

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

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

Dissertation

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

vorgelegt von
Charlotte Schlimgen
2025

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

Dekan/in: Univ.- Prof. Dr. med. Nikolai Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. O. Picker, MBA

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Dr. med. André Heinen

Abstract Deutsch

Hintergrund: Trotz der hohen Bedeutung der Sepsis als eine der wichtigsten Todesursachen in Deutschland ist die Pathophysiologie der Sepsis bis heute nicht vollständig verstanden. Dabei ist die Aufrechterhaltung der Perfusion und Oxygenierung beispielsweise des Gastrointestinaltrakts für das Überleben einer Sepsis von hoher Bedeutung. Unabhängig von der durch vasodilatierende Mediatoren unterstützten Makrozirkulation, spielt bei der Entstehung eines septischen Multiorganversagens v.a. auch die Mikrozirkulation eine maßgebliche Rolle. Hierbei konnten der Zusammenhang zwischen reduzierter Mikrozirkulation und mitochondrialer Dysfunktion hergestellt werden. Zahlreiche Substanzen können die Sauerstoffversorgung im Gastrointestinaltrakt erhöhen, jedoch limitieren ausgeprägte kardiale Nebenwirkungen deren systemischen Gebrauch. Daher wurde in einer vorangegangenen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe der Ansatz der lokalen Verabreichung verfolgt. Hier konnte gezeigt werden, dass die lokale Therapie mit dem Prostaglandin Iloprost als Vasodilatator bei hämorrhagischem Schock im Hundemodell die Oxygenierung der Magenschleimhaut verbessern konnte, ohne dabei Einfluss auf Kreislaufparameter zu nehmen. In einem weiteren Projekt unserer Arbeitsgruppe konnte ein positiver Einfluss von lokal appliziertem Iloprost auf die mitochondriale Funktion im Colonomogenat von gesunden Ratten festgestellt werden. Unklar ist bislang, ob sich unter septischen Bedingungen ähnliche Ergebnisse erzielen lassen und sich so die Prognose im septischen Organversagen verbessern könnte. Außerdem konnten in vitro Untersuchungen zeigen, dass das direkte Parasympathomimetikum Carbachol die intestinale Barrierefunktion verbessert. Carbachol als Acetylcholin Analogon bewirkt über die Stimulation des Parasympathikus eine Vasodilatation und schützt die intestinale Barrierefunktion, sodass eine Kombination mit Iloprost sich günstig auswirken könnte. Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob die lokale Applikation von Iloprost und Carbachol die mitochondriale Funktion im Colon im Rahmen einer Sepsis verbessern kann. Für den Versuchsaufbau wurde dafür die abdominelle Sepsis im Rattenmodell gewählt. **Methodik:** Nach der Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (84-02.04.2015.A538) wurden die Versuche an insgesamt 80 männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Dabei wurden die Tiere in 8 Versuchsgruppen (n=10) eingeteilt und entweder mit Carbachol, Iloprost, einer Kombination der beiden Medikamente oder NaCl behandelt. Die Versuche wurden sowohl unter septischen als auch nicht septischen Bedingungen durchgeführt. Zur Induktion der abdominalen Sepsis wurde dabei das CASP-Modell (*Colon ascendens stent peritonitis*) angewandt. Die nicht-septischen Kontrolltiere wurden einer Sham-Operation unterzogen. 24 Stunden nach der jeweiligen Operation wurden die Versuchstiere erneut laparotomiert und die jeweilige Substanz 60min lokal in das Colon appliziert. Anschließend wurden zur Erfassung der mitochondrialen Funktion in Colonomogenaten respirometrisch sowohl die Sauerstoffkonzentration als auch die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit gemessen. Zur Quantifizierung der mitochondrialen Funktion wurden im Anschluss der *Respiratory Control Index* (RCI) und die *Adenyldiphosphat-oxygen Ratio* (ADP/O-R) errechnet. Mittels Kruskal-Wallis und Dunn's Korrektur wurden die Daten statistisch analysiert. Die Ergebnisse wurden als Minimal-, Median- und Maximalwert dargestellt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ angesehen. **Ergebnisse:** Innerhalb der CASP-Versuchsreihe zeigte sich bei Iloprost und bei Carbachol keine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion im Colon. In der Sham-Gruppe zeigte sich nach Gabe von Iloprost sowohl über Komplex I (Kontrolle: 3,11, Ilo: 3,92

p < 0,05) als auch über Komplex II (Kontrolle: 4,99, Ilo: 6,16, p < 0,05) eine signifikante Steigerung des RCI. **Schlussfolgerung:** Die lokale Applikation von Iloprost konnte in nicht-septischen Tieren eine signifikante Steigerung des RCI und somit eine verbesserte Kopplung der Atmungskettenaktivität an die oxidative Phosphorylierung im Colon erzielen. Die Kombination mit Carbachol konnte keinen zusätzlichen positiven Effekt bewirken. In der septischen Versuchsreihe konnten weder Iloprost noch Carbachol eine signifikante Veränderung der Parameter der mitochondrialen Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen.

Abstract English

Background: Despite the significance of sepsis as one of the most important causes of death in Germany, the pathophysiology of sepsis is still not fully understood. Maintaining perfusion and oxygenation, for example of the gastrointestinal tract, is of great importance for survival in sepsis. Independent of the macrocirculation, which is largely promoted by vasodilating mediators such as NO, the microcirculation also plays a decisive role in the development of septic multiorgan failure. The connection between reduced microcirculation and mitochondrial dysfunction has already been established. Numerous substances can increase oxygenation in the gastrointestinal tract, but severe cardiac side effects limit their systemic use. Therefore, in a previous study of our team, the approach of local administration was followed. It was shown that local therapy with the prostaglandin iloprost as a vasodilator in hemorrhagic shock in a dog model could improve the oxygenation of the gastric mucosa without affecting circulatory parameters. In another project of our team a positive influence of locally applied iloprost on the mitochondrial function in the colon homogenate of healthy rats could be determined. It remains unclear whether similar results can be achieved under septic conditions and whether the prognosis in septic organ failure could be improved. In addition, in vitro studies have already shown that the direct parasympathomimetic carbachol improves the intestinal barrier function. Carbachol, as an acetylcholine analogue, causes vasodilation via stimulation of the parasympathetic nervous system and protects the intestinal barrier function, so that a combination with iloprost could have beneficial effects. The aim of this study was to investigate whether the local application of iloprost and carbachol can improve the mitochondrial function in the colon during sepsis. For the experimental setup the abdominal sepsis in the rats as subjects was chosen.

Methods: After permission given by the Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz of Nordrhein-Westfalen (84-02.04.2015.A538) the experiments were carried out on a total of 80 male Wistar rats. Therefore, the subjects had been distributed into 8 experimental groups (n=10) and were either treated with a local application of carbachol, iloprost a combination of the two drugs or saline. The experiments were carried out under both septic and non-septic conditions. For the induction of an abdominal sepsis the CASP model (*Colon ascendens stent peritonitis*) had been implemented. The non-septic control animals underwent sham surgery. 24 hours later a second laparotomy following the local administration of the respective substances for 60 minutes was performed. Subsequently, the oxygen concentration and the rate of oxygen consumption were measured respirometrically to record the mitochondrial function in colon homogenates. For quantitation of the mitochondrial function the *Respiratory Control Index* (RCI) and the *Adenyldiphosphat-oxygen Ratio* (ADP/O-R) were calculated afterwards. The data were statistically analyzed using Kruskal-Wallis and Dunn's correction. Results were presented as minimum, median and maximum value. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: Within the CASP series, neither iloprost nor carbachol showed any influence on the mitochondrial function in the colon. In the sham group, after administration of iloprost, both after stimulation of the respiratory chain via complex I (controls: 3.11, Ilo 3.92 $p < 0.05$) and via complex II (controls: 4.99, Ilo 6.16, $p < 0.05$) a significant increase in the RCI were determined. **Conclusion:** The local application of iloprost resulted in a significant increase in RCI in healthy animals and thus improved coupling of respiratory chain activity to oxidative phosphorylation in the colon. The combination with carbachol did not cause any additional positive effect. In the septic test series, neither iloprost nor carbachol showed a

significant change in the parameters of mitochondrial function compared to the control group.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ADP/O	ADP-Sauerstoff-Ratio
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Aqua dest.</i>	Destilliertes Wasser
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovine Serum Albumin
BT	Bakterielle Translokation
bzw.	beziehungsweise
c-	centi-
CASP	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>
CGRP	Calcitonin-gene-related-peptide
et al.	<i>et alii</i>
FAD/FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm
h	Stunde(n)
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Meter
m-	milli-
μ-	mikro
M	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mol/l
MAP	<i>mean arterial pressure</i> (mittlerer arterieller Druck)
MD	Mitochondriale Dysfunktion
MF	Mitochondriale Funktion
mM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mmol/l
MMDS	<i>Microcirculatory and mitochondrial distress syndrome</i>
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MOV	Multiorganversagen
min	Minute
n	Anzahl
n-	nano-
NaCl	Natriumchlorid
NADH/H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
pCO ₂	Kohlenstoffoxidpartialdruck
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RCI	<i>Respiratory Control Index</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s.c.	subkutan

SOFA	<i>Sequential organ failure</i>
SRSS	<i>Septic rat severity score</i>
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche (mit)
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
ΔO	Sauerstoffverbrauch
%	Prozent

Inhaltsverzeichnis

2	<u>EINLEITUNG</u>	1
2.1	RELEVANZ DER SEPSIS	1
2.2	DEFINITION UND KLINIK DER SEPSIS	2
2.3	PATHOPHYSIOLOGIE DER SEPSIS	3
2.3.1	MULTIORGANVERSAGEN UND ROLLE DES DARMS	4
2.3.2	ROLLE DER MITOCHONDRIEN	5
2.4	WIRKUNG VON ILOPROST UND CARBACHOL	6
2.4.1	ILOPROST	6
2.4.2	CARBACHOL	7
2.5	ZIEL DIESER ARBEIT	8
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	10
3.1	TIEREXPERIMENTELLER TEIL	10
3.1.1	VERSUCHSGENEHMIGUNG	10
3.1.2	VERSUCHSTIERE	10
3.1.3	CHIRURGISCHE VORBEREITUNG DER VERSUCHSTIERE	11
3.2	LABOREXPERIMENTELLER TEIL	14
3.2.1	AUFBEREITUNG DES COLONS	14
3.2.2	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	14
3.2.3	MESSUNG DER MITOCHONDRIALEN FUNKTION	15
3.2.4	VERSUCHSPROTOKOLL	19
3.2.5	VERSUCHSGRUPPEN	20
3.3	DATENMANAGEMENT UND STATISTISCHE ANALYSE	22
4	<u>ERGEBNISSE</u>	23
4.1	APPLIKATION VON ILOPROST UND CARBACHOL UNTER NICHT-SEPTISCHEN BEDINGUNGEN	23
4.2	APPLIKATION VON ILOPROST UND CARBACHOL UNTER SEPTISCHEN BEDINGUNGEN	25
5	<u>DISKUSSION</u>	28
5.1	METHODENDISKUSSION	28
5.3	ERGEBNISDISKUSSION	32
5.4	SCHLUSSFOLGERUNG	38

6	ANHANG	39
6.1	MATERIAL UND GERÄTE	39
6.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	41
6.3	PUFFER UND LÖSUNGEN	42
6.4	SEPTIC RAT SEVERITY SCORE	43
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	44

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: SOFA-Score zur Quantifizierung der Organdysfunktion bei Sepsis	2
Abb. 2: Funktionsweise der CASP- und Sham-Operation	4
Abb. 3: Prinzip und Aufbau der Respirometrie	17
Abb. 4: Zustände der Respirometrie (Messkurve)	18
Abb. 5: Zusammenfassung des Versuchsablaufs	20
Abb. 6: Zeitlicher Ablauf der Respirometrie	20
Abb. 7: RCI und ADP/O-Ratio für Komplex I und II nach steriler Laparotomie	26
Abb. 8: RCI und ADP/O-Ratio für Komplex I und II bei einer Sepsis	27

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dosierung applizierter Medikamente und Trägersubstanzen	12
Tabelle 2: Konzentration der Standardverdünnungsreihe	15
Tabelle 3: Gruppeneinteilung	21
Tabelle 4: Kopplung der Atmungskettenaktivität an die oxidative Phosphorylierung (RCI) unter spezifischen und nicht-septischen Bedingungen	24
Tabelle 5: Effizienz der oxidativen Phosphorylierung (ADP/O) unter septischen und nicht-septischen Bedingungen	24

2 Einleitung

2.1 Relevanz der Sepsis

„Alle 7 Minuten stirbt ein Mensch in Deutschland an einer Sepsis. Jede halbe Stunde könnte ein Tod vermieden werden, wenn Bevölkerung und Mitarbeiter der Gesundheitsberufe besser über die Erkrankung Bescheid wüssten.“

Dieses Zitat des Deutschen Ärzteblatts vom 26. Februar 2021 zeigt eindrücklich auf, von welcher großen Bedeutung das Krankheitsbild der Sepsis ist [1]. In Deutschland erkranken 300.000 Menschen pro Jahr an einer Sepsis. Die Inzidenz zeigt jährlich einen Anstieg von bis zu 15 % [2]. Trotz der bereits erzielten Fortschritte in diesem Gebiet enden auch heute noch 30–50% der septischen Multiorganversagen letal [3]. Damit stellt die Sepsis eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland dar [4]. Die Mortalität ist vergleichbar mit der eines Myokardinfarkts [5]. Wie aus dem Zitat ersichtlich, spielt das fehlende Bewusstsein für die Erkrankung sowohl im klinischen Alltag als auch in der Gesellschaft eine große Rolle. Dabei ist die Sepsis bei jeder neu auftretenden Organdysfunktion als potenzielle Differentialdiagnose in Betracht zu ziehen [6].

Weltweit nehmen 5 Millionen der 30 Millionen Sepsis-Fälle jährlich einen tödlichen Ausgang [7]. Trotz dieser eindrücklichen Zahlen ist es aufgrund der stabilen Mortalitätsraten im Rahmen der Sepsisbehandlung nach geltenden Standards schwierig, den Nutzen neuer Therapieansätze statistisch zu belegen: Bei aktueller Letalität von 25 % in den USA sind Stichprobengrößen von mehr als 10.000 Patienten erforderlich, um relative Risikounterschiede von 10 % zu zeigen. Dies bedeutet für künftige Forschungsvorhaben einen erheblichen Zeitaufwand bei hoher Kostenintensität [8].

Dass weitere Forschung und neue Therapieansätze aber dringend erforderlich sind, zeigt die Betrachtung der intensivmedizinischen Behandlung der Sepsis: Die Mortalität der Intensivpatienten mit erworbener Sepsis im Krankenhaus übersteigt mit über 40 % die Gesamtmortalität der kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation [9].

2.2 Definition und Klinik der Sepsis

Die Sepsis ist definiert als lebensbedrohliche Organdysfunktion infolge einer dysregulierten Immunantwort auf eine mutmaßliche Infektion [10]. Hierbei ist kein einzelner diagnostischer Test verfügbar, der die Diagnose Sepsis oder septischer Schock sichern könnte. Es handelt sich vielmehr um klinisch komplexe Syndrome, die durch eine Konstellation aus Symptomen und Laborwertveränderungen definiert sind [11]. Die resultierende Dysfunktion kann dabei alle Organsysteme betreffen. Als dominant zeigen sich vor allem neurologische, pulmonale, kardiovaskuläre, renale, hämatologische und hepatische Funktionsstörungen [11]. Zur Quantifizierung einer akuten Organdysfunktion wird im klinischen Alltag der SOFA-Score (*Sequential Organ Failure Assessment*) verwendet. Hierbei werden die oben genannten Organsysteme anhand ihrer Funktion mit einem Punktwert von eins bis vier bewertet. Ein Anstieg des Scores um zwei Punkte macht eine Sepsis als Diagnose wahrscheinlicher [12]. Hierbei korrelieren sowohl Komplikationen als auch Letalität mit der Höhe des SOFA-Scores [12, 13].

