leber und des Colons bei 30°C im Respirationspuffer (siehe 9.4.2, Respirationspuffer), nach Bestimmung des Proteinanteils und somit Quantifizierung der Mitochondrienzahl mit einer Clark-Elektrode (MT200 und SI782, Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Scotland), untersucht. Der Proteinanteil wurde für das Colon auf 6 mg/ml und für die Leber auf 4 mg/ml Protein empirisch festgelegt. Aus dem Proteinanteil beider Organe wurde ein Quotient gebildet, der nach Umrechnung in  $\mu\text{l}$  das Verhältnis von Puffer zur Probe für die Respirometrie festlegte. Die bestimmte Menge Gewebehomogenat wurde mit Respirationspuffer auf insgesamt 600  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Anschließend wurden 550  $\mu\text{l}$  in die Messkammer des Respirometers pipettiert. Nach einer Minute konnten die Substrate Glutamat/Malat (2,5 mM, Mischverhältnis 1:1) oder Succinat (10 mM für Leber, 5mM für Colon) hinzugefügt werden. Nach einer weiteren Minute wurde ADP (250  $\mu\text{M}$  für Leber, 125  $\mu\text{M}$  für Colon) hinzugefügt und die maximale Geschwindigkeit der Atmungskettenaktivität simuliert. Nach Erreichen einer Plateauphase wurde die Messung beendet. Neben der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches bei Zugabe der Substrate Glutamat/Malat oder Succinat (State 2) und der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches bei Zugabe von ADP (State 3) wurde auch die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches nach Verbrauch des ADP gemessen (State 4). Die Menge an  $\text{O}_2$ , die beim Umwandeln von ADP in ATP verbraucht wird, wurde als  $\Delta\text{O}$  bestimmt. Um die Kopplung von Atmungskettenaktivität und oxidativer Phosphorylierung darzustellen, wurde der Quotient aus State 3 und State 2 gebildet und als RCI

berechnet. Die Effizienz der oxydativen Phosphorylierung wurde durch den ADP/O-Quotienten dargestellt. Dieser wurde aus der Menge an hinzugefügtem ADP und dem O<sub>2</sub>-Verbrauch ( $\Delta O$ ) gebildet.



#### Abb. 2: Versuchsablauf Respirometrie

Sauerstoffkonzentration in Gewebehomogenaten im zeitlichen Verlauf. State 2 = Basisgeschwindigkeit der oxidativen Phosphorylierung nach Zugabe von Substrat für Komplex I (Glutamat/Malat) und Komplex II (Succinat); State 3 = Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von ADP; State 4 = beginnt mit Verbrauch von ADP und endet mit dem Verbrauch vom verbliebenen O<sub>2</sub>. nM = Nanomolar; min = Minuten, O<sub>2</sub> = Sauerstoff;  $\Delta O$  = Menge an verbrauchtem Sauerstoff; ADP = Adenosindiphosphat. Schema nach Simonnet et al. modifiziert.<sup>56</sup>

## 4.7 Malondialdehyd-Assay

MDA als Biomarker für oxidativen Stress und Abbauprodukt mehrfach ungesättigter Fettsäuren wurde mit Hilfe eines MDA-Assays bestimmt. Zur Messung der MDA-Konzentration in nmol MDA/mg Protein wurden 50 mg Colon- oder Lebergewebe in 500  $\mu$ l 1,15% KCL-Lösung homogenisiert. Das Homogenat (250  $\mu$ l) sowie 1,5 ml 1%ige Phosphorsäure und 500  $\mu$ l 0,6%ige 2-Thiobarbitursäure (TBA) wurden anschließend zusammen 45 min bei 95°C inkubiert und auf Eis wieder abgekühlt. Nach Hinzufügen von 2000  $\mu$ l n-Butanol und Zentrifugieren bei 2500 rcf für 15 min bei 4°C konnte der Überstand bei 535 nm und 520 nm als Referenzwellenlänge photometrisch bestimmt werden. Die MDA-Konzentration wurde zur Proteinkonzentration normiert (bestimmt nach Lowry et al.<sup>55</sup>) und anschließend in nmol MDA / mg Protein angegeben.

## **4.8 Organschädigungsparameter**

Nach der Zentrifugation (4 °C, 4000 rcf, 10 min) von Blutproben, die mit der Exsanguination aller Tiere entnommen wurden, konnte das gewonnene Plasma in EDTA-Röhrchen bei – 80 °C gelagert werden. Das Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Düsseldorf bestimmte anschließend die Schädigungsparameter Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) für die Leber sowie für die Nierenfunktion Kreatinin und Harnstoff. Außerdem wurde die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) gemessen. Als systemischer Entzündungsparameter wurden zusätzlich die Leukozytenzahl aus dem Vollblut bestimmt.

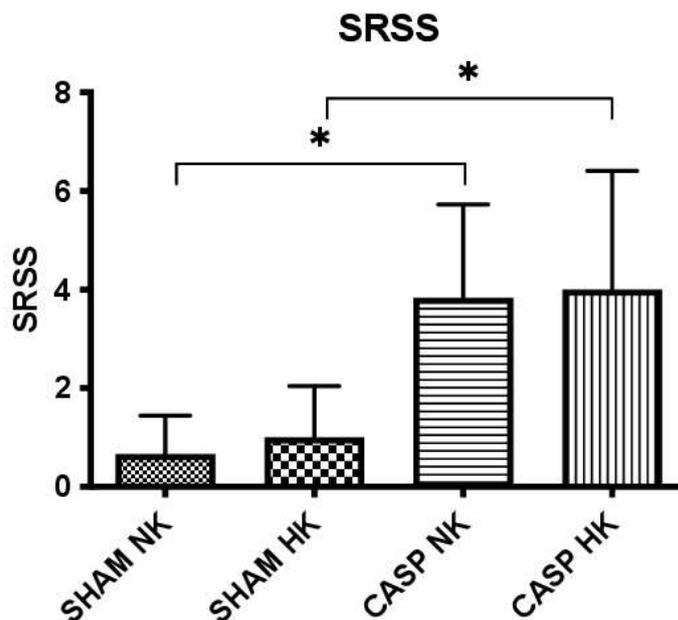
## **4.9 Statistik**

Die Statistik wurde mit GraphPad Prism 6.0 erstellt. Als statistische Methode diente der t-Test. Die Ergebnisse sind als MW±SD dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Septic rat severity score

Die Sepsisinduktion führte zu einem signifikanten Anstieg des SRSS im Vergleich zu den Sham-Tieren sowohl unter normo- als auch hyperkapnischer Beatmung (Sham Normokapnie  $0,66 \pm 0,77$  vs. CASP Normokapnie  $3,83 \pm 1,89^*$ ; Sham Hyperkapnie  $1 \pm 1,04$  vs. CASP Hyperkapnie  $4 \pm 2,41^*$ ).



**Abb. 3: Septic rat severity score (SRSS)**

Klinischer Score bei Sham oder CASP-Tieren unter Normo- und Hyperkapnie. n=12; MW±SD. \*vs. Sham (t-Test), \*p<0,05.

### 5.2 Laborchemische Marker

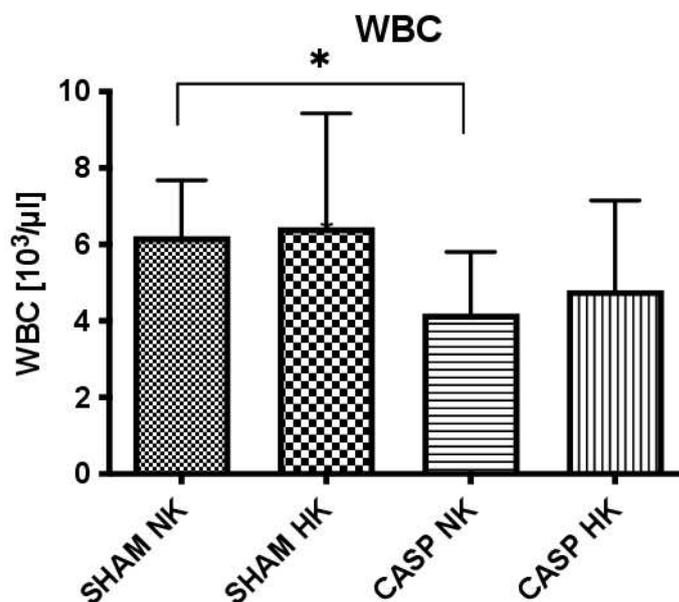
In der laborchemischen Bestimmung der Organschädigungsparameter fiel die GPT (U/l) bei CASP-Tieren unter hyperkapnischer Beatmung signifikant vs. Sham-Tieren ab (Sham Hyperkapnie  $38 \pm 10,06$  vs. CASP Hyperkapnie  $25 \pm 8,87^*$ ). Unter Normokapnie konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden (Sham Normokapnie  $33 \pm 8,14$  vs. CASP Normokapnie  $29 \pm 12,67$ ). Kreatinin, Harnstoff, GOT und LDH zeigten weder bei Sham- noch bei CASP-Tieren signifikante Veränderungen, unabhängig vom Beatmungsmodus. (siehe Tabelle 3).

