

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Volk

**Untersuchung des Einflusses einer systemischen Inflammation auf flüchtige
organische Verbindungen in der Ausatemluft der Ratte**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

Vorgelegt von: Dietmar Philipp

geb. am: 15.10.1986 in Schopfheim

Tag der Promotion:

06.04.2021

Dekan:

Univ.- Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Tobias Fink

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals

Inhaltsverzeichnis

I. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	4
II. Abkürzungsverzeichnis	5
1. Zusammenfassung/Summary	7
1.1 Zusammenfassung	7
1.2 Summary	9
2. Einleitung	10
2.1 Inflammation	10
2.1.1 Grundlagen und Definition	10
2.1.2 Abgrenzung SIRS von Sepsis und Neudefinition	12
2.1.3 Pathophysiologie des SIRS	14
2.1.4 Diagnose und Therapie	17
2.1.5 Problemfelder	19
2.2 Ionenmobilitätsspektrometrie	19
2.2.1 Einführung in die Ionenmobilitätsspektrometrie	19
2.2.2 Anwendungsgebiete	20
2.3 Zielsetzung der Arbeit	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.2 Methoden	24
3.2.1 Multikapillarsäulengekoppelte Ionenmobilitätsspektrometrie	24
3.2.2 Versuchstiere	26
3.2.3 Versuchsgruppen	27
3.2.4 Anästhesie und Präparation	27
3.2.5 Versuchsprotokoll	28
3.2.6 Zytokinmessung mittels ELISA	30
3.2.7 Auswertung und Statistik	31

4. Ergebnisse	33
4.1 Überlebenszeit.....	33
4.2 Blutgasanalyse und Vitalparameter.....	34
4.2.1 Blutgasanalyse	34
4.2.2 Herzzeitvolumen.....	37
4.2.3 Mittlerer Arterieller Blutdruck	37
4.3 Zytokinbestimmung.....	37
4.4 Atemluftanalyse	39
4.4.1 Alpha-Toxin.....	41
4.4.2 Lipopolysaccharid	43
5. Diskussion	46
5.1 Diskussion der Methodik.....	46
5.1.1 Diskussion des Tiermodell.....	46
5.1.2 Diskussion der Atemluftanalyse	47
5.1.3 Diskussion der statistischen Auswertung	49
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	49
5.2.1 Diskussion der Vitalparameter sowie Zytokinbestimmung.....	50
5.2.2 Diskussion der Atemluftanalyse im Gruppenvergleich.....	52
5.2.3 Einzelbetrachtung signifikanter VOCs.....	55
5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick	57
6. Literaturverzeichnis.....	58
7. Veröffentlichung.....	65
8. Danksagung	66
9. Lebenslauf	67

I. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1	SIRS-Kriterien
Tabelle 2	Quick Sequential Organ Failure Assessment (qSOFA)
Tabelle 3	Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score
Tabelle 4	Verwendete Chemikalien und Medikamente
Tabelle 5	Übersicht über die Versuchsgruppen und Medikation
Tabelle 6	Übersicht über die Ergebnisse der Blutgasanalyse
Tabelle 7	Herzeitvolumen
Tabelle 8	Identifizierte VOCs
Tabelle 9	Signifikante VOCs nach Toxinmodellen
Tabelle 10	Signifikante VOCs nach Ursprung
Abbildung 1	Sepsisdefinition modifiziert nach Vincent et al.
Abbildung 2	Dreidimensionale Struktur von Alpha-Toxin
Abbildung 3	Funktionsprinzip eines Ionenmobilitätsspektrometers
Abbildung 4	Beispielhaftes IMS-Spektrogramm einer Ratte
Abbildung 5	Überblick Versuchsablauf
Abbildung 6	Überlebenszeiten nach Kaplan Meier
Abbildung 7	Zytokinkonzentration
Abbildung 8	Signalintensität 1-Butanol
Abbildung 9	Signalintensität 1-Pentanol (Alpha-Toxin).
Abbildung 10	Signalintensität Isopropylamin
Abbildung 11	Signalintensität Butanal
Abbildung 12	Signalintensität 1-Pentanol (LPS)
Abbildung 13	Signalintensität 2-Propanol
Abbildung 14	Signalintensität 2-Butanon

II. Abkürzungsverzeichnis

15-HPETE	15-Hydroxyeicosatetraensäure
°C	Grad Celsius
A.	Arteria, Arterie
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
APC	Antigen Presenting Cells
AT	Alpha-Toxin
BE	Blutentnahme
BGA	Blutgasanalyse
CD 64	Cluster of Differentiation 64
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-Reaktives Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
g	Gramm
h	Stunde
HD	High Dose
HZV	Herzzeitvolumen
IL	Interleukin
IMS	Ionenmobilitätsspektrometer
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KKT	Körperkerntemperatur
LD	Low Dose
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mittlerer Arterieller Blutdruck
MCC	Multikapillarsäule
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter

II. Abkürzungsverzeichnis

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mV	Millivolt
NaCL	Natriumchlorid
NF-KB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer'
ng	Nanogramm
PAMP	Pathogen Associated Moleculare Patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Polyethylen
PEEP	Positive End Expiratory Pressure
pH	Wasserstoffionenexponent
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ppb	parts per billion
PRR	Pathogen Recognition Receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
qSOFA	Quick Sequential Organ Failure Assessment
V	Volt
V.	Vena, Vene
VOCs	Volatile Organische Komponenten
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1. Zusammenfassung/Summary

1.1 Zusammenfassung

Die systemische Entzündungsreaktion, oder auch Inflammation, ist nach wie vor ein Prozess der die Medizin vor mannigfaltige Herausforderungen stellt. Seien es die Diagnosestellung, Therapie oder auch die noch nicht vollständig verstandene Pathophysiologie. Auch ist die Abgrenzung zum Krankheitsbild der Sepsis, auf dem Boden einer Infektion, weiter schwierig. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es daher, die Diagnostik der Inflammation weiter zu verbessern. Mit der Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) steht hierzu ein vielversprechendes Verfahren zur Verfügung, mit dem folgende Fragestellung beantwortet werden soll: Lässt sich mittels IMS-Analyse der Expirationsluft eine bestehende systemische inflammatorische Reaktion bei der Ratte nachweisen? Und kann mittels IMS-Analyse eine Differenzierung zwischen unterschiedlichen Auslösern der Inflammation erfolgen?

Um diese Fragen zu beantworten wurden männliche Sprague-Dawley Ratten, nach vorheriger Erlaubnis der zuständigen Tierschutzbehörde, anästhesiert und über 24 Stunden beatmet. Die Vitalparameter wurden kontinuierlich aufgezeichnet und Interleukin-6 im Blut bestimmt. Um eine sterile Inflammation auszulösen, erfolgte die Gabe von Alpha-Toxin sowie Lipopolysaccharid in je zwei unterschiedlichen Dosierungen („Low Dose“ und „High Dose“). Alle zwanzig Minuten wurden Proben der Expirationsluft entnommen und mittels IMS analysiert.

Die Auswertung der Letalität als auch der Serumkonzentrationen von Interleukin-6 zeigte, dass eine systemische Inflammationsreaktion im Tiermodell ausgelöst wurde. Es gelang mehrere Volatile Organische Komponenten (VOCs) zu ermitteln, anhand derer sich die Inflammationsgruppen von der Kontrollgruppe, als auch voneinander differenzieren ließen. Im Einzelnen ermöglichen die VOCs 1-Butanol, 1-Pentanol, Butanal und Isopropylamin eine Differenzierung der Alpha-Toxin-Gruppe von der Kontrollgruppe. 1-Butanol und 1-Pentanol zeigten einen Anstieg der Signalintensität, wohingegen für Butanal und Isopropylamin ein Abfall detektiert wurde. Für die LPS-Gruppen stellten sich signifikante Unterschiede für die VOCs 1- Pentanol, 2-Propanol und Butanon dar. Hier zeigte 1-Pentanol ebenfalls einen Signalanstieg, ein gegensätzlicher Verlauf stellte sich für 2-Propanol dar. Interessanterweise zeigte der VOC Butanon einen Anstieg in der Low Dose-Gruppe und einen Abfall in der High Dose-Gruppe.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass sich eine Inflammation bei der Ratte anhand charakteristischer Veränderungen von VOCs detektieren lässt. Zudem war anhand

unterschiedlicher VOCs eine Differenzierung des auslösenden Toxins möglich. Daher scheint die Atemgasanalyse mittels IMS eine potentielle Diagnosemöglichkeit für den Nachweis und die Differenzierung eines systemischen inflammatorischen Geschehens.

1.2 Summary

A study of the influence of systemic inflammation on volatile organic components in exhaled breath of rats

Inflammation still remains a severe condition and poses particular challenges for modern medicine. This includes diagnosis, treatment, specific pathophysiology and the differentiation from infection-based sepsis. The aim of this study was to seek further development in the diagnosis of inflammation, exploring the usability of Ion Mobility Spectrometry (IMS) as a suitable diagnostic tool for inflammation. IMS, a well-known analytical technique, allows real-time detection of molecules down to trace elements. This study investigates the potential presence of inflammatory markers in exhaled breath of rats, and secondly, whether IMS allows to determine the different triggers of Inflammation.

To answer these questions male Sprague-Dawley rats were anesthetized and were ventilated over 24 hours. Vital parameters were continuously monitored and Interleukin-6 was determined via blood samples. All animal-procedures took place by permission of the local agency of animal protection. To initiate an inflammatory reaction two toxins, alpha-toxin and lipopolysaccharid (LPS), were applicated in two different doses ("Low Dose" and "High Dose"). Exhaled breath was automatically measured every twenty minutes by IMS.

In the present study we determined specific volatile exhaled components (VOCs) associated with inflammation induced by alpha-toxin or LPS. After alpha-toxin treatment, 1-butanol and 1-pentanol showed increase in signal intensity. Contrary butanal and isopropylamine showed a decrease in signal intensity instead. The LPS groups could be differentiated from the control group by increase of 1-pentanol and decrease of 2-propanol. For 2-butanone, LPS Low Dose treatment resulted in an increase of intensity, but LPS High Dose decreased. However, this study showed that inflammation in rats can be detected by specific VOCs in exhaled breath and the different triggers of inflammation, as LPS or alpha-toxin, can be distinguished.

2. Einleitung

2.1 Inflammation

Nachfolgend soll das Krankheitsbild Inflammation als grundlegender Forschungsgegenstand dieser Arbeit näher beleuchtet werden. Darüber hinaus wird eine Abgrenzung gegenüber der Sepsis vorgenommen, wobei auch gemeinsame Merkmale Erwähnung finden sollen.

2.1.1 Grundlagen und Definition

Die Fähigkeit des menschlichen Immunsystems auf unterschiedlichste Pathogene mit der Bildung spezifischer Antikörper zu reagieren, war wahrscheinlich eine der Grundbedingungen unseres evolutionären Erfolges. Nicht immer jedoch, ist ein von außen in den Körper eindringendes Pathogen Ursache für die Aktivierung des Immunsystems. Auch schwere Allgemeinerkrankungen, wie beispielsweise eine nekrotisierende Pankreatitis, können zu einer „sterilen“ Aktivierung des Immunsystems im Sinne einer systemischen inflammatorischen Reaktion (SIRS) führen. Diese Erkenntnis hat allerdings erst sehr spät, in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts, Einzug in klinische Leitlinien gehalten. Zum besseren Verständnis des SIRS folgt ein kurzer historischer Überblick über die verschiedenen pathophysiologischen Konzepte der Immunantwort.

Erkrankungen begleiten den menschlichen Organismus seit seiner Existenz. Bereits früh hatte man eine Begrifflichkeit für fulminant verlaufende fieberhafte Erkrankungen. Der Begriff Sepsis findet sich schon bei Hippokrates (460 – 370 v. Chr.), der damit eine „Wund-Fäulnis“ beschrieb [1]. In späteren Jahrhunderten hatten Ärzte verschiedenste Begrifflichkeiten und auch Vorstellungen von Auslösern fieberhafter Erkrankungen, oft auch im Reich des Aberglaubens. Erst durch die Arbeiten von Robert Koch (1843 – 1910), dem 1882 die Entdeckung des Tuberkuloseerregers gelang, wurden Bakterien als Krankheitserreger identifiziert. Dies führte zur Begründung der Mikrobiologie als eigenständige medizinische Disziplin [2]. Doch erst drei Jahrzehnte später im Jahre 1914 wurde durch Hugo Schottmüller, anlässlich eines Vortrages auf der Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, eine erste klinische Definition für das Krankheitsbild der Sepsis eingeführt:

„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, daß durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ [3].

Von Schottmüller stammt auch die These, dass nicht die im Blut vorhandenen Bakterien, sondern vielmehr ihre Toxine das eigentlich schädigende Agens sind. Er führte hierzu weiter aus:

„Eine Therapie hätte sich also nicht gegen die im Blute kreisenden Bakterien, sondern gegen die immer und immer wieder frei werdenden Bakterien-Toxine zu richten, welche die Organe, z.B. das Herz, offenbar [...] hauptsächlich zurzeit ihres Freiwerdens und Auftretens im Blut schädigen“ [3].

Diesen Ausführungen lag dabei bereits eine genaue Vorstellung der pathophysiologischen Zusammenhänge zugrunde. In den Jahrzehnten danach wurden immer wieder neue Begriffsdefinitionen vorgenommen, welche jedoch die wesentlichen Elemente der Definition von Schottmüller beibehielten. Diese frühen Definitionen ließen jedoch die bis dahin wenig bekannte Tatsache außer Acht, dass auch nichtinfektiöse Ursachen, wie beispielsweise ein schweres (Verbrennungs-) Trauma oder eine Pankreatitis, eine systemische Reaktion provozieren können. Welche klinisch schwer von einer Sepsis zu unterscheiden ist. Es dauerte bis ins Jahr 1991, um sich auf der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine auf eine allgemeingültige Definition zu einigen. Entsprechend dieser Definition liegt ein sogenanntes Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) vor, wenn zwei der folgenden vier Kriterien erfüllt sind. Tabelle 1 zeigt diese sogenannten SIRS Kriterien. Hierbei wurde der Übergang von SIRS zur Sepsis und schließlich zum septischen Schock als kaskadenartiges Kontinuum betrachtet [4].

Tabelle 1: Severe Inflammatory Response Syndrome (SIRS)-Kriterien/Organdysfunktion modifiziert nach ACCP/SCCM Konsensuskonferenz von 1991[4]

SIRS-Kriterien
<ul style="list-style-type: none">• Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$)• Tachykardie: Herzfrequenz ≥ 90 /min• Tachypnoe (Frequenz ≥ 20 /min) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4,3$ kPa/ ≤ 33 mmHg)• Leukozytose ($\geq 12\ 000$ /mm^3) oder Leukopenie ($\leq 4\ 000$ /mm^3) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

2.1.2 Abgrenzung SIRS von Sepsis und Neudefinition

Aus der oben genannten Definition wird deutlich, dass ein SIRS, wenn ein exogener Erreger hinzukommt, im Rahmen einer bakteriellen Infektion in einer Sepsis münden kann. Gleichzeitig ist es aber auch als eigenständige Entität im Sinne einer sterilen Inflammation zu sehen. In dieser Arbeit werden die Begriffe Inflammation und SIRS im Sinne einer systemischen Reaktion des Immunsystems gebraucht, ohne dass eine bakterielle Infektion zugrunde liegt.

Nach Etablierung der SIRS/Sepsis-Definition 1991 standen insbesondere die SIRS-Kriterien in der Kritik, für die Diagnostik nicht spezifisch genug zu sein [5]. Daher wurde auf der dritten internationalen Konsensuskonferenz für Sepsis und septischer Schock 2016 in New York eine Anpassung der Definition vorgenommen. Die SIRS-Kriterien wurden zugunsten des „quick Sequential Organ Failure Assessment“-Score (qSOFA) als diagnostischer Screeningtest verlassen, der eine validere Möglichkeit zu einer frühen Identifikation von Patienten mit möglicher Sepsis bietet.

Tabelle2: qSOFA-Score nach der dritten internationalen Konsensuskonferenz für Sepsis und septischer Schock (Sepsis-3)[6]

Quick Sequential Organ Failure Assessment (qSOFA)
· Veränderte Bewusstseinslage
· Atemfrequenz $\geq 22/\text{min}$
· Systolischer Blutdruck $\leq 100\text{mmHG}$
Schlechteres Outcome bei ≥ 2 Kriterien

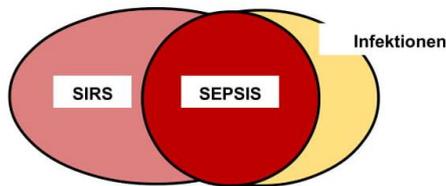
Die Sepsis selbst wurde definiert als „*lebensbedrohliche Organdysfunktion, verursacht durch eine dysregulierte Wirtsreaktion auf eine Infektion*“ [6]. Diese Definition legt den Schwerpunkt somit auf eine Organdysfunktion als Voraussetzung für die Sepsis. Als Beurteilungsmaßstab für die Schwere einer Organdysfunktion wurde der SOFA-Score etabliert (Siehe Tabelle 3). Der septische Schock wurde definiert als „*Untergruppe der Sepsis, bei der die Kreislaufreaktion und die zellulären und metabolischen Veränderungen so tiefgreifend sind, dass das Sterberisiko deutlich erhöht ist*“ [6].

Tabelle 3: SOFA-Score modifiziert nach der dritten internationalen Konsensuskonferenz für Sepsis und septischer Schock (Sepsis-3)[6]

Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score					
System	Punktzahl				
	0	1	2	3	4
Atmung PaO ₂ /FiO ₂ in mmHg	≥ 400	< 400	< 300	< 200	< 100
Gerinnung Thrombozytenzahl x10 ³ /µl	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Leber Bilirubin in mg/dl	< 1,2	1,2 - 1,9	2,0 - 5,9	6,0 - 11,9	> 12,0
Kardiovaskuläres System MAP in mmHg Dobutamin in µg/kg/min	≥ 70	< 70	< 5	5,1 - 15	> 15
Zentrales Nervensystem Glasgow Coma Scale	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Niere Kreatinin in mg/dl Urinausscheidung in ml/d	< 1,2	1,2 - 1,9	2,0 - 3,4	3,5 - 4,9 < 500	> 5 < 200

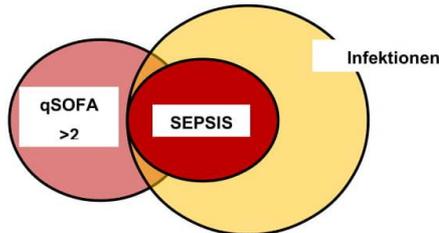
Abbildung 1 veranschaulicht die Unterschiede zwischen der Definition von 1992 und der Neufassung von 2016. Mit der Schwerpunktsetzung auf die Organdysfunktion ist die Definition der Sepsis deutlich enger gefasst als mit dem Konzept des SIRS. Es wird deutlich, dass die Sepsis nach neuer Definition eine geringere Zahl an Infektionserkrankungen einschließt, als es bisher der Fall war.

A



Bildteil A: Sepsis nach der Definition von 1992; SIRS ist Bestandteil der Definition. Ein Großteil aller Infektionen entspricht der Sepsisdefinition.

B



Bildteil B: Sepsis nach der Neudefinition von 2016; hier liegt eine deutlich enger gefasste Definition des Krankheitsbildes zugrunde. Nur Infektionen mit nachgewiesener Organdysfunktion erfüllen die Sepsisdefinition.

Abbildung 1: Umbruch der Schwerpunktsetzung in der Sepsisdefinition, modifiziert nach Vincent et al. [7]

Auch diese neue Definition wird kontrovers diskutiert. So bleibt festzuhalten, dass auch nach der aktuellen Definition das Konzept des SIRS als eigenständige, von einer Sepsis abzugrenzenden Entität bestehen bleibt [7, 8].

