

Klinik für Anaesthesiologie  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. E. Kochs)

**Etablierung eines chronischen Sepsismodells in der Ratte  
unter besonderer Berücksichtigung der  
Azetylcholinrezeptoren**

Christiane Gabriele Frick

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. M. Blobner  
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 12.04.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 19.07.2006 angenommen.

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha_1$ -AGP:	$\alpha_1$ -saures Glykoprotein
$\alpha$ -BTX:	$\alpha$ -Bungarotoxin
AChR:	Azetylcholinrezeptor
BE:	Basenüberschuss (base excess)
CIM:	Critical Illness Myopathy
cpm:	count per minute
CIP:	Critical Illness Polyneuropathy
$d_i, i \in \{3,7,14\}$ :	Messgruppe Tag i
FiO <sub>2</sub> :	inspiratorischer Sauerstoffanteil
IL:	Interleukin
MAP:	mittlerer arterieller Blutdruck
N:	Newton
P <sub>0</sub> :	maximale tetanische Kontraktionskraft
P <sub>t</sub> :	maximale Einzelkontraktionskraft
p <sub>a</sub> O <sub>2</sub> :	arterieller Sauerstoffpartialdruck
p <sub>a</sub> CO <sub>2</sub> :	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
SAP:	systolischer arterieller Blutdruck
SIRS:	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TNF- $\alpha$ :	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TOF:	Train-of-Four
T <sub>4</sub> /T <sub>1</sub> :	TOF-Quotient

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	4
1.1 Sepsis.....	4
1.2 Definition der Sepsis .....	4
1.3 Pathogenese des septischen Krankheitsbildes .....	7
1.4 Neurologische Manifestationen der Sepsis .....	8
1.4.1 <i>Septische Enzephalopathie</i> .....	8
1.4.2 <i>Critical Illness Polyneuropathie</i> .....	9
1.5 Tiermodelle zur Sepsis .....	12
1.5.1 <i>Akutmodelle</i> .....	12
1.5.2 <i>Chronische Sepsismodelle</i> .....	13
1.6 Neuromuskuläre Übertragung .....	15
1.6.1 <i>Anatomische und physiologische Grundlagen</i> .....	15
1.6.2 <i>Der Azetylcholinrezeptor</i> .....	15
1.6.3 <i>Grundlagen der Rezeptorpharmakologie</i> .....	17
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b> .....	19
<b>3. Material und Methoden</b> .....	20
3.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen und Akklimation .....	20
3.2 Versuchsplan .....	20
3.3 Anästhesie zur Versuchsdurchführung.....	21
3.3.1 <i>Narkose</i> .....	21
3.3.2 <i>Beatmung</i> .....	22
3.3.3 <i>Monitoring</i> .....	22
3.4 Versuchsdurchführung.....	23
3.4.1 <i>Bakterieninjektion</i> .....	23
3.4.2 <i>Versuchsende</i> .....	23
3.5 Laborchemische Analysen.....	24
3.5.1 <i>Azetylcholinrezeptorassay</i> .....	24
3.5.2 <i>Chemilumineszenz Immunoassay</i> .....	24
3.6 Statistik .....	26
<b>4. Ergebnisse</b> .....	27
4.1 Allgemeine Mortalität.....	27
4.2 Allgemeine und spezielle Infektionsparameter .....	28
4.2.1 <i>Körpergewicht</i> .....	28
4.2.2 <i>Blutbild</i> .....	29
4.2.2.1 Leukozytenzahlen: .....	29
4.2.2.2. Thrombozytenzahlen.....	30
4.2.2.3. $\alpha_1$ -saures Glycoprotein.....	31
4.3 Muskelgewichte.....	32
4.4 Expression der Azetylcholinrezeptoren.....	33
<b>5. Diskussion</b> .....	34
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	39
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	41
<b>8. Danksagung</b> .....	46
<b>9. Lebenslauf</b> .....	47

# 1. Einleitung

## 1.1 Sepsis

Sepsis (griechisch für „Fäulnis“) bleibt trotz moderner Intensivmedizin ein häufiges Krankheitsbild. In den Vereinigten Staaten entwickeln jährlich ca. 500 000 Patienten ein septisches Krankheitsbild. Für die Behandlung müssen allein in den USA 16,7 Billionen US-Dollar kalkuliert werden. Obwohl die kontinuierlichen Fortschritte der modernen intensivmedizinischen Versorgung die Überlebenschancen septischer Patienten verbessert haben, liegt die Mortalitätsrate immer noch bei 30%-50% (Dellinger 2004; S.858-73, Lowry 1994, S.1-2; Riedemann 2003; S. 460; Riedemann 2003, S. 517).

## 1.2 Definition der Sepsis

Der Sepsisbegriff hat im Laufe der Jahre einen erheblichen Bedeutungswandel erfahren. Die verschiedenen Ausprägungen von systemischer Entzündungsreaktion bis hin zum septischen Multiorganversagen wurden 1991 im Rahmen einer Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians and der Society of Critical Care Medicine* folgendermaßen definiert.

➤ ***Bakteriämie***

Vorkommen lebensfähiger Bakterien im Blut; analog gilt für Viren (Virämie), Pilze (Fungämie) und Parasiten (Parasitämie).

➤ ***Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)***

Generalisierte hyperinflammatorische Reaktion verschiedener Ursachen (z. B. Infektion, Verbrennung, Trauma)

➤ ***Sepsis***

SIRS hervorgerufen durch eine Infektion

➤ ***Schwere Sepsis***

Sepsis mit Organdysfunktionen

➤ ***Septischer Schock***

Sepsis mit Schock

Darüber hinaus wurde von der Konsensuskonferenz ein Kriterienkatalog für die Diagnose der Sepsis erstellt und von der Arbeitsgruppe Sepsis der *European Society of Intensive Care Medicine* wie folgt modifiziert:

Eine **schwere Sepsis** liegt vor, wenn sämtliche folgenden drei Kriterien erfüllt sind:

- I. Nachweis eines infektiösen Ursprungs der Inflammation (mindestens eines der folgenden Kriterien):
  - mikrobiologisch gesicherte Infektion
  - klinisch gesicherte Infektion
  - vermutete Infektion
- II. Nachweis einer systemischen inflammatorischen Wirtsreaktion (SIRS) (mindestens zwei der folgenden Kriterien):
  - Hypo- (<36°C) oder Hyperthermie (>38°C)
  - Tachykardie (>90/min)
  - Tachypnoe (>20/min) und/oder arterieller pCO<sub>2</sub> <4,3kPa (33mmHg) und/oder Notwendigkeit einer maschinellen Beatmung
  - Leukozytose >12.000/μl oder Leukopenie <4.000/μl und/oder Linksverschiebung der Leukopoese >10% im Blutbild
- III. Infektionsbezogene Organdysfunktion (mindestens einer der folgenden Kriterien):
  - Akute Enzephalopathie (reduzierte Vigilanz, Unruhe, Desorientiertheit, Delir ohne Beeinflussung durch Psychotropika)
  - Thrombozytopenie (Thrombozyten <100.000/μl oder Thrombozytenabfall >30% in 24 Stunden ohne Blutverlust als Ursache)
  - Arterielle Hypoxämie (paO<sub>2</sub> <10kPa (75 mmHg) unter Raumluft, paO<sub>2</sub>/ FiO<sub>2</sub> <33kPa (250 mmHg) ohne manifeste pulmonale oder kardiale Erkrankung als Ursache).
  - Arterielle Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck <90 mmHg oder mittlerer arterieller Blutdruck <70mmHg über mindestens 1 Stunde trotz adäquater Volumenzufuhr bei Abwesenheit anderer Schockursachen)
  - Renale Dysfunktion (Urinausscheidung <0,5ml/kg/Std. über mindestens eine Stunde trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serum-Kreatitins)
  - Metabolische Azidose (Basendefizit >5,0Eq/l oder eine Plasma-Laktatkonzentration >1,5x oberhalb des Referenzbereichs des jeweiligen Labors).

Ein **septischer** Schock liegt vor, wenn sämtliche folgenden drei Kriterien erfüllt sind:

- I. Nachweis eines infektiösen Ursprungs der Inflammation
- II. Nachweis einer systemischen inflammatorischen Wirtsreaktion (SIRS)
- III. Nachweis einer arteriellen Hypotonie trotz adäquater Volumentherapie:  
Systolischer Blutdruck  $<90\text{mmHg}$  oder mittlerer arterieller Blutdruck  $<70\text{mmHg}$   
für mindestens 2 Std. bzw Einsatz von Vasopressoren erforderlich, um den  
systolischen Blutdruck  $>90\text{mmHg}$  oder den arteriellen Mitteldruck  $>70\text{mmHg}$  zu  
halten.

### 1.3 Pathogenese des septischen Krankheitsbildes

Im Rahmen eines SIRS werden humorale und zelluläre Abwehrmechanismen aktiviert.

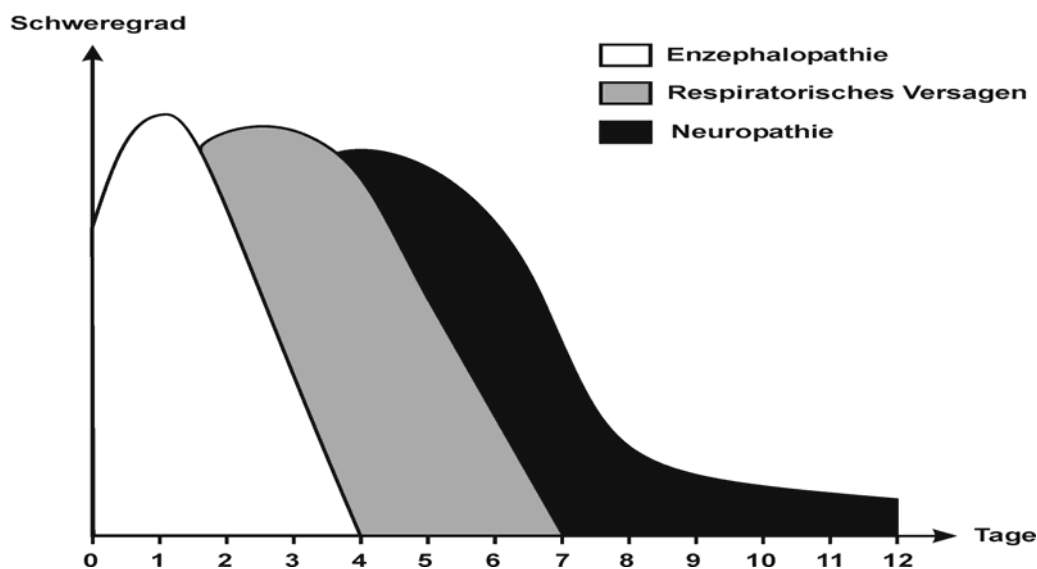
Die zelluläre Immunantwort führt zur Aktivierung epithelialer und endothelialer Zellen, sowie von Makrophagen und Neutrophilen. Dies induziert die humorale Immunantwort. Proinflammatorische Mediatoren wie Interleukin-1, -2, -6, Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ), Arachnidonsäure, Gerinnungsfaktoren, freie Sauerstoffradikale und Proteasen werden lokal aktiviert. Diese Mediatoren aktivieren metabolische Kaskaden, die über Aktivierung von Muskelproteasen mit Bereitstellung von Aminosäuren für die hepatische Gluconeogenese und Synthese der Akute-Phase-Proteine, z. B. das  $\alpha_1$ -saure Glykoprotein, in einen Katabolismus münden. Die Interaktionen zwischen zellulären und humoralen Faktoren führen zu Mikrozirkulationsstörungen und Funktionseinschränkung einzelner Organsysteme. Histologisch erkennbar sind Obstruktionen der Endstrombahn durch Leukozyten- und Thrombozytenaggregation. Durch die Überproduktion von Stickstoffmonoxid kommt es zur exzessiven Vasodilatation und zur verminderten Perfusion des Gewebes. Eine erhöhte Kapillarpermeabilität führt zur Ausbildung interstieller Ödeme und erleichtert toxischen Stoffen den Zugang zum Organparenchym. Essentielle Nährstoffe können das zu versorgende Gewebe nicht mehr erreichen