Gruppe (n=12)	Kreatinin [mg/dl]	Harnstoff [mg/dl]	GOT [U/l]	GPT [U/l]	LDH [U/l]
Sham NK	0,3 ± 0,08	37,08 ± 5,05	60,75 ± 19,79	33 ± 8,14	152 ± 87,94
CASP NK	0,3 ± 0,08	33,67 ± 8,76	72,67 ± 34,90	29 ± 12,67	166 ± 59,52
Sham HK	0,3 ± 0,08	36,08 ± 7,46	59,17 ± 19,12	38 ± 10,06	135 ± 39,01
CASP HK	0,3 ± 0,09	31,83 ± 7,76	55,08 ± 12,36	25 ± 8,87*	131 ± 61,40

**Tabelle 3: Organschädigungsparameter**

Konzentration von Kreatinin, Harnstoff, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase und LDH = Laktatdehydrogenase im Blut. Alle Werte sind als Mittelwerte ± SD dargestellt; n =12, \*p<0,05 vs. Sham-HK (t-Test).

Bei Normokapnie fiel die Leukozytenzahl ( $10^3 / \mu\text{l}$ ) der CASP-Tiere im Vergleich zu Sham-Tieren signifikant ab (Sham-NK:  $6,20 \pm 1,46$ , CASP-NK:  $4,18 \pm 1,61^*$ ). Eine hyperkapnische Beatmung führte zu keinen Veränderungen der Leukozytenzahl zwischen den Sham- und CASP-Tieren (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: White blood cells (WBC)**

Leukozytenzahl ( $10^3/\mu\text{l}$ ) bei Sham- oder CASP-Tieren unter Normo- und Hyperkapnie. n=12; MW±SD. \* vs. Sham Normokapnie (t-Test), \*p<0,05.

### 5.3 Arterielle Blutgasanalysen

Der pH der Gruppen Sham HK und CASP HK fiel bereits am ersten Messpunkt 30 Minuten nach der Baseline auf 7,14 ab und bewegte sich bis zum letzten Messpunkt nach 120 Minuten zwischen Mittelwerten von 7,09 bis 7,10. Der Kohlendioxidpartialdruck ( $p\text{CO}_2$ ) der normokapnisch beatmeten Tiere bewegte sich im

angestrebten Zielkorridor von 35-40 mmHg. Die hyperkapnisch beatmeten Tiere erreichten die Zielwerte von 65-75 mmHg ebenfalls, sodass eine kontinuierliche Hyperkapnie sichergestellt werden konnte. Der arterielle Sauerstoffpartialdruck (paO<sub>2</sub>) aller Versuchsgruppen erreichte im Untersuchungszeitraum Mittelwerte zwischen 125 mmHg und 153 mmHg.

<b>pH</b>					
Gruppe (n=12)	Baseline	30min	60min	90min	120min
Sham NK	7,4±0,04	7,38±0,06	7,33±0,05	7,33±0,05	7,32±0,05
CASP NK	7,41±0,06	7,38±0,06	7,36±0,07	7,33±0,07	7,33±0,07
Sham HK	7,41±0,07	7,14±0,04	7,28±0,57	7,09±0,04	7,09±0,04
CASP HK	7,41±0,07	7,14±0,05	7,12±0,05	7,11±0,06	7,10±0,05
<b>pCO<sub>2</sub> [mmHg]</b>					
Gruppe (n=12)	Baseline	30min	60min	90min	120min
Sham NK	30±3,8	29,8±4,6	31,9±3,1	32,0±3,7	31,4±4,8
CASP NK	31,1±3,3	32,4±5,9	32,7±4,2	33,6±4,1	34,2±2,8
Sham HK	32,8±6,5	64,94±8,0	63,9±7,5	71,5±6,4	72,4±7,6
CASP HK	31,0±2,8	65,5±10,4	67,8±8,3	69,4±7,0	68,8±5,4
<b>paO<sub>2</sub> [mmHg]</b>					
Gruppe (n=12)	Baseline	30min	60min	90min	120min
Sham NK	152,6±20,6	136,6±13,1	131,6±13,3	131,2±11,0	130,2±9,5
CASP NK	152,2±6,1	143,4±6,7	137,4±7,5	128,7±10,4	125,7±13,2
Sham HK	147,5±8,6	146,3±7,2	138,5±12,2	136,5±15,2	134,1±12,4
CASP HK	153,7±9,9	148,7±9,9	143,7±11,0	138,7±16,4	133,9±13,9

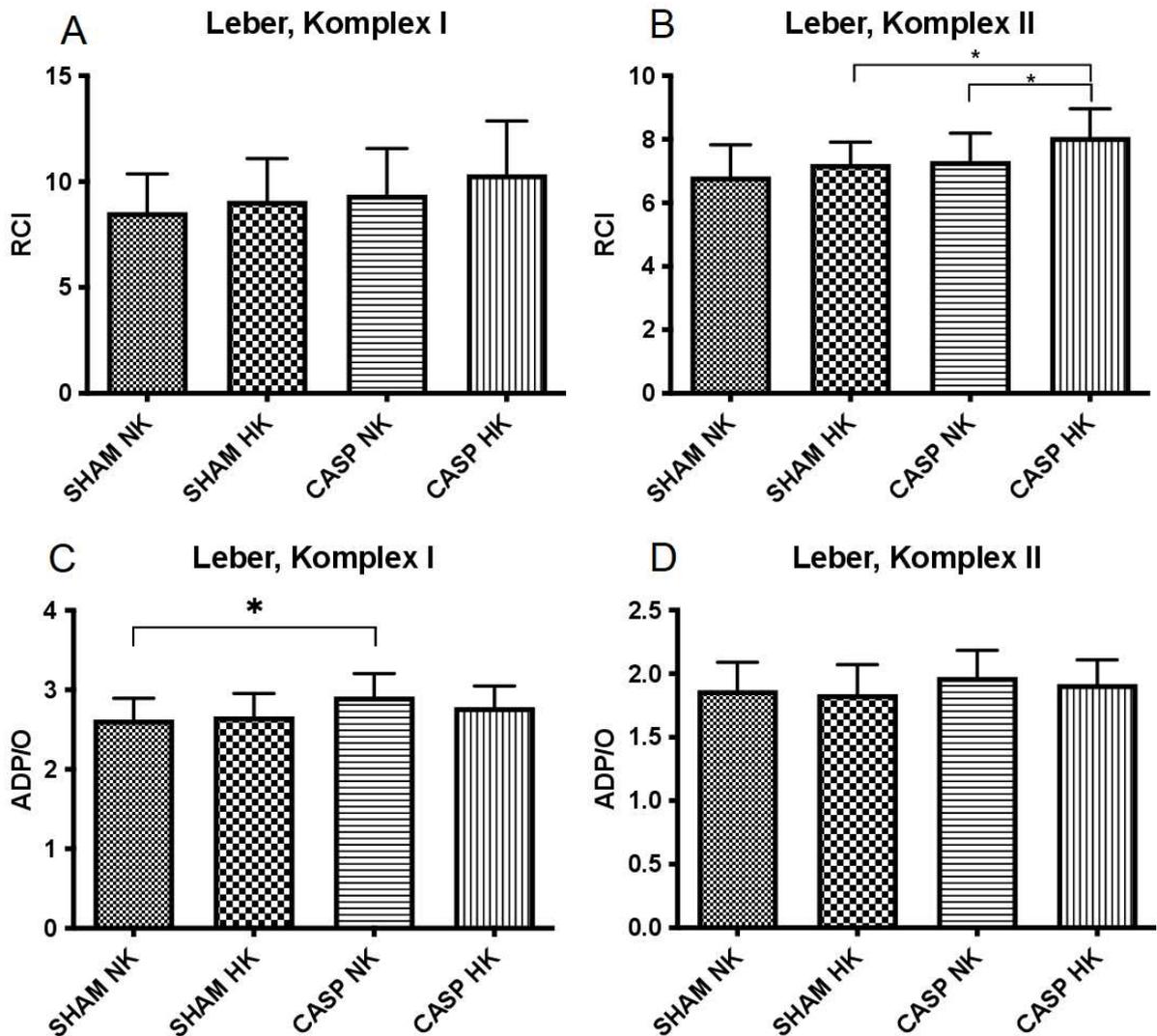
**Tabelle 4: Arterielle Blutgasanalysen**

Alle Werte sind als Mittelwerte ± SD dargestellt. n=12. mmHG = Millimeter-Quecksilbersäule; pCO<sub>2</sub> = Kohlendioxidpartialdruck; paO<sub>2</sub> = arterieller Sauerstoffpartialdruck.

## 5.4 Mitochondrienfunktion in der Leber

Der RCI für Komplex I zeigt sich sowohl unter normo- und hyperkapnischer Beatmung als auch bei Sham- und CASP-Tieren unverändert (siehe Abb. 5A). Hyperkapnie erhöht den RCI für Komplex II bei CASP-Tieren sowohl gegenüber normokapnisch beatmeten CASP-Tieren (CASP Hyperkapnie 8,06 ± 0,86\* vs CASP Normokapnie 7,31 ± 0,85) als auch gegenüber hyperkapnisch beatmeten Sham-Tieren (CASP Hyperkapnie 8,06 ± 0,86\* vs Sham Hyperkapnie 7,22 ± 0,65) (siehe Abb. 5B). Unter Normokapnie steigt der ADP/O Quotient für Komplex I bei CASP-Tieren signifikant im Vergleich zu Sham-Tieren an (CASP Normokapnie 2,91 ± 0,27\* vs Sham Normokapnie 2,63 ± 0,25) (siehe Abb. 5C). Der ADP/O Quotient für Komplex II weist

keine signifikanten Veränderungen auf, weder unter normo- und hyperkapnischer Beatmung noch bei Sham- und CASP-Tieren (siehe Abb. 5D).