2.1.3 Pathophysiologie des SIRS

Die einzelnen Pathomechanismen des SIRS sind bis heute Bestandteil vieler Forschungsbemühungen und in ihrer Gesamtheit noch nicht vollständig verstanden. In dieser Arbeit wurde zur Induktion eines SIRS das Glykoprotein Lipopolysaccharid sowie das Bakterientoxin Alpha-Toxin verwendet. Lipopolysaccharid ist als Endotoxin ein Membranbestandteil gramnegativer Bakterien. Es besteht aus einer je nach Spezies unterschiedlichen Kernregion, welche eine spezifische Zuckerkette mit einem Lipid verknüpft. Die toxinspezifischen pathophysiologischen Prinzipien, welche zur Aktivierung der Immunreaktion führen, werden im Folgenden dargestellt:

Zu Beginn steht die Invasion von Pathogenen in den Organismus und der erste Kontakt mit Immunzellen des Körpers. Von besonderer Wichtigkeit sind hier die antigenrepräsentierenden Zellen (APC) wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, da durch sie die nachfolgende Immunantwort induziert wird. Eindringende Pathogene werden durch ihre charakteristischen Zellbestandteile oder Antigene, sogenannten „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP), von antigenrepräsentierenden Zellen über spezielle Rezeptoren, die „pattern recognition receptors“ (PRR) erkannt [9].

Die Bindung von Lipopolysaccharid erfolgt, unterstützt durch Cofaktoren wie dem Glykoprotein CD 14 (CD = Cluster of Differentiation) und MD 2 (Myeloid Differentiation Factor 2) sowie dem „lipopolysaccharid-binding-factor“, an Toll-Like-Rezeptor 4. Dies führt schließlich zur Aktivierung des NF- κ B Signalweges. NF- κ B stellt einen Transkriptionsfaktor dar. Er kommt ubiquitär in Körperzellen vor und nimmt eine zentrale Funktion in der Steuerung der Immunantwort, sowie der Apoptose ein. LPS führt über eine Aktivierung dieses Signalweges zur Expression proinflammatorischer Cytokine sowie zur Induktion von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoffspezies und damit zu oxidativem Stress [10-12].

Im Myokard führt LPS zur Ausschüttung von Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α) und reaktiven Stickstoffspezies, woraus klinisch eine Kardiomyopathie resultiert. Dabei ist der Körper nicht mehr in der Lage das Herzzeitvolumen dem Bedarf anzupassen. Darüber hinaus konnte eine direkte Wirkung auf Ionenkanäle des Myokards nachgewiesen werden [13, 14].

Alpha-Toxin ist ein Exotoxin des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus*. Es bindet unspezifisch und rezeptorvermittelt über die Metalloproteinase ADAM 10 (ADAM = A Disintegrin And Metalloproteinase), welche Bestandteil der Zellmembran ist, an Säugetierzellen. Nach Bindung oligomerisiert es zu einem amphiphilen Komplex [15]. Durch diesen Vorgang werden Transmembrankanäle von circa 3 nm Durchmesser ausgebildet, was zum Zelltod durch Elektrolyt- und Flüssigkeitsverschiebung führt. Im Blut führt Alpha-Toxin damit dosisabhängig zur Hämolyse [16, 17]. Weiterhin scheint diese Verletzung der Zellintegrität ebenfalls zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalweges zu führen und hier vor allem eine Ausschüttung des proinflammatorischen Mediators Interleukin-8 zu induzieren [18]. Abbildung 2 veranschaulicht die dreidimensionale Struktur und Ausbildung des Transmembrankanals.

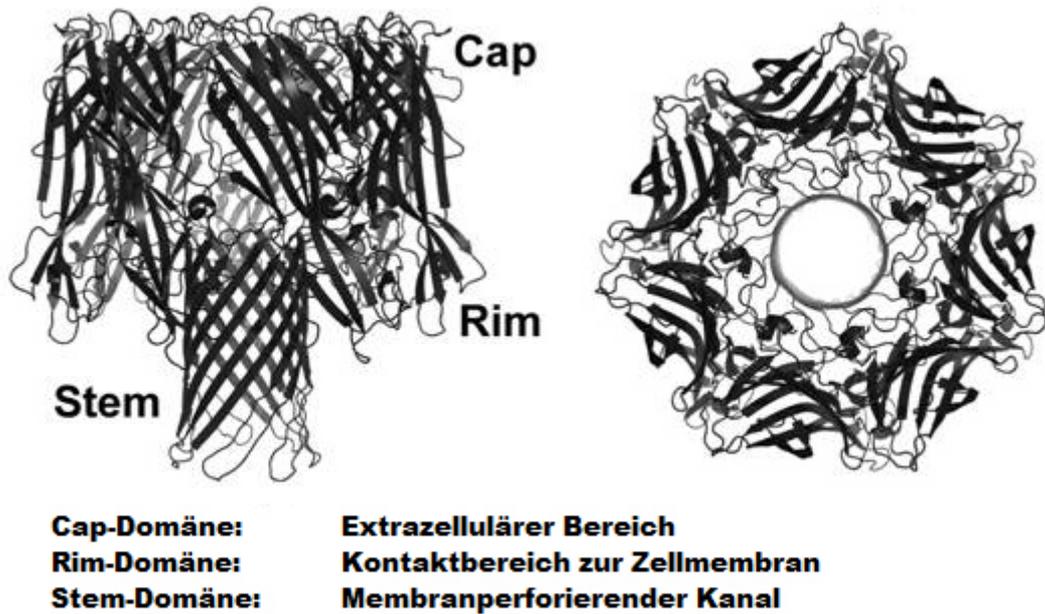


Abbildung 2: Dreidimensionale Struktur von Alpha-Toxin. Modifiziert nach [19].

Sowohl die Ausschüttung von Zytokinen, als auch der induzierte oxidative Stress dienen primär der Verstärkung der Immunantwort beziehungsweise der direkten Bekämpfung von Erregern durch einen sogenannten „oxidative burst“. Allerdings kommt es dadurch auch zu Zellschäden bei körpereigenen Zellen. Eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie spielen Endothelschäden an Gefäßen und Schleimhäuten. Dies führt zum „Syndrom des kapillaren Lecks“ (capillary leak) und damit einer Flüssigkeitsverschiebung ins Interstitium [20]. Die Folge ist eine hypotone Kreislaufdysregulation. Damit einhergehend ein verminderter Sauerstofftransport und konsekutive Hypoxie.

Durch die endothelialen Schäden wird der Aktivator des extrinsischen Gerinnungssystems, das sogenannte Thromboplastin („tissuefactor“) freigesetzt und erhält Kontakt mit dem Blutstrom. Zusätzlich wird die Expression von Thromboplastin durch proinflammatorische Zytokine induziert. Dies führt schließlich zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems und damit zur Bildung von Thromben in Endstromgebieten [21]. Im Vollbild führt dies zu einer Verbrauchskoagulopathie, was dann wiederum durch eine Gerinnungsimbalance zu verstärkter Blutungsneigung führt. Verschärfend kommt eine verminderte Verformbarkeit der Erythrozyten hinzu, welche die Gewebsdurchblutung noch weiter einschränkt [22].

Nach der Initialphase der inflammatorischen Reaktion, welche von Zytokinsturm und einer maximalen Immunantwort geprägt ist, schließt sich eine kompensatorische Gegenreaktion (CARS = Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome) an. Dies soll eine überschießende Immunreaktion verhindern. Sie ist geprägt durch Anwesenheit

antiinflammatorischer Zytokine, welche allerdings ihrerseits zu Immunparalyse führen können. In diesem Zustand ist der Patient anfällig für Infektionen [23].

Als Folge, insbesondere der Minderdurchblutung der Endstrombahnen, der daraus folgenden Gewebshypoxie und der Kumulation reaktiver Spezies, kommt es schließlich zum Multiorganversagen (MOV). Letztlich kann dies direkt zum Tode führen, wobei auch hier die genauen Zusammenhänge noch nicht vollständig verstanden sind [24].

2.1.4 Diagnose und Therapie

Bis heute bleiben sowohl die Diagnose der schweren Inflammationsreaktion, als auch die Abgrenzung zur Sepsis eine Herausforderung. Die Verdachtsdiagnose ruht auf dem Vorhandensein einer Reihe von klinischen Kriterien. Wie bereits beschrieben sind die SIRS-Kriterien zur Diagnose einer Inflammation sehr weit gefasst. Dies hat zur Einführung des (q)SOFA-Score geführt, um Patienten mit dem Verdacht auf eine Sepsis besser erkennen zu können. Doch auch dieser Score ist nicht frei von Kritik. *Vincent et al.* geben zu bedenken, dass die prädiktive Validität bei Patienten mit schwerem Herzfehler, Hypovolämie oder Lungenarterienembolie erst noch weiter untersucht werden müsse. Des Weiteren könne eine Sepsis trotz (q)SOFA-Score < 2 präsent sein, da sich nicht in jedem Patienten die Organdysfunktion in den abgefragten Kriterien widerspiegeln müsse. Sie merken daher an, die (q)SOFA-Kriterien seien zwar „klinisch wertvoll aber nicht perfekt“ [8]. So bleibt insbesondere in der Initialphase eine Diagnostik oder gar Differenzierung der beiden Krankheitsbilder weiterhin schwierig.

Neben klinischen Kriterien sind auch eine Reihe von laborchemischen Veränderungen bei der Diagnosestellung hilfreich. Wie bereits in der Pathophysiologie des SIRS beschrieben, führt die Immunantwort zu einem Anstieg von Interleukinen wie Interleukin-8 und Interleukin-6 (IL-6) [25]. Als möglicher Biomarker könnte daher IL-6 in Frage kommen. Bereits 1991 wurde IL-6 als prognostischer Marker für das Outcome bei schwerer intraabdomineller Sepsis untersucht [26]. Genetische Polymorphismen führen jedoch zu großen interindividuellen Unterschieden in der Plasmakonzentration von IL-6 bei der Immunantwort, wie eine Studie von *Li et al.* 2015 zeigen konnte [27].

Als weiterer Laborparameter bietet sich hier das Akute-Phase-Protein C-reaktives Protein (CRP) an, mit dem ein weiterer Marker für Inflammation und Sepsis zur Verfügung steht [28, 29]. Der Nachteil von CRP ist allerdings, dass es wenig spezifisch ist. Es finden sich erhöhte CRP-Werte beispielsweise auch nach Myokardinfarkt beziehungsweise bei allen Bedingungen, welche mit einer Aktivierung des Komplementsystems einhergehen [30].

Ein neuerer inzwischen gut etablierter Marker ist das Prohormon Procalcitonin, welches zur Diagnostik von bakteriellen Infektionen und zur Verlaufsbeurteilung herangezogen wird [31, 32]. Procalcitonin wurde allerdings in mehreren Studien hinsichtlich seiner Sensitivität und Spezifität ebenfalls kritisch beurteilt [33]. Von einem Procalcitonin basierendem Algorithmus versprach man sich eine bessere Differenzierung einer Inflammation oder einer bakteriellen Sepsis und vor allem einen gezielteren Antibiotikaeinsatz.

Jedoch zeigten *Annaneet al.*, dass ein Procalcitonin basierter Algorithmus keinen Einfluss auf die Reduktion von Antibiotikagaben bei septischen Patienten auf Intensivstationen zur Folge hatte [34]. Inzwischen wurde eine Vielzahl weiterer möglicher Marker identifiziert. Eine aktuelle Meta-Analyse, welche 60 potentielle Biomarker hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität untersuchte, konnte sieben Biomarker identifizieren, bei denen die Studienlage eine valide Berechnung der Spezifität und Sensitivität erlaubte. Die besten Werte zeigte hierbei das membranständige Glykoprotein CD64 mit einer Sensitivität von 0.87 und einer Spezifität von 0.93. Jedoch wurde festgestellt, dass die Bestimmung von CD64 mittels Durchflusszytometrie nur mit einem hohen technischen Aufwand betrieben werden kann und entsprechend teuer ist, was die breite klinische Anwendung deutlich einschränkt [35]. So steht momentan kein „idealer“ Biomarker für die Inflamationsdiagnostik zur Verfügung.

Die Diagnosestellung erfolgt in der Praxis daher weiterhin in der Zusammenschau von Klinik und Laborparametern. Wichtige Hilfestellung bei der Einschätzung des Patienten geben dabei die vorbeschriebenen klinischen Scores wie die SIRS-Kriterien oder SOFA/qSOFA. Ist allerdings bereits die Diagnosestellung mit gewissen Schwierigkeiten vergesellschaftet, so gilt dies insbesondere auch für die nachfolgende Therapie, welche sich nach der heute gültigen Sk-2-Leitlinie der Deutschen Sepsis-Gesellschaft (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) von 2010 richtet [36]. Bei einem reinen SIRS stehen hier vorwiegend supportive Maßnahmen sowie die Behandlung der Ursache, beispielsweise die Therapie eines Verbrennungstraumas, im Vordergrund. Sobald ein Infektfokus vermutet wird ist eine frühzeitige antiinfektive Therapie essentiell. Als kausale Therapie steht hier insbesondere die Fokussanierung, beispielsweise durch chirurgische Abszessdrainage, im Vordergrund.

2.1.5 Problemfelder

Die mit dem Wandel der Zeit wiederkehrende und bis heute andauernde Diskussion um eine spezifische Definition des SIRS und der Sepsis, in Verbindung mit dem daraus resultierenden unterschiedlichen Verständnis dieser Krankheitsbilder, zeigen, wie komplex diese in ihrer Gesamtheit sind. Nicht nur, dass die Definition selbst bereits eine Herausforderung darstellt, so gilt dies ebenso für die Diagnostik und Therapie. Bis heute fehlt es an einem in der klinischen Routine anwendbaren Biomarker zur Frühdiagnostik eines inflammatorischen Geschehens. Trotz einer Vielzahl von Empfehlungen zur Therapie ist diese oft mehr von Erfahrung denn tatsächlicher Evidenz geprägt [37, 38].

Daher ist die weitere Suche nach neuen möglichen Biomarkern für Inflammation von großer klinischer Bedeutung. Hier bietet sich als geeignetes Mittel zur Diagnostik verschiedenster Pathologien die Analyse der Atemluft an.

2.2 Ionenmobilitätsspektrometrie

In den weiteren Abschnitten des Kapitels soll die in der Arbeit verwendete Analysetechnik, die Ionenmobilitätsspektrometrie eingeführt und Anwendungsgebiete betrachtet werden. Die genauen technischen Details werden im Kapitel „Material und Methoden“ näher erläutert.

2.2.1 Einführung in die Ionenmobilitätsspektrometrie

Das Ionenmobilitätsspektrometer ist ein bereits in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts entwickeltes Analysegerät zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Zusammensetzung von Gasgemischen. Die Erfindung des IMS geht auf Arbeiten von *Paul Langevin* zurück, welcher 1905 mathematische Modelle zur Bewegung von Ionen im elektrischen Feld veröffentlichte [39]. Genau diese „Ionendrift“ macht sich das IMS zunutze, in dem das zu untersuchende Gasgemisch ionisiert wird und im elektrischen Feld gegen ein sogenanntes Driftgas wandert. Dabei werden aufgrund der unterschiedlichen Driftgeschwindigkeiten die einzelnen Analyte voneinander getrennt und treffen am Ende der sogenannten Driftröhre auf einen Detektor. Von der Anzahl der auf den Detektor treffenden Ionen wird die quantitative Analyse abgeleitet. *Martin J. Cohen* und *Francis W. Karasek* etablierten die Ionenmobilitätsspektrometrie schließlich in den 1970er Jahren unter dem Namen Plasmachromatographie [40].

Seitdem wurde das Verfahren kontinuierlich weiterentwickelt und steht für die unterschiedlichsten Einsatzbereiche zur Verfügung. Den „Goldstandard“ der Gasanalytik stellt, aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität, jedoch weiter die Gaschromatographie gekoppelt mit einer Massenspektrometrie dar. Allerdings bietet das IMS im Vergleich zur Gaschromatographie eine Reihe von Vorteilen. So ist es nicht nur deutlich günstiger in Anschaffung und Betrieb, es stehen auch alltagstaugliche Geräte für den mobilen Einsatz zur Verfügung [41]. Mit einer Nachweisgrenze im ppb-Bereich (parts per billion = 1×10^{-9}) eignet es sich zum Nachweis von Gasen im Spurenbereich. Die kurze Analysezeit, welche sich je nach Einsatzzweck im Bereich von 1-15 min befindet, ermöglicht es nahezu eine Echtzeitmessung durchzuführen. Genau diese Eigenschaften machen es insbesondere für die klinische Diagnostik am Patientenbett interessant.

2.2.2 Anwendungsgebiete

Aus den genannten Vorteilen leiten sich die häufigsten Anwendungsfelder des IMS ab. Insbesondere dort, wo eine schnelle Detektion wichtig ist, leistet das IMS gute Dienste. So wird es zur Detektion von Sprengstoffen als auch von chemischen Kampfstoffen wie Sarin oder Senfgas verwendet [42, 43]. In der pharmazeutischen Industrie findet das IMS ebenfalls seit langem seine Verwendung in der Qualitätskontrolle von pharmazeutischen Erzeugnissen, beziehungsweise in der Prozessüberwachung von Reinigungsmaßnahmen [44]. Ebenfalls ist auch die Lebensmittelindustrie auf die Möglichkeiten des IMS aufmerksam geworden. Hier dient es vor allem zur Überwachung und Steuerung von Reifungs- und Fermentationsprozessen. Erwähnt sei hier die alkoholische Gärung von Bier, welche bislang von Großbrauereien aufwendig mittels gaschromatographischer Verfahren überwacht wurde. Mit dem IMS steht ein deutlich weniger aufwendiges Werkzeug zur Verfügung, welches auch für kleinere Betriebe wirtschaftlich ist [45].

Aufgrund der vielfältigen und schnellen Anwendungsmöglichkeiten rückt zunehmend auch die medizinische Forschung in den Fokus der IMS-Anwendung. Hierbei ist unter anderem die Suche nach Biomarkern für bestimmte Erkrankungen oder pathophysiologischen Vorgängen ein wichtiges Betätigungsfeld diverser Arbeitsgruppen. Als Probemedium kommt die Expirationsluft des Menschen in Betracht. Beispielsweise konnten *Westhoff et al.* zeigen, dass sich anhand von Proben der Expirationsluft Sarkoidose-Patienten von Gesunden unterscheiden ließen [46]. Die Ionenmobilitätsspektrometrie wird auch im Bereich der Tumorforschung angewendet. So zeigten *Darwiche et al.*, dass Lungentumoren selbst VOCs zu „produzieren“ scheinen, indem sie bronchoskopisch gewonnene Proben der Expirationsluft von gesunder und erkrankter Lungenseite mittels IMS verglichen [47].

Das Verfahren ist auch für Fachrichtungen neben der Pulmologie von Interesse. Bereits im Mittelalter beurteilten Ärzte bei der sogenannten „Harnschau“ Patientenurin neben Farbe und Trübung auch nach seinem Geruch. Es scheint daher nur konsequent mittels IMS nach volatilen Biomarkern im Urin zu fahnden. So gelang es *Garrido-Delgado et al.* mittels IMS Aceton, einen Marker für stoffwechselassoziierte Erkrankungen im Urin nachzuweisen als auch quantitativ zu bestimmen [48].

Ein weiteres medizinisches Anwendungsfeld aus dem Bereich der Anästhesiologie ist die Überwachung des Wirkspiegels von Medikamenten, das sogenannte „Drug-Monitoring“. Von großem Interesse ist hier die Bestimmung von Propofol in der Ausatemluft. Bei Propofol handelt es sich um ein gebräuchliches Hypnotikum, welches in der Intensivmedizin zur Sedierung oder während Operationen zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose dient. *Kreuder et al.* konnten zeigen, dass zwischen der Exspiratorischen- sowie der Blutplasmakonzentration von Propofol ein enger Zusammenhang besteht [49]. Daraus resultiert die Möglichkeit zur Detektion und Quantifizierung von Propofol in der Atemluft mittels IMS. Durch eine Echtzeitüberwachung der Plasmakonzentration könnte IMS die Narkoseführung erheblich erleichtern, da bis dato neben diversen Rechenmodellen kein Verfahren existiert, das dieses erlaubt.

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Die dargestellten Sachverhalte zeigen, dass der sichere Nachweis einer Inflammation weiterhin eine große Herausforderung darstellt. Zugleich steht mit dem Ionenmobilitätsspektrometer eine einfache, kostengünstige Analysemethode zur Verfügung, welche in den letzten Jahren insbesondere im Bereich der Atemgasanalytik eingesetzt wurde. Zwischenzeitlich ist bekannt, dass verschiedene Erkrankungen zu charakteristischen Veränderungen in der Ausatemluft führen. Daher ist die Frage naheliegend, ob sich auch bei systemischer Inflammation veränderte VOC-Muster in der Expirationsluft zeigen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob und inwiefern sich mittels IMS anhand spezifischer VOCs systemische inflammatorische Prozesse in der Expirationsluft detektieren lassen. Für diesen Nachweis wurde ein bereits in der Literatur vielfach beschriebenes Tiermodell gewählt. Hierbei wird mittels Alpha-Toxin und Lipopolysaccharid in unterschiedlichen Dosierungen eine Inflammationsreaktion des Organismus provoziert.

