

Anwendung von Polymethinfarbstoffen *in vivo*
als dynamisches Messverfahren zur simultanen
Beurteilung von Leber- und Nierenfunktion

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Marianne Johanna Butans, geb. Schulz
geboren am 07. Oktober 1991 in Friedrichroda

Gutachter :

apl. Prof. Dr. Ralf A. Claus, Jena

apl. Prof. Dr. Amelie Lupp, Jena

Prof. Dr. Sebastian N. Stehr, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung : 31.08.2021

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VI
GRAPHICAL ABSTRACT.....	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 AKUTES LEBERVERSAGEN UND NIERENVERSAGEN.....	1
1.1.1 <i>Epidemiologische Bedeutung</i>	1
1.1.2 <i>Pathophysiologie</i>	2
1.1.3 <i>Diagnostik – statische und dynamische Verfahren</i>	5
1.2 POLYMETHINFARBSTOFFE.....	16
2 ZIELE DER ARBEIT	19
3 METHODIK.....	21
3.1 MATERIAL.....	21
3.1.1 <i>Versuchstiere</i>	21
3.1.2 <i>Chemikalien</i>	21
3.1.3 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	22
3.1.4 <i>Geräte</i>	23
3.2 TIERVERSUCHE.....	24
3.2.1 <i>Generelle Techniken</i>	24
3.2.2 <i>Induktion einer polymikrobiellen Sepsis</i>	25
3.2.3 <i>Ischämie-Reperfusion-Modell zur isolierten Organschädigung</i>	26
3.2.4 <i>Glycerolinjektion zur Nierenschädigung</i>	28
3.2.5 <i>Plasmaverschwinderate und Sekretionsraten</i>	29
3.2.6 <i>Intravitalmikroskopie (IVM)</i>	31
3.2.7 <i>Organentnahme und –asservierung</i>	33
3.2.8 <i>Lagerung der Proben</i>	33
3.3 KLINISCHE VERLAUFSPARAMETER UND BLUTBILD	33
3.4 FLUORIMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG.....	34
3.5 ORGANLYSATE.....	35
3.6 AUSWERTUNG DER DATEN.....	35

4	ERGEBNISSE	36
4.1	VORVERSUCHE ZUR ERMITTLUNG DES GEEIGNETEN FARBSTOFFPAARES	36
4.1.1	<i>Vorversuche in gesunden Tieren</i>	36
4.1.2	<i>Vorversuche in septischen Tieren.....</i>	37
4.2	ANWENDUNG DER FARBSTOFFE IN VERSCHIEDENEN KRANKHEITSMODELLEN.....	38
4.2.1	<i>PCI-Modell.....</i>	38
4.2.2	<i>Ischämie--Reperfusion der Leber.....</i>	45
4.2.3	<i>Ischämie-Reperfusion der Niere.....</i>	49
4.2.4	<i>Nierenschädigung durch Glycerolinjektion.....</i>	52
4.3	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	55
5	DISKUSSION.....	56
5.1	FARBSTOFFE	56
5.2	SCHÄDIGUNGSMODELLE	62
5.3	AUSBLICK	75
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	76
	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS.....	78
	ANHANG	85
I.	<i>Exzitationsmaximum (Ex_{max}) und Emissionsmaximum (Em_{max}) in Ethanol sowie organspezifische Ausscheidung (Organspezifität) der verwendeten Farbstoffe</i>	85
II.	<i>Bsp. Standardreihe - Farbstoffpaar DY-680+DY-778.....</i>	86
III.	<i>Gemessene Konzentrationen der Farbstoffe im Plasma: Bsp. $c(DY-780)$ [nM], gain 200.....</i>	87
IV.	<i>Mittelung der Daten zum Erstellen einer beschreibenden Potenzfunktion, am Bsp. PCI-Gruppe, $c(DY-780)$ im Plasma.....</i>	88
V.	<i>Mathematische Beschreibung der PDR</i>	90
VI.	<i>Messwerte der Fluoreszenzintensität mittels IVM</i>	92
VII.	<i>Messwerte klinische Verlaufparameter/ Biomarker</i>	93
VIII.	<i>Konjugationsindex der Gallensäuren aus Plasmaproben</i>	93
A]	<i>Danksagung.....</i>	94
B]	<i>Tabellenverzeichnis</i>	95
C]	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	96
D]	<i>Lebenslauf</i>	97
E]	<i>Ehrenwörtliche Erklärung.....</i>	98

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie; <i>arteria (lat.)</i>
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AP	alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CHE	Serum-Cholinesterase
CL	Kaudaler Lappen; <i>caudate lobe (engl.)</i>
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emissionswellenlänge [nm]
Ex	Exzitationswellenlänge [nm]
FI	Fluoreszenzintensität [AU]
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Gauge (Einheit für Außendurchmesser einer Kanüle)
(e)GFR	(geschätzte) glomeruläre Filtrationsrate; <i>(estimated) glomerular filtration rate (engl.)</i> [mL/min/(1,73 m ²)]
gGT; γGT	Gamma-Glutamyltranspeptidase
Gl.	<i>glandula (lat.)</i>
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
I/R	Ischämie-Reperfusion
ICG	Indocyaningrün
IVM	Intravitalmikroskopie
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes (engl.)</i>
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
Lig.	<i>ligamentum (lat.)</i>
LLL	Linker lateraler Lappen; <i>left lateral lobe (engl.)</i>
LSM	<i>laser scanning microscope (engl.)</i>
M.	<i>musculus (lat.)</i>
MEGX	Monoethylglycinoxylidid
ML	Mittlerer Lappen; <i>median lobe (engl.)</i>
MODS	Multiorganversagen; <i>multi organ dysfunction syndrome (engl.)</i>
MW	Mittelwert
N.	<i>nervus (lat.)</i>
NGAL	Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
NIR	Nahinfrarot (Wellenlängenbereich von 780 nm bis 3000 nm)
O ₂	Sauerstoff
PCI	<i>peritoneal contamination and infection (engl.)</i>
PDR	Plasmaverschwinderate; <i>plasma disappearance rate (engl.)</i>
RIFLE	<i>Risk – Injury – Failure – Loss – End Stage Renal Disease (engl.)</i>
RL	Rechter Lappen; <i>right lobe (engl.)</i>
s.c.	subcutan
SEM	Standardfehler; <i>standard error of the mean (engl.)</i>
SOFA	<i>Sepsis-related organ failure assessment score (engl.)</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
V.	Vene; <i>vena (lat.)</i>

Zusammenfassung

Hintergrund Auf Intensivstationen stellt die Behandlung septischer PatientInnen eine große Herausforderung dar. Treten dabei Leber- und Nierenversagen auf, steigt die Mortalität rasant an. Darum gilt es, diese Organdysfunktionen frühzeitig zu diagnostizieren und zu therapieren. Aktuell in der klinischen Routine angewendete diagnostische Methoden beruhen auf der punktuellen, statischen Erfassung von Biomarkern und können somit Verläufe funktioneller Prozesse nicht widerspiegeln. Sie weisen zudem Defizite bezüglich Sensitivität, Fehleranfälligkeit, Zeitfaktor oder Wirtschaftlichkeit auf. Daher widmet sich die Forschung neuen Ansätzen, welche sich dynamischer Messverfahren bedienen. Optimalerweise sollen Tests bettseitig durchführbar sein und in kurzer Zeit eine präzise Aussage zur Organfunktion liefern. Der Einsatz fluoreszierender Farbstoffe eröffnet dabei vielversprechende Möglichkeiten: Indocyaningrün wird bereits klinisch zur Beurteilung der hepatischen *Clearance* verwendet, indem die Konzentrationsänderung des Farbstoffs im Blut nach *i.v.*-Applikation als Korrelat der hepatischen Eliminationsleistung fungiert.

Fragestellung und Ziele In Anlehnung an dieses Prinzip war es Ziel dieser Arbeit, ein Farbstoffpaar zu identifizieren und zu charakterisieren, welches sich zur simultanen Bestimmung der Leber- und Nierenfunktion eignet. Dies sollte aufgrund seiner biophysikalischen und chemischen Eigenschaften organspezifische Eliminationsrouten aufweisen und in einem zügig durchführbaren Verfahren eine Organschädigung frühzeitig anzeigen.

Methodik Es wurden hierfür Paare aus Polymethinfarbstoffen, basierend auf ihrer hepatischen beziehungsweise renalen Eliminationsroute, unter Anwendung verschiedener Organschädigungsmodelle *in vivo* untersucht. Nicht nur die polymikrobielle Sepsis, sondern auch isolierte Organschädigungen wurden hervorgerufen, um die Verlaufparameter der Blutplasma-, Gallen- und Urinkinetik differenziert betrachten zu können. Dabei erfolgte zur Charakterisierung der Farbstoffe die fluorimetrische Probenvermessung an definierten Entnahmezeitpunkten. Zudem wurden etablierte Biomarker zur Bestimmung der Organfunktion erhoben. Intravitalmikroskopische Darstellungen der Farbstoffverteilung wurden als unabhängige Methode zur Beurteilung der kinetischen

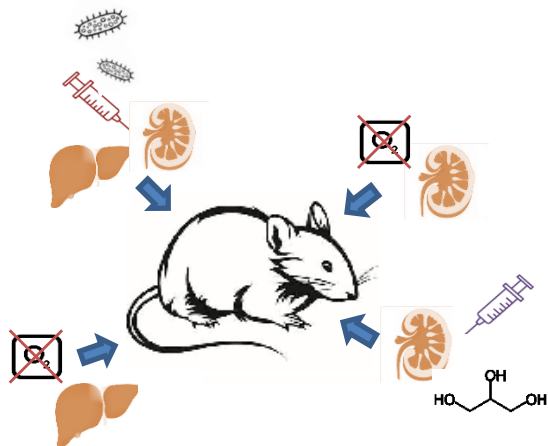
Verlaufparameter innerhalb der jeweiligen Organe durchgeführt und Organlysate zur Messung einer Farbstoffakkumulation hergestellt.

Ergebnisse und Diskussion Basierend auf unterschiedlichen biophysikalischen und chemischen Eigenschaften weisen die einzelnen Farbstoffe differenzierte pharmakokinetische Eigenschaften und Organverteilungsmuster auf. Es konnte gezeigt werden, dass die Messung der Plasmaverschwinderate der Farbstoffkombination DY-780 + DY-654 eine simultane Darstellung der Leber- und Nierenfunktion erlaubt. Die Messungen des hepatisch eliminierten Farbstoffs DY-780 zeigten deutlich eine hepatische Funktionseinschränkung an. Insbesondere bei Sepsis wurde diese durch die reduzierte DY-780-Plasmaverschwinderate differenziert wiedergegeben, die hier mit entsprechenden klinischen Parametern einherging. Auch in den Modellen der isolierten Organschädigung konnten veränderte Verläufe der Plasmakonzentrationen von DY654 festgestellt werden. Der renal eliminierte Kombinationspartner DY-654 zeigte ebenfalls tendenziell eine reduzierte Elimination in den Schädigungsmodellen an. Anhand der Farbstoffmengen in Galle bzw. Urin spiegelten sich diese Prozesse wider, indem ein geringerer Anteil des jeweiligen Farbstoffs ausgeschieden wurde. Intravitalmikroskopisch ließ sich die intrahepatische und intrarenale Kinetik verfolgen. Eine verlangsamte kanalikuläre Exkretion mit hepatozytärer Farbstoffakkumulation war die Folge einer Sepsis-induzierten Leberschädigung. Bei Ischämie-Reperfusion wurde deutlich, dass dort bereits die basolaterale hepatozytäre Aufnahme des hepatisch eliminierten Farbstoffs reduziert war. Renal zeigte sich bei den Schädigungsmodellen in der Intravitalmikroskopie ein verändertes intratubuläres Verteilungsmuster im Sinne inhomogener Farbstoffakkumulationen in nekrotischen Tubuluszellen.

Schlussfolgerung Die simultane Erfassung der Leber- und Nierenfunktion in Organschädigungsmodellen ist durch die Kombination der Polymethinfarbstoffe möglich und spiegelt eine differenzierte Abbildung der Organfunktion wider, die der Bestimmung konventioneller Biomarker überlegen scheint. Es konnten bei Organschädigung Kinetikänderungen innerhalb der Kompartimente Plasma, Galle und Urin sowie innerhalb der Organe festgestellt werden. Für die Anwendung bei PatientInnen ist die transkutane non-invasive Messung vorgesehen.

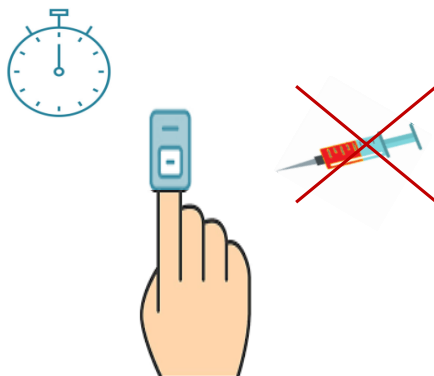
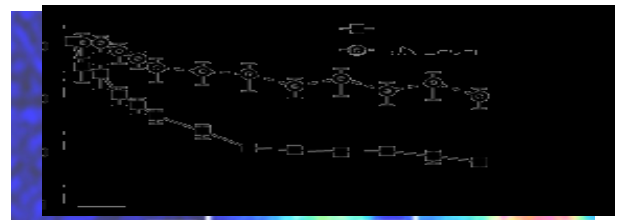
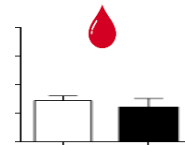
graphical abstract

Zur Erfassung von Leber- und Nierenfunktion werden klinisch meist statische Biomarker verwendet. Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem dynamischen Verfahren zur simultanen Erfassung der Organfunktionen durch die Anwendung eines hepatisch und renal eliminierten Farbstoffs.



Dazu wurde die Farbstoffkombination in verschiedenen Modellen der Leber- und Nierenschädigung *in vivo* untersucht. Es wurden Plasma-, Galle- und Urinproben entnommen, Organlysate hergestellt und Intravitalmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Es zeigten sich veränderte Kinetiken in den Schädigungsmodellen. Intravitalmikroskopisch waren Akkumulationen der Farbstoffe zu sehen. Während durch dieses dynamische Messverfahren die Organdysfunktion abgebildet wurde, blieben konventionelle statische Biomarker unverändert



Im klinischen setting stellt die transkutane Messung der Plasmaverswinderaten eine noninvasive, bettseitig schnell durchführbare Methode dar.

1 Einleitung

1.1 Akutes Leberversagen und Nierenversagen

1.1.1 Epidemiologische Bedeutung

Die Haupttodesursache infolge einer Infektion ist die Sepsis. Weltweit sind davon jährlich 27 bis 30 Millionen Menschen betroffen, von denen sieben bis neun Millionen PatientInnen versterben (*Fleischmann et al. 2016*). Nach den Sepsis-3 Leitlinien sind zelluläre Prozesse im Rahmen der Wirtsantwort auf eine Infektion und daraus resultierende Organdysfunktionen als entscheidende Pathomechanismen zu verstehen (*Singer et al. 2016*). Leber und Niere zählen dabei zu den am häufigsten geschädigten Organen und sind oft gleichzeitig betroffen. Das schwere Krankheitsbild kann, wird es nicht erfolgreich therapiert, im sogenannten MODS (*Multiorgan Dysfunction Syndrome*), einem Multiorganversagen, gipfeln - eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität auf Intensivstationen (*Wang und Ma 2008*).

Ein akutes Nierenversagen erleiden 20 - 50 % der intensivpflichtigen PatientInnen (*Case et al. 2013*). Es ist mit einer hohen Mortalität von mindestens 30 % zu rechnen (*Srisawat et al. 2015, Case et al. 2013*). Bei einer Sepsis, der Hauptursache des akuten Nierenversagens auf Intensivstationen, steigt diese sogar bis auf 70 % an (*Bagshaw et al. 2007*).

Mit einer Inzidenz von 11 % tritt das akute Leberversagen auf Intensivstationen weniger häufig auf als das akute Nierenversagen (*Kramer et al. 2007*). Gleichwohl stellt die Sepsis auch hier eine maßgebliche Ursache dar. Anhand des *Sepsis-related organ failure assessment (SOFA)*-scores, der von der *International Sepsis Definitions Conference* zur Einschätzung der Organdysfunktion empfohlen wird, ist bei 30 % der PatientInnen mit Sepsis ein Leberschaden festgestellt worden. Die Mortalität septischer PatientInnen, die einen Leberschaden erleiden, ist dabei dreifach erhöht (*Vincent et al. 2003*).

Diese epidemiologischen Daten verdeutlichen, dass die beeinträchtigte Leber- und Nierenfunktion bei kritisch kranken PatientInnen eine dramatische Bedeutung hinsichtlich Krankheitsverlauf und Prognose besitzt. Dabei stellt Sepsis, definitions-

gemäß nach den Sepsis-3 Leitlinien mit Organdysfunktion einhergehend, sowohl eine Hauptursache als auch einen prognoseverschlechternden Faktor dar. Um eine effektive und rechtzeitige Therapie einleiten zu können, ist die sensitive, spezifische und frühzeitige Diagnose eines akuten Nieren- und Leberversagens unerlässlich.

1.1.2 Pathophysiologie

Mannigfaltige Ursachen, Pathomechanismen und Risikofaktoren bestimmen den Verlauf eines Leber- und Nierenschadens, was wiederum unterschiedliche Anwendungen und Interpretationen der Diagnostik sowie entsprechende Therapiestrategien bedeutet und die Prognose beeinflusst. Die Verschlechterung der Organfunktion innerhalb weniger Stunden, Tage oder Wochen wird dabei als akutes Organversagen bezeichnet und erfordert eine intensive medizinische Betreuung. Es kann als Komplikation verschiedenster Erkrankungen auftreten und spielt insbesondere bei der Sepsis eine große Rolle (*Acute Kidney Injury Work Group 2012, Bernal und Wendon 2013, Lelubre und Vincent 2018*). Die akute Funktionseinschränkung der immunologisch aktiven und an zahlreichen Stoffwechselprozessen beteiligten Leber bewirkt gerade bei kritisch kranken PatientInnen eine Verschlechterung des Outcomes bis hin zum Multiorganversagen. So kann ein akutes Leberversagen *vice versa* eine Sepsis verursachen. Abb. 1 verdeutlicht diese wichtige Rolle der Leber im Gesamtorganismus.

Das akute Leberversagen tritt in westlichen Industriestaaten weniger häufig auf als in anderen Ländern. Dank Impfungen und hygienischen Standards sind hier Infektionen mit den Virushepatitiden A, B und E deutlich seltener anzutreffen. Toxische Medikamentenwirkungen stellen stattdessen eine Hauptursache dar (*Bernal und Wendon 2013*). Weitere Ursachen sind neoplastische oder metabolische Erkrankungen (z.B. Morbus Wilson), Vaskulitiden (z.B. Budd-Chiari-Syndrom) oder das HELPP (*Haemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count*)-Syndrom während einer Schwangerschaft. Ein akuter hypoxischer Leberzellschaden bei kritisch kranken PatientInnen entsteht aufgrund kardiovaskulärer, hämodynamischer oder respiratorischer Instabilität, was insbesondere septische PatientInnen betrifft (*Bernal und Wendon 2013*).

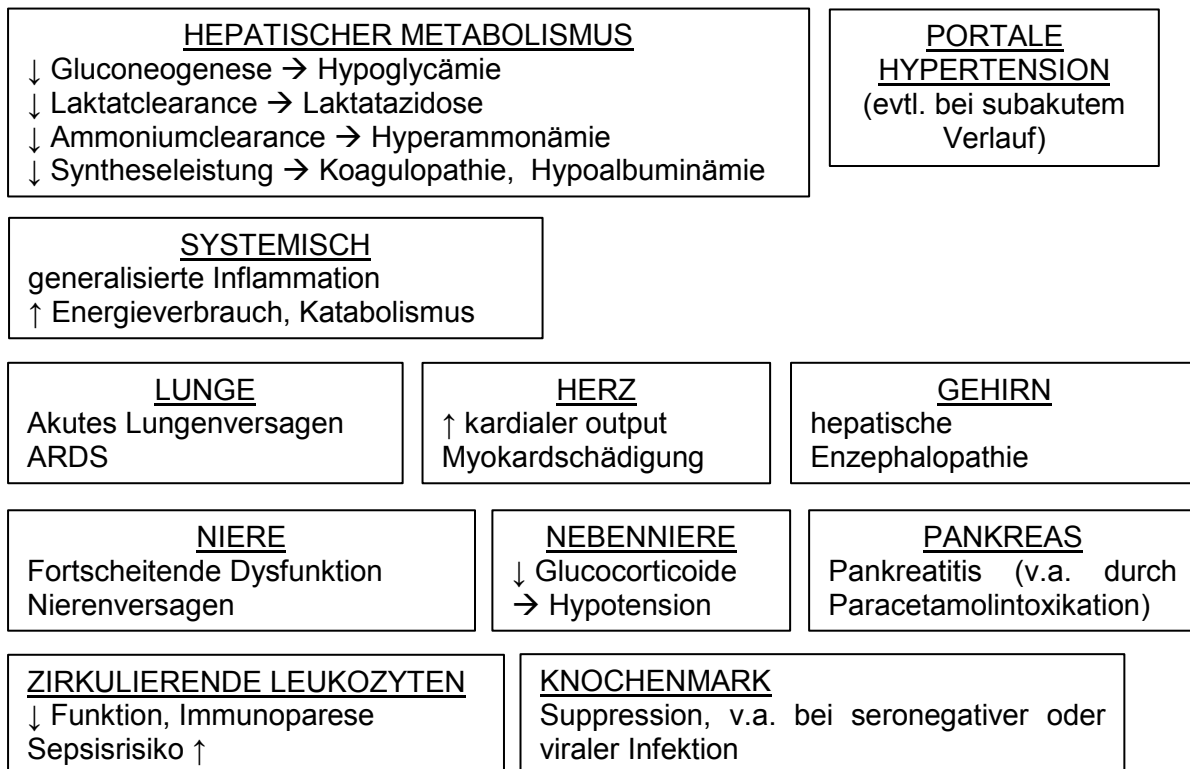


Abbildung 1: klinische Auswirkungen des akuten Leberversagens (verändert nach *Bernal et al. 2010*).

Klinisch imponiert das akute Leberversagen durch die Trias Koagulopathie, Ikterus und hepatische Enzephalopathie. Im engeren Sinne liegt es vor, wenn der Zeitraum zwischen dem Auftreten von Ikterus und hepatischer Enzephalopathie unter zwei Wochen beträgt (*Bernal und Wendon 2013*).

Bei der Entwicklung einer sepsisassoziierten Enzephalopathie stehen Mikrozirkulationsstörungen, Elektrolytverschiebungen und Barrierestörungen der Blut-Hirn-Schranke im Vordergrund, ohne dass zwingend eine hepatische Pathologie vorliegen muss. Die Blutungsneigung bei Sepsis resultiert aus einer disseminierten intravasalen Gerinnung, welche auf einer durch Entzündungsmediatoren getriggerten endothelialen Dysfunktion basiert (*Gofton und Young 2012, Satran und Almog 2003, Madoiwa 2015*). Die Aktivierung der Gerinnungskaskade wird zudem durch bakterielle Endotoxine und Entzündungsmediatoren ausgelöst. Es resultieren Mikroembolien mit konsekutiven Mikrozirkulationsstörungen. Gleichzeitig besteht durch die hervorgerufene Verbrauchskoagulopathie ein erhöhtes Blutungsrisiko. Enzephalopathie und Koagulopathie können also durch diese pathophysiologischen Vorgänge der Sepsis bedingt sein, ohne zwingend einen Leberschaden

vorauszusetzen, wodurch dieser als Diagnose verschleiert werden kann (*Trzeciak und Rivers 2005*).

Zur Entstehung der im Zentrum des septischen Geschehens stehenden Organ-dysfunktion spielen zudem weitere Mechanismen eine Rolle, die sich wechselseitig beeinflussen und zur Gewebshypoxie beitragen. Aufgrund der generalisierten Infektionsantwort des Körpers kommt es zur Umverteilung des Blutvolumens, was eine Hypotension bedingt. Bei gleichzeitiger peripherer Vasodilatation, hervorgerufen durch Toxine und Mediatoren, entwickelt sich eine Minderperfusion der Organe (*Rivers et al. 2001*).

Histologisches Korrelat des hepatischen Gewebsschadens stellen dabei hepato-zelluläre Apoptosen, zentrilobuläre Nekrosen, lobuläre und portale Inflammation, Steatosis und Cholangitis dar (*Koskinas et al. 2008*). In diesem Zusammenhang werden die Begriffe der hypoxischen Hepatitis und Schockleber verwendet. Diese geht mit einem rasanten Transaminasenanstieg einher (*Waseem und Chen 2016*). Es hat sich herausgestellt, dass im Rahmen einer experimentellen Sepsis bereits 15 Stunden nach der Infektion ein Leberschaden in Ratten auftritt (*Recknagel et al. 2012*). Dabei sind vor allem die Bereiche um die Zentralvene betroffen. Unter physiologischen Verhältnissen herrscht ein Gefälle des Sauerstoffpartialdruckes von periportal zu zentrolobulär vor. Die Bereiche zeichnen sich durch unterschiedliche Stoffwechselprozesse aus, die je nach Sauerstoffbedarf lokalisiert sind. Kommt es zu einer Hypoxie, sind vor allem die zentrilobulären Bereiche um die Zentralvene beeinträchtigt, was vor allem anabole Prozesse, wie die Glutaminsynthese, negativ beeinflusst (*Bauer und Kortgen 2012*). Auch andere energieabhängige Vorgänge, wie die hepatische Metabolisierung von Gallensäuren, sind in der Sepsis betroffen. Dies spiegelt sich vor allem in der Akkumulation unkonjugierter Gallensäuren wider (*Recknagel et al. 2012*).

Ein akutes Nierenversagen entwickelt sich klinisch in einem Zeitraum über maximal sieben Tage und ist durch Störungen des Stoffwechsels, des Elektrolyt-, Flüssigkeits- und Säure-Basen-Haushalts gekennzeichnet. Es führt zur Akkumulation potentiell giftiger Substanzen im Körper. Bezüglich der Lokalisation der Nierenschädigung werden prärenales, renales und postrenales Nierenversagen unterschieden. Am häufigsten tritt das prärenale Nierenversagen auf, welches

wiederum zumeist durch eine Minderperfusion durch Volumenmangel oder Hypotension bedingt ist (*Rahman et al. 2012*).

Das prärenale Nierenversagen stellt im Wesentlichen die bei einer Sepsis vorliegende Pathologie dar. Die hämodynamische Situation verursacht gemeinsam mit den inflammatorischen Prozessen einen Nierenschaden (*Fuji et al. 2014*). Besteht eine Minderperfusion der Niere, resultiert einerseits eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Andererseits entwickelt sich fokale ischämisch bedingte akute Tubulusnekrose, die auf die verminderte Durchblutung der äußeren Markzone zurückzuführen ist (*Takasu et al. 2013*). Es kommt zur Verlegung des Tubuluslumens durch nekrotische Tubuluszellen und zum sogenannten „back leak“ des Primärharns aus dem Tubulussystem in das Interstitium. Dabei fällt der Schweregrad der akuten Tubulusnekrose interindividuell sehr unterschiedlich aus. Es resultieren insgesamt glomeruläre Ischämie-Reperfusionsschäden sowie tubuläre Schäden durch Zytokine und Apoptose im akuten Nierenversagen durch Sepsis (*Alobaidi et al. 2015*). Im histologischen Präparat spiegelt sich die tubuläre Schädigung beim septischen Nierenschaden im Verlust des Bürstensaums, dilatierten Tubuli und Nekrosen wider. Daneben sind glomeruläre Fibrinansammlungen und Leukozyteninfiltrationen zu sehen (*Lerolle et al. 2010*). Es imponiert eine dramatische Reduzierung der GFR bei gleichzeitig stark erhöhtem Serumkreatinin und -harnstoff (*Havasi und Borkan 2011*).

Zusammenfassend sind das akute Leber- und Nierenversagen oft Resultate aus ischämisch-entzündlich-toxischen Prozessen, welche beispielsweise bei Einwirken von Noxen, ischämischen Ereignissen oder Sepsis vorherrschen.

1.1.3 Diagnostik – statische und dynamische Verfahren

Die Bedeutung der akuten Insuffizienz von Leber und Niere als rasch eintretendes, lebensbedrohliches Krankheitsbild gebietet, unabhängig vom zugrunde liegenden Schädigungsmechanismus, eine zügige und sensitive Diagnostik. Nur durch das frühzeitige Erkennen der Organdysfunktion kann eine optimale Therapie entsprechend der individuellen Gesamtsituation der PatientIn eingeleitet und angepasst werden. Das ideale diagnostische Verfahren ist kostengünstig, präzise,

schnell und einfach anzuwenden und zeigt mit hoher Spezifität und Sensitivität den Schweregrad der spezifischen Organdysfunktion bereits frühzeitig an.

Mittels des SOFA-scores werden bei kritisch kranken, septischen PatientInnen die wichtigsten Organfunktionen im Überblick erfasst. Die Einschätzung des Grades der Organdysfunktion korreliert mit der Mortalität (*Lambden et al. 2019*). So wird mithilfe des SOFA-scores anhand des Serumbilirubins die Leberfunktion der IntensivpatientInnen beurteilt. Die Nierenfunktion wird durch eine Messung des Serumkreatinins bzw. der Urinausscheidung dargestellt (s. Tab. 1).

Tabelle 1: SOFA (Sepsis-related organ failure assessment)-score (nach *Lambden et al. 2019*).

SOFA-score	1	2	3	4
Atmung PaO ₂ /FIO ₂ (mmHg)	< 400	< 300	< 200	< 100
Gerinnung Thrombozytenzahl (x10 ³ /mm ³)	< 150	< 100	< 50	< 20
Leber Bilirubin (mg/dL)	< 2	< 6	< 12	> 12
Kreislauf Hypotonie	MAP < 70 mmHg	Dopamin* ≤ 5 oder Dobutamin	Dopamin* > 5	Dopamin* > 15
Zentrales Nervensystem Glasgow Coma Scale	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Niere Kreatinin (mg/dL) Oder: Urin	< 2	< 3,5	< 5 < 500 mL/d	> 5 < 200 mL/d

*adrenerge Substanzen für 1h, Einheit in [µg/kg/min]

PaO₂ - Sauerstoffpartialdruck; FIO₂ - inspiratorische Sauerstofffraktion; MAP - mittlerer arterieller Druck

Es existieren weitere Kriterien und scores zur Erfassung der Leber- und Nierenfunktion, basierend auf verschiedenen in der klinischen Routine langjährig angewendeten Biomarkern, welche die Funktion von Leber und Niere widerspiegeln und deren Anwendbarkeit und Nützlichkeit teils kontrovers diskutiert wird

(Mendizabal und Silva 2016, Pan et al. 2016). Diese Biomarker werden dabei in Blutproben laborchemisch regelhaft mittels photometrischer Messungen bestimmt. Da ein einzelner Wert zu einem einzigen Zeitpunkt ermittelt wird, kann dies als statische Messung bezeichnet werden.

Die zur Einschätzung des Schweregrades eines akuten Nierenversagens bestehenden Klassifikationen ziehen unterschiedliche Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion, wie Harnstoff, Kreatinin und Urinausscheidung, in verschiedener Gewichtung heran. Ein Anstieg der Biomarker im Serum, beziehungsweise eine reduzierte Urinausscheidung, bedeutet eine verminderte GFR und damit einen Nierenschaden. Diese Kriterien weisen jedoch Limitationen auf.

Harnstoff wird endogen durch die Leber bei der Eliminierung von Ammoniak synthetisiert. Ein erhöhter Harnstoffwert ist nicht in jedem Falle als Indikator einer Nierenschädigung zu werten, da auch eine erhöhte Proteinzufuhr, Gewebsuntergang, intestinale Blutungen oder eine Corticoidtherapie ursächlich sein können (Steiner et al. 2011, Rockey 2005). Eine reduzierte Proteinzufuhr oder eine Leberschädigung wiederum führen zu einer Einschränkung der Harnstoffsynthese, wodurch bei einer Nierenschädigung falsch-niedrige Werte im Serum ermittelt werden (Traynor et al. 2006). Ein weiterer Grund für die unzureichende Eignung dieses Markers besteht in der passiven tubulären Reabsorption von 40 bis 50 % des glomerulär filtrierte Harnstoffs. Im Falle eines Volumenmangels, welcher auch in der Sepsis vorherrscht, wird dieser Prozess sogar verstärkt. Eine Erhöhung des Serumharnstoffs kann hier die tatsächliche GFR unterschätzen, was wiederum für therapeutische Maßnahmen, beispielweise Medikamentendosierungen, dramatische Auswirkungen hätte (Bagshaw und Gibney 2008). Zur Detektion eines akuten Nierenversagens, vor allem bei Komorbiditäten, ist Harnstoff allein demzufolge ein kaum geeigneter Marker.

Kreatinin ist ein Abbauprodukt des Kreatins, welches zur Adenosintriphosphat (ATP)-Bereitstellung für die Muskelkontraktion dient. Das Serumkreatinin ist abhängig vom Gesamtvolumenstatus und ist physiologisch erniedrigt bei geringer Muskelmasse, zunehmendem Alter sowie weiblichem Geschlecht. Die Einschätzung der Nierenfunktion in Bezug auf die standardisierten Normwerte kann somit falsche Rückschlüsse zulassen. Darüber hinaus zeigt auch das Serumkreatinin eine

Nierenschädigung erst bei einer fortgeschrittenen Einschränkung der GFR an. Der sogenannte kreatininblinde Bereich liegt bei 50 % der GFR, was die Diagnose einer leichten oder beginnenden Nierenschädigung erschwert (*Bragadottir et al. 2013*).

Die gebräuchlichste Stadieneinteilung bedient sich dennoch, aufgrund der bisher bestehenden klinischen Möglichkeiten, oben beschriebener Marker. Es handelt sich um die Leitlinien nach *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO), welche Serumkreatininanstieg, Urinmenge und teilweise GFR berücksichtigt (s. Tab. 2). Diese Einteilung wurde durch die Kombination der früher verwendeten "Acute Kidney Injury Network" (AKIN) - und "Risk–Injury–Failure–Loss–End stage renal disease" (RIFLE) -Kriterien entwickelt (*Acute Kidney Injury Work Group 2012*).

Tabelle 2: KDIGO-Leitlinien zur Stadieneinteilung des akuten Nierenversagens (nach *Acute Kidney Injury Work Group 2012*).

Grad	Serumkreatinin	Urinausscheidung
1	Anstieg um $\geq 0,3$ mg/dL (26,5 μ mol/L) oder Anstieg auf das 1,5- bis 1,9-fache des Ausgangswerts	$< 0,5$ mL/kg/h für 6–12 h
2	Anstieg auf das 2,0- bis 2,9-fache des Ausgangswerts	$< 0,5$ mL/kg/h für ≥ 12 h
3	Anstieg auf das $\geq 3,0$ -fache des Ausgangswerts oder Anstieg auf $\geq 4,0$ mg/dL (353,6 μ mol/L) oder Beginn einer Nierenersatztherapie oder bei Patienten unter 18 Jahren Abnahme der eGFR auf < 35 mL/min/1,73 m ²	$< 0,3$ mL/kg//h für ≥ 24 h oder Anurie für ≥ 12 h

Neue Biomarker zur Nierenfunktionsmessung wurden in den letzten Jahren etabliert. Dabei hat sich Cystatin C als interessanter Marker herausgestellt. Er scheint nach bisheriger Studienlage der Serumkreatininbestimmung überlegen zu sein, denn er zeigt bereits zwei bis drei Tage früher als Kreatinin ein akutes Nierenversagen an und überbrückt den kreatininblinden Bereich (*Herget-Rosenthal et al. 2004*). Jedoch ist auch der Cystatin C - Spiegel beeinflussbar, z.B. durch Corticoidgabe, Schilddrüsenfehlfunktion oder Malignome (*Zhai et al. 2016, Schmid et al. 2012, Keiko et al. 2008*).