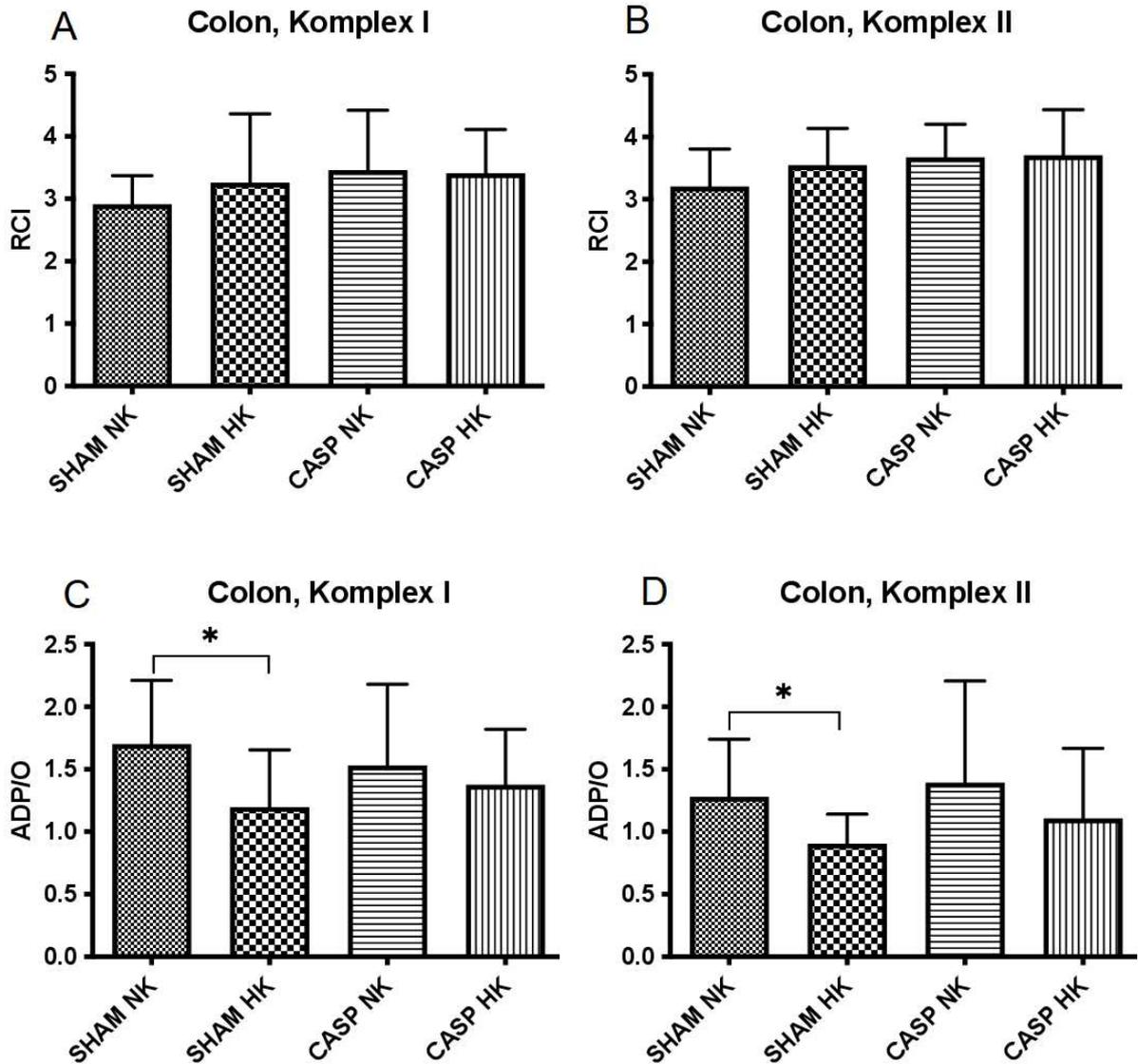


**Abb. 5: Respirometrie der Leber**

Stimulation der Komplexe I und II der Atmungskette. Respiratory control index (RCI) für die Komplexe I (A) und II (B) der Gruppen Sham Normokapnie (NK), CASP Normokapnie (NK), Sham Hyperkapnie (HK) und CASP Hyperkapnie (HK). ADP/O-Quotient für Komplex I (C) und II (D) der Gruppen Sham Normokapnie (NK), CASP Normokapnie (NK), Sham Hyperkapnie (HK) und CASP Hyperkapnie (HK). n=12, t-Test, \*p<0,05, MW±SD.

## 5.5 Mitochondrienfunktion im Colon

Der RCI zeigte sich bei Sham- und CASP-Tieren für beide Komplexe und unter normo- und hyperkapnischer Beatmung unverändert (siehe Abb. 6A und B). Hyperkapnie vermindert den ADP/O-Quotienten bei Sham-Tieren für Komplex I (Sham Normokapnie  $1,7 \pm 0,51$  vs Sham Hyperkapnie  $1,20 \pm 0,46^*$ ) (siehe Abb. 6C) und Komplex II (Sham Normokapnie  $1,28 \pm 0,46$  vs Sham Hyperkapnie  $0,9 \pm 0,24^*$ ) (siehe Abb. 6D), ohne diesen unter septischen Bedingungen zu verändern.



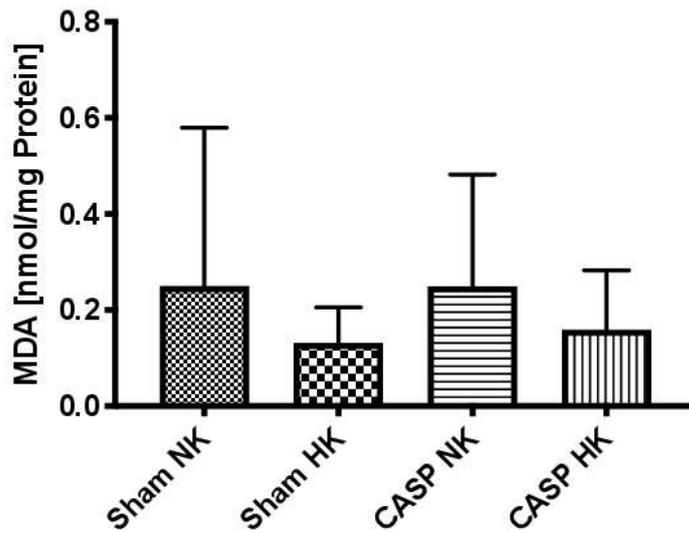
**Abb. 6: Respirometrie des Colons**

Stimulation der Komplexe I und II der Atmungskette. Respiratory control index (RCI) für die Komplexe I (A) und II (B) der Gruppen: Sham Normokapnie (NK), CASP Normokapnie (NK), Sham Hyperkapnie (HK) und CASP Hyperkapnie (HK). ADP/O-Quotient für die Komplexe I (C) und II (D) der Gruppen: Sham Normokapnie (NK), CASP Normokapnie (NK), Sham Hyperkapnie (HK), CASP Hyperkapnie (HK); n=12, t-Test, \*p<0,05, MW±SD.

## 5.6 Malondialdehyd-Assay in Leber und Colon

Die Malondialdehydkonzentration als Indikator des oxidativen Stresses ergab keine signifikanten Ergebnisse in Leber und Colon (siehe Abb. 7 und Abb. 8). Es zeigte sich weder ein Einfluss durch die Operation (CASP vs. Sham) noch durch die Beatmung (Hyperkapnie vs. Normokapnie).

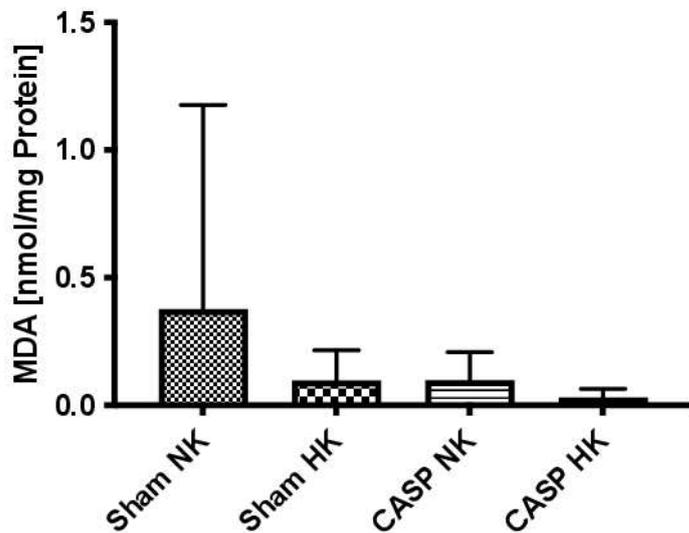
### Leber, MDA



**Abb. 7: Malondialdehydkonzentration in der Leber**

Malondialdehydkonzentration in nmol/mg Protein der Leber der Gruppen Sham und CASP unter Normokapnie (NK) und Hyperkapnie (HK). n=12, MW±SD.