Mit dieser Arbeit sollen insbesondere folgende Fragestellungen betrachtet werden:

1. Lässt sich mittels IMS-Analyse der Expirationsluft eine bestehende systemische inflammatorische Reaktion bei der Ratte detektieren?
2. Kann mittels IMS-Analyse der Expirationsluft eine Differenzierung zwischen unterschiedlichen Toxinen und deren Dosierungen als auslösende Agentien vorgenommen werden?

3. Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Medikamente

Narkoseinduktion und Aufrechterhaltung	
Atracurium 50mg/5ml	Hexal, Holzkirchen, Deutschland
Pentobarbital (Narcoren) 16g/100ml	Merial, Hallbergmoos, Deutschland
Sevofluran 100%/250ml	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Toxine	
Alpha-Toxin	List Biological Laboratories, Campbell, USA
Lipopolysaccharid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Sonstige	
Heparin-Natrium	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Sterofundin BG5	B.Braun, Melsungen, Deutschland
NaCl	B.Braun, Melsungen, Deutschland
ELISA	
ELISA Testset	BD Biosciences, San Diego, USA
	Rat IL-6 ELISA Set
Fangantikörper	Anti-Rat IL-6 monoclonal antibody
Detektionsantikörper	Biotinylated Anti-Rat IL-6 monoclonal antibody
Positiv-Kontrolle	Recombinant rat IL-6, lyophilized
Pufferlösung pH9,5	7,13g NaHCO ₃ + 1,59g Na ₂ CO ₃
Assay Diluent	10ml Fetal Bovine Serum 10% + 90ml PBS
Waschlösung	1 Liter PBS + 500µl Tween 20
Substratlösung	6 ml Tetramethylbenzidin + 6ml H ₂ O ₂
Phosphate-buffered saline (PBS) pH7	80,0g NaCL + 11,6g Na ₂ HPO ₄ + 2,0g KH ₂ PO ₄ + 2,0g KCL

3.2 Methoden

Nachfolgend werden die genutzten Labormethoden einschließlich der technischen Umsetzung der Ionenmobilitätsspektrometrie vorgestellt. Das verwendete Tiermodell richtet sich in wesentlichen Punkten nach einem von *Wolf et al.* etablierten hochstandardisiertem Modell zur Atemluftanalyse mittels MCC-IMS bei der Ratte [50].

3.2.1 Multikapillarsäulengekoppelte Ionenmobilitätsspektrometrie (MCC-IMS)

Die Ionenmobilitätsspektrometrie macht sich die unterschiedlichen Driftzeiten von Ionen in einem elektrischen Feld zu nutze. Hierzu gelangt die zu analysierende Probe mit einem Trägergas durch den Probeneinlass in die Ionisationskammer. Mittels einer Strahlenquelle werden die in der Probe enthaltenen Analyte ionisiert. In den hier genutzten Ionenmobilitätsspektrometern wurde eine ^{63}Ni -Strahlenquelle verwendet, welche β -Strahlung emittiert. Durch ein Schottgitter gelangen die ionisierten Analyte in die Driftregion. Die Ionen wandern entlang eines hier anliegenden elektrischen Feldes in Richtung der sogenannten Faraday-Platte, welche als Detektor fungiert. Üblicherweise werden hier Feldstärken von 200-500 V/cm genutzt. Dabei werden sie von einem Driftgas, welches die entgegengesetzte Flussrichtung aufweist, abgebremst. Treffen die Ionen schließlich auf die Faraday-Platte, entsteht ein Strom. Dieser wird verstärkt und stellt das Messsignal dar. Die Zahl der auftreffenden Ionen und damit die Signalstärke repräsentiert die Analytmenge. Um die Ionen, welche sich noch in der Driftstrecke bewegen, zu isolieren, befindet sich vor der Faraday-Platte ein Aperturgitter. Dieses gewährleistet eine kapazitive Entkopplung zwischen den Ionen an der Faraday-Platte und dem Ionenstrom im Drifttraum. Wird nun die Intensität des Stromes an der Faraday-Platte in V gegen die Zeit aufgetragen, erhält man das sogenannte IMS-Spektrogramm.

Anhand der unterschiedlichen Driftzeiten und Signalstärken ist es, nach Abgleich mit einer Datenbank, möglich einzelne VOCs zu identifizieren. Die Driftzeit der Ionen ist dabei von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Im Wesentlichen sind dies: die Driftstrecke, die Anzahl der Zusammenstöße der Ionen mit den Molekülen des Driftgases, die Moleküldichte des Driftgases und damit der Temperatur, sowie die Masse der Ionen selbst. Abbildung 3 zeigt exemplarisch das Funktionsprinzip eines Ionenmobilitätsspektrometers.

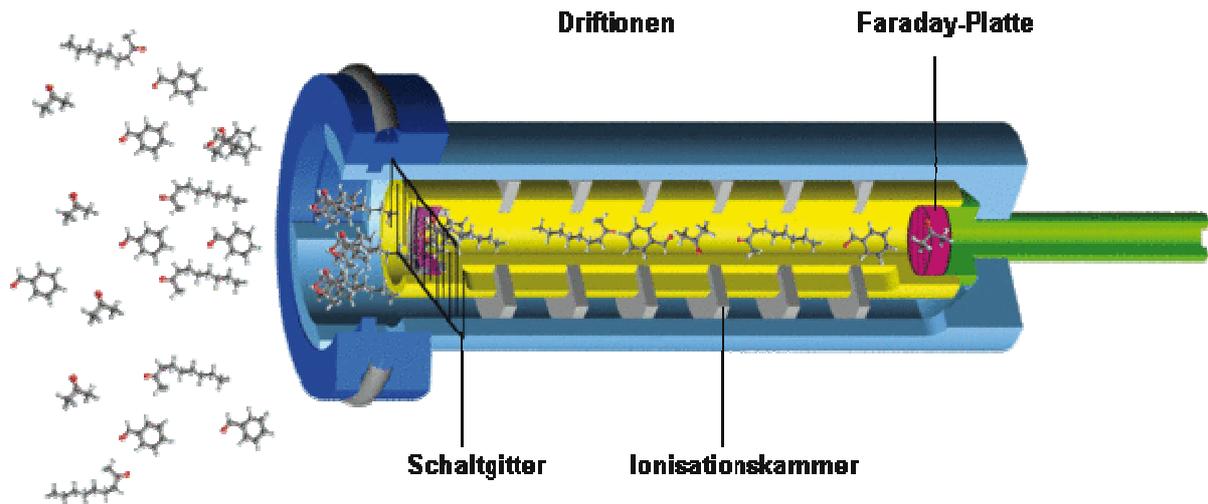


Abbildung 3: Funktionsprinzip eines Ionenmobilitätsspektrometers. Modifiziert nach [51]

Ein weiterer großer Einflussfaktor und ein nicht zu unterschätzendes Problem, insbesondere bei der Analyse von Expirationsluft, stellt deren Feuchtigkeit dar. Hohe Feuchtigkeit in der Ionisationskammer kann unter anderem zu einer gleichzeitigen Ionisation der Analyte und damit zu Signalüberlagerungen führen. Ein weiteres Phänomen stellt die Anlagerung von H_2O -Molekülen an die Ionen des Ionenschwarms dar. Dies führt zu vermehrten Kollisionen mit den Molekülen des Driftgases und damit zu einer Verschiebung der Driftzeiten. Was zeigt, dass die Bedingungen innerhalb der Driftröhre konstant gehalten werden müssen, um ein reproduzierbares Ergebnis zu erreichen.

Eine Lösung für dieses Problem resultierte aus der Vorschaltung einer Multikapillarsäule (MCC), welche über eine Vortrennung der Analyte die Spezifität weiter erhöht und gleichzeitig eventuell vorhandene Feuchtigkeit reguliert. Eine MCC besteht aus bis zu 1200 Kapillaren mit einem Durchmesser zwischen 50-250 μm und einer Länge von 50-300 mm. Die Betriebstemperatur bis max. 250 $^\circ\text{C}$ erlaubt eine zuverlässige Feuchtigkeitsseparation. Durch die Vortrennung der VOCs wird die Retentionszeit dem Spektrogramm des IMS hinzugefügt, welches dadurch eine dritte Dimension erhält. Werden VOCs rein nach ihrer Driftzeit aufgetrennt, kann es in Einzelfällen zu Überlagerungen durch ähnliches Driftverhalten kommen. Mittels einer weiteren Auftrennung über die Retentionszeit werden diese vermieden und die Spezifität der Methode hinsichtlich Differenzierung einzelner VOCs erhöht. Abbildung 4 zeigt exemplarisch ein typisches dreidimensionales IMS-Spektrogramm der Expirationsluft einer Ratte.

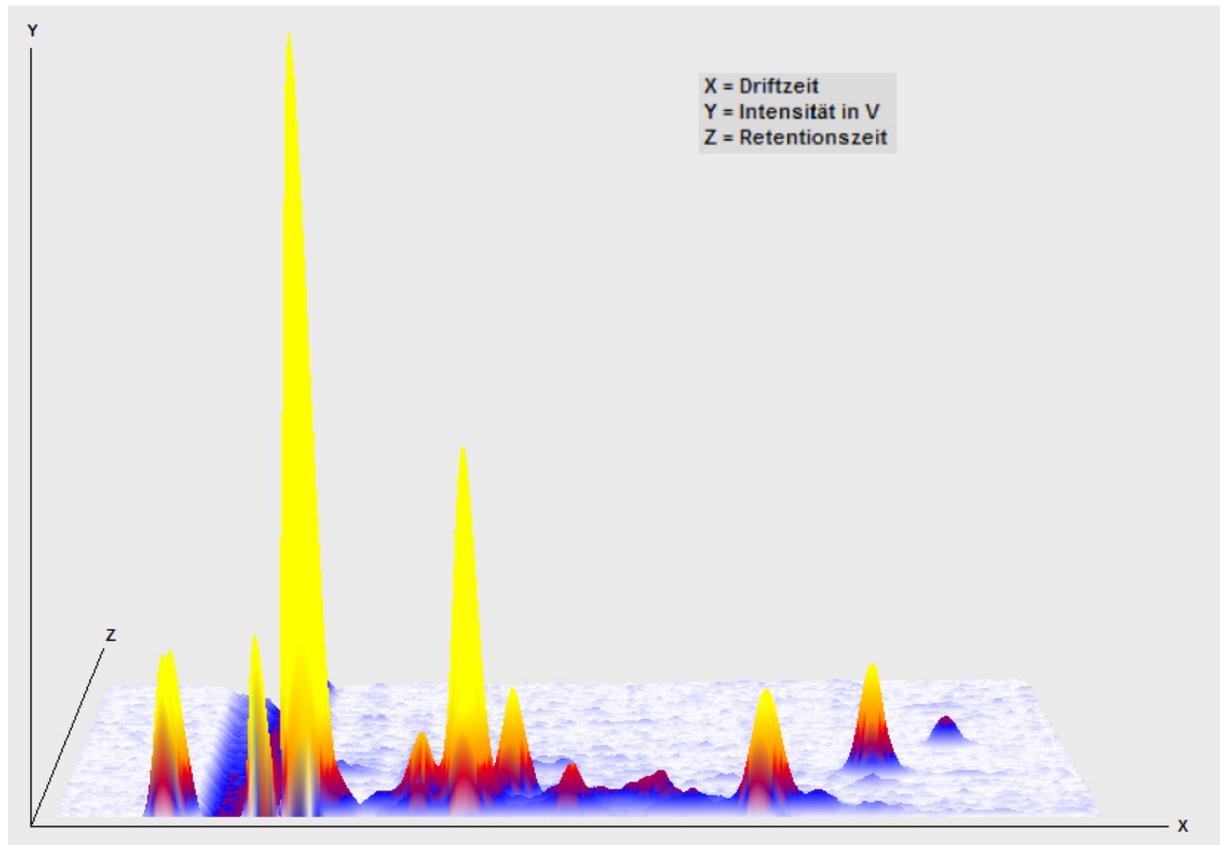


Abbildung 4: Beispielhaftes IMS-Spektrogramm einer Ratte

Verwendet wurden MCC-OV5 Multikapillarsäulen (Firma Multichrom, Novosibirsk, Russland). Prinzipiell existieren eine Reihe weiterer Analysemethoden, die je nach Analysezweck sinnvoll mit dem IMS gekoppelt werden können. Als Beispiel sei hier die Gaschromatographie genannt. Aufgrund fehlender Relevanz für vorliegende Arbeit sollen diese jedoch nicht weiter beschrieben werden.

3.2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 200-300 g und einem Alter von ca. 8-10 Wochen. Alle Versuche wurden durch die zuständige Tierschutzbehörde (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Saarbrücken) unter den Aktenzeichen C-1.2.4.2/36/2014 sowie C-1.2.4.2.41/2014 genehmigt. Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn bei einer Raumtemperatur von 20°C (\pm 2°C), sowie einem Tag/Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden gehalten. Als Futter diente Pelletfutter. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurde mit einer Nahrungskarenz begonnen. Wasser stand ihnen bis zur Narkoseeinleitung ad libitum zur Verfügung.

3.2.3 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in insgesamt 5 Gruppen (n = 10 Tiere pro Gruppe) randomisiert. Die Vehikel- oder Kontrollgruppe erhielt NaCl 0,9 % als Studienmedikation. Zur weiteren Differenzierung der beiden Toxine wurden, je Toxin, zwei Versuchsgruppen gebildet. Die erste Gruppe erhielt eine niedrige Dosierung (Low Dose), die zweite eine hohe (High Dose). Eine Übersicht der Versuchsgruppen mit den jeweiligen Dosierungen ist in Tabelle 5 dargestellt:

Tabelle 5: Versuchsgruppen und Medikation

Übersicht über die Versuchsgruppen und Medikation	
Gruppe	Studienmedikation
Vehikel	NaCl
LPS Low Dose	5mg/kg/KG
LPS High Dose	10mg/kg/KG
Alpha-Toxin Low Dose	40µg/kg/KG
Alpha-Toxin High Dose	80µg/kg/KG

In Abbildungen und Tabellen werden aus Platzgründen auch die Abkürzungen AT-LD und AT-HD für Alpha-Toxin Low Dose sowie Alpha-Toxin High Dose verwendet. Beziehungsweise LPS-LD und LPS-HD für LPS Low Dose und LPS High Dose.

3.2.4 Anästhesie und Präparation

Initial erfolgte eine Sedierung der Tiere mittels Sevofluran per inhalationem. Dazu wurden 2 ml Sevofluran in ein luftdicht verschlossenes Gefäß gegeben in welches das Versuchstier gesetzt wurde. Anschließend wurden die sedierten Tiere gewogen (Waage Kern 470-44, Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt, Deutschland), um eine gewichtsadaptierte Medikamenten- und Volumengabe zu gewährleisten. Die Fortführung der Narkose erfolgte durch die intraperitoneale Gabe von Pentobarbital in einer Dosierung von 60 mg/kgKG. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe, definiert als „keine Reaktion auf Schmerzreiz bei erhaltener Spontanatmung“, wurde mit der Präparation begonnen. Hierzu wurden die Tiere auf einer beheizbaren Aluminiumplatte (Terra Plus ComfortHeat Mat, Eurozoo K., Geilenkirchen, Deutschland) in Rückenlage fixiert. Während des Versuches wurde die Körperkerntemperatur mittels der beheizbaren Platte sowie einer über der Ratte angebrachten Wärmelampe (Reflektorlampe R50, Honsel Leuchten, Arnsberg, Deutschland) konstant bei 37°C (± 2°) gehalten.

Zu Beginn der Präparation erfolgte ein 1,5 cm langer medialer Hautschnitt vom Larynx bis zum Manubrium sterni. Nach Darstellung und Mobilisation der Trachea erfolgte eine Tracheotomie. Hierzu wurde eine Querinzision der Trachea im oberen Drittel durchgeführt und eine Trachealkanüle aus Edelstahl eingeführt, welche mittels Fäden fixiert wurde. Im weiteren Verlauf wurde die rechte V. jugularis interna freipräpariert, nach kranial ligiert und durch Einlage eines Polyethylenschlauches 0,58 x 0,96 mm Innen-/Außendurchmesser (neoLabMigge Laborbedarf, Heidelberg, Deutschland) katheterisiert. Über diesen zentralvenösen Katheter (ZVK) wurde als Volumenersatz mittels Spritzenpumpe (Fresenius Kabi, Injectomat®, TIVA Agilia, Bad Homburg, Deutschland) Sterofundin BG 5 in einer Dosierung von 5 ml/kgKG/h infundiert. Nach Anlage des ZVK fand die Darstellung der linken Arteria femoralis statt. Nach distaler Ligatur und proximalem Setzen einer Gefäßklemme erfolgte die Inzision, sowie ebenfalls die Einlage eines PE-Katheters und die Fixierung mittels Fäden. Hierüber wurde die invasive Messung und Aufzeichnung des arteriellen Druckes und der Herzfrequenz (PowerLab 8/35, LabChart V7, AD Instruments, Oxford, Großbritannien) sichergestellt.

Als letzter Schritt folgte schließlich die Präparation der Arteria carotis communis sinistra und Einlage eines Katheters (MLT 1450 T-Type, AD Instruments, Oxford, Großbritannien) in gleicher Technik zur Bestimmung des Herzzeitvolumens mittels transpulmonaler Thermodilution und Messung der Körperkerntemperatur. Abschließend wurden die Tiere durch die Gabe von 3 mg Atracurium relaxiert und mittels Kleintierbeatmungsgerät (KTR-5 small animal ventilator, Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Deutschland) maschinell beatmet. Die Beatmungsparameter wurden den physiologischen Verhältnissen der Ratte angepasst. Die Grundeinstellung bestand aus einer Atemfrequenz von 65 pro Minute, bei einem PEEP von 2 cmH₂O und einer Inspirationsratio von 45%. Das Tidalvolumen betrug 6-8 ml/kg/KG im Sinne einer lungenprotektiven Beatmung.

3.2.5 Versuchsprotokoll

Die maschinelle Beatmung der Tiere wurde nach Abschluss der Präparation wie oben beschrieben weitergeführt. Benutzt wurde synthetische Luft höchster Reinheit (O₂ 20,5 Vol-%, N₂ 79,5%, CO₂<100 ppb, CO <100 ppb, Kohlenwasserstoffe<50 ppb, Stickoxide<10 ppb, SO₂ <5 ppb, H₂S <5 ppb, H₂O<2 ppm; Air Liquide, Ludwigshafen, Deutschland). Die Entnahme der Atemluftproben erfolgte im Seitenstromprinzip am Expirationsschenkel des Beatmungsgerätes. Währenddessen wurden automatisiert alle 20 Minuten 10 ml über 20

Sekunden entnommen. Dies führte zu keiner kardiopulmonalen Beeinträchtigung der Versuchstiere.

Alle verwendeten Schlauchmaterialien waren aus Polytetrafluorethylen, die Verbindungsstücke aus Edelstahl und damit ebenfalls inert. Bereits vor Versuchsbeginn wurde eine Messung der Raum- und Respiratorluft durchgeführt. Die Messung der Raumluft wurde am Versuchsende wiederholt, um eventuelle Kontaminationen der Respiratorluft aufzudecken.

Die Narkose wurde durch 30-minütige Bolusgaben von Pentobarbital in einer gewichtsadaptierten Dosierung, ergänzt durch bedarfsadaptierte Gaben, aufrechterhalten. Wie Vorversuche von *Fink et al* gezeigt haben, scheinen einige Metabolite, beispielsweise Aceton, vom Stoffwechselstatus des Organismus abhängig zu sein [52]. Daher wurde eine Elektrolytlösung mit 5% Glukosezusatz zur Deckung des Flüssigkeitsbedarfs während des Untersuchungszeitraumes verwendet. Unter dieser Glukosesubstitution zeigten die Versuchstiere während des gesamten Versuchszeitraumes Blutzuckerwerte im Normbereich.

Zur Aufrechterhaltung der Relaxierung wurde diese mit Atracurium im Verhältnis 3 ml Atracurium (entsprechen 30 mg) ad 7 ml Sterofundin BG 5 versetzt. Die Laufrate über Perfusor (Fresenius Kabi, Injectomat®, TIVA Agilia, Bad Homburg, Deutschland) betrug 5 ml/kgKG/h. Es wurden kontinuierlich Herzfrequenz, Blutdruck, Körperkerntemperatur und die periphere Sauerstoffsättigung aufgezeichnet. Alle vier Stunden wurde das Herzzeitvolumen gemessen und eine Blutgasanalyse durchgeführt. Die Beatmungsparameter wurden nach einem standardisierten Schema den BGA-Ergebnissen angepasst.