Abhängig von der Pathogenität des Erregers, der Immunlage des Patienten und seinen Vorerkrankungen kann es zu einer inadäquaten, exzessiven Ganzkörperentzündungsreaktion kommen (Neugebauer 1995, S.2-10). Die Abwehrsysteme mit toxischen Mediatorkonzentrationen richten sich gegen die körpereigenen Strukturen und verstärken sich im Sinne eines positiven Feedbacks. Gelingt es dem Organismus nicht diese überschießende Abwehrreaktion zu kontrollieren, kommt es zum Multiorganversagen, hypodynamen Schock bis hin zum Tod (Neugebauer, S.2-10).

## 1.4. Neurologische Manifestationen der Sepsis

70 % der Patienten mit schwerer Sepsis zeigen eine Beteiligung des Nervensystems (Bolton 1993, S. 58; Bolton 2005, S.141). Als neurologische Manifestationen der Sepsis wurden die septische Enzephalopathie und die Critical Illness Polyneuropathie beschrieben (Bolton 2005, S.143-145). Beide Krankheitsbilder zeigen einen typischen zeitlichen Verlauf im Rahmen des septischen Geschehens (siehe Abbildung 1).

**Abbildung 1: Neurologische Komplikationen der Sepsis**



### 1.4.1. Septische Enzephalopathie

In der Frühphase einer Sepsis kann sich die septische Enzephalopathie entwickeln. Darunter versteht man eine akute, reversible und generalisierte zerebrale Funktionsstörung, deren Symptomatik von einer leichten Bewusstseinstörung bis hin zum Koma variieren kann (Bolton 1996, S.1410; Bolton 2005, S.143). Eine spezifische Therapie gibt es nicht. Therapieziel ist daher generell die operative und/ oder antibiotische Fokussanierung, Erhaltung eines adäquaten Kreislaufes mit Volumen und ggf. Katecholaminen zur Verbesserung der Organ- und Gewebepfusion, sowie die Deckung des Energiebedarfs.



Nach erfolgreicher Therapie kommt es schnell zur einer Verbesserung des Gesundheitszustandes dieser Patienten (Bolton 1996, S.1411; Bolton 2005, S.143; Nauwynck and Huyghens 1998, S. 92-97).

#### 1.4.2 Critical Illness Polyneuropathie

Neben der Manifestation am zentralen Nervensystem kann es auch zu einer Beteiligung des peripheren Nervensystems im Sinne einer Critical Illness Polyneuropathie (CIP) kommen.

50-70% der Patienten mit SIRS weisen die elektrophysiologischen und klinischen Zeichen einer Critical Illness Polyneuropathie auf (Leijten 1995, S.1221-1225; Witt 1991, S.182). Die CIP ist charakterisiert durch eine akute, primäre axonale Degeneration der motorischen und sensiblen Nervenfasern (Hund 2001, S. 930). Sie wird begleitet von einer Atrophie der Skelettmuskulatur (Bolton 2005, S.144-146; Hund 2001, S.930). Die Mortalität von Intensivpatienten mit nachgewiesener CIP ist deutlich erhöht. Dies könnte zum einen in besonders schweren Verlaufsformen des septischen Krankheitsbildes bei Patienten mit CIP begründet sein, zum anderen verursacht die CIP einen prolongierten Krankheitsverlauf mit langfristiger Bettlägrigkeit, erschwerter Entwöhnung vom Beatmungsgerät und somit verzögerter Rehabilitation. Das Risiko konsekutiver Komplikationen wie Pneumonie oder Lungenembolie ist dadurch deutlich erhöht.

Die pathophysiologischen Grundlagen der CIP sind nur unzureichend geklärt. Faktoren, wie Immobilisation (Ibebunjo 1997, S. 443-451), Inflammation (Bolton 2005, S.154-155; Hund 2001, S. 931) sowie die Verabreichung gewisser Medikamenten sind bei jedem intensivmedizinischen Patienten vorhanden. Dies lässt eine ursächliche Beteiligung dieser Faktoren bei der CIP vermuten (Bolton 2005, S.154-155; Hund 2001, S.931).

Klinisches Leitsymptom der CIP ist eine generalisierte motorische Muskelschwäche. Weitere Symptome sind symmetrische, distal und proximal lokalisierte schlaffe Paresen. Diese

variieren von milden Beeinträchtigungsformen bis hin zu einer kompletten Quadriplegie. Bei Patienten mit einer inkompletten Lähmung der Extremitäten sind die motorischen Defizite distal ausgeprägter als proximal, in den unteren Extremitäten ausgeprägter als in den oberen Extremitäten (de Seze 2000, S.61-69).

Besonders die Atemhilfsmuskulatur und das Diaphragma sind von dieser Muskelschwäche betroffen. Daher fallen diese Patienten zunächst durch erschwertes Entwöhnen vom Beatmungsgerät auf. Die Muskeleigenreflexe sind meistens, wenn auch abgeschwächt, erhalten (Hund 2001, S.930). In 50% der Fälle werden sensorische Nerven ausfälle wie distal lokalisierte Störungen des Vibrationsempfindens bis hin zu Parästhesien von handschuh- oder strumpfförmiger Ausbreitung und eine Mitbeteiligung des N. phrenicus beobachtet (de Seze 2000, S.61-69).

Das Krankheitsbild der CIP wird auf Grundlage des klinischen Erscheinungsbildes, elektrophysiologischer Aufzeichnungen und histologischer Untersuchungen diagnostiziert. Nervenbiopsien zeigen eine primär axonale Degeneration motorischer und sensibler Fasern, welche bevorzugt den distalen Teil des Axons betreffen. Muskelbiopsien veranschaulichen die infolge der Degeneration resultierenden atrophischen Veränderungen (Hund 2001, S.930-931).

Eine spezielle Therapie der CIP steht derzeit nicht zur Verfügung (Berek 1996, S.849-855; De Jonghe 2002, S.2859-2867). Daher stehen nach Aufnahme auf die Intensivstation zunächst allgemeine Therapieprinzipien im Vordergrund wie die Stabilisierung des Herz-Kreislaufsystems, die chirurgische und antibiotische Infektsanierung und die kontinuierliche Überwachung des Patienten und seiner Organfunktionen. Da der Einfluss von Kortikosteroiden und Muskelrelaxanzien auf die Entstehung der CIP nur unzureichend geklärt ist, sollen diese Substanzen nur in der niedrigsten Konzentration und für möglichst kurze Zeiträume angewendet werden (Bolton 2005, S.147).

Patienten mit einer milden bis moderaten Polyneuropathie erholen sich oft schnell und vollständig, innerhalb von Wochen (Hund 2001, S.931). Patienten mit einer schweren Sepsis und einer längeren Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation zeigen eine langsame und inkomplette Erholung von der Symptomatik einer CIP, oft über Monate. 20% der Patienten bleiben mit einer motorischen Beeinträchtigung nach unvollständiger Erholung zurück (Nauwynck and Huyghens 1998, S.92-97). Nach einem Aufenthalt auf einer Intensivstation von 28 Tagen und mehr zeigen mehr als 90% der Patienten mit Critical Illness Polyneuropathie neuromuskuläre Defizite (Fletcher 2003, 1014-1016).

## 1.5 Tiermodelle zur Sepsis

### 1.5.1 Akutmodelle

Zur Erforschung der Sepsis und ihrer Langzeitveränderungen auf die verschiedenen Organsysteme wurden bisher mehrere Tiermodelle etabliert. Man unterscheidet zwischen akuten und chronischen Sepsismodellen.

#### **Zoekale Ligatur und Punktion**

Bei der zoekalen Ligatur und Punktion (CLP) wird ein Stück des Dickdarms (Caecum) der Ratte mit einem Faden unterbunden und mit einer Nadel mehrfach punktiert. So gelangen Darmbakterien in die Bauchhöhle und bewirken eine septische Peritonitis. Die Tiere versterben meist akut innerhalb von 24-48 Stunden an einem septischen Schock (Wichterman 1980, S.189-201). Durch Modifikation des Modells, mit einer nur einmaligen kleinen Punktion des Caecums, ist die septische Peritonitis weniger stark ausgeprägt, was die Mortalitätsrate deutlich senkt. Durch die individuellen Reaktionen des Wirtorganismus auf die Bakterien, ist eine Standardisierung der Ausprägung der Sepsis jedoch nicht möglich (Fried 1986, S.173-178).

#### **Kapselimplantation**

Bei diesem Modell wird eine definierte Dosis eines bekannten Bakterienstammes (z.B. E. coli) in einer Gelatine kapsel in die Bauchhöhle von Ratten implantiert. Die Kapsel löst sich sukzessive auf, wodurch die Bakterien freigesetzt werden.

Dies induziert eine Peritonitis mit nachfolgender Sepsis. Durch diese Methode ist zwar eine gewisse Standardisierung der Ausprägung der Sepsis zu erreichen, jedoch besteht weiterhin eine hohe Letalität innerhalb der ersten Stunden (Freund 1986, S.1154-1158).

## **Kontinuierliche Pumpinfusion**

Durch die kontinuierliche Infusion von lebenden Bakterien in die Bauchhöhle mittels einer osmotischen Pumpe wird eine Peritonitis ausgelöst. Bei diesem Modell ist eine gewisse Standardisierung der Sepsisausprägung möglich, jedoch zeigt der Gewichtsverlauf als Indikator für die Schwere der Sepsis keine signifikanten Unterschiede zwischen septischen und nicht-septischen Tieren, so dass scheinbar keine katabole Stoffwechsellage induziert werden kann (Peck and Alexander 1991, S.433-436).

### 1.5.2 Chronische Sepsismodelle

#### **Colon Ascendens Stent Peritonitis**

Als Sepsisherd wird eine Fistel im aufsteigenden Teil des Dickdarms (Colon ascendens) angelegt. Damit über einen längeren Zeitraum Darmbakterien in die Bauchhöhle austreten können, wird ein Stent, der die Fistel offenhält, in den Fistelkanal implantiert. Problem dieses Modells ist ebenfalls die Reproduzierbarkeit. Einige Tiere versterben innerhalb der ersten 48 Stunden im septischen Schock, andere hingegen zeigen keine klinischen Anzeichen eines schweren Krankheitsverlauf (Zantl 1998, S.2300-2309).