### Colon, MDA



**Abb. 8: Malondialdehydkonzentration im Colon**

Malondialdehydkonzentration in nmol/mg Protein im Colon der Gruppen Sham und CASP unter Normokapnie (NK) und Hyperkapnie (HK). n=12, MW±SD.

## 6 Diskussion

Die zu Beginn formulierten Fragestellungen können wie folgt beantwortet werden:

1. Eine moderate Hyperkapnie vermindert ausschließlich nach einer sterilen Laparotomie die Effizienz der oxydativen Phosphorylierung von Colonmitochondrien. Sowohl in Lebermitochondrien als auch unter septischen Bedingungen blieb diese unverändert. Darüber hinaus verbessert eine moderate Hyperkapnie nur unter septischen Bedingungen die Kopplung von Atmungskettenaktivität und ATP-Synthese (RCI) der Lebermitochondrien.
2. Die ROS-Produktion in Leber und Colon wird durch die moderate Hyperkapnie im untersuchten Zeitraum von 120 min weder nach einer sterilen Laparotomie noch nach einer CASP-Operation statistisch signifikant beeinflusst.
3. Über den Effekt einer moderaten Hyperkapnie auf die Organschädigungsparameter der Leber und der Niere unter septischen Bedingungen kann in dieser Studie keine Aussage getroffen werden, da diese durch die moderate Sepsis nicht beeinflusst waren. Hyperkapnie jedoch signalisiert möglicherweise einen antiinflammatorischen Effekt, der sich durch Unterdrückung der sepsis-bedingten Leukopenie zeigt.

### 6.1 Methodendiskussion

Die möglichst praxisnahe Simulation einer generalisierten und moderaten Sepsis bildet die Grundlage der vorliegenden Arbeit. Kontinuierlicher Austritt von Faeces aus dem Darmlumen kann in dem hier eingesetzten CASP-Modell verlässlich und reproduzierbar zu einer diffusen Peritonitis mit systemischer Sepsis führen.<sup>57,58</sup> Dabei kann die Schwere der Sepsis durch das Lumen des verwendeten Stents unmittelbar beeinflusst werden.<sup>38</sup> Im klinischen Alltag ist dieses Bild auch von insuffizienten Anastomosen nach Darmoperationen bekannt.<sup>59</sup> Alternative Sepsismodelle wie *Cecal ligation and puncture* (CLP), bei dem das Colon etwa 15 mm proximal des Coecalpols ligiert und anschließend mit einer Venenverweilkanüle punktiert wird, führen zu einem lokalen Abszess, dessen systemische Infektionszeichen geringer sind.<sup>60,61</sup> Beim LPS-Modell wird Lipopolysaccharid als Baustein der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien i.v. oder intraabdominell appliziert.<sup>62</sup> Dieses Modell scheint weniger geeignet, die humane Sepsis nachzustellen, da diese häufig polymikrobieller Ursache ist.<sup>63</sup> Zudem folgt auf die Endotoxämie beim LPS-Modell ein früher und ausgeprägter

Anstieg der inflammatorischen Zytokine, jedoch von kürzerer Dauer als beim Menschen.<sup>64</sup> Die Tiere der Sham-Kontrollgruppen wurden ebenfalls dem Stress einer Laparotomie und Narkose ausgesetzt, welche die Mitochondrienfunktion variabel beeinflussen können.<sup>40,41</sup>

Wie bereits erwähnt, war die eingangs formulierte Annahme, dass eine moderate Hyperkapnie im Rahmen einer abdominellen Sepsis die mikrozirkulatorische Oxygenierung ( $\mu\text{HbO}_2$ ) des Colons verbessert.<sup>51</sup> Eine Steigerung des  $\mu\text{HbO}_2$  könnte etwa durch einen reduzierten mitochondrialen  $\text{O}_2$ -Verbrauch erklärt werden. Die Methode der Wahl zur Bestimmung der Mitochondrienaktivität war die Respirometrie, die in diversen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bereits etabliert wurde. Hierbei wurden Gewebehomogenate genutzt, die eine vergleichbare Mitochondrienqualität schaffen wie aufwendig isolierte Mitochondrien und zudem Folgen des Isolationsprozesses wie Beschädigung oder Verlust von Mitochondrien vermeiden.<sup>65,66</sup> Um den Einfluss von Messfehlern zu reduzieren, wurden alle Messungen mittels Respirometrie dreimal wiederholt, wobei in die Datenauswertung der Mittelwert einfließt. Da eine auf  $30^\circ\text{C}$  temperierte Messkammer nicht der physiologischen Körperkerntemperatur des Menschen entspricht, sind unmittelbare Rückschlüsse auf die Mitochondrienaktivität des Menschen möglicherweise nur bedingt anwendbar. Die durchgeführten Messungen können nicht ganzheitlich die Aktivität der Mitochondrien abbilden, bieten jedoch Zugriff auf Daten bestimmter Teilvorgänge und waren somit geeignet die eingangs gestellten Fragen zu untersuchen.

## **6.2 Ergebnisdiskussion**

### **6.2.1 Diskussion der Effekte auf den SRSS**

Alle Tiere nach CASP-Operation zeigten einen Anstieg des SRSS verglichen mit den entsprechenden Sham-Gruppen. Eine Aussage über den Effekt der Hyperkapnie auf den SRSS kann nicht getroffen werden, da zu dem Zeitpunkt der Erhebung des SRSS-Status noch keine Beatmung stattgefunden hat. Von klinischen Gesichtspunkten her gab es keine Unterschiede zwischen den in die Normo- bzw. Hyperkapnie-Gruppen randomisierten Tieren. Die möglichst detaillierte Beurteilung des klinischen Zustands der Tiere beruht vor allem auf dem Abfragen von multiplen Kriterien, die sowohl das Verhalten und das Erscheinungsbild als auch vitale Parameter, wie zum Beispiel die Atemfrequenz oder ein expiratorisches Atemgeräusch, erfassen. Die Stärke des SRSS beruht vor allem darauf, in kurzer Zeit und reproduzierbar zu erfassen, ob ein

Tier noch den Kriterien der Versuchsreihe genügt oder ausgeschlossen werden muss. Schwer erkrankte Tiere wurden bei einem SRSS > 12 mittels Pentobarbital (120 mg/kg i.p.) euthanasiert. Von 52 Tieren wurden drei Tiere auf diesem Weg aus dem Versuch ausgeschlossen, ein Tier verstarb innerhalb von 48 h nach der CASP-Operation. Die Krankheitsentwicklung konnte somit bei 48 Tieren erfolgreich dokumentiert werden. Der SRSS wurde bereits in vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe eingesetzt und über mehrere Versuchsreihen etabliert.<sup>38,41</sup> Als Schwachpunkt ist neben einem nicht verblindeten Untersucher eine gewisse Subjektivität in der Beurteilung einzelner Kriterien zu nennen.

## **6.2.2 Diskussion der Effekte auf Labormarker und Blutgasanalysen**

Die Referenzbereiche der bestimmten Organschädigungsparameter orientieren sich an einem Datensatz männlicher Wistar-Ratten der Universität Düsseldorf aus dem Jahr 2005.<sup>67</sup> Eine Nierenschädigung konnte nicht nachgewiesen werden, die Messwerte von Kreatinin und Harnstoff aller Gruppen bewegten sich in den Referenzbereichen. Eine klinisch relevante Leberschädigung ergab sich ebenfalls nicht. Der statistisch signifikante Unterschied bei GPT zwischen der CASP-Gruppe und der SHAM-Gruppe hyperkapnisch beatmeter Tiere (CASP-HK  $25 \pm 8,87$  U/L; Referenz:  $35 \pm 10$  U/L) hat keine weitere klinische Relevanz, da alle Werte nicht über dem Normalwert liegen.

Die Messwerte von GOT und LDH waren unter Normo- und Hyperkapnie weder bei septischen noch der Kontrollgruppe pathologisch verändert. Es lässt sich somit sagen, dass die moderate Sepsis durch die CASP-OP 48 h nach Sepsisinduktion anhand der verwendeten Marker zu keinem relevanten Organschaden führt. Dies deckt sich mit einer Vorstudie der Arbeitsgruppe.<sup>38</sup> Eine moderate Hyperkapnie moduliert diesen Zustand ebenfalls nicht. Die Leukozytenzahl im Blut der septischen, normokapnisch beatmeten Tiere fiel im Mittel mit  $4,2 \times 10^3 / \mu\text{l}$  unter die Untergrenze des Referenzbereiches von  $4,7 - 9,4 \times 10^3 / \mu\text{l}$ .<sup>68</sup> Zusätzlich zeigte sich ein signifikanter Abfall gegenüber den Sham-Tieren unter Normokapnie (Sham-NK:  $6,20 \pm 1,46$ , CASP-NK:  $4,18 \pm 1,61^*$ ). Diese Effekte waren bei hyperkapnisch beatmeten Tieren nicht zu beobachten. Leukozytose oder Leukopenie waren Kriterien zur Diagnosestellung des SIRS vor Etablierung der neuen Sepsis-3 Leitlinie. Eine retrospektive Kohortenstudie von septischen Intensivpatienten aus dem Jahr 2021 zeigt, die Leukopenie war mit 4,2 % im Vergleich zur Leukozytose (51,2 %) eher selten, jedoch mit einer erhöhten Mortalität verknüpft.<sup>69</sup> Antiinflammatorische Effekte in septischen Modellen unter dem Einfluss einer Hyperkapnie sind vorbeschrieben und sind vor allem in der frühen