SOFA score	1	2	3	4
<i>Respiration</i>				
PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg	< 400	< 300	< 200 —— with respiratory support ——	< 100
<i>Coagulation</i>				
Platelets × 10 ³ /mm ³	< 150	< 100	< 50	< 20
<i>Liver</i>				
Bilirubin, mg/dl (μmol/l)	1.2 – 1.9 (20 – 32)	2.0 – 5.9 (33 – 101)	6.0 – 11.9 (102 – 204)	> 12.0 (> 204)
<i>Cardiovascular</i>				
Hypotension	MAP < 70 mmHg	Dopamine ≤ 5 or dobutamine (any dose) ^a	Dopamine > 5 or epinephrine ≤ 0.1 or norepinephrine ≤ 0.1	Dopamine > 15 or epinephrine > 0.1 or norepinephrine > 0.1
<i>Central nervous system</i>				
Glasgow Coma Score	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
<i>Renal</i>				
Creatinine, mg/dl (μmol/l) or urine output	1.2 – 1.9 (110 – 170)	2.0 – 3.4 (171 – 299)	3.5 – 4.9 (300 – 440) or < 500 ml/day	> 5.0 (> 440) or < 200 ml/day

^a Adrenergic agents administered for at least 1 h (doses given are in μg/kg·min)

Abbildung 1: SOFA-Score zur Quantifizierung der Organdysfunktion bei Sepsis
Beim SOFA-Score werden die einzelnen Organsysteme nach Funktion beurteilt, um die Organdysfunktion zu quantifizieren. Punktwerte von 0 (normale Funktion) bis 4 (deutlich eingeschränkte Funktion) [12].

Die Maximalform der Sepsis stellt der septische Schock dar. Als relevante Parameter gelten hier die Erforderlichkeit einer Katecholamintherapie bei einer Hypotonie mit einem mittleren arteriellen Blutdruck (*mean arterial pressure*, MAP) unter 65 mmHg trotz adäquater Volumengabe, sowie ein erhöhtes Serum-Lactat von über 2 mmol/l [11].

Zur Verhinderung eines derartigen Fortschreitens in einem septischen Geschehen wird daher im klinischen Alltag das *1 Hour Bundle* angewandt. Dies beinhaltet die verschiedenen Schritte, die innerhalb der ersten Stunde nach der erstmaligen begründeten Verdachtsdiagnose Sepsis eingeleitet werden sollten. Neben der Messung des Serum-Lactats fallen hierunter außerdem die Blutkulturdiagnostik, eine schnelle Volumensubstitution und die kalkulierte antibiotische Therapie. Bleibt der MAP trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution bei unter 65 mmHg, wird der Einsatz einer Katecholamintherapie nötig. In diesem Fall spricht man von einem septischen Schock [10].

2.3 Pathophysiologie der Sepsis

Trotz ihrer hohen Bedeutung ist die Pathophysiologie der Sepsis bis heute nicht vollständig verstanden [14, 15]. Auslöser der Sepsis sind in der Regel Bakterien, jedoch kommen auch Pilze, Viren oder Parasiten in Betracht [5, 16]. Für die primäre Entzündungsreaktion kommt dabei prinzipiell jedes Organsystem als Fokus in Frage. Als häufigste initiale Infektionen zeigen sich respiratorische, abdominelle, urogenitale sowie primär hämatogene Infektionen [17]. Durch mikrobielle Mediatoren kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems, welche vor allem eine Aktivierung spezifischer Rezeptoren wie der Toll-like-Rezeptoren bedingt [17]. Nach der resultierenden Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 und Tumornekrosefaktor- α folgen kaskadenartig weitere entzündungsfördernde Signalwege, unter anderem über das Komplementsystem. Als kompensatorische Gegenregulation werden auch antiinflammatorische Zytokine freigesetzt und entsprechende Signalwege aktiviert, sodass eine dysregulierte Immunreaktion resultiert [18].

Zudem wird durch die freigesetzten Zytokine die Gerinnung aktiviert:

Durch die Proteolyse von Prothrombin fällt zum einen vermehrt Thrombin an, ein wichtiger Aktivator der Gerinnungskaskade. Zum anderen werden Antithrombin und Protein C gehemmt, welche sich jeweils hemmend auf die Blutgerinnung auswirken. Das resultierende Ungleichgewicht der Gerinnungssituation äußert sich in einer disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), die zu Hypoxie in den Endstrombahnen kleiner Gefäße führt [19]. Auch resultiert eine endotheliale Dysfunktion durch den Untergang von Endothelzellen und den resultierenden Verlust der Barrierefunktion [7].

Diese komplexen Abläufe während der Entstehung einer Sepsis bedingen unter anderem eine Hypoperfusion, die zu einer Ischämie führt und in einer akuten Organdysfunktion mündet [19, 20]

2.3.1 Multiorganversagen und Rolle des Darms

Auch die genauen Mechanismen des Multiorganversagens (MOV) sind nicht abschließend geklärt [14, 15]. Es ist erwiesen, dass die Zentralisierung des Kreislaufs zur Aufrechterhaltung der Perfusion lebenswichtiger Organe zu einer Minderperfusion anderer Organsysteme führt. Speziell im Darm kommt es daraufhin durch eine verminderte Makrozirkulation zu einer Hypoperfusion. Zahlreiche Studien belegen die zentrale Rolle des Darms in der Entstehung des septischen Multiorganversagens [21-24]. Dabei konnte belegt werden, dass in der Mukosa selbst sowohl Akute-Phase-Proteine [25] als auch Cytokine [26] synthetisiert werden. Im septischen Geschehen reagiert die Darmschleimhaut zudem mit einer zusätzlich gesteigerten Cytokinproduktion [26]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Darm nicht nur durch die Kreislaufzentralisierung und Makrozirkulationsstörung von einem MOV betroffen, sondern pathophysiologisch maßgeblich an dessen Entstehung beteiligt ist [26]. Allerdings gelten nicht nur diese veränderte Makrozirkulation, sondern v.a. Mikrozirkulationsstörungen derzeit als eine der Hauptursachen des septischen MOV und bedingen eine erhöhte Mortalität [27, 28]. Aus der gestörten Mikrozirkulation im Darm resultiert eine Schwächung der intestinalen Mukosa und ihrer Barrierefunktion. Diese wird normalerweise sowohl mechanisch über die *tight junctions* als auch immunologisch über Prostaglandine aufrechterhalten. Eine Destabilisierung der mukosalen Integrität beruht auf Störungen dieser mechanischen und immunologischen Barrierefunktion und führt zu einer sowohl epithelialen als auch endothelialen Hyperpermeabilität. Somit können Pathogene vermehrt in den Blutkreislauf, umliegendes Gewebe oder das Lymphsystem übertreten. Dieses Phänomen wird als bakterielle Translokation (BT) bezeichnet [29]. Die BT kann als Trigger für weitere Immunreaktionen fungieren und so im Rahmen einer Sepsis eine Überreaktion des Immunsystems noch verstärken [29, 30]. Eine BT scheint zudem durch eine verminderte mitochondriale Funktion verstärkt zu werden, sodass hier ein direkter Zusammenhang zur gestörten Zellatmung während der Sepsis besteht [31, 32].

2.3.2 Rolle der Mitochondrien

Die Mitochondrien spielen laut aktueller Studienlage eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis, wobei der genaue Mechanismus bislang nicht geklärt werden konnte [33, 34]. Sie sind als „Kraftwerk der Zelle“ für die Energiebereitstellung in Form von ATP verantwortlich. Dies geschieht unter hohem Sauerstoffbedarf über die oxidative Phosphorylierung. Hierbei entstehen durch die unvollständige Reduktion von Sauerstoff auch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) [35]. Diese potenziell toxischen Metabolite können physiologisch durch antioxidative Mechanismen der Mitochondrien neutralisiert werden [36, 37]. Im Rahmen einer Sepsis aber entstehen vermehrt Radikale, die nicht mehr kompensiert werden können und zu oxidativem Stress führen [38]. Die entstehenden mitochondrialen Schäden führen durch Hemmung der respiratorischen Enzyme und der oxidativen Phosphorylierung über eine gestörte Zellatmung letztlich zum Organversagen [38-40]. Somit scheint die mitochondriale Dysfunktion (MD) eine weitere ursächliche Säule des septischen MOV zu sein [40, 41]. Weiter wird vermutet, dass die eingangs beschriebene Mikrozirkulationsstörung direkt mit der mitochondrialen Funktion (MF) zusammenhängt. Demnach führt eine verminderte Mikrozirkulation zu einer MD und somit zu Gewebsschäden. Dieser funktionelle Komplex wird als *Microcirculatory and mitochondrial distress syndrome* (MMDS) bezeichnet [28]. Auch Rolfe et al. konnten den Zusammenhang zwischen reduzierter Mikrozirkulation und MD nachweisen [42]. Dennoch ist die Studienlage insgesamt kontrovers [34]. Einige Autoren postulieren einen erhöhten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Rahmen einer Sepsis [43, 44], während andere Studien einen reduzierten Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien zeigen [45-47]. Weitere Arbeiten beschreiben keine Veränderung der mitochondrialen Funktion in einem septischen Geschehen [48, 49]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich durch die Divergenz der untersuchten Organsysteme und Spezies erklären [34]. Da sich aber auch in menschlichen Mitochondrien in einem septischen Geschehen Hinweise auf eine veränderte Zellatmung im Rahmen einer MD zeigen, müssen weitere Untersuchungen die genauen Mechanismen klären. So zeigten menschliche Mitochondrien von Sepsispatienten der Intensivstation eine veränderte MF [40]. Dabei erwiesen sich die ATP-Konzentration und die MF bei Patienten mit letalem Ausgang der Sepsis als deutlich niedriger als bei den Sepsisüberlebenden [40].

Auch der zeitliche Verlauf scheint während der Sepsis einen maßgeblichen Effekt auf die Funktion der Mitochondrien zu haben. Verschiedene Studien

konnten zeigen, dass die MF in der Frühphase der Sepsis ansteigt, im weiteren Verlauf aber kontinuierlich sinkt [39, 50, 51]. Vermutet wird hier eine zelluläre Schutzreaktion bei verstärkter ROS-Produktion als Ursache für die abnehmende MF [52]. Angesichts der kontroversen Studienlage bleibt zu klären, welche Rolle die Mitochondrien in der Pathophysiologie der Sepsis genau einnehmen.

2.4 Wirkung von Iloprost und Carbachol

2.4.1 Iloprost

Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Pathophysiologie erscheint es sinnvoll, die Sauerstoffversorgung gerade im Gastrointestinaltrakt zu verbessern. Für einige Substanzen wie das *Brain natriuretic peptide* oder Dihydralazin ist dies auch bereits nachgewiesen [53]. Unter der Annahme, dass Mikrozirkulationsstörungen bei der Sepsis eine wesentliche Rolle spielen, scheint der Einsatz von Vasodilatoren sinnvoll, da so der Antriebsdruck der Mikrozirkulation im Gefäßbett erhöht und der Blutfluss und folglich auch die Sauerstoffversorgung verbessert werden könnten [54]. In vorangegangenen Untersuchungen kamen hier Prostaglandine erfolgreich zum Einsatz [55]. Physiologisch werden sie im Gastrointestinaltrakt gebildet und haben hier unter anderem eine protektive Wirkung auf die Mukosa indem sie sowohl die Regulation des Blutflusses als auch den epithelialen Zusammenhalt beeinflussen [56]. Auch bei zusätzlicher systemischer Verabreichung zeigt sich ein ähnlicher Effekt: Prostaglandine haben einen protektiven Effekt im Gastrointestinaltrakt und schützen vor der Entstehung von Ulcera [57]. Insgesamt ist die Verwendung allerdings limitiert, da es bei systemischer Anwendung vermehrt zu schweren v.a. kardiovaskulären Nebenwirkungen kam [53]. Gerade als therapeutische Maßnahme bei kritisch kranken Patienten ist der Gebrauch von Prostaglandinen somit deutlich eingeschränkt.

In vorangegangenen Untersuchungen kam auch Iloprost zum Einsatz. Als Prostaglandinanalogon bewirkt es eine Vasodilatation, eine Thrombozytenaggregationshemmung, Antiinflammation, sowie die Erhöhung der Kapillardichte. Folglich wird die Permeabilität der Blutgefäße gesenkt [54]. Es gibt Hinweise darauf, dass Iloprost die Blutversorgung verbessern und die intestinale Barrierefunktion stärken könnte. Bei lokaler Anwendung ist zudem

von einer deutlichen Reduktion systemischer Nebenwirkungen bei hohen Wirkstoffspiegeln im Zielorgan auszugehen [54]. Hierbei ist die topische Therapie mit Iloprost in anderen Organsystemen bereits etabliert. So kommt es bei pulmonalem Hypertonus erfolgreich als inhalative Therapie zum Einsatz [58]. Bei intraperitonealer Anwendung zeigen Versuche im Rattenmodell, dass es durch die Verstärkung der Neoangiogenese und Kollagenneubildung zu einer verbesserten Bildung von Anastomosen führt [59, 60].

Herminghaus et al. konnten 2018 weitere positive Effekte auf die mitochondriale Funktion bei der lokalen Applikation von Iloprost feststellen: Im *in vitro* Versuch an Colonhomogenat konnte die maximale mitochondriale Respiration gesenkt und die oxidative Phosphorylierung verbessert werden [61]. Truse et al. zeigten außerdem, dass die topische Applikation von Iloprost während eines hämorrhagischen Schocks eine Verbesserung der Oxygenierung der Magenschleimhaut bewirkt, ohne Einfluss auf die Perfusion zu nehmen [62].

Ob die intestinale Perfusion durch lokale Iloprostgabe unter septischen Bedingungen verbessert werden kann, ist bislang unklar.

2.4.2 Carbachol

Wie eingangs bereits geschildert, spielt auch die Barrierefunktion eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des septischen Multiorganversagens. Für Iloprost konnte in den vorangegangenen Untersuchungen von Herminghaus et al. und Truse et al. kein direkter Einfluss auf die Integrität der Barriere nachgewiesen werden [61, 62]. Vergleichsdaten zur genauen Untersuchung der Wirkung von Iloprost auf die *tight junctions* liegen bislang nicht vor. Fakt ist, dass die Sepsis von einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems begleitet wird, was insbesondere durch eine erhöhte präkapilläre Vasokonstriktion zu einem erhöhten Gefäßwiderstand führt. Denkbar ist, dass dies den erhofften positiven Effekt von Iloprost auf die Mikrozirkulation beeinträchtigen könnte [63]. Es erscheint daher sinnvoll, Iloprost mit einem Medikament zu kombinieren, welches die mikrovaskuläre Zirkulation verbessern und die Mukosa-Barriere stärken könnte. Diese Funktion könnte Carbachol erfüllen. Es handelt sich um einen Muscarinrezeptor-Agonisten und somit ein direktes Parasympathomimetikum [64].

Lesko et al. zeigten *in vitro*, dass Carbachol die Barrierefunktion erhalten kann: Untersuchungen an porcinen Colonzellen zeigten hier eine positive Beeinflussung des transepithelialen elektrischen Widerstandes über den muskarinischen Signalweg [65].