In der Forschung werden weitere Marker untersucht. Sie weisen einen Nierenschaden bereits frühzeitig, teilweise schon etwa zwei Stunden nach Auftreten der Dysfunktion, nach (*van Biesen et al. 2006*). Vielversprechend dabei ist vor allem NGAL (Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin), welches mit dem *outcome* der PatientInnen korreliert. Jedoch wird NGAL von inflammatorischen Prozessen, z.B. Sepsis, beeinflusst (*Otto et al. 2013*). Auch die anderen statischen Marker weisen Nachteile, wie hohe Kosten, geringe Spezifität und Instabilität, auf (s. Tab. 3).

Tabelle 3: Vergleich neuer Biomarker der Nierenfunktion (verändert nach *Adiyanti und Loho 2012*).

Biomarker	Beschreibung	Nierenfunktion
N-Acetyl-beta-D-Glucosaminidase (NAG)	Lysosomales Enzym des proximalen Tubulus; stabiler als andere Enzyme im Urin. Spezifität?	Tubulär
β2-Mikroglobulin	MHC-I leichte Kette in allen kernhaltigen Zellen. Instabil in Urin bei pH < 6	Tubulär
Urinary Retinol-Binding- Protein (RBP)	Synthetisiert durch die Leber, stabil in saurem Urin-pH	Tubulär
Cystatin C	Cysteinprotease-Inhibitor, teuer	Glomeruläre Filtration
Kidney Injury Molecule (KIM)-1	Typ I Membranglykoprotein, sehr spezifisch und sensitiv, später Marker	Tubulär
Clusterin	aus tubulären Epithelzellen, sehr sensitiv, keine klinischen Studien	Tubulär
NGAL	wird auch durch Entzündung in epithelialen Zellen induziert	Tubulär
Sodium-Hydrogen-Exchanger (NHE) 3	Tubulärer Natriumtransport, Untersuchungsprozess der Proben nicht optimal	Tubulär
Exosomales Fetuin A	Hepatisch synthetisiertes Akute-Phase Protein, Untersuchungsprozess der Proben nicht optimal	Tubulär

Generell wird empfohlen, nicht einen einzelnen Biomarker zur Beurteilung der Organfunktion heranzuziehen, da diese in unterschiedlichen Bereichen der Niere lokalisiert sind und die „Schädigung verschiedener renaler Strukturen in unterschiedlichem Maße“ bei einem akuten Nierenversagen daher nicht allein abbilden können (*Adiyanti und Loho 2012*).

Da die einzelne Bestimmung der statischen Biomarker die beschriebenen Nachteile aufweist, ist der Goldstandard zur Beurteilung der Nierenfunktion momentan die Ermittlung der GFR, welche den dynamischen Prozess der renalen Ausscheidung als funktionellen Wert reflektiert. Als Messinstrument dienen dabei *Clearance*-Bestimmungen, für die sich verschiedene Substanzen eignen, die glomerulär frei filtriert werden. Das Polysaccharid Inulin weist ideale Eigenschaften zur GFR-Bestimmung auf. Es wird frei filtriert, weder sezerniert noch rückresorbiert. Jedoch ist Inulin kein körpereigenes Produkt und muss daher von außen zugeführt werden. Aus diesem Grund wird es im klinischen Alltag kaum eingesetzt. Es wird stattdessen auf endogene Stoffe zurückgegriffen, welche bereits in den Serumbestimmungen beschrieben wurden – Harnstoff und insbesondere Kreatinin. Die Bestimmung der Harnstoff- und Kreatininclearance überschätzt jedoch die tatsächliche GFR, da beide Substanzen tubulär sezerniert werden (*Stevens und Levey 2009*).

Die schlussendliche Berechnung der GFR kann durch die Konzentrationsbestimmung im Sammelurin über 24 Stunden erfolgen, was ein fehleranfälliges und zeitaufwändiges Verfahren darstellt. Zur Diagnostik eines akuten Nierenversagens eignet sich die *Clearance*-Messung mittels Sammelurin somit nicht. Um das Urinsammeln zur GFR-Bestimmung zu umgehen, existieren alternativ klinisch gebräuchliche mathematische Formeln, welche PatientInnendaten und Serummarker berücksichtigen. Jedoch weisen auch diese Berechnungen unter bestimmten Umständen Ungenauigkeiten auf. Nach der Formel von Cockcroft-Gault werden Serumkreatinin, Alter, Geschlecht und Gewicht berücksichtigt. Übergewicht oder ein Flüssigkeitsoverload führen zu verfälschten Ergebnissen. In die *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD)-Formel fließen Alter, Ethnie, Geschlecht, Serumkreatinin, -harnstoff und -albumin ein. Sie bezieht sich auf eine Körperoberfläche von $1,73 \text{ m}^2$, anthropometrische Variationen werden somit nicht

berücksichtigt. Ähnliches gilt für die häufig angewendete *Chronic-Kidney-Disease-Epidemiology-Collaboration* (CKD-EPI)-Formel. Auch bei Kindern und alten PatientInnen werden ungenaue Ergebnisse errechnet. Insgesamt basieren die Berechnungen einmal mehr auf der Bestimmung des Serumkreatinins und unterliegen somit den erwähnten Limitationen dieses Biomarkers (*Inker 2011*). Des Weiteren kommt es bei einer reduzierten glomerulären Filtration verstärkt zur tubulären Sekretion von Kreatinin, wodurch die sowohl durch Messungen als auch Berechnungen ermittelte GFR überschätzt wird (*Doolan et al. 1962, Bellomo et al. 2004*).

Die etablierten Methoden zur Erfassung der Nierenfunktion sind zusammenfassend mit zeitlichem und methodischem Aufwand verbunden und weisen Ungenauigkeiten auf. So erfordert die Messung der Serummarker Kreatinin und Harnstoff externe Laboranalysen und ist von intrinsischen Faktoren abhängig. *Clearance*-Bestimmungen mittels Sammelurin stellen ein fehleranfälliges und zeitaufwändiges Verfahren dar. Auch mathematische Formeln gewährleisten keine präzise Einschätzung der GFR, denn letztendlich beruhen sie auf den gemessenen Serumkreatininwerten (s. Abb. 2).

Clearance:

$$Cl_X = V_U \times c(X)_U / c(X)_{\text{Plasma}}$$

Cockcroft-Gault-Formel:

$$GFR = ((140 - A) / SKr) * (KG / 72) - \text{Bei Frauen mit } 0,85 \text{ multiplizieren}$$

MDRD-Formel:

$$GFR = 175 \text{ (bzw. } 186) \times SKr^{-1,154} \times A^{-0,203} - \text{Bei Frauen mit } 0,742 \text{ multiplizieren, bei schwarzer Hautfarbe mit } 1,212.$$

CKD-EPI-Formel:

$$GFR = 141 \times \min(SKr/\kappa, 1)^\alpha \times \max(SKr/\kappa, 1)^{-1,209} \times 0,993^{\text{Alter}} - \text{Bei Frauen mit } 1,018 \text{ multiplizieren, bei schwarzer Hautfarbe mit } 1,159.$$

Abbildung 2: Bestimmung der GFR. Cl_X = Clearance Substanz X [mg/dl]; V_U = Harnzeitvolumen [mL/min]; $(X)_U$ = Konzentration Substanz X im Urin [mg/dL]; $c(X)_{\text{Plasma}}$ = Plasmakonzentration Substanz X; SKr = Serumkreatinin [mg/dL]; A = Alter [Jahre]; KG = Körpergewicht [kg]; Geschlechtsabhängiger Parameter κ = 0,7 (Frau) bzw. 0,9 (Mann); Geschlechtsabhängiger Parameter α = -0,329 (Frau) bzw. -0,411 (Mann); min = Minimum von SKr/ κ und 1; max = Maximum von SKr/ κ und 1

Klinischer Standard zur Einschätzung der Leberfunktion ist bisher ebenfalls die Analyse von statischen Biomarkern im Serum. Dabei spiegeln die Transaminasen ASAT (Aspartat-Aminotransferase; *syn.* GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) und ALAT (Alanin-Aminotransferase; *syn.* GPT, Glutamat-Pyruvat-Transaminase), Bilirubin, γ GT (Gamma-Glutamyltranspeptidase), AP (alkalische Phosphatase) und Syntheseprodukte, wie Albumin, Gerinnungsfaktoren oder CHE (Serum-Cholinesterase), je nach ihrer typischen Lokalisation und Funktion eine Beeinträchtigung verschiedener Ebenen wider (s. Tab. 4). Analog der Bestimmung von Serummarkern der Nierenschädigung versteht man den Nutzen dieser statischen Messwerte zur Differentialdiagnostik und Einschätzung chronischer Lebererkrankungen innerhalb einer PatientIn. Ähnlich den klinischen Nierenparametern zeigen sie jedoch eine Leberschädigung nicht sensitiv an oder besitzen keine prognostische Aussagekraft beim akuten Leberversagen (*Sakka 2007*).

Ein Bilirubinanstieg wird häufig als Parameter für die Leberschädigung verwendet und hat beispielsweise auch Eingang in den bereits erwähnten SOFA-score gefunden. Bei einer schweren Sepsis kommt es jedoch mitunter erst sieben bis 20 Tage nach der Leberschädigung zu einem deutlichen Anstieg. Daher herrschte bis vor einigen Jahren die Annahme vor, dass das akute Leberversagen ein spätes Ereignis in der Sepsis darstellen sollte. Durch neue Testverfahren konnte dies jedoch widerlegt werden (*Recknagel et al. 2012*). Bilirubin eignet sich daher nicht zur Früherkennung eines Leberversagens. Hinzu kommt, dass eine vorbestehende chronische Leberschädigung nicht durch die alleinige Bilirubinbestimmung abzugrenzen ist (*Kortgen et al. 2009, Marshall et al. 1995*).

Eine Transaminasenerhöhung setzt im akuten Leberversagen früher ein als der Anstieg des Serumbilirubins. So zeigten sich beim akuten hypoxischen Leberschaden nach 24 Stunden bereits erhöhte Werte, während Bilirubin noch im Normbereich lag. Jedoch besitzt der Transaminasenanstieg keine prognostische Bedeutung für den Verlauf und weist eine geringe Spezifität auf (*Henrion 2011*).

Dynamische Testverfahren, die nicht auf endogenen Substanzen beruhen und somit nicht von deren Fehleranfälligkeit betroffen sind, werden daher zur Beurteilung der Nieren- und Leberfunktion eingesetzt. Im Bereich der Nierenfunktionsdiagnostik

sei hier die Nierenszintigrafie genannt, welche als radiologisch-nuklearmedizinische Untersuchung eine minimalinvasive und bettseitige Durchführbarkeit jedoch nicht gewähren kann und somit keine Option einer Routinediagnostik darstellt. Abseits der klinischen Anwendung existieren weitere experimentelle Methoden, bei denen radioaktive oder fluoreszierende Substanzen zum Einsatz kommen. Die Verwendung von Radioisotopen als teures und mit den Risiken und Kontraindikationen im Zusammenhang mit radioaktiver Strahlung verbundenes Verfahren eignet sich jedoch weniger zur frühzeitigen und engmaschigen Überwachung von IntensivpatientInnen. Der Fokus liegt daher auf der Erforschung weiterer fluoreszenzbasierter Methoden. Das klinisch als zur GFR-Bestimmung ideal geltendes Molekül Inulin, kombiniert mit der Fluoreszenzmarkierung durch FITC (Fluoresceinisothiocyanat), ermöglicht hierbei eine transkutane Messung zur Einschätzung der GFR und somit der Nierenfunktion (*Steinbach et al. 2014*). Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Exzitations- und Emissionsspektren des FITC ($EX_{FITC} = 488 \text{ nm}$, $EM_{FITC} = 525 \text{ nm}$, *Huang et al. 2017*) nicht im optischen Fenster des Blutes zwischen 650 und 900 nm liegen. Dies behindert die Messung aufgrund der Störung des Emissionssignals durch Hämoglobin, s. Abb. 4

Inzwischen wurden in Anlehnung an FITC-Inulin in verschiedenen Abwandlungen fluoreszierende Moleküle angewendet, um die Nierenfunktion darzustellen (*Joshi und Wang 2010*). Im Nahinfrarotbereich wird das Molekül IRDye[®] 800CW neben der renalen Clearancebestimmung zum *targeting* von Tumorzellen *in vivo* verwendet. Die Akkumulation in der Haut und die hohe Plasmaproteinbindung bedeuten jedoch auch bei dieser Substanz keine optimalen kinetischen Eigenschaften. Ein jüngeres Beispiel sind die Nahinfrarot (NIR)-Farbstoffe ABZWCY-HP β CD und AAZWCY-HP β CD, die ohne Reabsorption oder Sekretion renal ausgeschieden werden und eine niedrigere Plasmaproteinbindung aufweisen (*Yu et al. 2015, Huang et al. 2017*).

Eine Methode, die einen der GFR-Bestimmung der Niere entsprechenden endogenen funktionellen Eliminationsprozess der Leber dynamisch wiedergibt, existiert in der klinischen Routine bisher nicht. Es wurden dynamische Testverfahren entwickelt, die die Verabreichung eines Stoffes voraussetzen (s. Tab. 4).

Tabelle 4: Einteilung und Informationsgehalt gebräuchlicher Leberfunktionstests (verändert nach *Bauer und Kortgen 2012*).

Testtyp	Parameter	Statische Tests:	Informationsgehalt
		ALAT, ASAT γGT, AP Bilirubin Albumin Gerinnungsfaktoren	hepatozelluläre Integrität Cholestase Exkretionsleistung Syntheseleistung Syntheseleistung
Testtyp	Parameter	Dynamische Tests:	Informationsgehalt
		MEGX-Test ICG-Clearance Aminosäuren-Clearance-Test	Metabolisierungskapazität Clearanceleistung Syntheseleistung

Dynamische Verfahren ermöglichen eine schnelle und genaue Aussage über die Organfunktion und sollen gleichzeitig idealerweise minimalinvasiv und bettseitig durchführbar sein. Dahingehend besteht in der momentanen klinischen Anwendung noch Verbesserungspotential. Es sind oftmals repetitive Blutentnahmen vonnöten, um Plasmaspiegel einer verabreichten Substanz zu bestimmen. Als Beispiel zur Leberfunktionsprüfung sei der MEGX-Test genannt. In Plasmaproben wird hier nach *i.v.*-Lidocaingabe die Konzentration des Metaboliten Monoethylglycinxylylid (MEGX), dessen Bildung ausschließlich einer Cytochrom P450 3A-Aktivität unterliegt, bestimmt. Einen weiteren Ansatz eines dynamischen Messverfahrens stellt die Messung der Aminosäurenclearance dar. Da diese in der Leber zur Proteinsynthese verwendet werden, können durch die Plasmakonzentrationen nach der Applikation Rückschlüsse auf die Syntheseleistung der Leber gezogen werden (*Bauer und Kortgen 2012*).

Bei der Diagnostik des akuten Nieren- und Leberversagens werden klinisch bisher überwiegend statische Biomarker herangezogen, welche die Organfunktionen nur ungenau darstellen können, handelt es sich doch bei der Metabolisierung und Eliminierung verschiedenster Substanzen um hochdynamische Prozesse. Dynamische Messverfahren stellen im Vergleich zu statischen Biomarkern eine Organdysfunktion sensitiver und genauer dar, indem organspezifische Prozesse in Echtzeit wiedergespiegelt werden (*Sakka 2007, Bauer und Kortgen 2012*). Plasmakonzentrationen eines zugeführten Stoffes werden in engen Intervallen

gemessen, wodurch die Plasmaverschwinderate (PDR) annähernd genau bestimmt werden kann. Die Kurvenverläufe resultieren aus der Überlagerung der organspezifischen Elimination des jeweiligen Stoffes und Verteilungsvorgängen im Körper, wobei zumeist biphasische Verläufe resultieren (s. Abb. 3).

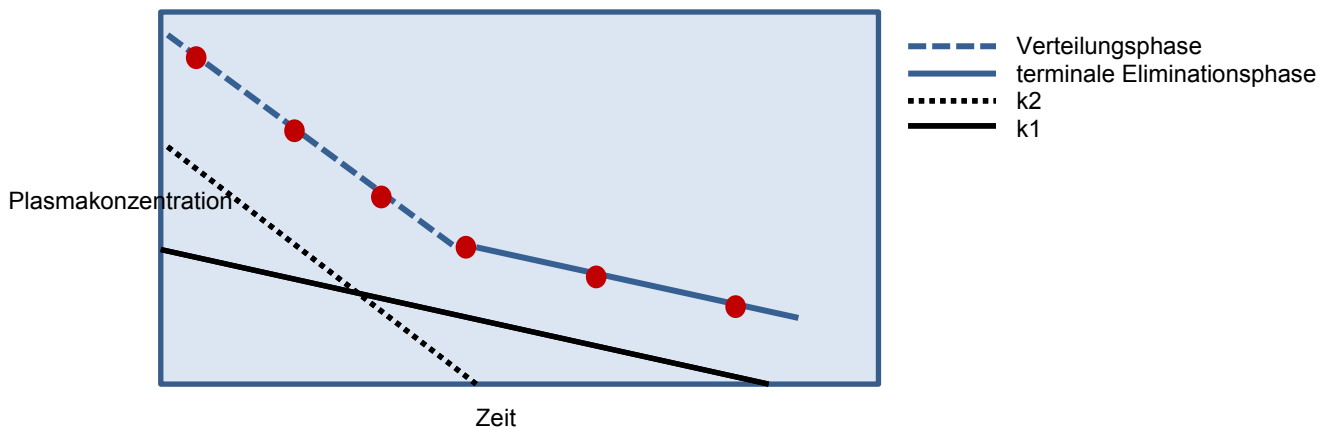


Abbildung 3: Biphasischer Verlauf der Plasmaverschwinderate. Während der Equilibrationsphase kommt es zum Konzentrationsausgleich zwischen intra- und extravaskulärem Kompartiment (k_2). Der renale Eliminationsprozess (k_1) findet zeitgleich statt. Beide Prozesse laufen zeitgleich in der Verteilungsphase ab. Nach Erreichen des Äquilibrium erfolgt die terminale Eliminationsphase (verändert nach *Traynor et al. 2006*).

Im Vergleich zu den bisher genannten Methoden stellt sich in diesem Sinne die Bestimmung der hepatischen *Clearance* von Indocyaningrün (ICG) als weniger invasive, kostengünstige und mit geringem Zeitaufwand bettseitig durchführbare Alternative dar. Es handelt sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, dessen Spektrum im optischen Fenster des Blutes liegt. Dies beschreibt den Wellenlängenbereich von 650 nm bis 900 nm, in dem kaum Überschneidungen mit den optischen Eigenschaften anderer Blutbestandteile auftreten. ICG wird nach *i.v.*-Gabe gebunden an Albumin im Blut transportiert, ATP-unabhängig von Hepatozyten aufgenommen und unter ATP-Verbrauch unverändert in die Galle ausgeschieden, ohne dabei dem enterohepatischen Kreislauf zu unterliegen (*Desmettre et al. 2000*). Da diese Substanz fluoresziert, kann ihre Plasmakonzentration durch Emissionsmessung über ein Pulsdensitometer transkutan quantifiziert werden, ohne dass Blutentnahmen erforderlich sind. Das Absorptionsmaximum von ICG befindet sich im Blut bei 805 nm, das Emissionsmaximum bei 830 nm (*Desmettre et al. 2000*). Im Gesunden beträgt die PDR(ICG) nach einer Injektionsdosis von 0,25 - 0,5 mg/kg KG mindestens 18 %/min. Eine Verlangsamung der PDR lässt Rückschlüsse auf eine

durch reduzierten Blutfluss und/oder Energiemangel beeinträchtigte Leberstoffwechsellistung zu (Faybik und Hetz 2006). Für das perioperative Überleben von PatientInnen mit Leberzirrhose hat die Messung der PDR(ICG) prädiktiven Wert. Außerdem ist die PDR(ICG)-Messung zu engmaschigen Verlaufsbeurteilungen und Therapieanpassungen wegen der schnellen und einfachen bettseitigen Durchführung geeignet und besitzt somit auch das Potential, eine akute Leberschädigung zu detektieren. Studien zeigen diesbezüglich, dass eine verringerte PDR(ICG) mit einer erhöhten Letalität bei kritisch kranken und septischen PatientInnen korreliert (Hemming et al. 1992, Sakka et al. 2002, Kortgen et al. 2009).

1.2 Polymethinfarbstoffe

Geeignete Farbstoffe für *in vivo imaging* und transkutane Messungen weisen Absorptions- und Emissionsspektren auf, die sich im optischen Fenster zwischen 650 nm und 900 nm befinden (Smith et al. 2009, James et al. 2013). Dazu gehören im Nahinfrarotbereich fluoreszierende (NIR) Farbstoffe, zu denen auch ICG zählt. Durch diese Eigenschaft wird eine Überlagerung durch Blutbestandteile wie Hämoglobin und Wasser möglichst gering gehalten. Eine möglichst niedrige Wellenlänge ermöglicht dabei eine hohe Auflösung und ausreichende Gewebepenetration von ein bis zwei Zentimetern zur transkutanen Detektion (Smith et al. 2009, Kobayashi et al. 2010, s. Abb. 4).

Der bereits erwähnte Farbstoff ICG, der seit einigen Jahren klinisch angewendet wird, gehört strukturell zu den Polymethinfarbstoffen. Diese zeichnen sich durch konjugierte Methingruppen (-CH=) aus, die ein mesomeres System bilden, welches durch zusätzliche chromophore Gruppen verlängert, stabilisiert und in den optischen Eigenschaften modifiziert wird. Die Substituenten besitzen zumeist einen heterozyklischen Ring und bewirken aufgrund ihrer Ladung eine gleichmäßige Ladungsverteilung im Molekül. Somit ist eine stärkere Delokalisation der π -Elektronen möglich, wodurch diese leichter angeregt werden können (Ullah et al. 2013).

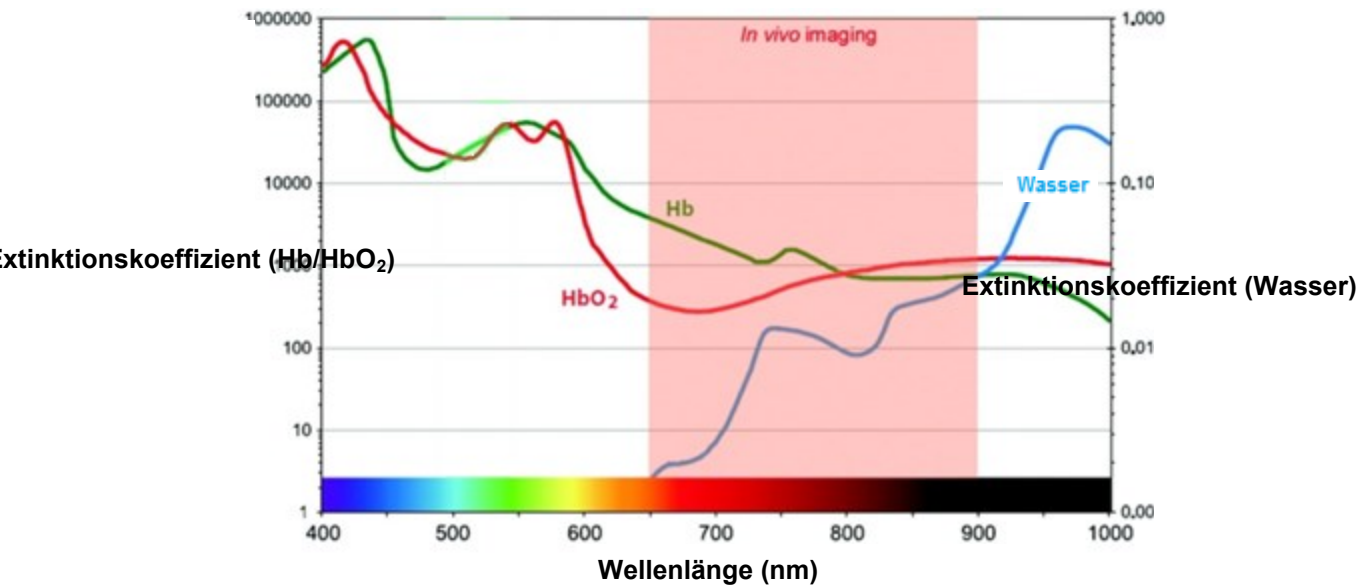


Abbildung 4: Extinktionskoeffizienten der Blutbestandteile. Optisches Fenster des Blutes. Durch die Absorptionsspektren von Wasser und Hämoglobin ergibt sich ein optisches Fenster zwischen 650 und 900 nm, das sich zur Detektion fluoreszierender Stoffe eignet. Darstellung der Extinktionskoeffizienten von Wasser, Oxy- und Desoxyhämoglobin bis in den NIR-Bereich (verändert nach Kobayashi et al. 2010).

Polymethinfarbstoffe werden aufgrund ihrer biochemischen und optischen Eigenschaften in verschiedensten Bereichen angewendet. Sie zeichnen sich durch hohe molare Absorptionskoeffizienten von bis zu $3 \cdot 10^5 \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ und modifizierbare Absorptionsspektren im sichtbaren und Nahinfrarotbereich aus. Dabei werden die elektrischen und optischen Eigenschaften durch die Kettenlängen und terminalen Gruppen, die als Elektronenakzeptor bzw. -donor fungieren, bestimmt (James et al. 2013, Ullah et al. 2013).

In den Versuchen, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, wurden Polymethinfarbstoffe der Firma Dyomics GmbH (Jena) verwendet. Es konnte in vorangehenden Arbeiten gezeigt werden, dass diese Substanzen eine höhere Quanteneffizienz, bessere Stabilität und geringere Zytotoxizität als ICG aufweisen (Pauli et al. 2009). Einige dieser Farbstoffe wurden bereits bei *in-vivo*-Experimenten eingesetzt, beispielsweise um die Exkretionsleistung durch Leber und Niere zu visualisieren (Press et al. 2014, Recknagel et al. 2012). Im Vorfeld dieser Arbeit wurden pharmakokinetische Parameter verschiedener einzelner Farbstoffe in gesunden Ratten gemessen (Keib 2012). So konnten diese in den

Körperflüssigkeiten mittels Fluorimetrie qualitativ beurteilt werden und anhand der Konzentrationen in Galle und Urin Rückschlüsse auf den hepatischen bzw. renalen Eliminationsweg gezogen werden. Dies ermöglichte nun eine Vorauswahl von vier Farbstoffen zur Anwendung bei der simultanen Leber- und Nierenfunktionsmessung. Es wurden Kombinationen aus einem vornehmlich hepatisch und einem renal eliminierten Stoff gebildet, welche sich anhand ihrer Spektren optisch unterscheiden lassen. Die Paare DY-654 + DY-780 und DY-778 + DY-680 wurden dabei als vielversprechende Kombinationen ausgewählt (s. Anhang I).

Die chemische Struktur der Farbstoffe lässt Vermutungen über die organspezifische Eliminationsroute zu. Die Anzahl möglicher Sulfonsäuresubstituenten bestimmt dabei insgesamt die Hydrophobizität des Moleküls und dessen biophysikalische Eigenschaften: Je mehr Sulfonsäuregruppen vorhanden sind, desto hydrophiler wird das Molekül, zudem nimmt die Plasmaproteinbindung ab. Beides führt dazu, dass die Moleküle vorwiegend im proximalen Tubulus der Niere sekretiert oder reabsorbiert werden sollen (*Hamann et al. 2011*).

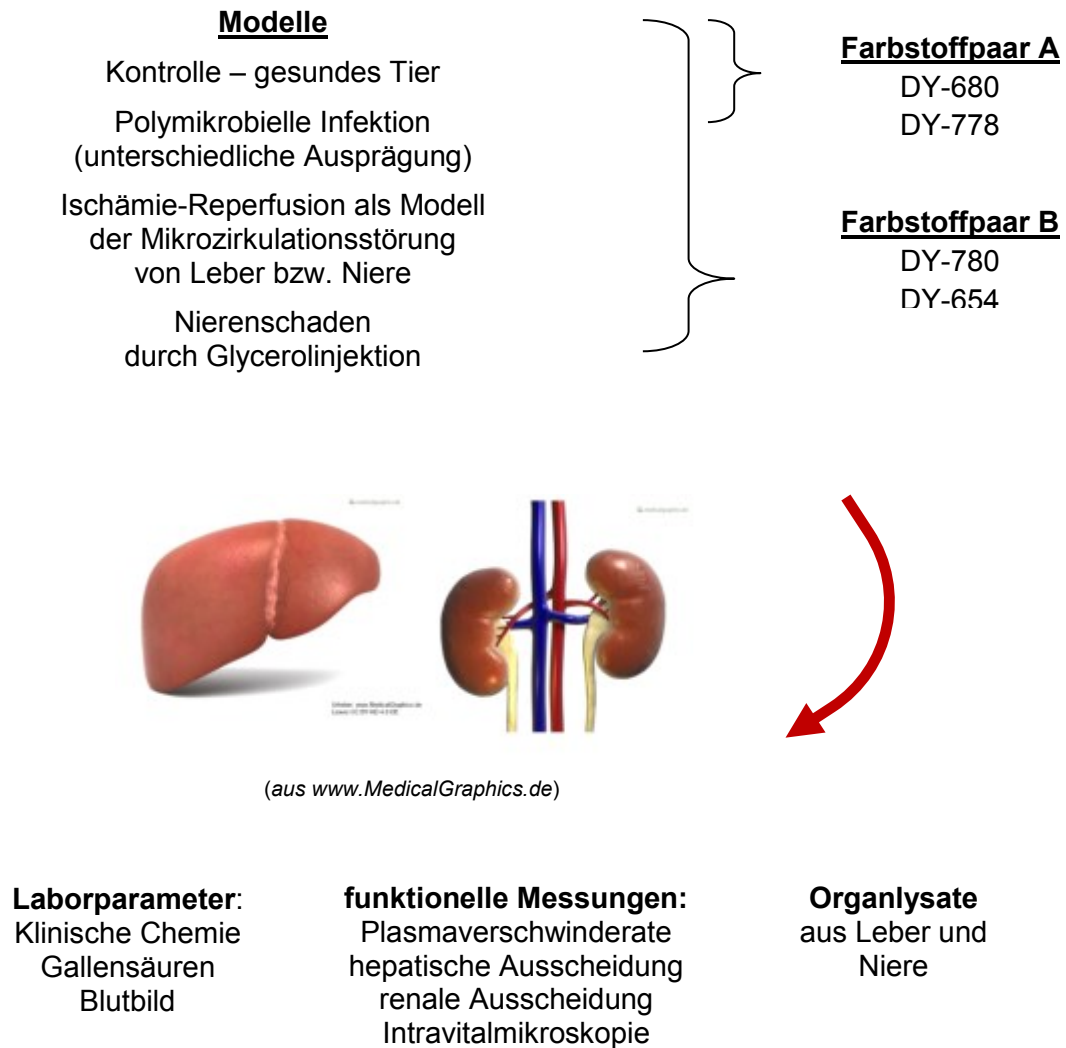
2 Ziele der Arbeit

Differenzierte biophysikochemische Eigenschaften der Polymethinfarbstoffe lassen ihre Anwendung als eine nicht-invasive, schnelle Bestimmungsmethode der Leber- und Nierenfunktion zu. Eine simultane Messung beider Organfunktionen sollte unter Verwendung eines geeigneten Paares, welches voneinander abgrenzbare Absorptions- und Emissionsspektren aufweist, möglich sein.

Ziel dieser Arbeit war es somit, ein geeignetes Farbstoffpaar zur gleichzeitigen dynamischen Leber- und Nierenfunktionsmessung zu identifizieren. In verschiedenen Schädigungsmodellen sollten dabei die pharmakokinetischen Parameter der Farbstoffe *in vivo* durch fluorimetrische Konzentrationsbestimmungen und mikroskopische Aufnahmen untersucht werden.

Hierfür wurden Experimente mit simultaner Applikation eines hepatisch und renal eliminierten Farbstoffs durchgeführt. Dabei wurden zunächst die jeweiligen Kombinationen der Farbstoffe bei gesunden und septischen Ratten injiziert, um deren Kinetik bei der simultanen Verabreichung im Vergleich darzustellen. Ziel war es herauszustellen, ob im septischen Tier eine veränderte Ausscheidung des Farbstoffs vonstattengehen würde. Zudem sollten intravitalmikroskopische Aufnahmen angefertigt werden, um die Dynamik des Farbstofftransportes innerhalb des jeweiligen Organs zu beurteilen. Die gewonnenen Daten wurden in Zusammenschau mit klinischen Parametern der Versuchstiere betrachtet und die Akkumulation der Farbstoffe in Organlysaten ausgewertet. Dies diente der Verifizierung der Organschädigung und die Korrelation der Daten.

Es sollte daraufhin ein Farbstoffpaar ausgewählt werden, welches deutlich veränderte Kinetiken im septischen Tier im Vergleich zur Kontrolle aufweist. Dieses wurde außerdem in anderen Organschädigungsmodellen untersucht. Dabei kamen das Ischämie-Reperfusion (I/R)-Modell der Leber und der Niere sowie die Glycerol-induzierte Nierenschädigung zum Einsatz. Hier war es das Ziel, eine isolierte Organschädigung hervorzurufen und festzustellen, ob die gewonnenen Daten im Vergleich zur Sepsis verändert wären. Abb. 5 veranschaulicht die Vorgehensweise.



-
- 
- **Ausprägung der Organschädigung**
 - **Eignung der Farbstoffpaare**
 - **Auswahl eines Farbstoffpaares**

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Es wurden verschiedene Modelle zur Organschädigung angewendet. Anschließend wurde ein Farbstoffpaar injiziert. Zur Messung der Organschädigung wurden unterschiedliche, unabhängige Verfahren angewendet.

3 Methodik

3.1 Material

3.1.1 Versuchstiere

Für die Messungen der Plasmaverschwinderate und der Intravitalmikroskopie-Epifluoreszenz wurden verwendet:

Tierart	Ratten, Wistar (Rcc:Han)
Geschlecht	männlich
Züchter	Harlan
Gewicht	250 – 350 g

Für die Messungen der *laser scanning* Intravitalmikroskopie wurden verwendet:

Tierart	Mäuse, FVB/NRj
Geschlecht	männlich
Züchter	Janvier
Gewicht	25 – 30 g

Die Versuche wurden an Ratten und Mäusen durchgeführt. Grundlegende makro- und mikroskopische Eigenschaften der Wirbeltiere in Bezug auf Metabolismus und Anatomie stimmen im Vergleich zum Menschen überein. Im Sinne des Tierschutzes wurden die sinnesphysiologisch am geringsten differenzierten Spezies gewählt, die weitestgehend auf den Menschen übertragbare Ergebnisse produzieren. Repetitive Blutentnahmen bedingen ein ausreichendes Blutvolumen, weshalb bei entsprechenden Versuchen Ratten verwendet wurden. Die LSM Mikroskopie wurde aus logistischen Gründen mit Mäusen durchgeführt.