#### **Schwämmchenimplantation**

Ein im Unterhautfettgewebe implantiertes Schwämmchen wird täglich mit einer definierten Dosis zweier verschiedener Bakterienstämme beimpft. Daraus resultiert über die Dauer von drei Wochen ein stabiler Zustand einer hyperdynamen Sepsis. Bei der Erstbeschreibung dieses Modells konnten die Untersucher zwei unterschiedliche Sepsisverläufe beobachten. Ein Teil der Tiere nimmt nach anfänglichem Gewichtsverlust wieder an Gewicht zu, der andere Teil nimmt weiterhin kontinuierlich ab. Grund für die Gewichtsabnahme könnte eine mögliche Abzessbildung mit Abkapselung des Herdes sein. Die Kapsel verhindert eine

weitere Streuung der Bakterien und somit eine chronische Sepsis (Mela-Riker 1988, S.231-244). Erneut ist das Fehlen einer stabilen Reproduzierbarkeit der limitierende Faktor bei diesem Modell.

### **Bakterieninjektionen**

Bei diesem Modell werden lebende Bakterien in die Schwanzvene von Ratten injiziert. Dadurch wird ein septischer Zustand erzielt, der für 8-10 Tage anhält (Breuille 1999, S.1079-1085). Bis zu 10 Tagen nach Injektion können nach der Injektion können Bakterien im Gewebe nachgewiesen werden. Häufig bilden sich Abszesse in Niere und Hoden. Die definierte Bakterienkonzentration, welche verabreicht wird, gewährleistet eine gute Reproduzierbarkeit, allerdings entspricht eine einmalige Infektion nicht der intermittierenden Ausschüttung von Keimen, wie sie bei septischen Patienten zu sehen ist (Wichterman 1980, S.189-201).

## 1.6 Neuromuskuläre Übertragung

### 1.6.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

Die Axone der motorischen Vorderhornzellen teilen sich in unmittelbarer Nähe der Muskelzellen in mehrere nichtmyelinisierte Fasern. Das Ende dieser Fasern wird als präsynaptische Nervenendigung bezeichnet. Diese steckt in einer Einfaltung der Muskelmembran und bildet mit dieser die neuromuskuläre Endplatte.

Erreicht ein Nerven-Aktionspotential die präsynaptischen Nervenendigung, entleeren Vesikel Acetylcholin in den synaptischen Spalt. Acetylcholin diffundiert über den synaptischen Spalt und bindet an den postsynaptischen Acetylcholinrezeptoren (AChR). Dieses Rezeptorprotein enthält eine transmembranöse Ionophore, die sich nach Aktivierung durch Acetylcholin öffnet und durch den dadurch initiierten Ionenstrom ein postsynaptisches Aktionspotential auslöst.

### 1.6.2 Der Acetylcholinrezeptor

Die Familie der Acetylcholinrezeptoren (AChR) umfasst muskarinische und nikotinische Subtypen.

Muscarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) gehören der Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren an. Bei Säugetieren wurden bisher fünf verschiedene Subtypen des mAChR durch Klonierung identifiziert (M1-M5) (Bonner 1987, S.527). Alle muscarinischen Acetylcholinrezeptoren zeigen unterschiedliche pharmakologische und funktionelle Eigenschaften. Im zentralen Nervensystem sind muscarinische Rezeptoren in eine Vielzahl vegetativer, sensorischer und motorischer Prozesse involviert (Peralta 1987, S.3923).

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) spielen eine Hauptrolle bei der schnellen synaptischen Transmission, sowohl in den neuro-neuronalen als auch in den neuromuskulären Synapsen.

In der Frühphase der embryonalen Entwicklung, vor der Ausbildung neuromuskulärer Synapsen, exprimiert der Muskel entlang seiner gesamten Oberfläche sogenannte „juvenile“ oder „embryonal“ genannte nAChR. Der Rezeptor besteht aus Glykoproteinen, die nach aufsteigendem Molekulargewicht mit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  und  $\gamma$  benannt werden. Diese bilden im Verhältnis 2:1:1:1 den nAChR

Nach Ausbildung der neuromuskulären Synapse, kommt es zu einem Wechsel der Subtypen. Dieser als „adult“ oder „reif“ bezeichnete Subtyp enthält statt einer  $\gamma$ -Untereinheit eine  $\epsilon$ -Untereinheit. Zusätzlich zum Wechsel der Untereinheiten, gruppieren sich die Rezeptoren im Bereich der neuromuskulären Endplatte. Kommt es zu einer Abnahme neuronale Reize, wie zum Beispiel bei einer Denervierung, beginnt der Muskel erneut „juvenile“ Rezeptoren zu synthetisieren. Parallel dazu erfolgt eine erneute Ausbreitung der Rezeptoren über die gesamte Muskeleoberfläche. Weitere klinische Konstellationen, welche eine Hochregulation von nikotinischen AChR verursachen, sind Verbrennung (Martyn 1986, S.680; Pavlin 1988, S.696; Ward 1993, S.595), lang- andauernde Immobilisation (Ibebunjo 1997, S.443; Martyn 1992, S.831), sowie die chronische Gabe von Muskelrelaxantien (Martyn 1992, S.823).

Die Veränderung einer Untereinheit führt zu bedeutsamen physiologischen, pharmakologischen und metabolischen Unterschieden. Im Gegensatz zu den reifen nAChR mit einer metabolischen Halbwertszeit ca. 14 Tagen, weisen die embryonalen nAChR nur eine metabolische Halbwertszeit von weniger als 24 Stunden auf. Zusätzlich besitzen embryonale nAChR eine geringere Einzelkanalleitfähigkeit bei einer 2- 20-fach längeren mittleren Kanalöffnungszeit. Zur Depolarisation des embryonalen nAChR sind, verglichen mit dem adulten AChR, nur ein zehntel bis ein Hunderstel der Menge eines Agonisten wie Azetylcholin oder Succinylcholin nötig. Die Wirkung kompetitiver Antagonisten ist ebenfalls verändert. Zur Blockade embryonaler nAChR sind höhere Konzentrationen eines nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans (NDMR) nötig, man spricht daher auch von einer Resistenz gegenüber NDMR (Martyn 1992, S. 822-843).



„Juvenile“ Rezeptoren im junktionalen Bereich sollen aufgrund ihrer längeren Kanalöffnungszeit gegenüber „adulten“ Rezeptoren eine Verzögerung der neuromuskulären Transmission bewirken, ein Merkmal, welches mit dem klinischen Bild der Muskelschwäche vergesellschaftet sein soll (Ibebunjo and Martyn 1999, S. 276).

### 1.6.3 Grundlagen der Rezeptorpharmakologie

Eine Hochregulation der nAChR im Rahmen einer Infektion wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen spekulativ diskutiert (Blobner 1999, S.1001; Martyn 1992, S.833; Tomera 1996, S.63). Indirekte Hinweise dafür bestanden in Fallberichten, in denen Hyperkaliämien nach Succinylcholingabe beschrieben worden sind (Gronert 1999, S.320, Kohlschütter 1976, S.557). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Hochregulation der AChR und Sepsis konnte jedoch bisher nicht bewiesen werden, da die betroffenen Patienten zumeist eine multifaktorielle Krankheitsgeschichte mit Langzeitimmobilisation und Gabe verschiedener Medikamente zeigen.

Azetylcholin und andere nAChR-Agonisten binden an die  $\alpha$ -Untereinheit des nAChR. Eine Hochregulation hat eine Hypersensitivität von Agonisten zur Folge. Nicht nur bindet die gleiche Menge an Agonist nunmehr an mehr AChR, sondern die juvenilen AChR zeigen zusätzlich eine vermehrte Sensitivität gegenüber Agonisten. Praktisches Beispiel dafür ist eine durch Succinylcholin induzierte Hyperkaliämie, die bei entsprechendem Ausmaß der Hochregulierung von AChR einen lebensgefährlichen Grad annehmen kann (Gronert 1999, S.320, Kohlschütter 1976, S.557, Tobey 1970, S.359).

Im Gegensatz dazu steht die „Down-Regulation“, die Verminderung der Anzahl der Rezeptoren. Sie kann in Folge von chronischer Exposition gegenüber Agonisten, bei Myasthenia gravis und nach chronischer Inhibition der Azetylcholinesterase auftreten. Eine Reduktion der Anzahl der AChR-Rezeptoren ist verbunden mit einer Hyposensitivität der

Rezeptoren gegenüber Agonisten und einer Überempfindlichkeit gegenüber kompetitiven Antagonisten (Martyn 1992, S.823).

## **2. Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist ein neues, chronisches und klinisch relevantes Sepsismodell in der Ratte zu etablieren unter besonderer Berücksichtigung einer möglichen veränderten Expression der nAChR.

### **3 . Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere, Haltungsbedingungen und Akklimatisation**

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 209.1/ 211-2531-40/2000).

Zur Versuchsdurchführung werden 98 männliche, adulte Sprague Dawley Ratten (Stamm: CD, der Firma Charles River Deutschland, Niederlassung Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 250-350g verwendet.

Im Alter von 4 Wochen werden die ca. 180g schweren Tiere angeliefert und in Sechsergruppen eingesetzt. Nach zwei Wochen Akklimatisationszeit werden die Tiere in Einzelkäfige verteilt und in den Versuch aufgenommen.

Die Haltung erfolgt in einem klimatisierten Raum bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden. Lichtintensität, Luftwechsel, Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur werden überwacht und konstant gehalten. Futter (Altromin-Haltung 1324, Altromin GmbH, Lage) und Wasser in Trinkflaschen werden ad libitum angeboten.

#### **3.2 Versuchsplan**

Beginnend zwei Tage vor Versuchsbeginn bis zum Versuchsende werden die Tiere täglich gewogen.

Am Tag 0 werden die Tiere randomisiert zwei Versuchsgruppen zugeordnet: E. coli und NaCl. Die Tiere der E. coli-Gruppe (n=67) erhalten über einen in Vollnarkose gelegten zentralen Venenkatheter 500 µl einer Escherischia coli (E.coli) Bakteriensuspension, die  $3,2 \times 10^8$  Colony Forming Units (CFU) vom Serotyp 0153: KH erhält. Die Tiere der NaCl-Gruppe (n=31) erhalten 500 µl einer 0.9% Kochsalzlösung.

Die Gruppen werden weiter in die Subgruppen d3, d7 und d 14 unterteilt, entsprechend den Tagen nach Bakterieninjektion, an denen die Messungen durchgeführt werden. Diese

umfassen zum einen die Bestimmung Messung inflammatorischer Parameter im Blut als auch Quantifizierung der Expression der AChR im Muskel.