Nach einer Adaptionphase von 30 Minuten erfolgte als sogenannte „Baseline“ die erste Blutgasanalyse und Messung des HZV, sowie die Abnahme von 0,5 ml Blut zur Zytokinbestimmung über den arteriellen Katheter. Nach Bestimmung der Baseline-Parameter fand die Gabe der Studienmedikation statt. Je nach Randomisierung Alpha -Toxin, LPS oder NaCl. Die Studienmedikation wurde über 20 Minuten fraktioniert verabreicht, um hämodynamisch wirksame Sofortreaktionen auf die Toxine zu vermeiden. Dieser Zeitpunkt wurde als Beginn des Beobachtungszeitraumes ($t=0$) definiert. Als Endpunkt wurden 24 Stunden Beobachtungszeit ($t=24$) oder der Tod der Tiere definiert. Nach Abschluss des Beobachtungszeitraums wurden die überlebenden Tiere mittels Pentobarbital eingeschläfert. Abbildung 5 zeigt den Versuchsaufbau in schematischer Übersicht.

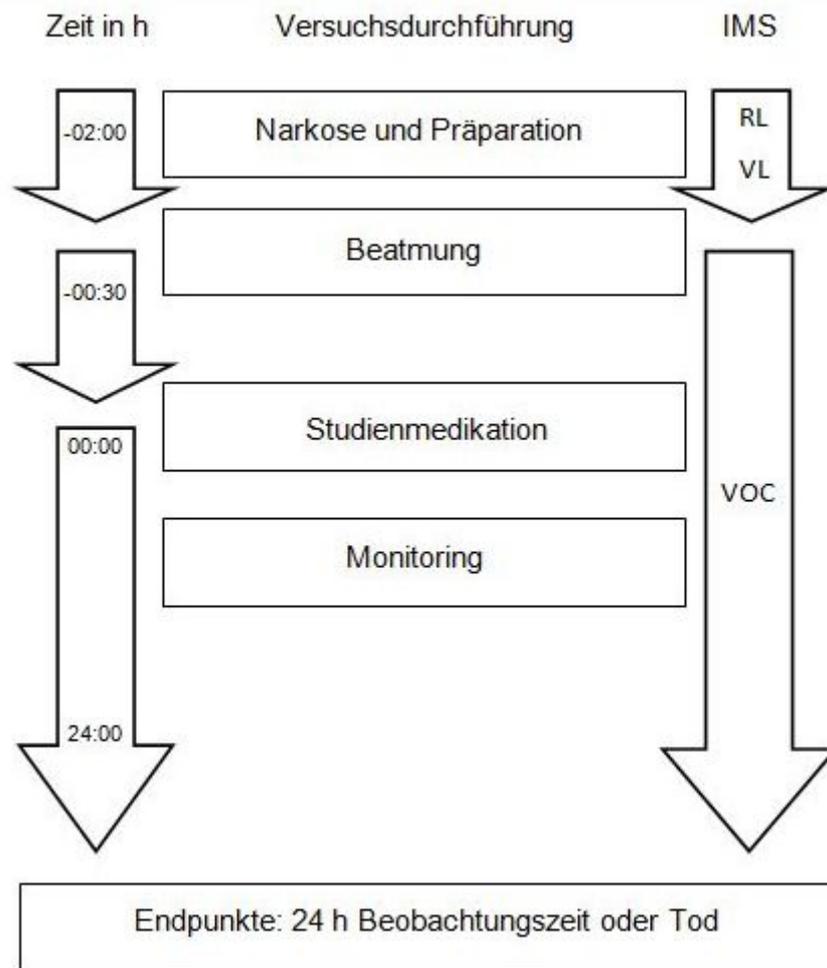


Abbildung 5: Überblick Versuchsaufbau; RL: Raumluftanalyse VL: Analyse Ventilatorluft, VOC: VOC-Analyse

3.2.6 Zytokinmessung mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ein ELISA ist ein 1971 durch *Perlmann* und *Engvall* beschriebenes Nachweisverfahren [53]. Das Prinzip beruht auf einer Antikörper-Reaktion, bei der das nachzuweisende Antigen von einem für das Antigen spezifischen Fangantikörper auf einer Mikrotiterplatte gebunden wird. Hierbei werden verschiedene Waschschriffe durchgeführt, um sicherzustellen, dass nur das nachzuweisende Antigen vorhanden ist. Nach Anreicherung des Antigens auf der Mikrotiterplatte (Well) wird ein Peroxidase-Antikörper zugefügt, welcher ebenfalls am Antigen bindet. Diese Reaktion wird als sogenanntes „Sandwich-Prinzip“ bezeichnet. Überschüssige Antikörper werden durch weitere Waschvorgänge entfernt. Mit Hilfe einer Peroxidase abhängigen Substratlösung erfolgt eine Fluoreszenzreaktion, welche sich in ihrer Stärke proportional zur Menge des gebundenen Antigens verhält.

Für den vorliegenden Versuch wurde Interleukin 6 (IL-6) mittels eines kommerziellen Testsets bestimmt. Die Durchführung richtete sich nach der Herstelleranweisung. Die Mikrotiterplatten wurden am Vortag mit dem Fangantikörper für IL-6 (50 µl/well) beschichtet und über Nacht bei 4 °C gekühlt. Am Versuchstag erfolgten fünf Waschzyklen mit der Waschlösung. Danach folgte die Beschichtung der Platten mit in Pufferlösung (PBS) gelöstem fetalem Rinderserum (200 µl/well) und Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur, um freie Bindungsstellen zu blocken. Hiernach folgten ebenfalls 5 Waschzyklen.

Nun mussten die Serumproben (50µl/well) hinzugegeben und 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurden zusätzlich Standard-Verdünnungsreihen mit absteigenden Cytokinkonzentrationen ebenfalls auf die Platten pipettiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde der Detektionsantikörper in einer Konzentration von 50 µl/well gelöst in einem Verdünnungsmittel (Diluent) hinzugegeben. Danach wurden die Platten eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und noch weitere fünf mal gewaschen.

Im nächsten Schritt war es nötig das Katalysatorenzym Peroxidase zuzusetzen und die Wells 30 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Hierzu wurden 50 µl Enzyme-Reagent in einer Konzentration von 1:250 mit Diluent verdünnt. Nach diesem Schritt wurden die Wells erneut siebenmal gewaschen, um überschüssiges Enzym zu entfernen. Zum Start der Farbreaktion mussten abschließend 100 µl/well Substratlösung zugesetzt und die Wells abermals 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert werden. Durch Zugabe von 50 µl/well 1 molarer Schwefelsäure wurde die Reaktion schließlich abgestoppt. Die photometrische Absorptionsmessung wurde mittels ELISA-Reader (Mikrotek-Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels zugehöriger Software (Mikrotek-Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland).

3.2.7 Auswertung und Statistik

Die graphische Darstellung der einzelnen Analyte der Expirationsluft basiert auf ihrer Retentionszeit in der Multikapillarsäule und der Driftzeit in der Ionisationskammer des IMS. Die Identifizierung der einzelnen Atemluftsignale wurde mit der Software Visual Now, Version 3.1 (B&S Analytik, Dortmund, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden alle gefundenen Analyte mit einer Signalintensität zwischen 1 mV und 5 V als Signalpeak definiert. Die Identifizierung der Signalpeaks als spezifische Substanz erfolgte im Folgenden mittels der datenbankgestützten (MCC/IMS Database Version 1209 B&S Analytik, Dortmund,

Deutschland) Auswertesoftware MIMA (KIST Europe, Saarbrücken, Deutschland). Konnte einem Peak keine Substanz zugeordnet werden, wurde dieser als „unknown“ beschrieben.

Die statistische Auswertung der Versuchsgruppen erfolgte auf Grundlage der folgenden Parameter: Überlebenszeit, Vitalparameter, Zytokinkonzentration und detektierten Atemluftsignalen. Die LPS High Dose Gruppe wies im Versuch eine hohe Letalität auf. Daher wurde der Beobachtungszeitraum dieser Gruppe angepasst und auf acht Stunden begrenzt. Der Beobachtungszeitraum aller anderen Gruppen (0-24 Stunden) blieb von dieser Maßnahme unberührt. Die statistischen Vergleiche zwischen den Gruppen fanden zu bestimmten Zeitpunkten nach 4, 8, 16 und 24 Stunden statt. Zuerst wurde mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Sofern diese gegeben war, wurde eine Varianzanalyse (oneway ANOVA) durchgeführt, gefolgt vom Holm-Sidak-Test zur Korrektur multipler Vergleiche. Bei Fehlen einer Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-Rangsummentest angewandt. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

Zum Vergleich innerhalb der Gruppen wurde eine Varianzanalyse für verbundene Stichproben (repeated measurement ANOVA), ebenfalls gefolgt vom Holm-Sidak Test, durchgeführt. P-Werte $< 0,05$ wurden hier gleichermaßen als statistisch signifikant angesehen.

Die Analyse der Überlebenszeit erfolgte mittels Log-Rank-Test nach Kaplan Meier. Zur Analyse der Zytokinkonzentration wurde die statistische Betrachtung für alle Gruppen auf die Zeitpunkte 0 und 12 Stunden beschränkt, um einen Bias aufgrund der Fallzahl auszuschließen. Um einzelne Extremwerte abzufangen, wurden zum Vergleich zwischen den Gruppen, jeweils die Medianwerte der Plasmakonzentration herangezogen. Auch hier musste zuerst auf Normalverteilung geprüft werden. Bei negativem Ergebnis konnte als Rangsummentest der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt werden. Als post-hoc-Test wurde die Dunn's Methode angewandt, um die Gruppen paarweise zu vergleichen. Alle statistischen Berechnungen wurden mittels SigmaPlot (Version 12.5; Systat Software Erkrath, Deutschland) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Überlebenszeit

Alle Versuchstiere der Kontrollgruppe überlebten den Beobachtungszeitraum von 24 Stunden.

Hingegen wiesen die mit Lipopolysaccharid behandelten Gruppen die höchste Sterblichkeit auf. In der LPS High Dose Gruppe betrug die mittlere Überlebenszeit 11,6 Stunden ($p < 0,05$; Kontrollgruppe: 24 h vs. LPS High Dose: $11,6 \pm 1,3$ h; CI 95 % 9,1 – 14,1 h), in der Low Dose Gruppe 13,4 Stunden ($p < 0,05$; Kontrollgruppe: 24 h vs. LPS Low Dose: $13,4 \pm 1,7$ h; CI 95 % 10,1 – 16,7 h). Damit unterscheiden sich beide LPS Gruppen signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe. Zwischen beiden LPS Gruppen zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied für die Überlebenszeit.

Bei den mit Alpha-Toxin behandelten Gruppen überlebten in der Low Dose Gruppe alle Tiere den Versuchszeitraum. Die Tiere der High Dose Gruppe zeigten mit einer mittleren Überlebenszeit von 22,8 Stunden (Alpha-Toxin High Dose: $22,8 \pm 1,1$ h; CI 95 % 20,8 – 24,0 h) ein verkürztes Überleben, die sich jedoch zur Kontrollgruppe als auch zur Low Dose-Gruppe nicht signifikant unterschied.

Abbildung 6 gibt einen Überblick über die Überlebenszeiten der einzelnen Versuchsgruppen.

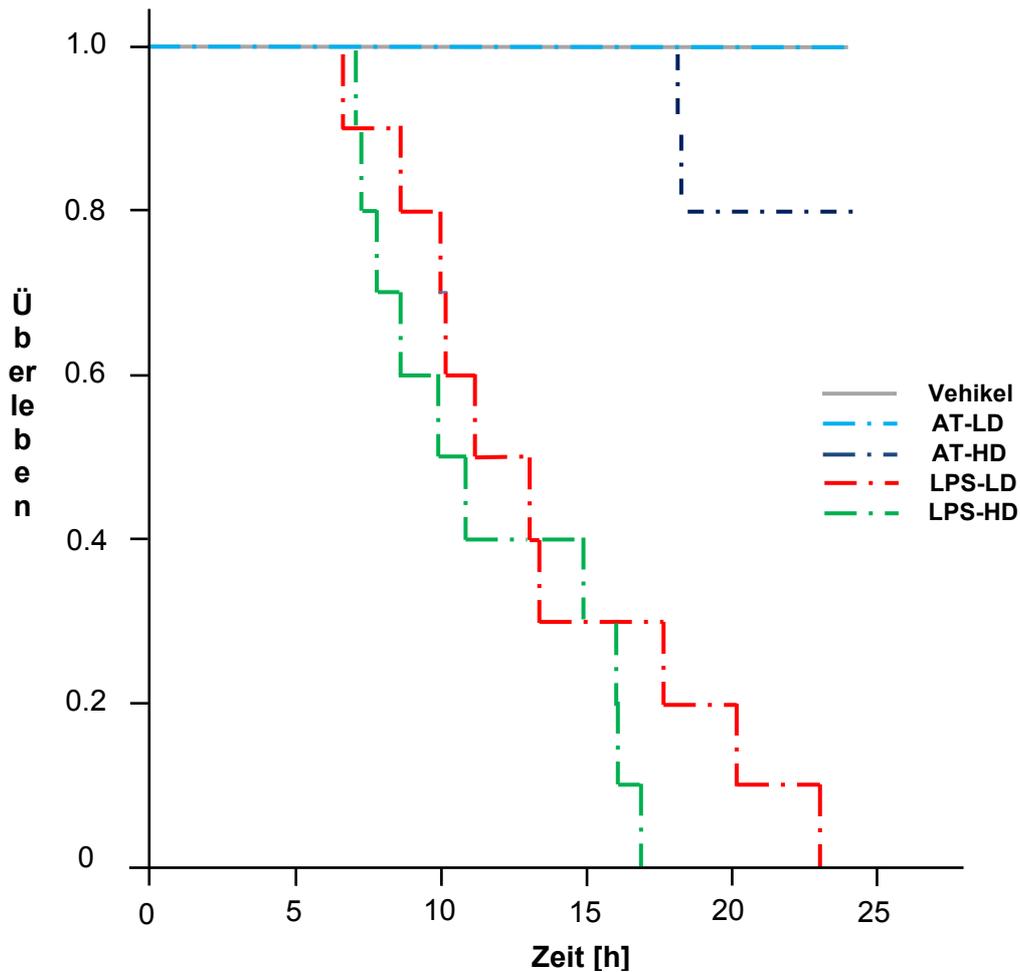


Abbildung 6: Überlebenszeiten nach Kaplan Meier. $p < 0.05$ LPS-LD und HD vs Vehikel. AT-LD (Alpha-Toxin Low Dose): 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG AT, AT-HD (Alpha-Toxin High Dose): 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG AT, LPS-LD (Lipopolysaccharid Low Dose): 5 mg/kg KG LPS. LPS-HD (Lipopolysaccharid High Dose): 10 mg/kg KG LPS.

4.2 Blutgasanalyse und Vitalparameter

4.2.1 Blutgasanalyse

Nach Versuchsprotokoll wurde vor Beginn des Beobachtungszeitraumes sowie alle vier Stunden danach, eine Blutgasanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die Parameter pH, pO_2 , CO_2 , Basenüberschuss (BE) und Laktat analysiert. In der Auswertung der Ausgangswerte zeigten alle Versuchsgruppen vergleichbare Werte innerhalb des jeweiligen Referenzbereiches. Nach Induktion der Inflammation konnte in beiden LPS-Gruppen ein signifikanter Anstieg von Laktat und BE sowie ein zeitlich leicht verzögerter pH-Abfall festgestellt werden ($p < 0,05$ für LPS Low Dose/High Dose vs. Vehikel für Laktat und BE bei 4 h und 8 h, sowie für pH bei 8 h). Die beiden Alpha-Toxin Gruppen zeigten einen signifikanten BE-Anstieg im Vergleich zur Vehikelgruppe ($p < 0,05$ ab 16 h für Alpha-Toxin Low Dose sowie ab 20 h für Alpha-Toxin High Dose im Vergleich zu den Ausgangswerten). Tabelle 6 gibt einen Überblick über die erhobenen BGA-Parameter.

Ergebnisse

Tabelle 6: Übersicht über die Ergebnisse der Blutgasanalyse. BE: Basenüberschuss, pO₂: Sauerstoffpartialdruck, pCO₂: Kohlenstoffdioxidpartialdruck, AT-LD (Alpha-Toxin Low Dose): 40 µg/kg KG AT, AT-HD (Alpha-Toxin High Dose): 80 µg/kg KG AT. LPS-LD (Lipopolysaccharid Low Dose): 5 mg/kg KG LPS. LPS-HD (Lipopolysaccharid High Dose): 10 mg/kg KG LPS. Basierend auf der Überlebenszeitanalyse der LPS-Gruppen, wurden die statistischen Analysen für den Zeitraum 0-8h betrachtet.

	0 h		4 h		8 h		12 h	
pH								
Vehikel	7,43	± 0,05	7,46	± 0,03	7,48	± 0,03	7,46	± 0,04
AT-LD	7,38	± 0,05	7,44	± 0,03	7,44	± 0,03	7,45	± 0,05
AT-HD	7,45	± 0,04	7,47	± 0,03	7,47	± 0,04	7,45	± 0,07
LPS-LD	7,44	± 0,07	7,41	± 0,04	7,31 ^{**}	± 0,03	7,31	± 0,06
LPS-HD	7,41	± 0,04	7,36	± 0,09	7,30 ^{**}	± 0,13	7,38	± 0,06
BE								
Vehikel	1,7	± 1,8	-0,6	± 2,1	-0,2	± 1,2	1,6	± 1,8
AT-LD	1,8	± 2,0	-0,7	± 2,6	-0,8	± 2,1	-0,8	± 3,0
AT-HD	1,5	± 2,0	-1,8	± 1,8	-3,2	± 2,2	-1,7	± 2,6
LPS-LD	0,7	± 1,6	-7,5 ^{**}	± 2,9	-11,7 ^{**}	± 4,8	-11,5	± 5,3
LPS-HD	2,3	± 2,1	-6,0 ^{**}	± 3,0	-11,6 ^{**}	± 6,7	-10,9	± 7,0
Laktat [mmol/l]								
Vehikel	0,9	± 0,3	0,6	± 0,1	0,9	± 0,3	0,9	± 0,2
AT-LD	0,7	± 0,2	0,7	± 0,3	1,3	± 1,3	1,3	± 1,0
AT-HD	0,9	± 0,1	0,9	± 0,2	0,8	± 0,2	0,8	± 0,2
LPS-LD	95,9	± 26,5	88,4	± 19,8	101	± 13,0	102	± 7,6
LPS-HD	88,2	± 14,7	75,2	± 10,2	91,9	± 32,8	106	± 52,0
pO₂ [mmHg]								
Vehikel	83,6	± 12,8	85,7	± 11,5	97,9	± 16,4	84,9	± 10,8
AT-LD	81,6	± 17,2	86,2	± 7,9	81,2	± 6,2	94,8	± 18,9
AT-HD	83,0	± 10,6	96,0	± 13,9	102	± 18,1	92,5	± 9,4
LPS-LD	95,9	± 26,5	88,4	± 19,8	101	± 13,0	102	± 7,6
LPS-HD	88,2	± 14,7	75,2	± 10,2	91,9	± 32,8	106	± 52,0
pCO₂ [mmHg]								
Vehikel	40,4	± 7,3	32,7	± 2,8	31,6	± 3,3	35,3	± 4,4
AT-LD	45,4	± 7,2	34,4	± 3,5	34,7	± 1,9	33,2	± 2,4
AT-HD	36,6	± 3,2	30,3	± 3,3	29,1	± 4,9	32,7	± 5,8
LPS-LD	32,7	± 4,8	29,1	± 4,9	27,7	± 8,0	29,7	± 5,0
LPS-HD	40,3	± 7,5	35,6	± 5,3	29,0	± 7,3	24,2	± 8,4

Ergebnisse

	16 h		20 h		24 h	
pH						
Vehikel	7,47	± 0,02	7,46	± 0,04	7,40	± 0,05
AT-LD	7,41	± 0,06	7,38	± 0,05	7,38	± 0,08
AT-HD	7,46	± 0,04	7,47	± 0,05	7,48	± 0,10
LPS-LD	7,32	± 0,10	7,27	± 1,30		
LPS-HD	7,26	± 0,43				
BE						
Vehikel	-1,2	± 1,8	-2,0	± 2,3	-2,3	± 2,0
AT-LD	-4,6 #	± 2,6	-7,2 #	± 3,1	-6,6 #	± 4,6
AT-HD	-3,5	± 2,4	-4,0 #	± 3,0	-5,4 #	± 3,2
LPS-LD	-15,70	± 7,7	-17,60	± 12,7		
LPS-HD	-15,70	± 9,70				
Laktat [mmol/l]						
Vehikel	0,8	± 0,2	0,7	± 0,2	1,3	± 0,9
AT-LD	1,0	± 0,4	1,1	± 0,6	1,2	± 0,6
AT-HD	1,0	± 0,2	1,1	± 0,2	1,7	± 0,6
LPS-LD	103	± 41,5	91,0	± 70,5		
LPS-HD	89,1	± 48,6				
pO₂ [mmHg]						
Vehikel	94,1	± 15,3	87,5	± 15,5	84,8	± 17,0
AT-LD	87,1	± 18,8	86,3	± 8,4	90,6	± 16,4
AT-HD	96,1	± 13,5	101	± 19,7	90,3	± 31,6
LPS-LD	103	± 41,5	91,0	± 70,5		
LPS-HD	89,1	± 48,6				
pCO₂ [mmHg]						
Vehikel	31,1	± 3,1	30,7	± 3,7	37,6	± 4,0
AT-LD	31,8	± 4,1	30,3	± 2,2	30,9	± 2,5
AT-HD	31,1	± 1,4	37,5	± 2,4	32,2	± 4,9
LPS-LD	20,3	± 6,6	20,7	± 64,8		
LPS-HD	24,8	± 12,5				

Darstellung: Mittelwert ± 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts

* p < 0,05 vs. Vehikel; # p < 0,05 vs. Baseline

Ergebnisse

4.2.2 Herzzeitvolumen

Alle Tiere zeigten bei Versuchsbeginn ein Herzzeitvolumen im physiologischen Bereich der Ratte ($90,9 \pm 19,3$ ml/min, CI 95% $90,9 \pm 5,7$ ml/min). Beide LPS Gruppen sowie beide Alpha-Toxin Gruppen zeigten im weiteren Versuchsverlauf keine signifikanten Unterschiede zur Vehikel-Gruppe, wie aus Tabelle 7 ersichtlich wird.