Auch in Arbeiten zu humanen kultivierten Epithelzellen konnten ähnliche Effekte gezeigt werden: Über den muskarinischen Signalweg konnte mittels Carbachol die Barrierefunktion stabilisiert werden. Bemerkenswert ist bei Betrachtung dieser Studie von Khan et al., dass es sich um durch Ethanol geschädigte Epithelzellen handelte [66]. Dies lässt vermuten, dass Carbachol auch auf anderweitig geschädigte Zellen, zum Beispiel im Rahmen einer Sepsis, einen positiven Effekt haben könnte. Ähnliche Schlüsse lässt auch die Untersuchung von Wang et al. zu: Im Rattenmodell zeigte sich eine Verbesserung der intestinalen Barriere nach intraperitonealer Applikation von Carbachol bei akuter Pankreatitis [67]. Dies ist zum einen ein weiterer Hinweis darauf, dass Carbachol in verschiedenen pathologischen Settings einen positiven Effekt haben kann. Zum anderen legt diese Studie nahe, dass gerade eine lokale Applikation von Carbachol eine gute Wirksamkeit zeigt. Bao et al. unterstützen mit ihrer Arbeit diese Thesen: Im Rattenmodell konnte hier die lokale Carbacholapplikation den mukosalen Blutfluss steigern, die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase und die Expression von Aquaporin 1 fördern und so das Outcome bei einem Verbrennungsschock verbessern [68]. Ob Carbachol auf diese Weise auch unter septischen Bedingungen einen positiven Effekt auf die Barrierefunktion im Darm haben und somit die MF zusätzlich verbessern kann, ist bislang unklar.

2.5 Ziel dieser Arbeit

Trotz intensiver Forschung bleibt die Sepsis eine der führenden Todesursachen stationär behandelter Patienten [3]. Die Pathophysiologie ist bis heute nicht vollständig verstanden [14]. Definitionsgemäß ist die Sepsis die sequenzielle Abfolge aus einer Infektion, einer dysregulierten Immunreaktion und einer systemischen Entzündungsreaktion [10, 14]. Maßgeblich beteiligt an der Entwicklung eines septischen Organversagens scheinen nach aktuellem Forschungsstand Mikrozirkulationsstörungen sowie mitochondriale Dysfunktion [27, 40].

In bisherigen Arbeiten konnte die Sauerstoffversorgung im Gastrointestinaltrakt durch zahlreiche systemisch verabreichte Substanzen bereits verbessert werden, jedoch war deren Einsatz aufgrund von kardiovaskulären Begleiterscheinungen begrenzt [53]. Um systemische Nebenwirkungen zu reduzieren, ergibt sich die Überlegung eines lokalen Therapieansatzes, welcher in anderen Organsystemen bereits etabliert ist

[58]. Zur Behandlung im Gastrointestinaltrakt gibt es diesbezüglich bislang nur wenig Daten. Es zeigten sich allerdings bereits Hinweise auf eine Verbesserung der Anastomosefestigkeit durch die intraperitoneale Applikation von Iloprost [59]. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte im Hundemodell durch die lokale Applikation von Iloprost an der Magenschleimhaut bereits eine verbesserte Oxygenierung erzielt werden ohne Einfluss auf Kreislaufparameter zu nehmen [62]. Daran anknüpfende Untersuchungen zeigten, dass lokal appliziertes Iloprost die mitochondriale Funktion positiv beeinflussen kann: im Colonomogenat von gesunden Ratten zeigte sich die maximale mitochondriale Atmung reduziert, während die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung erhöht war [61].

Zudem konnten *in vitro* Untersuchungen bereits zeigen, dass Carbachol die intestinale Barrierefunktion verbessert [65], sodass sich eine Kombination der beiden Medikamente günstig auswirken könnte. Ob Carbachol auf diese Weise die Funktion der Mitochondrien im Colon beeinflusst, wurde bislang nicht untersucht.

Auf diesen Ergebnissen basierend ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Kann die lokale Applikation von Iloprost die mitochondriale Funktion *in vivo* unter septischen und nicht septischen Bedingungen verbessern?
- 2) Hat Carbachol einen zusätzlichen Einfluss auf die mitochondriale Funktion?

3 Material und Methoden

Die genauen Angaben zu den verwendeten Materialien und Geräten, sowie Chemikalien, Puffern und Lösungen sind im Anhang aufgeführt.

3.1 Tierexperimenteller Teil

3.1.1 Versuchsgenehmigung

Nach der Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (84-02.04.2015.A538) wurden die Versuche an insgesamt 100 männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, die im Rahmen dieses Projektes direkten Kontakt mit den Versuchstieren hatten und den tierexperimentellen Teil durchführten, hatten zuvor einen entsprechenden Fachkundenachweis erworben. Der operative tierexperimentelle Teil der Versuchsreihe wurde von einer Veterinärmedizinerin durchgeführt. Dies umfasste neben der CASP-/Sham-Operation auch die erneute Laparotomie, die anschließende Perfusion des Colons sowie die Organentnahme.

3.1.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 3 Monate alte WISTAR-Ratten mit einem Gewicht von 355 ± 25 g. Es wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet, um hormonelle Schwankungen als möglichen Einflussfaktor auszuschließen. In die Versuche eingeschlossen wurden lediglich gesunde Tiere, die keine Krankheitsanzeichen zeigten. Die Ratten wurden bezogen aus der Züchtungseinrichtung ZETT („Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben“), welche ihre Tiere aus den Janvier Laboratorien in Frankreich bezieht. Die Versuchstiere wurden über den Versuchszeitraum hinweg in Makrolon®-Einzelkäfigen vom Typ 3 gehalten. Durch artifizielles Licht war ein konstanter 12 h Tag-/Nacht-Rhythmus gewährleistet. Die Raumtemperatur wurde kontinuierlich bei 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) gehalten, die Luftfeuchtigkeit betrug durchgehend 50% (relative Luftfeuchtigkeit, $\pm 5\%$). Als Einstreu wurde entkeimtes Weichholzgranulat verwendet, der Wechsel erfolgte zweimal wöchentlich. Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse sowie entkeimtem Trinkwasser in ausreichender Menge. Die Tiere unterlagen vor

unseren Untersuchungen einer Adaptationszeit von sieben Tagen. Die Hygieneüberwachung wurde gemäß den FELASA-Richtlinien durchgeführt. Die Tötung der Tiere bei Versuchsende erfolgte durch Exsanguination.

3.1.3 Chirurgische Vorbereitung der Versuchstiere

Einen Tag vor der Durchführung des laborexperimentellen Teils erfolgte die chirurgische Vorbehandlung der Versuchstiere. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde entweder eine Sham- oder eine CASP-Operation durchgeführt. Das *colon ascendens stent peritonitis* (CASP) Verfahren stellt ein etabliertes Modell zur Induktion einer Sepsis im Tiermodell dar [69-71]. Auch in unserer Arbeitsgruppe fand dieses Verfahren bereits vermehrt Anwendung [72, 73]. Hierbei wird durch Einbringen eines Stents in das *Colon ascendens* eine stetige Verbindung zur Peritonealhöhle geschaffen. Somit wird durch kontinuierlichen Austritt von Fäzes eine Peritonitis initiiert, welche sich im Verlauf zur Sepsis entwickelt. Dabei lässt sich die Schwere der Sepsis mittels Anzahl und Durchmesser der Stents variieren. In unserem Versuchsvorhaben wurden zwei Stents mit einem Durchmesser von 14 G verwendet. Eingesetzt wurden diese zum einen im Übergangsbereich von *Caecum* zum *Colon ascendens* und zum anderen mittig an der großen Kurvatur des *Caecums*. Bei der Sham-Operation wird das Abdomen der Versuchstiere ebenfalls laparotomiert. Anschließend erfolgt die Annahrt eines Stents der Größe 14 G an die *Tunica serosa* des *Caecums* im Bereich der großen Kurvatur, jedoch ohne eine Penetration zu provozieren. So konnte eine Vergleichbarkeit zur CASP-Gruppe bezüglich der Manipulation des Colons geschaffen werden.

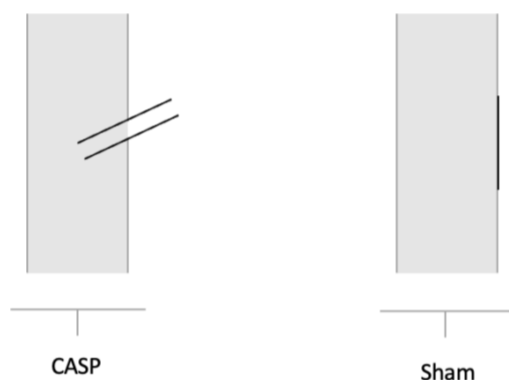


Abb. 2: Funktionsweisen der CASP- und Sham-Operation

Bei der CASP-Operation wird ein Stent in das Colon, hier dargestellt als grauer Balken, eingebracht und eine Verbindung zur Bauchhöhle geschaffen. Bei der Sham-Operation hingegen wird der Stent lediglich von außen an die Darmwand angenähert. CASP = *Colon ascendens stent peritonitis*, Abbildung in Anlehnung an Lustig, et al. (6)

Die Versuchstiere beider Gruppen wurden ab dem Zeitpunkt der Operation bis zum Versuchsende am Folgetag ausreichend mit Analgetika abgedeckt. Dazu wurde präoperativ, acht Stunden postoperativ, 16 Stunden postoperativ und am Morgen des Versuchstags Buprenorphin mit 0,1 mg pro Kilogramm Körpergewicht verabreicht. Außerdem wurden die Versuchstiere mittels *Septic Rat Severity Score* (siehe Anhang) protokollgerecht überwacht. Tiere, die einen Score von über 10 Punkten erreichten, wurden aus der Versuchsreihe ausgeschlossen und euthanasiert.

Am Folgetag erfolgte zu Beginn des Versuchs eine Injektionsnarkose mittels Pentobarbital mit 60 mg pro Kilogramm Körpergewicht und Buprenorphin 0,1mg/kg. Anschließend erfolgte die Tracheotomie, um die Versuchstiere über die gesamte Operation hinweg normokapnisch beatmen zu können. Nach Einleitung der Narkose erfolgte die Kanülierung über die *Vena jugularis externa dextra* und die *Arteria carotis communis*. Über den arteriellen Zugang wurden Blutdruck und Herzfrequenz gemessen, sowie regelmäßige Blutgasanalysen durchgeführt. Es erfolgte außerdem ein Monitoring der Beatmungsparameter, sowie eine regelmäßige Aufzeichnung der Körpertemperatur. Über den gesamten Versuch hinweg erfolgte in regelmäßigen Abständen die Kontrolle von O₂-Partialdruck, CO₂-Partialdruck, O₂-Sättigung, pH-Wert, Elektrolyten und Base Excess.

Nach erfolgreicher Narkoseeinleitung und Kanülierung begann zunächst eine 30-minütigen Stabilisierungsphase. Es folgte die topische Applikation der jeweiligen Medikamente bzw. der Kontrollsubstanz über eine Kanüle von 24 G, welche 2 cm distal des Colon-Stents eingebracht wurde. Hierüber wurde der jeweilige Bolus und anschließend die fortlaufende Infusion über eine Stunde verabreicht. Die genauen Dosierungen der applizierten Medikamente sind in Tabelle 1 angegeben. Anschließend erfolgte die Organentnahme von 2-3 cm Colon. Nach Beendigung des Versuchs wurde unter fortlaufender Analgesie und Narkotisierung die Exsanguination durchgeführt.

Wirkstoff	Bolus	Infusion
NaCl	1 ml	0,02 ml/g/h
Iloprost	0,0001 µg / g KG (in 1 ml NaCl)	0,02 ml/g KG /h (Konz.: 0,1 µg/ml)
Carbachol	0,06 µg/g KG (in 1 ml NaCl)	0,02 ml/g KG/h (Konz.: 60 µg/ml)
Iloprost + Carbachol	0,0001 µg/g KG + 0,06 µg/g KG (in 1 ml NaCl)	0,01 ml/g KG/h (Konz.: 200 ng/ml) + 0,01 ml/g/h (Konz.: 120 µg/ml)

Tabelle 1: Dosierung applizierter Medikamente und Trägersubstanzen.

NaCl = Natriumchlorid, ml = Milliliter, KG = Körpergewicht h = Stunde, µg = Mikrogramm, g = Gramm, Konz. = Konzentration der Lösung

3.2 Laborexperimenteller Teil

3.2.1 Aufbereitung des Colons

Nach der Entnahme wurde das Colon in 4°C kalten Isolationspuffer überführt. Es folgte die unmittelbare Eröffnung und manuelle Entfernung der Reste von Fäzes und *Mucus* mittels einer Baumwollkompressen. Anschließend wurde das vorgereinigte Colon mit der Peptidase Trypsin (0,05%) in gewichtsadaptierter Menge ($\text{Volumen (ml)} = \text{Darmgewicht (g)} \times 2$) behandelt, um die Zellen aus dem Zellverband herauszulösen. Nach einer fünfminütigen Inkubationsphase auf Eis wurde das Colon in ein Gefäß mit Isolationspuffer mit erhöhtem BSA-Gehalt ($\text{Puffermenge in ml} = \text{Darmgewicht in g} \times 4$) und dem Protease-Inhibitor Complete (Complete in ml = ml Puffer/100) gegeben, um den durch das Trypsin begonnenen proteolytischen Vorgang zu unterbrechen und so intrazelluläre Proteine zu schützen. Es folgte die manuelle Zerkleinerung mit der Schere. Anschließend erfolgte die Überführung in einen Glaszylinder und die Homogenisierung mittels Potter-Elvehjem-Verfahren. Hierbei wurde ein mit 2000 U/min rotierender Teflonkolben in den Glaszylinder eingeführt und fünfmal auf und ab bewegt. Durch dieses Verfahren konnte die Freisetzung der Zellorganellen besonders schonend erfolgen. Zur weiteren Lagerung wurde das entstandene Colonomogenat in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und auf Eis gestellt.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um in der Respirometrie den Sauerstoffverbrauch bezogen auf die im Homogenat enthaltene Proteinmenge untersuchen zu können, wurde zunächst die Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt. Dies erfolgte kolorimetrisch mittels Folin-Phenol-Reagenz nach Lowry [74]. Diese Methode funktioniert zunächst über die Bildung von Komplexen zwischen Peptidbindungen und Kupfer II-Ionen. Kupfer II wird zu Kupfer I reduziert. Das entstandene Kupfer I reduziert nun das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz (Phosphomolybdat-Phosphowolframat) zu Molybdänblau; es entsteht eine Blaufärbung. Es erfolgt eine photometrische Messung, bei der die Proben mit einer Standardverdünnungsreihe mit festgelegten Proteinkonzentrationen verglichen werden. In unseren Untersuchungen wurde Bovines Serum Albumin als Standard verwendet und die entsprechenden Verdünnungen

mittels Hinzufügens von *Aqua dest.* hergestellt. Die entsprechenden Verdünnungen lauten wie folgt:

	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	BSA 1000 (μl)	Wasser (μl)
K0	0	0	500
K1	62,5	31,2	468,7
K2	125	62,5	437,5
K3	250	125	375
K4	500	250	250
K5	750	375	125
K6	1000	500	0

Tabelle 2: Konzentration der Standardverdünnungsreihe

Angegeben sind die Stufen der Standardverdünnungsreihe mit K0 bis K6, sowie die jeweiligen Konzentrationen dieser, die sich aus den nebenstehenden Mengen BSA (angegeben in μl) und Wasser (angegeben in μl) ergeben.

Die Standardverdünnungsreihe wurde anschließend auf Eis gelagert. Zunächst wurden 10 μl des zuvor hergestellten Homogenats mit 990 μl Wasser verdünnt. Es wurden drei technische Replikate hergestellt, indem der Vorgang für drei verschiedene Reaktionsgefäße wiederholt wurde, sodass drei verdünnte Homogenatproben entstanden. Anschließend wurden 100 μl dieser verdünnten Proben und 500 μl der Lösung 1 (s. Anhang) in ein Eppendorf *Tube* pipettiert. Ebenso wurden 100 μl der jeweiligen Standardverdünnung mit 500 μl der Lösung 1 in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden alle Proben mittels Vortex-Kreismischer durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden den Reaktionsgefäßen jeweils 50 μl der Lösung 2 zugefügt. Folgend wurden die Proben nach nochmaliger Anwendung des Vortex-Kreisrüttlers für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 200 μl als Doppelbestimmung in eine 96-Well Mikrotitrierplatte überführt. Die Messung der Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm durchgeführt und über die Software Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader mit dem Programm Gen51.11 ausgewertet.