3.1.2 Chemikalien

Farbstoffaufbereitung

DY-654	DYOMICS
DY-680	DYOMICS
DY-780	DYOMICS

DY-778	DYOMICS
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich
Ampuwa®	Fresenius
Kanülen, diverse	Sterican

Tierversuche

Glucosteril 5 %	Fresenius
NaCl 0,9 %	Fresenius
Ringer-Laktat	Fresenius
Heparin Natrium 25000 IE	Ratiopharm
1,2 mL Lithium-Heparin S- Blutentnahmeröhrchen	Sarstedt
1,2 mL EDTA-Röhrchen	Sarstedt
Polyurethan Katheter, diverse	Instech Solomon
Bupivacain 0,5%	Jenapharm
Xylocain 0,1%	Aspen
Isofluran	Actravis
HistoAcryl	B. Braun
Desinfektionsmittel (Softasept®)	B. Braun
Glycerol	Sigma Aldrich
Acetonitril	Merck
Triton® X-100	Thermo Fisher Scientific
faeces Charge III	(vgl. <i>Sommerfeld et al. 2020</i>)
Stickstoff (flüssig)	

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

div. Pipetten 1 µL – 1000 µL	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reaktionsgefäße 1 mL – 2 mL	Eppendorf
Falcons 10 mL	diverse
Wellplatten “half area flat black”	Greiner Bio One
Sterile Tupfer	diverse

Fadenrolle 3-0 polyfiler Faden	Ethicon
Steriles Abdecktuch	diverse
Petrischalen	diverse
Urinbecher	diverse
Nahtmaterial, diverses	Ethicon
OP-Besteck, diverses	diverse
Einmalskalpell	Dahlhausen

3.1.4 Geräte

Lichtmikroskop	OLYMPUS® - PROVIS AX70
Kamera	Carl Zeiss - AxioCam MRc5
Epifluoreszenz Intravitalmikroskop	Carl Zeiss - AxioObserver Z1
<i>laser scanning</i> Mikroskop	Carl Zeiss - LSM-780
Operationsmikroskop	Carl Zeiss - OPMI microscope
Mikrotitrierplatten-Reader	Tecan - infinite® pro microplate reader
Isofluranverdampfer	DRÄGER - Vapor 19.3
Heizplatte + Kontrolleinheit	World precision instruments, ATC1000
Schermaschine + Scherkopf	Aesculap® - Favorita II + GH700
Tierwaage	Sartorius - LP2205
Feinwaage	Sartorius - BP61
Klinische Chemie Automat	Abbott - Architect ci8200
Blutbild Automat	Sysmex - pocH-100iV
Vortex Mixer	Scientific industries - Vortex Genie™ 2T
Zentrifuge	Heraeus™ - Biofuge™ Stratos
Kugelmühle	Qiagen - TissueLyser LT

3.2 Tierversuche

3.2.1 Generelle Techniken

Die Durchführung der Tierversuche wurde mit den Aktenzeichen TVA 02-014/12 und TVA 02-047/14 vom Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz genehmigt.

Die Versuche wurden an Ratten und Mäusen durchgeführt. Die Schädigungsmodelle, welche auf ischämische und entzündliche Prozesse hinauslaufen, spiegeln Pathomechanismen wider, die auch bei menschlichen PatientInnen von Bedeutung sind.

Narkose

Zur Narkoseeinleitung mit Vaporisator wurde ein Sauerstoff-Luft-Gasgemisch im Verhältnis 1:2, Tidalvolumen 1mL/kg KG, Isofluran 4 %, verwendet und in eine Kammer eingeleitet. Nach dem Einschlafen des Tieres folgte die Überprüfung der Narkosetiefe anhand Reflexprüfungen an Zehen und Kornea. Die Narkose wurde über eine Nasenmaske aufrechterhalten. Die Narkosetiefe wurde während der Eingriffe kontinuierlich anhand der Reflexe und Atmung des Tieres überprüft und die Gaszufuhr entsprechend angepasst. Zur Ausleitung der Narkose wurde die Isofluranzufuhr gestoppt und das Tier unter Beobachtung der Atmung und Reflexe aufwachen gelassen.

Während der Narkose wurde die Körpertemperatur des Tieres mithilfe einer Heizplatte mit rektalem Temperatursensor bei 37,5 °C aufrechterhalten (*Gudjonsson 1932*). Um Flüssigkeitsverluste während der Narkose auszugleichen, wurden dem Tier einmal pro Stunde 0,5 mL Glucose 0,5 % *s.c.* injiziert, sofern keine Spülung über den *i.v.* Zugang während der Probenentnahme erfolgte.

Sterilität

Das Arbeiten wurde soweit möglich in steriler Umgebung durchgeführt, insbesondere, wenn das Tier nach dem Eingriff wieder erwachen sollte. Es kamen steril verpackte Arbeitsmaterialien, sterile Handschuhe, hitzesterilisiertes OP-Besteck (250 °C, 2 min) und Desinfektionsmittel zum Einsatz. Hautschnitte wurden nach der Naht desinfiziert und mit Aluminiumspray versiegelt.

3.2.2 Induktion einer polymikrobiellen Sepsis

Zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis wurde das PCI (*peritoneal contamination and infection*) - Modell angewendet. Dies ist ein anerkanntes Verfahren für ein experimentelles Sepsismodell, welches in der Arbeitsgruppe der experimentellen Anästhesie des Universitätsklinikums Jena etablierte Anwendung findet und mit einer Einschränkung von Leber- und Nierenfunktion einhergeht (Gonnert et al. 2011, Otto et al. 2015).

Die aliquotierte *faeces*-Menge wurde im Verhältnis 1:4 mit NaCl 0,9 % verdünnt. Das Tier wurde gewogen und in einer Kammer in Narkose gelegt. Anschließend wurde der linke Unterbauch der Ratte desinfiziert und die *faeces*-Suspension gewichtsadaptiert intraperitoneal injiziert (1,25 μ L/g KG). Danach wurde der Bauch des Tieres massiert, um eine bessere intraabdominelle Verteilung der *faeces* zu erzielen. Daraufhin wurden die Tiere über 15 Stunden in einzeln belüfteten Käfigen in Einzelhaltung bei frei zugänglicher Nahrung und Wasser belassen. Über den Beobachtungszeitraum erfolgten kein Monitoring und keine zusätzliche Volumengabe.

Vor Beginn der Messungen nach 15 Stunden wurden die Tiere erneut gewogen und ihr Erscheinungsbild beurteilt (s. Abb. 6).

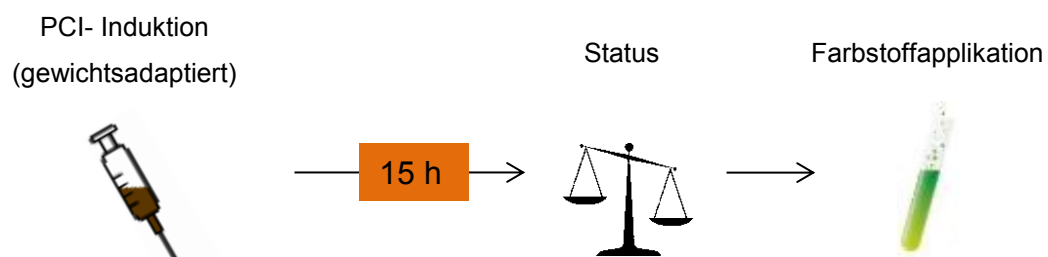


Abbildung 6: Versuchsablauf PCI-Induktion. Nach 15-stündiger Inkubationszeit wurden die Versuchstiere gewogen und ihr Krankheitszustand eingeschätzt. Anschließend erfolgte die Messung der Kinetiken.

3.2.3 Ischämie-Reperfusion-Modell zur isolierten Organschädigung

Anschließend wurden die Farbstoffkonzentrationen in Plasma, Galle und Urin in Krankheitsmodellen charakterisiert, welche eine isolierte Organschädigung hervorrufen sollen. Um bei einem Versuchstier entweder einen Leber- oder einen Nierenschaden zu generieren, wurde am jeweiligen Organ das Ischämie-Reperfusion-Modell angewendet. Die Ischämie wurde jeweils 45 Minuten lang aufrechterhalten. Im Anschluss erfolgte die Reperfusion über 24 Stunden (*Mendes-Braz et al. 2012, Hines et al. 2003, Williams et al. 1997*).

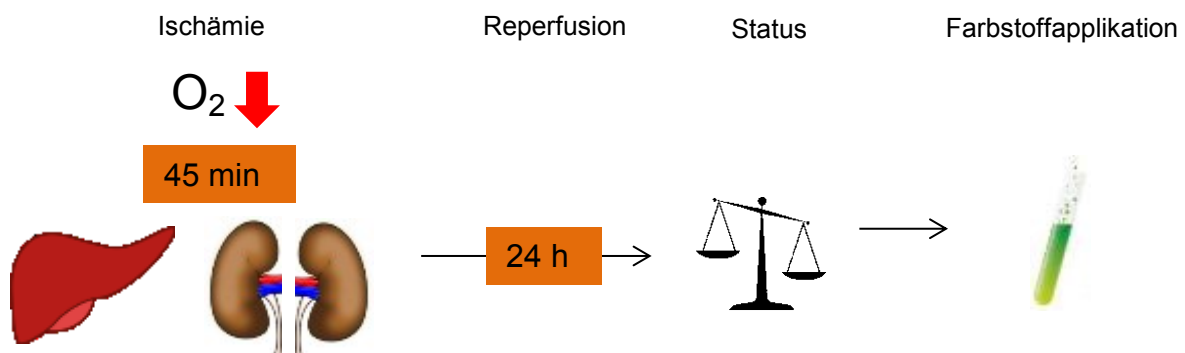


Abbildung 7: Versuchsablauf Ischämie-Reperfusion-Modell. Nach 45-minütiger Ischämie erfolgte die Reperfusion über 24 Stunden. Anschließend erfolgten eine Stuserhebung und die Messung der Kinetiken.

Zunächst wurde das Tier gewogen und dann narkotisiert. Das Abdomen wurde rasiert und anschließend mit Hautdesinfektionsmittel desinfiziert. Nach der Fixation des Tieres mittels Klebeband an den Extremitäten auf der Heizplatte und dem Einführen des rektalen Temperatursensors wurde das Tier mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt. Die Reflexe wurden zur Einschätzung der Narkosetiefe geprüft (Zehenreflex, Lidschlussreflex). Die Narkose wurde über eine Nasenmaske aufrechterhalten. Es erfolgte die erneute Hautdesinfektion des Operationsfeldes. Das Operationsbesteck wurde im Hitzesterilisator bei 250 °C zwei Minuten lang sterilisiert.

Um einer Hypotonie entgegenzuwirken und den Flüssigkeitshaushalt des Versuchstieres auszugleichen, wurden vor Beginn der Operation 2 mL Glucosteril mittels einer 25 G Kanüle s.c. injiziert.

Danach erfolgte unter sterilen Bedingungen die Eröffnung des Bauchraumes von ventral-medial durch einen vertikalen Schnitt entlang der *linea alba*. Dabei wurden zuerst die Hautschicht und anschließend Muskelschicht und Peritoneum durchtrennt. Eventuell auftretende Blutungen wurden mittels Kauterisierung gestoppt. Mit Wattestäbchen wurde vorsichtig das Darmgekröse steril ausgelagert, um Zugang zu den Nieren bzw. der Leber zu erhalten.

Um eine Nierenischämie zu erzielen, wurden im Anschluss beide Nieren aufgesucht und stumpf freigelegt. Anschließend wurde jeweils eine Gefäßklemme am Nierenhilus platziert. Somit wurde eine bilaterale 100-prozentige Nierenischämie induziert. Durch das Unterbinden der Gefäße entfärbten sich die Nieren in den ersten Sekunden, dann nahmen sie eine dunkelviolette Oberfläche an, welche nach 45 Minuten unregelmäßig gefleckt erschien.

Die 70-prozentige Leberischämie trat nach dem Verschluss der versorgenden Abschnitte der Portalvene und Leberarterie auf. Hierbei wurde eine Gefäßklemme entsprechend distal der Abzweigungen der afferenten Gefäße zu den kaudalen und rechten Leberlappen gesetzt (s. Abb. 8). Dadurch wurden der LLL (Linke Laterale Lappen) und der ML (Mediale Lappen) der Leber ischämisch. Diese entfärbten sich im Laufe der Ischämie und imponierten nach 45 Minuten unregelmäßig gefleckt.



Abbildung 8: makroskopische Unterteilung der Rattenleber. Die Leber setzt sich aus dem Median Lobe (ML; Mittlerer Lappen), Left Lateral Lobe (LLL; Linker Lateraler Lappen), Right Lobe (RL; Rechter Lappen) und Caudate Lobe (CL; Kaudaler Lappen) zusammen. Rechts: Darstellung der Gefäßunterbindung bei Ischämie-Reperfusion (verändert nach *Aller et al. 2012*).

Direkt nach dem Anbringen der Gefäßklemmen wurden 500 μL Heparin (50 IE/mL) in das Abdomen des Tieres gegeben, um der Bildung von Thromben vorzubeugen. Während der Ischämie wurde das Operationsfeld mit sterilen, in Ringer-Laktat getränkten Tüchern bedeckt und die Narkosetiefe wurde anhand der Atemfrequenz und -tiefe sowie des Erlöschens der Krallenschlussreflexe auf ca. 1,5 % Isofluran angepasst. Nachdem 45 Minuten vergangen waren, wurden die Klemmen entfernt und die Reperfusion begann. Die Organe nahmen in den ersten zwei Minuten wieder ihre normale Färbung an. Das Abdomen wurde mit sterilem NaCl 0,9 % gespült. Nun wurden Muskelschicht und Haut durch jeweils eine Naht verschlossen (Nahtmaterial: Prolene 3-0, Ethicon) und die Schmerzbehandlung mit Bupivacain 0,25 % s.c. (7,5 $\mu\text{g/g}$ KG) eingeleitet. Die Wunde wurde zum Schutz mit Aluminiumspray bedeckt und die Narkose ausgeleitet. Anschließend wurde das Tier in einen separaten Käfig überführt und das Erwachen nach der Narkose überwacht. Nahrung und Trinkwasser wurden frei zur Verfügung gestellt.

Vor Beginn der anschließenden Messungen nach 24 Stunden wurden die Tiere erneut gewogen und ihr Erscheinungsbild beurteilt (s. Abb. 7).

3.2.4 Glycerolinjektion zur Nierenschädigung

Mithilfe dieses Modells sollte eine isolierte Nierenschädigung durch freiwerdendes Myoglobin, resultierend aus Rhabdomyolyse, hervorgerufen werden. Zunächst wurden die Tiere für 16 Stunden ohne Zugang zu Trinkwasser belassen. Anschließend erfolgte die gewichtsadaptierte *i.m.*-Injektion einer 50-prozentigen Glycerollösung (10 $\mu\text{L/g}$ KG) im Bereich der Hinterbeine. Nach 24 Stunden, in denen wieder freier Zugang zu Wasser bestand, wurden die Tiere für die Messung der Farbstoffkinetik verwendet (s. Abb. 9; Malik 1998, Wolfert und Oken 1989).

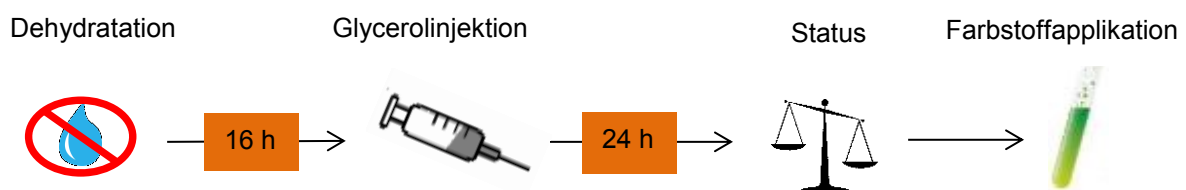


Abbildung 9: Versuchsablauf Glycerolinjektion. Zuerst erfolgte eine Dehydratation über 16 Stunden. Danach wurde die Glycerollösung injiziert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Versuchstiere gewogen und ihr Krankheitszustand eingeschätzt. Anschließend erfolgte die Vermessung der Farbstoffe.

3.2.5 Plasmaverschwinderate und Sekretionsraten

Die Vorbereitung der Operation und Einleitung der Narkose erfolgte wie bereits beschrieben.

Um die Blutgefäßkatheter einzusetzen, wurde am Hals der Ratte ventral eine ein bis zwei Zentimeter lange, vertikal verlaufende Inzision rechts lateral der Luftröhre gesetzt. Mittels stumpfer Präparation durch Aufspreizen des Gewebes wurden der *M. sternocleidomastoideus* und der *M. omohyoideus* vorsichtig voneinander getrennt. Dazwischen konnte nun die *A. carotis* dargestellt werden. Der *N. vagus*, der dieses Gefäß begleitet, wurde zur Schonung von der Arterie gelöst. Anschließend wurde die Blutzufuhr durch Fadenligaturen unterbunden und der mit Heparin gefüllte Katheter wurde eingesetzt und fixiert. Die korrekte Katheterlage konnte durch die pulsierende Blutsäule im Katheterlumen bestätigt werden. Es wurden 50 µL Heparin (500 IE/mL) und anschließend 1000 µL Ringer-Laktat zum Flüssigkeitsausgleich injiziert. Dann erfolgte die erste Blutentnahme (einmal Lithium-Heparin-Blutentnahmeröhrchen, ca. 300 µL, und einmal Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Blutentnahmeröhrchen, ca. 100 µL). Die antikoagulierten Proben wurden im Kühlschrank bei 4 °C zwischengelagert.

Die *V. jugularis* wurde nun lateral der Arterie, umgeben von der *Gl. submandibularis*, aufgesucht und freipräpariert. Analog erfolgte hier die Einbringung eines mit Heparin gefüllten Katheters in das Gefäßlumen und die *i.v.*-Spülung mit 300 µL Ringer-Laktat.

Nach erfolgreicher Katheterisierung wurde das Operationsfeld mit feuchten Tüchern abgedeckt. Es folgte die Eröffnung des Abdomens. Hierbei wurde entlang der *linea alba* eine vier Zentimeter lange Inzision bis zum *Xyphoid* gesetzt. Durch diese Schnittführung konnte die Blutungsgefahr bei der Baucheröffnung minimiert werden. Die Leber wurde vorsichtig mit Wattestäbchen positioniert und das Duodenum leicht hervorgelagert. Der Gallengang (*ductus choledochus*), welcher als dünne, leicht grünliche Struktur durch das diffuse Pankreas verläuft, konnte somit identifiziert werden. Er wurde durch eine Fadenligatur etwas herausgezogen. Es folgte die Platzierung des Katheters und dessen Fixierung durch einen vorgelegten Faden. Die aus dem Katheter tretende Gallenflüssigkeit wurde in einem

Reaktionsgefäß gesammelt. Das eröffnete Abdomen wurde mit feuchten sterilen Tüchern bedeckt. Abb. 10 veranschaulicht die Lage der Katheter.

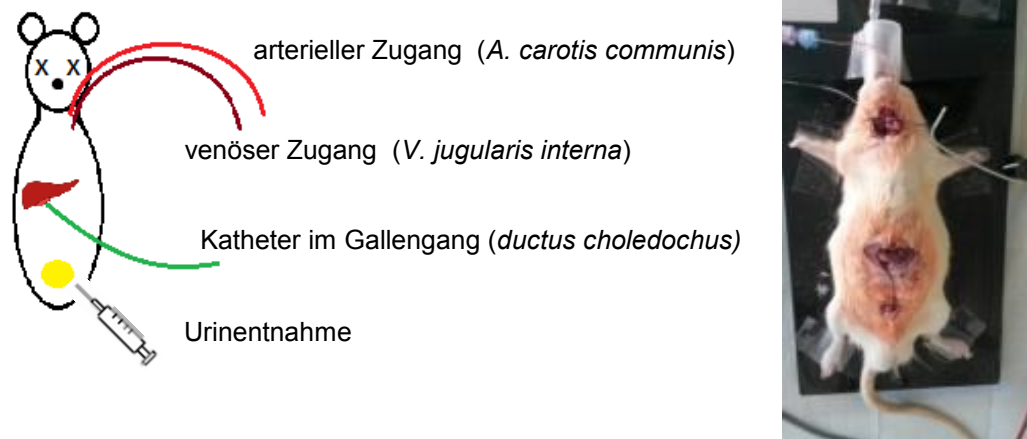


Abbildung 10: Versuchsablauf PDR-Messung. In Isoflurannarkose wurden ein arterieller, venöser und ein Gallengangskatheter platziert. Nach der *i.v.*- Injektion der Farbstoffe erfolgten die arterielle Blutentnahme und das Sammeln der Galle. Der Urin wurde am Ende des Experiments direkt aus der Harnblase entnommen.

Nach dem Platzieren aller Katheter wurde die Injektionslösung der Farbstofflösungen vorbereitet (je 140 pmol/g KG je Farbstoff, in 100 - 300 μL NaCl 0,09 %). Bevor die Farbstoffapplikation erfolgte, wurde eine vertikale Inzision auf Höhe der Harnblase gesetzt. Diese wurde zwischen der Muskelschicht herausgelagert und durch manuellen Druck entleert, sodass der Urin beim Austritt aus der Urethra in einem Reaktionsgefäß aufgefangen werden konnte. Anschließend wurde der Raum abgedunkelt, die Farbstofflösung über den venösen Katheter injiziert und mit 100 μL Ringer-Laktat nachgespült. Nun folgte das Probenampling. Es wurden je 300 μL Blut aus dem arteriellen Katheter in Lithium-Heparin-Blutentnahmeröhrchen zu den Zeitpunkten 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45 Minuten nach Farbstoffinjektion abgenommen. Die Galle wurde jeweils über einen Zeitraum von fünf Minuten in schwarzen Reaktionsgefäßen aufgefangen. Der Urin wurde nach 45 Minuten durch die Punktion der Harnblase mittels einer feinen Kanüle am *kranialen* Pol komplett aus der Harnblase abgezogen und in ein schwarzes Reaktionsgefäß überführt (s. Abb. 10 und Abb. 11).



Abbildung 11: DY-654 in der Harnblase eines Kontrolltiers nach Versuchsende.

3.2.6 Intravitalmikroskopie (IVM)

Nachdem das Tier narkotisiert wurde, erfolgte die Platzierung des Jugularvenenkatheters analog zur Prozedur der PDR-Messung. Anschließend wurden 200 μ L Ringer-Laktat *i.v.* appliziert.

Imaging Niere:

Nach dem Einbringen des Katheters erfolgte die Eröffnung des Abdomens rechts - lateral unterhalb des Rippenbogens auf Höhe der rechten Niere. Das umliegende Fettgewebe wurde vorsichtig entfernt, um die Niere etwas exponieren zu können.

Imaging Leber:

Nach dem Einbringen des Katheters erfolgte die Eröffnung des Abdomens links-lateral durch einen vertikalen Schnitt, beginnend am lateralen Ende der Leber. Anschließend wurden das *lig. falciforme*, *lig. hepatoduodenale*, *lig. hepatogastricum* und *lig. intralobulare* durchtrennt, um die Leber leichter mobilisieren zu können.

Es erfolgte anschließend die Umlagerung des Tieres auf den Mikroskopiertisch. Hier wurden die rechte Niere bzw. der *LLL* des Tieres vorsichtig exponiert. Das Organ wurde nun mittels HistoAcryl[®] auf dem Objektträger fixiert, um eine Verlagerung der Bildausschnitte während des Aufnahmezeitraums zu verhindern.

Um Aufnahmen der Leber und Niere in Ratten durchzuführen, wurde ein Epifluoreszenzmikroskop verwendet. Dabei wurde mittels der Software AxioVision (Zeiss) das zu mikroskopierende Organ bei ca. 450 nm Emission der NAD(P)H-Autofluoreszenz aufgesucht, um die Gewebestruktur darzustellen. 10-14 Positionen wurden dabei gespeichert. Es erfolgte eine Aufnahme vor der Farbstoffapplikation. Danach wurde das Farbstoffpaar (140 pmol/g KG) intravenös injiziert und mit 200 µL Ringer-Laktat nachgespült. Mit der Injektion des Farbstoffpaares begann die Messung. Diese erstreckte sich über 45 (50) Minuten bei den Versuchen am Epifluoreszenzmikroskop AxioObserver Z1 (Carl Zeiss), wobei im Abstand von 2,5 (2) Minuten die Positionen auf drei Kanälen aufgenommen wurden (s. Tab. 5; Messwerte s. Anhang VI)

Tabelle 5: Einstellungen der Kanäle bei epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen am AxioObserver Z1, Carl Zeiss. Vergrößerung: 20x; Verstärkung: Em-gain 60 + gain protection. DY-654/DY-780 wurden durch eine 100-Watt Quecksilberdampflampe angeregt. Die Aufnahme der Emission erfolgte mittels einer CCD Kamera (C9100-14, Hamamatsu Photonics, Japan).

Molekül	Exzitation	Emission	Belichtungszeit
NAD(P)H	365 bis 395 nm	445 bis 450 nm	50 ms
DY-654	630 bis 640 nm	650 bis 690 nm	150 ms
DY-780	775 bis 805 nm	845 bis 855 nm	150 ms

Die Videoaufnahmen der murinen Niere erfolgten am *laser scanning* Mikroskop LSM-780 (Carl Zeiss). Hier wurde DY-654 nicht in die *V. jugularis*, sondern in die Schwanzvene der Maus injiziert. Die Exzitationswellenlänge betrug hier 633 nm, die Emissionswellenlänge 650 nm; NAD(P)H-Autofluoreszenz wurde bei 405 nm \pm 30 nm Emission und 410 - 440 nm Exzitation erreicht.

Die Tiere verblieben bei allen Eingriffen während der kompletten Prozedur in Narkose. Bei sämtlichen Eingriffen wurde die Narkosetiefe ständig überwacht und an die individuellen Vitalparameter und den Reflexstatus des jeweiligen Versuchstieres angepasst. Ein einzelnes Tier wurde jeweils nur für eine Messung verwendet. Für unterschiedliche Methoden (PDR-Messung bzw. Intravitalmikroskopie) existierten ebenfalls getrennte Versuchsgruppen.

3.2.7 Organentnahme und –asservierung

Nachdem die Messungen (Plasmaverschwinderaten bzw. Intravitalmikroskopie) abgeschlossen waren, wurde das Tier mittels Herzpunktion euthanasiert und die Leber und Nieren entnommen. Die Organe wurden in NaCl 0,9 % gewaschen und anschließend teilweise kryoasserviert bzw. in Formalin 5 % zur Verwendung in anderen Untersuchungen fixiert.

3.2.8 Lagerung der Proben

Die Blutproben wurden innerhalb einer Stunde nach Gewinnung abzentrifugiert (15 min, 2500 x g). Das Plasma sowie die Organ-, Galle- und Urinproben wurden bei -80 °C gelagert.

3.3 Klinische Verlaufparameter und Blutbild

Es wurden Blutproben vor Beginn der Farbstoffapplikation entnommen, um Biomarker und Blutbild zu bestimmen. Diese wurden bei 2500 x g über 15 min abzentrifugiert und anschließend nach geräteinterner Funktion vermessen.

Die Biomarker der Leber- und Nierenschädigung wurden quantitativ photometrisch, potentiometrisch und turbidimetrisch gemessen (Architect ci8200 - Abbott). Zur Erfassung der Leberfunktion wurden Bilirubin (Exkretionsleistung), γ GT (Cholestase) sowie ASAT und ALAT (Leberzellintegrität) bestimmt. Als Nierenparameter wurden Harnstoff und Kreatinin herangezogen (Messwerte s. Anhang VII).

Aus dem Blutplasma wurde am poch-100iV - Sysmex durch das Reagenziensystem poch-Pack 65 XL ein Differentialblutbild erstellt. Die ermittelte Leukozytenzahl ging in die Beschreibung des Status der Tiere, insbesondere nach PCI-Induktion, mit ein.

3.4 Fluorimetrische Quantifizierung

Zur Auswertung der Messergebnisse wurden Standardreihen (100 - 1000 nM in Plasma bzw. 10 - 100 nM in Urin bzw. Galle) mit den Farbstoffpaaren vermessen, um die Konzentrationen in den Proben im Anschluss berechnen zu können. Es wurden die geräteinternen Verstärkungen von 100, 125, 150, 175, 200 oder 225 angewendet.

Für die Vermessung der Proben wurde je Farbstoff am Mikroplattenreader eine Exzitationswellenlänge gewählt, welche ohne Überschneidung der beiden Spektren der enthaltenen Farbstoffe eine gute Fluoreszenzintensität ergibt. Ebenso wurden Emissionsspektren zur Detektion verwendet, die sich nicht überlagern (s. Einleitung, Kapitel 1.2). Dabei ergaben sich folgende Einstellungen (s. Tab. 6):

Tabelle 6: verwendete Wellenlängen der fluorimetrischen Messungen.

Farbstoffname	DY-654	DY-680	DY-778	DY-780
Exzitationswellenlänge	651 nm	686 nm	761 nm	776 nm
Emissionswellenlänge	690 nm	725 nm	800 nm	815 nm

Die Plasma-, Galle- und Urinproben wurden aufgetaut und in 96-Well-Platten pipettiert. Das Gesamtvolumen betrug dabei immer 70 µL. Galle- und Urinproben wurden dabei im Verhältnis 1:100 in MilliQ® verdünnt. Dies war erforderlich, da einerseits wenig Probenvolumen pro Zeitpunkt vorhanden und andererseits die Konzentration der Farbstoffe sehr hoch war. Das Plasma konnte unverdünnt vermessen werden. Je nach Konzentration wurde die passende Verstärkung gewählt, um Ergebnisse innerhalb des linearen Detektionsbereiches des Fluorimeters zu erreichen. Die Konzentration wurde aus den Messergebnissen mithilfe der Standardreihen rückgerechnet (s. Anhang II und III).

3.5 Organlysate

Die kryosasservierten Organe wurden mittels Stößel in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser zerkleinert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Organe nicht auftauen. Danach wurden genau abgewogene Mengen (90 - 110 mg) in 2 mL *safe lock* Eppendorff Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde der Lysepuffer (20 mL Acetonitril 50 %, 40 µL Triton X100 0,01 %, *Aqua dest. ad* 40 mL) gewichtsadaptiert (500µL/100mg) hinzugegeben und die Organstückchen in der Kugelmühle zerkleinert (Frequenz 50/s, 10 min). Nach Abzentrifugation (1000 x g, 15 min) wurden 100 µL Überstand in eine Wellplatte überführt und die Fluoreszenzintensität im Mikrotitrierplatten-Reader bei Exzitationswellenlängen von 651 nm und 776 nm und Emissionswellenlängen von 690 nm und 815 nm vermessen.

3.6 Auswertung der Daten

Zur Darstellung der Graphen wurde mit dem Programm GraphPad Prism gearbeitet. Statistische Signifikanztests wurden ebenfalls mit diesem Programm durchgeführt. Die Daten unterlagen keiner Normalverteilung, wie mittel Shapiro-Wilk Test überprüft wurde (Ablehnung der Nullhypothese wenn $p > 0,05$). Es herrschte eine heterogene Varianz und es lagen unterschiedliche Stichprobengrößen vor. Messungen der PDR, klinischer Verlaufparameter sowie der Fluoreszenzintensität im IVM sind entsprechend einer Rationalskala skaliert. Es wurde zum Vergleich der Gruppen untereinander der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Zur Beschreibung der Plasmaverschwinderaten wurde zunächst eine Mittelung der Daten durchgeführt. Zudem wurden die Daten normiert (s. Anhang IV). Dies erlaubt die zusammenfassende Beurteilung bei den stark variierenden Messbereichen. Diese Daten wurden mittels der Software Origin dargestellt und Potenzfunktionen beschrieben. Eine genauere Erläuterung findet sich im Anhang V. Die gefundenen Funktionen werden im Diskussionsteil (Kapitel 5.1) erörtert.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche zur Ermittlung des geeigneten Farbstoffpaares

4.1.1 Vorversuche in gesunden Tieren

Zunächst wurden Messungen der Plasmaverschwinderaten mit zwei unterschiedlichen Farbstoffkombinationen in gesunden Tieren durchgeführt (DY-680 + DY-778 bzw. DY 780 + DY-654, s. Tab. 7).

Tabelle 7: Farbstoffpaare zur simultanen Erfassung der Leber und Nierenfunktion.

	Paar 1	Paar 2
Monitoring der Leberfunktion	DY-780	DY-680
Monitoring der Nierenfunktion	DY-654	DY-778

In allen Versuchsgruppen war eine Abnahme der Plasmakonzentration der Farbstoffe im Zeitverlauf zu verzeichnen.

Bei den hepatisch eliminierten Farbstoffen DY-780 und DY-680 war dabei über den Messzeitraum von 45 Minuten ein starker Abfall zu sehen, welcher in den ersten zehn Minuten nach Applikation besonders schnell erfolgte und anschließend abflachte. Die Plasmakonzentration von DY-780 lag im gesunden Tier nach zehn Minuten bei 52 % (64 % bei DY-680) und nach 40 Minuten bei ca. 9 % (31 %).

Die renal eliminierten DY-778 und DY-654 hingegen präsentierten einen flacheren Abfall der Plasmakonzentration. Eine Halbierung der Anfangskonzentration wurde im Gegensatz zu den hepatisch eliminierten Farbstoffen innerhalb 45 Minuten nur annähernd erreicht. Am Ende der Messung lagen demnach noch 50 % der Anfangskonzentration von DY-654 (54 % DY-778) im Plasma vor (s. Abb. 12).

4.1.2 Vorversuche in septischen Tieren

Im Anschluss wurden die Farbstoffpaare bei PCI-behandelten Tieren injiziert. Eine deutlich unterschiedliche Kinetik konnte einzig bei DY-780 festgestellt werden. Insgesamt war bei den renal eliminierten Farbstoffen DY-778 und DY-654 kaum eine Änderung der pharmakokinetischen Parameter zu verzeichnen (s. Abb. 12).

Das Farbstoffpaar DY-780 + DY-654 wies im Vergleich zur Anwendung in gesunden Tieren insgesamt deutlich unterschiedlichere Kurvenverläufe im Plasma auf als DY-680 + DY-778. Ersteres Paar wurde deshalb ausgewählt, um die weiteren Versuche durchzuführen und es in den im Folgenden beschriebenen Modellen der Organschädigung weiter zu charakterisieren.