Im Rahmen der Versuchsdurchführung verstarben einige Tiere während der Narkoseeinleitung und der chirurgischen Präparation. Tiere mit respiratorischen, metabolischen und hämodynamischen Problemen wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Dadurch verringerten sich die Gruppen. Eine Versuchsauswertung erfolgte damit bei 26 Tieren der NaCl-Gruppe (davon 9 aus der Subgruppe d3, 7 aus der Subgruppe d7 und 10 aus der Subgruppe d14) und 33 Tiere der E. coli-Gruppe (davon 10 aus der Subgruppe d3, 13 aus der Subgruppe d7 und 10 aus der Subgruppe d14).

### 3.3 Anästhesie zur Versuchsdurchführung

#### 3.3.1 Narkose

Die Narkoseeinleitung erfolgt in einem gläsernen Standzylinder (25 cm hoch, Durchmesser 24 cm, mit gut verschießendem gläsernen Deckel), in dem sich eine mit dem volatilen Anästhetikum Sevofluran (SEVOrane® Sevofluran, Abbott GmbH, Wiesbaden) getränkte Zellstofflage befindet.

Durch das Einatmen des Anaesthetikums Sevofluran werden die Tiere narkotisiert. Nach Erreichen des Toleranzstadiums bei einer Atemfrequenz von ca. 50–60/ min wird die Ratte mit Hilfe eines modifizierten Kinderlaryngoskop unter direkter Sichtkontrolle endotracheal intubiert. Als Tubus fungiert eine angespitzte Venenkanüle (Cavafix Certo 12G, Fa. Braun AG, Melsungen).

Nach Intubation wird die Narkose mit einem Sauerstoff/ Lachgasgemisch im Verhältnis 1:2 unter Beimischung von 4-6% Sevofluran fortgeführt. Für die Platzierung des zentralen Venenkatheters ist die Inhalationsanästhesie ausreichend. Am eigentlichen Messtag (d3, d7 und d14) wird die Narkose nach einer zusätzlichen Kannülierung der V. jugularis externa mit Propofol (20-40mg/kg/h) und Fentanyl (4µg/kg/h) fortgesetzt.

### 3.3.2 Beatmung

Die Versuchstiere werden mit einer volumengesteuerten Beatmungspumpe (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Harvard Apparatus inc., South Natick, Massachusetts, USA) ventiliert. Bei diesem Respirator handelt es sich um ein halboffenes System ohne Rückatmung mit einer konstanten Frischgaszufuhr von etwa 2 l/min und einer Gasabsaugung. Mit Hilfe eines Atemgasmonitors (Capnomac, Fa.Datex, Helsinki, Finnland) werden die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von Sauerstoff, Kohlendioxid, Lachgas und Sevofluran sowie die Beatmungsfrequenz und der Beatmungsdruck überwacht.

### 3.3.3 Monitoring

Während der gesamten Dauer der Narkose findet eine intensive Überwachung der Versuchstiere statt. Dies erlaubt eine kontrollierte Narkoseführung und garantiert konstante Versuchsbedingungen.

Zur Ableitung des Elektrokardiogramms werden zwei Nadelelektroden am ventralen Brustkorb subkutan platziert. Anhand arterieller Blutgasanalysen werden Kohlendioxidpartialdruck ( $PCO_2$ ), Sauerstoffpartialdruck ( $PO_2$ ), Basenüberschuss (BE), pH und Bikarbonat ( $HCO_3$ ), sowie Elektrolyte, Hämoglobin, Met-Hämoglobin, Laktat und Glucose gemessen. Der arterielle Blutdruck wird kontinuierlich über einen Katheter in der A. carotis gemessen. Zu niedrige Werte werden als Volumenmangel gedeutet, der gegebenenfalls mit Hydroxyethylstärke (HAES steril 6%, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61346 Bad Homburg) ausgeglichen wird. Erhöhte Blutdruckwerte und Herzfrequenzen werden als Stress interpretiert und die Narkose vertieft. Die rektale Temperatur wurde unter zu Hilfenahme einer Wärmedecke und einer Heizlampe zwischen  $36,8^{\circ}C$  und  $37,2^{\circ}C$  konstant gehalten.

## 3.4 Versuchsdurchführung

### 3.4.1 Bakterieninjektion

Nach endotrachealer Intubation wird in Inhalationsnarkose die linke V. jugularis externa in Rückenlage präpariert und kanuliert (Intramedic, Non-Radiopaque, Polyethylene Tubing, Clay Adams, Parsipanny, New Jersey 07054, USA).

Vor Injektion der Keime wird zunächst 200µl Blut entnommen, um Hämoglobin sowie die Anzahl der Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten zu bestimmen. Nach Injektion der E.coli Suspension bzw. 0,9% NaCl-Lösung wird der Katheter mittels Ligatur in der Vene befestigt, das überstehende Ende subkutan belassen und die Haut über der Inzision verschlossen.

Nach Ausleiten der Inhalationsnarkose und gesicherter suffizienter Spontanatmung werden die Versuchstiere extubiert und im Anschluss für weitere drei Stunden überwacht.

### 3.4.2 Messtag

Nach 3, 7 bzw. 14 Tagen nach Bakterien-/ NaCl-Injektion wird die Ratte bei eröffneter Bauchhöhle in tiefer Narkose durch Punktion der Aorta abdominalis entblutet und getötet. 200µl Vollblut werden zur erneuten Blutbildbestimmung entnommen. Das restliche Blut wird bei 4°C für 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen/ pro min zentrifugiert (Varifuge 3.OR, Heraeus, Sepatech). Das gewonnene Serum wird für die weiteren Untersuchungen bei -70°C eingefroren.

Die Mm. tibialis crainalis, gastrognemius und soleus werden entnommen, gewogen, in vorgekühltem Isopentan gefroren und anschließend für weitere Untersuchungen (AChR, Histologie) bei -70°C aufbewahrt.

## 3.5 Laborchemische Analysen

### 3.5.1 Chemilumineszenz Immunoassay

Die  $\alpha_1$ -saure Glykoprotein ( $\alpha_1$ -AGP) Spiegel als Inflammationsparameter im Serum wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Peter Lupp, Institut für Klinische Chemie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München, anhand eines sensitiven Chemilumineszenz Immunoassay bestimmt. Der Assay basiert auf einem Antigen Capture Assay mit biotinyliertem Ratten  $\alpha_1$ -AGP als Tracer (Metzger 2001, S.514).

### 3.5.2 Azetylcholinrezeptorassay

Die Oberflächenexpression der Azetylcholinrezeptoren wurde mittels  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ Bungarotoxin ( $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ BTX) Bindung quantifiziert (Ibebunjo and Martyn 1999, S.275).  $\alpha$ BTX (Molekulargewicht [MW] = 8000), ein Extrakt aus dem Kobragift, ist ein spezifischer Ligand des Azetylcholinrezeptors, der irreversibel an den Rezeptor bindet. Durch Konjugation des  $\alpha$ BTX mit einem geeigneten Marker, wie z.B.  $^{125}\text{I}$ , lässt sich die Menge der Azetylcholinrezeptoren indirekt über die Messung der  $\gamma$ -Emission quantifizieren.

Die gefrorenen Gastrocnemius Muskeln wurden auf Eis getaut und bei 4°C in einem 0,01 M Kaliumphosphatpuffer homogenisiert (pH 7,4, versetzt mit den Proteaseinhibitoren EDTA [1mM], Phenylmethylsulfonylfluorid [0,1M], Benzamidinhydrochlorid [2mM], 0,5 mg/ml Bacitracin und dem bakteriziden Wirkstoff Natriumazid [0,02%]). Das Homogenat wurde mit 20.000-facher Erdanziehungskraft bei 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Die durch das Zentrifugen entstandenen Präzipitate wurden erneut in dem Kaliumphosphatpuffer suspendiert. Zusätzlich enthielt der Puffer bei diesem Schritt 2% (v/v) Triton X-100 - einem Detergens mit der Eigenschaft Membranproteine, unter anderem die Azetylcholinrezeptoren, aus der Zellmembran zu lösen (alle Chemikalien von Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Die Suspension wurde über Nacht bei 4°C auf einer



Rotationsplattform inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension mit 20.000-facher Erdanziehungskraft gelösten Azetylcholinrezeptor wurde abpipettiert. Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Bio-Rad DC-Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bestimmt. Die  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$  BTX Bindung an die gelösten Azetylcholinrezeptoren wurde in ein einem dreifach Ansatz aus dem Extrakt analysiert. In drei Reagenzgläsern wurden je 100  $\mu\text{l}$  Muskelextrakt mit 2.5 nM  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$  BTX (spezifische Aktivität  $\sim 16,8 \mu\text{Ci} \mu\text{g}^{-1}$ , NEN, Boston, MA) bei Zimmertemperatur für 90 min inkubiert. Überschüssiges, nichtgebundenes  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ BTX wurde von  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$  BTX-Azetylcholinrezeptorkomplexen mittels Vakuumfiltration durch Whatman GF/B Glasfaserfilter, getränkt in 10%iger Polyethylenimin Lösung, getrennt. Um Bindung von  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ BTX an andere Proteinen neben den Azetylcholinrezeptoren zu bestimmen, musste die sogenannte „unspezifische Bindung“ zusätzlich bestimmt werden. Dies wurde ebenfalls in einem 3-fach Ansatz durchgeführt. Vor der Inkubation mit  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$  BTX wurden je 100 $\mu\text{l}$  Muskelextrakt mit nicht-radioaktivem  $\alpha$ BTX versetzt. Das nicht radioaktiv markierte BTX bindet an den Azetylcholinrezeptor ohne dabei später ein radioaktives Signal abzugeben. Die erst nachträglich hinzugefügte radioaktive  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ BTX Lösung bindet somit nur an nicht Azetylcholin spezifische (unspezifische) Bindungsstellen. Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Gammazähler in counts pro Minute (cpm) gemessen. Aus den einzelnen cpm wurde der Mittelwert der jeweiligen 3-fach Ansätze (spezifische und unspezifische) berechnet.