3.2.3 Messung der mitochondrialen Funktion

Als Maß der mitochondrialen Funktion diente die Messung des Sauerstoffverbrauchs. Dazu wurde die Aktivität der Teilschritte der Atmungskette bestimmt. Die Atmungsgeschwindigkeit wurde dabei über die Ableitung der errechneten Sauerstoffkonzentration nach Zeit und pro mg

Protein ermittelt. Gemessen wurde bei einer konstanten Temperatur von 30°C. Dies ist aufgrund der Temperaturabhängigkeit der oxidativen Phosphorylierung von besonderer Bedeutung und wurde durch die ständige Umspülung der Messkammer mit erwärmtem Wasser gewährleistet.

Die Messung erfolgte mit einer Clark-Elektrode, welche den Sauerstoffgehalt der Probe über einen proportional zum Sauerstoffpartialdruck entstehenden Stromfluss ermittelt. Der Sauerstoffverbrauch wurde kontinuierlich während des Versuchs gemessen. Die Ergebnisse der Messungen wurden durch das Programm Strahlkelvin 782 auf einen Computer übertragen. Hierüber erfolgten auch die anschließende Dokumentation und Berechnung der Mittelwerte über das Programm Microsoft Excel.

Vor Beginn der respirometrischen Messungen erfolgte die Eichung der Elektrode des Respirometers mittels einer Zwei-Punkt-Kalibrierung. Dabei wurde die Negativkontrolle mit sauerstoffbindender Natriumsulfidlösung durchgeführt. Als Normwerte galten hier Werte < 50 pA. Die Positivkontrolle erfolgte mit *Aqua dest.*, welches unter Zuhilfenahme des Vortex-Kreisrüttlers und manuell mit Sauerstoff angereichert wurde. Als Normwert wurden dabei Werte zwischen 500 und 700 pA angesehen.

Zur Messung wurde das zuvor hergestellte Gewebehomogenat in einen 30°C warmen Respirationspuffer überführt. Das Verhältnis wurde dabei so gewählt, dass eine Proteinkonzentration von 6 mg/ml erreicht wurde. Die Mischung aus Homogenat und Pufferlösung wurde anschließend in die Messkammer überführt. Diese war während des gesamten Versuchs verschlossen, sodass die Sauerstoffkonzentration innerhalb der Messkammer von äußeren Einflüssen unbeeinträchtigt blieb. Im Verschluss der Messkammer befand sich ein dünner Kanal. Dieser diente der Zugabe der Substrate während der Messung. Es erfolgte eine ständige Durchmischung durch einen Magnetrührer, um den gleichmäßigen Verbrauch des Sauerstoffs in der Messkammer zu gewährleisten.

Um die mitochondriale Funktion messen zu können, wurde die Atmungskette über Komplex I und II durch die Zugabe verschiedener Substrate stimuliert. Durch Induktion der Atmungskette stieg der Sauerstoffverbrauch in der Messkammer an, während die Sauerstoffkonzentration abnahm. Diese Veränderungen wurden mittels Oximeter gemessen und am Computer graphisch aufgezeichnet. Dies ist in Abbildung 3 zusammengefasst dargestellt.

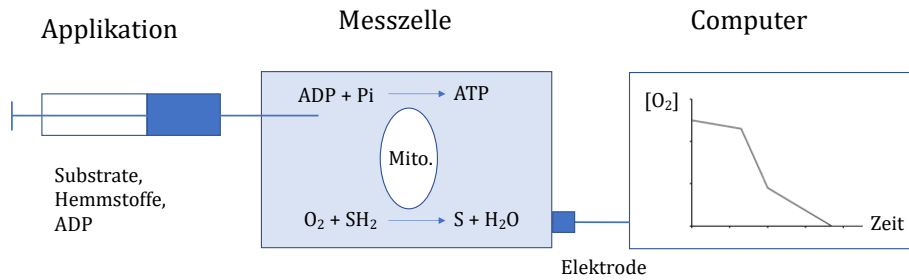


Abb. 3: Prinzip und Aufbau der Respirometrie

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

Für die Stimulation von Komplex I wurden die entsprechenden Substrate Glutamat (2,5 mM) und Malat (2,5 mM) dem Colonhomogenat hinzugefügt. Hierbei oxidiert das mitochondriale Enzym Glutamatdehydrogenase Glutamat zu alpha-Ketoglutarat. Dabei wird NAD⁺ zu NADH reduziert und die Atmungskette in Gang gesetzt.

Für die Stimulation von Komplex II wurde Succinat (10 mM) als Produkt des Citratzyklus hinzugegeben. Succinat wird zu Fumarat oxidiert, gleichzeitig wird FAD zu FADH₂ reduziert. Es erfolgte außerdem die Zugabe von Rotenon (0,5 µM) als Inhibitor der Aktivität von Komplex I, um Komplex II der Atmungskette isoliert betrachten zu können.

Gemessen wurden verschiedene Zustände der Respiration, gezeigt in Abbildung 4.

State 1 stellt dabei die Ausgangssituation dar. In State 2 wird über die oben beschriebene Stimulation der Atmungskette die mitochondriale Atmung gemessen. Dazu wurde die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe der jeweiligen Substrate ermittelt. In State 3 wird die maximale Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von ADP (250 µM) gemessen. Als Delta O wurde der Sauerstoffverbrauch während State 3 und somit der Anwesenheit von ADP bezeichnet. In State 4 wird die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach Verbrauch von ADP gemessen. Somit wird hier ein Zustand ähnlich der Ruhephase erreicht.

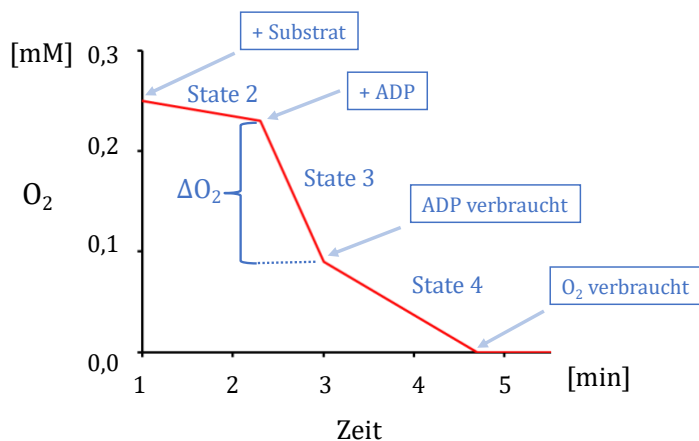


Abb. 4: Zustände der Respiration (Messkurve)

mM = Millimolar, O₂ = Sauerstoff, ΔO₂ = Sauerstoffverbrauch in State 3, ADP = Adenosindiphosphat, min = Minute; angelehnt an Gnaiger E. (8)

Durch die Verrechnung der Werte aus State 3 und State 2 wurde der Respiratory Control Index (RCI) ermittelt. Dieser bildet ab, wie effektiv die Kopplung der Atmungskettenaktivität an die oxidative Phosphorylierung funktioniert. Ein hoher RCI-Wert zeugt dabei von einer hohen Kopplung und somit einer hohen Oxidation der Substrate und eine erhöhte ATP-Produktion. Entsprechend spricht ein niedriger RCI-Wert für eine verminderte Kopplung und ein relevantes Protonenleck.

Berechnung RCI

$$RCI = \frac{State\ 3}{State\ 2}$$

Durch die Verrechnung des hinzugefügten ADP mit dem Sauerstoffverbrauch konnte über die ADP/O-Ratio die Wirksamkeit der oxidativen Phosphorylierung berechnet werden. Die Löslichkeit des Sauerstoffs wurde entsprechend des Strahlkelvin Handbuchs mit 223 μmol O₂/l bei 30°C angenommen. Die Respirationsraten wurden in Nanomol pro Minute pro Milligramm Protein angegeben.

Berechnung ADP/O ratio

$$ADP/O = \frac{zugefügtes\ ADP}{\Delta O_2}$$

Für jedes Versuchstier wurden sowohl für die Stimulation von Komplex I als auch für die Stimulation von Komplex II wie bereits oben angegeben drei technische Replikate angefertigt und der Durchschnitt aus den gemessenen Werten ermittelt. Durch eine Kontrollmessung wurde die Funktion der Mitochondrien überprüft. Dies erfolgte durch die Zugabe von Cytochrom C (2,5 μ M), Oligomycin (0,05 μ g/ml) und Antimycin A (2,5 μ M). Nach der Zugabe des jeweiligen Substrates wurde die Respirationskurve beobachtet. Zeigte sich kein Anstieg des Flusses nach Zugabe von Cytochrom C in State 3, zeugte dies von einer intakten äußeren Membran der Mitochondrien [75]. Durch die anschließende Zugabe von Oligomycin wurde die Unterbrechung der ATP-Synthese induziert. So wurde hier lediglich das mitochondriale Membranpotential aufrechterhalten, die Mitochondrien wurden in den Ruhezustand (State 2) versetzt. Wenn es nach Zugabe von Oligomycin nicht zu einem Abfall der Atmungskettenaktivität, war dies ein Anzeichen für eine bereits bestehende Protonenleckatmung. Somit konnte hier untersucht werden, ob die Mitochondrien während der Aufbereitung beschädigt wurden. Durch Zugabe von Antimycin A als Komplex-III-Inhibitor wurde eine Hemmung der Atmungskette induziert. So war es möglich, den Sauerstoffverbrauch der Enzyme, die nicht an der Atmungskette beteiligt sind, zu bestimmen.

3.2.4 Versuchsprotokoll

Um die genaue Durchführung der einzelnen Schritte nachvollziehen zu können, folgt in Abbildung 5 eine schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des tierexperimentellen und des laborexperimentellen Teils. In Abbildung 6 ist der zeitliche Verlauf der Verabreichung der Substrate zur Stimulation von Komplex I und II dargestellt.

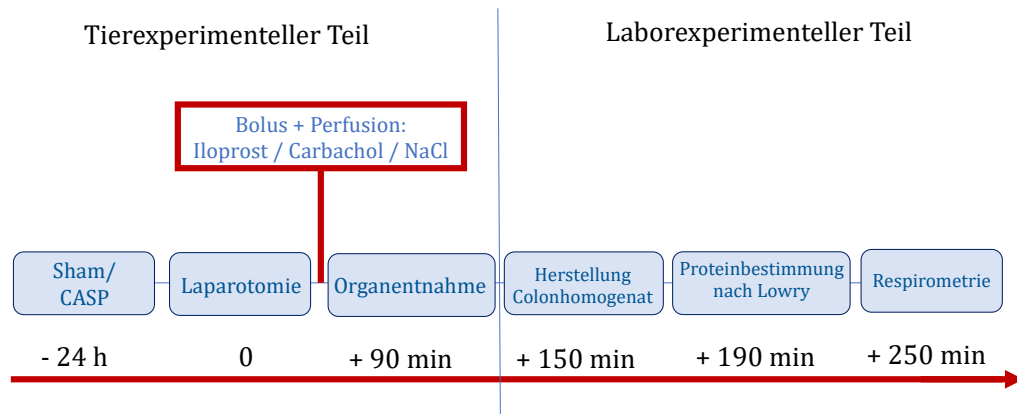


Abb. 5: Zusammenfassung des Versuchsablaufs

Dargestellt ist der zusammengefasste Versuchsablauf des tierexperimentellen, sowie des laborexperimentellen Teils. Auf dem Pfeil aufgetragen ist die Zeit in Minuten bzw. Stunden. CASP = *Colon ascendens stent peritonitis*

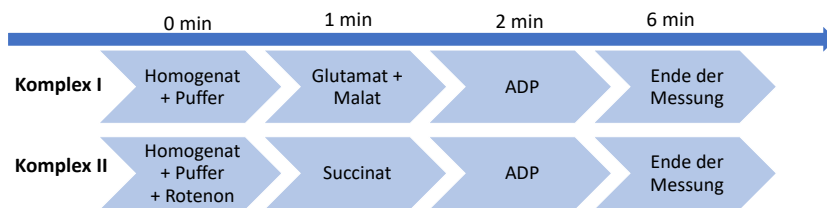


Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der Respirometrie

Dargestellt ist der Ablauf der Verabreichung der verschiedenen Substrate zur Stimulation von Komplex I und II im zeitlichen Verlauf.

3.2.5 Versuchsgruppen

Der oben beschriebene Versuchsaufbau wurde nach jeweils entsprechender Vorbereitung und Verabreichung der Medikamente an allen Versuchstieren durchgeführt. Hinsichtlich der Kontrollgruppen wurde die Gruppeneinteilung wie in Tabelle 3 angegeben gewählt.

	Operation	Medikation	Anzahl
Gruppe 1	Sham	NaCl	n = 10
Gruppe 2	Sham	Iloprost	n = 10
Gruppe 3	Sham	Carbachol	n = 10
Gruppe 4	Sham	Iloprost + Carbachol	n = 10
Gruppe 5	CASP	NaCl	n = 10
Gruppe 6	CASP	Iloprost	n = 10
Gruppe 7	CASP	Carbachol	n = 10
Gruppe 8	CASP	Iloprost + Carbachol	n = 10
Gesamt			n = 80

Tabelle 3: Gruppeneinteilung

NaCl = Natriumchlorid, n = Anzahl, CASP = *colon ascendens stent peritonitis*

3.3 Datenmanagement und Statistische Analyse

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

4 Ergebnisse

Untersucht wurde der Einfluss auf die mitochondriale Funktion nach lokaler Therapie mit Iloprost, Carbachol oder einer Kombination der beiden Medikamente. Als Maß zur Beurteilung der mitochondrialen Funktion des Colons dienten der RCI und der ADP/O-Quotient (vgl. dazu 2.2.3). Betrachtet wurden hierbei sowohl Komplex I als auch Komplex II der Atmungskette, erreicht durch die Zugabe der jeweiligen komplexspezifischen Substrate.

Nach der lokalen Applikation von Iloprost konnte unter nicht-septischen Bedingungen eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion sowohl für Komplex I als auch für Komplex II beobachtet werden. Carbachol schien innerhalb der Sham-Gruppe keinen Einfluss auf die MF zu nehmen.

Unter septischen Bedingungen zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der mitochondrialen Funktion in den behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.1 Applikation von Iloprost und Carbachol unter nicht-septischen Bedingungen

In der Sham-Gruppe zeigte sich nach Gabe von Iloprost eine signifikante Steigerung des RCI im Vergleich zur Kontrolle. Sowohl nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I (vgl. Tabelle 4, Abbildung 7, Kontrolle: median 3,11, Iloprost: median 3,92) als auch über Komplex II (vgl. Tabelle 4, Abbildung 7, Kontrolle: median 4,99, Iloprost: median 6,16; gezeigt werden in der unten stehenden Tabelle die jeweiligen minimalen, medianen und maximalen Werte) konnte ein erhöhter RCI gemessen werden.

Die ADP/O-Ratio blieb in der Sham-Gruppe nach Zugabe von Iloprost sowohl für Komplex I als auch für Komplex II unverändert (vgl. Tabelle 5, Abbildung 7).

Die Kombination von Iloprost und Carbachol hatte keine Auswirkung auf RCI und ADP/O-Ratio im Vergleich zur Kontrolle. Dies gilt sowohl für die Betrachtung von Komplex I als für Komplex II (vgl. Tabelle 4, Tabelle 5, Abbildung 7).

Auch bei der alleinigen Carbachol-Gabe in der Sham-Versuchsgruppe zeigten sich keine Veränderung des RCI oder der ADP/O-Ratio im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Tabelle 4, Tabelle 5, Abbildung 7).