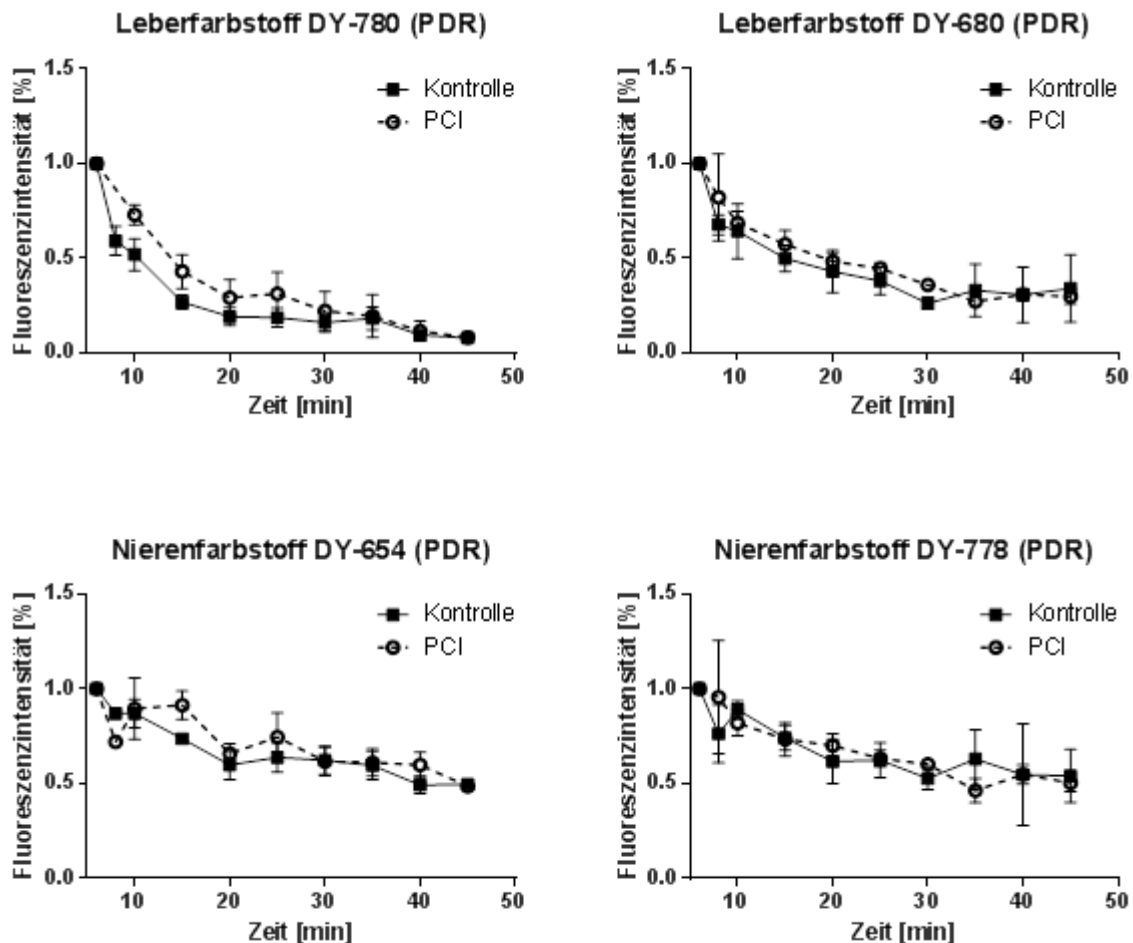


Abbildung 12: Plasmaverschwinderaten in gesunden und septischen Wistar-Ratten. Verlauf der Fluoreszenzintensität der Farbstoffpaare nach *i.v.* Injektion. Gemessen in Plasmaproben, $n = 3$ pro Gruppe, Darstellung MW + SEM. $t_1 = 6$ min *post injectionem*, $\Delta t = 2$ min (bis $t = 10$ min) bzw. 5 min (bis $t = 45$ min).

4.2 Anwendung der Farbstoffe in verschiedenen Krankheitsmodellen

4.2.1 PCI-Modell

PARAMETER DER LEBERSCHÄDIGUNG

Das Farbstoffpaar DY-780 + DY-654 wurde im PCI-Modell der polymikrobiellen Sepsis weitergehend charakterisiert. Es wurden zusätzliche Messzeitpunkte eingeführt. Die Tieranzahl der Sepsis- und Kontrollgruppe wurde in diesem Zuge erhöht ($n_{\text{Kontrolle}} = 5$, $n_{\text{PCI}} = 6$, s. Abb. 13).

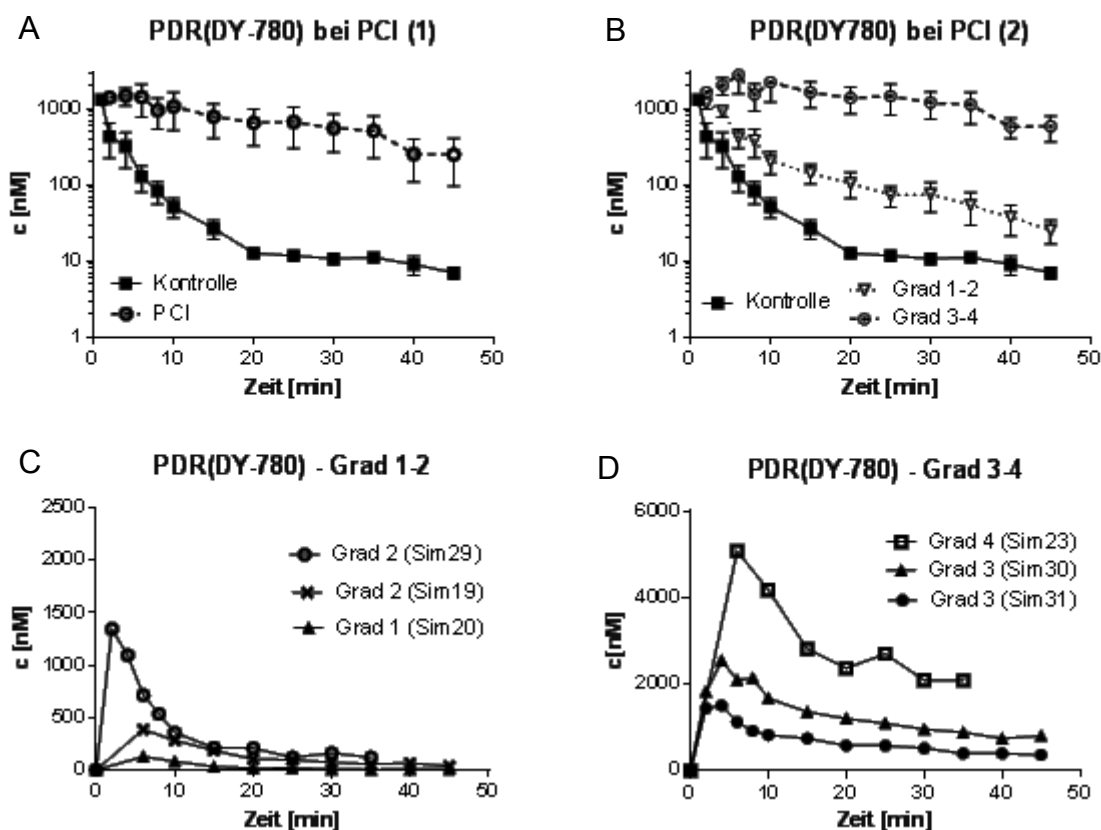


Abbildung 13: PDR (DY780) in PCI- und Kontrollgruppe. Verlauf der Konzentration von DY-780 nach *i.v.* Injektion. Gemessen in Plasmaproben. A) Kontrolle ($n = 5$) vs. PCI ($n = 6$) gesamt. B) Kontrolle ($n = 4$) vs. leichte Schädigung, Grad 1-2 ($n = 3$) vs. schwere Schädigung ($n = 3$). Die Y-Achse wurde aufgrund der Übersichtlichkeit logarithmiert. Darstellung MW + SEM. C) Einzelne PDR-Messungen der Gruppe „leichte Schädigung“. D) Einzelne PDR-Messungen der Gruppe „schwere Schädigung“. Sim 19 bis Sim 31 entsprechen der Verschlüsselung einzelner Versuchstiere.

Die drei Tiere, welche den flachsten Kurvenverlauf und die höchsten Plasmakonzentrationen des Farbstoffs DY-780 aufwiesen, wurden in die

Untergruppe „schwere Schädigung“ (Grad 3 bis 4) eingeteilt. Ihre Leberwerte (γ GT, Bilirubin, ALAT, ASAT) waren signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die übrigen drei Tiere mit steileren PDR-Kurven zeigten weniger beziehungsweise geringere ausgeprägte Verschlechterungen insbesondere der leberspezifischen Indikatoren, sodass sie als „leichte Schädigung“ gruppiert wurden. Die biliäre Ausscheidung des Farbstoffs DY-780 über 30 Minuten und auch die PDR spiegeln sich in dieser Gruppeneinteilung wider. Im Urin war in keiner der Versuchsgruppen DY-780 zu detektieren. Allgemeine Parameter (Gewichtsabnahme und Leukozytenzahl) waren in den beiden Untergruppen heterogen (s. Tab. 8).

Tabelle 8: Einteilung der PCI-Tiere nach Schweregraden. Allgemeine Parameter und Leberwerte sowie DY-780-Wiederfindung in Galle. Sim 2 bis Sim 31 entsprechen der Verschlüsselung einzelner Versuchstiere. Rot = schwere Schädigung, orange = leichte Schädigung.

Tier	Gewicht %	Leukozyten *10 ³ [μL]	ALAT [U/L]	ASAT [U/L]	γ GT [U/L]	Bilirubin [μmol/L]
Sim2	100	9,2	31	62	2	3
Sim4	100	6,4	70	132	1	8
Sim5	100	9,1	78	111	4	3
Sim26	100	11,5	32	63	2	8
Sim20	99,1	5,2	45	82	5	3
Sim19	92,4	1,3	41	116	14	9
Sim29	98,2	1,3	33	167	13	12
Sim30	100,0	8	446	479	24	7
Sim31	99,7	11,6	384	707	5	11
Sim23	96,7	1,2	114	617	21	13
Tier	Parameter allgemein	Parameter Leber	DY-780 in Galle [nmol]	Schweregrad Schädigung	Exponent alpha	korr. R ²
Sim2	0	0	44830	Kontrolle	1,312	0,914
Sim4	0	0	40752	Kontrolle	0,912	0,666
Sim5	0	0	175519	Kontrolle	0,898	0,896
Sim26	0	0	---	Kontrolle	1,722	0,968
Sim20	1	0	42866	Grad 1	1,617	0,915
Sim19	2	2	45672	Grad 2	1,069	0,955
Sim29	1	2	22651	Grad 2	1,101	0,971
Sim30	0	3	19639	Grad 3	0,501	0,975
Sim31	0	3	18396	Grad 3	0,551	0,978
Sim23	2	4	8046	Grad 4	0,536	0,916

Der Allgemeinzustand der Tiere anhand Gewichtsabnahme und Leukozytenzahl sowie die Biomarker der Leberschädigung zeigen, dass verschiedene Schweregrade einer Sepsis ausgelöst wurden. Ein Tier präsentierte dabei in keiner Kategorie eine deutliche Verschlechterung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zwei Tiere wiesen eine Verschlechterung der allgemeinen Parameter sowie γ GT und Bilirubin auf, während die Transaminasen stabil blieben. Zwei weitere Tiere zeigten keine Veränderung des allgemeinen Zustandes, jedoch imponierten erhöhte Transaminasen und entweder erhöhtes γ GT oder Bilirubin. Ein letztes Tier schließlich bot in allen Kategorien auffällige Werte.

Es zeigt sich eine Heterogenität der Wertekonstellationen bei unterschiedlichen Ausprägungsstufen der experimentell induzierten Sepsis. So war die Transaminasenerhöhung nur in ausgeprägten Stadien zu sehen. Bilirubin und γ GT korrelierten nicht in allen Fällen mit anderen Messwerten. Allgemeine Parameter wie Gewichtsabnahme und Leukozytenverminderung gingen nicht eindeutig mit erhöhten Leberwerten einher. So scheinen einige Parameter bereits 15 Stunden nach Sepsisinduktion einen stärkeren Leberschaden anzuzeigen. Bei einem langsameren und milderem Verlauf sind sie jedoch entweder gar nicht erhöht (Transaminasen) oder weisen eine geringe Spezifität auf (γ GT, Bilirubin; *Bauer et al. 2013*). Bei schwerer Schädigung waren ALAT, ASAT und γ GT signifikant erhöht und der Farbstoff in Plasma und Galle bot eine deutlich veränderte Kinetik (s. Abb. 14).

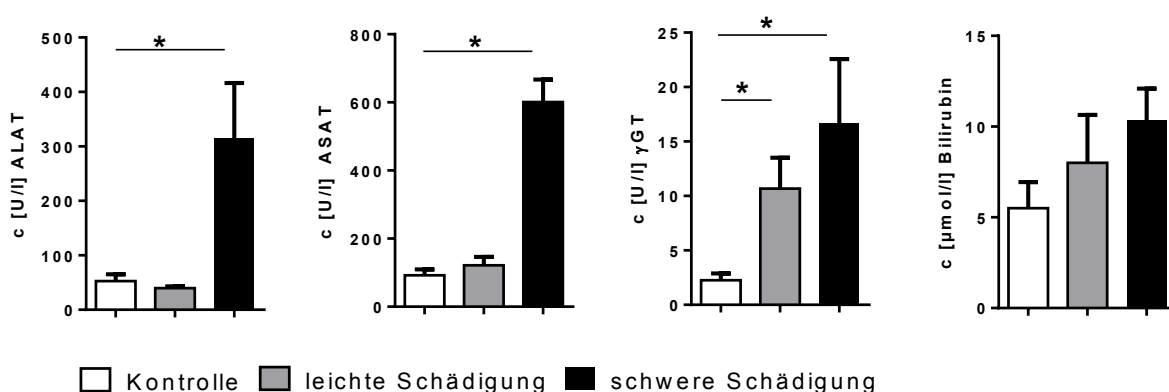


Abbildung 14: Biomarker der hepatischen Schädigung im Sepsismodell. ALAT, ASAT, γ -GT, Bilirubin in Kontrolle vs. leichte Schädigung vs. schwere Schädigung. Darstellung MW + SEM; * $p < 0,05$

Abb. 15 zeigt an zwei Beispieletieren (Kontrolle vs. Gruppe 4) die Verläufe der Plasmakonzentrationen von DY-780 und dessen Detektion in der Galle im Vergleich. Es wird deutlich, dass die hepatische Ausscheidung des Farbstoffs im septischen Tier limitiert ist. Dies ist auch anhand der Bestimmung der insgesamt ausgeschiedenen Farbstoffmenge in der Galle zu sehen. Hier zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und PCI-Gruppe.

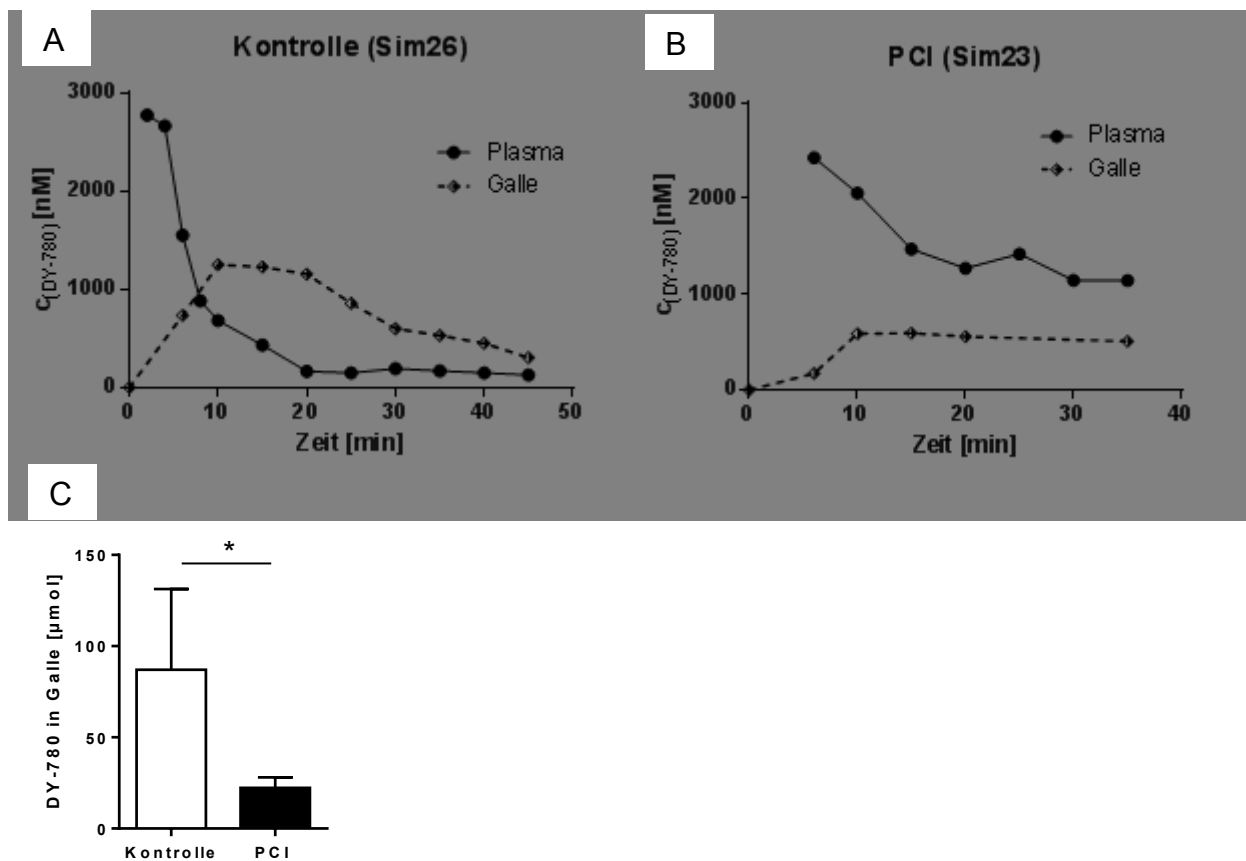


Abbildung 15: repräsentative Darstellung der DY-780-Konzentrationen in Plasma und Galle. A) Kontrolltier (Sim 26), Messung über 45 min. B) PCI-Tier (Sim 23), Messung über 35 min. Im septischen Tier ist die Exkretion limitiert: Die Plasmakonzentration fällt langsamer ab, die maximale Exkretion in die Galle bleibt unterhalb des Kontrolltieres. C) insgesamt biliär ausgeschiedene Stoffmenge (DY-780) nach 30 min. Kontrolle (n = 3) vs. PCI (n = 5), MW + SEM, * p < 0,05.

Die Zusammenschau der Plasma- und Gallekinetik deutet auf eine Farbstoffakkumulation in der Leber hin. Anhand intravitalmikroskopischer Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass DY-780 einerseits etwas langsamer von den Hepatozyten aufgenommen und außerdem deutlich langsamer ausgeschieden wird (Abb. 16 A und C). Dies spiegelt sich in einem erniedrigten Fluoreszenzpeak und einem flacheren Fluoreszenzabfall wider.

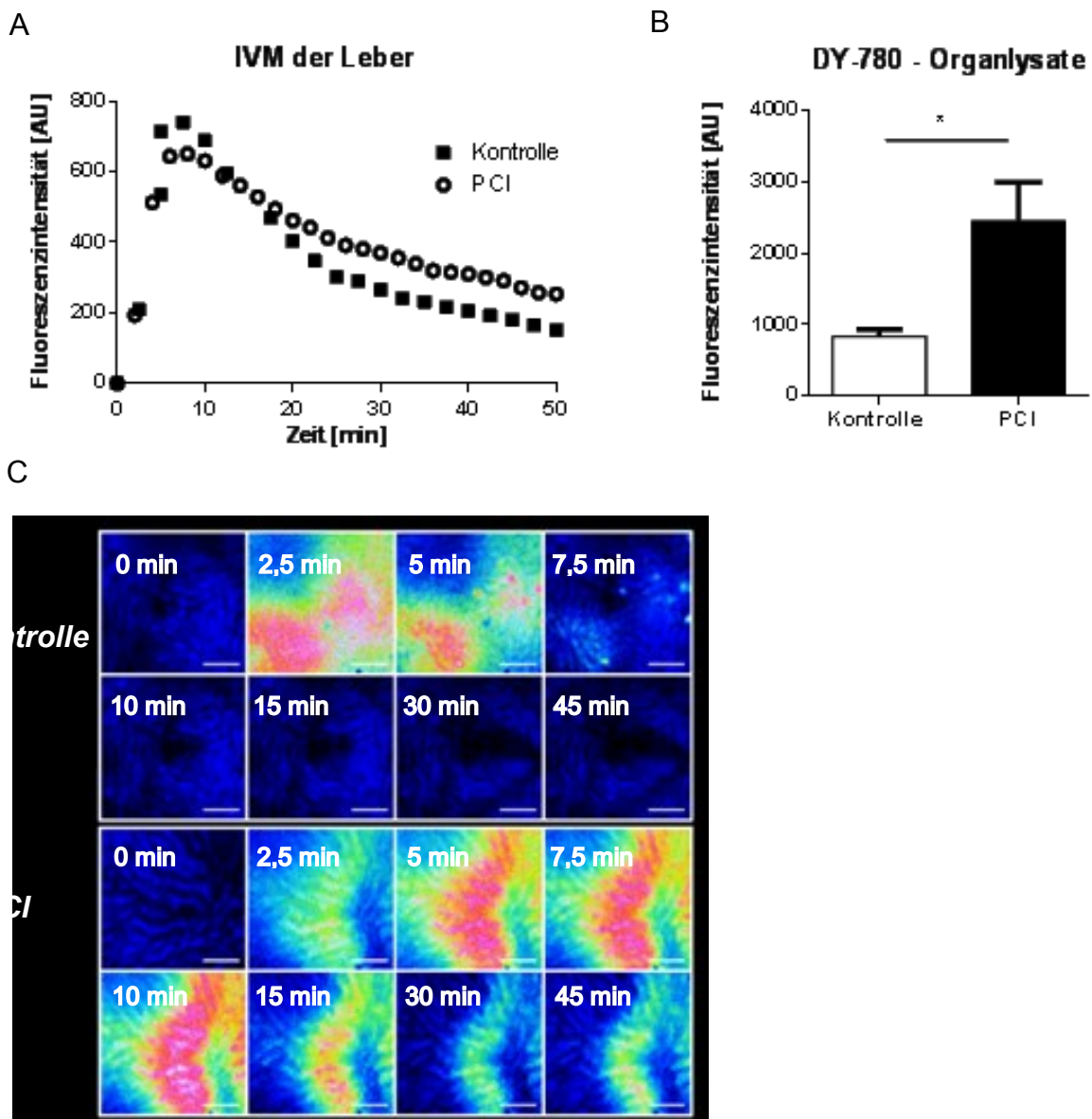


Abbildung 16: DY-780 in der Leber bei PCI-induzierter Sepsis. A) Intravitalmikroskopische Erhebung der Farbstoffaufnahme und -abgabe im Leberparenchym, $n = 3$. Im septischen Tier ist der Anstieg der Fluoreszenzintensität etwas verlangsamt, der Peak erniedrigt und der Abfall flacher. B) DY-780 im Organlysate 60 min *post injectionem*, $n(\text{Kontrolle}) = 12$, $n(\text{PCI}) = 8$. Es kommt zu einer Farbstoffakkumulation im Lebergewebe nach Sepsisinduktion. Darstellung MW + SEM, * $p < 0,05$. C) intrahepatische Fluoreszenzintensität im Kanal DY-780 in Kontrolle und PCI-Tier. Skalierungsbalken 200 μm , Filtereinstellungen s. Tab. 5.

In Lysaten der entnommenen Organe (60 Minuten *post injectionem*) wurden erhöhte DY780-Konzentrationen nachgewiesen, was zusammen mit den IVM-Daten und Gallenexkretionsraten eine intrahepatische Akkumulation anzeigt (Abb. 16 B).

Es wurden des Weiteren Taurin- und Glycin-konjugierte sowie unkonjugierte Gallensäuren im Plasma gemessen. Der Konjugationsindex ist bei schwerer Leberschädigung nach PCI deutlich erniedrigt. Im Gegensatz dazu weisen die Tiere mit milder Leberschädigung einen erhöhten Konjugationsindex auf (s. Anhang VIII).

PARAMETER DER NIERENSCHÄDIGUNG

Die PDR(DY-654) der gesunden und septischen Tiere zeigten graphisch keinen deutlichen Unterschied. Im Kontrolltier kam es insbesondere innerhalb der ersten vier Minuten zu einem deutlichen Abfall der Plasmakonzentration. Eine Tendenz eines leichten Kurvenanstiegs zum Zeitpunkt $t = 4$ min war bei den septischen Tieren zu verzeichnen. Im Urin fand sich eine etwas verringerte Menge DY-654 wieder. Kreatinin und Harnstoff im Serum stiegen nicht signifikant an (s. Abb. 17).

Mittels intravitalmikroskopischer Aufnahmen konnten keine deutlichen intrarenalen Unterschiede der DY-654-Fluoreszenz ermittelt werden. Insgesamt unterschieden sich Kontroll- und PCI-Gruppe hinsichtlich der Messung der Nierenfunktion weniger stark im Vergleich zur Leberfunktionsmessung in denselben Tieren (s.o.).

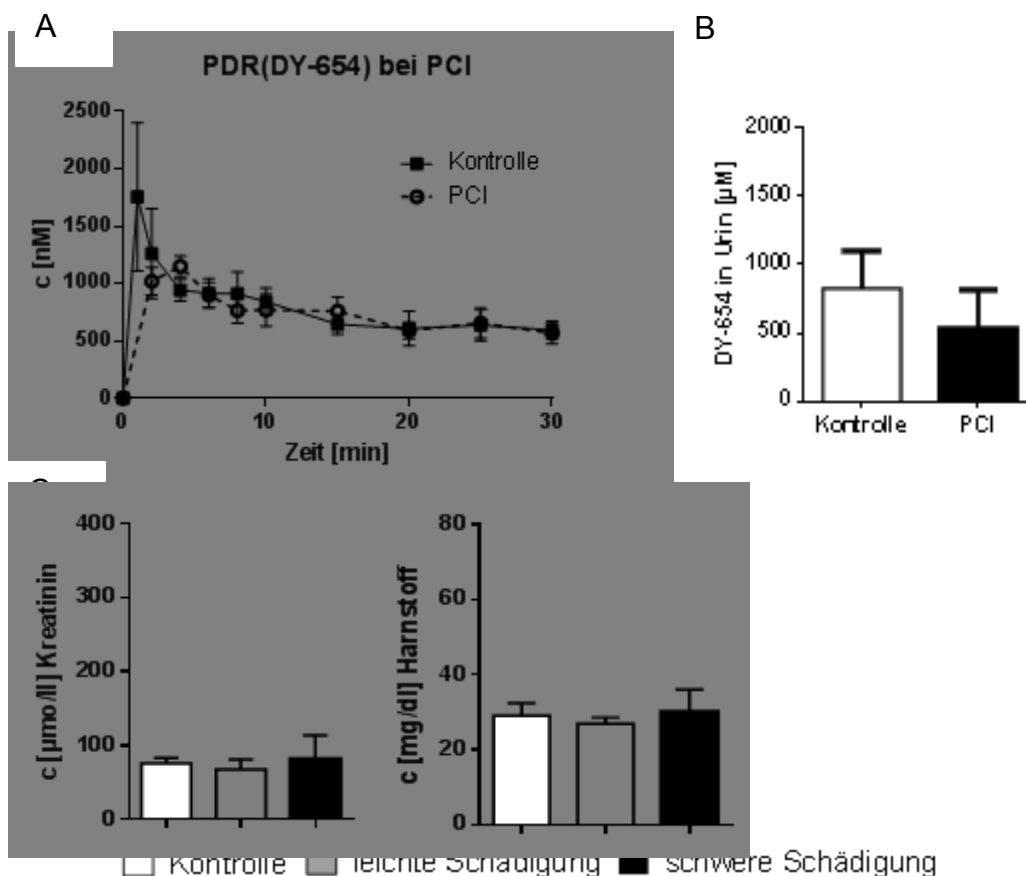


Abbildung 17: Nierenfunktionsmessung bei PCI. A) PDR (DY-654) Kontrolle (n = 5) vs. PCI (n = 6). B) DY-654-Wiederfindung im Urin, Kontrolle vs. PCI, je n = 5. C) Serumkreatinin, Serumharnstoff Kontrolle (n = 4) vs. schwere und leichte Schädigung (je n = 3). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in PDR, Stoffmenge im Urin und Biomarkern im Serum. Darstellung MW + SEM.

4.2.2 Ischämie-Reperfusion der Leber

PARAMETER DER LEBERSCHÄDIGUNG

Die PDR(DY-780)-Kurve zeichnete sich auch in diesem Modell, analog der PCI-Gruppe, durch einen abgeflachten Kurvenverlauf aus. Ebenso kam es zu einer verringerten Ausscheidung des Farbstoffs über die Galle. Alle gemessenen Biomarker der Leberschädigung waren tendenziell erhöht, signifikant imponierte insbesondere ALAT. Dieses Modell rief eine 70-prozentige Leberischämie hervor, die übrigen Leberabschnitte waren also nicht von der Schädigung durch Ischämie-Reperfusion betroffen. Die Verschlechterung der leberspezifischen Parameter war dementsprechend geringer ausgeprägt als bei einer schweren Schädigung im PCI-Modell (s. Abb.18).

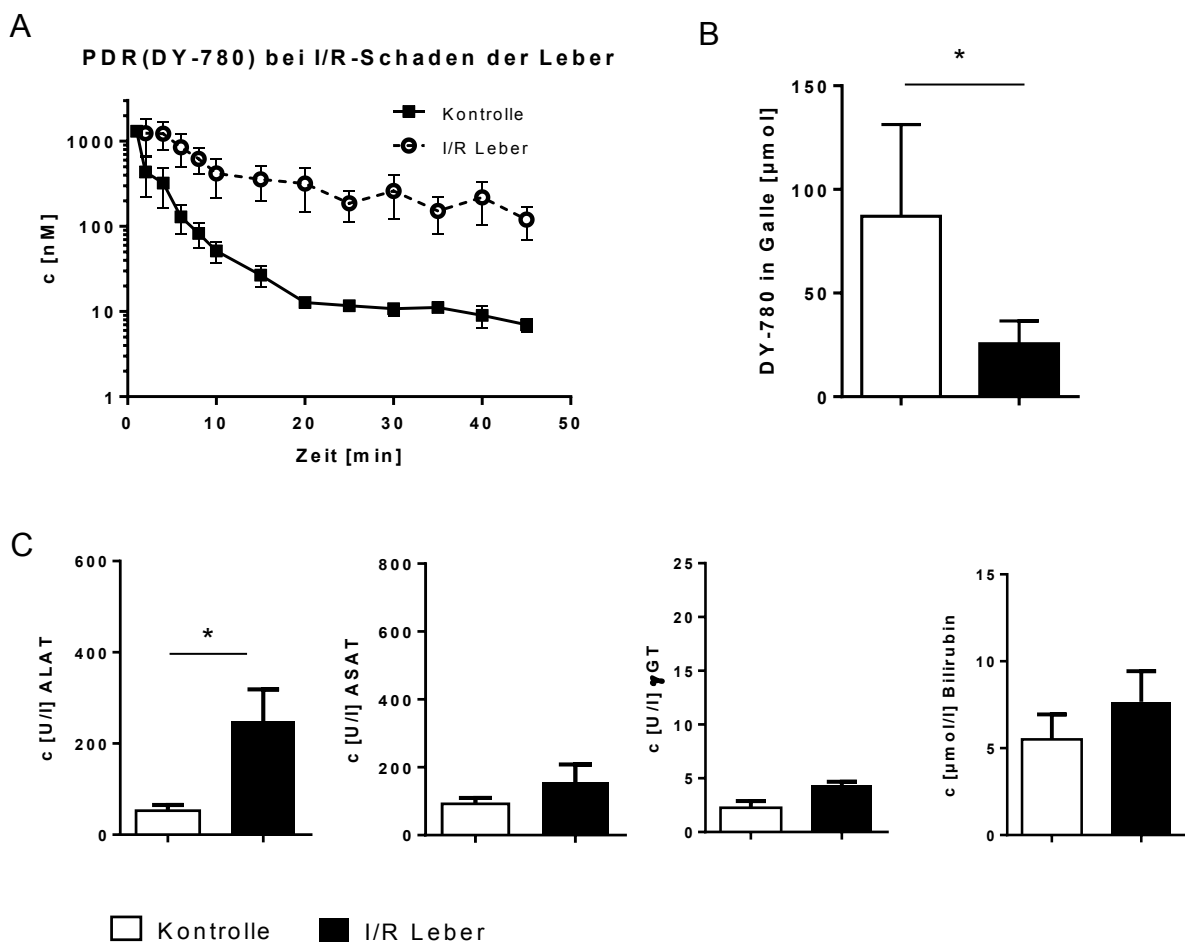


Abbildung 18: Leberfunktionsmessung nach I/R Leber. A) PDR(DY-780) Kontrolle (n = 5) vs. I/R Leber (n = 3). B) DY-780-Wiederfindung in der Galle, Kontrolle vs. I/R Leber, je n = 3, p < 0,05. C) ALAT, ASAT, γGT , Bilirubin Kontrolle (n = 4) vs. I/R Leber (n = 3). Darstellung MW + SEM, * p < 0,05.

Die Fluoreszenzintensität im von der Schädigung betroffenen LLL stieg bei intravitalmikroskopischer Messung kaum und sehr langsam an. Dies liegt in der unmittelbaren Schädigung des Leberparenchyms begründet, wodurch bereits die Aufnahme des Farbstoffs in das geschädigte Areal verhindert wird (Abb. 19 A und C).

Im Organlysate stellte sich dieser Sachverhalt als Ungleichgewicht der gemessenen Fluoreszenzintensität zu Lasten des betroffenen Leberlappens dar. Während bei Kontrolle und PCI-Gruppe das Verhältnis der Farbstoffkonzentrationen im LLL im Vergleich zum RIL im Organlysate gleich groß ist, befindet sich im LLL bei Anwendung des Leber I/R-Modells deutlich weniger DY-780 (Abb. 19 B).

Wie in der Gruppe der milden Leberschädigung nach PCI konnten erhöhte konjugierte Gallensäuren im Plasma festgestellt werden (s. Anhang VIII)

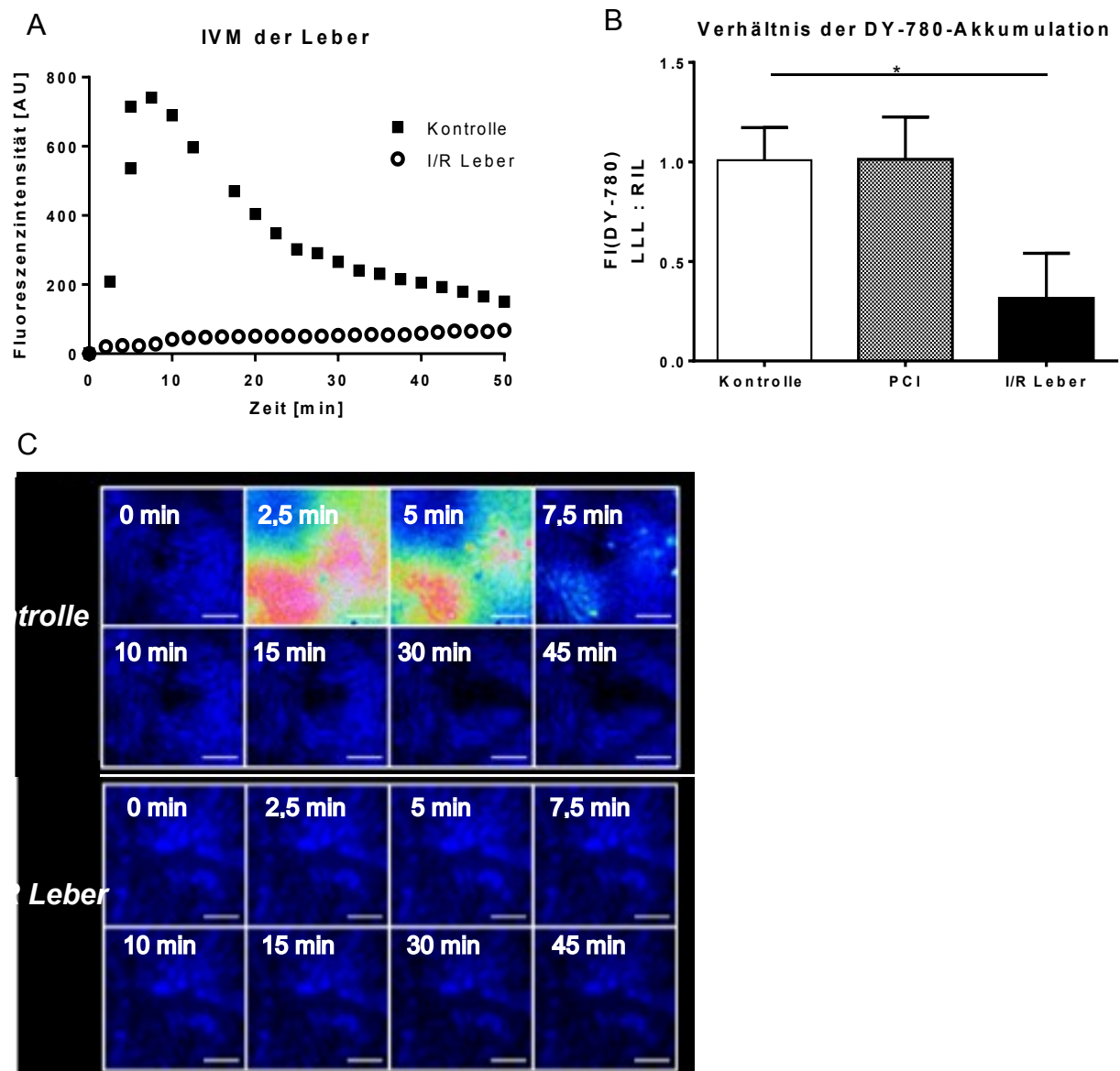


Abbildung 19: DY-780 in der Leber bei I/R Leber. A) Intravitalmikroskopische Erhebung der Farbstoffaufnahme und -abgabe im Leberparenchym, I/R Leber (n = 2) vs. Kontrolle (n = 3). Im LLL findet nach I/R kaum eine Aufnahme des Farbstoffs statt. B) Verhältnis von DY-780 im Organlysat 60 min post injectionem in verschiedenen Leberlappen, n(Kontrolle) = 6, n(PCI) = 4, n(I/R Leber) = 3. * p < 0,05. Es zeigt sich eine Heterogenität der Farbstoffverteilung zwischen den Leberlappen nach I/R Leber. Darstellung MW + SEM, * p < 0,05. C) intrahepatische Fluoreszenzintensität im Kanal DY-780 in Kontrolle und I/R Leber. Skalierungsbalken 200 μ m, Filtereinstellungen s. Tab. 5.