Phase, bis zu 6 h, zu beobachten. Ein prospektiv randomisierter Tierversuch unter Anwendung des CLP-Modells konnte 3 h nach der Operation und hyperkapnischer Ventilation über 3 h einen signifikanten Abfall neutrophiler Granulozyten im gewonnenen Material nach bronchoalveolärer Lavage (BAL) der Lunge beobachten, während 96 h nach Sepsisinduktion kein inflammatorischer Effekt nachweisbar war.<sup>70</sup> John G. Laffey et al. zeigten einen signifikanten Abfall neutrophiler Granulozyten nach BAL in der Folge intratrachealer Instillation von LPS und anschließender Hyperkapnie über einen Zeitraum von 6 h.<sup>71</sup> Die Vergleichbarkeit zwischen den oben genannten Studien und unserer Versuchsreihe ist zwar im Hinblick auf die Dauer der kontrollierten Hyperkapnie (2 h) gegeben, aber angesichts des Studiendesigns unterscheiden sich die Versuchsprotokolle signifikant. Während die beiden zuvor genannten Studien Probenmaterial aus der Lunge untersuchen, werden in den vorliegenden Daten Blutproben analysiert. Die direkte Vergleichbarkeit wird zusätzlich durch jeweils unterschiedliche Sepsismodelle beeinflusst. Zusammenfassend ist also die Unterbindung der sepsis-bedingten Leukopenie als möglicher antiinflammatorischer Effekt der moderaten Hyperkapnie zu diskutieren.

Das Protokoll zur volumenkontrollierten Beatmung der Versuchstiere und die externe Zuführung von CO<sub>2</sub> waren gut geeignet, um eine rasche und über den Messzeitraum stabile moderate Hyperkapnie einzuleiten. Eine Anpassung der Beatmungsparameter oder des zugeführten Gasgemisches erfolgte nicht und war auch nicht vorgesehen, um die Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen sicherzustellen. Insgesamt sind 120 min Hyperkapnie übertragen auf ein klinisches Setting ein eher kurzer Zeitraum, sodass eine prolongierte Hyperkapnie möglicherweise weiteren Einfluss haben kann. Über den Effekt einer Hyperkapnie auf die Organschädigungsparameter kann man in unserer Studie keine Aussage treffen, da diese durch das milde Sepsis-Modell nicht beeinflusst waren.

### **6.2.3 Diskussion der Effekte auf die Mitochondrienfunktion der Leber**

Der RCI stieg bei moderater Hyperkapnie und CASP-Operation nach Stimulation der Atmungskette über Komplex II sowohl gegenüber den Tieren der normokapnisch beatmeten CASP-Gruppe also auch der Sham-Gruppe unter Hyperkapnie signifikant an. Ein hoher RCI entspricht einem hohen Maß an Kopplung der Atmungskettenaktivität. Je niedriger der RCI, desto wahrscheinlicher ist eine Entkopplung von Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung, beispielhaft durch

ein Protonenleck der inneren Mitochondrienmembran. Unabhängig vom Einfluss der Hyperkapnie sind Daten zur Funktion von Lebermitochondrien in der Sepsis widersprüchlich und sie zeigen eine verbesserte, verschlechterte oder eine unveränderte mitochondriale Funktion. Herminghaus et al. zeigten im CASP-Modell zeitabhängige Veränderungen der Mitochondrienfunktion mit einem postoperativen Anstieg von RCI und ADP/O-Quotient 24 h und 48 h nach CASP-OP sowie eine Normalisierung nach 96 h.<sup>41</sup> In der hier vorliegenden Studie konnten wir ebenfalls einen erhöhten ADP/O-Quotienten nachweisen. Der RCI zeigte sich ebenfalls tendenziell leicht erhöht. Bereits einige Jahre zuvor hatten Kozlov et al. unter Anwendung des LPS-Modells einen Anstieg der Mitochondrienfunktion in der Leber 16 h nach LPS-Injektion nachgewiesen.<sup>37</sup> Der gesteigerten Aktivität der Mitochondrien kann der Zustand des Hypermetabolismus während der Sepsis zugrunde liegen, welcher sich primär in einem erhöhten Energieverbrauch, im Speziellen aber auch einem erhöhten Protein- und Fettsäurenstoffwechsel äußert<sup>72</sup>. Whelan et al. konnten 8h nach Sepsisinduktion mittels CLP-Modell einen ebenfalls gesteigerten Protein- und Fettsäurenstoffwechsel nachweisen.<sup>73</sup> Denkbar ist also eine kompensatorisch gesteigerte Mitochondrienaktivität in der frühen Phase der Sepsis, um den Energiebedarf der Zelle weiter zu decken. Eine weitere Studie von Llesuy et al. ergab keine Veränderung der Mitochondrienaktivität im CLP-Modell nach 6h und 24 h.<sup>74</sup> Einen verminderten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch von Hepatozyten im CLP-Modell konnten sowohl Kantrow et al.<sup>75</sup> nach 16 h als auch Eyenga et al.<sup>36</sup> nach 24 h belegen. Zusätzlich demonstrierten Eyenga et al. in ihrer Studie eine verminderte ATP-Synthese sowie eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung 36 h nach CLP-OP. Daten zur Rolle der Mitochondrien unter dem Einfluss einer temporären moderaten Hyperkapnie im septischen Setting sind rar und trotzdem widersprüchlich. So führte eine erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentration in humanen Zellkulturen durch vermehrte Aktivität der mircoRNA-183 und verminderter Expression von IDH2 (Isozitatdehydrogenase 2) im Citratzyklus zu mitochondrialer Dysfunktion in Form der verminderten ATP-Synthese und verminderten Sauerstoffverbrauchs.<sup>76</sup> Daten einer Studie im Tierversuch an Mitochondrien der linken Herzkammer mit Hyperkapnie über einen Zeitraum von 20 min zeigen dagegen einen positiven Effekt auf das mitochondriale Membranpotential, mitochondriale Biogenese, morphologische Schädigung der mitochondrialen Membranen und ATP-Produktion gegenüber der Gruppe der normokapnisch beatmeten Tiere.<sup>77</sup> Das mitochondriale Membranpotential ist entscheidend für den Prozess der oxidativen Phosphorylierung und der ATP-

Synthese, weshalb ein Einbruch des Membranpotentials die oxidative Phosphorylierung und ATP-Synthese hemmt.<sup>78</sup> Das aus der verminderten ATP-Synthese entstehende Energiedefizit und die unzureichende Verfügbarkeit von ATP aktivieren zusätzlich Signalwege, die letztendlich die Apoptose induzieren.<sup>79</sup> Unsere Ergebnisse weisen ebenfalls auf einen positiven Effekt der Hyperkapnie auf die Kopplung der Atmungskette mit der ATP-Produktion unter septischen Bedingungen hin. Welche Mechanismen genau sich dahinter verbergen und warum der positive Effekt der Hyperkapnie lediglich unter septischen Bedingungen nachweisbar war, muss noch weiter untersucht werden. Denkbar wäre eine Hypothese, dass der Effekt der Hyperkapnie sowie der stimulierende Effekt der Sepsis auf den RCI-Wert kumulativ zu der Steigerung des RCI-Werts geführt haben, während beide Faktoren allein zwar zu einer Steigerung des RCI geführt haben, aber die statistische Signifikanz nicht erreichten.

Das Verhältnis von zugeführter Menge ADP zum verbrauchten Sauerstoff durch die ATP-Synthase (Komplex V) ergibt bei Zunahme des ADP/O-Quotient eine gesteigerte Effizienz, also niedrigere Energie oder weniger Sauerstoff pro Molekül ATP, das entsteht. Der Anstieg des ADP/O-Quotienten der septischen gegenüber den Sham-operierten Tieren für Komplex I der Atmungskette unter Normokapnie in unserer Studie deckt sich mit Daten einer Vorstudie der Arbeitsgruppe, die ebenfalls Messungen nach 48 h vorgenommen hat.<sup>41</sup> Geller et al. konnten dagegen im septischen Rattenmodell nach intraperitonealer Injektion von *E. coli* Endotoxin nach 18 h keine Veränderungen des ADO/O-Quotienten der Leber aufzeigen.<sup>80</sup> Unter Hyperkapnie ergaben sich weder bei CASP- noch Sham-Versuchstieren in unserer Studie Veränderungen des ADP/O-Quotienten, was nahelegt, dass eine moderate Hyperkapnie diesen Effekt der gesteigerten Effizienz möglicherweise moduliert. Auch hier ist die Datenlage unübersichtlich. Hillered et al. konnten im Tierversuch mit Wistar-Ratten Mitochondrien des Hirns isolieren und sowohl konstante als auch verminderte ADP/O-Quotienten unter Hyperkapnie dokumentieren.<sup>81</sup> Chi et al. konnten einen erhöhten ATP-Gehalt in cardialen Mitochondrien nachweisen.<sup>77</sup> Ein direkter Vergleich ist hier durch unterschiedliche Organsysteme und einen anderen Versuchsaufbau jedoch schwierig. Zu beachten ist ein teils unterschiedliches Studiendesign mit Messungen zu variablen Zeitpunkten, einer anderen Methode der Sepsisinduktion oder die Verwendung isolierter Mitochondrien anstatt von Gewebehomogenaten. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine moderate Hyperkapnie einen positiven Effekt auf die Kopplung der Atmungskette mit der ATP-Synthese in den

hepatischen Mitochondrien unter septischen Bedingungen zeigt, ohne die Effizienz der oxydativen Phosphorylierung zu beeinflussen. Diese Effekte waren nicht nach steriler Laparotomie nachweisbar, was vermuten lässt, dass sich bei den beobachteten Ergebnissen um die kumulative Wirkung der Sepsis und der Hyperkapnie handelt.