RCI	NaCl (Min/Median/Max)	Iloprost (Min/Median/Max)	Carbachol (Min/Median/Max)	Iloprost + Carbachol (Min/Median/Max)	
Komplex I	2,62 3,11 4,97	2,75 3,92* 9,61	2,18 4,78 9,82	2,1 5,24 7,89	Sham
Komplex II	2,28 4,99 6,38	5,68 6,165* 7,08	3,57 4,8 8,97	2,38 5,56 7,53	
Komplex I	2,2 4 10,91	3,26 4,76 7,6	1,77 4,18 7,66	2,31 3,77 6,67	CASP
Komplex II	3,84 5,35 7,08	4,32 6,56 8,29	3,45 5,66 7,54	4,05 5,36 14,58	

Tabelle 4: Kopplung der Atmungskettenaktivität an die oxidative Phosphorylierung (RCI) unter septischen und nicht-septischen Bedingungen

RCI im Colonhomogenat als Maß der Kopplung der Atmungskettenaktivität an die oxidative Phosphorylierung in nicht-septischen (Sham) und septischen (CASP) Gruppen nach lokaler Applikation von Iloprost, Carbachol, Iloprost + Carbachol sowie der Kontrollsubstanz NaCl. Alle Werte sind als minimaler (min), medianer (median) und maximaler (max) Wert angegeben

ADP/O	NaCl (Min/Median/Max)	Iloprost (Min/Median/Max)	Carbachol (Min/Median/Max)	Iloprost + Carbachol (Min/Median/Max)	
Komplex I	0,85 1,77 3,38	1,21 1,63 3,01	1,14 1,62 3,67	0,87 1,55 3,82	Sham
Komplex II	0,5 1,15 1,74	0,47 1,01 1,95	0,76 1,19 2,77	0,57 0,99 3,1	
Komplex I	1,68 2,20 3,11	0,94 1,72 2,93	1,08 1,64 4,93	1,05 1,81 2,25	CASP
Komplex II	0,92 1,3 1,98	0,69 1,12 1,58	0,43 1,09 1,95	0,83 1,02 1,4	

Tabelle 5: Effizienz der oxidativen Phosphorylierung (ADP/O) unter septischen und nicht-septischen Bedingungen

ADP/O-Ratio im Colonhomogenat als Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung in nicht-septischen (Sham) und septischen (CASP) Gruppen nach lokaler Applikation von Iloprost, Carbachol, Iloprost + Carbachol sowie der Kontrollsubstanz NaCl. Alle Werte sind als minimaler (min), medianer (median) und maximaler (max) Wert angegeben.

4.2 Applikation von Iloprost und Carbachol unter septischen Bedingungen

Innerhalb der CASP-Versuchsreihe zeigte sich nach Iloprostapplikation keine Beeinflussung des RCI, sowohl für Komplex I, als auch für Komplex II (vgl. Tabelle 4, Abbildung 8). Auch der ADP/O-Quotient blieb in beiden Komplexen unverändert (vgl. Tabelle 5, Abbildung 8).

Ferner zeigte auch die kombinierte Gabe von Iloprost und Carbachol keine Auswirkungen auf den RCI oder den ADP/O-Quotienten im CASP-Versuchsarm. Dies galt sowohl bei der Betrachtung von Komplex I als von Komplex II (vgl. Tabelle 4, Tabelle 5, Abbildung 8).

Die alleinige Applikation von Carbachol zeigte unter septischen Bedingungen keine Veränderungen, die auf eine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion schließen ließen (vgl. Tabelle 4, Tabelle 5, Abbildung 8).

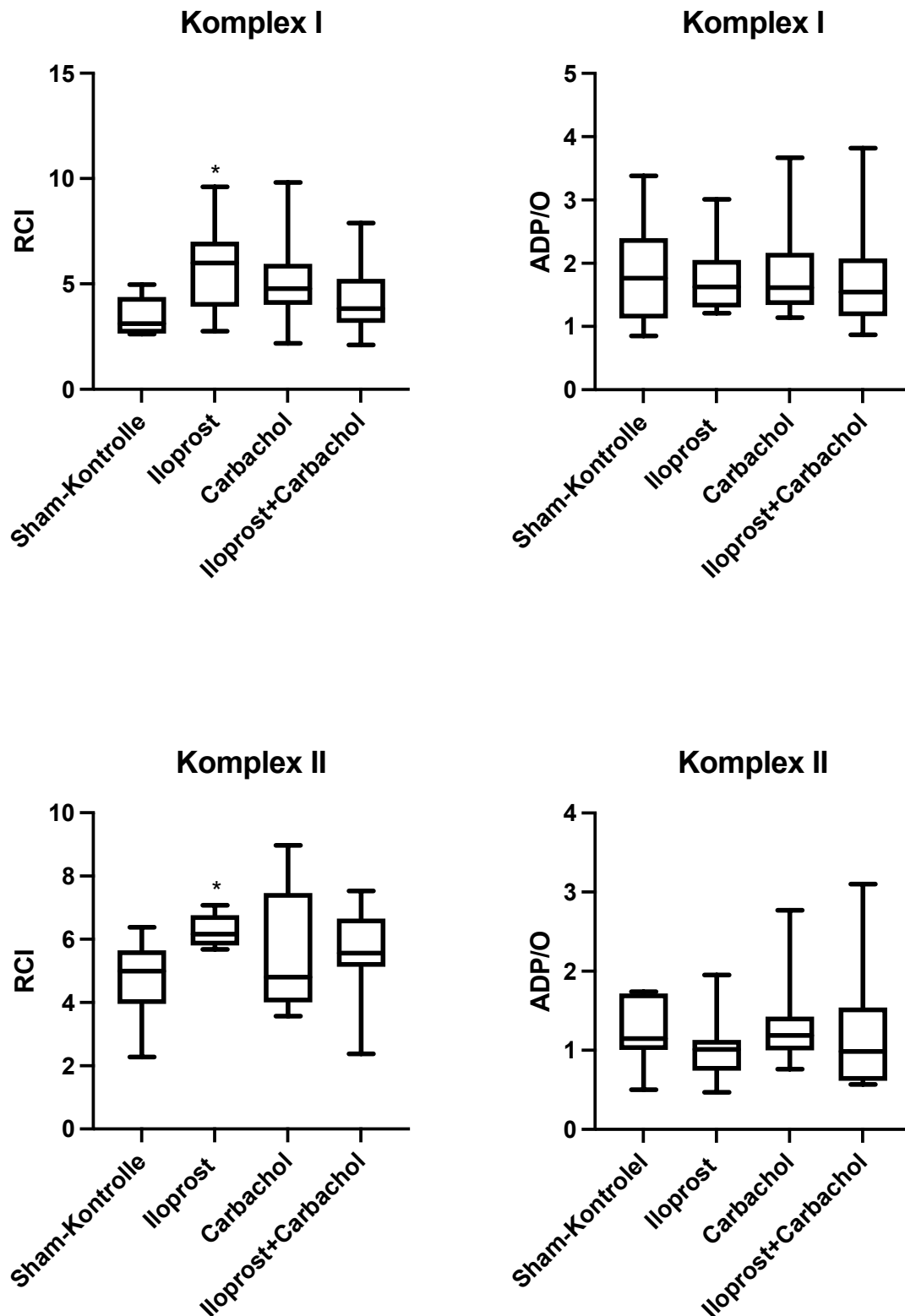


Abbildung 7: RCI und ADP/O-Ratio für Komplex I und II nach steriler Laparotomie

RCI und ADP/O-Ratio für Komplexe I und II der Atmungskette unter nicht-septischen Bedingungen des Sham-Versuchsarms nach der topischen Applikation von Iloprost, Carbachol, Iloprost + Carbachol oder der Kontrollsubstanz NaCl. Die Daten sind als *minimaler*), *medianer* und *maximaler* Wert angegeben.

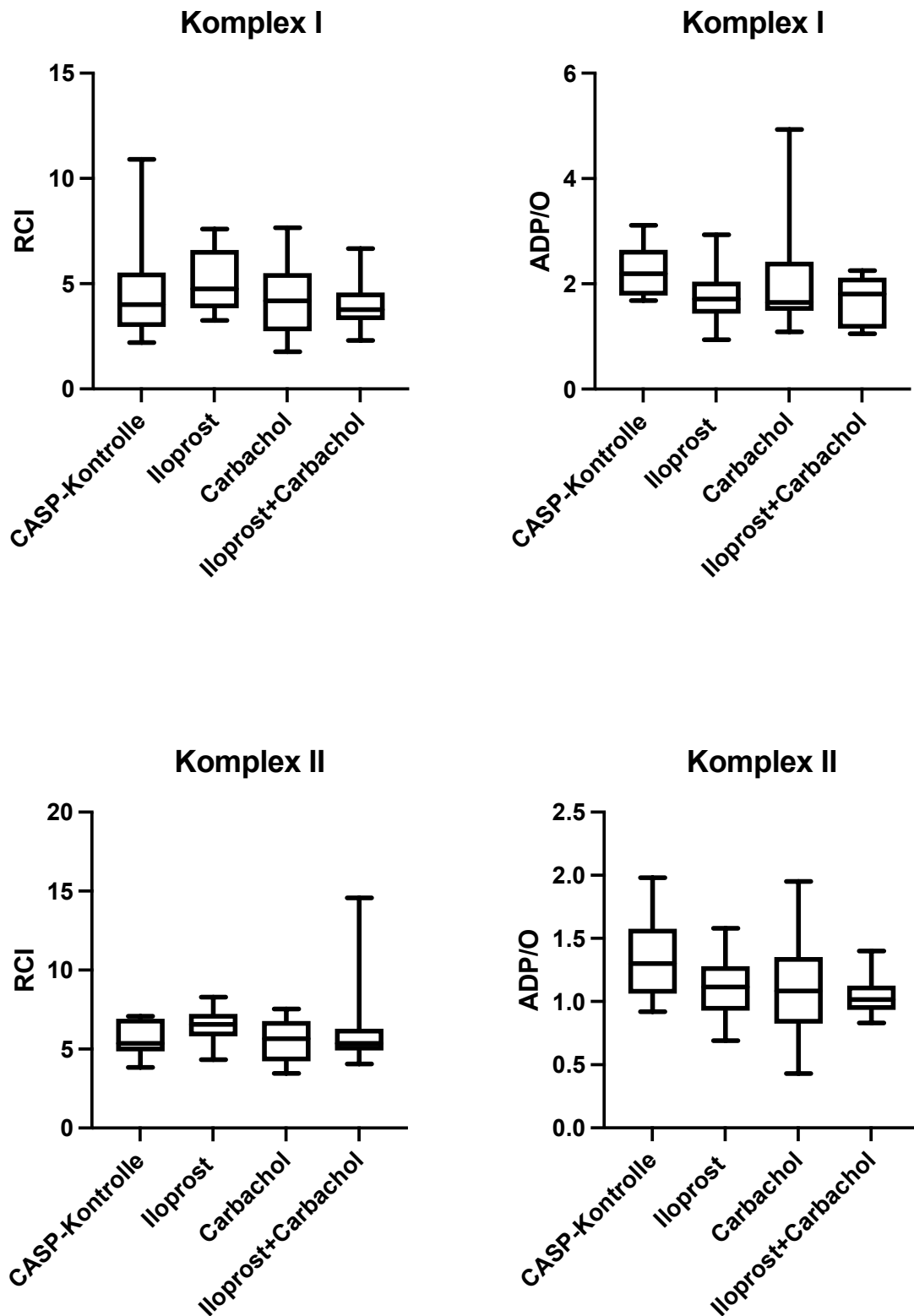


Abbildung 8: RCI und ADP/O-Ratio für Komplex I und II bei einer Sepsis

RCI und ADP/O-Ratio für Komplexe I und II der Atmungskette unter septischen Bedingungen des CASP-Versuchsarms nach der topischen Applikation von Iloprost, Carbachol, Iloprost + Carbachol oder der Kontrollsubstanz NaCl. Die Daten sind als *minimaler, medianer und maximaler Wert* angegeben.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die lokale Applikation von Iloprost und Carbachol die mitochondriale Funktion im Colonomogenat unter septischen und nicht septischen Bedingungen beeinflusst. Zur Induktion einer abdominalen Sepsis diente das CASP-Modell, die Kontrollgruppen erhielten eine Sham-Operation.

In Bezug auf die Beantwortung der eingangs gestellten zentralen Fragen lässt sich folgendes festhalten:

- 1) Die lokale Applikation von Iloprost in vivo bewirkte keine Verbesserung der mitochondrialen Funktion unter septischen Bedingungen. Nach einer sterilen Laparotomie zeigte sich allerdings ein positiver Effekt auf die mitochondriale Funktion im Colon im Sinne einer erhöhten Kopplung zwischen der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung.
- 2) Die zusätzliche Applikation von Carbachol hat keinen Einfluss auf die mitochondriale Funktion.

5.1 Methodendiskussion

Um zu gewährleisten, dass mögliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen interventionsbedingt und nicht durch sekundäre Einflüsse verursacht waren, erfolgte eine Optimierung der experimentellen Rahmenbedingungen. Hierzu zählen die standardisierte Versuchsausführung durch dieselben, geschulten Untersucher, die Verblindung der Untersucher, eine regulierte Unterbringung und Versorgung der Versuchstiere sowie Kontrollmessung und Mehrfachmessung durch die Fertigung technischer Replikate (vgl. Kapitel 2.0).

Für unsere Fragestellung wurden die Versuche im Rahmen eines septischen Rattenmodells durchgeführt. Betrachtet man lediglich die Hämodynamik, scheinen andere Versuchstiere dem menschlichen Organismus ähnlicher und

daher auf den ersten Blick geeigneter [76, 77]. In dieser Arbeit lag der Fokus aber auf der Beurteilung der Einflüsse auf die mitochondriale Funktion. Diese scheint zwischen den verschiedenen Spezies für das gleiche Organsystem gut vergleichbar ohne die Notwendigkeit einer ähnlichen Hämodynamik [34]. Um eine möglichst gute klinische Übertragbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, ist es von großer Relevanz, im gewählten Tiermodell möglichst genau die Pathophysiologie der humanen Sepsis widerzuspiegeln. Bei genauer Betrachtung bietet hier das septische Rattenmodell eine gute Simulation der klinisch kritischen Situation einer Sepsis. Es gibt Hinweise darauf, dass gerade im septischen Geschehen die Ergebnisse eines Rattenmodells aufgrund physiologischer, biochemischer und histologischer Ähnlichkeiten im septischen Organismus gut auf den Menschen übertragbar sind [45].

Zudem nutzten viele vorangegangene Arbeiten Nager als Versuchstiere zur genaueren Untersuchung der Pathophysiologie einer Sepsis [46, 56, 59, 61, 69, 73, 78]. Dies erlaubt eine Vergleichbarkeit der Forschungsergebnisse untereinander.

Das in unserem Versuchsaufbau gewählte CASP-Modell hat sich in der Vergangenheit bereits in vielen Arbeiten zur Sepsisinduktion bewährt und ist daher in der Literatur vielfach zu finden [69-71, 79]. Auch in unserem Institut für experimentelle Anästhesiologie hat es sich als Modell etabliert und vermehrt Anwendung gefunden [51, 72, 73, 80]. Dabei handelt es sich um ein invasives Vorgehen: Wie im Kapitel 2.1.3 bereits beschrieben, wird nach Eröffnung des Abdomens per Laparotomie ein Stent in das Colon des Versuchstiers eingesetzt und so eine kontinuierliche Verbindung zwischen Intestinum und Bauchraum geschaffen. Die durch Austritt des Fäzes induzierte abdominelle Sepsis kommt der klinischen Situation einer Anastomoseninsuffizienz sehr nahe [71]. Anders als in anderen Modellen, bedingt die resultierende Peritonitis die Entwicklung einer systemischen Infektion und Sepsis [81]. Bei der *cecal ligation and puncture* (CLP) Methode beispielsweise wird durch Punktion des Zökums auch eine intraabdominelle Entzündungsreaktion provoziert [82]. Jedoch beschränkt es sich hier auf eine lokale Reaktion im Sinne eines Abszesses, eine systemische Beteiligung im Sinne einer schweren Sepsis bleibt aus, sodass dieses Modell für unsere Fragestellung ungeeignet erschien [81]. Die CASP-Methode ermöglicht außerdem durch das entstehende polymikrobielle Milieu die Simulation der humanen septischen Pathophysiologie. Im Vergleich dazu wird bei dem vielfach verwendeten, wesentlich einfacher durchzuführenden Alternativverfahren, der Lipopolysaccharid (LPS) - Injektion beispielsweise über das Injizieren von Gram negativen Zellwandbestandteilen die Freisetzung

inflammatorischer Mediatoren stimuliert und so Symptome der Sepsis hervorgerufen. Der entstehende Zustand lässt sich allerdings eher als Endotoxämie beschreiben, sodass auch das LPS-Modell aufgrund des fehlenden septischen Fokus für unsere Untersuchung keine Option darstellte [83].