Die Menge der Azetylcholinrezeptoren wurde aus dem Molekulargewicht, der spezifischen Aktivität des  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ BTX und den cpm anhand folgender Schritte berechnet:

1. Molare Konzentration von  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ BTX:

$$\text{Konzentration } ^{125}\text{I}-\alpha\text{BTX [M]} = \frac{\text{Gesamtaktivität } [\mu\text{Ci}]}{(\text{Spezifische Aktivität } [\mu\text{Ci}/\mu\text{g}] \times (\text{MW} = 8000) \times 10^6)}$$

## 2. Korrektur für radioaktiven Zerfall:

Gesamtaktivität [ $\mu\text{Ci}$ ]  $\times$  Zerfallsfaktor (aus Tabelle) = Gesamtaktivität<sub>Zerfall</sub> [ $\mu\text{Ci}$ ]

## 3. Berechnung des decay pro min (Zerfall pro min = DPM) Äquivalents:

$$\text{DPM Äquivalent} = \frac{\text{Konzentration } ^{125}\text{I-}\alpha\text{BTX [M]}}{(\text{Gesamtaktivität}_{\text{Zerfall}} [\mu\text{Ci}] \times 2,22 \times 10^6) \times 10^{-15}}$$

Anmerkungen:  $1 \mu\text{Ci} = 2,22 \times 10^6$  (Konstante)  
Division mit  $10^{-15}$  konvertiert das Ergebnis von mol zu fmol

## 4. Konzentration der AChR in 100 $\mu\text{l}$ Muskelextrakt:

cpm (spezifisch – unspezifisch)  $\times$  DPM Äquivalent = AChR [fmol/100 $\mu\text{l}$  Extrakt]

## 5. Expression der AChR:

$$\text{AChR Expression [fmol/mg Protein]} = \frac{\text{AChR [fmol/100}\mu\text{l Extrakt]}}{\text{Proteinkonzentration [mg/100}\mu\text{l]}} \times 10$$

## 3.6 Statistik

Die Variablen wurden mit einer faktoriellen ANOVA geprüft. Als Faktoren gingen die Zeit nach der Infektion der Tiere, mit den Ausprägungen 3 Tage, 7 Tage und 14 Tage, sowie der Faktor Infektion, mit den Ausprägungen NaCl und E. coli, ein. Post-hoc wurden an jedem Zeitpunkt die Werte zwischen E. coli und NaCl mit dem t-Test geprüft. Dargestellt werden die Mittelwerte und die Standardabweichung der einzelnen Variablen. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 11.5.1. für Windows (SPSS 11.5.1., SPSS GmbH Software, München, Deutschland). Statistische Signifikanz wurde bei einem  $p < 0,05$  angenommen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Allgemeine Mortalität**

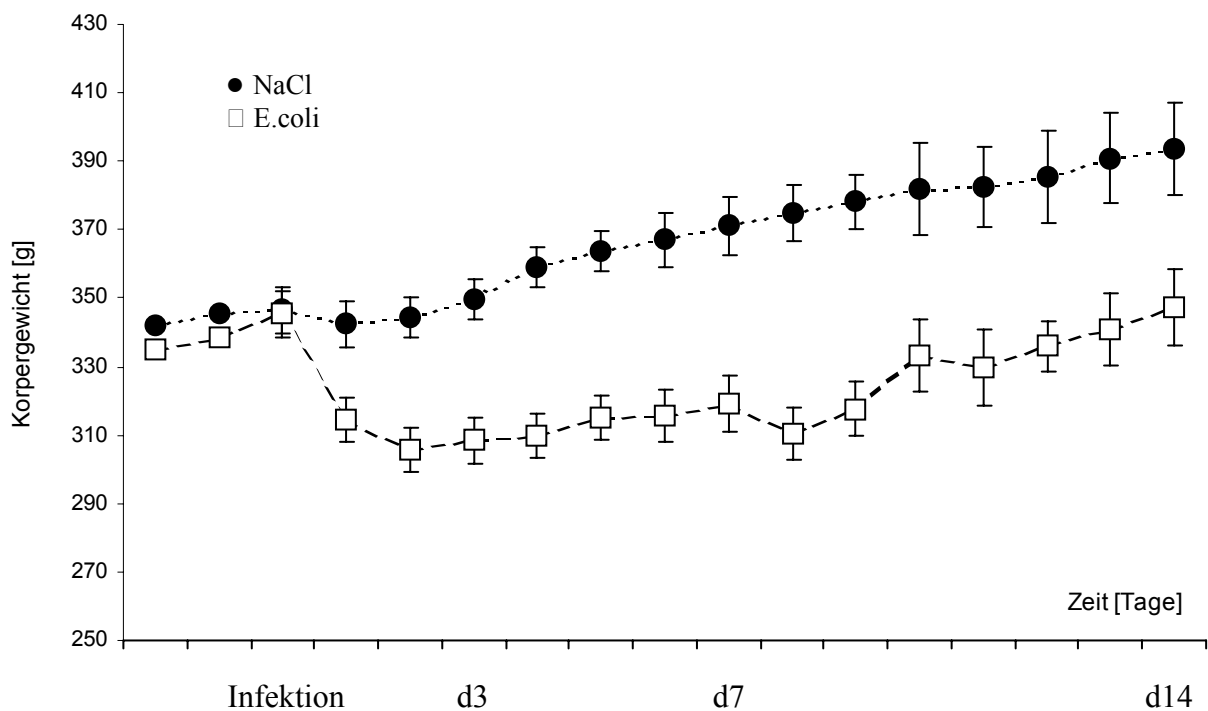
In der NaCl-Gruppe starben 5 Versuchstiere. In der Gruppe E.coli starben 34 Tiere. Insgesamt wurden 59 überlebende Tiere in die Versuchsauswertung eingeschlossen, 33 Tiere aus der Gruppe E.coli und 26 Tiere aus der Kontrollgruppe.

## 4.2. Allgemeine und spezielle Infektionsparameter

### 4.2.1 Körpergewicht

An den Tagen vor der NaCl/ E. coli Injektion bzw. am Tag der eigentlichen Injektion bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des Körpergewichtes. Beginnend am Tag 1 nach Injektion der bakteriellen Keime zeigten die Tiere der Gruppe E.coli einen ausgeprägteren Gewichtsverlust als Tiere der Gruppe NaCl. Beginnend mit Tag 1 nach Injektion war das Gewicht der E. coli Gruppe zu allen Messzeitpunkten signifikant geringer als das der entsprechenden NaCl-Gruppe (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1:



## 4.2.2 Blutbild

### 4.2.2.1 Leukozyten:

Keine der NaCl Gruppen zeigte am jeweiligen Messtag einen Anstieg der Leukozyten verglichen mit Werten vor der NaCl-Injektion. Die Tiere der Gruppe E.coli zeigten am Messtag d3 eine signifikante Leukozytose verglichen mit den Werten vor Injektion der Bakteriensuspension. In den Gruppen d7 und d14 konnte kein signifikanter Effekt der E. coli Injektion auf die Leukozytenexpression festgestellt werden (siehe Abbildung 2a und b).

Abbildung 2a: **Leukozyten vor E.coli/ NaCl Injektion [G/l]**

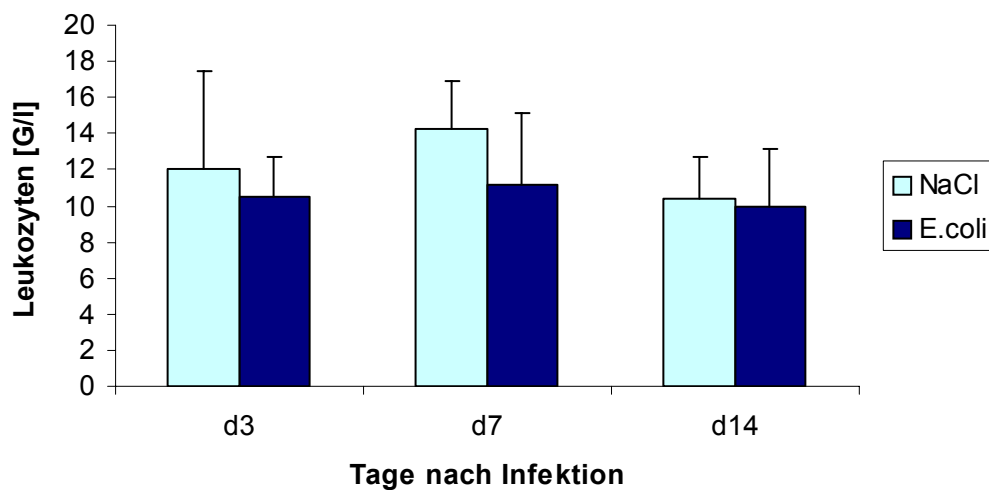
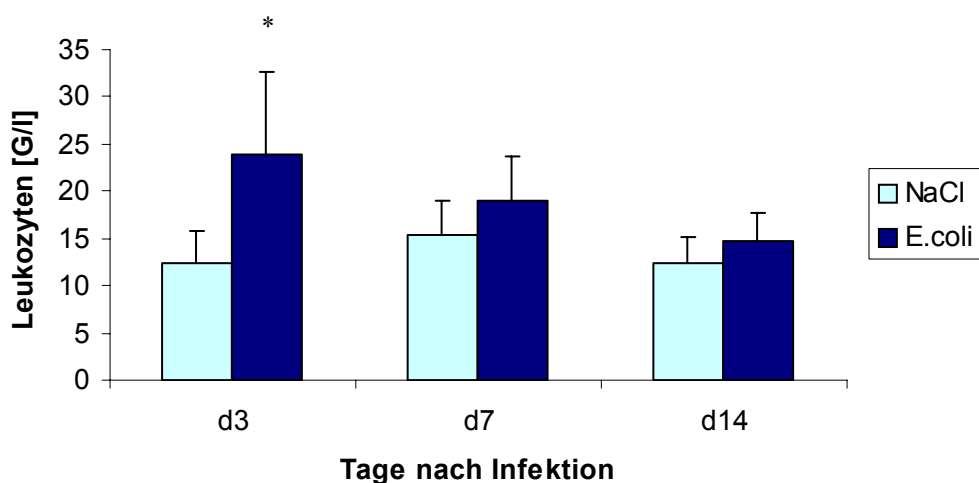


Abbildung 2b: **Leukozyten nach E.coli/ NaCl Injektion [G/l]**



#### 4.2.2.2. Thrombozyten

Keine der NaCl Gruppen zeigte am Messtag eine Veränderung der Thrombozytenzahlen verglichen mit Werten vor der NaCl-Injektion. Die Tiere der Gruppe E.coli zeigten am Messtag d3 eine signifikante Thrombozytopenie verglichen mit den Werten vor Injektion der Bakteriensuspension. In den Gruppen d7 und d14 konnte kein signifikanter Effekt der E.coli Injektion auf die Thrombozytenexpression festgestellt werden (siehe Abbildung 3 a und b).