#### **6.2.4 Diskussion der Effekte auf die Mitochondrienfunktion des Colons**

Unsere Studie zeigt für die Komplexe I und II der Atmungskette in intestinalen Mitochondrien einen verminderten ADP/O-Quotienten nach einer sterilen Laparotomie für moderat hyperkapnisch beatmete Versuchstiere gegenüber den Tieren unter Normokapnie. Unter septischen Bedingungen war dieser Effekt nicht nachweisbar. Die Mitochondrienfunktion im Colon im septischen CASP-Modell unter Normokapnie bleibt bis zu 96 h nach Sepsisinduktion unverändert.<sup>38</sup> Der negative Effekt der Hyperkapnie auf die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung könnte mit der Expression des Hypoxie-induzierten Faktors-1 $\alpha$  (HIF) zusammenhängen. Der Darm ist bereits im physiologischen Zustand an wechselnde Sauerstoffkonzentrationen adaptiert. Während der Sauerstoffpartialdruck der Raumluft 21 % von 760 mmHg auf Meeresebene beträgt, misst er in der Tunica muscularis 42 mmHg und in der Tunica submucosa des Colons nur 5 - 10 mmHg.<sup>82</sup> Um einer verminderten Verfügbarkeit von Sauerstoff zu entgegen, kann mit Hilfe von HIF zum einen das Sauerstoffangebot erhöht, aber auch der Sauerstoffverbrauch reduziert werden.<sup>83</sup> Die Expression von HIF hat zudem eine protektive Wirkung zur Aufrechterhaltung der wichtigen Barrierefunktion der Darmwand.<sup>84</sup>

In einer tierexperimentellen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass eine sechsstündige Hyperkapnie über Suppression der HIF-1 $\alpha$  Expression direkt das Sauerstoffangebot und den Sauerstoffverbrauch modulieren kann.<sup>85</sup> Ein vermehrter Sauerstoffverbrauch durch Unterdrückung von HIF-1 $\alpha$  könnte den Abfall des ADP/O-Quotienten der Versuchsgruppe Sham-HK gegenüber Sham-NK erklären und möglicherweise Hinweis für den fehlenden Einfluss der Hyperkapnie auf die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung unter septischen Bedingungen in unserer Studie liefern. Sepsis oder septischer Schock steigert zudem die HIF-1 $\alpha$  Expression.<sup>86</sup> Der hemmende Effekt der Hyperkapnie kann hier entgegenwirken und den möglichen Effekt der Sepsis auf die intestinalen Mitochondrien verdecken. Allerdings widerspricht diese Hypothese den Ergebnissen aus der vergangenen Studie, die zeigte, dass

Sepsis keinen Effekt auf die intestinale Mitochondrien hat.<sup>41</sup> Eine mögliche Erklärung dafür könnte die niedrige metabolische Aktivität des Darms sein.<sup>87</sup>

Am wahrscheinlichsten erscheint, dass die Wirkung der moderaten Hyperkapnie auf die mitochondriale Funktion multifaktoriell ist. Um diese Aussage zu prüfen sind jedoch weitere Daten nötig. Direkte Vergleichsstudien, die eine moderate Hyperkapnie in Mitochondrien des Colons im septischen und nicht septischen Tiermodell untersuchen, liegen nicht vor.

### **6.2.5 Diskussion der Effekte auf die reaktiven Sauerstoffspezies**

Der Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies erfolgte über die Messung der MDA-Konzentration in Homogenaten von Leber und Colon 48 h nach Sepsisinduktion. Die Versuchsreihe ergab keine Signifikanz in allen vier untersuchten Gruppen. Diese Ergebnisse decken sich mit einer Vorstudie der Arbeitsgruppe in der unterschiedliche septische Schweregrade im CASP-Modell nach 24 h in Lebermitochondrien ohne signifikante Veränderung der ROS-Produktion blieben.<sup>38</sup> Im Gegenteil dazu konnte im zeitlichen Verlauf einer weiteren Vorstudie nach einem signifikanten Anstieg der ROS-Produktion in der Leber nach 24 h - sowohl nach steriler Laparotomie als auch bei septischen Tieren - ein Abfall nach 96 h nachgewiesen werden.<sup>41</sup> Taylor et al. zeigen nach CLP in der frühen Phase bis 24 h nach Induktion der abdominalen Sepsis den organspezifischen Anstieg der ROS-Produktion in der Leber.<sup>88</sup> Es gibt aber ebenfalls Hinweise, dass beschädigte Lebermitochondrien im Rahmen der mitochondrialen Dysfunktion der Autophagie zugeführt werden und somit weiterer Schaden durch gesteigerte ROS-Produktion verhindert wird.<sup>89</sup> Dieser Mechanismus greift womöglich schon im Anfangsstadium der Sepsis und verstärkt sich im zeitlichen Verlauf, was zu einer frühzeitigen Autophagie beschädigter Mitochondrien und zu keinem oder keinem weiteren Anstieg der ROS führen würde. In Mitochondrien des Colons tritt offenbar ein verzögerter Anstieg der ROS-Produktion in Korrelation mit der Expression von TNF- $\alpha$  auf, wobei es noch weitere Einflussfaktoren geben muss.<sup>41,90</sup> Unser Messzeitpunkt nach 48 h ist womöglich zu früh, um den beschriebenen Anstieg nach 96 h zu erfassen.<sup>41</sup> Die wenigen vorliegenden Daten, insbesondere zum Einfluss einer Hyperkapnie, machen einen Blick auf andere Organsysteme erneut lohnenswert. Moderate Hyperkapnie führte bei nicht septischen Tieren in Hirngewebe zu einem Anstieg der ROS-Produktion.<sup>91</sup> Eine gesteigerte ROS-Produktion zeigten auch Kardiomyozyten gesunder Tiere unter dem Einfluss einer Hyperkapnie.<sup>77</sup> Im

septischen LPS-Modell bei über 180 min hyperkapnisch beatmeten Chinchillakaninchen ergab sich kein spezifischer Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies.<sup>92</sup> Die ROS-Produktion unserer Versuchsreihe zeigt zwar keine signifikanten Veränderungen, generell wird diese jedoch sowohl zeitlich als auch abhängig vom Organsystem und dem Krankheitsverlauf moduliert, wobei eine moderate Hyperkapnie kein relevanter Einflussfaktor zu sein scheint.

## 7 Ausblick

Die Tatsache, dass über 80 % der Patienten im septischen Schock auf eine invasive Beatmung angewiesen sind, zeigt, wie wichtig weitere Erkenntnisse über die Anwendung lungenprotektiver Beatmungsstrategien mit konsekutiver, permissiver Hyperkapnie sind.<sup>93</sup> Unklar ist bislang auch die Rolle der Mitochondrien während der Sepsis und einer temporären Hyperkapnie. Mitochondrien des Colons zeigten in dieser Studie nur unter sterilen Bedingungen im Rahmen einer Hyperkapnie eine verminderte Effizienz. Mitochondrien der stoffwechselaktiveren Leber scheinen in der Frühphase der Sepsis durch eine Hyperkapnie die Kopplung von Atmungskettenaktivität und ATP-Synthese zu verbessern. Die Wirkung einer moderaten Hyperkapnie auf die mitochondriale Funktion scheint also organspezifisch zu sein.

Ein limitierender Faktor dieser vorklinischen Studie ist sicherlich die Untersuchungszeit. Die prolongierte Hyperkapnie wäre ein Ansatz weiterer Studien, um das Potential für die klinische Anwendbarkeit zu prüfen, da diese in der Regel den Zeitraum der vorliegenden Daten deutlich überschreiten. Auch der beschriebene antiinflammatorische Effekt der Hyperkapnie in der Sepsis kann Ansatzpunkt weiterer Forschung sein. Auch wenn Ergebnisse tierexperimenteller Versuche nicht direkt auf die Menschen übertragbar sind, können sie eine Grundlage bilden, anwendbare Therapiekonzepte für Patienten mit abdomineller Sepsis zu erarbeiten, um zukünftig das Outcome zu verbessern.