Tabelle 7: Herzzeitvolumen. AT-LD (Alpha-Toxin Low Dose): 40 µg/kg KG AT, AT-HD (Alpha-Toxin High Dose): 80 µg/kg KG AT. LPS-LD (Lipopolysaccharid Low Dose): 5 mg/kg KG LPS. LPS-HD (Lipopolysaccharid High Dose): 10 mg/kg KG LPS.

	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
Überlebensrate							
Vehikel	10	10	10	10	10	10	10
AT-LD	10	10	10	10	10	10	10
AT-HD	10	10	10	10	10	8	8
LPS-LD	10	10	8	5	3	2	0
LPS-HD	10	10	7	4	3	0	0
Herzzeitvolumen [ml/min]							
Vehikel	92,3 ± 16,3	102 ± 31,1	105 ± 40,4	97,7 ± 14,9	106 ± 23,6	136 ± 52,9	167 ± 66,5
AT-LD	88,5 ± 13,2	103 ± 9,9	108 ± 21,1	98,8 ± 23,9	148 ± 64,4	142 ± 24,1	138 ± 29,9
AT-HD	88,8 ± 36,7	93,7 ± 17,3	70,4 ± 16,3	72,0 ± 13,0	103 ± 19,6	106 ± 17,6	98,9 ± 98,1
LPS-LD	85,1 ± 8,7	75,4 ± 18,1	64,4 ± 14,4	75,0 ± 20,6	45,7 ± 48,4	21,0 ± 34,5	
LPS-HD	96,2 ± 15,0	101 ± 12,1	80,8 ± 26,4	90,5 ± 110	90,8 ± 68,2		

Darstellung: Mittelwert ± 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts.

4.2.3 Mittlerer Arterieller Blutdruck

Zu Beginn zeigten alle Versuchsgruppen physiologische Werte ($106,78 \pm 21,7$; CI 95% $106,78 \pm 6,13$) des Mittleren Arteriellen Blutdrucks (MAP). Die Vergleichstiere zeigten über den kompletten Versuchszeitraum stabile, normotensive MAP-Werte. Bei den Inflammationsgruppen wiesen beide LPS Gruppen nach Applikation der Studienmedikation einen kontinuierlichen MAP-Abfall im Vergleich zu den Vergleichstieren auf ($p < 0,05$; für LPS Low Dose vs. Vehikel nach 16 h, für LPS High Dose vs. Vehikel zum Zeitpunkt 12 h und ab 14 h). In den Alpha-Toxin Gruppen zeigte sich bezogen auf den MAP kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.3 Zytokinbestimmung

Als inflammatorischer Marker wurde das Zytokin Interleukin 6 (IL-6) bestimmt. Hier zeigte sich zum Ausgangszeitpunkt kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Zum Zeitpunkt 12 Stunden zeigte sich für die LPS Low Dose wie auch für die LPS High Dose Gruppe ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentration für Interleukin 6 im Vergleich zur Vehikelgruppe (Median für LPS-LD 4955,5 pg/ml für LPS-HD 5250,0 pg/ml vs. 277,5 pg/ml

Ergebnisse

für Vehikel $p < 0,05$). Für Beide Alpha-Toxin Gruppen zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied zur Vergleichsgruppe.

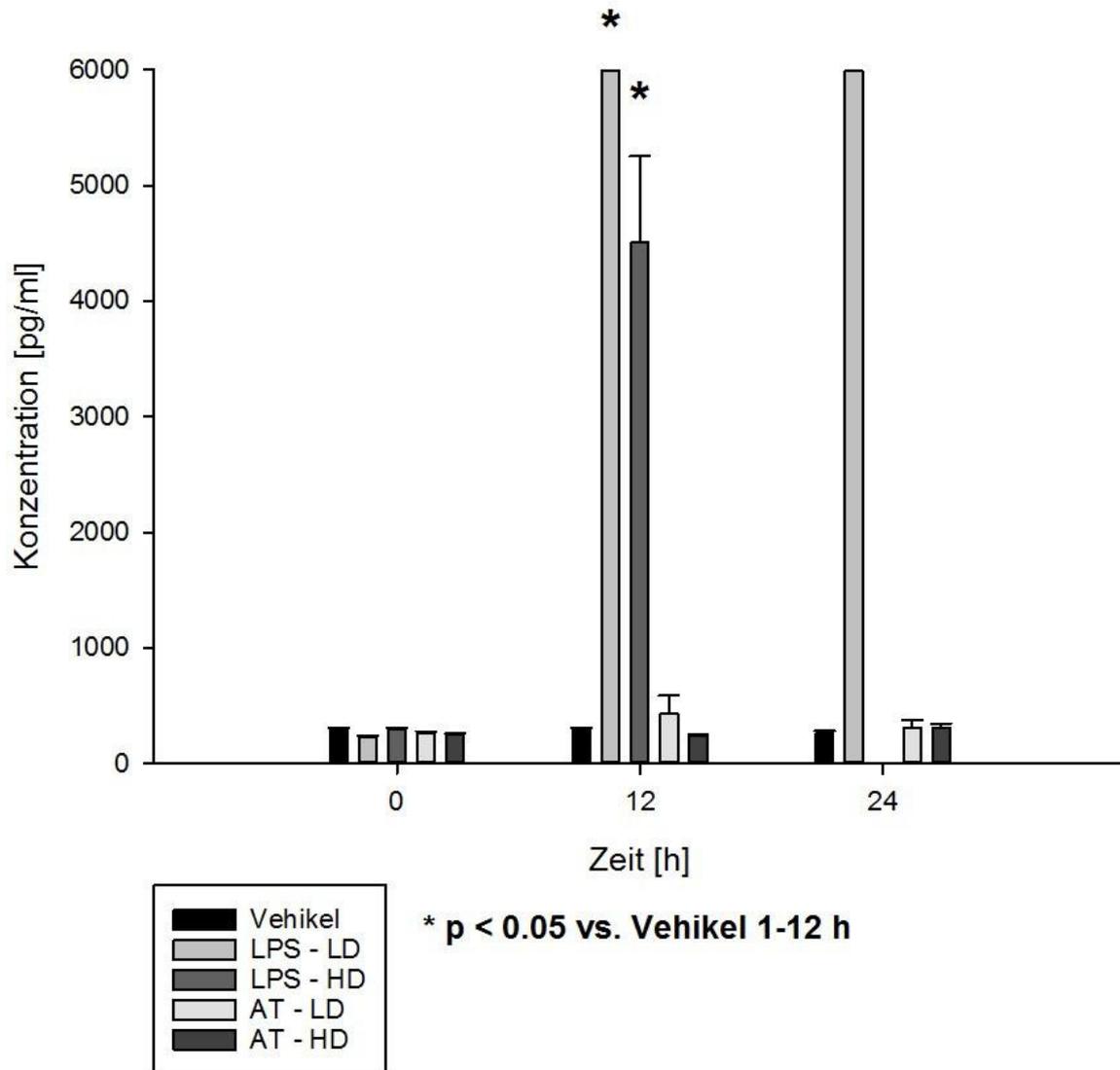


Abbildung 7: Ergebnisse der Zytokinkonzentrationsmessung. AT-LD (Alpha-Toxin Low Dose): 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG AT, AT-HD (Alpha-Toxin High Dose): 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG AT. LPS-LD (Lipopolysaccharid Low Dose): 5 mg/kg KG LPS. LPS-HD (Lipopolysaccharide High Dose): 10 mg/kg KG LPS. Darstellung: Median \pm 95% Konfidenzintervall.

4.4 Atemluftanalyse

Gemessen wurde die Intensität der einzelnen flüchtigen organischen Verbindungen (volatile organic compounds VOCs) als elektrisches Summensignal an der Detektorplatte des IMS. Zu Versuchsbeginn konnten 73 verschiedene VOCs detektiert werden. Zwischen den einzelnen Gruppen ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisen. Von 73 detektierten VOCs konnten 35 der Respiratorluft zugeordnet werden, da sie bereits vor Versuchsbeginn in der Luftfraktion des Beatmungsgerätes vorhanden waren. Alle anderen gefundenen VOCs waren alleine der Expirationsluft der Versuchstiere zuzuordnen. Von insgesamt 73 VOCs konnten mit der verwendeten Datenbank 49 identifiziert und mittels Substanzdatenbank analysiert werden. Tabelle 8 gibt einen Überblick über alle identifizierten VOCs.

Ergebnisse

Tabelle 8: Identifizierte VOCs

Signal	Analyt	1/K0	RT	Signal	Analyt	1/K0	RT
R1	2-Methylpentan	0,51	7,40	AL0	Isopropylalkohol	0,53	1,30
R2	Ethanol	0,51	1,40	AL1	Aceton	0,55	1,20
R3	2-Pentanon (Monomer)	0,55	5,90	AL2	1-Propanol	0,63	2,60
R4	Cyclohexanon (Monomer)	0,57	11,60	AL3	2-Methylfluran	0,66	3,60
R5	1-Pentanol	0,61	8,00	AL4	unknown	0,68	3,50
R6	2-Hexanon	0,58	5,90	AL5	1-Butanol	0,70	3,60
R7	5-Methyl-3-heptanon	0,63	16,30	AL6	Dimethylsulfid	0,50	5,80
R8	2-Ethyl-1-hexanol	0,70	33,10	AL7	3-Pentanon (Monomer)	0,55	8,20
R9	Nonan	0,73	57,30	AL8	unknown	0,79	3,10
R10	2-Octanol	0,70	25,20	AL9	3-Pentanon (Dimer)	0,67	7,80
R11	1-Butanol	0,69	5,90	AL10	Hexanol	0,66	7,90
R12	n-Nonan	0,72	12,40	AL11	2-Hexanol	0,64	10,90
R13	unknown	0,74	6,80	AL12	2-Heptanon	0,62	11,50
R14	1-Hexanol	0,80	8,00	AL13	unknown	0,68	11,20
R15	2-Heptanol	0,83	16,30	AL14	2,2,4,6,6-Pentamethyl-heptan	0,67	29,10
R16	p-Cymol (Dimer)	0,83	28,10	AL15	unknown	0,72	3,50
R17	unknown	0,90	113,60	AL16	2-Heptanol	0,66	11,30
R18	(-)-Menthol	0,90	102,30	AL17	Acetophenon	0,55	37,70
R19	unknown	0,92	133,50	AL18	Terpinolen	0,62	47,70
R20	p-Cymol (Monomer)	0,58	22,80	AL19	2-Butanon	0,53	6,80
R21	unknown	0,73	8,40	AL20	unknown	0,80	3,20
R22	4-Heptanon	0,78	15,30	AL21	Heptanal	0,67	10,10
R23	3-Hydroxy-2-Butanon	0,65	5,90	AL22	unknown	0,91	2,90
R24	Isopropylamin	0,59	3,10	AL23	unknown	0,94	3,10
R25	2-Propanol	0,53	2,60	AL24	Phenylacetaldehyd	0,74	29,70
R26	2-Pentanon (Dimer)	0,56	2,00	AL25	unknown	0,63	16,30
R27	Butanal	0,63	7,90	AL26	unknown	0,79	7,80
R28	Cyclohexanon (Dimer)	0,71	5,40	AL27	1-Pentanol	0,62	7,00
R29	unknown	0,85	231,30	AL28	Cyclohexanol (Dimer)	0,77	11,60
R30	unknown	0,95	287,70	AL29	unknown	0,61	21,30
R31	unknown	0,98	424,60	AL30	unknown	0,62	21,30
R32	unknown	0,99	536,30	AL31	3-Caren	0,65	26,40
R33	unknown	0,98	568,00	AL32	D-Limonen	0,60	29,40
R34	Cyclohexanon (Monomer)	0,76	11,20	AL33	unknown	0,58	38,10
R35	unknown	0,70	16,00	AL34	unknown	0,60	48,00
				AL35	unknown	0,56	52,30
				AL36	Decanal	0,77	121,80
				AL37	unknown	0,54	60,80

R: VOCs die sowohl in der Ausatemluft als auch im Respirator detektiert wurden. **AL:** VOCs die nur in der Ausatemluft der Versuchstiere detektiert wurden. **1/K0** = Driftzeit **RT** = Retentionszeit. **Unknown** = VOC nicht in Datenbank.

Im Folgenden erfolgt eine Darstellung der Ergebnisse für die einzelnen Studiengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.4.1 Alpha-Toxin

Hier ließen sich für folgende VOCs signifikante Unterschiede darstellen: 1-Butanol, 1-Pentanol, Butanal und Isopropylamin.

1-Butanol zeigte in der Low Dose Gruppe keinen Unterschied zur Vergleichsgruppe. In der High Dose Gruppe kam es jedoch zu einem kontinuierlichen Intensitätsanstieg, welcher nach achtzehn Stunden das Signifikanzniveau zur Vergleichsgruppe sowie nach zwanzig Stunden gegenüber der Low Dose Gruppe überschritt. Für 1-Pentanol zeigte sich in Beiden Alpha-Toxin Gruppen eine Intensitätszunahme. Diese überschritt jedoch nur in der High Dose Gruppe nach zwanzig Stunden das Signifikanzniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Isopropylamin zeigte in beiden Gruppen einen Intensitätsabfall, welcher sich auch hier nur in der High Dose Gruppe ab vier Stunden als signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe erwies. Ein ähnliches Verhalten konnte bei der Substanz Butanal beobachtet werden. Hier kam es in allen Tiergruppen zu einem Intensitätsabfall, der sich ebenfalls nur in der High Dose Gruppe und auch hier ab dem Zeitpunkt vier Stunden als signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe zeigte. Die Abbildungen 8-11 zeigen die Verläufe der einzelnen VOC-Signalintensitäten über die Zeit.

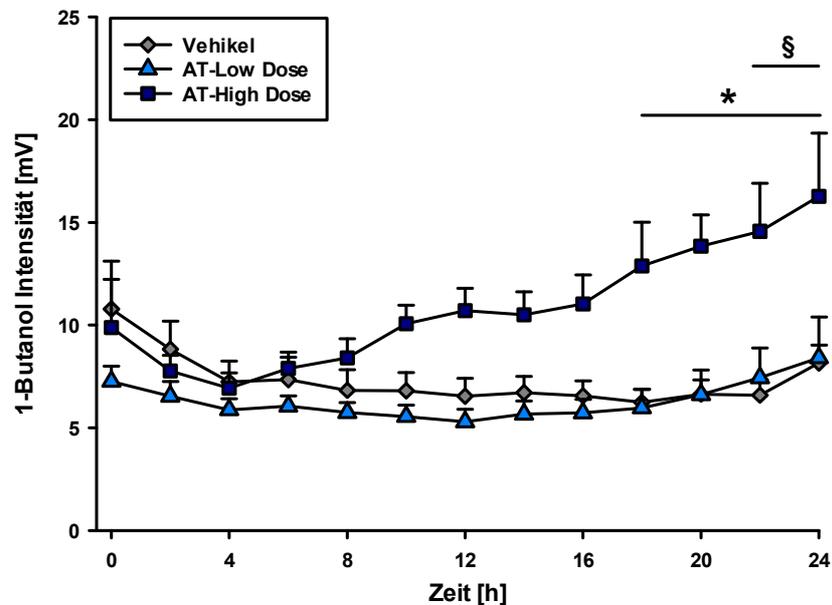


Abbildung 8: Signalintensität von 1-Butanol. AT-Low Dose: 40 µg/kg KG AT, AT-High Dose: 80 µg/kg KG AT * p<0,05 AT-HD vs. Vehikel, § p<0,05 AT-Low Dose vs. AT-High Dose. Daten dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung.

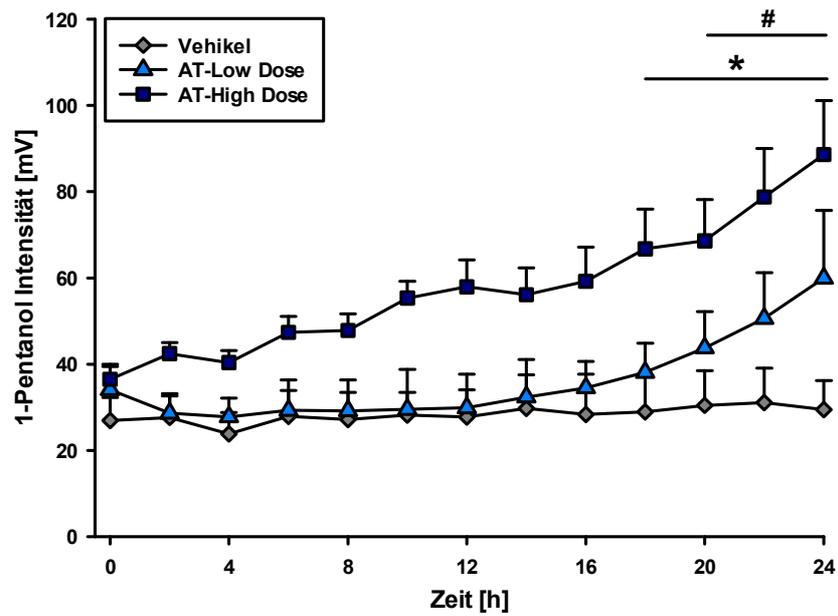


Abbildung 9: Signalintensität von 1-Pentanol. AT-Low Dose: 40 µg/kg KG AT, AT-High Dose: 80 µg/kg KG AT * p<0,05 AT-High Dose vs. Vehikel, # p<0,05 AT-HD vs. 0 h. Daten dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung.