Abbildung 3a: **Thrombozyten vor E.coli/ NaCl-Injektion [G/l]**

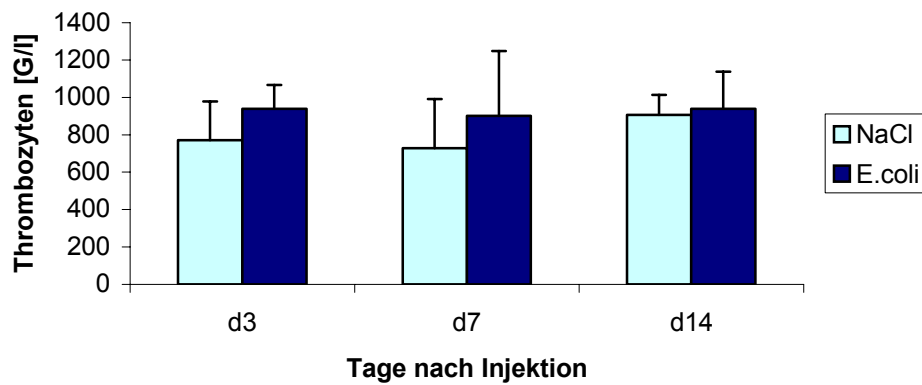
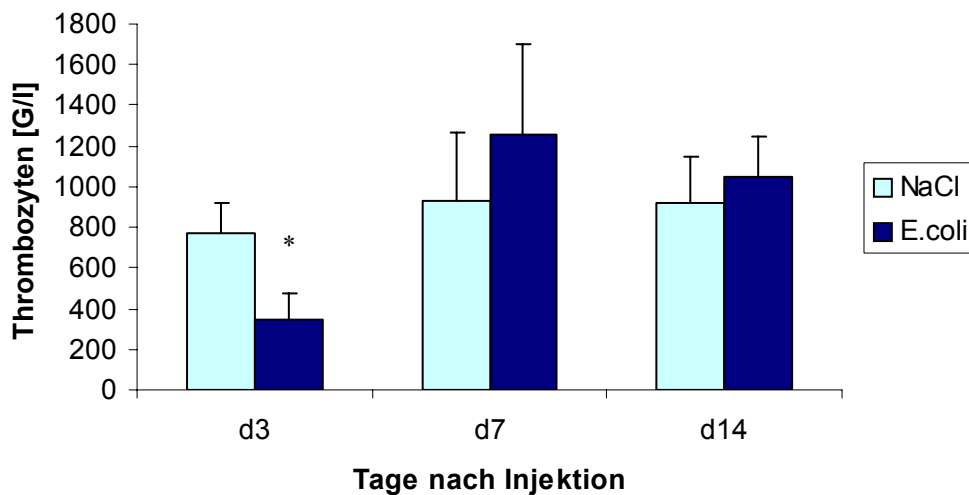


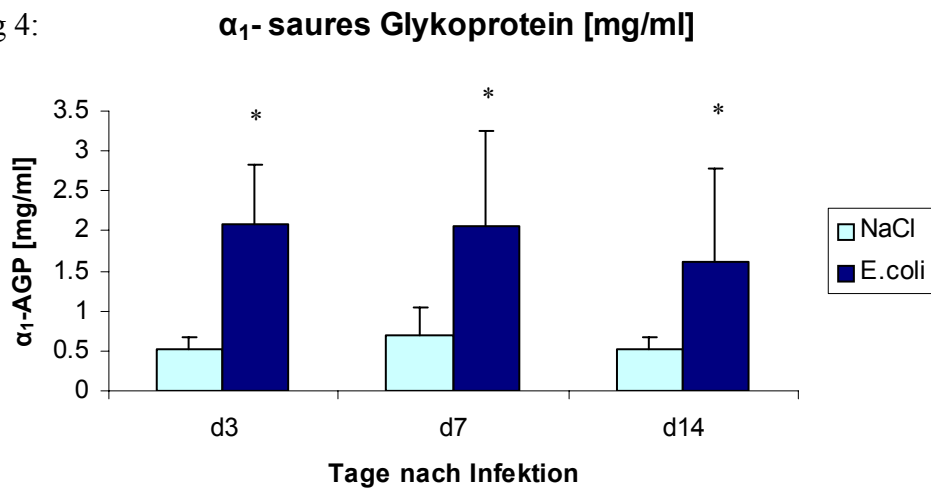
Abbildung 3b: **Thrombozyten nach E.coli/ NaCl injektion [G/l]**



#### 4.2.2.3. $\alpha_1$ -saures Glykoprotein

In der Gruppe E. coli waren die  $\alpha_1$ -AGP Spiegel im Vergleich zur NaCl- Gruppe an den Tagen 3, 7 und 14 signifikant erhöht (siehe Abbildung 4).

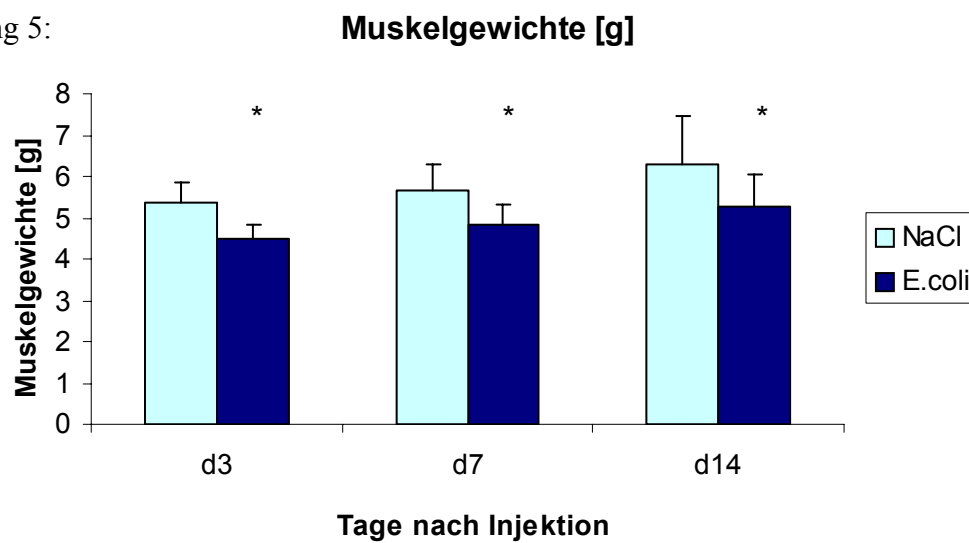
Abbildung 4:



### 4.3 Muskelgewichte

Das Gesamtgewicht der drei entnommenen Muskeln (M.tibialis cranialis, M.soleus und M.gastrocnemius), war bei den Tieren der Gruppe E. coli an den Tagen 3, 7 und 14 signifikant gegenüber den NaCl-Tieren erniedrigt (siehe Abbildung 5).

Abbildung 5:

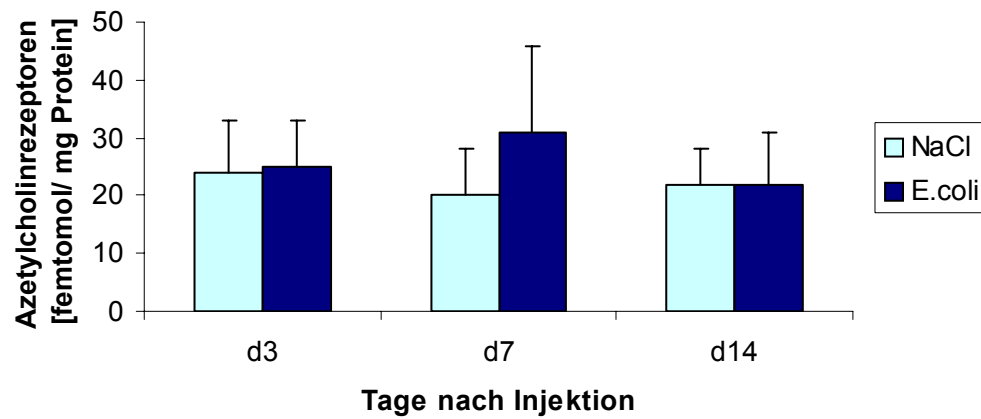




#### 4.4 Expression der Azetylcholinrezeptoren

Die Expression der Acetylcholinrezeptoren auf der Muskeloberfläche unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6: **Expression der Azetylcholinrezeptoren  
[femtomol/mg Protein]**



## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Etablierung eines neuen chronischen, klinisch relevanten Sepsismodells. Neben einem allgemeinen Katabolismus mit signifikant erniedrigten Muskelgewichten konnte ein Anstieg des Akute-Phase-Proteins  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein, sowie ein vorübergehender Anstieg der Leukozyten und Abfall der Thrombozyten nachgewiesen werden. Es kam jedoch zu keinem signifikanten Effekt auf die Expression der Azetylcholinrezeptoren.

Die komplexen pathophysiologischen Prozesse der Sepsis und ihrer neuromuskulären Manifestationen sind trotz intensiver Forschung bis heute nicht restlos aufgeklärt. Sepsis mit ihren Begleiterscheinungen führt zu einer großen Breite an hämodynamischen und metabolischen Veränderungen, die über Wochen den Organismus des septisch kranken Patienten beeinflussen. Ziel unserer Experimente ist daher es ein Sepsismodell zu etablieren, welches die pathophysiologischen Prozesse einer systemischen Infektion imitiert und somit langfristige Beobachtung des septischen Krankheitsgeschehen und dessen neurologischen Manifestationen erlaubt. Vorhergehende tierexperimentelle Untersuchungen haben versucht entsprechende Sepsismodelle zu etablieren (Breuille 1999, S.1079-1085; Freund 1986, S.1154-1158; Fried 1986, S.173-178; Lang 1983, S.201-210; Martineau and Shek 1996, S. 446-454; Mela-Riker 1988, S. 231-244; Peck and Alexander 1991, S.433-436; Wichterman 1980, S.189-201; Zantl 1998, S. 2300-2309). Diese zeigen klinische Zeichen einer Sepsis sowie einen akuten Gewichtsverlust. Eine langfristige Beobachtung des septischen Geschehens (bis zu 10 Tagen) ist mit Hilfe dieser Sepsismodelle nicht möglich, da sie keinen chronischen Krankheitsverlauf induzieren oder die Mehrheit der Tiere in den ersten 24–48 Stunden im septischen Schock verstirbt. Peritonitismodelle verursachen im Allgemeinen einen akuten Gewichtsverlust innerhalb der ersten 1-2 Tage und zeigen eine hohe Letalität innerhalb der ersten Stunden (Wichterman 1980, S.189). Endotoxinmodelle zeigen geringere Mortalitätsraten, oft erholen sich die Tiere jedoch zu schnell. Nach wiederholter Gabe oder

kontinuierlicher Infusion von Endotoxin entwickeln zudem viele Versuchstiere eine Endotoxinresistenz (Breuille 1999, S.1083). Breuille et al konnten zeigen, dass Ratten, denen einmalig  $2,5 \times 10^8$  lebende E.coli in die Schwanzvene injiziert wurde, sich über eine Zeit von 8-10 Tagen in einer katabolen Stoffwechsellage befinden. Kein Versuchstier war nach Injektion dieser Dosis verstorben (Breuille 1999, S.1081).

Das in der vorliegenden Studie angewendete Tiermodell stellt eine Modifikation des von Breuille beschriebenen Sepsismodells. Über einen in der V. jugularis liegenden Katheter wurde das klinische Erscheinungsbild einer Kathetersepsis simuliert, wie es im klinischen Alltag auf der Intensivstation auftritt. Der Vorteil dieses Modells sollte auf Grund des chronisch streuenden intravasalen Herdes eine deutlich länger anhaltende Sepsis mit konstanten Entzündungsverläufen sein.