## 8 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Vincent J-L, Sakr Y, Sprung CL, *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Critical care medicine* 2006; 34: 344–53
2. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2016; 193: 259–72
3. Seventieth World Health Assembly. Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis 2017
4. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Medicine* 2016; 42: 1980–9
5. Martin AB, Hartman M, Benson J, Catlin A. National Health Spending In 2014: Faster Growth Driven By Coverage Expansion And Prescription Drug Spending. *Health affairs (Project Hope)* 2016; 35: 150–60
6. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine* 2001; 29: 1303–10
7. Lagu T, Rothberg MB, Shieh M-S, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Critical care medicine* 2012; 40: 754–61
8. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Critical care medicine* 2017; 45: 486–552
9. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801–10
10. Vincent J-L, Moreno R, Takala J, *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Medicine* 1996; 22: 707–10
11. Kumar G, Kumar N, Taneja A, *et al.* Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest* 2011; 140: 1223–31
12. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Medicine* 2021; 47: 1181–247
13. Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ (Clinical research ed.)* 2016; 353: i1585
14. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars in immunopathology* 2017; 39: 517–28
15. Müller-Werdan U, Schumann H, Fuchs R, *et al.* Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) is cardiodepressant in pathophysiologically relevant concentrations without inducing inducible nitric oxide-(NO)-synthase (iNOS) or triggering serious cytotoxicity. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1997; 29: 2915–23
16. Li Q, Zhang Q, Wang C, Liu X, Li N, Li J. Disruption of tight junctions during polymicrobial sepsis in vivo. *The Journal of pathology* 2009; 218: 210–21
17. Uhle F, Lichtenstern C, Brenner T, Weigand MA. Sepsis und Multiorganversagen - Pathophysiologie der Sepsis. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 2015; 50: 114–22

18. Karlsson S, Varpula M, Ruokonen E, *et al.* Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. *Intensive Care Medicine* 2007; 33: 435–43
19. Cao Y, Chen Q, Wang Z, *et al.* PLK1 protects against sepsis-induced intestinal barrier dysfunction. *Scientific Reports* 2018; 8
20. Klingensmith NJ, Coopersmith CM. The Gut as the Motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness. *Critical care clinics* 2016; 32: 203–12
21. Mittal R, Coopersmith CM. Redefining the gut as the motor of critical illness. *Trends in molecular medicine* 2014; 20: 214–23
22. Yoseph BP, Klingensmith NJ, Liang Z, *et al.* Mechanisms of Intestinal Barrier Dysfunction in Sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)* 2016; 46: 52–9
23. Klaus DA, Motal MC, Burger-Klepp U, *et al.* Increased plasma zonulin in patients with sepsis. *Biochimica Medica* 2013; 23: 107–11
24. Saxena A, Lopes F, McKay DM. Reduced intestinal epithelial mitochondrial function enhances in vitro interleukin-8 production in response to commensal *Escherichia coli*. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2018; 67: 829–37
25. Saxena A, Lopes F, Poon KKH, McKay DM. Absence of the NOD2 protein renders epithelia more susceptible to barrier dysfunction due to mitochondrial dysfunction. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2017; 313: G26-G38
26. Nazli A, Yang P-C, Jury J, *et al.* Epithelia Under Metabolic Stress Perceive Commensal Bacteria as a Threat. *The American Journal of Pathology* 2004; 164: 947–57
27. Yan J, Li S, Li S. The role of the liver in sepsis. *International reviews of immunology* 2014; 33: 498–510
28. Canabal JM, Kramer DJ. Management of sepsis in patients with liver failure. *Current opinion in critical care* 2008; 14: 189–97
29. Nessler N, Launey Y, Aninat C, Morel F, Mallédant Y, Seguin P. Clinical review: The liver in sepsis. *Critical care (London, England)* 2012; 16: 235
30. Balestra GM, Legrand M, Ince C. Microcirculation and mitochondria in sepsis: getting out of breath. *Current opinion in anaesthesiology* 2009; 22: 184–90
31. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, *et al.* Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet* 2002; 360: 219–23
32. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical care (London, England)* 2005; 9 Suppl 4: S13-9
33. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, *et al.* Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2004; 286: R491-7
34. Arulkumaran N, Deutschman CS, Pinsky MR, *et al.* MITOCHONDRIAL FUNCTION IN SEPSIS. *Shock (Augusta, Ga.)* 2016; 45: 271–81
35. Jeger V, Djafarzadeh S, Jakob SM, Takala J. Mitochondrial function in sepsis. *European journal of clinical investigation* 2013; 43: 532–42
36. Eyenga P, Roussel D, Morel J, *et al.* Time course of liver mitochondrial function and intrinsic changes in oxidative phosphorylation in a rat model of sepsis. *Intensive care medicine experimental* 2018; 6

37. Kozlov AV, Staniek K, Haindl S, *et al.* Different effects of endotoxic shock on the respiratory function of liver and heart mitochondria in rats. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 2006; 290: G543-9
38. Herminghaus A, Barthel F, Heinen A, *et al.* Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver. *Mitochondrion* 2015; 24: 122–8
39. Drechsler S, Weixelbaumer KM, Weidinger A, *et al.* Why do they die? Comparison of selected aspects of organ injury and dysfunction in mice surviving and dying in acute abdominal sepsis. *Intensive care medicine experimental* 2015; 3: 48
40. Mittal A, Hickey AJR, Chai CC, *et al.* Early organ-specific mitochondrial dysfunction of jejunum and lung found in rats with experimental acute pancreatitis. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 2011; 13: 332–41
41. Herminghaus A, Papenbrock H, Eberhardt R, *et al.* Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive care medicine experimental* 2019; 7: 4
42. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2009; 20: 332–40
43. Mantzaris K, Tsolaki V, Zakyntinos E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017; 2017: 5985209
44. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British journal of anaesthesia* 2011; 107: 57–64
45. den Uil CA, Klijn E, Lagrand WK, *et al.* The microcirculation in health and critical disease. *Progress in cardiovascular diseases* 2008; 51: 161–70
46. Petrucci N, Feo C de. Lung protective ventilation strategy for the acute respiratory distress syndrome. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013: CD003844
47. Villar J, Kacmarek RM, Pérez-Méndez L, Aguirre-Jaime A. A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilatory strategy improves outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial. *Critical care medicine* 2006; 34: 1311–8
48. Curley G, Contreras MMB, Nichol AD, Higgins BD, Laffey JG. Hypercapnia and acidosis in sepsis: a double-edged sword? *Anesthesiology* 2010; 112: 462–72
49. Fleischmann E, Herbst F, Kugener A, *et al.* Mild hypercapnia increases subcutaneous and colonic oxygen tension in patients given 80% inspired oxygen during abdominal surgery. *Anesthesiology* 2006; 104: 944–9
50. Schwartges I, Schwarte LA, Fournell A, Scheeren TWL, Picker O. Hypercapnia induces a concentration-dependent increase in gastric mucosal oxygenation in dogs. *Intensive Care Medicine* 2008; 34: 1898–906
51. Stubs CCM, Picker O, Schulz J, *et al.* Acute, short-term hypercapnia improves microvascular oxygenation of the colon in an animal model of sepsis. *Microvascular research* 2013; 90: 180–6
52. Vannucci RC, Towfighi J, Heitjan DF, Brucklacher RM. Carbon dioxide protects the perinatal brain from hypoxic-ischemic damage: an experimental study in the immature rat. *Pediatrics* 1995; 95: 868–74

53. Mas A, Saura P, Joseph D, *et al.* Effect of acute moderate changes in PaCO<sub>2</sub> on global hemodynamics and gastric perfusion. *Critical care medicine* 2000; 28: 360–5
54. Akça O, Doufas AG, Morioka N, Iscoe S, Fisher J, Sessler DI. Hypercapnia improves tissue oxygenation. *Anesthesiology* 2002; 97: 801–6
55. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, Farr A, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 1951; 193: 265–75
56. Simonnet H, Vigneron A, Pouysségur J. Conventional techniques to monitor mitochondrial oxygen consumption. *Methods in enzymology* 2014; 542: 151–61
57. Korneev KV. Mouse Models of Sepsis and Septic Shock. *Molecular Biology* 2019; 53: 704–17
58. Traeger T, Koerner P, Kessler W, *et al.* Colon ascendens stent peritonitis (CASP)—a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2010
59. Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D, *et al.* Colon ascendens stent peritonitis—a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock (Augusta, Ga.)* 2007; 28: 59–64
60. Maier S, Traeger T, Entleutner M, *et al.* Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)* 2004; 21: 505–11
61. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research* 1980; 29: 189–201
62. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *Journal of leukocyte biology* 2007; 81: 137–43
63. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, *et al.* Cecal ligation and puncture. *Shock (Augusta, Ga.)* 2005; 24 Suppl 1: 52–7
64. Seemann S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *Journal of biomedical science* 2017; 24: 60
65. Kozlov AV, Duvigneau JC, Hyatt TC, *et al.* Effect of estrogen on mitochondrial function and intracellular stress markers in rat liver and kidney following trauma-hemorrhagic shock and prolonged hypotension. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 2010; 16: 254–61
66. Azevedo LCP. Mitochondrial dysfunction during sepsis. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 2010; 10: 214–23
67. Zur B. Laborchemische Referenzbereich für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. *Univ. Diss. Düsseldorf, 2005*
68. Anja Ewringmann BG. Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus: Diagnostischer Leitfaden und Therapie. *Stuttgart, 2014*
69. Belok SH, Bosch NA, Klings ES, Walkey AJ. Evaluation of leukopenia during sepsis as a marker of sepsis-defining organ dysfunction. *PloS one* 2021; 16: e0252206
70. Costello J, Higgins B, Contreras M, *et al.* Hypercapnic acidosis attenuates shock and lung injury in early and prolonged systemic sepsis. *Critical care medicine* 2009; 37: 2412–20