Neben der besseren Abbildbarkeit des bakteriellen Spektrums, lässt sich auch der Schweregrad der Sepsis im CASP-Modell über die Wahl des eingelegten Stents gut beeinflussen [71, 73, 79, 81]. Schöneborn et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Verwendung eines Stents von 14G zur Ausprägung einer moderaten Sepsis führt [72]. Für unseren Versuchsaufbau implantierten wir zwei 14G-Stents. Die somit hervorgerufene kritische physiologische Situation bedingte teilweise das Versterben der Versuchstiere noch bevor die Verabreichung der zu untersuchenden Substanzen erfolgte, sodass sich eine Letalität von 22% ergab. Dieser vermeintliche Nachteil der Methodik wurde bewusst gewählt, um den klinischen Verlauf der Sepsis und des septischen Schocks und die damit einhergehende Mortalität möglichst genau widerspiegeln zu können und eine bessere Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf die humane Sepsis zu schaffen [16].

Um eine genaue Aussage über die Beeinflussung der mitochondrialen Funktion im septischen Geschehen zu treffen, erscheint es sinnvoll, die Medikamente in gleicher Dosierung in einer physiologisch Kreislauftsituation zu applizieren. In der Kontrollgruppe wurde dazu die Sham-Operation angewandt, bei der der in der CASP-Operation verwendete Stent lediglich auf das Colon aufgenäht wird, ohne dies zu penetrieren (vgl. 2.1.3).

Es wird somit ein Zustand hergestellt, der mit der physiologischen Kreislauffunktion im Gesunden nicht vergleichbar ist. So kommt es durch den chirurgischen Eingriff zu einer stressbedingten Minderperfusion. Inwieweit dies direkten Einfluss auf die MF nimmt, ist laut aktueller Studienlage nicht eindeutig geklärt. Zwar beschreiben Mittal et al. in ihrer Arbeit keine Beeinflussung der MF durch eine durchgeführte Operation an den Kontrolltieren, jedoch handelte es sich hier lediglich um eine Laparotomie ohne das Annähen eines Stents und damit einhergehende Manipulation am Darm [84]. Dem gegenüber konnten Herminghaus et al. hingegen 2015 in den hepatischen Mitochondrien Sham-operierter Versuchstiere erhöhte RCI-Werte Vergleich zur nicht operierten Kontrollgruppe feststellen [51]. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch eine Folgearbeit 2019, in welcher erneut eine Beeinflussung der MF im Lebergewebe durch lediglich eine sterile Laparotomie gezeigt werden konnte. Die Untersuchung von Colonomogenat

zeigte hier jedoch keine mitochondriale Beeinflussung [80]. Eine Einordnung unserer Daten in diesen Kontext ist nicht möglich, da an jedem Versuchstier ein chirurgischer Eingriff vorgenommen wurde. Somit ist festzuhalten, dass es sich bei unseren Kontrollgruppen nicht um eine physiologische, sondern lediglich um eine nicht-septische Kreislaufsituation handelt.

Die Dosierung von Iloprost orientierte sich an einer entsprechenden Vorstudie unserer Arbeitsgruppe im Hundemodell, in welcher ein positiver Effekt auf die gastrische Mikrozirkulation nach topischer Anwendung von Iloprost gezeigt werden konnte [62]. Die Dosis für Carbachol wurde analog zu einer Untersuchung zu lokal appliziertem Carbachol im Rattenmodell von Bao et al. gewählt [68]. Hier konnte bereits eine verbesserte gastrointestinale Funktion nach topischer Therapie nachgewiesen werden.

Die mitochondriale Funktion wurde in unserer Arbeit im Colonomogenat untersucht. Als alternative Methode ist in der Literatur die Untersuchung isolierter Mitochondrien beschrieben. Hierbei kann es allerdings im Rahmen des aufwändigen Isolationsprozesses zu einer Beschädigung der Mitochondrien kommen. Zudem werden einzelne Mitochondrien isoliert, sodass im Gegensatz zur Untersuchung des Gewebehomogenats nicht die Gesamtheit der Mitochondrienpopulation betrachtet wird und so Verzerrungen der Ergebnisse möglich sind [85-87]. Ferner bietet die weniger aufwändige Aufbereitung eines Homogenats im Vergleich zu isolierten Mitochondrien den Vorteil, dass weniger Material für die Analyse benötigt wird [86].

Die in unserer Arbeit verwendete Respirometrie stellt eine etablierte Methode zur Messung der mitochondrialen Funktion dar und fand in unserem Institut für experimentelle Anästhesiologie bereits mehrfach Anwendung [51, 61, 75, 84]. Zwar stellen die hierbei gemessene Sauerstoffkonzentration sowie der Sauerstoffverbrauch wichtige Gesichtspunkte der mitochondrialen Funktion dar, jedoch bleiben weitere Aspekte der komplexen intrazellulären Vorgänge sowie Wechselwirkungen im lebenden Organismus unbeachtet. Die durch unsere Versuchsreihe gewonnenen Erkenntnisse lassen sich somit nur auf einen Teilaspekt der MF anwenden.

5.3 Ergebnisdiskussion

In dieser Arbeit konnte durch die lokale Applikation von Iloprost eine Verbesserung der MF unter nicht-septischen Bedingungen erzielt werden. Bezüglich des Einflusses von Iloprost auf die MF gibt es bislang nur wenig Daten. In einer vorangegangenen Arbeit aus unserem Arbeitskreis konnte lokal appliziertes Iloprost im Hundemodell die mikrozirkulatorische Oxygenierung des Magens im hämorrhagischen Schock verbessern [62]. Truse et al. wiesen in ihrer Arbeit nach lokaler Iloprosttherapie einen geringeren Abfall der postkapillären Sauerstoffsättigung der Magenschleimhaut im Vergleich zum unbehandelten Schocktier nach und schlossen daraus auf einen geringeren O₂ Bedarf im Gewebe, welcher eine geringere Ausschöpfung des Sauerstoffangebotes bedingen würde. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Mitochondrien sich grundsätzlich an den Energiebedarf der Zelle anpassen können [88, 89], scheint es denkbar, dass die Veränderungen der gastralen Oxygenierung möglicherweise mit einer Veränderung der MF zusammenhängen könnten. Auch in unserem Versuchsaufbau ist diese Erklärung für die positive Beeinflussung der MF unter nicht-septischen Bedingungen denkbar. Da die MF bei Truse et al. aber nicht untersucht wurde, ist eine Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse nur sehr eingeschränkt möglich.

Okabe et al. konnten in ihrer Arbeit eine gezielte Verbesserung der MF nach lokaler Perfusion von Iloprost nachweisen [90]. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein positiver Effekt auf die MF durch Iloprost. Jedoch bezog sich dies nicht wie bei Okabe et al. auf die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung (ADP/O-Quotient), sondern auf die Kopplung der Atmungskettenaktivität an die oxidative Phosphorylierung (RCI). Es bleibt zu berücksichtigen, dass es sich bei Okabe et al. um die Untersuchung an ischämischen Leberzellen handelte, sodass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt ist.

Insgesamt scheint die Herkunft der Mitochondrien bei der Untersuchung der MF eine wesentliche Rolle zu spielen. So zeigen Studien, dass die MF für verschiedene Organsysteme sehr variabel ist [84].

In Bezug auf die organspezifische Wirkweise von Iloprost liegen bereits konkrete Untersuchungsergebnisse vor. So wird inhalativ verabreichtes Iloprost wegen seiner dilatativen Wirkung auf Pulmonalarterien und -venen bereits regelhaft zur Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertension

eingesetzt [58]. Systemisch verabreicht kann es bei kardialer Ischämie durch die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion einen protektiven Effekt haben [91]. Bei Patienten im septischen Schock konnte Iloprost durch eine Steigerung des splanchnischen Blutflusses die Sauerstoffzufuhr des Gastrointestinaltraktes verbessern [92]. Zudem sind positive Effekte von Iloprost bei der Heilung von Darmanastomosen beschrieben [59].

In der oben bereits erwähnten Studie von Truse et al. konnte Iloprost die gastrale Oxygenierung verbessern. Auch in der Leber sind Verbesserungen der MF durch Iloprost erwiesen [90, 93].

Die vorliegende Arbeit konnte einen positiven Effekt auf die mitochondriale Funktion im Colon nicht-septischer Ratten nach lokaler Iloprost Gabe aufzeigen. Dies stimmt mit den Untersuchungsergebnissen von Herminghaus et al. überein, die bereits 2018 eine Verbesserung der MF nach Inkubation mit Iloprost im Colon von Ratten beschrieben [61]. Zu beachten ist jedoch, dass unterschiedliche Parameter der MF verbessert wurden. So konnten Herminghaus et al. einen erniedrigten *State 3* sowie eine erhöhte ADP/O-Ratio messen. Die Autoren schlossen daher darauf, dass die mitochondriale Atmung reduziert und die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung verbessert werden konnte. In unserer Untersuchung zeigten sich diese Werte nicht signifikant verändert, allerdings war sowohl für Komplex I als auch für Komplex II ein signifikant erhöhter RCI zu beobachten. Folglich lässt sich aus unseren Ergebnissen schließen, dass die Kopplung der Substratoxidation gesteigert und so auch die ATP-Produktion verstärkt werden konnte. Die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung blieb dabei unbeeinflusst. Dies bedeutet, dass der Sauerstoffverbrauch nicht gesenkt werden konnte.

Trotz gewisser Ähnlichkeiten im Versuchsaufbau kommen die Arbeiten also zu unterschiedlichen Ergebnissen. Zu berücksichtigen bleibt, dass Herminghaus et al. im Gegensatz zur vorliegenden Forschungsarbeit in ihren Versuch am Gewebe von gesunden Ratten und zudem *in vitro* durchführten, sodass die Konzentration der Substanzen genau kontrolliert werden konnte.

Für die lokale Anwendung von Carbachol konnte in der vorliegenden Arbeit keine Verbesserung der MF im nicht-septischen Versuchsaarm gezeigt werden. Limitierend ist hier eine unzureichende Studienlage und somit mangelnde Vergleichbarkeit zu Vorergebnissen, sodass sich mögliche Ursachen einer fehlenden Modulation nur aus der Wirkweise von Carbachol herleiten lassen. Carbachol entfaltet seinen parasymphomimetischen Effekt auf zwei Wegen.

Zum einen wirkt es endothel-abhängig über muskarinerge M1- und M3-Acetylcholin-Rezeptoren.

Zum anderen besteht eine Endothel-unabhängige Wirkweise. Die cholinerge Aktivierung präsynaptischer muskarinenger M1- und M3-Rezeptoren bewirkt eine Freisetzung von *Calcitonin-gene-related-peptide* (CGRP). CGRP führt über seinen entsprechenden Rezeptor an der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Relaxation [94, 95]. In vorausgegangenen Studien wurde untersucht, wie viel Acetylcholin zur Aktivierung dieses Pfades benötigt wird und es wurde gezeigt, dass erst eine erhöhte Menge Acetylcholin eine Aktivierung bewirken kann [95]. Dies legt die Überlegung nahe, dass es bei Carbachol einen ähnlichen Dosis-abhängigen Effekt geben könnte und die fehlende Modulation der MF durch eine zu niedrige Konzentration bedingt ist. Hierzu sind weitere Studien mit verschiedenen Carbachol-Dosierungen notwendig.

Wie eingangs bereits beschrieben, ist die Studienlage zur MF unter septischen Bedingungen insgesamt kontrovers und es lässt sich keine klare Aussage bezüglich sepsisbedingter Veränderungen der MF treffen [34]. So zeigten Kantrow et al. einen erhöhten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch in ihrer Untersuchung von Hepatozyten im septischen Rattenmodell [44]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch Takeyama et al. in ihrer Betrachtung von Mitochondrien aus Leberhomogenat erzielen [43]. Andere Autoren zeigten einen reduzierten Sauerstoffverbrauch während einer Sepsis, so z.B. Brealey et al. [45] in einer Untersuchung von Leber und Skelettmuskulatur und Larche et al in ihrer Arbeit zu Herzmitochondrien [46]. In den Arbeiten von Taylor et al. [48] und Geller et al. [49] ließ sich eine unveränderte MF im Rahmen einer Sepsis feststellen.

Zu erklären sind die divergierenden Untersuchungsergebnisse zum Teil durch die jeweilige Methodik: So wurden unterschiedliche Sepsismodelle und Versuchstiere gewählt und unterschiedliche Stadien der Sepsis untersucht. Eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist somit nicht gegeben.

Zu klären bleibt, warum trotz wiederholter Messung einer verbesserten MF durch lokale Iloprostapplikation unter nicht-septischen Bedingungen keine Beeinflussung während einer Sepsis gezeigt werden konnte. Einen möglichen Erklärungsansatz stellt die veränderte Mikrozirkulation im Rahmen einer Sepsis dar. In vorangegangenen Studien hatte systemisch angewendetes Iloprost auch in kritischen Kreislaufsituationen positive Effekte [92]. Im septischen Geschehen kann die eingangs beschriebene veränderte Mikrozirkulation allerdings zu veränderten lokalen Wirkprozessen führen. Die

Sympathikusaktivierung während einer kritischen Kreislagsituation wie z.B. einer Sepsis fñhrt zu einer Vasokonstriktion im Kapillarnett. Wñhrend es bei der systemischen Verabreichung von Iloprost zu einer Vasodilatation kommt, scheint dieser Effekt bei lokaler Verabreichung nicht ausreichend einzutreten [62].

Weitere Erklñrungsversuche setzen bei der ohnehin speziellen Oxygenierungssituation im Dickdarm an. Dabei herrscht hier ein steiler Sauerstoffgradient zwischen anaerobem Darmlumen bis hin zur reich vaskularisierten subepithelialen Mukosa. In Colonzellen lassen sich daher verschiedene Mechanismen zur Anpassung an die unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen finden, wie z.B. die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF (Hypoxie-induzierender Faktor) [96]. Denkbar wñre hier auch, dass im Rahmen dieser Anpassungen wñhrend einer Sepsis der ATP-Bedarf im Colon reduziert ist. In vorausgegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Mitochondrien sich grundsatzlich an den Energiebedarf der Zelle anpassen kñnnen [88, 89]. Auch die Mitochondrien selbst verfñgen ùber Kompensationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, um die Zelle unter widrigen Bedingungen wie einer Sepsis zu schñtzen [97]. In jedem Fall ist festzuhalten, dass unsere Ergebnisse auch bedeuten, dass eine septisch Ausgangsbedingung einen signifikanten Einfluss auf die Wirkung von Iloprost hat.

Auch die Dosierung scheint eine wichtige Rolle in Bezug auf die Wirksamkeit von Iloprost auf die MF zu spielen. Neben dem positiven Effekt von Iloprost auf die Funktion myokardialer Mitochondrien wurde in der Studie von Ferrari et al. ein dosisabhñngiger Effekt von Iloprost beschrieben [91]. Einerseits ist es mñglich, dass die Iloprost-Dosierung in unserem Versuch nicht ausreichend war. Andererseits ist jedoch viel wahrscheinlicher, dass die Untersuchungsergebnisse sich aufgrund der gravierenden Unterschiede zwischen Myokardzellen und intestinalen Zellen nicht ùbertragen lassen. Unterstñtzt wird diese Annahme durch die Arbeit von Herminghaus et al., bei der keine dosisabhñngige Wirkung fñr Iloprost gezeigt werden konnte [61].