PARAMETER DER NIERENSCHÄDIGUNG

Die PDR(DY-654) sowie die Konzentrationen von Harnstoff und Kreatinin im Plasma waren in diesem Modell unverändert. Jedoch fand sich, ähnlich den septischen Tieren, eine leichter Peak der PDR-Kurve nach $t = 4$ min und zudem eine leicht verminderte Ausscheidung des Farbstoffs über den Urin. Die Biomarker Harnstoff und Kreatinin verblieben stabil (s. Abb. 20).

Signifikante Unterschiede konnten hier insgesamt nicht erreicht werden, waren in diesem Falle jedoch auch nicht zu erwarten.

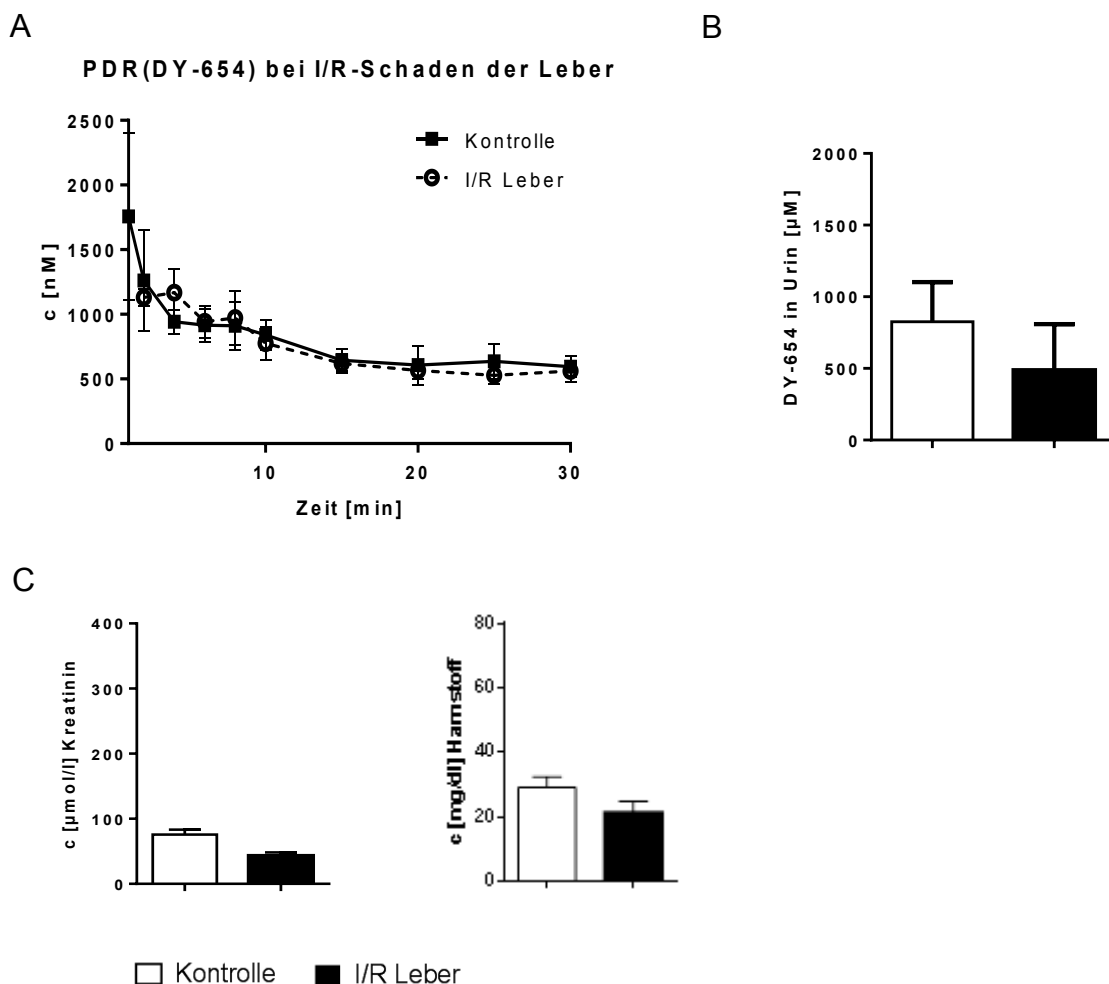


Abbildung 20: Nierenfunktionsmessung bei I/R-Leber. A) Kontrolle ($n = 5$) vs. I/R Leber ($n = 3$). B) DY-654-Wiederfindung im Urin, Kontrolle ($n = 5$) vs. I/R Leber ($n = 3$). C) Serumkreatinin, Serumharnstoff Kontrolle ($n = 4$) vs. I/R-Leber ($n = 3$). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in PDR, Stoffmenge im Urin und Biomarkern im Serum. Darstellung MW + SEM.

4.2.3 Ischämie-Reperfusion der Niere

PARAMETER DER LEBERSCHÄDIGUNG

Der hepatisch eliminierte Farbstoff DY-780 wies eine flache PDR-Kurve sowie eine verminderte Gallenexkretion auf, jedoch war dies nicht signifikant. Biomarker der Leberschädigung waren nicht erhöht. Somit herrscht hier eine Diskrepanz zwischen den Messwerten der Plasma- und Gallekonzentrationen von DY-780 und den laborchemisch ermittelten Parametern (s. Abb. 21).

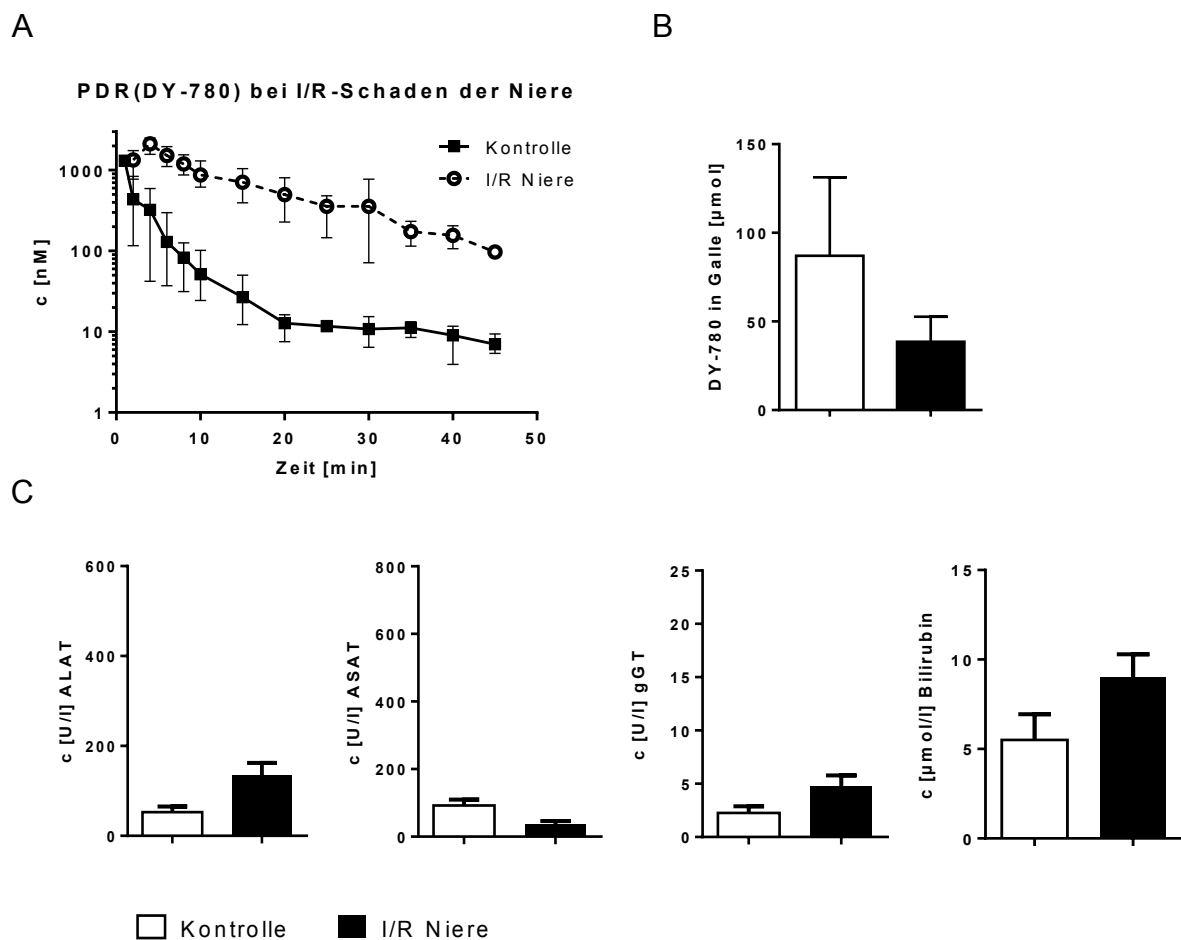


Abbildung 21: Leberfunktionsmessung nach I/R Niere. A) PDR(DY-780) Kontrolle (n = 5) vs. I/R Niere (n = 3). B) DY-780-Wiederfindung in der Galle. n = 3 pro Gruppe. C) ALAT, ASAT, γ GT, Bilirubin Kontrolle vs. I/R Niere. n = 4 pro Gruppe.

PARAMETER DER NIERENSCHÄDIGUNG

Es kam zu einem DY-654-Plasmapeak bei $t = 4$ min, welcher stärker ausgeprägt war als bei der PCI- oder I/R Leber-Gruppe. Insgesamt traten höhere Plasmakonzentrationen des Farbstoffes als bei der Kontrollgruppe auf. Die Ausscheidung über den Urin war im Gegensatz zur PCI- und I/R Leber-Gruppe signifikant reduziert. Die Biomarker der Nierenschädigung blieben jedoch unverändert (s. Abb. 22).

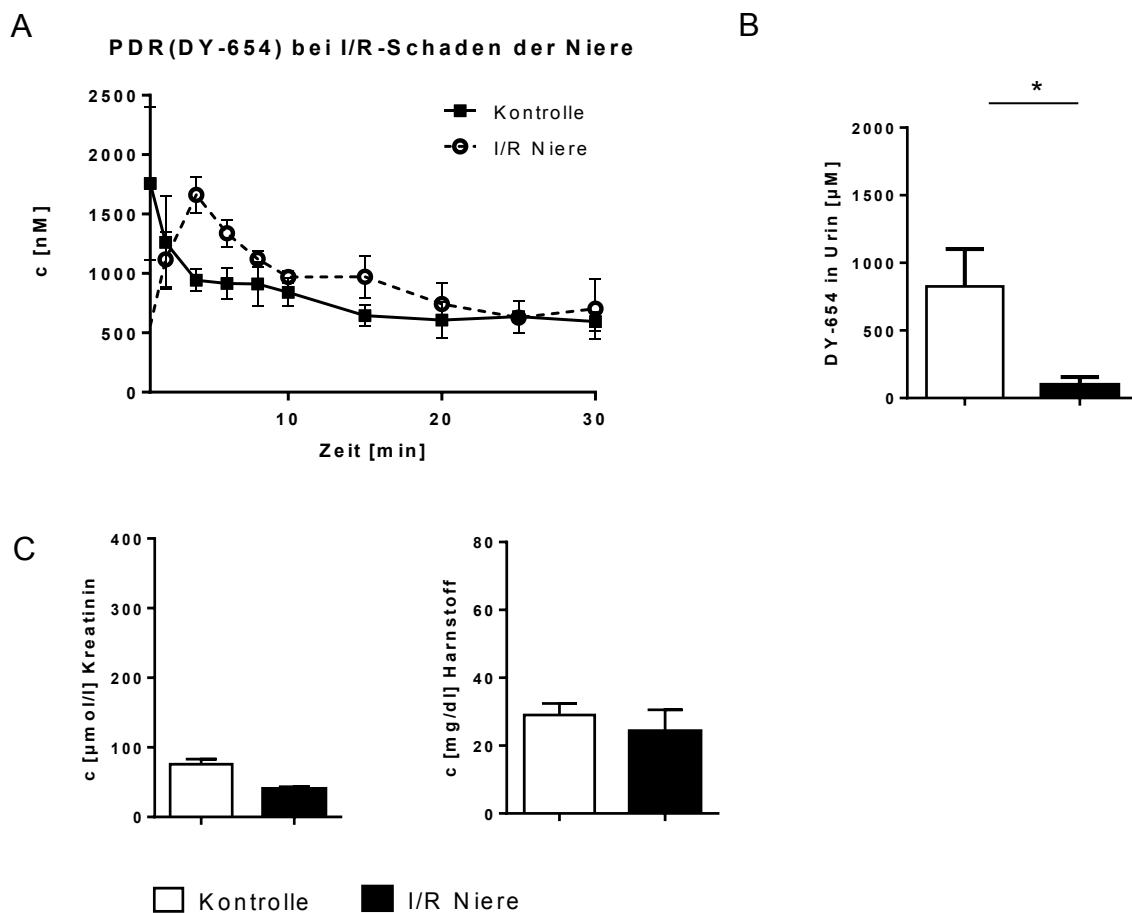
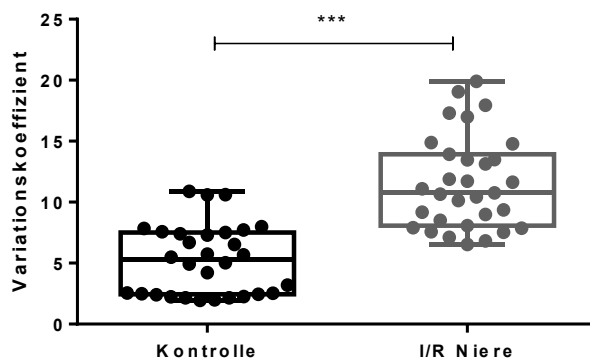


Abbildung 22: Nierenfunktionsmessung bei I/R Niere. A) Kontrolle ($n = 5$) vs. I/R Niere ($n = 3$). B) DY-654-Wiederfindung im Urin, $n = 5$ pro Gruppe. C) Serumkreatinin, Serumharnstoff Kontrolle vs. I/R Niere, $n = 4$ pro Gruppe. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in PDR und Biomarkern im Serum. Die Urinausscheidung von DY-654 war jedoch signifikant reduziert. Darstellung MW + SEM, * $p < 0,05$.

Als Maß der Streubreite der Fluoreszenzintensitäten von DY-654 im Nierenparenchym wurde der Variationskoeffizient aus den intravitalmikroskopischen Messungen berechnet. Dabei stellte sich heraus, dass im I/R-Modell der Nierenschädigung deutlich stärkere Unterschiede der Fluoreszenzintensität zu einem bestimmten Zeitpunkt ($t = 8 \text{ min}$) auftraten als im Kontrolltier (Abb. 23 A).

An den Aufnahmen ist des Weiteren zu erkennen, dass nach I/R Niere der Farbstoff länger im Nierentubulussystem zu verweilen scheint und sich Bereiche mit erhöhter Fluoreszenzintensität ausbilden (Abb. 23 B).

A IVM Niere, Verteilung von DY-654; 8 min post injectionem



B

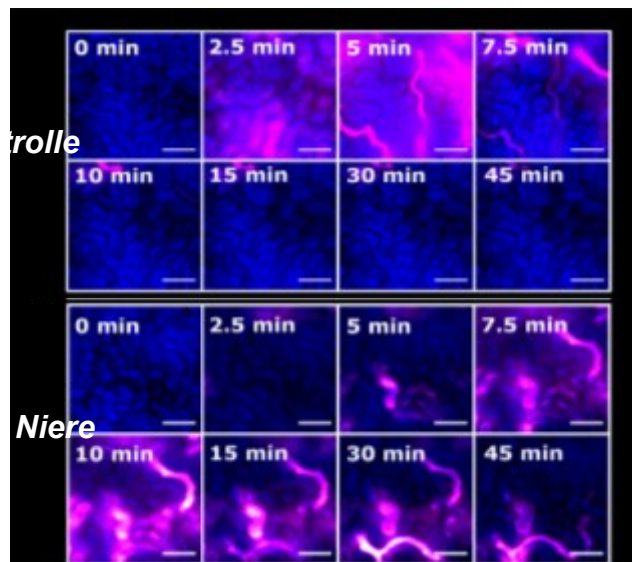


Abbildung 23 Intravitalmikroskopie der FI(DY-654) im Nierenparenchym. A) Variationskoeffizient; $n = 5$ pro Gruppe, je 6 Bildausschnitte, $t = 8 \text{ min}$ post injectionem. Darstellung MW, Minimum, Maximum, *** $p < 0,001$. B) Intravitalmikroskopische Aufnahmen der FI. Nach $t = 45 \text{ min}$ verbleibt im Modell I/R Niere ein intensives und diffus erscheinendes intrarenales Signal im Kanal DY-654. Skalierungsbalken $200 \mu\text{m}$, Filtereinstellungen s. Tab. 5

4.2.4 Nierenschädigung durch Glycerolinjektion

PARAMETER DER LEBERSCHÄDIGUNG

Die PDR(DY780) unterschied sich zur Kontrollgruppe, war jedoch nicht so stark reduziert wie in den anderen Schädigungsmodellen. Gleichwohl war auch hier die Ausscheidung über die Galle reduziert. Die Leberfunktionsparameter zeigten keine Abweichung von der Kontrollgruppe (s. Abb. 24).

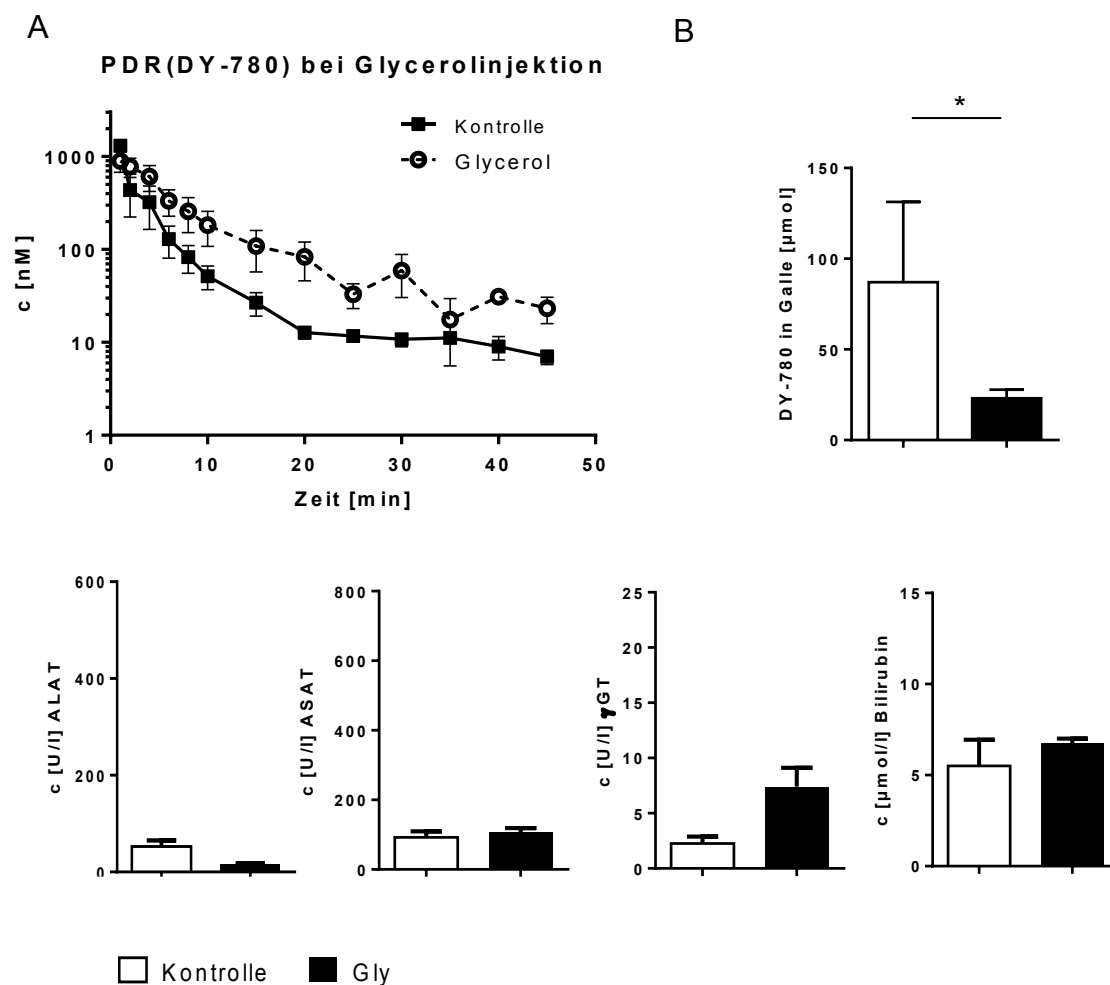


Abbildung 24: Leberfunktionsmessung nach Glycerolinjektion. A) PDR(DY-780) Kontrolle (n = 5) vs. Glycerol (n = 4) über 45 min. B) DY-780-Wiederfindung in der Galle. Kontrolle (n = 3) vs. Glycerol (n = 4). C) ALAT, ASAT, γ GT, Bilirubin Kontrolle vs. Glycerol. n = 4 pro Gruppe. Darstellung MW + SEM, * p < 0,05.

PARAMETER DER NIERENSCHÄDIGUNG

Die PDR(DY-654) zeigte in diesem Modell die langsamste Abnahme sowie die höchsten Konzentrationswerte. Da die Tiere anurisch waren, konnte kein Farbstoff im Urin nachgewiesen werden. Dies spiegelt bei Störung des Fließgleichgewichts eine unzureichende renale Ausscheidung des Farbstoffs wider. Gleichermaßen kam es nur in diesem Modell zu einem signifikanten Anstieg der Nierenretentionswerte Kreatinin und Harnstoff (s. Abb. 25).

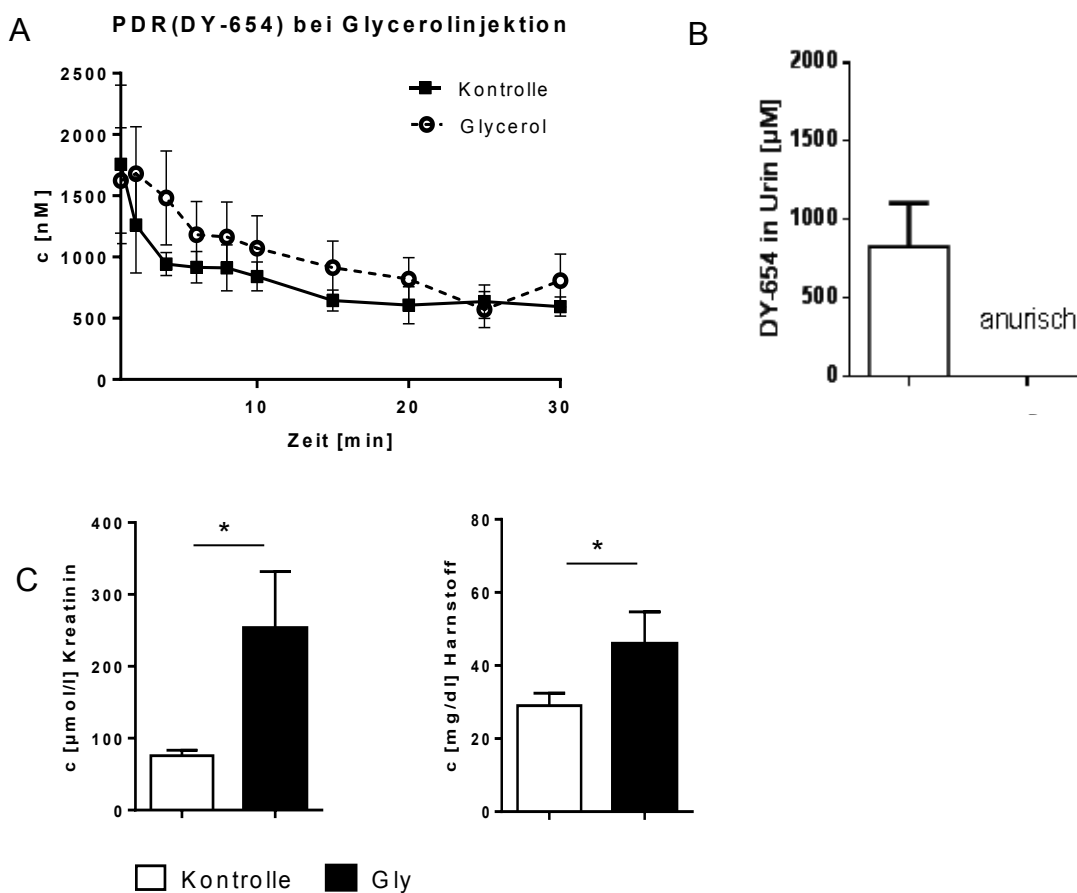


Abbildung 25: Nierenfunktionsmessung bei Glycerolinjektion. A) Kontrolle (n = 5) vs. Glycerol (n = 4). B) DY-654-Wiederfindung im Urin Kontrolle (n = 5) vs. Glycerol (n = 3). C) Serumkreatinin, Serumharnstoff Kontrolle vs. Glycerol, n = 4 pro Gruppe. Es zeigen sich signifikante Unterschiede in Biomarkern im Serum, Urinausscheidung von DY-654. Darstellung MW + SEM, * p < 0,05.

Intravitalmikroskopisch trat ein verändertes Fluoreszenzmuster in der Niere auf. Die höchste Fluoreszenzintensität war hier anscheinend nicht im Tubuluslumen lokalisiert, sondern fand sich ringförmig darum verteilt (s. Abb. 26). Um dies genauer zu untersuchen, wurde in diesem Modell zusätzlich die intravitalmikroskopische Fluoreszenzmessung mittels eines *laser scanning* Mikroskopes an Mäusen ergänzt, s. Diskussion.

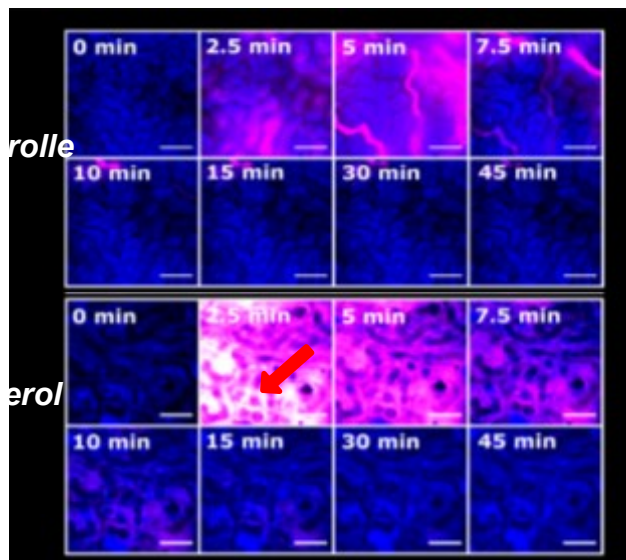


Abbildung 26: DY-654 in der Niere nach Glycerolinjektion. Es zeigt sich ein verändertes Verteilungsmuster der Fluoreszenzintensität im Kanal DY-654 in der Glycerolgruppe. Der Pfeil zeigt auf die ringförmig imponierende Akkumulation. Skalierungsbalken 200 μm , Filtereinstellungen s. Tab. 5

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Plasmaverschwinderaten der Farbstoffe DY-780 und DY-654 zeigen unterschiedliche Verläufe in verschiedenen experimentellen Modellen zur Schädigung von Leber und Niere. Im Rahmen einer experimentellen Sepsis konnte dabei vor allem die Leberfunktion mittels der PDR(DY-780) sensitiv erfasst werden, indem sich der Schweregrad der Schädigung in den Plasmaverschwinderaten differenziert wiederfindet. Eine beeinträchtigte Nierenfunktion konnte insbesondere durch intramuskuläre Glycerolinjektion hervorgerufen werden und äußerte sich in einer veränderten Kinetik von DY-654. Die Wiederfindungsraten der Farbstoffe in Galle und Urin zeigten sich ebenfalls reduziert. So war DY-780 insbesondere bei schwerer Schädigung im PCI-Modell und bei I/R Leber deutlich weniger in der Galle ausgeschieden worden. In allen Modellen kam es zu einer verminderten DY-654-Menge im Urin. Gleichzeitig bestand in keinem Modell eine renale Ausscheidung von DY-780 oder eine hepatische Ausscheidung von DY-654, was die Organspezifität dieser Farbstoffe belegt.

Biomarker der Leber- und Nierenschädigung stiegen in unterschiedlichem Maße bei den Versuchsgruppen an. Als signifikante Erhöhungen der Biomarker der hepatischen Schädigung konnte nur ein Transaminasenanstieg verzeichnet werden, welcher in Form einer ASAT- und ALAT-Erhöhung bei schwerer Schädigung durch PCI und einer alleinigen ALAT-Erhöhung bei I/R Leber stattfand. Bilirubin und γ GT veränderten sich in allen Modellen nicht signifikant. In Bezug auf die Nierenschädigung zeigte sich nur nach Glycerolinjektion ein signifikanter Anstieg der Werte Harnstoff und Kreatinin.

Intravitalmikroskopisch konnte eine Akkumulation des leberspezifischen Farbstoffs in der PCI-Gruppe gezeigt werden. Nach I/R Leber kam es zu keiner Aufnahme des Farbstoffs in den betroffenen Leberlappen. DY-654 zeigte innerhalb der Niere eine veränderte Verteilung in den Modellen I/R Niere und Glycerolinjektion, was auf Farbstoffakkumulationen hinweist.

5 Diskussion

In diesem Kapitel wird die thematische Unterteilung anhand von Hypothesen vorgenommen, deren Abhandlung teilweise aufeinander aufbaut. Zuerst wird auf generelle Erkenntnisse zum Verhalten der Farbstoffe *in vivo* eingegangen. Im Anschluss erfolgt die Einbettung dieser Themen in den Kontext der jeweiligen Modelle, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt.

5.1 Farbstoffe

Hypothese: Die ausgewählten Farbstoffe sind grundsätzlich zur simultanen Leber- und Nierenfunktionsbestimmung geeignet

In dieser Arbeit sollte ein Farbstoffpaar charakterisiert werden, anhand dessen Plasmaverschwinderaten die hepatische und renale Eliminationsleistung *in vivo* bei gesunden und geschädigten Organen gleichzeitig beurteilt werden kann.

Eine Voraussetzung dafür ist die organspezifische Elimination des jeweiligen Farbstoffs. Dies bedeutet, dass einer der Farbstoffe des jeweiligen Paares vornehmlich bis ausschließlich renal und der andere Kombinationspartner hepatisch eliminiert werden darf. In allen Versuchsgruppen fand sich im Urin DY-654 wieder, während dort kein DY-780 zu detektieren war. Genau anders herum stellte es sich in der Gallenflüssigkeit dar - hier war DY-780 vorzufinden, jedoch kein DY-654. Intravitalmikroskopische Aufnahmen unterstützen diese Beobachtung. Im renalen Tubuluslumen wurde bei simultaner *i.v.*-Applikation ein Signal im Kanal DY-654 und kein Signal im Kanal DY-780 detektiert, während im Leberparenchym keine DY-654-Fluoreszenz zu finden war, dafür aber DY-780 im entsprechenden Kanal verfolgt werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigen die vorhergesagte organspezifische Eliminierung der jeweiligen Farbstoffe.

Da Farbstoffpaare gebildet wurden, deren Emissionsspektren keine Überschneidungen aufweisen, kam es bei den Fluoreszenzmessungen nicht zu überlagerten Ergebnissen. Die Probenvermessung und intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden nacheinander mit ebenfalls sich nicht überkreuzenden Anregungsspektren durchgeführt, was zusätzlich eine eventuelle Überlagerung der

Messwerte verhindert. Die unterschiedlichen PDR-Kurvenverläufe von renal und hepatisch eliminiertem Farbstoff nach gleichzeitiger Injektion bestätigen zudem die voneinander unabhängigen Messwerte.

Hypothese: Der Verlauf der Plasmakonzentrationen der Farbstoffe wird durch vergleichbare interkompartimentelle Prozesse beeinflusst

Zwischen renal und hepatisch eliminierten Farbstoffen zeigten sich unterschiedliche Kurvenverläufe der PDR. Insgesamt boten die PDR der renal eliminierten Farbstoffe heterogenere Verläufe. Bei der Betrachtung ihrer Kinetiken müssen weitere Vorgänge neben der organspezifischen Eliminierung berücksichtigt werden.

Die geringere Plasmaproteinbindung der renal eliminierten Farbstoffe ermöglicht Diffusionsvorgänge, die bei den an Albumin gebundenen, hepatisch eliminierten Farbstoffen nicht oder in äußerst geringem Ausmaß stattfinden (*Berezin et al. 2011*). Durch die in höherem Maße stattfindende Einbeziehung anderer, möglicherweise tieferer Kompartimente liegt bei den renal eliminierten Farbstoffen daher eine andere Kinetik der PDR vor als bei den hepatisch eliminierten Farbstoffen.

Dies wurde bereits bei Studien zu IRDye[®] 800CW deutlich. Ebenso wie die Farbstoffe DY-778 und DY-654 wird dieses fluoreszierende Molekül renal eliminiert, was gleichsam der erhöhten Hydrophilie aufgrund Substitution mit mehreren Sulfonsäuregruppen geschuldet ist. Studien konnten hier darlegen, dass zwar die intrarenale Kinetik im Sinne einer freien Filtration diesen Farbstoff potenziell zur non-invasiven Messung geeignet erscheinen lässt (*Scarfe et al. 2015*), jedoch wurde bei transkutanen Messungen über 90 Minuten kein Fluoreszenzabfall gemessen. Bei intravitalmikroskopischen Untersuchungen von IRDye[®] 800CW und anderen renal eliminierten Fluoreszenzfarbstoffen konnte gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit des hydrophilen Charakters des Stoffes zu einer erheblichen Akkumulation in der Haut von Versuchstieren kommt (*Yu et al. 2015*). So ist der zu den hepatisch eliminierten, an Albumin gebundenen Farbstoffen verschiedene Verlauf der Plasmakonzentrationen wahrscheinlich auch dieser ausgeprägten interkompartimentellen Verteilung zuzurechnen. Zudem erschwert dieser Umstand die transkutane Erhebung der Plasmaverschwinderate des Farbstoffs.