Das klinische Bild der Sepsis wird entscheidend von einem Verlust an Körpergewicht und Muskelmasse geprägt (Breuille 1999, S.1083; Cooney 1997, S.1). In unseren Untersuchungen zeigten Versuchstiere der Gruppe E.coli in den ersten drei Tagen einen deutlichen Gewichtsverlust im Vergleich zur NaCl-Gruppe. Ab dem 3. Tag kam es zu einer zögerlichen Erholung mit einer Stabilisierung des Körpergewichtes, ab dem 9.Tag nahmen die E.coli Tiere wieder in kontinuierlichem Maße zu. Das Körpergewicht der E. coli Gruppe war zu allen Messzeitpunkten signifikant geringer als das der entsprechenden NaCl-Gruppe. Voisin et al. konnten ähnliche Ergebnisse erzielen. Sie teilten dabei den zeitlichen Verlauf des Gewichtsverlustes in eine akute, chronische und späte Phase auf. In der *akuten Phase* der Inflammation/ Infektion kommt es innerhalb ersten 3-4 Tagen zu einem initialen Gewichtsverlust und Muskelatrophie. Hypermetabolische, hyperdynamische Veränderungen prägen die zweite Phase. Das Körpergewicht stabilisiert sich im weiteren Verlauf über 4-8 Tage, während die Atrophie weiter fortschreitet (*chronische Phase*). Die Erholung des Körpergewichtes beginnt an den Tagen 8-10 postinfectionem (*späte Phase*), die Muskelmasse blieb jedoch gegenüber den Kontrolltieren weiter vermindert (Breuille 1999, S.1081, Voisin

1996, S.1610). Das Erreichen des Ausgangskörpergewichtes dient bei den Versuchen von Breuille et al. als Indikator für die Dauer der Erkrankung. Betrachtet man alleinig den Körpergewichtsverlauf in unseren Untersuchungen, so führt die Injektion von E.coli über einen nach der Injektion liegen bleibenden Jugulariskatheter zu einer ähnlich langandauernden Sepsisausprägung wie eine direkte Injektion der Erreger in die Schwanzvene. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine Obliteration der V. jugularis mit einer Abkapselung des Sepsisherdes sein.

Das Muskelgewicht war im Gegensatz zum Körpergewicht an allen Messzeitpunkten signifikant erniedrigt. Grund dafür ist am ehesten eine gesteigerte Proteolyse. Je schwerer die Sepsis, desto ausgeprägter die Proteolyse. Der ausgeprägte Proteinverlust während einer Infektion kann jedoch neben einer gesteigerten Proteolyse (Clowes 1983, S.545; Hasselgren, 1986, S.918), auch auf eine verminderte Proteinsynthese zurückzuführen sein ( Rennie 1983, S.387; Rennie 1985, S.257; Vary and Kimball 1992, S.1513). So beschreiben Vary et al. bei einem Sepsisverlauf von 5-7 Tagen einen Verlust von 25-35% an Muskelmasse verbunden mit einer 40-50%igen Inhibition der muskulären Proteinsynthese am Tag 6 (Vary and Kimball 1992, S.445; Vary and Kimball 1992, S.1513; Vary 1988, S.981). Zurückzuführen sind diese Auswirkungen auf komplexe Interaktionen von Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6) und Hormonen (Insulin, Wachstumshormone und insulin-like growth factor) (Bolton 2005, S.141).

Leukozytose und Thrombozytopenie sind Bestandteile der Definition eines SIRS. In unseren Untersuchungen, zeigten die Tiere der Gruppe E.coli am 3. Tag nach Injektion der Keime im Blutbild eine signifikante Leukozytose sowie eine signifikante Thrombozytopenie im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe. In den Gruppen d7 und d14 konnte kein signifikanter Effekt der E. coli Injektion auf die Leukozytenexpression und Thrombozytenzahlen festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Ausprägung der Sepsis über den Untersuchungszeitraum abnimmt.

Die Bildung von Akut-Phase-Proteinen, wie zum Beispiel  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein, ist ein weiteres wichtiges Merkmal einer systemischen Inflammationreaktion. Sämtliche Erkrankungen mit einer Beteiligung des Immunsystems wie Verbrennung, Karzinome, chronische Inflammation und Sepsis können zu einer Erhöhung der Akut-Phase Proteine und somit auch das  $\alpha_1$ -AGP führen (Martyn 1984, S.537; Paxton 1983, S.646). In dem hier präsentierten Infektionsmodell können wir persistierend hohe  $\alpha_1$ -saure Glykoprotein-Plasmaspiegel über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen demonstrieren. So konnten in anderen Untersuchungen an Ratten nach einmaliger Injektion von E.coli ein signifikanter Anstieg von akute Phase-Proteinen auch noch an 6 Tagen nach Infektion nachgewiesen werden (Breuille 1999, S.1084). In eigenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten wir nach einmaliger Injektion von Corynebakterium parvum einen Gipfel der  $\alpha_1$ -saure Glykoprotein-Plasmaspiegel nach 4-8 Tagen beobachten. Die hervorgerufene Inflammation war jedoch selbst-limitierend und die  $\alpha_1$ -AGP Plasmaspiegel erreichten nach 12 Tagen wieder Normwerte. Um Aminosäuren für die Bildung der Akut-Phase-Proteine bereitzustellen, kommt es im Rahmen einer systemischen Inflammation zu einem generalisierten Hypermetabolismus. Dies führt zu einer katabolen Stoffwechsellage mit negativer Proteinbilanz. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die Versuchstiere über den gesamten Beobachtungszeitraum einen prolongierten Krankheitsverlauf mit konstantem Entzündungsverlauf zeigen.

Neben den gravierenden Auswirkungen einer Inflammation auf den Proteinmetabolismus im Muskel sind ebenfalls Auswirkungen auf die Expression von Oberflächenproteinen beschrieben worden. Im Bereich der neuromuskulären Endplatte ist dabei eine Veränderung der Expression der AChR von Bedeutung (Blobner 1999, S.1001; Martyn 1992, S.833; Tomera 1996, S.63-72). Dies ist klinisch relevant, da eine vermehrte Expression von AChRs zum einen mit Muskelschwäche assoziiert sein kann (Ibebunjo and Martyn 1999, S.276), zum anderen die Gabe des depolarisierenden Muskelrelaxans Succinylcholin zu hyperkalämischen

Herz-Kreislauf-Stillstand führen kann (Gronert 1999, S.320; Kohlschütter 1976, S.557). In einzelnen Fallberichten wurde eine vermehrte Oberflächenexpression im Rahmen einer systemischen Inflammation bereits vermutet (Blobner 1999, S.1001; Martyn 1992, S.833; Tomera 1996, S.63-72). Gesichert ist eine Hochregulation der AChR bei Verbrennungen, Denervierung, chronischer Gabe von Muskelrelaxantien und langdauernde Immobilisation (Martyn 1992, S.823). Im Gegensatz dazu beobachteten Tsukagoshi et al. eine Verminderung der Expression der AChR in einem Rattenmodell der zökalen Ligatur (Tsukagoshi 1999, S.448). Eine Verminderung der Rezeptorzahl kommt einem myasthenischen Syndrom gleich und resultiert in einer verminderten Muskelkraft. In unserem Modell konnte kein Effekt der E.coli induzierten Inflammation auf die Expression der AChR nachgewiesen werden. Dennoch bleibt die Frage offen, ob eine längeranhaltende Infektion quantitative und/ oder qualitative Veränderungen induzieren könnte. Dodson konnte in postmortalen Muskelbiopsien einer erhöhte Anzahl von Azetylcholinrezeptoren direkt nachweisen (Dodson 1995, S.815-821). Nachteil dieser Untersuchungen ist jedoch, dass alle Patienten auf Grund der langandauernden Intensivtherapie eine multifaktorielle Krankheitsgeschichte mit zusätzlicher Immobilisation und Medikamentengabe zeigen. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Hochregulation der AChR und Sepsis konnte nicht bewiesen werden, da die Effekte einer Inflammation gegenüber den Einflussfaktoren Immobilisation und Gabe von Muskelrelaxanzien nicht eindeutig unterschieden werden konnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir ein Sepsismodell entwickelt haben, welches die laborchemischen und metabolischen Veränderungen einer chronischen Infektion reproduziert. Wir konnten zeigen, dass die Injektion von E.coli zu einem allgemeinen Katabolismus mit dem Verlust von Körper und Muskelgewicht führt, welche am ehesten auf einen veränderten Proteinmetabolismus im Rahmen eines septischen Geschehens zurückzuführen sind. Ein Einfluss auf die Expression der Azetylcholinrezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden.

## 6. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Etablierte Sepsismodelle zeigen alle einen auf wenige Tage limitierten Krankheitsverlauf. Mit dem Ziel chronische Veränderungen an der neuromuskulären Endplatte hervorzurufen, entwickelten wir ein neues Sepsismodell in der Ratte und beschreiben die laborchemischen und metabolischen Veränderungen sowie die Auswirkung auf die Expression der Azetylcholinrezeptoren.

**Methoden:** Zur Induktion einer Infektionsreaktion injizierten wir männlichen Sprague-Dawley-Ratten über einen in der V. jugularis liegenden Katheter  $3,2 \times 10^8$  CFU einer E. coli Bakteriensuspension (n=67). Versuchstiere der Kontrollgruppe wurde das entsprechende Volumen 0,9% NaCl-Lösung (n=31) verabreicht. Die Tiere wurden täglich gewogen. Nach 3, 7 und 14 Tagen wurden die Tiere durch Entbluten getötet und die Mm. tibialis cranialis, gastrocnemius und soleus entnommen. Aus dem Blut wurde ein Blutbild angefertigt. Serumwerte von  $\alpha_1$ -saurem Glykoprotein als Inflammationsparameter wurden mit einem Chemilumineszenz Immunoassay gemessen. Die Expression der Azetylcholinrezeptoren im Muskel wurde mit  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -Bungarotoxinbindung quantifiziert.

**Ergebnisse:** Versuchstiere der Gruppe E.coli zeigten initial eine ausgeprägteren Gewichtsverlust sowie im weiteren Verlauf eine verminderte Gewichtszunahme verglichen mit den Tieren der NaCl-Gruppe. Das Gesamtgewicht der entnommenen Muskeln war bei den E.coli Tieren an allen Messzeitpunkten vermindert. Am Tag 3 nach Infektion zeigten Tiere der Gruppe E. Coli eine manifeste Leukozytose sowie eine Thrombozytopenie. Die  $\alpha_1$ -AGP Spiegel waren im Vergleich zur NaCl-Gruppe an den Tagen 3, 7 und 14 erhöht. Die Expression der Acetylcholinrezeptoren auf der Muskeleoberfläche unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen.

### **Schlussfolgerung:**

In unserem chronischen Modell einer Kathetersepsis zeigten Versuchstiere der Gruppe E.coli die metabolischen und laborchemischen Effekte einer langandauernden Infektion. Der ausgeprägte Verlust von Körper- und Muskelgewicht ist am ehesten auf den allgemeinen Katabolismus im Rahmen eines septischen Geschehens zurückzuführen ist. Veränderungen der Expression der AChR konnten nicht nachgewiesen werden.