Wenn auch die Rolle der Mitochondrien im septischen Geschehen noch nicht eindeutig geklñrt ist, ist die Relevanz der Mikrozirkulation belegt: Sie ist entscheidend fñr das Outcome schwer septischer Patienten [98]. In Tierversuchen wird daher nach weiteren therapeutischen Mñglichkeiten der Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation geforscht [99]. Fñr Iloprost sind in vorangegangenen Arbeiten positive Effekte auf die gastrale Oxygenierung

beschrieben, jedoch handelte es sich hier um die Betrachtung im hämorrhagischen Schock [62]. Bewiesen ist, dass die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation sich positiv auf die mukosale Barrierefunktion auswirkt [100]. Da auch gezeigt wurde, dass diese Beziehung wechselseitig ist, wurde in unserer Arbeit Iloprost mit Carbachol kombiniert, um die intestinale Barrierefunktion zu stabilisieren und so die MF während einer Sepsis zusätzlich zu verbessern. Unsere Untersuchung zeigte allerdings weder unter nicht-septischen noch unter septischen Bedingungen eine Beeinflussung der MF durch die kombinierte Applikation von Iloprost und Carbachol. Eine mögliche Erklärung könnte eine negative Beeinflussung der Barrierefunktion durch Iloprost sein. Für NO beispielsweise ist eine derartige Wirkweise nachgewiesen. Salzman et al. konnten eine Schädigung der tight junctions durch NO in Zellkulturen intestinaler Endothelzellen nachweisen [101]. Entsprechende Daten zu Iloprost existieren bislang nicht. Unter der Annahme, dass Iloprost eine Schädigung der Barriere hervorruft, ist in dieser Überlegung eine zusätzliche negative Beeinflussung durch das Erreichen hoher lokaler Wirkspiegel bei topischer Applikationsform denkbar.

Für die lokale Anwendung von Carbachol konnte in der vorliegenden Arbeit auch im septischen Versuchsaarm keine Verbesserung der MF gezeigt werden. Der Einfluss von Carbachol auf die MF während einer Sepsis ist bislang nur unzureichend erforscht. Die Untersuchungsergebnisse von Zhou et al. aus 2020 konnten gewisse positive Beeinflussungen bei der lokalen intraabdominellen Therapie mit Carbachol erzielen: Im septischen Rattenmodell zeigte sich hier eine verminderte Freisetzung inflammatorischer Faktoren und apoptotischer Proteine [102]. Da die MF nicht zuletzt auch durch inflammatorische Prozesse beeinflusst wird, schien es denkbar, dass auch für unsere Fragestellung ein positiver Effekt durch die lokale Anwendung von Carbachol erzielt werden könnte. Dies konnten unsere Untersuchungsergebnisse allerdings nicht bestätigen. Im direkten Vergleich der Methodik zeigt die Studie von Zhou et al. deutliche Unterschiede auf: Carbachol wurde hier nicht im Rahmen einer lokalen Perfusion zugeführt, sondern direkt intraabdominell injiziert. Zwar handelte es sich bei Zhou et al. um ein ähnliches Sepsismodell, jedoch wurden die eigentlichen Untersuchungen an Myokardzellen durchgeführt. Darüber hinaus wurden von Zhou et al. keine Parameter der mitochondrialen Respiration gemessen, sondern Faktoren der Inflammation bestimmt. Eine Vergleichbarkeit ist hier also nur sehr eingeschränkt gegeben.

In Hinblick auf die oben beschriebene Wirkweise von Carbachol ist es entscheidend, auch die endothel-abhängige Wirkung über muskarinerge M1- und M3-Acetylcholin-Rezeptoren zu betrachten. Über die Freisetzung von Calcium wird die NO-Synthase aktiviert, die eine erhöhte NO-Produktion nach sich zieht. Infolgedessen kommt es zu einer Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße [94, 103]. Durch die Vasokonstriktion kleiner arterieller Gefäße und Öffnung arterio-venöser Shunts im Rahmen einer Sepsis ist es denkbar, dass die Wirkung auf die vorgeschalteten Gefäße überwiegt und so eine vasodilatatorische Wirkung auf die Mikrozirkulation durch Carbachol verhindert wird.

Im Rahmen der Bildung von NO sind auch weitere Co-Faktoren der NO-Synthase von Relevanz. Unter anderem ist Tetrahydrobiopterin (BH4) ein wegweisender Faktor in diesem Geschehen, der aufgrund seiner Anfälligkeit auf oxidativen Stress vor allem in kritischen Situationen des Organismus eine Rolle spielt [104]. So beschreiben Vásquez-Vivar et al. beispielsweise, dass BH4 als „Redox-Schalter“ fungiert, indem es die Freisetzung von Superoxid verringert und die Bildung von NO verstärkt [104]. Zudem wurde BH4 auch in Verbindung mit der Entstehung der Sepsis gebracht [105, 106]. In Tierstudien konnte bei exogener Zugabe von BH4 eine verbesserte mikrovaskuläre Perfusion und verringerter oxidativer Stress festgestellt werden [99, 107-109]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es im septischen Organismus einen Mangel an physiologisch vorkommendem BH4 gibt und eine exogene Gabe sich daher positiv auf die Mikrozirkulation auswirkt. Unter Annahme dessen könnte BH4 als Kofaktor der NO-Synthase ein begrenzender Faktor für die Wirksamkeit von Carbachol sein. Hierzu wurden in unserer Arbeit keine detaillierten Messungen vorgenommen, sodass eine eindeutige Aussage nicht möglich ist, weitere Studien aber interessant wären.

Festzuhalten ist außerdem, wie von Geller et al. bereits beschrieben, dass eine fehlende Veränderung der gemessenen Parameter der MF nicht bedeutet, dass keine veränderte Funktion im Stoffwechsel des septischen Organismus vorliegt [49]. Wie eingangs beschrieben wird in der bei uns durchgeführten Respirometrie die Fähigkeit der Mitochondrien zur oxidativen Phosphorylierung gemessen. Im gewählten Versuchsaufbau werden dazu hochenergetische Substrate zugefügt. Unter diesen Umständen zeigen sich laut unseren Ergebnissen keine Beeinträchtigungen der MF. Inwieweit sich dies aber auf einen septischen Organismus übertragen lässt, kann auf diese Weise nicht untersucht werden, da die Respirometrie nur einen Teilaspekt der komplexen mitochondrialen Atmung darstellt.

5.4 Schlussfolgerung

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit sehr plausibel in den Kontext der aktuellen Datenlage einordnen. Auch wenn eine direkte Übertragung auf die klinische Situation nicht möglich ist, lassen die gezeigten Effekte von Iloprost auf die Mitochondrien im nicht-septischen Organismus den Schluss zu, dass weitere Untersuchungen zur genauen Wirkweise von lokal appliziertem Iloprost interessant sein könnten. Für weitere klinische Bereiche ist bereits ein Nutzen der topischen Therapie bekannt. So konnten adäquate Perfusion und Oxygenierung den Heilungsprozess von Anastomosen nach Darmoperationen positiv beeinflussen [110]. Unsere Daten konnten die Ergebnisse von Herminghaus et al. in Teilen unterstützen [61] und zeigen, dass lokal appliziertes Iloprost unter nicht-septischen Bedingungen die MF positiv beeinflusst. Durch die lokale Applikation geschah dies ohne kreislaurelevante Nebenwirkungen. Im septischen Organismus konnten keine Beeinflussungen festgestellt werden. Wir konnten somit zeigen, dass die Wirkung von Iloprost während einer Sepsis verändert ist. Die Ergebnisse unserer Arbeit erweitern somit das Wissen weiterer möglicher Wirkweisen der untersuchten Medikamente. Langfristig kann dies zur Erweiterung der therapeutischen Option während einer Sepsis beitragen.

6 Anhang

6.1 Material und Geräte

96-Well-Platte	96 Well Multiply® PCR Plate, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Analyseprogramm zur Respirometrie	Strahlkelvin 782 System Version 4.4 HID, Strahlkelvin Instruments, Motherwell, Großbritannien
Beatmungsgerät	Inspira Advanced Safety Ventilator MA1 55-7059, Harvard Apparatur GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
Borosilikatglas	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Buprenorphin	Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
ED Wasserbad	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Eismaschine	AF80, Scotsman, Mailand, Italien
Eppendorf Reference® Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcons Cellstar Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Folie für Wellplatte	Klebefolie, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Futtermittel für Ratten	Familie Rettenmaier&Söhne GmbH und Co KG, Rosenberg
Gewebehomogenisator Potter-Elvehjem	Pro Scientific, Swedesboro, New Jersey, USA
Homogenisatorgefäß / Glaszylinder	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Homogenisierstation	Dispergierstation T 8.10 mit Metallpotter, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Injekt Spritze “micorsynrings” MS-R25	Ito Corporation Exmire, Fuji, Japan
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	Synergy 2 Plate Reader mit Gen5™ Data Analysis Software Version 1.11, BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA
Nahtmaterial	VicrylPlus® 4-0, Ethicon Inc, Bridgewater, New Jersey, USA
Nahtmaterial	Prolene® 6-0, Ethicon Inc, Bridgewater, New Jersey, USA
PCR-Wellplatten	96 Well Multiply® PCR Plate, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pentobarbital	Narcoren®, Pentobarbital-Natrium, Zentralapotheke Universitätsklinikum Düsseldorf
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Laborausrüstung Klees, Düsseldorf, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Respirometriesystem	MT200-Respirometer, Strahlkelvin Instruments, Motherwell, Großbritannien
Sevofluran	Sevorane®, AbbVie GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
Thermometer	GTH 1160, Greisinger Electronic GmbH, Temperaturmessung, Regenstauf, Deutschland

Venenverweilkanüle 14G	Vasofix®Safety 14Gx2 B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Venenverweilkanüle 24G	Introcane Safety ®-Winged 24Gx3/4, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Vortexgerät	Vortex Genie Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wärmematte	Julabo 6, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Weichholzgranulat als Einstreu	Ssniff Spezialdiät GmbH, Soest

6.2 Chemikalien und Reagenzien

ADP (Adenosintriphosphat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Carbachol	Merck, Darmstadt, Deutschland
cOmplete™ (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche Diagnostics GmbH, Heilighaus, Deutschland
Cytochrom C	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethylenglykoltetraacetat	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Folin & Ciocalteu's phenol reagent	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glutamat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Iloprost	Cayman, CAY-10008585-5
Kaliumnatrium-Tartrat-Tetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Malat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mannitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
MOPS MG (3-(N-Morpholino) - propansulfonsäure)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	
Natriumdiphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rotenon	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Sodiumsulfidlösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin- EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Gibco®, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

6.3 Puffer und Lösungen

Colon-Isolationspuffer (pH 7,15)	200 mM	Mannitol
	50 mM	Sucrose
	5 mM	KH ₂ PO ₄
	5 mM	MOPS
	0,1 %ig	BSA <i>essentially fatty acid free</i>
	1 mM	EGTA
Colon-Isolationspuffer mit erhöhtem BSA-Gehalt	20 mg/ml	BSA <i>essentially fatty acid free</i>
Colon-Respirationspuffer (pH 7,4)	130 mM	KCl
	5 mM	KH ₂ PO ₄
	20 mM	MOPS
	2,5 mM	EGTA
	0,1 %ig	BSA <i>fatty acid free</i>
	1 µM	Na ₄ P ₂ O ₇
		vor Gebrauch wurden zusätzlich 20 mg BSA/ml hinzugefügt
Lowry Lösung 1		
• Reagenz A	10 g Natriumcarbonat in 500 ml 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung gelöst	
• Reagenz B	2 g Kaliumnatrium-Tartrat-Tetrahydrat in 100 ml <i>Aqua dest.</i> gelöst	
• Reagenz C	1 g Kupfersulfatpentahydrat in 100 ml <i>Aqua dest.</i> gelöst	
Lowry Lösung 2	2 ml <i>Aqua dest.</i> 2 ml <i>Folin & Ciocalteu's phenol reagent</i>	

6.4 Septic Rat Severity Score

Tiernummer	Versuchsgruppe	Gewicht	Stentgröße	Tüttennummer

Klinische Untersuchung:

Untersuchung	Untersuchungsergebnis	Zeit:	11-12 Uhr	16-17 Uhr	20 Uhr	22-23 Uhr	5-6 Uhr
<u>Körpergewicht</u>	1. präop. Gewicht (pG) ____ g 2. Momentanwert (mW) ____ g 3. $\Delta = \% \text{ des mW vom pG}$ ____ $\Delta\%$	$\Delta\% < 5 \Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Delta\% < 10 \Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Delta\% < 15 \Rightarrow 3 \text{ P}$ $\Delta\% \geq 15 \Rightarrow 10 \text{ P}$					
<u>Erscheinung</u>	1. normale Erscheinung, Fell anliegend, sauber geputzt 2. geringes Pflegedefizit, Fell gesträubt 3. zunehmendes Pflegedef., Ränder an Auge/Anus 4. deutliches Pflegedef., Augen verklebt, Einstreu haftet am Anus	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$					
<u>Spontanverhalten</u>	1. Ratte (R) erkundet Käfig, aktiv 2. R sitzt auf einer Stelle, Ganzkörperbewegung vorhanden 3. buckelige Haltung, schwankender Gang 4. immobil, Seitenlage	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$ $\Rightarrow 10 \text{ P}$					
<u>Provoziertes Verhalten</u>	1. R flieht bei Käfigöffnung, starker Muskeltonus 2. R flieht erst bei Annäherung der Hand 3. R flieht erst bei Berührung 4. Fluchtreflex erloschen	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$ $\Rightarrow 10 \text{ P}$					
<u>Atemfrequenz</u>	1. präop. Wert (pW) ____ /min 2. Momentanwert (mW) ____ /min 3. $\Delta = \% \text{ des mW vom pW}$ ____ $\Delta\%$	$\Delta\% < 10 \Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Delta\% < 20 \Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Delta\% < 50 \Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Delta\% > 50 \Rightarrow 3 \text{ P}$					
<u>Expiratorisches Atemgeräusch</u>	Nein Ja	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$					
<u>Abdomen-palpation (AP)</u>	1. kein Druckschmerz bei AP, weiches Abdomen 2. geringe Reaktion auf AP, weiches Abdomen 3. abdominelle Resistenz 4. deutl. Schmerzzeichen auf AP, hartes Abdomen	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 1 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$ $\Rightarrow 10 \text{ P}$					
<u>Kotbeschaffenheit</u>	1. viel normaler Kot im Käfig, koten während der Untersuchung 2. viel Kot im Käfig, Kot blutig, dünnflüssig oder schleimig 3. wenig Kot im Käfig, unabh. von Beschaffenheit 4. kein Kot im Käfig (seit letzter Untersuchung)	$\Rightarrow 0 \text{ P}$ $\Rightarrow 2 \text{ P}$ $\Rightarrow 3 \text{ P}$ $\Rightarrow 10 \text{ P}$					

Auswertung:

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

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

Name und Unterschrift:

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Fischer-Fels, J., *Sepsis: Frühe Erkennung soll Überleben verbessern*. Deutsches Ärzteblatt International, 2021. **118**(8): p. 382.
2. Bauer, M., et al., *[Mortality in sepsis and septic shock in Germany. Results of a systematic review and meta-analysis]*. Anaesthesist, 2021: p. 1-8.
3. Angus, D.C. and T. van der Poll, *Severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2013. **369**(9): p. 840-51.
4. Fleischmann, C., et al., *Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(10): p. 159-66.
5. Martin, G.S., *Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. **10**(6): p. 701-6.
6. Herold, G., *Innere Medizin 2020*. 2019, Köln: Herold, Gerd S.323.
7. Caraballo, C. and F. Jaimes, *Organ Dysfunction in Sepsis: An Ominous Trajectory From Infection To Death*. Yale J Biol Med, 2019. **92**(4): p. 629-640.
8. Kempker, J.A. and G.S. Martin, *The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis*. Clin Chest Med, 2016. **37**(2): p. 165-79.
9. Markwart, R., et al., *Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis*. Intensive Care Med, 2020. **46**(8): p. 1536-1551.
10. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Jama, 2016. **315**(8): p. 801-10.
11. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis and septic shock*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16045.
12. Vincent, J.L., et al., *The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine*. Intensive Care Med, 1996. **22**(7): p. 707-10.
13. Seymour, C.W., et al., *Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Jama, 2016. **315**(8): p. 762-74.
14. Abraham, E. and M. Singer, *Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction*. Crit Care Med, 2007. **35**(10): p. 2408-16.
15. Exline, M.C. and E.D. Crouser, *Mitochondrial mechanisms of sepsis-induced organ failure*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 5030-41.
16. Dellinger, R.P., et al., *Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012*. Crit Care Med, 2013. **41**(2): p. 580-637.
17. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
18. Stearns-Kurosawa, D.J., et al., *The pathogenesis of sepsis*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 19-48.
19. Levi, M., et al., *Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis*. Jama, 1993. **270**(8): p. 975-9.
20. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen, *Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(12): p. 862-74.