Im Falle einer Inflammation, welche in den Schädigungsmodellen hervorgerufen wurde, herrschen interkompartimentelle Flüssigkeitsverschiebungen vor. Dies kann auch zu einer Abweichung der intravasalen Kinetik führen, wodurch die erwarteten Kurvenverläufe insbesondere der hydrophilen, nicht an Albumin gebundenen Farbstoffe durch das vergrößerte Extravasalvolumen beeinflusst sein können. Dass in den Schädigungsmodellen der Verlauf der Plasmakonzentration von DY-654 nicht in ähnlicher Ausprägung wie bei DY-780 gemessen wird, könnte unter anderem diesem Einfluss geschuldet sein.

Hypothese: Die mathematische Beschreibung der PDR orientiert sich am Zwei-Kompartiment-Modell

Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden die originalen Messwerte in den Abbildungen graphisch dargestellt. Um mathematische Beschreibungen zu verbessern, ist zudem eine Form der Normierung der Messwerte angewendet worden. Hierdurch blieben die Kurvenverläufe der einzelnen Messreihen unverändert, konnten jedoch in vergleichbare Messbereiche gebracht werden. Dazu wurde innerhalb einer Messung die Teilsumme aus den in allen Messungen vorliegenden Zeitpunkten gebildet und anschließend die Messwerte durch diese Teilsumme dividiert (s. Anhang IV). Daraufhin wurden Formeln gesucht, welche die Kurvenverläufe mathematisch mit größtmöglicher Annäherung abbilden.

Pharmakologischen Betrachtungen zu Bestimmungen von Plasmaverschwindraten liegen häufig Exponentialfunktionen mit Basis der Eulerschen Zahl e zugrunde (*Riegelman et al. 1968*). Eine einfache, monoexponentielle e -Funktion beschreibt hier die kontinuierliche Ausscheidung einer Substanz im Ein-Kompartiment-Modell, wobei die Konzentrationsänderung nur abhängig von der Konzentration selbst ist. Es resultiert ein prozentualer Abfall der Plasmakonzentration über die Zeit. Dieses Modell beschreibt dabei einen einzelnen zeitabhängigen Vorgang. In den Versuchen dieser Arbeit kommt es jedoch neben der Ausscheidung über Niere bzw. Leber auch zu Bindungs- und Verteilungsvorgängen im Organismus. Die Farbstoffe können, je nach Plasmaproteinbindung, hydrophilem Charakter und Gefäßpermeabilität, in unterschiedlichem Maße zwischen dem Blutgefäßsystem und dem Gewebe

ausgetauscht werden, wobei von Diffusionsprozessen ausgegangen werden kann. Daher muss die Formel erweitert werden, um beide Vorgänge gleichberechtigt und überlagert zu berücksichtigen, welche mit unterschiedlichen Zeitkonstanten stattfinden. Somit ist mindestens ein Zwei-Kompartiment-Modell zu verwenden (*Hull 1979, Ahmed 2015*). Die entsprechende mathematische Formel würde einem biexponentiellen Zusammenhang entsprechen (*Traynor et al. 2006*):

$$c(t) = c_1 * e^{\frac{-t}{\tau_1}} + c_2 * e^{\frac{-t}{\tau_2}}$$

Der zunächst steiler abfallenden Kurve liegen dabei rasche Diffusionsvorgänge zwischen den Kompartimenten bei großen Konzentrationsunterschieden zu Grunde. Kommt es im Verlauf zum Ausgleich und einem Diffusionsgleichgewicht, verläuft die Kurve flacher. Es wird davon ausgegangen, dass die Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit proportional zu der Konzentration selbst ist.

Die monoexponentielle Funktion bildet die Vorgänge nicht zufriedenstellend ab. Dies ist auch anhand des korrigierten R-Quadrates und im Vergleich mit biexponentiellen Verläufen am reduzierten Chi-Quadrat zu sehen (s. Anhang V).

In *fitting*-Analysen wurde überprüft, nach welcher Kinetik die PDR verlaufen. Es hat sich herausgestellt, dass die Messwerte der PDR nicht nur durch den biexponentiellen fit, sondern auch allesamt durch Potenzfunktionen gut abgebildet werden können:

$$c(t) = c * t^{-\alpha}$$

Ogleich kein entsprechendes pathophysiologisches Modell funktionell dieser Funktionsklasse zugeordnet wird, so sind diese Potenzfunktionen doch deskriptiv gut anzuwenden und verdeutlichen die unterschiedlichen Kinetiken anschaulich. Generell muss beachtet werden, dass die Funktionen auf einer idealisierten Annahme des Zwei-Kompartiment-Modells beruhen, denn im lebenden Organismus ist mit Flüssigkeitsverschiebungen, Akkumulationen, induzierten Mikrozirkulationsstörungen und Blutdruckschwankungen sowie bisher möglicherweise nicht vorbeschriebenen Transportmechanismen zu rechnen. Die genauen physiologischen Prozesse bleiben dabei nur zu vermuten.

Durch den Exponenten, der den Kurvenanstieg beschreibt, lässt sich eine Zahl herausfinden, die es ermöglicht, die Kurvenverläufe zu vergleichen. Über die erste Ableitung der monoexponentiellen Funktion lässt sich folgender Zusammenhang ermitteln:

$$\frac{\Delta c}{c} \approx -\frac{1}{\tau} * \Delta t$$

Die relative Abnahme der Konzentration ist bei dieser Funktionsklasse konstant zu jedem Zeitpunkt entsprechend des Faktors $-\frac{1}{\tau}$.

Bei einer Potenzfunktion erhält man für die relative Konzentrationsänderung folgenden Ausdruck:

$$\frac{\Delta c}{c} \approx -\frac{\alpha}{t} * \Delta t$$

Hier ergibt sich, dass die relative Konzentrationsabnahme pro Zeiteinheit entsprechend des Faktors $-\frac{\alpha}{t}$ mit zunehmender Zeit t abnimmt, da die Zeit im Nenner steht. Jedoch gilt an jedem Zeitpunkt: je größer der Faktor α ist, desto schneller erfolgt die relative Konzentrationsabnahme an diesem Zeitpunkt. Daraus folgt, dass eine Funktion mit größerem α an einem beliebigen Zeitpunkt eine schnellere relative Konzentrationsänderung aufweist, als eine Funktion mit kleinerem α zum gleichen Zeitpunkt.

Für DY-780 sind die α der PDR aus den verschiedenen Modellen Tab. 9 zu entnehmen. Hier ist zu sehen, dass der Exponent in Kontrolle (1,656), I/R Niere (1,034) und Glycerolgruppe (1,266) sowie PCI mild (1,125) > 1 ist. Hier ist es dementsprechend nicht zu einer verlangsamten PDR(DY-780) und damit zu keiner Leberschädigung gekommen. In diesem Sinne ergibt sich hier ein Hinweis auf eine hohe Spezifität des Verfahrens, denn durch die pathophysiologischen Vorgänge dieser Modelle sollte auch keine Leberdysfunktion auftreten. Die anderen Gruppen weisen einen kleineren Wert auf. Es ist zu erkennen, dass insbesondere die Gruppe „schwere Sepsis“ (0,620) einen flacheren Abfall der Funktionswerte besitzt. Danach folgt I/R Leber (0,942). Hier konnte der Leberschaden also sensitiv detektiert

werden. Milde Leberschädigung nach PCI (1,125) unterscheidet sich wenig von der Kontrolle.

Tabelle 9: Exponent α zum Vergleich der PDR(DY-780).

Gruppe	α
Kontrolle	1,656
PCI schwer	0,524
PCI mild	1,125
PCI gesamt	0,620
I/R Leber	0,942
I/R Niere	1,034
Glycerol	1,266

Auch der Vergleich der PDR(DY-654) ist durch die Betrachtung von α der Potenzfunktionen aus den normierten Daten möglich (s. Tab. 10). In dieser Darstellung zeigt sich, dass hier ebenso wie bei DY-780 in der Kontrollgruppe der Betrag des Exponenten am größten ist (0,340). Im I/R Leber-Modell gibt es nur eine geringfügige Minderung (0,324). I/R Niere (0,299), PCI (0,278) und Glycerol (0,258) weisen in dieser Reihenfolge einen immer flacheren Abfall auf. Diese Darstellung zeigt deutlicher als die nichtnormierte Auswertung der Daten aus dem Ergebnisteil dieser Arbeit eine Reduzierung der PDR(DY-654) auch im PCI- und I/R Niere-Modell.

Tabelle 10: Exponent α zum Vergleich der PDR(DY-654).

Gruppe	α
Kontrolle	0,340
PCI gesamt	0,278
I/R Niere	0,299
Glycerol	0,258
I/R Leber	0,324

Durch Potenzfunktionen gelingt die Beschreibung der Kurvenverläufe aller verschiedenen Gruppen und eine Vergleichbarkeit der PDR der Versuchsgruppen wird ermöglicht. Graphen der gefitteten Funktionen sind im Anhang V zu finden.

5.2 Schädigungsmodelle

Hypothese: Im Modell der polymikrobiellen Sepsis wird die Leberschädigung frühzeitig durch Polymethinfarbstoffe erkannt

Durch die Induktion einer Sepsis wird eine gleichzeitige Beeinträchtigung der Leber- und Nierenfunktion hervorgerufen. Das zu diesem Zweck angewendete PCI-Modell zeichnet sich dadurch aus, einerseits der klinischen Ausprägung in Form einer polymikrobiellen Sepsis zu entsprechen und andererseits durch definierte Mengen der applizierten *faeces* reproduzierbare Verläufe hervorrufen zu können (*Gonnert et al. 2011*).

Bezüglich der Leberschädigung zeigte sich bei Anwendung des PCI-Modells in Versuchen mit Ratten, dass 15 Stunden nach Sepsisinduktion die Leberwerte signifikant ansteigen (*Recknagel et al. 2012*). Im klinisch zur Einschätzung des Leberstatus angewendeten SOFA-score wird Bilirubin gegenüber den Transaminasen als spezifischerer und prognostisch aussagekräftigerer Marker der Vorzug gegeben (*Marshall et al. 1995*). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Bestimmung konjugierter und unkonjugierter Gallensäuren eine höhere Korrelation mit der 28-Tages-Mortalität septischer PatientInnen aufweist als Bilirubin (*Recknagel et al. 2012*). Die bei den Versuchstieren dieser Arbeit bestimmten Gallensäuren im Plasma wiesen einen deutlich erniedrigten Konjugationsindex in der Gruppe der schweren Leberschädigung bei Sepsis auf, was eine Beeinträchtigung der hepatischen Biotransformation anzeigt. Bei milder Leberschädigung hingegen war der Konjugationsindex erhöht. Dies entspricht einer vornehmlich reduzierten Ausscheidungskapazität bei erhaltener oder leicht eingeschränkter Biotransformation. Es zeigt sich auch in diesem Falle, dass durch die Bestimmung der Gallensäuren im Plasma eine hepatische Schädigung besser und differenzierter Widerspiegelt als der Bilirubin-Serumspiegel (vgl. Kapitel 4.2.1)

Als Zeichen der Leberschädigung war in dieser Arbeit auch ein Anstieg der entsprechenden Biomarker zu verzeichnen. Insbesondere waren jedoch die Transaminasen ALAT und ASAT, welchen den akuten hepatozellulären Zelluntergang anzeigen, signifikant erhöht. γ GT und Bilirubin hingegen zeigten statistisch lediglich eine Erhöhungstendenz. Diese Ergebnisse können damit begründet sein, dass die Ausprägung der Leberschädigung nicht ausreichte, um eine relevante Cholestase zu erzeugen, und dass der γ GT- und Bilirubinanstieg, wie in anderen Arbeiten auch in PatientInnen gesehen wurde, zu einem späteren Zeitpunkt einsetzt (*Strnad et al. 2017, Henrion 2011, Bernal 2016*). Dies wird dadurch erklärt, dass es zunächst zum hypoxischen Zellschaden kommt, auch als ischämische Hepatitis bezeichnet. Erst im Anschluss tritt die Cholestase ein (*Henrion 2011*). Korrelierend dazu waren in den Versuchen lediglich bei einer Schädigung „Grad 4“ alle Parameter einschließlich der Cholestaseparameter deutlich erhöht.

Es stellte sich in den PCI-Versuchen insgesamt ein heterogenes Bild der Krankheitsschwere der Tiere dar, welches insgesamt auch dem Phänotyp septischer PatientInnen entspricht. In den experimentellen Befunden spiegelte sich dies in dem klinischen Erscheinungsbild und auch in den gemessenen Laborwerten sowie den PDR(DY-780)-Kurven wider. Diese auf molekularer Ebene begrenzte Reproduzierbarkeit der Leberschädigung bei diesen Versuchen im PCI-Modell kann durch die mikrobielle Zusammensetzung der verwendeten *faeces*-Charge bedingt sein; individuell unterschiedlich stark ausgeprägte Immunkompetenzen der Tiere sind, obgleich zu vermeiden gesucht, ebenso denkbar – abhängig von sozialen Faktoren (Anzahl der Tiere im Käfig, Stress) oder dem hormonellen und immunologischen Status (z.B. Tageszeitenvariabilität; *Scheiermann et al. 2013, Curtis et al. 2014*).

Gleichwohl ermöglicht es diese Heterogenität zu zeigen, dass eine klinische und laborchemisch bestimmte Krankheitsschwere mit einer entsprechend abgeflachten PDR(DY-780) einhergeht. Bei der Einteilung in leichte und schwere Schädigung fiel interessanterweise auf, dass die Tiere der Gruppe „leichte Schädigung“ zwar keine erhöhten Transaminasen aufwiesen, jedoch γ GT und Bilirubin erhöht waren. Neben der hypoxischen Hepatitis kommt es in der Sepsis ebenfalls zur Cholestase (*Henrion 2011*). Es wäre auch denkbar, dass diese Komponente in dieser Gruppe stärker

ausgeprägt war – jedoch war auch die DY-780-Ausscheidung über die Galle nicht reduziert, was wiederum diese Argumentationslinie nicht unterstützt. Die PDR(DY-780) war in der Gruppe „leichte Schädigung“ allenfalls geringfügig reduziert. Sie zeigte insgesamt einen ähnlichen Verlauf wie in den Kontrolltieren mit einem nur leicht flacheren Abfall der Konzentrationskurve. In Tab. 8 zeigt sich daher bezüglich des Exponenten α kaum ein Unterschied zwischen „leichter Schädigung“ und den einzelnen Kontrolltieren. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass bei den Kontrolltieren, welche ein ungewöhnlich niedriges α vorweisen, die Potenzfunktion den Kurvenverlauf nicht so gut abbildet (s. korrigiertes R^2 in Tab. 8). Dies bedeutet eine hohe Abweichung der Messwerte von der Kurve und ist unter Anderem ausgeprägteren Messfehlern geschuldet. Kurvenverläufe mit größerem korrigiertem R^2 sollten daher stärker gewichtet werden. Hier ist ersichtlich, dass bei diesen Tieren auch α größer und der Kurvenverlauf damit steiler ist. Unter diesen Umständen würde also ein deutlicherer Unterschied der PDR beider Gruppen „Kontrolle“ und „leichte Schädigung“ festzustellen sein.

Für andere leberspezifische Farbstoffe konnte in Studien gezeigt werden, dass ihre PDR das Ausmaß der hepatischen Dysfunktion widerspiegelt. Die PDR(ICG) besitzt einen prognostischen Wert für das Überleben bei septischen PatientInnen. So lag bei einer PDR(ICG) $> 16 \text{ \%/min}$ die Mortalität unter 80 %, während eine PDR(ICG) $< 8 \text{ \%/min}$ mit einer Mortalität von 80 % einherging (*Sakka et al. 2002, Kortgen et al. 2009*). Dass die PDR der Farbstoffe abhängig von intrahepatischen Vorgängen ist, zeigten Gonnert et al. (2013). Sie betrachteten die Kinetik von ICG in septischen Tieren mittels Intravitalmikroskopie sowie die Gallenexkretion. Zusätzlich charakterisierten sie einen weiteren Farbstoff, DY-635. Beide Farbstoffe eigneten sich zur Beurteilung der Leberfunktion. Es wurde bei Sepsis jeweils eine geringere Menge über die Galle ausgeschieden und auch bei intravitalmikroskopischer Betrachtung zeigte sich eine verzögerte hepatische Exkretion sowie ein heterogenes intrahepatisches Fluoreszenzmuster. Als zugrunde liegender Pathomechanismus wurde eine verminderte Genexpression der apikalen und basolateralen Transporter nachgewiesen (*Trauner et al. 1999*). Insbesondere die Genexpression der kanalikulären Transporter für ICG unterliegt einer deutlichen Reduzierung, während die Genexpression basolateraler Transporters zur Aufnahme des Farbstoffs in die Hepatozyten weniger betroffen bzw. sogar erhöht sein kann (*Kortgen et al. 2009*).

Dass die PDR absinkt, wird zum einen durch den verminderten ATP-Gehalt, der für die basolateralen Transporter zur Verfügung steht, begründet. Außerdem kommt es durch intrinsische Vorgänge im Bereich der Sinusoide zur Ausbildung von Shunts in der Mikrozirkulation, wodurch die Perfusion herabgesetzt wird – die verminderte PDR ist also als überlagerndes Zusammenwirken von eingeschränkter Mikroperfusion und reduzierter basolateraler Transportkapazität aufgrund Energiemangels zu verstehen (*Paxian et al. 2003*).

Es ist wahrscheinlich, dass die hier verwendeten leberspezifischen Farbstoffe durch dieselben oder ähnliche Transporter ein- und ausgeschleust werden, denn die Ergebnisse sind mit Messungen dieser Arbeit kongruent. Eine vergleichbar veränderte Kinetik trat bei den Untersuchungen mittels IVM auf. Eine verlangsamte hepatische Aufnahme mit entsprechend verzögerter DY-780-Anflutung in den Hepatozyten spiegelt die beeinträchtigte basolaterale Transporterfunktion wider. Dadurch wird die flachere PDR-Kurve bei septischen Tieren bedingt. Ebenfalls war die Abnahme der intrahepatischen DY-780-Fluoreszenz verlangsamt. Die höhere Farbstoffkonzentration im Organlysat zeigt, dass die Hepatozyten den Farbstoff akkumulieren und wie ein Reservoir zwischenspeichern. Es fanden sich zudem geringere Farbstoffmengen in den Galleproben. In einem Tier mit schwerem Leberschaden wurde im Vergleich zum Kontrolltier ein langsamerer Anstieg und ein niedrigeres Maximum der Ausscheidungsrate des Farbstoffs erreicht (s. Abb. 15). Diese Ergebnisse spiegeln die beeinträchtigte Ausscheidungskapazität, hervorgerufen durch eine beeinträchtigte Funktion der apikalen Transporter, wider.

Die hepatische Elimination und die veränderte PDR bei Sepsis konnte in dieser Arbeit für die Farbstoffe DY-680 und DY-780 beschrieben werden. Bei der Fragestellung, welche der beiden Substanzen eine bessere Unterscheidung zwischen Kontrolle und Sepsis ermöglicht, muss jedoch berücksichtigt werden, dass der hervorgerufene Leberschaden nach PCI interindividuell unterschiedlich ausgeprägt war. Bei den Größen der Versuchsgruppen, welche unter Berücksichtigung des Tierschutzgesetzes so gering wie möglich gehalten wurden, ist hier durchaus eine unregelmäßige Verteilung der Schweregrade bei der Untersuchung von DY-680 und DY-780 möglich. Nichtsdestotrotz zeigte sich, dass die PDR(DY-780) sich deutlicher als die PDR(DY-680) zwischen den Gruppen „Kontrolle“ und „PCI“ unterscheidet.

Allein DY-680 könnte durch die geringe Gruppengröße zu Unrecht im Vergleich zu DY-780 als etwas unterlegen beurteilt worden sein.

Hypothese: Im Modell der polymikrobiellen Sepsis wird eine frühe Nierenschädigung induziert und durch Polymethinfarbstoffe erkannt

Die konventionellen Biomarker Serumkreatinin und Serumharnstoff stellen Indikatoren für eine Nierenschädigung dar. Klinischer Standard zur Erfassung der Nierenfunktion ist die Berechnung der GFR anhand des Serumkreatinins. Eine Nierenschädigung im Tiermodell einer polymikrobiellen Sepsis ging in diesen Versuchen jedoch nicht mit einem signifikanten Kreatininanstieg einher. Studien sind zu dem Ergebnis gekommen, dass 24 Stunden nach Sepsisinduktion mittels CLP einerseits eine große Streubreite der Kreatininwerte vorlag und dabei 49 % der Ratten gar kein akutes Nierenversagen entwickelt haben (*Holly et al. 2006*). Es zeigte sich, dass Sepsisinduktion hier gar zu einer Reduktion des Kreatininspiegels führen kann, was die Detektion einer Nierenschädigung maskierte. Die Autoren stellten fest, dass es zwar zum Anstieg der Leberenzyme ALAT und ASAT sowie der Inflammationsmarker Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Laktatdehydrogenase (LDH) kommt, das Serumkreatinin jedoch kaum anstieg, bzw. bei nephrektomierten Versuchstieren gar ein niedrigeres Level 14 Stunden nach Sepsisinduktion aufwies (*Doi et al. 2009*). *Otto et al. (2013)* konnten zeigen, dass sowohl Harnstoff als auch Kreatinin in der frühen Sepsisphase (sechs Stunden nach PCI) keine erhöhten Werte aufweisen, jedoch der Marker NGAL, assoziiert mit erhöhten TNF- α -Werten, bereits signifikant angestiegen war.

Auch die Ergebnisse der PDR(DY-654)- bzw. PDR(DY-778)-Messung bleiben weniger eindeutig als die Ergebnisse des hepatisch eliminierten Kombinationspartners DY-780 bzw. DY-680 in denselben Versuchstieren. In den Vorversuchen zeigten beide renal eliminierten Farbstoffe, DY-778 und auch DY-654, keine signifikanten Änderungen der Kinetik an. DY-654 wurde dennoch für die nachfolgenden Versuche ausgewählt, da eine stärkere Tendenz einer verminderten PDR zu verzeichnen war und die Substanz aufgrund seiner optischen Eigenschaften als passender Kombinationspartner für den vielversprechenden Farbstoff DY-780

fungieren kann.

Bezüglich der Eliminationskinetik ist erkennbar, dass in PCI-behandelten Tieren weniger DY-654 in den Urin ausgeschieden wird als im naiven Tier. Gleichwohl konnte anhand des bloßen Kurvenverlaufs der PDR zunächst nicht eindeutig eine verringerte PDR gesehen werden. Ein Anstieg der Plasmakonzentration bei $t = 4$ min wurde festgestellt. Nach der Auswertung der Daten eröffnete sich die Frage, ob möglicherweise innerhalb der ersten zwei Minuten schon deutlichere Unterschiede in der PDR festzustellen sein könnten. Diese Vermutung bestätigte sich dahingehend im Anschluss an weiteren Kontrolltieren, bei denen ein starker Abfall der PDR bereits in diesem Zeitfenster vorstattenging.

In die PDR fließen neben der reinen renalen Elimination auch Verteilungsvorgänge zwischen den Kompartimenten ein. Entzündungsmediatoren bewirken in der Sepsis eine Permeabilitätserhöhung der Gefäße, sodass sich das Flüssigkeitsvolumen nach extravasal verschiebt und gleichzeitig eine Hypotonie bei Hypovolämie mit herabgesetztem kolloidosmotischen Druck besteht (*Reinhart et al. 2002, van der Flier et al. 2005*). Diese Faktoren begünstigen eine Diffusion sogar großer Moleküle wie Albumin nach extravasal (s. Abb. 27; *Andersson et al. 1995*). Zumindest die nicht an Albumin gebundenen Farbstoffe DY-654 und DY-778 können somit wohl auch die gestörte Barriere passieren. Für an Albumin gebundene Farbstoffe ist diese Aussage nicht mit Sicherheit zu treffen.

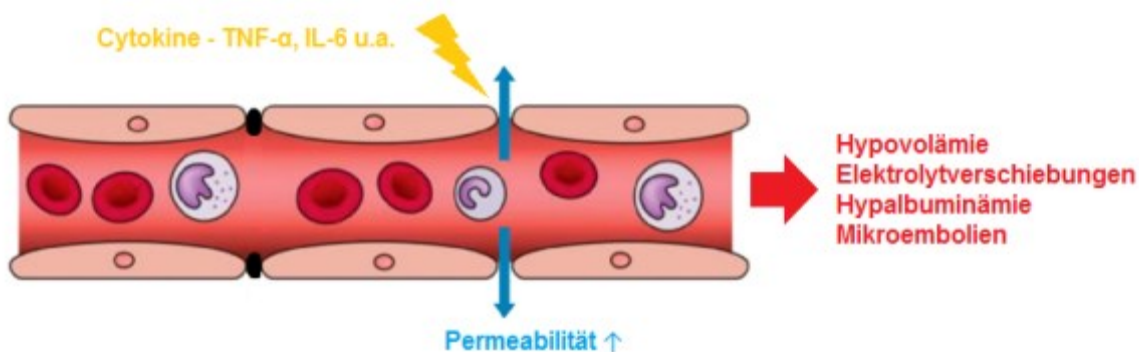


Abbildung 27: Inflammatorische Mediatoren erhöhen die Permeabilität des Endothels. Es resultieren hämodynamische Komplikationen (verändert nach *Lee und Rah 2016*).

Da die renal eliminierten Farbstoffe, wie DY-654 und DY-778, im Plasma frei vorliegen und kaum an Albumin gebunden sind, ist die Möglichkeit der glomerulären Filtration gegeben. Trotzdem sind tubuläre Transportmechanismen zunächst nicht auszuschließen. So ist eine Sekretion oder auch Reabsorption denkbar, die bei einer Organschädigung entsprechend beeinflusst werden würde. Eine reduzierte Farbstoffmenge im Urin bei gleichzeitig intravitalmikroskopisch sichtbarer erhöhter Fluoreszenzintensität des Nierenparenchyms im septischen Tier bedeutet jedenfalls eine intrarenale Farbstoffakkumulation.

Hypothese: Ischämie-Reperfusions-Modelle und Glycerolinjektion eignen sich zur Induktion einer isolierten Organschädigung

Pathophysiologische Prozesse im Rahmen einer Sepsis bewirken komplexe Reaktionen des Organismus basierend auf generalisierten Entzündungsprozessen und Wechselwirkungen der Organdysfunktionen untereinander. Um die Beschreibung der Kinetiken zu präzisieren, sind im Anschluss an die PCI-Versuche Modelle zur lokalen Organschädigung des jeweils für die Farbstoffelimination verantwortlichen Organs (Leber bzw. Niere) angewendet worden. Einflüsse der generalisierten Inflammation (wie veränderte interkompartimentelle Dynamik, Zirkulationsstörungen, vermindertes Herzzeitvolumen) und eventuelle Einflüsse einer begleitenden Organdysfunktion sollten in diesen Experimenten vermieden werden. Es wurden also Modelle gewählt, die entweder einen Leber- oder einen Nierenschaden hervorrufen sollen.

Es existieren unterschiedliche Modelle, um eine solche isolierte Organschädigung zu erzeugen. Das Ischämie-Reperfusions-Modell wurde ausgewählt, da der Schädigungsmechanismus des Organs hier ähnlich wie bei einer Sepsis auf der hypoxischen Zellschädigung in Folge einer beeinträchtigten Organperfusion basiert. Die bei einer Sepsis durch Mikroembolien entstehende Hypoxie verursacht zelluläre Prozesse der nachgeschalteten Stromgebiete, welche den Vorgängen der Ischämie beim Ischämie-Reperfusionsschaden entsprechen.

Zunächst entwickelt sich während der Ischämiephase ein hypoxisch bedingter ATP-Mangel, der mit Elektrolytverschiebungen und Azidose einhergeht. Es resultiert

ein Zellödem und entzündliche Prozesse werden ausgelöst. Durch den Anstieg des intrazellulären Calciums über die Aktivierung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) wird die Entzündungsreaktion durch die Initiierung von Vasokonstriktion, Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Gerinnungsaktivierung weiter begünstigt. Es kommt außerdem zur Infiltration von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten, welche ihrerseits reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Zytokine und Enzyme freisetzen. Durch die Volumenverschiebung erhöht sich die Blutviskosität und durch das Zellödem verringert sich der Gefäßdurchmesser. Die Mikrozirkulation wird fortschreitend behindert (s. Abb. 28; *Schmaderer et al. 2005*).

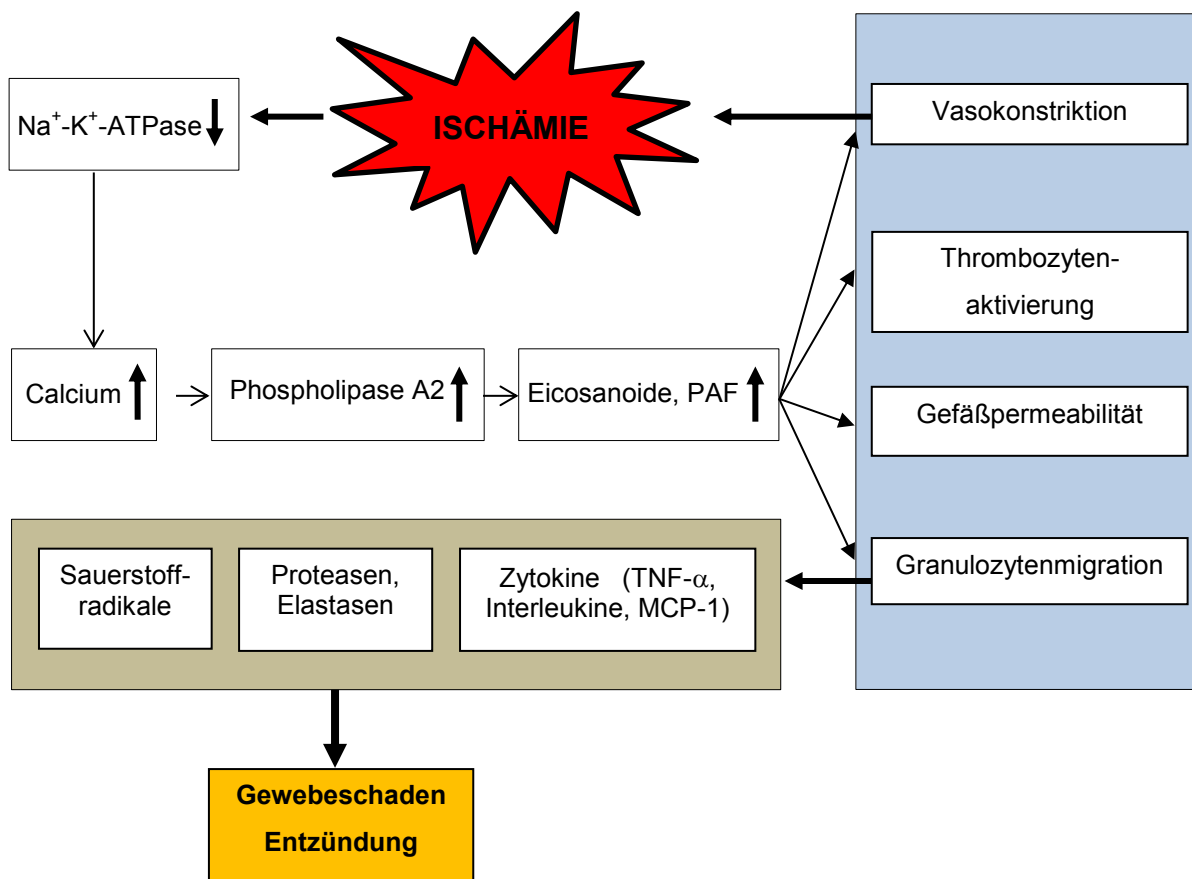


Abbildung 28: Pathophysiologische Prozesse bei Ischämie führen zur Gewebeschädigung (verändert nach *Schmaderer et al. 2005*).

Im Anschluss an die Ischämie beginnt die Reperfusionphase. Dies stellt den zweiten Schädigungsmechanismus dar. Aufgrund des plötzlichen Anflutens von Sauerstoff entstehen durch Oxidationsprozesse reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Eine Inaktivierung derselben kann nicht effizient erfolgen, da sie in großen Mengen

gebildet werden und die Reaktionssysteme ihre Funktion aufgrund des vorangegangenen Energiemangels noch nicht vollständig wiedererlangt haben. Die ROS leiten die Apoptose ein (*Schmaderer et al. 2005*). Insgesamt resultiert beim Ischämie-Reperfusion-Modell der apoptotische und nekrotische Zelluntergang (*Schmaderer et al. 2005, Daemen et al. 2002*).

Aufgrund der zwischenzeitlichen Unterbrechung und des anschließenden Wiederanschlusses an das Blutkreislaufsystem kann es klinisch bei Organtransplantationen und Leberresektionen zur Schädigung durch Ischämie-Reperfusion kommen. Die PDR(ICG) wird auch hier klinisch zur Beurteilung der Leberfunktion eingesetzt (*Hsieh et al. 2004, Clavien et al. 2007, Lee und Hwang 2005*). Wir wählten ein etabliertes Modell zur Erzeugung eines Ischämie-Reperfusionsschadens von 70 % der Leber, um die Kinetik von DY-780 in der isolierten Leberschädigung bei uneingeschränkter Nierenfunktion charakterisieren zu können (*Mendes-Braz et al. 2012, Hines et al. 2003*). Der gleiche Mechanismus sollte genutzt werden, um eine isolierte Nierenschädigung zur Charakterisierung von DY-654 hervorzurufen. Hier stellt die zeitgleiche Unterbrechung der arteriellen Blutzufuhr beider Nieren wie in den durchgeführten Versuchen ebenfalls ein etabliertes Modell dar, welches in Studien nach 45 Minuten Ischämie gefolgt von 24 Stunden Reperfusion die maximale Schädigung aufwies (*Williams et al. 1997*).

Die PDR(DY-780) im I/R Leber-Modell ist deutlich vermindert. Nur die PCI-Gruppe ist stärker betroffen. Bilirubin, ASAT und γ GT zeigten keine Änderung; lediglich ein signifikanter Anstieg der ALAT wies in der klinischen Chemie auf einen Leberschaden hin. Anders als im Sepsismodell kam es nicht zu einer Farbstoffakkumulation im geschädigten Lebergewebe; es ist augenscheinlich, dass die Aufnahme des Farbstoffes DY-780 in die Hepatozyten insuffizient war. Makroskopisch imponierte der LLL deutlich blasser als die anderen Leberlappen. Das dynamische Messverfahren stellt sich ähnlich wie in der PCI-Gruppe gegenüber der Bestimmung der statischen Biomarker zur Erfassung der Leberfunktion als überlegen heraus. Bei der Bestimmung der Gallensäuren zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der leichten Leberschädigung bei Sepsis. Der erhöhte Konjugationsindex weist auf eine intakte Biotransformation bei verminderter Exkretionsleistung hin. Bei der Interpretation sollte jedoch bedacht werden, dass 30 % des Lebergewebes noch

funktionstüchtig waren.