71. Laffey JG, Honan D, Hopkins N, Hyvelin J-M, Boylan JF, McLoughlin P. Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004; 169: 46–56
72. Tappy L, Chioléro R. Substrate utilization in sepsis and multiple organ failure. *Critical care medicine* 2007; 35: S531-4
73. Whelan SP, Carchman EH, Kautza B, *et al.* Polymicrobial sepsis is associated with decreased hepatic oxidative phosphorylation and an altered metabolic profile. *The Journal of surgical research* 2014; 186: 297–303
74. Llesuy S, Evelson P, González-Flecha B, *et al.* Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Radical Biology and Medicine* 1994; 16: 445–51
75. Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Archives of biochemistry and biophysics* 1997; 345: 278–88
76. Vohwinkel CU, Lecuona E, Sun H, *et al.* Elevated CO<sub>2</sub> levels cause mitochondrial dysfunction and impair cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 2011; 286: 37067–76
77. Chi L, Wang N, Yang W, *et al.* Protection of Myocardial Ischemia-Reperfusion by Therapeutic Hypercapnia: a Mechanism Involving Improvements in Mitochondrial Biogenesis and Function. *Journal of cardiovascular translational research* 2019; 12: 467–77
78. Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environmental health perspectives* 1990; 87: 213–8
79. Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* 2014; 5: 66–72
80. Geller ER, Jankauskas S, Kirkpatrick J. Mitochondrial death in sepsis: A failed concept. *Journal of Surgical Research* 1986; 40: 514–7
81. Hillered L, Ernster L, Siesjö BK. Influence of in vitro lactic acidosis and hypercapnia on respiratory activity of isolated rat brain mitochondria. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1984; 4: 430–7
82. He G, Shankar RA, Chzhan M, Samouilov A, Kuppusamy P, Zweier JL. Noninvasive measurement of anatomic structure and intraluminal oxygenation in the gastrointestinal tract of living mice with spatial and spectral EPR imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96: 4586–91
83. Cummins EP, Strowitzki MJ, Taylor CT. Mechanisms and Consequences of Oxygen and Carbon Dioxide Sensing in Mammals. *Physiological reviews* 2020; 100: 463–88
84. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *The Journal of clinical investigation* 2004; 114: 1098–106
85. Selfridge AC, Cavadas MAS, Scholz CC, *et al.* Hypercapnia Suppresses the HIF-dependent Adaptive Response to Hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 2016; 291: 11800–8
86. Vanderhaeghen T, Vandewalle J, Libert C. Hypoxia-inducible factors in metabolic reprogramming during sepsis. *The FEBS journal* 2020; 287: 1478–95

87. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological reviews* 1997; 77: 731–58
88. Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Archives of biochemistry and biophysics* 1995; 316: 70–6
89. Aki T, Unuma K, Uemura K. Emerging roles of mitochondria and autophagy in liver injury during sepsis. *Cell stress* 2017; 1: 79–89
90. Arab HH, Al-Shorbagy MY, Abdallah DM, Nassar NN. Telmisartan attenuates colon inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of experimental inflammatory bowel disease. *PloS one* 2014; 9: e97193
91. Ding H-G, Li Y, Li X-S, *et al.* Hypercapnia promotes microglial pyroptosis via inhibiting mitophagy in hypoxemic adult rats. *CNS neuroscience & therapeutics* 2020; 26: 1134–46
92. Billert H, Bednarek E, Kusza K, Ponichter M, Kurpisz M. Effect of acute isooxic hypercapnia on oxidative activity of systemic neutrophils in endotoxemic rabbits. *Central-European journal of immunology* 2021; 46: 47–53
93. Quenot J-P, Binquet C, Kara F, *et al.* The epidemiology of septic shock in French intensive care units: the prospective multicenter cohort EPISS study. *Critical Care* 2013; 17: R65

## 9 Anhang

### 9.1 Materialien und Geräte tierexperimenteller Versuch

Atemgas	Linde AG, Leuna, Deutschland
Aufzeichnung	Powerlab, AD Instruments, Castle Hill, Australien
Hämodynamik und Respiration	
Beatmungsgerät	Inspira Advanced Safety Ventilator, Havard Apparatus, Holliston, USA
Blutgasanalysator	ABL 715, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Buprenorphin s.c.	Temgesic®, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland
Kompressen	ES-Kompressen, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Lochtuch	Foliodrape® Lochtuch selbstklebend, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Nahtmaterial	EH7403, 6-0 Ethikon Prolene®, Ethikon Inc., Somerville, USA VCP304H, 4-0 Ethicon Vicryl Plus®, Johnson & Johnson GmbH, Neuss, Deutschland
Pentobarbital	Narcoren® Pentobarbital-Natrium, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland
Ringer-Infusionslösung	Zulassungsnummer: 6737462.00.01, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sevofluran	Sevorane®, Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Thermometer	GTH 1160, Greisinger Electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland
Tubus	Braunüle® MT G16, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Venenverweilkanüle	Braunüle® MT G14, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Wärmematte	Julabo 6, Julabo Labortechnik KmbH, Seelbach, Deutschland

## 9.2 Materialien und Geräte laborexperimenteller Versuch

Bad-Umwälzthermostat	ED-5, JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland
Eismaschine	RF 0244, MANITOWOC ICE INC., Manitowoc, Wisconsin, USA
Falcons	Falcon™ 15 ml und 50 ml, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Hämatologiegerät	scil Vet abc, scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland
Kühlschrank	Forma 900 Ultratiefkühlschrank, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
Magnetrührer	IKAMAG RET Janke & Kunkel GmbH u. Co KG, Staufen, Deutschland
Mikrotestplatte	Mikrotestplatte 96 Well, SARSTEDT AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Pipetten	Pipette Pasteur 7 ml, VWR International, Darmstadt, Deutschland Pipettensatz Eppendorf Research® 100 µl bis 5000 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattenlesegerät	Synergy 2 mit Software Gen5 Version 1.1, BioTek U.S, Winooski, USA
Reagenzglasschüttler	Reax Top, SuboLab GmbH Fein- und Industriechemie, Pfinztal-Söllingen, Deutschland
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Repirometer Software	782 System Version 4.4, Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Scotland
Respirometer	MT200 und SI782, Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Scotland
Rührwerk	IKA® EUROSTAR 20 digital, IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland
Trockenschrank	UT 6060, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Vortexgerät	Vortex Genie Touch Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

## 9.3 Chemikalien und Reagenzien laborexperimenteller Teil

### 9.3.1 Substrate Respirometrie:

Adenosindiphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen b. München, Deutschland
Glutamat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Malat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Succinat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland

### 9.3.2 Weitere Reagenzien:

2-Thiobarbitursäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA (fatty acid free)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen b. München, Deutschland
BSA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
cOplete™	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
EGTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Linde, Duisburg, Deutschland
Folin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Kaliumchlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mannitol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
3-MOPS	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
N-Butanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumcarbonat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phosphorsäure 85%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodium sulfite	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Tetrasodiumpyrophosphat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Trypsin-ETDA	Life Technologies Corporation, Grand Island NY, USA

## 9.4 Puffer und Lösungen

### 9.4.1 Isolationspuffer

BSA	0,1%ig
EGTA	1 mM
Kaliumhydrogenphosphat	5 mM
Mannitol	200 mM
3-MOPS	5 mM
Saccharose	50 mM
pH	7,15

### 9.4.2 Respirationspuffer

BSA	0,1%ig
EGTA	2,5 mM
Kaliumhydrogenphosphat	5 mM
KCL	130 mM
3-MOPS	20 mM
Tetrasodiumpyrophosphat	1 $\mu$ M
pH	7,4

### 9.4.3 Proteinbestimmung nach Lowry

#### Lowry Reagenz A

Natriumcarbonat	10g
Natriumhydroxid	0,1 M 500 ml

#### Lowry Reagenz B

Kalium-Natrium-Tartrat	2g in 100ml Aqua dest. gelöst
------------------------	-------------------------------



## 9.5 Untersuchungsbogen Septic rat severity score

Anlage 2

### Untersuchungsbogen

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

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

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

Klinische Untersuchung:

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

### Auswertung:

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

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

Euthanasierung des Tieres durch Überdosis Pentobarbital (120mg/kg) i.p. notwendig bei 10 und mehr Punkten

Nein   
Ja

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

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SOFA-Score <sup>9</sup> zum Erkennen akuter Organdysfunktion in der Sepsis .....	2
Tabelle 2: Standardreihe nach Lowry.....	11
Tabelle 3: Organschädigungsparameter. ....	16
Tabelle 4: Arterielle Blutgasanalysen. ....	17

## 11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Versuchsablauf tierexperimenteller Teil .....	10
Abb. 2: Versuchsablauf Respirometrie .....	13
Abb. 3: Septic rat severity score (SRSS).....	15
Abb. 4: White blood cells (WBC) .....	16
Abb. 5: Respirometrie der Leber .....	18
Abb. 6: Respirometrie des Colons.....	19
Abb. 7: Malondialdehydkonzentration in der Leber .....	20
Abb. 8: Malondialdehydkonzentration im Colon .....	20

## **Danksagung**

In der Folge möchte ich all denen danken die zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Olaf Picker für die Möglichkeit dieses Promotionsvorhaben umzusetzen.

An Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus geht ein besonderer Dank für die unermüdliche Unterstützung und Begleitung, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Deine Arbeit und dein Engagement sind nicht selbstverständlich.

Danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer für die Schaffung einer guten Forschungsumgebung und ein jederzeit offenes Ohr für alle Doktoranden und Doktorandinnen.