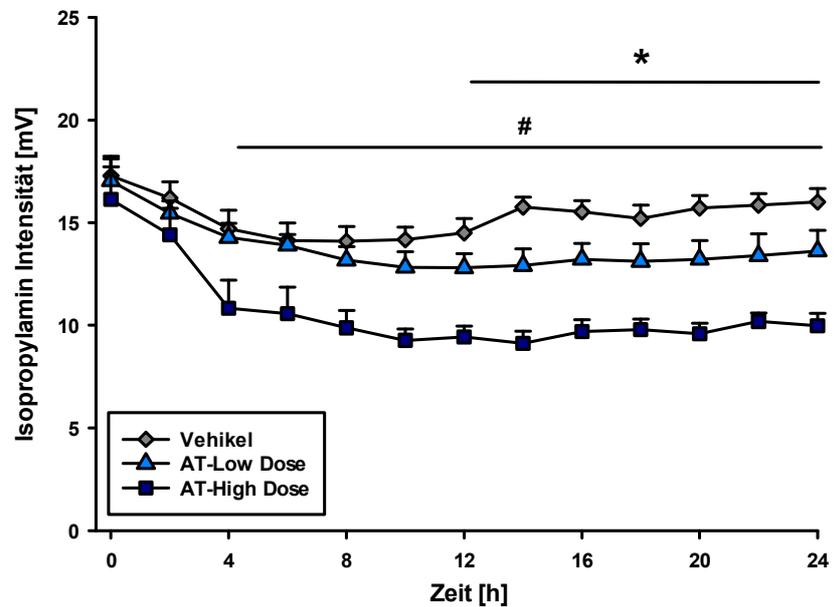


Abbildung 10: Signalintensität von Isopropylamin. AT-Low Dose: 40 µg/kg KG AT, AT-High Dose: 80 µg/kg KG AT * p<0,05 AT-High Dose vs. Vehikel, # p<0,05 AT-High Dose vs. 0 h. Daten dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung.

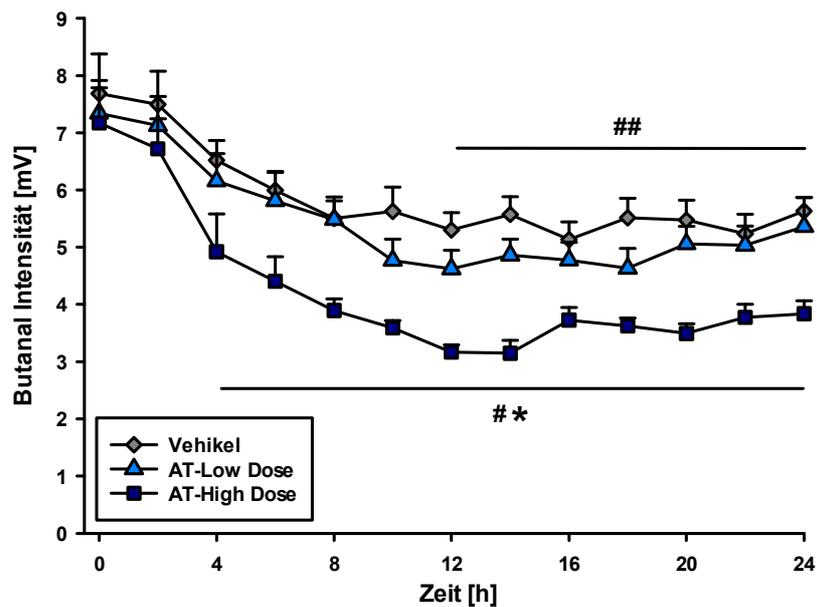


Abbildung 11: Signalintensität von Butanal. AT-Low Dose: 40 µg/kg KG AT, AT-High Dose): 80 µg/kg KG AT * p<0,05 AT-High Dose vs. Vehikel, # p<0,05 AT-HD vs. 0 h, ## p<0,05 Vehikel und AT-Low Dose vs. 0 h. Daten dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung.

4.4.2 Lipopolysaccharid

Für die mit Lipopolysaccharid behandelten Tiergruppen zeigten sich signifikante Unterschiede bei Folgenden VOCs: 1-Pentanol, 2-Propanol und Butanon.

1-Pentanol zeigte eine Intensitätszunahme welche für die LPS High Dose Gruppe nach acht Stunden signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe war. Die Low Dose Gruppe zeigte ebenfalls eine Intensitätszunahme nach sechzehn Stunden. Für 2-Propanol stellte sich in allen Versuchsgruppen ein initialer Intensitätsverlust dar, der nach vier Stunden für die High Dose Gruppe einen signifikanten Unterschied gegenüber dem Ausgangswert bot. Im weiteren Zeitverlauf fand sich in Beiden LPS Gruppen eine Intensitätszunahme. Diese erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Auch in der Vergleichsgruppe kam es im weiteren Zeitverlauf wieder zu einem leichten Intensitätsanstieg, welcher hier nach 24 Stunden wieder den Ausgangswert erreichte.

Ein komplexeres Verhalten bot der VOC 2-Butanon. Hier ließ sich für die Vergleichsgruppe ein signifikanter Intensitätsabfall über die Zeit nachweisen, während sich in der Low Dose Gruppe ein Intensitätsanstieg ermitteln ließ. In der High Dose Gruppe kam es hingegen, wie in der Vergleichsgruppe, zu einem Intensitätsabfall. Nach sechs Stunden konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden LPS-Gruppen nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Die Abbildungen 12-14 zeigen die Verläufe der einzelnen VOC-Signalintensitäten über die Zeit.

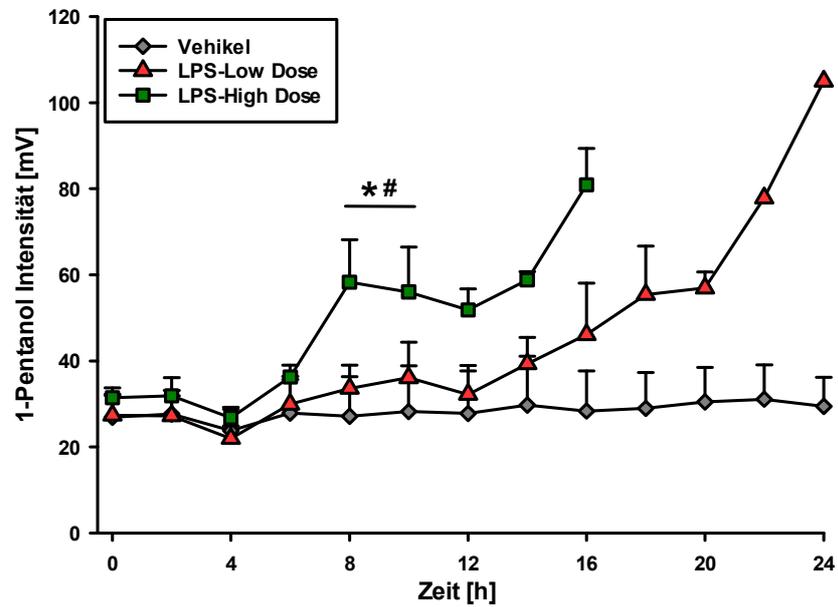


Abbildung 12: Signalintensität 1-Pentanol. LPS-Low Dose: 5 mg/kg KG LPS. LPS-High Dose: 10 mg/kg KG LPS.* $p < 0,05$ LPS-High Dose vs. Vehikel, # $p < 0,05$ LPS-HD vs. 0 h. Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

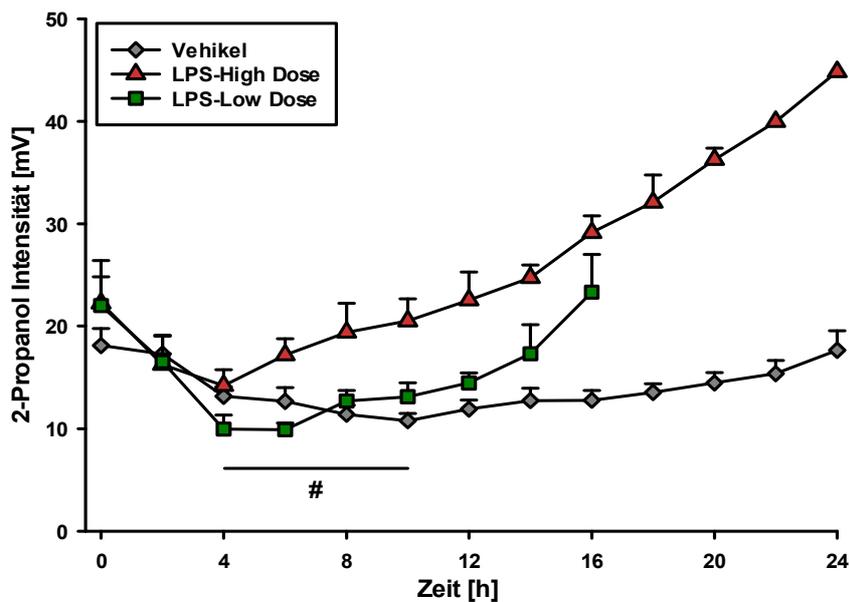


Abbildung 13: Signalintensität 2-Propanol. LPS-Low Dose: 5 mg/kg KG LPS. LPS-High Dose 10 mg/kg KG LPS.# $p < 0,05$ LPS-HD vs. 0 h. Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

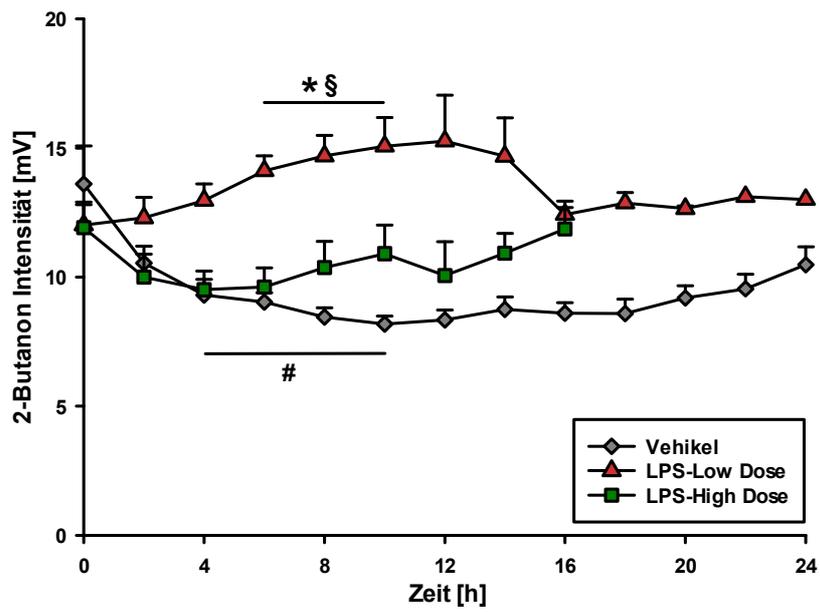


Abbildung 14: Signalintensität 2-Butanon. LPS-Low Dose: 5 mg/kg KG LPS. LPS-High Dose 10 mg/kg KG LPS. * $p < 0,05$ LS-Low Dose vs. Vehikel, # $p < 0,05$ Vehikel vs. 0 h. § $p < 0,05$ LPS-Low Dose vs. LPS-High Dose. Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

Im vorliegenden Kapitel wird das verwendete Tiermodell, sowie die Methode der Atemgasanalyse mittels MCC-IMS einer kritischen Diskussion und Wertung unterzogen. Ebenso kommen Herausforderungen der statistischen Auswertung zur Diskussion.

5.1.1 Diskussion des Tiermodell

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei Inflammationsmodelle gewählt. Ein Endotoxin-basiertes Modell mittels Lipopolysaccharid (LPS), sowie ein Exotoxin-Modell mittels Alpha-Toxin. Das gewählte Endotoxin-Modell ist bereits seit langem in unterschiedlichen Varianten etabliert und die Auswirkungen von LPS auf verschiedene Spezies sind gut beschrieben [54]. LPS bewirkt im Tiermodell eine systemische Inflammationsreaktion mit Ausschüttung proinflammatorischer Cytokine. Bei Ratten scheint eine ausgeprägte Dosis-Wirkungsbeziehung vorhanden zu sein. So bewirkt die Applikation einer hohen LPS-Dosis (40 µg/kgKG) nach Literaturangaben eine hypodynamie Kreislauftsituation mit reduziertem Herzzeitvolumen und anschließendem Tod. Bei sehr niedrigen LPS-Dosen (0,1 µg/kgKG) konnte hingegen eine hyperdynamie Kreislauftreaktion beobachtet werden [54, 55]. Allerdings werden Endotoxin-basierte Modelle durchaus kritisch beurteilt. Dies hat unter anderem folgende Gründe: Inflammation basiert nicht nur auf einer LPS-vermittelten inflammatorischen Reaktion. Gerade im Bereich abdomineller Prozesse steht häufig eine polymikrobielle Induktion der Immunantwort im Sinne eines septischen Geschehens im Vordergrund. Auch zeigen Nagetiere eine gewisse Resistenz gegenüber Endotoxinen, so dass mit vergleichsweise hohen Dosen gearbeitet werden muss [56].

In der Literatur zeigt sich jedoch eine hohe Spannweite der verwendeten Dosierungen. Diese reichen im Kleintiermodell von 0,1 µg/kg KG bis hin zu 120 mg/kg KG [54, 57]. Für vorliegende Arbeit wurde die mittlere LD₅₀ als Referenzwert genommen und die Low-/High-Dose-Dosierungen nach eigenen Vorversuchen davon abgeleitet. Große Vorteile dieses Modells sind die hohe Standardisierbarkeit und gute Reproduzierbarkeit. Im Gegensatz zu Modellen mit Induktion einer polymikrobiellen Sepsis, beispielsweise mittels Coecum-Ligatur und Punktion oder Inzision, kann bei Verabreichung eines Toxins mit genauen - bezogen auf das Körpergewicht - immer gleichen Dosierungen gearbeitet werden [58].

Für das Exotoxin-Modell gilt ähnliches. *Wegner* untersuchte in ihrer Dissertation die Auswirkungen eines Exotoxinschocks durch Alpha-Toxin in zwei unterschiedlichen Dosierungen am Rattenmodell. Hier konnte für eine Dosierung von 40 µg/kgKG eine deutliche Kreislaufreaktion im Sinne einer Hypotension und kompensatorischer Erhöhung der Herzfrequenz beobachtet werden. Die Überlebenszeit war deutlich verkürzt. Für eine niedrigere Dosierung von 20 µg/kgKG konnte dies nicht beobachtet werden. Eine Erhöhung von IL-6 konnte zum Messzeitpunkt nach vier Stunden in beiden Gruppen nicht nachgewiesen werden [59]. Auch die Inflammationsreaktion nach Alpha-Toxin-Gabe kann nicht eine polymikrobielle Sepsis in ihrer Gesamtheit abbilden. Dennoch spielt Alpha-Toxin wie bereits erläutert, eine wichtige Rolle bei der Induktion einer systemischen Inflammationsreaktion. Die Vorteile des Modells liegen wie bei LPS in der einfachen Handhabbarkeit unter Laborbedingungen. Ein weiterer gemeinsamer Vorteil beider Modelle ist die einfache Möglichkeit der Randomisierung.

Beide Modelle gewährleisten die Untersuchung einer sterilen systemischen inflammatorischen Reaktion. Weiter erlauben die gewählten Modelle einen direkten Vergleich der beiden Toxine in unterschiedlichen Dosierungen und ermöglichen einen hohen Standardisierungsgrad. Vor dem Hintergrund der Fragestellung dieser Arbeit, der Atemluftanalyse während systemischer Inflammation, sind beide Modelle daher als geeignet anzusehen.

5.1.2 Diskussion der Atemluftanalyse

Die Analytik der Expirationsluft bietet eine Reihe von Herausforderungen. So handelt es sich bei der Ausatemluft um ein heterogenes Gasgemisch unterschiedlicher Zusammensetzung mit hoher Feuchte. An die Analyse von Expirationsluft werden daher folgende Forderungen gestellt [60]:

1. Die Validität der Atemluft als Indikator für venöse oder arterielle Stoffkonzentrationen sollte etabliert werden.
2. Die Faktoren, welche das Blut zu Atemluft Verhältnis beeinflussen, sollten identifiziert werden.
3. Da es sich bei Atemluft nicht um ein homogenes Gemisch handelt, sollte die Probengröße, welche die Blutkonzentration repräsentativ darstellt, identifiziert und entnommen werden.
4. Der Probensammler an sich sollte einen geringen Atemwiderstand haben, durch Wasserdampf unbeeinflusst bleiben, schnell abdichten, und es erlauben, eine Probe wiederholt und reproduzierbar durchzuführen.

5. Die verwendete Technik sollte sensitiv und spezifisch genug sein, auch Spurenwerte von gelösten Substanzen reproduzierbar zu messen.

Die Forderungen eins bis drei erfolgen unter der Vorstellung, mittels Atemluftanalytik eine Blutuntersuchung obsolet zu machen, in dem direkt der entsprechende Stoff in der Ausatemluft detektiert wird. Was man sich beispielsweise beim Propofolmonitoring zu Nutze macht. Hier konnte eine gute Korrelation zwischen expiratorischer Propofolkonzentration und Blutplasmakonzentration gezeigt werden. Dies ist jedoch für jeden Analyten einzeln zu klären und setzt voraus, dass der gesuchte Analyt bekannt ist. Ziel dieser Arbeit war es nicht, bereits bekannte Laborparameter in der Atemluft zu detektieren, sondern vielmehr ob prinzipiell Unterschiede im „VOC-Muster“ der Expirationsluft unter Inflammation auftreten.

Die Punkte vier und fünf sind technischer Natur und beschreiben die Anforderungen an das eingesetzte Analyseverfahren. Hier wird deutlich, dass sich das MCC-IMS sehr gut zur Analyse der Expirationsluft eignet. Durch Vorschaltung einer beheizbaren Multikapillarsäule wird dem Problem der Feuchte begegnet und zusätzlich die Trennschärfe für volatile Substanzen erhöht. Auch die Forderung der Detektion bis in den Spurenbereich (ppb) wird durch MCC-IMS voll erfüllt. Bezüglich der Anwendung von MCC-IMS stehen Erfahrungen aus Vorversuchen zur Verfügung, so dass der vorliegende Versuchsaufbau Ergebnis einer empirischen Entwicklung ist. Bereits erwähnt wurde beispielsweise der Einfluss der Stoffwechsellage auf den VOC Aceton wie *Fink et al.* zeigen konnten [52].

Allerdings ist auch das MCC-IMS nicht frei von spezifischen Limitationen. Bezüglich der qualitativen Analyse ist zu sagen, dass in der verwendeten Datenbank bisher eine zwar stetig wachsende aber nur begrenzte Zahl an Analyten hinterlegt sind. Das heißt es gibt eine Vielzahl von Stoffen, welche mit MCC-IMS zwar detektierbar aber noch nicht zuzuordnen sind. Auch in der vorliegenden Arbeit mussten einige detektierte VOCs als „unbekannt“ klassifiziert werden.

Im Hinblick auf die quantitative Analyse ist mit MCC-IMS prinzipiell eine absolute Aussage möglich. Allerdings muss die Methode hierzu auf den entsprechenden VOC kalibriert werden, da der Detektor die Zahl der auftreffenden Driftionen als elektrische Spannung in mV misst und somit nur eine relative Aussage möglich ist. Erst nach Korrelation der gemessenen Spannung mit Spannungswerten verschiedener Konzentrationen der Reinsubstanz ist eine absolute Konzentrationsangabe möglich.

Ein weiteres Problem, welches die Messgenauigkeit im ppb-Bereich mit sich bringt, ist die hohe Anfälligkeit für Umgebungseinflüsse. Die Möglichkeiten hierzu wurden durch den Versuchsaufbau weitgehend ausgeschlossen. Wie bei *Albrecht et al.* beschrieben, wurde der Respirator und das Schlauchsystem vor Versuchsbeginn mit synthetischer Luft gespült,

sowie Vergleichsmessungen der Raum- und Respiratorluft durchgeführt um eventuelle Kontaminationen aufzudecken [61]. Weiter wurden für Beatmungsschläuche und Verbindungsstücke inerte Materialien wie Teflon und Edelstahl verwendet.

Unter Beachtung der genannten Limitationen ist die Methode des MCC-IMS daher für das verwendete Modell als geeignet zu betrachten.

5.1.3 Diskussion der statistischen Auswertung

Die statistische Analyse von VOCs stellt eine nicht zu unterschätzende Herausforderung dar. Das Ziel dieser Arbeit war die Unterscheidung verschiedener Gruppen anhand spezifischer VOCs. Dies ist mit den beschriebenen statistischen Methoden gelungen.

Allerdings zeigen die detektierten VOCs nicht nur einen linearen Abfall oder Anstieg über die Zeit. Wie aus den Ergebnisgraphiken ersichtlich wird, ist das Verhalten deutlich komplexer. Hier drängt sich der Gedanke auf, dass ein VOC in der Einzelbetrachtung als nicht signifikant erscheinen mag. In der Betrachtung mit VOCs, welche ein ähnliches Verhalten zeigen, sich allerdings eine Signifikanz des gesamten „Musters“ oder „Clusters“ ergibt. Aus pathophysiologischer Sicht könnte einem solchen „Cluster“ auch ein gemeinsamer Stoffwechselweg oder biochemisches Korrelat zu Grunde liegen, was jedoch zum Zeitpunkt allenfalls als Spekulation bezeichnet werden darf.