Anhand der Betrachtung des Exponenten α zeigt sich, dass die PDR(DY-654) in der Gruppe I/R Niere im Vergleich zu den Kontrolltieren ebenfalls leicht reduziert war, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der PCI- und Glycerolgruppe. Kreatinin und Harnstoff zeigten die Organdysfunktion in diesem Modell nicht an. Die PDR-Messung scheint hier den statischen Biomarkern bei der Detektion der renalen Dysfunktion überlegen zu sein. Bei der Epifluoreszenzmessung bei I/R Niere traten insgesamt erhöhte Fluoreszenzwerte in der Niere auf, was auf eine renale Akkumulation des Farbstoffs hindeutet. Nach Ischämie-Reperfusion kommt es zu tubulären Obstruktionen und auch zum *back leak* von intratubulären Molekülen. Dies konnte bereits mit radioaktiv markiertem Inulin gezeigt werden (*Stenberg et al. 1988, Donohoe et al. 1978*)).

Die Ergebnisse waren dahingehend überraschend, als sich auch eine verringerte PDR des hepatisch eliminierten Farbstoffs DY-780 bei der Gruppe I/R Niere fand; die hepatischen Biomarker lagen im Referenzbereich. Eine Auswirkung des Nieren I/R-Modells auf die Leberfunktion wurde in Studien beschrieben. Durch Entzündungsmediatoren kam es hier zur Leberschädigung, was auch histologisch darstellbar war (*Kadkhodae et al. 2009, Bakker et al. 2015*). Die leichte Reduzierung der PDR(DY-780) könnte aber auch dadurch begründet sein, dass es im I/R-Modell der Niere zu lokalen Inflammationsprozessen kommt, welche eine erhöhte Gefäßpermeabilität und somit reduzierte Plasmaporteinkonzentration bewirken können und unter Umständen somit auch eine veränderte Plasmakinetik des an Albumin gebundenen Farbstoffs ermöglicht (*Jörres et al. 2016*).

Um eine vergleichende Kinetikmessung bei ausgeprägter isolierter Nierenschädigung durchzuführen, wurde des Weiteren das etablierte Modell der Nierenschädigung durch intramuskuläre Glycerolinjektion hervorgerufen. Durch dieses Verfahren kommt es zur Rhabdomyolyse. Das freiwerdende Myoglobin bewirkt, insbesondere bei gleichzeitig bestehendem Volumenmangel, eine Nierenschädigung, welche auf renaler Vasokonstriktion durch NO-Antagonismus, intrarenaler Präzipitatbildung und direkter Nephrotoxizität beruht. Es konnte zudem gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der GFR im Sinne einer glomerulären Schädigung einzelner Nephrone kommt (*Malik 1998, Wolfert und Oken 1989*). Die

Versuchstiere waren hier keiner chirurgischen Intervention ausgesetzt, wie es bei den Ischämie-Reperusionsversuchen der Fall war, was den Einfluss einer Inflammation weiter reduzieren sollte. Trotzdem war die Nierenfunktion stärker eingeschränkt als bei PCI und I/R Niere. Im Gegensatz zu diesen Modellen handelt es sich bei der Nierenschädigung durch Glycerolinjektion um ein rein experimentelles Szenario. Im klinischen Alltag wird es in dieser Form nicht anzutreffen sein, spiegelt jedoch eine dem *Crush*-Syndrom der Niere ähnliche Symptomatik wider.

Die Ergebnisse der I/R- und Glycerolversuche zeigen, dass hier ein verzögerter Anstieg und ein langsamerer Abfall der DY-654-Konzentration im Vergleich zum Kontrolltier erfolgten. Es wurde weniger DY-654 in den Urin ausgeschieden, nach Glycerolinjektion waren die Tiere anurisch. Die Nierenschädigungsparameter der klinischen Chemie waren, anders als im I/R-Modell der Niere, im Glycerolmodell ebenfalls signifikant erhöht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es zu einer ausgeprägten Nierenschädigung kam. Die Exponenten der gefitteten Potenzfunktionen zeigten im Glycerolmodell den langsamsten Abfall der Plasmakonzentration an. Epifluoreszenzmikroskopisch stellte sich hier ein verändertes Fluoreszenzmuster mit hohen Intensitäten im Randbereich der Tubuli dar, was auf eine Akkumulation in diesem Bereich hindeutet. Um dies genauer zu untersuchen, wurde in diesem Modell zusätzlich die intravitalmikroskopische Fluoreszenzmessung mittels eines *laser scanning* Mikroskopes an Mäusen durchgeführt. Dabei war es möglich, ohne Überlagerung anderer Ebenen die Farbstoffkinetik zu betrachten und in einem kürzeren Intervall Bildaufnahmen zu kreieren, um eine Videosequenz zu erhalten. Bei gesunden Kontrollmäusen kam es hierbei nach wenigen Sekunden zum Erscheinen des Farbstoffs DY-654 im Tubulussystem. Bei Mäusen nach Glycerolinjektion zeigte sich eine Akkumulation des Farbstoffes in verschiedenen Tubulusabschnitten, einerseits als intrazelluläre Anreicherung hervorgerufen durch gestörte Barrierefunktionen nekrotischer Epithelzellen, andererseits intraluminal am ehesten aufgrund einer Stase bei einer Tubulusverlegung durch nekrotisches Material (s. Abb. 29; *Press et al. 2017*).

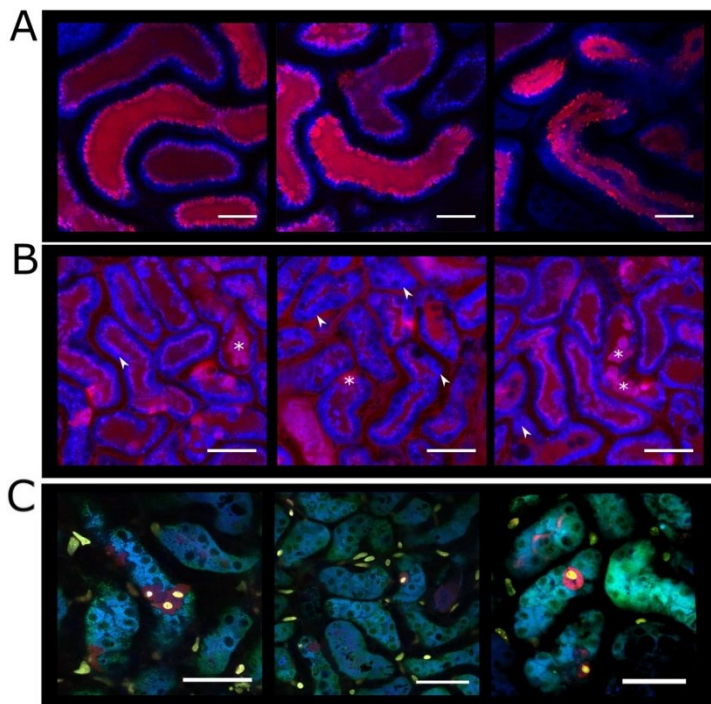


Abbildung 29: DY-654 Verteilung in Mäusenieren. IVM-Aufnahmen von DY-654 (rot) in Kontrolltieren (A) und nach Glycerolinjektion (B, C). (B): * = Zelltrümmer. Pfeile = erhöhte NAD(P)H-Autofluoreszenz (tubulärer Schaden). (C): DY-654 90 min post injectionem. Zusätzlich wurden tote Zellen mit Propidiumiodid (PI, gelb) gefärbt. DY-654 akkumuliert nur in PI positiven Zellen. NAD(P)H Autofluoreszenz = blau. Skalierungsbalken = 100 μm (A), 50 μm (B,C). Verändert nach *Press et al. 2017*.

Insgesamt bleibt zu klären, wie sich die Farbstoffe intratubulär in den verschiedenen Modellen verhalten. Ähnlich wie bei der Leber wäre es dabei interessant, ob basolaterale oder apikale Transportvorgänge beeinträchtigt werden und in welchem Ausmaß es zur Akkumulation innerhalb der Tubuluszelle selbst kommt. Die Farbstoffakkumulation im Tubulus lässt sich nicht wie bei den Hepatozyten durch ein Organlysat quantifizieren, da hier aufgrund methodischer Limitationen nicht zwischen Tubuluslumen und Tubuluszellen unterschieden werden kann. Intravital-mikroskopisch deutet eine diffuse Fluoreszenz der Tubuli im DY-654-Kanal auf dieses Geschehen hin. Die erhöhte Streubreite der Fluoreszenzintensität im I/R-Modell der Niere ist ebenfalls Ausdruck der intratubulären Anreicherung des Farbstoffs, wobei der Ort der tatsächlichen Anreicherung (Tubuluslumen vs. Tubuluszelle) unklar bleiben muss.

Weitere Videosequenzaufnahmen mittels LSM wurden an gesunden Mäusen durchgeführt.

DY-654 wurde dabei an ein sogenanntes Kammpolymer (P1-DY-654) gebunden, was aufgrund der Molekülgröße die glomeruläre Filtration behindert. Hier konnte im Gegensatz zum freien DY-654 kein intratubuläres Signal in den ersten Minuten gemessen werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass das ungebunden vorliegende DY-654 im gesunden Tier glomerulär filtriert und nicht tubulär sezerniert wird (s. Abb. 30). Jedoch ist auch nicht auszuschließen, dass ein eventueller Transporter durch das Polymer blockiert wird.

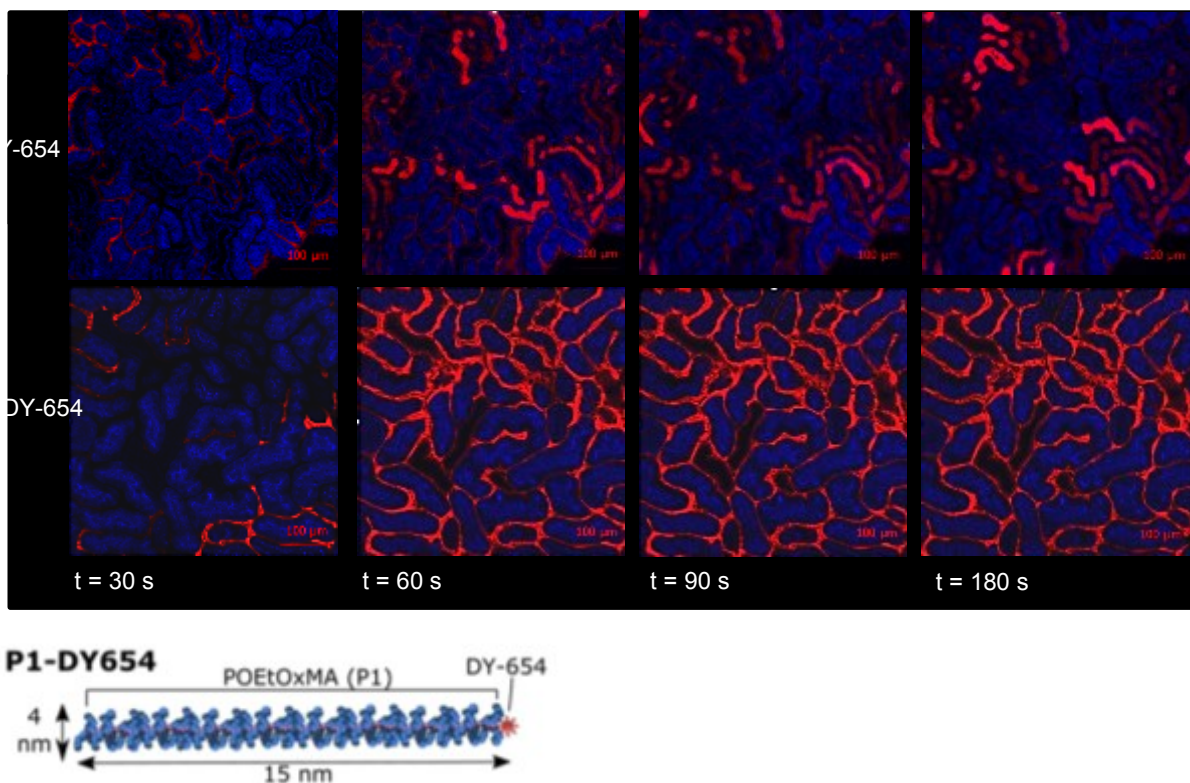


Abbildung 30: intrarenale Kinetik von DY-654 und P1-DY-654. *i.v.* Injektion in Mäuse und Aufnahmen mittels laser scanning Mikroskop. Der frei vorliegende Farbstoff wird renal eliminiert, während der an das Polymer gebundene Farbstoff extratubulär zirkuliert. Unten im Bild: Darstellung der Molekülgröße von P1-DY-654 (nach *Press et al. 2017*)

5.3 Ausblick

Um das Ziel der klinischen Anwendung in Form einer transkutanen Messung der Plasmaverläufe an PatientInnen zu verwirklichen, sind weitere Überlegungen und Untersuchungen vorzunehmen.

Nach Interpretation der Daten sind neue Fragen aufgeworfen worden. Im Vorfeld zu klinischen Studien sollten daher Limitationen der Messmethode experimentell geprüft werden. Insbesondere bezüglich des renal eliminierten Farbstoffs sind weitere Erkenntnisse zur Farbstoffverteilung zwischen den Kompartimenten zu gewinnen. Hier kann beispielsweise die Bildgebung mittels *multispectral optoacoustic transmission* (MSOT), welche ähnlich der Computertomografie Schnittbilder des Organismus erzeugt, hilfreiche Daten zu Verteilungsvorgängen im gesamten Organismus liefern. Einhergehend mit der Betrachtung der Transporterebene, insbesondere hinsichtlich des Eliminationsmechanismus des renal eliminierten Farbstoffs, können kausale Zusammenhänge der PDR-Verläufe besser verstanden werden.

Um die PDR-Messungen zunächst in tierexperimentellen Studien transkutan durchzuführen, wäre ein geeignetes Gerät zur pulsdensitometrischen Detektion vonnöten. Aufgrund der optischen Eigenschaften der Farbstoffe ist davon auszugehen, dass dies prinzipiell anwendbar sein kann. Die Umsetzung müsste dafür unter technischen und praktischen Gesichtspunkten evaluiert werden.

Sensitivität, Spezifität und frühe Detektion einer Organdysfunktion bei Anwendung des Verfahrens im klinischen *setting* sind durch Messungen in ProbandInnen ohne Organdysfunktion im Vergleich zu PatientInnen, die ein akutes Leber- oder Nierenversagen entwickeln, in prospektiven Studien zu beurteilen. Zusätzlich können auch sensitive Biomarker wie NGAL erhoben und mit den Ergebnissen der PDR-Messungen korreliert werden. Werden klinisch angewendete Biomarker (wie Bilirubin) und scores (wie KDIGO-Kriterien des akuten Nierenversagens) ermittelt, kann eine Überlegenheit des neuen Verfahrens gegenüber etablierten Biomarkern und den davon abgeleiteten scores geprüft werden.

6 Schlussfolgerungen

Das Farbstoffpaar DY-780 + DY-654 ist grundsätzlich zur simultanen Erfassung der Leber- und Nierenfunktion in verschiedenen *in vivo* Modellen der Organschädigung geeignet. Aufgrund unterschiedlicher Wellenlängenbereiche der Absorptions- und Emissionsspektren treten keine Überlagerungen der Messergebnisse auf. In den Messungen der Farbstoffkonzentrationen in Urin, Galle und Organlysaten sowie intravitalmikroskopischer Aufnahmen war zudem die organspezifische Elimination der jeweiligen Farbstoffe festzustellen.

Eine verminderte PDR zeigt die jeweilige Organdysfunktion frühzeitig an. Die veränderte Plasmakinetik resultiert dabei aus einer reduzierten Eliminationsleistung des betroffenen Organs. Bereits 15 Stunden nach Sepsisinduktion war eine differenzierte Beurteilung der Leberdysfunktion durch die PDR(DY-780) möglich. Auch in den anderen Schädigungsmodellen wurden veränderte Plasmakinetiken, einhergehend mit reduzierten Wiederfindungsraten in Galle bzw. Urin, nachgewiesen. Intravitalmikroskopische Analysen zeigen Akkumulationen der Farbstoffe in Leber und Niere nach deren Schädigung an.

Mathematische Betrachtungen erlauben es dabei, die veränderte Plasmakinetik der Farbstoffe zu quantifizieren. In Anlehnung an das Zwei-Kompartiment-Modell beschreiben biexponentielle Funktionen modellhaft die Verteilungsvorgänge *in vivo*. Für die Ergebnisse dieser Arbeit eignen sich zudem Potenzfunktionen zur übersichtlichen, vergleichbaren Darstellung der Kinetiken. Hier wird ersichtlich, dass es in den Schädigungsmodellen zu unterschiedlichen Ausprägungen der Organdysfunktion kommt. Die PDR(DY-780) war demnach insbesondere bei den septischen Tieren mit schwerem Leberschaden und nach I/R Leber reduziert, während die PDR(DY-654) nach Glycerolinjektion und bei Sepsis am stärksten beeinträchtigt war. Statische Biomarker waren dabei der dynamischen Messmethode unterlegen.

Dennoch muss bei der Interpretation der Daten beachtet werden, dass die molekularen und systemischen Vorgänge der Eliminations- und Verteilungsprozesse insbesondere des renal eliminierten Farbstoffs noch nicht vollständig bekannt sind. Diese könnten die PDR in den verschiedenen Modellen mitunter stark beeinflussen,

was wiederum zur Über- oder Unterschätzung der Funktion des Eliminationsorgans führen würde.

Der Vergleich mit klinisch etablierten Biomarkern der Leber- und Nierenschädigung erbrachte in dieser Arbeit Hinweise darauf, dass die PDR-Messung eine Organdysfunktion schneller und sensitiver erkennt. In der klinischen Anwendung sollten dahingehend weitere Untersuchungen mit der an PatientInnen anwendbaren transkutanen Messmethode durchgeführt werden.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Acute Kidney Injury Work Group. 2012.** Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int(Suppl 2)*:1–138.
- Adiyanti SS, Loho T. 2012.** Acute Kidney Injury (AKI) biomarker. *Acta Med Indones. Jul;44(3)*:246-55.
- Ahmed T. 2015.** Pharmacokinetics of drugs following IV Bolus, IV infusion, and oral administration. *Basic Pharmacokinetic Concepts and Some Clinical Applications 2015.*
- Aller MA, Arias N, Prieto I, Agudo S, Gilsanz C, Lorente L, Arias JL, Arias J. 2012.** A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. *World J Hepatol 2012; 4(7)*: 199-208.
- Alobaidi R, Basu RK, Goldstein SL, Bagshaw SM. 2015.** Sepsis-Associated Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol. Jan; 35(1)*: 2–11.
- Andersson R, Wang X, Ihse I. 1995.** The influence of abdominal sepsis on acute pancreatitis in rats: a study on mortality, permeability, arterial pressure, and intestinal blood flow. *Pancreas, 11(4)*, 365-373.
- Bagshaw SM, Gibney RTN. 2008.** Conventional markers of kidney function. *Critical care medicine, 36(4)*, S152-S158.
- Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Oudemans-van Straaten HM, Ronco C, Kellum JA. 2007.** Septic acute kidney injury in critically ill patients: Clinical characteristics and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol.;2*:431–9.
- Bakker PJ, Scantlebery AM, Butter LM, Claessen N, Teske GJ, van der Poll T, Florquin S, Leemans JC. 2015.** TLR9 Mediates Remote Liver Injury following Severe Renal Ischemia Reperfusion. *PLoS One. Sep 11;10(9)*:e0137511. doi: 10.1371/journal.pone.0137511.
- Bauer M, Kortgen A. 2012.** Leberdysfunktion beim Intensivpatienten. *Anästhesiol Intensivmed. 9*, 470-487.
- Bauer M, Press AT, Trauner M. 2013.** The liver in sepsis: patterns of response and injury. *Curr Opin Crit Care. Apr;19(2)*:123-7. doi: 10.1097/MCC.0b013e32835eba6d.
- Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. 2004.** Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical care, 8(4)*, R204.
- Berezin MY, Guo K, Akers W, Livingston J, Solomon M, Lee H, Liang K, Agee A, Achilefu S. 2011.** Rational Approach To Select Small Peptide Molecular Probes Labeled with Fluorescent Cyanine Dyes for in Vivo Optical Imaging. *Biochemistry 50 (13)*, 2691-2700, DOI: 10.1021/bi2000966.
- Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. 2010.** Acute liver failure. *Lancet. Jul 17;376(9736)*:190-201. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60274-7.
- Bernal W, Wendon J. 2013.** Acute Liver Failure. *N Engl J Med. Dec 26;369(26)*:2525-34. doi: 10.1056/NEJMra1208937.
- Bernal W. 2016.** The liver in systemic disease: Sepsis and critical illness. *Clin Liver Dis (Hoboken). Apr 27;7(4)*:88-91. doi: 10.1002/cld.543.

- Bragadottir G**, Redfors B, Ricksten SE. **2013**. Assessing glomerular filtration rate (GFR) in critically ill patients with acute kidney injury - true GFR versus urinary creatinine clearance and estimating equations. *Crit Care*.17(3): R108.
- Case J**, Khan S, Khalid R, Khan A. **2013**. Review Article: Epidemiology of Acute Kidney Injury in the Intensive Care Unit. *Critical Care Research and Practice*, vol. 2013, Article ID 479730, 9 pages, <https://doi.org/10.1155/2013/479730>.
- Clavien PA**, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. **2007**. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med*. Apr 12;356(15):1545-59.
- Curtis AM**, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. **2014**. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*. Feb 20;40(2):178-86. doi: 10.1016/j.immuni.2014.02.002.
- Daemen MA**, de Vries B, Buurman WA. **2002**. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation*, 73(11), 1693-1700.
- Desmettre T**, Devoisselle JM, Mordon S. **2000**. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. *Surv Ophthalmol*. Jul-Aug;45(1):15-27.
- Doi K**, Yuen PS, Eisner C, Hu X, Leelahavanichkul A, Schnermann J, Star RA. **2009**. Reduced production of creatinine limits its use as marker of kidney injury in sepsis. *J Am Soc Nephrol*. Jun;20(6):1217-21. doi: 10.1681/ASN.2008060617.
- Donohoe JF**, Venkatachalam MA, Bernard DB, Levinsky NG. **1978**. Tubular leakage and obstruction after renal ischemia: structural-functional correlations. *Kidney Int*. Mar;13(3):208-22.
- Faybik P, Hetz H**. **2006**. Plasma Disappearance Rate of Indocyanine Green in Liver Dysfunction. *Transplant Proc.*, 38(3):801-2.
- Fleischmann C**, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. **2016**. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*, 193(3):259-72.
- Fujii T**, Uchino S, Takinami M, Bellomo R. **2014**. Subacute Kidney Injury in Hospitalized Patients. *CJASN* March, 9 (3) 457-461; DOI: <https://doi.org/10.2215/CJN.04120413>.
- Goffton TE, Young GB**. **2012**. Sepsis-associated encephalopathy. *Nature Reviews Neurology*, 8(10), 557.
- Gonnert FA**, Recknagel P, Hilger I, Claus RA, Bauer M, Kortgen A. **2013**. Hepatic excretory function in sepsis: implications from biophotonic analysis of transcellular xenobiotic transport in a rodent model. *Crit Care*. Apr 10;17(2):R67. doi: 10.1186/cc12606.
- Gonnert FA**, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Lösche W, Claus RA, Bauer M. **2011**. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*. Sep;170(1):e123-34.
- Gudjonsson SV**. **1932**. The body temperature in rats on normal and deficient diets. *J Physiol*. 1932;74:73-80.
- Hamann FM**, Brehm R, Pauli J, Grabolle M, Frank W, Kaiser WA, Fischer D, Resch-Genger U, Hilger I. **2011**. Controlled modulation of serum protein binding and biodistribution of asymmetric cyanine dyes by variation of the number of sulfonate groups. *Mol Imaging*. Aug;10(4):258-69. doi: 10.2310/7290.2011.00005.
- Havasi A, Borkan SC**. **2011**. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney international*, 80(1), 29-40.

- Hemming AW**, Scudamore CH, Shackleton CR, Pudek M, Erb SR. **1992**. Indocyanine green clearance as a predictor of successful hepatic resection in cirrhotic patients. *Am J Surg.* May;163(5):515-8.
- Henrion J.** **2011**. Hypoxic hepatitis. *Liver Int.* Aug;32(7):1039-52. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02655.x.
- Hergert-Rosenthal S**, Marggraf G, Hüsing J, Göring F, Pietruck F, Janssen O, Philipp T, Kribben A. **2004**. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int.* Sep;66(3):1115-22.
- Holly MK**, Dear JW, Hu X, Schechter AN, Gladwin MT, Hewitt SM, Yuen PS, Star RA. **2006**. Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney Int.* Aug;70(3):496-506.
- Hsieh CB**, Chen CJ, Chen TW, Yu JC, Shen KL, Chang TM, Liu YC. **2004**. Accuracy of indocyanine green pulse spectrophotometry clearance test for liver function prediction in transplanted patients. *World J Gastroenterol.* Aug 15;10(16):2394-6.
- Huang J**, Weinfurter S, Daniele C, Perciaccante R, Federica R, Della Ciana L, Pill J, Gretz N. **2017**. Zwitterionic near infrared fluorescent agents for noninvasive real-time transcutaneous assessment of kidney function. *Chem Sci.* Apr 1;8(4):2652-2660. doi: 10.1039/c6sc05059j.
- Hull CJ.** **1979**. Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *British Journal of Anaesthesia*, 51(7), 579-594.
- Inker AS.** **2011**. Frequently asked questions about GFR estimates. New York: The National Kidney Foundation.
- James NS**, Chen Y, Joshi P, Ohulchanskyy TY, Ethirajan M, Henary M, Streckowski L, Pandey RK. **2013**. Evaluation of polymethine dyes as potential probes for near infrared fluorescence imaging of tumors: part - 1. *Theranostics*, 3(9), 692–702. <https://doi.org/10.7150/thno.5922>.
- Jörres A**, Hrsg., Ronco C, Hrsg, Kellum JA, Hrsg. **2016**. Management of Acute Kidney Problems. 1. Aufl. reprint (2010). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Joshi BP, Wang TD.** **2010**. Exogenous Molecular Probes for Targeted Imaging in Cancer: Focus on Multi-modal Imaging. *Cancers (Basel)*. Jun 11;2(2):1251-87. doi: 10.3390/cancers2021251.
- Kadkhodae M**, Golab F, Zahmatkesh M, Ghaznavi R, Hedayati M, Arab HA, Ostad SN, Soleimani M. **2009**. Effects of different periods of renal ischemia on liver as a remote organ. *World J Gastroenterol.* Mar 7; 15(9): 1113–1118.
- Keib A.** **2013**. Charakterisierung von Polymethinfarbstoffen zur nicht-invasiven simultanen Diagnostik von Organ-funktionen in Leber und Niere [Bachelorarbeit]. Jena / Furtwangen FH.
- Kimura S**, Yoshioka T, Shibuya M, Sakano T, Tanaka R, Matsuyama S. **2001**. Indocyanine green elimination rate detects hepatocellular dysfunction early in septic shock and correlates with survival. *Crit Care Med.* Jun; 29(6):1159-63.
- Kobayashi H**, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. **2010**. New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chem Rev.* May 12;110(5):2620-40. doi: 10.1021/cr900263j.
- Kortgen A**, Paxian M, Werth M, Recknagel P, Rauchfuss F, Lupp A, Krenn CG, Müller D, Claus RA, Reinhart K, Settmacher U, Bauer M. **2009**. Prospective assessment of hepatic function and mechanisms of dysfunction in the critically ill. *Shock*, 32(4):358-65.

- Koskinas J**, Gomas IP, Tiniakos DG, Memos N, Boutsikou M, Garatzioti A, Archimandritis A, Betrosian A. **2008**. Liver histology in ICU patients dying from sepsis: a clinico-pathological study. *World J Gastroenterol*. Mar 7;14(9):1389-93.
- Kramer L**, Jordan B, Druml W, Bauer P, Metnitz PG. **2007**. Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients - a prospective multicenter study. *Crit Care Med.*, 35(4):1099-104.
- Lambden S**, Laterre PF, Levy MM, Francois B. **2019**. The SOFA score—development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Crit Care*. 2019; 23: 374.
- Lee SG, Hwang S. 2005**. How I do it: assessment of hepatic functional reserve for indication of hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2005;12(1):38-43.
- Lee YH, Rah WJ. 2016**. Pre-graftment syndrome: clinical significance and pathophysiology. *Blood Res*. Sep;51(3):152-154.
- Lelubre C, Vincent JL. 2018**. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nature Reviews Nephrology*, 14(7), 417-427.
- Lerolle N**, Nochy D, Guérot E, Bruneval P, Fagon JY, Diehl JL, Hill G. **2010**. Histopathology of septic shock induced acute kidney injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med*. Mar;36(3):471-8. doi: 10.1007/s00134-009-1723-x.
- Madoiwa S. 2015**. Recent advances in disseminated intravascular coagulation: endothelial cells and fibrinolysis in sepsis-induced DIC. *Journal of intensive care*, 3(1), 8.
- Malik GH. 1998**. Rhabdomyolysis and Myoglobin-induced Acute Renal Failure. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. Jul-Sep;9(3):273-84.
- Marshall JC**, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. **1995**. Multiple organ dysfunction score: A reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med*. 1995;23:1638–1652.
- Marshall JC**, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ: **1995**, Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med*. 23: 1638-1652.
- Mendes-Braz M**, Elias-Miró M, Jiménez-Castro MB, Casillas-Ramírez A, Ramalho FS, Peralta C. **2012**. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:298657. doi: 10.1155/2012/298657.
- Mendizabal M, Silva MO. 2016**. Liver transplantation in acute liver failure: A challenging scenario. *World journal of gastroenterology*, 22(4), 1523.
- Nakai K**, Kikuchi M, Fujimoto K, Kaneko Y, Omori S, Nakai K, Suwabe A. **2008**. Serum levels of cystatin C in patients with malignancy. *Clin Exp Nephrol*. Apr;12(2):132-139. doi: 10.1007/s10157-008-0043-8.
- Otto GP**, Busch M, Sossdorf M, Claus RA. **2013**. Impact of sepsis-associated cytokine storm on plasma NGAL during acute kidney injury in a model of polymicrobial sepsis. *Crit Care* 17:419.
- Otto GP**, Grünwald B, Geis C, Köthe S, Hurtado-Oliveros J, Chung HY, Ekaney M, Bockmeyer CL, Sossdorf M, Busch M, Claus RA. **2015**. Impact of antibiotic treatment intensity on long-term sepsis-associated kidney injury in a polymicrobial peritoneal contamination and infection model. *Nephron*. 2015;129(2):137-42. doi: 10.1159/000368701.

- Pan HC**, Chien YS, Jenq CC, Tsai MH, Fan PC, Chang CH, Chen YC. **2016**. Acute kidney injury classification for critically ill cirrhotic patients: a comparison of the KDIGO, AKIN, and RIFLE classifications. *Scientific reports*, 6, 23022.
- Pauli J**, Vag T, Haag R, Spieles M, Wenzel M, Kaiser WA, Resch-Genger U, Hilger I. **2009**. An in vitro characterization study of new near infrared dyes for molecular imaging. *Eur J Med Chem. Sep*;44(9):3496-503. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.01.019. Epub 2009 Jan 29.
- Paxian M**, Bauer I, Rensing H, Jaeschke H, Mautes AE, Kolb SA, Wolf B, Stockhausen A, Jeblick S, Bauer M. **2003**. Recovery of hepatocellular ATP and "pericentral apoptosis" after hemorrhage and resuscitation. *FASEB J* 17:993-1002.
- Press AT**, Butans MJ, Haider TP, Weber C, Neugebauer S, Kiehntopf M, Schubert US, Clemens MG, Bauer M, Kortgen A. **2017**. Fast simultaneous assessment of renal and liver function using polymethine dyes in animal models of chronic and acute organ injury. *Sci Rep*. Nov 13;7(1):15397. doi: 10.1038/s41598-017-14987-5.
- Press AT**, Traeger A, Pietsch C, Mosig A, Wagner M, Clemens MG, Jbeily N, Koch N, Gottschaldt M, Bézière N, Ermolayev V, Ntziachristos V, Popp J, Kessels MM, Qualmann B, Schubert US, Bauer M. **2014**. Cell type-specific delivery of short interfering RNAs by dye-functionalised theranostic nanoparticles. *Nat Commun*. Dec 3;5:5565. doi: 10.1038/ncomms6565.
- Rahman M**, Shad F, Smith MC. **2012**. Acute kidney injury: a guide to diagnosis and management. *American family physician*, 86(7), 631-639.
- Recknagel P**, Claus RA, Neugebauer U, Bauer M, Gonnert FA. **2012**. In vivo imaging of hepatic excretory function in the rat by fluorescence microscopy. *J Biophotonics*. Jul;5(7):571-81. doi: 10.1002/jbio.201100118.
- Recknagel P**, Gonnert FA, Westermann M, Lambeck S, Lupp A, Rudiger A, Dyson A, Carré JE, Kortgen A, Krafft C, Popp J, Sponholz C, Fuhrmann V, Hilger I, Claus RA, Riedemann NC, Wetzker R, Singer M, Trauner M, Bauer M. **2012**. Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis. *PLoS Med.*, 9(11):e1001338.
- Reinhart K**, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. **2002**. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Crit Care Med* May; 30(5):S302-S312.
- Rivers E**, Nguyen B, Havsta, S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Tomlanovich M. **2001**. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *New England Journal of Medicine*, 345(19), 1368-1377.
- Riegelman S**, Loo JCK, Rowland M. **1968**. Shortcomings in pharmacokinetic analysis by conceiving the body to exhibit properties of a single compartment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57(1), 117-123.
- Rockey DC**. **2005**. Gastrointestinal bleeding. *Gastroenterology Clinics*, 34(4), 581-588.
- Sakka SG**, Reinhart K, Meier-Hellmann A. **2002**. Prognostic value of the indocyanine green plasma disappearance rate in critically ill patients. *Chest* 122:1715-1720.
- Sakka SG**. **2007**. Assessing liver function. *Curr Opin Crit Care*. Apr;13(2):207-14.
- Satran R, Almog Y**. **2003**. The coagulopathy of sepsis: pathophysiology and management. *IMAJ-RAMAT GAN-*, 5(7), 516-520.