## 7. Literaturverzeichnis

1. **Berek K, Margreiter J, Willeit J, Berek A, Schmutzhard E, Mutz NJ:** Polyneuropathies in critically ill patients: a prospective evaluation. *Intensive Care Med* (1996); 22: 849-855
2. **Blobner M, Kochs E, Fink H, Mayer B, Veihelmann A, Brill T, Stadler J:** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vecuronium in rats with systemic inflammatory response syndrome: treatment with NG-monomethyl-L-arginine. *Anesthesiology* (1999); 91: 999-1005
3. **Bolton CF:** Neuromuscular complications of sepsis. *Intensive Care Med* (1993); 19 Suppl 2: S58-63
4. **Bolton CF:** Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: neuromuscular manifestations. *Crit Care Med* (1996); 24: 1408-1416
5. **Bolton CF:** Neuromuscular manifestations of critical illness. *Muscle Nerve* (2005); 32: 140-163
6. **Bolton CF, Gilbert JJ, Hahn AF, Sibbald WJ:** Polyneuropathy in critically ill patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1984); 47: 1223-1231
7. **Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR:** Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* (1987); 237: 527-532
8. **Breuille D, Voisin L, Contrepois M, Arnal M, Rose F, Obled C:** A sustained rat model for studying the long-lasting catabolic state of sepsis. *Infect Immun* (1999); 67: 1079-1085
9. **Clowes GH, Jr., George BC, Villee CA, Jr., Saravis CA:** Muscle proteolysis induced by a circulating peptide in patients with sepsis or trauma. *N Engl J Med* (1983); 308: 545-552
10. **Cooney RN, Kimball SR, Vary TC:** Regulation of skeletal muscle protein turnover during sepsis: mechanisms and mediators. *Shock* (1997); 7: 1-16
11. **De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur JP, Authier FJ, Durand-Zaleski I, Boussarsar M, Cerf C, Renaud E, Mesrati F, Carlet J, Raphael JC, Outin H, Bastuji-Garin S:** Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. *Jama* (2002); 288: 2859-2867

12. **de Seze M, Petit H, Wiart L, Cardinaud JP, Gaujard E, Joseph PA, Mazaux JM, Barat M:** Critical illness polyneuropathy. A 2-year follow-up study in 19 severe cases. *Eur Neurol* (2000); 43: 61-69
13. **Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM:** Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* (2004); 32: 858-873
14. **Dodson BA, Kelly BJ, Braswell LM, Cohen NH:** Changes in acetylcholine receptor number in muscle from critically ill patients receiving muscle relaxants: an investigation of the molecular mechanism of prolonged paralysis. *Crit Care Med* (1995); 23: 815-821
15. **Fletcher SN, Kennedy DD, Ghosh IR, Misra VP, Kiff K, Coakley JH, Hinds CJ:** Persistent neuromuscular and neurophysiologic abnormalities in long-term survivors of prolonged critical illness. *Crit Care Med* (2003); 31: 1012-1016
16. **Freund HR, James JH, LaFrance R, Gallon LS, Barcelli UO, Edwards LL, Joffe SN, Bjornson HS, Fischer JE:** The effect of indomethacin on muscle and liver protein synthesis and on whole-body protein degradation during abdominal sepsis in the rat. *Arch Surg* (1986); 121: 1154-1158
17. **Fried RC, Bailey PM, Mullen JL, Stein TP, Crosby LO, Buzby GP:** Alterations in exogenous substrate metabolism in sepsis. *Arch Surg* (1986); 121: 173-178
18. **Gronert GA:** Succinylcholine hyperkalemia after burns. *Anesthesiology* (1999); 91: 320-322
19. **Hasselgren PO, Talamini M, James JH, Fischer JE:** Protein metabolism in different types of skeletal muscle during early and late sepsis in rats. *Arch Surg* (1986); 121: 918-923
20. **Hund E:** Neurological complications of sepsis: critical illness polyneuropathy and myopathy. *J Neurol* (2001); 248: 929-934
21. **Ibebunjo C, Martyn JA:** Fiber atrophy, but not changes in acetylcholine receptor expression, contributes to the muscle dysfunction after immobilization. *Crit Care Med* (1999); 27: 275-285
22. **Ibebunjo C, Nosek MT, Itani MS, Martyn JA:** Mechanisms for the paradoxical resistance to d-tubocurarine during immobilization-induced muscle atrophy. *J Pharmacol Exp Ther* (1997); 283: 443-451

23. **Kim C, Fuke N, Martyn JA:** Burn injury to rat increases nicotinic acetylcholine receptors in the diaphragm. *Anesthesiology* (1988); 68: 401-406
24. **Kohlschütter B, Baur H, Roth F:** Suxamethonium-induced hyperkalaemia in patients with severe intra-abdominal infections. *Br J Anaesth* (1976); 48: 557-562
25. **Lang CH, Bagby GJ, Bornside GH, Vial LJ, Spitzer JJ:** Sustained hypermetabolic sepsis in rats: characterization of the model. *J Surg Res* (1983); 35: 201-210
26. **Leijten FS, Harinck-de Weerd JE, Poortvliet DC, de Weerd AW:** The role of polyneuropathy in motor convalescence after prolonged mechanical ventilation. *Jama* (1995); 274: 1221-1225
27. **Lowry SF:** Sepsis and its complications: clinical definitions and therapeutic prospects. *Crit Care Med* (1994); 22: S1-2
28. **Martineau L, Shek PN:** A sustained release bacterial inoculum infusion model of intra-abdominal infection in conscious rats: bacteriology, metabolism, and histopathology. *Shock* (1996); 5: 446-454
29. **Martyn JA, Abernethy DR, Greenblatt DJ:** Plasma protein binding of drugs after severe burn injury. *Clin Pharmacol Ther* (1984); 35: 535-539
30. **Martyn JA, White DA, Gronert GA, Jaffe RS, Ward JM:** Up-and-down regulation of skeletal muscle acetylcholine receptors. Effects on neuromuscular blockers. *Anesthesiology* (1992); 76: 822-843
31. **Mela-Riker L, Alexander P, Bartos D, Bryant RE, Connell RS, Erwin L, Gilchrist B, Harrison M, Luallin D, Oh G, et al.:** Chronic hyperdynamic sepsis in the rat: I. Characterization of the animal model. *Circ Shock* (1988); 25: 231-244
32. **Metzger J, Blobner M, Lupp PB:** Sensitive chemiluminescence immunoassay for the determination of rat serum alpha1-acid glycoprotein. *Clin Chem Lab Med* (2001); 39: 514-518
33. **Nauwynck M, Huyghens L:** Neurological complications in critically ill patients; septic encephalopathy, critical illness polyneuropathy. *Acta Clin Belg* (1998); 53: 92-97
34. **Neugebauer E, Dimmeler S, Troidl H:** [Mediator systems and infection]. *Chirurg* (1995); 66: 2-10

35. **Paxton JW:** Alpha 1 -acid glycoprotein and binding of basic drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* (1983); 5: 635-648
36. **Peck MD, Alexander JW:** Survival in septic guinea pigs is influenced by vitamin E, but not by vitamin C in enteral diets. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* (1991); 15: 433-436
37. **Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J, Capon DJ:** Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *Embo J* (1987); 6: 3923-3929
38. **Rennie MJ:** Muscle protein turnover and the wasting due to injury and disease. *Br Med Bull* (1985); 41: 257-264
39. **Rennie MJ, Edwards RH, Emery PW, Halliday D, Lundholm K, Millward DJ:** Depressed protein synthesis is the dominant characteristic of muscle wasting and cachexia. *Clin Physiol* (1983); 3: 387-398
40. **Riedemann NC, Guo RF, Ward PA:** The enigma of sepsis. *J Clin Invest* (2003); 112: 460-467
41. **Riedemann NC, Guo RF, Ward PA:** Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* (2003); 9: 517-524
42. **Tobey RE:** Paraplegia, succinylcholine and cardiac arrest. *Anesthesiology* (1970); 32: 359-364
43. **Tomera JF:** Interaction of lipopolysaccharide endotoxin produced from *Escherichia coli* with D-tubocurarine at the nicotinic<sub>2</sub> receptor and adenosine 3':5' cyclic monophosphate during physiological contraction in skeletal muscle. *Food Chem Toxicol* (1996); 34: 63-72
44. **Tsukagoshi H, Morita T, Takahashi K, Kunimoto F, Goto F:** Cecal ligation and puncture peritonitis model shows decreased nicotinic acetylcholine receptor numbers in rat muscle: immunopathologic mechanisms? *Anesthesiology* (1999); 91: 448-460
45. **Vary TC, Kimball SR:** Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. *Am J Physiol* (1992); 262: C445-452
46. **Vary TC, Kimball SR:** Sepsis-induced changes in protein synthesis: differential effects on fast- and slow-twitch muscles. *Am J Physiol* (1992); 262: C1513-1519

47. **Vary TC, Siegel JH, Tall BD, Morris JG, Smith JA:** Inhibition of skeletal muscle protein synthesis in septic intra-abdominal abscess. *J Trauma* (1988); 28: 981-988
48. **Voisin L, Breuille D, Combaret L, Pouyet C, Taillandier D, Arousseau E, Obled C, Attaix D:** Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup> -activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest* (1996); 97: 1610-1617
49. **Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH:** Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* (1980); 29: 189-201
50. **Witt NJ, Zochodne DW, Bolton CF, Grand'Maison F, Wells G, Young GB, Sibbald WJ:** Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure. *Chest* (1991); 99: 176-184
51. **Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD, Pfeffer K:** Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* (1998); 66: 2300-2309

## 8. Danksagung

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Eberhard Kochs bedanken, dass er es mir ermöglicht, diese und weitere wissenschaftliche Arbeiten an der Klinik für Anaesthesiologie durchzuführen.

Mein tiefster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Blobner. Vielen Dank für die exzellente Betreuung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit in München und hier in Boston zu allen Zeiten.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Heidrun Fink für die Betreuung und Korrektur der Doktorarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Frau Martina Richtsfeld für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit zu allen Zeiten. Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Laurent Barbe, Shriners Burns Hospital, Boston, für die exzellente Betreuung und Unterstützung in allen Computerfragen bedanken.

Für die ausgezeichnete Zusammenarbeit beim Durchführen der Experimente und für die geduldige Einarbeitung in die Methoden möchte ich mich bei Dr. Lucia Gordan, Dr. Barbara Eckel und Dr. Christiane Michaelis bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. B. Gänsbacher und Prof. Dr. W. Erhard möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München bedanken. An dieser Stelle sei allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Unterstützung gedankt.

Ich bedanke mich auch bei Herrn Prof. Dr. Peter Lippa, Institut für Klinische Chemie für die Messung der  $\alpha_1$ -AGP Spiegel.

## 9. Lebenslauf

Name: Christiane Gabriele Frick  
Geburtsdatum: 08. März 1978  
Geburtsort: Tübingen

### **Schulischer Bildungsweg:**

1984 – 1988            Grundschule an der Wittelsbacherstrasse, Germering  
1988 – 1997            Max-Born-Gymnasium, Germering  
1997                    Abitur

### **Universitärer Bildungsweg:**

1997 – 1999            Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München,  
Vorklinischer Abschnitt  
August 1999            Ärztliche Vorprüfung  
1999 – 2004            Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München,  
Klinischer Abschnitt  
August 2000            Erstes Staatsexamen  
April 2003             Zweites Staatsexamen  
April 2004             Drittes Staatsexamen  
Oktober 2004         Approbation als Ärztin  
  
seit Mai 2004            Forschungsaufenthalt am Massachusetts General Hospital/ Shriners  
Burns Hospital for Children, Department of Anesthesia and Critical  
Care, Harvard Medical School, Boston, USA  
  
seit Juli 2005            Assistenzärztin an der Klinik für Anaesthesiologie  
Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München