Um dem genannten Problem zu begegnen, wäre für weiterführende Studien die Nutzung spezieller auf die Clusteranalyse von Atemluftsignalen ausgerichteter Software zu empfehlen. Hier bietet sich beispielsweise mit dem Biostatistik-Programm „Carotta“ ein vielversprechendes Werkzeug [62]. Für die Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit, im Sinne einer reinen Diskriminierung der Versuchsgruppen, ist eine Clusteranalyse jedoch nicht primär zielführend.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Unterscheidung der Gruppen nach Induktion einer sterilen Inflammation. Nach Betrachtung der Ergebnisse zeigen sich spezifische VOCs, welche eine Unterscheidung der Inflammationsgruppen gegenüber der Vergleichsgruppe sowie eine Diskriminierung der Inflammationsgruppen untereinander ermöglichen.

Nach Diskussion und Wertung der verwendeten Methoden erfolgt nun die Wertung der Ergebnisse und ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren soweit verfügbar.

Außerdem findet eine Einzelbetrachtung und Bewertung der signifikanten VOCs hinsichtlich ihrer Eigenschaft als möglicher Inflammationsmarker statt.

5.2.1 Diskussion der Vitalparameter sowie Zytokinbestimmung

Für die Kontrollgruppe ist festzuhalten, dass sich alle erhobenen Parameter während des kompletten Versuchszeitraumes im physiologischen Rahmen bewegten. Auch überlebten alle Tiere den Versuchszeitraum. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass es sich bei dem vorliegenden Modell um ein Langzeitmodell im Kleintierbereich handelt. Übliche Inflamationsmodelle, wie beispielsweise in den bereits zitierten Arbeiten von *Boom et al.* und *Wegner* genutzt, gehen von einer Versuchs- bzw. Beatmungsdauer von bis zu vier Stunden aus [55, 59]. Dies lässt den vorsichtigen Schluss zu, dass der gewählte Versuchsaufbau keinen wesentlichen Einfluss auf grundlegende physiologische Prozesse der Versuchstiere nimmt.

Alleine aus der Betrachtung der Überlebenszeiten scheint das LPS-Modell der Erwartung bei Induktion einer systemischen Inflammationsreaktion zu entsprechen. Beide LPS-Gruppen zeigen eine deutlich verkürzte mittlere Überlebenszeit, in der Low Dose Gruppe mit im Mittel 13,6 Stunden etwas länger als in der High Dose Gruppe mit 11,6 Stunden. Zieht man nun die weiteren Vitalparameter wie Blutgasanalyse (BGA) und Mittleren Arteriellen Blutdruck (MAP) sowie die Zytokinbestimmung zur Betrachtung heran, so zeigt sich in beiden LPS-Gruppen mit im Verlauf eintretender Hypotonie, deutlicher Erhöhung von IL-6, und metabolischer Azidose das Vollbild einer systemischen inflammatorischen Reaktion.

Entgegengesetzt hierzu scheint sich allerdings das Herzzeitvolumen (HZV) zu verhalten, welches im zeitlichen Verlauf keinen signifikanten Unterschied aufwies. Allerdings kann dies durch Betrachtung der Physiologie weitgehend erklärt werden. Das HZV wird von der myokardialen Kontraktilität, der Vorlast, der Nachlast, sowie der Herzfrequenz beeinflusst. In vorliegendem Fall bewirken direkte LPS-Wirkung sowie Zytokinausschüttung eine verminderte Kontraktilität des Myokards, welche allerdings durch Tachykardie und reduzierte Nachlast durch die ebenfalls vorhandene Hypotonie wieder ausgeglichen werden kann. Weiter wurde der statistische Betrachtungszeitraum der LPS High Dose Gruppe aufgrund der hohen Letalitätsrate eingegrenzt und entspricht nicht dem kompletten Versuchszeitraum. Zusammenfassend hat das LPS-Modell zur Induktion des Vollbildes einer systemischen inflammatorischen Reaktion geführt.

Für die Alpha-Toxin-Gruppen zeigen die Daten für das Überleben keinen signifikanten Unterschied, auch wenn in der High Dose Gruppe zwei Tiere vor Versuchsende verstarben. Weiter zeigt die BGA im zeitlichen Verlauf nur einen signifikanten Anstieg des

Basenüberschusses (Base-Excess, BE). Auch für die Herzkreislaufparameter Herzzeitvolumen und Mittlerer Arterieller Druck zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Für die Low Dose Gruppe lässt sich ab 16 Stunden mit 148 ml/min versus 106 ml/min allenfalls eine nicht signifikante Tendenz zu erhöhtem HZV erkennen. Für die hämodynamische Beeinflussung durch Alpha-Toxin finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. So beobachtete *Wegner* bei einer Dosierung von 40 µg/kgKG direkt nach Injektion einen deutlichen Abfall der hämodynamischen Parameter und deutlich verkürzte Überlebenszeit im Bereich weniger Stunden [59].

Ein möglicher Erklärungsmechanismus ist hier die direkte Wirkung am Myokard. So konnte an isolierten Rattenherzen gezeigt werden, dass Alpha-Toxin zu koronarer Vasokonstriktion und verminderter myokardialer Kontraktilität führt [63]. Dem entgegen steht eine Studie von *Pruefer et al.*, welche ebenfalls ein Modell mit 40 µg/kgKG verwendeten. Hier konnte jedoch direkt nach Injektion keine hämodynamische Beeinträchtigung festgestellt werden [64]. In beiden Arbeiten finden sich allerdings keine Angaben zur Injektionsgeschwindigkeit. In eigenen Vorversuchen konnte jedoch festgestellt werden, dass eine Bolusinjektion des Toxins durchaus zu hämodynamischer Dekompensation führt. Weshalb die Studienmedikation in vorliegendem Modell fraktioniert über 20 Minuten gegeben wurde.

Weitere Faktoren die sich hinsichtlich Hämodynamik und Überleben auf das Modell als positiv auswirken dürften, sind zum einen die kontinuierliche Flüssigkeitssubstitution. Auch wenn sie nur einer Deckung des Grundbedarfs und keiner therapeutischen Volumensubstitution entsprach. Zum anderen die suffiziente Beatmung und Narkoseführung. In den zitierten Literaturmodellen wurden die Versuche unter Spontanatmung sowie ohne Flüssigkeitssubstitution durchgeführt. Bezüglich der Zytokinkonzentration ließ sich in beiden Alpha-Toxin Gruppen ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachweisen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Aktivierung des Immunsystems in zu geringem Maße erfolgte, um einen sogenannten „Zytokinsturm“ auszulösen. Weiter wäre es möglich, dass bei den verwendeten, nicht unmittelbar letalen Dosierungen auch die Hämolyse als Hauptwirkung von Alpha-Toxin im Vordergrund stand. Allerdings wären dann, zumindest soweit erhoben, deutlich erhöhte Hämolyseparameter wie z.B. Kalium zu erwarten gewesen, was sich jedoch nicht beobachten ließ.

5.2.2 Diskussion der Atemluftanalyse im Gruppenvergleich

Nach Analyse aller gefundenen VOCs ist als Fazit der Atemluftanalyse festzuhalten, dass sich die Versuchsgruppen anhand spezifischer VOCs voneinander differenzieren lassen. Tabelle 9 gibt einen Überblick über die detektierten signifikanten VOCs der beiden Toxinmodelle.

Tabelle 9: Signifikante VOCs nach Toxinmodellen

Signifikante VOCs nach Toxinmodellen	
Alpha-Toxin	LPS
1-Pentanol	1-Pentanol
Isopropylamin	2-Butanon
1-Butanol	2-Propanol
Butanal	

Eine weitere Einteilung der VOCs kann nach ihrem Ursprung erfolgen. *Albrecht et al.* untersuchten in ihrer Studie den Einfluss der Respiratorluft auf das Exhalom der Ratte [61]. Hier ließen sich anhand des Verhältnisses der Intensität der durch die Ratte abgeatmeten VOCs und der Intensität der VOCs in der Respiratorluft drei Gruppen von VOCs differenzieren: 1. Abfallende (Expired), am ehesten einem endogenen, aus dem Versuchstier stammenden Ursprungs. 2. Unbeeinflusste (Unaffected) VOCs, welche nicht sicher zuzuordnen waren. Sowie 3. Resorbierte (Resorbed) und damit durch das Versuchstier aufgenommene, vom Respirator emittierte VOCs [61]. Tabelle 10 zeigt die in dieser Arbeit gefundenen signifikanten VOCs in der Zuordnung zu oben genannten Gruppen.

Tabelle 10: Signifikante VOCs nach Ursprung

Signifikante VOCs nach Ursprung		
Endogene VOCs	Unbeeinflusste VOCs	Resorbierte VOCs
1-Butanol	2-Propanol	Butanon
1-Pentanol	Isopropylamin	
Butanal		

Damit ließe sich der VOC Butanon am ehesten der Respiratorluft zuordnen. Eine Einzelbetrachtung und Wertung der VOCs folgt jedoch im späteren Verlauf der Diskussion.

Im Vergleich zu einer weiteren Arbeit von *Fink et al.*, in der VOCs bei polymikrobieller Sepsis der Ratte untersucht wurden, finden sich unterschiedliche signifikante VOCs. In der genannten Arbeit wurde eine polymikrobielle Sepsis bei Ratten durch Coecum Ligatur und Inzision induziert. Die VOCs wurden in einem ähnlichen Versuchsaufbau mittels MCC-IMS

detektiert. Hier stellten sich die Signalintensitäten folgender VOCs vermindert dar: Aceton, 2-Heptanol, 3-Pentatone, Dimethyl-Sulfid und 1-Propanol [65]. Dies scheint die Unterschiede in der Pathophysiologie zwischen einer sterilen inflammatorischen Reaktion als auch der Sepsis zu unterstreichen. Wobei man durchaus bei ähnlicher Pathophysiologie gemeinsame VOCs im Sinne einer Überschneidung der pathophysiologischen Prozesse erwarten könnte. Schließlich stellt sich auch eine klinische Differenzierung zwischen steriler Inflammation und mikrobieller Sepsis, wie bereits in der Einleitung aufgezeigt, als durchaus schwierig dar. Die Ergebnisse scheinen daher die grundsätzlichen Unterschiede beider Entitäten zu bestätigen.

Im Folgenden sollen die Versuchsgruppen hinsichtlich ihrer Gemeinsamkeiten und Unterschiede diskutiert werden, anschließend soll auf einzelne Analyte näher eingegangen werden.

Für die Alpha-Toxin Gruppen gilt, dass die VOC-Verläufe für 1-Pentanol, Isopropylamin und Butanal in der Low Dose sowie der High Dose Gruppe im Gegensatz zur Vergleichsgruppe gleichläufig sind. Was darauf schließen lässt, dass die Gabe von Alpha-Toxin auch als ursächlich für die Veränderungen anzusehen ist. Allerdings lässt sich nur für die High Dose Gruppe eine statistische Signifikanz gegenüber der Vehikelgruppe nachweisen. Was zusammen mit den Vitalparametern als weiteres Indiz dafür gedeutet werden kann, dass die inflammatorische Reaktion in der Low Dose Gruppe eher mild ausgeprägt war. In der Literatur ließen sich keine Hinweise darauf finden, dass dieses Modell bereits im Zusammenhang mit VOC-Analyse verwendet wurde. Ein direkter Vergleich zu den Ergebnissen anderer Autoren kann daher nicht vorgenommen werden.

Auch die LPS-Gruppen zeigen mit den VOC-Verläufen von 1-Pentanol und 2-Propanol ein homogenes Verhalten in der Low Dose als auch der High Dose Gruppe gegenüber der Vergleichsgruppe. Im Kontrast hierzu steht der VOC 2-Butanon, welcher in beiden LPS-Gruppen ein unterschiedliches Verhalten zeigte. Eine mögliche Ursache wäre im unterschiedlichen hämodynamischen Verhalten zu suchen. Gerade die High Dose Gruppe zeigte einen signifikanten MAP-Abfall über die Zeit. Allerdings steigt Butanal in der Low Dose Gruppe an, während es in der High Dose Gruppe zu einem Abfall kommt. Das Verhalten in der High Dose Gruppe entspricht damit dem der Vergleichsgruppe, was eine hämodynamische Beeinflussung dieses VOCs unwahrscheinlich macht.

Dennoch ist die Hämodynamik als möglicher Einflussfaktor abgeatmeter volatiler Komponenten durchaus in Betracht zu ziehen, da das Herzzeitvolumen die pulmonale Transitzeit und damit die Diffusion beeinflusst [66]. Daher wurde in einer vorausgehenden Arbeit von *Hüppe et al.* ein hämorrhagisches Schockmodell etabliert [67]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bis auf 2-Hexanon kein VOC einen signifikanten Unterschied zur

Vehikelgruppe zeigte. Auch wenn für 1-Propanol, Aceton und Butanal ein Trend für einen Signalanstieg erkennbar war. Auch unter Berücksichtigung der Tatsache, dass für den ebenfalls detektierten VOC 1-Propanol keine statistische Signifikanz vorlag, ist zumindest nur von einer geringen hämodynamischen Beeinflussung auszugehen.

Natürlich ist bei einem direkten Vergleich weiter einschränkend zu beachten, dass die Pathophysiologie eines septischen und hämorrhagischen Schockgeschehens zwar Gemeinsamkeiten aufweisen, aber grundsätzlich verschiedene Entitäten sind. Im Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren findet sich eine Arbeit von *Guamán et al.* in der ein ähnliches Endotoxin-Modell verwendet wurde. Zehn Ratten wurden 4 mg/kgKG LPS intraperitoneal injiziert. Eine Kontrollgruppe erhielt Natriumchloridlösung. Nach 24 Stunden wurden die Tiere anästhesiert und über Trachealkanüle für 20 Minuten beatmet. Die Expirationsluft wurde gesammelt und nach Ende der Beatmungsphase mittels IMS sowie vergleichender GC/MS-Messung analysiert. Insgesamt konnten 15 VOCs detektiert werden, anhand derer eine Diskriminierung der beiden Gruppen erfolgen konnte. Darunter auch das im vorliegenden Versuch nachgewiesene 2-Propanol [68].

Die direkte Vergleichbarkeit ist aufgrund der Unterschiedlichkeit der Modelle allerdings nicht gegeben. So wurde in unserem Versuch eine intravenöse Injektion des Toxins durchgeführt, was alleine durch sofortige systemische Verteilung über das Gefäßsystem eine stärkere Reaktion bzw. einen fulminanteren Verlauf vermuten lässt. Ein interessanter Nebenaspekt der Arbeit von *Guamán et al.* ist die Tatsache, dass der detektierte VOC Ketanon dem verwendeten Anästhetikum „Imlagene“ (Ketanest) zugeordnet werden konnte [68]. Dies zeigt zum einen, welche Möglichkeiten sich im Bereich „Drugmonitoring“ bieten, zum anderen, wie bereits ein einzelner Faktor, wie die Wahl des Narkosemedikamentes zu einer Beeinflussung des VOC-Musters führen kann. Und es unterstreicht die Wichtigkeit einer standardisierten Behandlung beider Gruppen bei der Anwendung von IMS, was hinsichtlich einer klinischen Anwendung noch einige Herausforderungen bietet.

Hüppe et al. untersuchten hierzu die Einflüsse der Umgebung einer Intensivstation auf IMS-Messungen an Patienten. Er konnte zeigen, dass nicht nur die Umgebungsluft einen Einfluss auf gemessene VOCs hat, sondern wie zu erwarten war, auch der Respirator. Allerdings ließen sich auch fünf VOCs der zentralen Gasversorgung zuordnen [69]. Um die Technik IMS im klinischen Umfeld einzusetzen müssen alle möglichen Kontaminationsquellen bekannt sein. Nur so lässt sich ausschließen, dass ein Kontaminations-VOC mit in die Auswertung eingeht. Daher wurde in diesem Tiermodell synthetische Luft höchster Reinheit verwandt und Messungen der Raum- und Respiratorluft durchgeführt, um potentielle Störfaktoren zu kontrollieren.

Im nächsten Abschnitt wird eine Einzelbetrachtung der signifikanten VOCs stattfinden und eine Wertung als potentieller Biomarker diskutiert.

5.2.3 Einzelbetrachtung signifikanter VOCs

Bei 1-Pentanol handelt es sich um einen Alkohol des Alkans n-Pentan. Interessanterweise zeigte er in beiden Alpha-Toxin-Gruppen als auch in beiden LPS-Gruppen einen Anstieg, welcher sich jedoch nur für die jeweiligen High Dose Gruppen als statistisch signifikant herausstellte. Pentan wird bereits seit langem zur Quantifizierung der Lipidperoxidation über gaschromatographische Bestimmung in der Ausatemluft eingesetzt [70, 71].

Smith und *Reilly* untersuchten *in vitro* die Bildung von 1-Pentanol und Pentan bei der Zersetzung von 15-Hydroxyperoxyeicosatetraensäure (15-HPETE), einem Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels, unter verschiedenen Bedingungen. Dabei stellten sie fest, dass unter hyperoxischen Bedingungen die Bildung von 1-Pentanol deutlich Anstieg, während unter hypoxischen Bedingungen die Bildung von Pentan überwog [72]. Im Verlaufe einer Inflammation kommt es neben einer Gewebshypoxie auch zur Kumulation von reaktiven O₂-Spezies [73]. Ob dies ein möglicher Erklärungsansatz für die ansteigende 1-Pentanol-Konzentration in den Inflammationsgruppen des vorliegenden Versuches darstellen könnte, ist allerdings unter Berücksichtigung der momentanen Datenlage eher als Spekulation anzusehen. Dennoch handelt es sich hier um einen VOC, welcher durchaus eine weitere Betrachtung in Form weiterführender Studien verdient.

Ein weiterer interessanter VOC zeigt sich mit dem Keton 2-Butanon. In der Literatur wurde er bereits erhöht bei Patienten mit COPD (Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung) sowie Rauchern detektiert [74, 75]. In vorliegendem Modell konnte in der LPS Low Dose Gruppe ebenfalls ein Anstieg verzeichnet werden. In der High Dose Gruppe kam es initial wie in der Vergleichsgruppe zu einem Abfall, gefolgt von einem leichten Anstieg ab acht Stunden. Dieser zeigte jedoch keine Signifikanz. Damit steht der VOC im Gegensatz zu den anderen Analyten, die in den Inflammationsgruppen eher ein gleichläufiges Verhalten zeigen. Warum sich der VOC in den LPS-Gruppen unterschiedlich verhält ist unbekannt.

Als weitere Einschränkung ist die Tatsache zu werten, dass dieser VOC von *Albrecht et al.* am ehesten der Respirotorluft zugeordnet werden konnte [61]. Natürlich wäre unter einer Inflammation dennoch eine endogene Produktion des VOCs denkbar. Ebenfalls wäre eine Beeinflussung des durch den Respirotor emittierten VOCs durch noch unbekannte Stoffwechselprozesse denkbar, was das unterschiedliche Verhalten erklären könnte.

Dennoch ist der VOC unter Berücksichtigung der Ergebnisse von *Albrecht et al.* nur unter Vorsicht als potentieller Biomarker zu werten.

2-Propanol zeigte einen initialen Abfall in beiden LPS- wie auch in der Vergleichsgruppe. Für die LPS High Dose Gruppe zeigte sich eine Signifikanz nach vier Stunden. Im weiteren Verlauf kam es in allen drei Gruppen zu einem Intensitätsanstieg, welcher das Signifikanzniveau allerdings nicht überschritt. Wie auch 2-Butanon wurde 2-Propanol als möglicher VOC zur Identifikation von Patienten mit COPD beschrieben [74]. Weiter konnte es bei neutropenen Kindern als eines von mehreren VOCs nachgewiesen werden [76]. Diese Tatsache lässt die Hypothese zu, dass 2-Propanol ein möglicher Marker für eine Immunparalyse sein könnte, welche auch unter Inflammation auftritt. Eine weitere Bestätigung von 2-Propanol als möglichen inflammatorischen Marker findet sich in der Arbeit von *Guamán et al.*, der den VOC ebenfalls in einem Endotoxinmodell nachweisen konnte [68]. Die genaue Herkunft in der Expirationsluft ist bei momentaner Datenlage allerdings unbekannt. Dessen ungeachtet scheint 2-Propanol mit Inflammation in starkem Zusammenhang zu stehen und sollte ebenfalls im Sinne weiterführender Arbeiten näher betrachtet werden.