21. Klingensmith, N.J. and C.M. Coopersmith, *The Gut as the Motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness*. Crit Care Clin, 2016. **32**(2): p. 203-12.
22. Fink, M.P., *Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness*. Curr Opin Crit Care, 2003. **9**(2): p. 143-51.
23. Fredenburgh, L.E., et al., *Cyclooxygenase-2 deficiency leads to intestinal barrier dysfunction and increased mortality during polymicrobial sepsis*. J Immunol, 2011. **187**(10): p. 5255-67.
24. Carrico, C.J., et al., *Multiple-organ-failure syndrome*. Arch Surg, 1986. **121**(2): p. 196-208.
25. Wang, Q., et al., *Endotoxemia in mice stimulates production of complement C3 and serum amyloid A in mucosa of small intestine*. Am J Physiol, 1998. **275**(5): p. R1584-92.
26. Meyer, T.A., et al., *Sepsis and endotoxemia stimulate intestinal interleukin-6 production*. Surgery, 1995. **118**(2): p. 336-42.
27. Sakr, Y., et al., *Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock*. Crit Care Med, 2004. **32**(9): p. 1825-31.
28. Ince, C., *The microcirculation is the motor of sepsis*. Crit Care, 2005. **9 Suppl 4**(Suppl 4): p. S13-9.
29. Balzan, S., et al., *Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(4): p. 464-71.
30. Nagpal, R. and H. Yadav, *Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview*. Ann Nutr Metab, 2017. **71 Suppl 1**: p. 11-16.
31. Nazli, A., et al., *Epithelia under metabolic stress perceive commensal bacteria as a threat*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 947-57.
32. Saxena, A., F. Lopes, and D.M. McKay, *Reduced intestinal epithelial mitochondrial function enhances in vitro interleukin-8 production in response to commensal Escherichia coli*. Inflamm Res, 2018. **67**(10): p. 829-837.
33. Grip, J., et al., *The effect of plasma from septic ICU patients on healthy rat muscle mitochondria*. Intensive Care Med Exp, 2016. **4**(1): p. 20.
34. Jeger, V., et al., *Mitochondrial function in sepsis*. Eur J Clin Invest, 2013. **43**(5): p. 532-42.
35. Poyton, R.O., K.A. Ball, and P.R. Castello, *Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(7): p. 332-40.
36. Zhang, H., Y.M. Go, and D.P. Jones, *Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress*. Arch Biochem Biophys, 2007. **465**(1): p. 119-26.
37. Jones, D.P., *Radical-free biology of oxidative stress*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(4): p. C849-68.
38. Galley, H.F., *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis*. Br J Anaesth, 2011. **107**(1): p. 57-64.
39. Singer, M. and D. Brealey, *Mitochondrial dysfunction in sepsis*. Biochem Soc Symp, 1999. **66**: p. 149-66.
40. Brealey, D., et al., *Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock*. Lancet, 2002. **360**(9328): p. 219-23.
41. Deitch, E.A., *Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy*. Ann Surg, 1992. **216**(2): p. 117-34.
42. Rolfe, D.F. and G.C. Brown, *Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals*. Physiol Rev, 1997. **77**(3): p. 731-58.

43. Takeyama, N., et al., *Altered hepatic mitochondrial fatty acid oxidation and ketogenesis in endotoxic rats*. Am J Physiol, 1990. **259**(4 Pt 1): p. E498-505.
44. Kantrow, S.P., et al., *Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis*. Arch Biochem Biophys, 1997. **345**(2): p. 278-88.
45. Brealey, D., et al., *Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(3): p. R491-7.
46. Larche, J., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(2): p. 377-85.
47. Lowes, D.A., et al., *Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis*. Br J Anaesth, 2013. **110**(3): p. 472-80.
48. Taylor, D.E., A.J. Ghio, and C.A. Piantadosi, *Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis*. Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(1): p. 70-6.
49. Geller, E.R., S. Jankauskas, and J. Kirkpatrick, *Mitochondrial death in sepsis: a failed concept*. J Surg Res, 1986. **40**(5): p. 514-7.
50. Singer, M., et al., *Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation*. Lancet, 2004. **364**(9433): p. 545-8.
51. Herminghaus, A., et al., *Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver*. Mitochondrion, 2015. **24**: p. 122-8.
52. Lelubre, C. and J.L. Vincent, *Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis*. Nat Rev Nephrol, 2018. **14**(7): p. 417-427.
53. Schwarte, L.A., et al., *The differential effects of recombinant brain natriuretic peptide, nitroglycerine and dihydralazine on systemic oxygen delivery and gastric mucosal microvascular oxygenation in dogs*. Anaesthesia, 2012. **67**(5): p. 501-7.
54. Buwalda, M. and C. Ince, *Opening the microcirculation: can vasodilators be useful in sepsis?* Intensive Care Med, 2002. **28**(9): p. 1208-17.
55. Blikslager, A.T., et al., *Prostaglandins I₂ and E₂ have a synergistic role in rescuing epithelial barrier function in porcine ileum*. J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 1928-33.
56. Takeuchi, K., *Gastric cytoprotection by prostaglandin E₂ and prostacyclin: relationship to EPI and IP receptors*. J Physiol Pharmacol, 2014. **65**(1): p. 3-14.
57. Brzozowski, T., et al., *Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation*. J Physiol Pharmacol, 2005. **56 Suppl 5**: p. 33-55.
58. Ewert, R., et al., *Inhaled iloprost for therapy in pulmonary arterial hypertension*. Expert Rev Respir Med, 2011. **5**(2): p. 145-52.
59. Vasiliadis, K., et al., *Influence of the stable prostacyclin analog iloprost on the healing of colonic anastomosis in rats*. Minerva Chir, 2007. **62**(4): p. 241-8.
60. Galanopoulos, G., et al., *The effects of iloprost on colonic anastomotic healing in rats*. Tech Coloproctol, 2011. **15 Suppl 1**: p. S117-20.
61. Herminghaus, A., et al., *Nitroglycerin and Iloprost Improve Mitochondrial Function in Colon Homogenate Without Altering the Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 291.
62. Truse, R., et al., *Effect of Topical Iloprost and Nitroglycerin on Gastric Microcirculation and Barrier Function during Hemorrhagic Shock in Dogs*. J Vasc Res, 2017. **54**(2): p. 109-121.
63. Wu, R., et al., *Ghrelin inhibits sympathetic nervous activity in sepsis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(6): p. E1697-702.

64. Aktories, K., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheke*. Vol. 12. 2017, München: Elsevier.
65. Lesko, S., et al., *Cholinergic modulation of epithelial integrity in the proximal colon of pigs*. Cells Tissues Organs, 2013. **197**(5): p. 411-20.
66. Khan, R.I., et al., *Activation of focal adhesion kinase via M1 muscarinic acetylcholine receptor is required in restitution of intestinal barrier function after epithelial injury*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1842**(4): p. 635-45.
67. Wang, H., et al., *Carbachol protects the intestinal barrier in severe acute pancreatitis by regulating Cdc42/F-actin cytoskeleton*. Exp Ther Med, 2020. **20**(3): p. 2828-2837.
68. Bao, C., et al., *Effect of carbachol on intestinal mucosal blood flow, activity of Na⁺-K⁺-ATPase, expression of aquaporin-1, and intestinal absorption rate during enteral resuscitation of burn shock in rats*. J Burn Care Res, 2010. **31**(1): p. 200-6.
69. Traeger, T., et al., *Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis*. J Vis Exp, 2010(46).
70. Zhang, L., et al., *Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) Induces Excessive Inflammation and Systemic Metabolic Dysfunction in a Septic Rat Model*. J Proteome Res, 2018. **17**(1): p. 680-688.
71. Lustig, M.K., et al., *Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes*. Shock, 2007. **28**(1): p. 59-64.
72. Schöneborn, S., et al., *Vasopressin V1A receptors mediate the stabilization of intestinal mucosal oxygenation during hypercapnia in septic rats*. Microvasc Res, 2016. **106**: p. 24-30.
73. Stübs, C.C., et al., *Acute, short-term hypercapnia improves microvascular oxygenation of the colon in an animal model of sepsis*. Microvasc Res, 2013. **90**: p. 180-6.
74. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
75. Kuznetsov, A.V., et al., *Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(5): p. H1633-41.
76. Haglund, U., et al., *Mucosal lesions in the human small intestine in shock*. Gut, 1975. **16**(12): p. 979-84.
77. Dressman, J.B., *Comparison of canine and human gastrointestinal physiology*. Pharm Res, 1986. **3**(3): p. 123-31.
78. Galanopoulos, G., et al., *The effects of iloprost on colonic anastomotic healing in rats under obstructive ileus conditions*. J Surg Res, 2014. **189**(1): p. 22-31.
79. Zantl, N., et al., *Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis*. Infect Immun, 1998. **66**(5): p. 2300-9.
80. Herminghaus, A., et al., *Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats*. Intensive Care Med Exp, 2019. **7**(1): p. 4.
81. Maier, S., et al., *Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis*. Shock, 2004. **21**(6): p. 505-11.
82. Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry, *Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal*. J Surg Res, 1980. **29**(2): p. 189-201.

83. Rittirsch, D., L.M. Hoesel, and P.A. Ward, *The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 137-43.
84. Mittal, A., et al., *Early organ-specific mitochondrial dysfunction of jejunum and lung found in rats with experimental acute pancreatitis*. HPB (Oxford), 2011. **13**(5): p. 332-41.
85. Kozlov, A.V., et al., *Effect of estrogen on mitochondrial function and intracellular stress markers in rat liver and kidney following trauma-hemorrhagic shock and prolonged hypotension*. Mol Med, 2010. **16**(7-8): p. 254-61.
86. Pecinová, A., et al., *Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates*. Mitochondrion, 2011. **11**(5): p. 722-8.
87. Azevedo, L.C., *Mitochondrial dysfunction during sepsis*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2010. **10**(3): p. 214-23.
88. Carré, J.E. and M. Singer, *Cellular energetic metabolism in sepsis: the need for a systems approach*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 763-71.
89. Brand, M.D. and D.G. Nicholls, *Assessing mitochondrial dysfunction in cells*. Biochem J, 2011. **435**(2): p. 297-312.
90. Okabe, K., P.S. Malchesky, and Y. Nose, *Protective effect of prostaglandin I₂ on hepatic mitochondrial function of the preserved rat liver*. Tohoku J Exp Med, 1986. **150**(4): p. 373-9.
91. Ferrari, R., et al., *Protective effect of a prostacyclin-mimetic on the ischaemic-reperfused rabbit myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 1988. **20**(12): p. 1095-106.
92. Kiefer, P., et al., *Hepato-splanchnic metabolic effects of the stable prostacyclin analogue iloprost in patients with septic shock*. Intensive Care Medicine, 2001. **27**(7): p. 1179-1186.
93. Lehmann, C., et al., *Effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, on intestinal leukocyte adherence and microvascular blood flow in rat experimental endotoxemia*. Critical Care Medicine, 2001. **29**: p. 1412-1416.
94. Tangsucharit, P., et al., *Muscarinic acetylcholine receptor M1 and M3 subtypes mediate acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric arteries*. J Pharmacol Sci, 2016. **130**(1): p. 24-32.
95. Takenaga, M., et al., *Calcitonin gene-related peptide mediates acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilation in mesenteric resistance blood vessels of the rat*. Circ Res, 1995. **76**(6): p. 935-41.
96. Colgan, S.P., E.L. Campbell, and D.J. Kominsky, *Hypoxia and Mucosal Inflammation*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 77-100.
97. Supinski, G.S., E.A. Schroder, and L.A. Callahan, *Mitochondria and Critical Illness*. Chest, 2020. **157**(2): p. 310-322.
98. De Backer, D., et al., *Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome*. Crit Care Med, 2013. **41**(3): p. 791-9.
99. Dumbarton, T.C., et al., *Tetrahydrobiopterin improves microcirculation in experimental sepsis*. Clin Hemorheol Microcirc, 2017. **67**(1): p. 15-24.
100. Truse, R., et al., *Topical Melatonin Improves Gastric Microcirculatory Oxygenation During Hemorrhagic Shock in Dogs but Does Not Alter Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers*. Front Med (Lausanne), 2020. **7**: p. 510.
101. Salzman, A.L., et al., *Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2BBE intestinal epithelial monolayers*. Am J Physiol, 1995. **268**(2 Pt 1): p. G361-73.

102. Zhou, L., et al., *Carbachol alleviates myocardial injury in septic rats through PI3K/AKT signaling pathway*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020. **24**(10): p. 5650-5658.
103. Gericke, A., et al., *Identification of the muscarinic acetylcholine receptor subtype mediating cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(10): p. 7479-84.
104. Vásquez-Vivar, J., et al., *The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study*. Biochem J, 2002. **362**(Pt 3): p. 733-9.
105. Hyndman, M.E., et al., *Interaction of 5-methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin on endothelial function*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2167-72.
106. Mittermayer, F., et al., *Tetrahydrobiopterin corrects Escherichia coli endotoxin-induced endothelial dysfunction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(4): p. H1752-7.
107. Wang, W.Z., et al., *Effects of supplementation of BH4 after prolonged ischemia in skeletal muscle*. Microsurgery, 2007. **27**(3): p. 200-5.
108. Tyml, K., F. Li, and J.X. Wilson, *Septic impairment of capillary blood flow requires nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase but not nitric oxide synthase and is rapidly reversed by ascorbate through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism*. Crit Care Med, 2008. **36**(8): p. 2355-62.
109. He, X., et al., *Administration of tetrahydrobiopterin improves the microcirculation and outcome in an ovine model of septic shock*. Crit Care Med, 2012. **40**(10): p. 2833-40.
110. Pham, T.H., et al., *Decreased conduit perfusion measured by spectroscopy is associated with anastomotic complications*. Ann Thorac Surg, 2011. **91**(2): p. 380-5.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Olaf Picker dafür bedanken, dass er mir unter seiner Leitung durch dieses Promotionsvorhaben einen Einstieg in die wissenschaftliche Tätigkeit ermöglicht hat.

Ein großer Dank geht an meine hervorragende wissenschaftliche Betreuerin Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus die durch ihren unermüdlichen Einsatz die Erstellung diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Vor allem den stetigen Austausch, die Diskussions- und Hilfsbereitschaft und ihre Zuverlässigkeit habe ich immer sehr geschätzt.

Auch bedanken möchte ich mich beim gesamten Team des Instituts für experimentelle Anästhesiologie für die spannende und lehrreiche Zeit. Speziell gilt dieser Dank Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer für die engagierte Begleitung während der Erstellung meiner Dissertation. Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Claudia Dohle und Birgitt Berke, die mir mit ihrem Wissen, ihrer Erfahrung und ihren Fertigkeiten im Laboralltag stets zur Seite standen. Danke auch an Claudia Hansen für die gute Zusammenarbeit und die zuverlässige Unterstützung beim tierexperimentellen Teil dieser Arbeit.

Von Herzen bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie für den bedingungslosen Rückhalt und die Geduld, mit der sie mich die gesamte Zeit über unentwegt unterstützt haben.

Zu guter Letzt bedanke ich mich ganz herzlich auch bei meiner Kollegin Dr. med. Jeanne Eitner-Pchalek für die stets gute und motivierende Zusammenarbeit in all der Zeit.