Isopropylamin dagegen ist ein primäres Amin, welches nur in den Alpha-Toxin Gruppen über den Zeitverlauf einen Konzentrationsabfall zeigte und damit eine Differenzierung der Alpha-Toxin-Gruppen gegenüber den anderen Gruppen erlaubte. Wenn auch für die Low Dose Gruppe keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte, so ist eine mit der High Dose Gruppe gleichläufige Tendenz erkennbar. Die Herkunft von Isopropylamin ist ebenfalls, wie für die meisten gemessenen VOCs, bislang ungeklärt. Eine Bewertung als möglicher Inflammationsmarker sollte vor dem Hintergrund der fehlenden Signifikanz daher eher zurückhaltend erfolgen.

Das Aldehyd Butanal konnte von *Silva et al.* in erhöhter Konzentration im Blutserum von Rauchern nachgewiesen werden [77]. Die Autoren schlagen Butanal daher als Biomarker für die Exposition von Tabakrauch vor. Konträr hierzu scheinen jedoch die Ergebnisse dieser Arbeit zu stehen, da Butanal in den Alpha-Toxin Gruppen einen signifikanten Signalabfall zeigte. Dies ist allerdings nur scheinbar ein Widerspruch, da Aldehyde wie Butanal Bestandteil des Tabakrauchs sind und mit Hämoglobin interagieren können, wie *Hobermann* und *San George et al.* bereits 1988 beschrieben [78]. Das erklärt durchaus den Anstieg bei exponierten Personen. Im Zusammenhang mit Inflammation wurde Butanal noch nicht beschrieben. Ein Modell für den detektierten Signalabfall unter Inflammation kann daher an dieser Stelle aufgrund des momentan eher als dürftig zu bezeichnenden Wissensstandes jedoch nicht angeboten werden.

5.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend ist das Modell sowie die Methodik dieser Arbeit geeignet, die vorliegende Fragestellung hinreichend zu untersuchen. Bezüglich der Fragestellung dieser Arbeit ist Folgendes festzuhalten:

1. Es konnten unterschiedliche Atemluftsignale zwischen den einzelnen Versuchsgruppen detektiert werden. Es gelang anhand spezifischer VOCs im Tiermodell eine Unterscheidung zwischen der Vehikel- sowie den Inflammationsgruppen vorzunehmen.
2. Weiter konnten die beiden Toxingruppen anhand des VOC-Musters unterschieden werden. Eine Differenzierung der unterschiedlichen Dosierungen gelang nur für die LPS-Gruppen. Hier zeigte sich für den VOC 2-Butanon ein unterschiedliches Verhalten in der Low Dose, als auch in der High Dose Gruppe. Der VOC 1-Pentanol fand sich als „verbindendes Element“ in beiden High Dose (LPS als auch Alpha-Toxin) Gruppen als signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe. Eine Differenzierung der Entitäten Inflammation und Sepsis ist unter Berücksichtigung der verfügbaren Literatur im Tiermodell ebenfalls möglich. Bei Einzelbetrachtung der gefundenen VOCs scheinen sich insbesondere 1-Pentanol und 2-Propanol als Inflammationsmarker zu eignen, auch wenn die Herkunft der genannten VOCs in der Ausatemluft größtenteils unbekannt ist.

Inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse vom Tiermodell auf den kritisch kranken Patienten übertragbar sind, müssen weitere Studien zeigen. Wie wichtig hierbei ein standardisiertes Studiendesign ist, wird anhand der vielfältigen Einflussfaktoren auf das Atemluftsignal, wie beispielsweise die Gabe weiterer Medikamente oder das Material des verwendeten Respirators und des Schlauchsystems, deutlich. Auch die genannten Störeinflüsse müssen weiter untersucht werden, um die Spezifität der Methode „Atemgasanalyse mit MCC-IMS“ weiter zu erhöhen.

6. Literaturverzeichnis

1. Majno G (1991) The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *The Journal of Infectious Diseases*. 163:937-945
2. Koch R (1882) Die Ätiologie der Tuberkulose. *Berliner Klinische Wochenschrift* 1882;15
3. Kreymann G, Wolf M (1996) Geschichte und Definition der Sepsis - Brauchen wir eine neue Terminologie? *Anästhesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie*. 31:9-14
4. June VINI, Justice C, Stewart P, Supreme S (1992) The ACCP-SCCM Consensus Conference on Sepsis and Organ Failure. *Chest*. 101:1481-1483
5. Vincent JL, Marshall JC, Opal SM, Tracey KJ (2013) Sepsis definitions: Time for change. *Lancet*. 381:774-775
6. Singer, M. et al., Bellomo R, Bernard GR, et al. (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) HHS Public Access *Jama*. 315:801-810
7. Vincent J, Levy MM, Martin GS (2016) qSOFA does not replace SIRS in the definition of sepsis. *Critical Care*. 20:210
8. Simpson SQ. (2018) SIRS in the Time of Sepsis-3. *Chest*. 153:34-38
9. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 140:805-820
10. Imler JL, Hoffmann JA (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biology*. 11:304-311
11. Tapping RI, Akashi S, Godowski PJ, Miyake K Tobias PS (2000) Toll-Like Receptor 4, But Not Toll-Like Receptor 2, Is a Signaling Receptor for Escherichia and Salmonella Lipopolysaccharides. *Journal of Immunology*. 165:5780-5787
12. Gutteridge JM, Mitchell J (1999) Redox imbalance in the critically ill. *British Medical Bulletin*. 55:49-75
13. Panaro MA, Calvello R, , Cianciulli A, Gagliardi N, Mitolo V, Saponaro C (2010) Toll-like Receptor 4 Mediates LPS-Induced Release of Nitric Oxide and Tumor Necrosis

- Factor- by Embryonal Cardiomyocytes : Biological Significance and Clinical Implications in Human Pathology. *Current Pharmaceutical Design*. 16:766-774
14. KI U, Grossmann C, Rueckschloss U, et al. (2014) Inhibition of cardiac pacemaker channel hHCN2 depends on intercalation of lipopolysaccharide into channel-containing membrane microdomains. *The Journal of Physiology*. 6:1199-1211
 15. Wilke GA, Wardenburg JB (2010) Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* -hemolysin-mediated cellular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:13473-13478
 16. Füssle R, Bhakdi S, Kranz T, Sziegoleit A, Trantum- J, Wellensiek H (1981) On the Mechanism of Membrane Damage by *Staphylococcus aureus* α -Toxin. *Journal of Cell Biology*. 91:83-94.
 17. Axel Hildebrand, Margit Pohl, et al. (1991) *Staphylococcus aureus* α -Toxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 266:17195-17200
 18. Dragneva Y, Anuradha CD, Bhakdi S, Hoffmann A, Valeva A (2001) Subcytotoxic Attack by *Staphylococcal* α -Toxin Activates NF- κ B and Induces Interleukin-8 Production. *Infection and Immunity*. 69:2630-2635
 19. Berube BJ, Wardenburg JB (2013) *Staphylococcus aureus* α -toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins*. 5:1140-1166
 20. Karimova A, Pinsky DJ (2001) The endothelial response to oxygen deprivation: Biology and clinical implications. *Intensive Care Medicine*. 27:19-31
 21. Schouten M, Levi M, Poll T Van Der, Wiersinga WJ (2008) Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of Leukocyte Biology*. 83:536-545
 22. Baskurt OK, Belmont D, Meiselman HJ (1998) Red Blood Cell Deformability in Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 157:421-427
 23. Adib-Conquy M, Cavaillon JM (2009) Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thrombosis and Haemostasis*. 101:36-47
 24. Gustot T (2011) Multiple organ failure in sepsis: prognosis and role of systemic inflammatory response. *Current Opinion in Critical Care*. 17:153-159
 25. Erik C, Aarden LA, De Groot ER, Thijs G (1989) Increased Plasma Levels of Interleukin 6 in Sepsis. *Blood*. 74:1704-1711

26. Patel R, Deen K, Keighley M, Youngs D, Warwick J (1994) Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. *British Journal of Surgery*. 81:795-839
27. Li Y, Oosting M, Deelen P, et al. (2016) Inter-individual variability and genetic influences on cytokine responses to bacteria and fungi. *Nature Medicine*. 22:952-960
28. Sierra R, Bailøn MA, Rello J, et al. (2004) C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Medicine*. 30:2038-2045
29. Póvoa P, Almeida E, Moreira P, et al. (1998) C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Medicine*. 24:1052-1056
30. de Beer FC, Allan RM, Fox KM, Hind CR, Maseri A, Pepys MB (1982) Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *British Heart Journal*. 47:239-243
31. Clec'h C, Fosse J, Karoubi P, et al. (2006) Differential diagnostic value of procalcitonin in surgical and medical patients with septic shock. *Critical Care Medicine*. 34:102-107
32. Schröder J, Kremer B, Staubach KH, Stüber F, Zabel P (1999) Procalcitonin as a marker of severity in septic shock. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 384:33-38
33. Tang BMP, Craig JC, Eslick GD, McLean AS (2007) Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 7:210-217
34. Annane D, Faller JP, Maxime V, et al. (2013) Procalcitonin levels to guide antibiotic therapy in adults with non-microbiologically proven apparent severe sepsis: a randomised controlled trial. *BMJ Open*. 3:e002186
35. Liu Y, Chen K, Hou J, Wang J, Wang S-N, Li Q (2016) Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Springerplus*. 5:2091
36. Reinhart K, Bardutzky J, Bone HG, Brunkhorst FM, Dimpfle CE (2010) Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis : 1 st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e . V . (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine. *German Medical Science*.8:1-86

37. Macias WL, Garg R, Janes J, Nelson DR, , Sashegyi A, Williams M (2005) Lack of evidence for qualitative treatment by disease severity interactions in clinical studies of severe sepsis. *Critical Care*. 9:607-622
38. Engelmann I (2006) Leitliniengerechte Sepsis-Therapie - viel Konsens, wenig Evidenz. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*. 58:789-791
39. Langevin P (1905) Sur une formule fondamentale de la théorie cinétique. *Annales de chimie et de physique*. 8:245ff
40. Cohen MJ, Karasek FW (1970) Plasma Chromatography - A New Dimension for Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*. 8:330-337
41. Hill HH, Simpson G (1997) Capabilities and limitations of ion mobility spectrometry for field screening applications. *Field Analytical Chemistry & Technology*. 1:119-134
42. Cohen MJ, Stimac RM, Wernlund RF (1984) The ion mobility spectrometer for high explosive vapor detection. *Nuclear Material Management*. XIII:220-225
43. Zimmermann S, Baether W, Barth S (2008) A miniaturized low-cost Ion mobility spectrometer for fast detection of trace gases in air. *Proceedings of IEEE Sensors*. 80:6671-6676
44. Strege MA, Juarbe N, Kozerski J, Mahoney P (2008) At-line quantitative ion mobility spectrometry for direct analysis of swabs for pharmaceutical manufacturing equipment cleaning verification. *Analytical Chemistry*. 80:3040-3044
45. Vautz W, Baumbach JI, Jung J (2004) CONTINUOUS MONITORING OF THE FERMENTATION OF BEER BY ION MOBILITY SPECTROMETRY. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*. 2004:6-8
46. Westhoff M, Baumbach JI, Freitag L, Litterst P (2007) Ion mobility spectrometry in the diagnosis of sarcoidosis: results of a feasibility study. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 58:739-751
47. Darwiche K, Baumbach JI, Freitag L, Sommerwerck U, Teschler H (2011) Bronchoscopically obtained volatile biomarkers in lung cancer. *Lung*. 189:445-452
48. Garrido-Delgado R, Arce L, Valcárcel M, Pérez-Marín CC (2009) Use of ion mobility spectroscopy with an ultraviolet ionization source as a vanguard screening system for

- the detection and determination of acetone in urine as a biomarker for cow and human diseases. *Talanta*. 78:863-868
49. Kreuder AE, Baumbach JI, Buchinger H, Kreuer S, Maddula S, Volk T (2011) Characterization of propofol in human breath of patients undergoing anesthesia. *International Journal for Ion Mobility Spectrometry*. 14:167-175
50. Wolf A, Baumbach J I, Favrod P, Fink T, Jang M, Kleber A, Kreuer S, Maddula S, Maurer F, Volk (2014) T Multi-capillary column-ion mobility spectrometer (MCC-IMS) breath analysis in ventilated rats: a model with the feasibility of long-term measurements *Journal of Breath Research*. 8:016006
51. Baumbach JI (2010) Working principle of an ion mobility spectrometer. Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:IMS_small.gif
52. Fink T, Albrecht FW, Baumbach JI, Hüppe T, Kleber A, Kreuer S, Maurer F, Schnauber K, Wolf B, Volk T (2015) Exhalation pattern changes during fasting and low dose glucose treatment in rats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407:3763-73
53. Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8:71-4.
54. Popov D, Pavlov G (2013) Sepsis Models in Experimental Animals. *Trakia Journal of Sciences*.1:13-23
55. Boom SJ, Barclay R, Padovani F Di, Ramsay G (1992) Prevention of cardiovascular effects of endotoxaemia by monoclonal antibodies specific for core endotoxin. *British Journal of Surgery*. 79:1087-1090
56. Michie HR (1998) The value of animal models in the development of new drugs for the treatment of the sepsis syndrome. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41:47-49
57. Stahl O, Haier J, Löffler B, Mardin WA, Mees ST (2013) Shock/Sepsis/Trauma/Critical Care: Mimicry of human sepsis in a rat model—Prospects and limitations. *Journal of Surgical Research*. 179:e167-e175
58. Heard, M. Fink S (1990) Models of Sepsis and Septic Shock. *Journal of Surgical Research*. 49:186-196

59. Wegner J (2004) Exotoxin-Schock, ausgelöst durch *Staphylococcus aureus* alpha-Toxin, am Tiermodell Ratte: Auswirkungen auf Gefäßendothel, Leukozytenakkumulation und Thrombozytenaggregation. Dissertation Universität Giessen. <internal-pdf://wegner04-0455570433/wegner04.pdf>.
60. Wilson H. (1987) Breath analysis. Physiological basis and sampling techniques. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health*.12:174-192
61. Albrecht FW, Baumbach JI, Fink T, Hüppe T, Kreuer S, Maurer F, Wolf A, Wolf B, Volk T (2015) Influence of the respirator on volatile organic compounds: an animal study in rats over 24 hours. *Journal of Breath Research* 9:016007
62. Hauschild AC, Frisch T, Baumbach J, Baumbach JI (2015) Carotta: Revealing Hidden Confounder Markers in Metabolic Breath Profiles. *Metabolites*. 5:344-36
63. Sibelius U, Buerke M, Grandel U, et al. (2000) Staphylococcal alpha-toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts: role of thromboxane generation. *Circulation*. 101:78-85
64. Pruefer D, , Buerke M, Buerke U, Dahm M, Darius H, Grandel U, Grimminger F, Makowski J, Seeger W, Schnell M, Sibelius U, Meyer J, Oelert H (2002) Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Circulation*. 106:2104-10
65. Fink T, Albrecht FW, Baumbach JI, Bödeker B, Hauschild AC, Heim N, Kreuer S, Wolf A, Wolf B, Maurer F, Sessler DI, Volk T (2015) Volatile Organic Compounds during Inflammation and Sepsis in Rats A Potential Breath Test Using Ion-mobility Spectrometry. *Anesthesiology*. 122:117-26
66. Le Sech C, Capderou A (1996) Determination of pulmonary mean transit time and cardiac output using a one-dimensional model. *Bulletin of Mathematical Biology*. 58:1155-1170
67. Hüppe T, Albrecht FW, Fink T, Kreuer S, Lorenz D, Maurer F, Schnauber K, Sessler DI, Volk T, Wolf B (2016) Exhalation of volatile organic compounds during hemorrhagic shock and reperfusion in rats: an exploratory trial. *Journal of Breath Research*. 10:016016
68. Guaman A V, Calvo D, Carreras A, et al. (2012) Rapid detection of sepsis in rats through volatile organic compounds in breath. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences*. 881-882:76-82

69. Hüppe T, Lorenz D, Wachowiak M, et al. (2017) Volatile organic compounds in ventilated critical care patients: a systematic evaluation of cofactors. *BMC Pulmonary Medicine*. 17:116
70. Filser JG, Bolt HM, Kappus H, Muliawan H (1983) Quantitative evaluation of ethane and n-pentane as indicators of lipid peroxidation in vivo. *Archives of Toxicology*. 52:135-147
71. Kunert KJ, Tappel AL (1983) The effect of vitamin C on in vivo lipid peroxidation in guinea pigs as measured by pentane and ethane production. *Lipids*. 18:271-274
72. Smith C, Reilly M (1989) Formation of pentane versus 1-pentanol in the ferrous sulfate-initiated decomposition of 15 hydroperoxyeicosatetraenoic acid in hypoxic and hyperoxic conditions N₂. *Biochemical Pharmacology*. 38:1362-1364
73. Gutteridge JM, Mitchell J (1999) Redox imbalance in the critically ill. *British Medical Bulletin*. 55:49-75
74. Koczulla R, Baumbach JI, Bödeker B, Hattesoehl A, Maddula S, Schmid S (2011) MCC/IMS as potential noninvasive technique in the diagnosis of patients with COPD with and without alpha 1-antitrypsin deficiency. *International Journal of Ion Mobility Spectrometry*. 14:177-185
75. Buszewski B, Amann A, Denderz N, Ligor T, Ulanowska A (2009) Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solidphase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 23:551-556
76. Furtwängler R, Baumbach JI, Bödeker B, Hauschild A-C, Hübel J, Maddula S, Rakicioglou H, Simon A (2014) Signals of neutropenia in human breath? *International Journal for Ion Mobility Spectrometry* 17:19–23
77. Silva LK, Capella KM, Espenship MF, Hile GA, et al. (2018) Quantification of 19 Aldehydes in Human Serum by Headspace SPME/GC/High-Resolution Mass Spectrometry. *Environmental Science & Technology*. 52:10571-10579
78. San George RC, Hoberman HD (1986) Reaction of acetaldehyde with hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*. 261:6811-21

7. Veröffentlichung

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Titel: "Changes in volatile organic compounds provoked by lipopolysaccharide- or alphatoxin-induced inflammation in ventilated rats"

Autoren: Lorenz, Dominik; Maurer, Felix; Philipp, Dietmar; Albrecht, Frederic; Hueppe, Tobias; Sessler, Daniel; Wolf, Beate; Volk, Thomas; Kreuer, Sascha; Fink, Tobias

Journal of Breath Research 2020 Oct 24;15(1):016003.

8. Danksagung

Natürlich war ich als Doktorand einer experimentellen Arbeit auf Unterstützung angewiesen. Daher möchte ich im Folgenden den Menschen meinen Dank aussprechen, welche mich bei dieser Arbeit maßgeblich unterstützt haben. Zuerst möchte ich meinem Betreuer Dr. med. Dominik Lorenz für seine große Unterstützung während der Laborphase und insbesondere bei der Korrektur der Arbeit danken. Ebenso sei Herr Prof. Dr. med. Kreuzer als Leiter des *Center of Breath Research* erwähnt, der mich als Doktorand am *Center of Breath Research* annahm. Nicht unerwähnt bleibt natürlich mein Doktorvater, Herr PD Dr. med. Tobias Fink. Ich danke ihm für die Möglichkeit sein Doktorand zu werden und die große Unterstützung, vor allem in der letzten Phase der Arbeit.

Herrn Dr. med. Frederic Albrecht und Dr. rer. nat. Felix Maurer danke ich für eine gute Einarbeitung und immer sehr kollegiale Zusammenarbeit im Labor. Weiter gebührt unserer Medizinisch-Technischen-Assistentin Frau Beate Wolf großer Dank, vor allem für die Unterstützung bei den Zytokinmessungen mittels ELISA und den vielen Kleinigkeiten des Laboralltages.

An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern danken. Ohne ihren Rückhalt vor und während des Studiums, hätte es diese Arbeit nie gegeben.

Außerdem danke ich meinen Mitdoktoranden Kristina Schnauber und Dr. med. René Rissel für die Unterstützung während der Tierexperimente und der gemeinsamen Zeit. An letzter Stelle, aber dennoch unverzichtbar, dank an meine Korrekturleser: Isabell Köllmer, Fee Benz, Laura Kampmann und meinem Bruder Alexander Philipp. Dank ihrer Hilfe ist die Arbeit leserlich und hoffentlich stilistisch ansprechend.

9. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.