- Scarfe L**, Rak-Raszewska A, Geraci S, Darssan D, Sharkey J, Huang J, Burton NC, Mason D, Ranjzad P, Kenny S, Gretz N, Lévy R, Park BK, García-Fiñana M, Woolf AS, Murray P, Wilm B. **2015**. Measures of kidney function by minimally invasive techniques correlate with histological glomerular damage in SCID mice with adriamycin-induced nephropathy. *Scientific reports*, 5, 13601.
- Scheiermann C**, Kunisaki Y, Frenette PS. **2013**. Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol*. Mar;13(3):190-8. doi: 10.1038/nri3386.
- Schmaderer C**, Lutz J, Stangl M, Hemann U. **2005**. Ischämie-/Reperfusionsschaden nach Nierentransplantation. *Transplantlink*, 2005(10):15-25.
- Schmid C**, Ghirlanda-Keller C, Zwimpfer C, Zoidis E. **2012**. Triiodothyronine stimulates cystatin C production in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 419:425-430.
- Singer M**, Deutschman CS, Seymour C, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M., Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. **2016**. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) *JAMA*. 2016;315(8):801–810. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- Smith AM**, Mancini MC, Nie S. **2009**. Bioimaging: second window for in vivo imaging. *Nature nanotechnology*, 4(11), 710–711. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.326>.
- Sommerfeld O**, Medyukhina A, Neugebauer S, Ghait M, Ulferts S, Lupp A, König R, Wetzker R, Schulz S, Figge MT, Bauer M, Press AT. **2020**. Targeting Complement C5a Receptor 1 for the Treatment of Immunosuppression in Sepsis. *Mol Ther Sep 5:S1525-0016(20)30465-2*. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.09.008.
- Srisawat N**, Sileanu FE, Murugan R, Bellomod R, Calzavacca P, Cartin-Ceba R, Cruz D, Finn J, Hoste EE, Kashani K, Ronco C, Webb S, Kellum JA. **2015**. Variation in risk and mortality of acute kidney injury in critically ill patients: a multicenter study *Am J Nephrol.*, 41(1):81-8.
- Steinbach S**, Krolop N, Strommer S, Herrera-Pérez Z, Geraci S, Friedemann J, Gretz N, Neiger R. **2014**. A pilot study to assess the feasibility of transcutaneous glomerular filtration rate measurement using fluorescence-labelled sinistrin in dogs and cats. *PLoS One*. Nov 25;9(11):e111734. doi: 10.1371/journal.pone.0111734.
- Steiner S**, Noe J, Denne S. **2011**. Corticosteroids Increase Protein Breakdown and Loss in Newly Diagnosed Pediatric Crohn Disease. *Pediatr Res* 70, 484–488. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31822f5886>.
- Stenberg A**, Bohman SO, Morsing P, Müller-Suur C, Olsen L, Persson AE. **1988**. Back-leak of pelvic urine to the bloodstream. *Acta Physiol Scand*. Oct;134(2):223-34.
- Stevens LA, Levey AS. 2009**. Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. *Journal of the American society of nephrology*, 20(11), 2305-2313.
- Strnad P**, Tacke F, Koch A, Trautwein Ch. **2017**. Liver — guardian, modifier and target of sepsis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* volume 14, pages 55–66.
- Takasu O**, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, Bhayan SB. **2013**. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187(5), 509-517.
- Trauner M**, Fickert P, Stauber RE. **1999**. Inflammation- induced cholestasis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 14(10), 946-959.

Traynor J, Mactier R, Geddes CC, Fox JG. 2006. How to measure renal function in clinical practice. *BMJ*; 333 :733.

Trzeciak S, Rivers EP. 2005. Clinical manifestations of disordered microcirculatory perfusion in severe sepsis. *Critical Care*, 9(4), S20.

Ullah S, Ahmad I, Alias Y, Yusoff I, Aqeel Ashraf M. 2013. Characterization of Triphenylamino-Based Polymethine Dyes. *Journal of Chemistry Vol. 2013*, Article ID 136908, 5 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/136908>.

Van Biesen W, Vanholder R, Lameire N. 2006. Defining acute renal failure: RIFLE and beyond. *Clin J Am Soc Nephrol*. Nov;1(6):1314-9.

van der Flier M, van Leeuwen HJ, van Kessel KP; Kimpen JL, Hoepelman A, Geelen SP. 2005. Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. *Shock*: Jan; 23(1):35-38.

Vincent JL, Angus DC, Artigas A., Kalil A., Basson BR, Jamal HH, Bernard GR. 2003. Effects of drotrecogin alfa (activated) on organ dysfunction in the PROWESS trial. *Critical care medicine*, 31(3), 834-840.

Wang H, Ma S. 2008. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Emerg Med.*, 26(6):711-5.

Waseem N, Chen PH. 2016. Hypoxic Hepatitis: A Review and Clinical Update. *J Clin Transl Hepatol*. Sep 28; 4(3): 263–268.

Wolfert AI, Oken DE. 1989. Glomerular hemodynamics in established glycerol-induced acute renal failure in the rat. *J Clin Invest*. Dec;84(6):1967-73.

Yu M, Liu J, Ning X, Zheng J. 2015. High-contrast Noninvasive Imaging of Kidney Clearance Kinetics Enabled by Renal Clearable Nanofluorophores. *Angew Chem Int Ed Engl*. Dec 14;54(51):15434-8. doi: 10.1002/anie.201507868.

Zhai JL, Ge N, Zhen Y, Zhao Q, Liu C. 2016. Corticosteroids Significantly Increase Serum Cystatin C Concentration without Affecting Renal Function in Symptomatic Heart Failure. *Clin Lab*. 62(1-2):203-7.

www.MedicalGraphics.de, Lizenz CC BY-ND 4.0 DE.

<https://dyomics.com/en/products/far-red-excitation/dy-680.html> (14.01.2020).

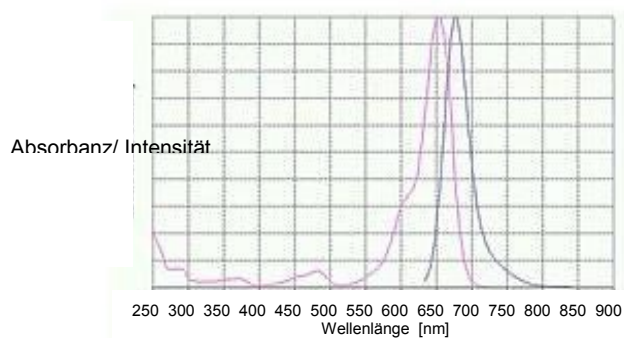
<https://dyomics.com/en/products/nir-excitation/dy-778.html> (14.01.2020).

<https://dyomics.com/en/products/nir-excitation/dy-780.html> (14.01.2020).

<https://dyomics.com/en/products/red-excitation/dy-654.html> (14.01.2020).

Anhang

- I. *Exzitationsmaximum (Ex_{max}) und Emissionsmaximum (Em_{max}) in Ethanol sowie organspezifische Ausscheidung (Organspezifität) der verwendeten Farbstoffe*

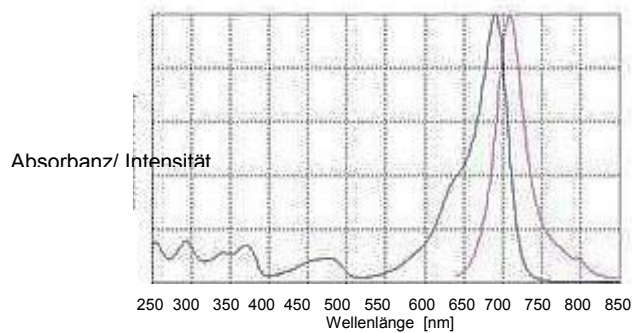


Farbstoffname DY-654

Ex_{max} 653 nm

Em_{max} 677 nm

Organspezifität Niere

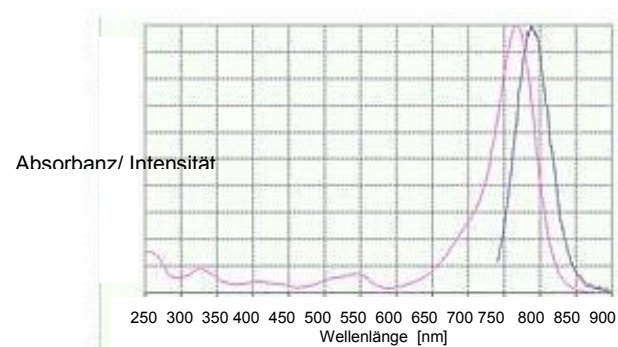


Farbstoffname DY-680

Ex_{max} 690 nm

Em_{max} 709 nm

Organspezifität Leber

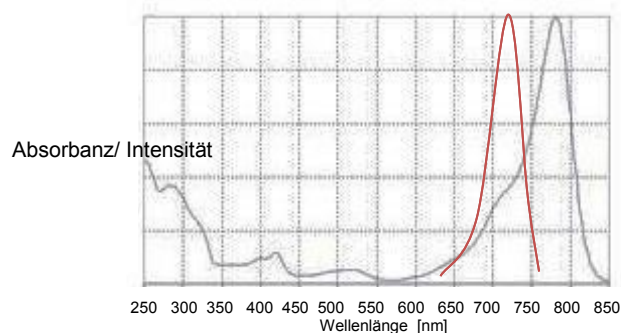


Farbstoffname DY-778

Ex_{max} 767 nm

Em_{max} 787 nm

Organspezifität Niere



Farbstoffname DY-780

Ex_{max} 782 nm

Em_{max} 800 nm

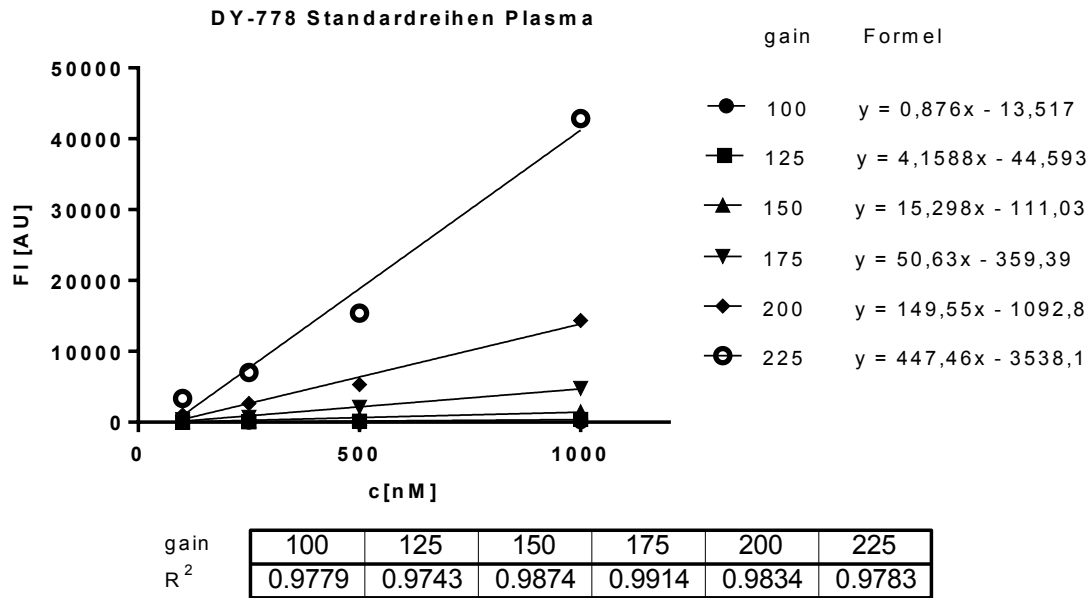
Organspezifität Leber

(Verändert nach <https://dyomics.com/en/products/>)

II. Bsp. Standardreihe - Farbstoffpaar DY-680+DY-778

DY-778		gain					
Plasma	c[nM]	100	125	150	175	200	225
	1000	77	387	1460	4777	14343	42838
	500	25	133	571	2084	5302	15401
	250	5	46	245	701	2650	7026
	100	1	25	110	367	1001	3363
Galle	c[nM]	100	125	150	175	200	225
	100	15	78	302	996	2966	6873
	50	7	44	150	325	1294	
	25	4	33	102	252	804	2165
	10		7	25	90	372	913
Urin	c[nM]	100	125	150	175	200	225
	100	12	65	190	806	2062	5873
	50	8	24	108	565	1236	3129
	25	4	17	63	205	713	1432
	10		8	32	131	398	819

Bsp. einer graphischen Darstellung mit Regressionsgeraden:



III. Gemessene Konzentrationen der Farbstoffe im Plasma: Bsp. c(DY-780) [nM],
gain 200

Zeit [min]	Kontrolle					IR Niere			
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1					1310,0				
2			116,3	351,7	835,1	1255,8	1736,9	1583,2	771,7
4			42,1	335,4	590,1	1902,5	2460,9	1570,4	2500,1
6	86,4	37,1	46,9	177,3	297,3	1236,6	1736,5	1108,9	1956,7
8			31,4	91,4	125,6	1054,7	1299,3	871,2	1547,3
10	36,4	28,0	24,4	67,4	101,7	864,8	715,4	614,2	1297,2
15	16,6	12,2	15,4	39,5	49,9	717,9	1041,1	394,4	674,0
20	16,2	7,5	14,4	12,8		543,8	804,2	227,4	412,3
25	13,7	11,2	10,4	11,5		405,5	395,6	145,5	481,0
30	10,1	11,2	6,4	15,4			770,4	71,2	227,0
35	8,5	12,5	10,2	13,3				114,3	231,7
40	11,7		3,9	11,3				106,2	204,8
45	6,2		5,4	9,4				96,8	

Zeit [min]	PCI gesamt							I/R Leber		
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1										
2				986,8	1347,6	1829,8	1448,8	988,0	398,7	2341,2
4				777,2	1096,8	2553,2	1511,2	1064,5	559,9	2050,7
6	386,3	128,9	5084,3	449,7	715,4	2097,7	1129,7	682,3	331,6	1520,2
8				226,9	535,8	2144,1	924,7	540,1	296,0	1016,0
10	282,0	82,5	4183,3	96,2	357,0	1675,5	829,1	325,0	125,6	803,0
15	185,5	33,1	2818,4	137,5	213,7	1361,2	747,1	307,8	109,6	649,9
20	103,3	18,4	2371,1	90,9	208,4	1205,1	583,4	273,5	47,4	632,7
25	97,0	20,0	2705,6	55,5	119,3	1099,7	583,8	232,0	39,2	289,4
30	72,7	8,2	2097,7	58,8	161,6	964,9	523,9	244,0	28,2	510,5
35	56,0	3,8	2093,8	35,4	120,3	888,7	400,9	260,2	20,1	174,5
40	65,2	8,2		40,2		749,6	401,8	199,3	29,6	426,7
45	37,3	8,7		30,3		805,8	369,3	132,8	27,7	199,3

Zeit [min]	Glycerol				PCI schwere Schädigung			PCI leichte Schädigung		
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1	285,0	880,7	1319,9	1100,7						
2	259,5	862,0	1116,7	865,2		1829,8	1448,8			1347,6
4	166,5	561,4	1088,8	616,7		2553,2	1511,2			1096,8
6	99,7	277,4	604,0	348,7	5084,3	2097,7	1129,7	386,3	128,9	715,4
8	57,7	181,4	551,5	235,2		2144,1	924,7			535,8
10	34,9	153,6	389,0	150,7	4183,3	1675,5	829,1	282,0	82,5	357,0
15	29,7	77,0	259,5	67,6	2818,4	1361,2	747,1	185,5	33,1	213,7
20	19,1	66,0	190,3	56,4	2371,1	1205,1	583,4	103,3	18,4	208,4
25	15,2	34,5		48,7	2705,6	1099,7	583,8	97,0	20,0	119,3
30	13,5	32,1	143,7	48,1	2097,7	964,9	523,9	72,7	8,2	161,6
35	5,6	29,6			2093,8	888,7	400,9	56,0	3,8	120,3
40		27,1		35,0		749,6	401,8	65,2	8,2	
45	10,5	23,2		35,9		805,8	369,3	37,3	8,7	

IV. *Mittlung der Daten zum Erstellen einer beschreibenden Potenzfunktion, am Bsp. PCI-Gruppe, c(DY-780) im Plasma*

Zeit [min]	c [nM]						
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1							
2				986,79	1347,58	1829,84	1448,80
4				777,24	1096,76	2553,18	1511,20
6	386,27	128,92	5084,25	449,69	715,42	2097,69	1129,69
8				226,94	535,80	2144,08	924,71
10	282,03	82,49	4183,26	96,20	357,01	1675,49	829,12
15	185,50	33,09	2818,38	137,47	213,69	1361,19	747,05
20	103,34	18,37	2371,13	90,92	208,36	1205,08	583,44
25	97,03	19,95	2705,56	55,46	119,25	1099,66	583,80
30	72,68	8,21	2097,66	58,77	161,60	964,94	523,89
35	56,04	3,83	2093,81	35,42	120,28	888,72	400,87
40	65,15	8,21		40,23		749,64	401,80
45	37,29	8,74		30,34		805,82	369,33

Pro Versuchstier wurden die Messwerte zu den Zeitpunkten, bei denen von allen Versuchstieren Messwerte vorliegen (grün markiert; $t_{6\text{min}}$; $t_{10\text{min}}$ bis $t_{35\text{min}}$), aufsummiert:

Σ	1182,89	294,87	21354,05	923,93	1895,60	9292,77	4797,86
----------	---------	--------	----------	--------	---------	---------	---------

Anschließend wurden alle Messwerte durch diese jeweilige Teilsumme dividiert:

Zeit [min]							
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1							
2				1,068	0,711	0,197	0,302
4				0,841	0,579	0,275	0,315
6	0,327	0,437	0,238	0,487	0,377	0,226	0,235
8				0,246	0,283	0,231	0,193
10	0,238	0,280	0,196	0,104	0,188	0,180	0,173
15	0,157	0,112	0,132	0,149	0,113	0,146	0,156
20	0,087	0,062	0,111	0,098	0,110	0,130	0,122
25	0,082	0,068	0,127	0,060	0,063	0,118	0,122
30	0,061	0,028	0,098	0,064	0,085	0,104	0,109
35	0,047	0,013	0,098	0,038	0,063	0,096	0,084
40	0,055	0,028		0,044		0,081	0,084
45	0,032	0,030		0,033		0,087	0,077

Aus diesen Werten wurde nun zu jedem Zeitpunkt der Mittelwert gebildet. Dieser erhaltene Wert wurde nun mit dem Mittelwert der Teilsummen multipliziert. Dabei ändert sich der individuelle Kurvenverlauf nicht, da jeder Wert einer Messung durch die gleiche Zahl geteilt und mit der gleichen Zahl multipliziert wird, aber die Daten wurden dadurch in einen ähnlichen Bereich normiert. Zudem wurde es dadurch ermöglicht, einen gemittelten Kurvenverlauf herzustellen, der nicht durch fehlende Messdaten verfälscht ist – durch die großen Unterschiede in den Konzentrationsbereichen kommt es ansonsten zu nicht repräsentativen Werten (s. z. B. folgende Tabelle, Schwarze Spalte, Zeitpunkte $t_{4\text{min}}$ und $t_{8\text{min}}$)

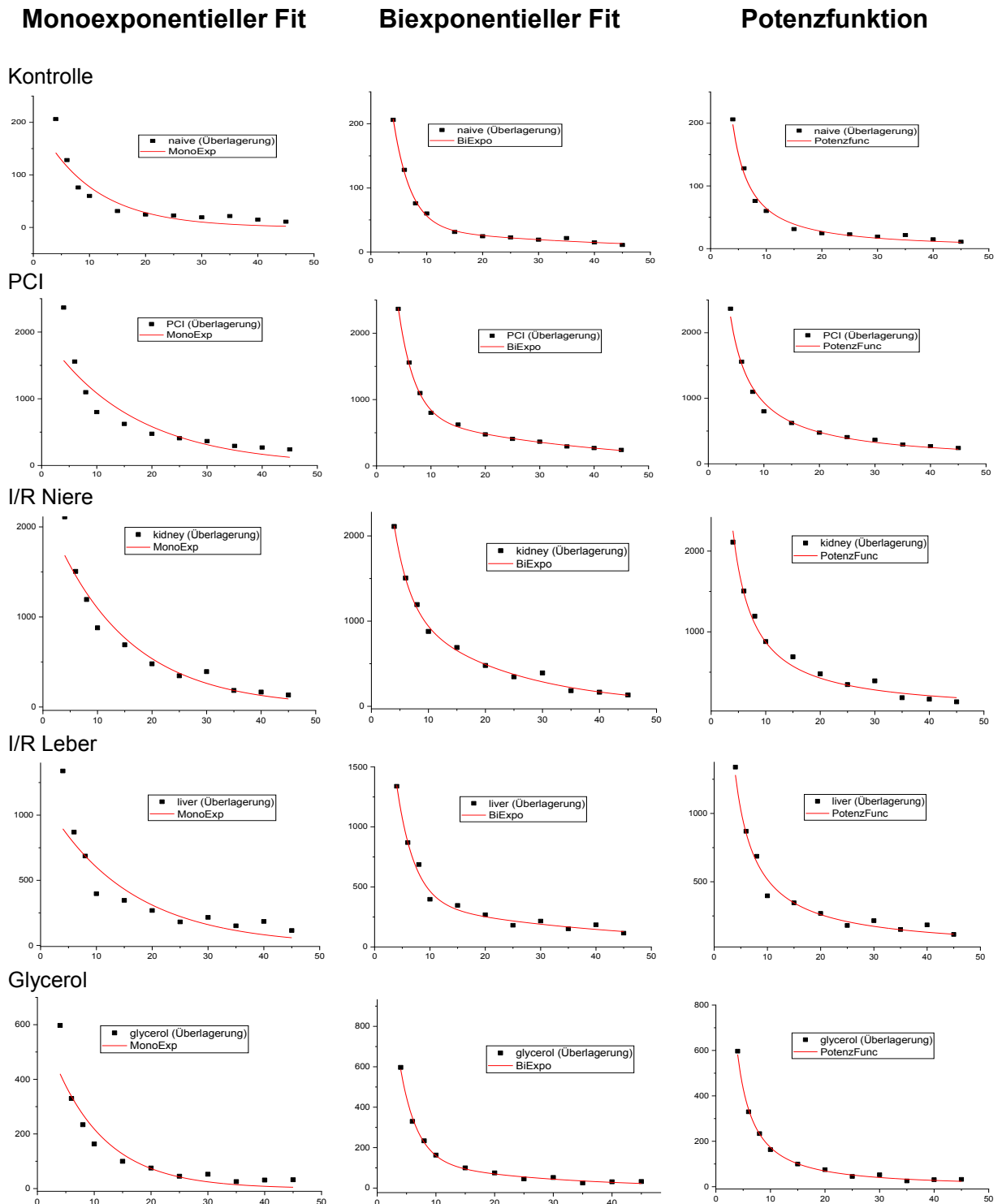
Die folgende Tabelle zeigt in Schwarz die Mittelwerte ohne Normierung und in Grün die normierten Mittelwerte

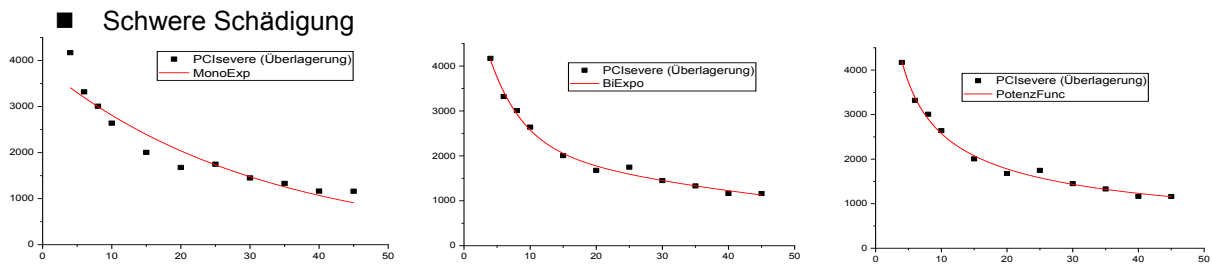
Zeit [min]	Mittelwerte	Mittelwerte normiert
0	0,00	0,00
1		
2	1403,25	3233,02
4	1484,60	2852,25
6	1427,42	1887,46
8	957,88	1350,86
10	1072,23	1102,76
15	785,20	782,45
20	654,38	584,22
25	668,67	518,54
30	555,39	445,61
35	514,14	356,38
40	253,01	330,30
45	250,31	292,61

V. Mathematische Beschreibung der PDR

Folgende Aufstellung zeigt graphisch die überlagerten Messwerte der einzelnen Gruppen, welche mit den verschiedenen Funktionen gefittet wurden:

Fit der Überlagerten Kurven mit ORIGIN – Vergleich der Kurvenverläufe für monoexponentiellen und biexponentiellen Ansatz sowie einer Potenzfunktion





Das reduzierte Chi-Quadrat gibt an, wie gut eine gefittete Funktion zu den Messwerten passt. Hier zeigt sich, dass biexponentielle Funktion und Potenzfunktion geeignet sind. Eine monoexponentielle Funktion (entsprechend der Kinetik eines Ein-Kompartmet-Modells) ist weniger geeignet.

Chi²red-Werte der überlagerten Kurven und korrigiertes R²

	Monoexpon. Fkt.		Biexpon. Fkt.		Potenzfunkt.	
	Chi ² red	Korr. R ²	Chi ² red	Korr. R ²	Chi ² red	Korr. R ²
Kontrolle	7,89	0,757	0,32	0,990	0,94	0,971
PCI gesamt	65,42	0,803	0,93	0,997	4,59	0,986
Schwere Schädigung	41,46	0,890	4,56	0,988	3,93	0,986
Leichte Schädigung	14,20	0,899	0,41	0,997	0,74	0,995
I/R Niere	25,46	0,939	6,56	0,985	13,58	0,968
I/R Leber	44,95	0,771	6,62	0,966	7,72	0,961
Glycerol	16,03	0,843	1,79	0,982	1,14	0,989

Anhand der Werte des korrigierten R-Quadrates ist ersichtlich, wie weit die Messwerte von der gefitteten Kurve abweichen. Auch hier ist zu sehen, dass die Messwerte nahe an den gefitteten biexponentiellen Funktionen und Potenzfunktionen liegen.

VI. Messwerte der Fluoreszenzintensität mittels IVM

- I/R Leber (Fluoreszenzintensität in [AU])

Zeit [min]	PCI			I/R Leber		Zeit [min]	Kontrolle		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0	0,000	0,000	0,000
2	0,323	0,286	0,385	0,965	0,993	2,5	0,298	0,521	0,209
4	0,854	0,777	0,748	0,967	0,993	5	0,943	0,962	0,992
6	1,000	0,993	0,973	0,967	0,992	7,5	1,000	1,000	1,000
8	1,000		1,000	0,970	0,993	10	0,967	0,954	0,872
10	0,996	1,000	0,974	0,977	0,995	12,5	0,868	0,908	0,703
12	0,917	0,985	0,937	0,982	0,993	15	0,779	0,893	0,630
14	0,877	0,979	0,922	0,984	0,993	17,5	0,696	0,835	0,528
16	0,859	1,036	0,895	0,985	0,992	20	0,602	0,778	0,447
18	0,824	1,045	0,867	0,986	0,992	22,5	0,531	0,716	0,381
20	0,805	0,939	0,839	0,986	0,993	25	0,459	0,633	0,330
22	0,773	0,919	0,822	0,985	0,993	27,5	0,446	0,572	0,292
24	0,697	0,880	0,795	0,986	0,993	30	0,409	0,534	0,263
26	0,724	0,849	0,763	0,986	0,993	32,5	0,383	0,490	0,216
28	0,694	0,821	0,749	0,986	0,993	35	0,359	0,443	0,222
30	0,664	0,777	0,743	0,987	0,993	37,5	0,341	0,459	0,197
32	0,645	0,759	0,725	0,989	0,992	40	0,318	0,424	0,198
34	0,613	0,810	0,699	0,990	0,992	42,5	0,295	0,393	0,189
36	0,585	0,791	0,665	0,990	0,992	45	0,273	0,368	0,181
38	0,567	0,785	0,673	0,990	0,992	47,5	0,245	0,354	0,175
40	0,530	0,807	0,672	0,992	0,993	50	0,221	0,334	0,162
42	0,487	0,819	0,650	0,993	0,994				
44	0,445	0,797	0,627	0,994	0,995				
46	0,452	0,782	0,578	0,993	0,996				
48	0,445	0,764	0,543	0,992	0,996				
50	0,415	0,756	0,529	0,995	0,996				
52	0,442	0,737	0,506	1,000					
54	0,435	0,727	0,494	0,998	0,997				
56	0,410	0,708	0,502	0,992	0,997				
58	0,394	0,689	0,516	0,997	0,999				
60	0,384	0,669	0,504	0,998	0,998				
62	0,376	0,673	0,492	0,998	0,998				
64	0,377	0,673	0,487	0,996	1,000				

- IVM Niere: Varianz der Fluoreszenzintensität

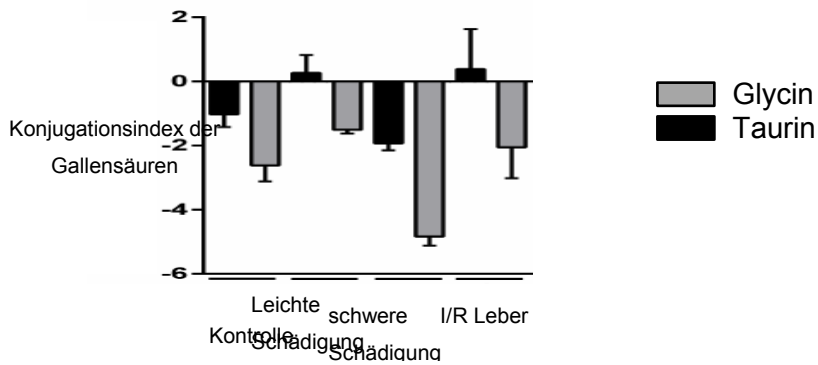
Kontrolle	7,30	5,67			6,71		10,89	10,61	7,57	5,03	7,50
I/R Niere	8,52	7,91	13,92	7,57	11,90	13,49	6,83	10,43	14,88		19,05
Kontrolle	6,52	4,92	7,99	2,15	2,48	2,53	2,54	2,24	3,21	4,21	7,83
I/R Niere	11,10	8,99	8,08	19,91	16,99	9,18	6,53	11,71	11,64	10,66	
Kontrolle	1,98	2,26	2,42	1,95	2,45	2,15	7,72	7,40	5,49	10,60	5,74
I/R Niere	7,10	13,47	13,13	9,37	10,76	14,78	7,87	7,52	10,13	17,30	17,94

VII. Messwerte klinische Verlaufsparemeter/ Biomarker

	γ GT (U L ⁻¹)				Bilirubin (μ mol L ⁻¹)				ASAT (U L ⁻¹)			
Kontrolle	2	4	2	1	3	3	8	8	62	111	63	132
PCI (schwer)	21	24	5		13	7	11		617	479	707	
PCI (mild)	14	5	13		9	3	12		116	82	167	
Niere I/R	6	3	3	7	6	10	12	8	57	22	48	22
Leber I/R	5	4	4		7	11	5		195	221	51	
Glycerol		5,4	10,8	6	7	6	7	7	103,56	140,64	88,5	95,82

	ALAT (U L ⁻¹)				Harnstoff (mg dL ⁻¹)				Kreatinin (μ mol mL ⁻¹)			
Kontrolle	31	78	32	70	27	24	32	26	90	55	77	81
PCI (schwer)	114	446	384		42	23	26		146	47	52	
PCI (mild)	41	45	33		30	25	25		74	42	87	
Niere I/R	155	51	160	171	20	10	28	40	36	39	35	50
Leber I/R	317	320	110		25	25	14		43	34	52	
Glycerol	17,52	16,44	13,20	20,64	42,50	59,90	59,30	41,80	78	439	316	179

VIII. Konjugationsindex der Gallensäuren aus Plasmaproben



A] Danksagung

Für die Unterstützung zur Anfertigung meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei folgenden Personen bedanken:

Apl. Prof. Ralf Claus hat die Betreuung meiner Doktorarbeit übernommen, mir als Leiter des Labors deren Thema vermittelt und meine Bewerbung für ein Stipendium unterstützt. Er half mir, bei auftretenden Problemen eine Lösung zu finden, wies mich auf wichtige inhaltliche Aspekte hin und engagierte sich für die Fertigstellung der Dissertation. Für das entgegengebrachte Vertrauen möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Bei Prof. Andreas Stallmach bedanke ich mich für die Vermittlung eines pathophysiologischen Verständnisses und für Impulse hinsichtlich Auswertungsstrategien, die mir im Rahmen seiner Zweitbetreuung zuteilwurden.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Adrian Press, der mich in den Versuchstechniken anleitete, mit mir gemeinsam Versuche durchführte und Ergebnisse diskutierte. Sowohl methodische Fertigkeiten als auch themenrelevantes Wissen habe ich durch seine Unterstützung erlangt.

Zudem bedanke ich mich bei Prof. Michael Bauer für Korrekturvorschläge beim Erstellen der Dissertationsschrift und Koordination der Betreuung.

Auch Prof. Peter Schlattmann sei für das Erklären statistischer Auswertungsstrategien gedankt.

Dem Center for Sepsis Control and Care unter der Leitung von Prof. Michael Bauer möchte ich für die Vergabe eines Stipendiums über zwei Semester zum Anfertigen einer medizinischen Doktorarbeit danken.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Motivation und Wertschätzung meiner Arbeit; insbesondere meinem Vater für sein Engagement bei der Diskussion physiologisch-mathematischer Probleme. Für die gewissenhafte Überprüfung der Arbeit auf formale, grammatikalische und logische Aspekte bedanke ich mich bei meiner Mutter und Fridtjof Harder.

Allen nicht namentlich erwähnten LaborassistentInnen, DoktorandInnen und studentischen MitarbeiterInnen der experimentellen Anästhesie des Universitätsklinikums Jena sei für den bereichernden fachlichen Austausch und die Unterstützung bei Versuchsdurchführungen gedankt.

B] Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: SOFA (Sepsis-related organ failure assessment)-score.</i>	6
<i>Tabelle 2: KDIGO-Leitlinien zur Stadieneinteilung des akuten Nierenversagens.</i>	8
<i>Tabelle 3: Vergleich neuer Biomarker der Nierenfunktion.</i>	9
<i>Tabelle 4: Einteilung und Informationsgehalt gebräuchlicher Leberfunktionstests.</i>	14
<i>Tabelle 5: Einstellungen der Kanäle bei epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.</i>	32
<i>Tabelle 6: verwendete Wellenlängen der fluorimetrischen Messungen.</i>	34
<i>Tabelle 7: Farbstoffpaare zur simultanen Erfassung der Leber und Nierenfunktion.</i>	36
<i>Tabelle 8: Einteilung der PCI-Tiere nach Schweregraden.</i>	39
<i>Tabelle 9: Exponent α zum Vergleich der PDR(DY-780).</i>	61
<i>Tabelle 10: Exponent α zum Vergleich der PDR(DY-654).</i>	61

C] Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Klinische Auswirkungen des akuten Leberversagens</i>	3
<i>Abbildung 2: Bestimmung der GFR.</i>	11
<i>Abbildung 3: Biphasischer Verlauf der Plasmaverschwinderate.</i>	15
<i>Abbildung 4: Extinktionskoeffizienten der Blutbestandteile.</i>	17
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.</i>	20
<i>Abbildung 6: Versuchsablauf PCI-Induktion.</i>	25
<i>Abbildung 7: Versuchsablauf Ischämie-Reperfusion-Modell.</i>	26
<i>Abbildung 8: Makroskopische Unterteilung der Rattenleber.</i>	27
<i>Abbildung 9: Versuchsablauf Glycerolinjektion.</i>	28
<i>Abbildung 10: Versuchsablauf PDR-Messung.</i>	30
<i>Abbildung 11: DY-654 in der Harnblase eines Kontrolltiers nach Versuchsende.</i>	31
<i>Abbildung 12: Plasmaverschwinderaten in gesunden und septischen Wistar-Ratten.</i>	37
<i>Abbildung 13: PDR (DY780) in PCI- und Kontrollgruppe.</i>	38
<i>Abbildung 14: Biomarker der hepatischen Schädigung im Sepsismodell.</i>	40
<i>Abbildung 15: Repräsentative Darstellung der DY-780-Konzentrationen in Plasma und Galle.</i>	41
<i>Abbildung 16: DY-780 in der Leber bei PCI-induzierter Sepsis.</i>	42
<i>Abbildung 17: Nierenfunktionsmessung bei PCI.</i>	44
<i>Abbildung 18: Leberfunktionsmessung nach I/R Leber.</i>	45
<i>Abbildung 19: DY-780 in der Leber bei I/R Leber.</i>	47
<i>Abbildung 20: Nierenfunktionsmessung bei I/R-Leber.</i>	48
<i>Abbildung 21: Leberfunktionsmessung nach I/R Niere.</i>	49
<i>Abbildung 22: Nierenfunktionsmessung bei I/R Niere.</i>	50
<i>Abbildung 23: Intravitalmikroskopie der FI(DY-654) im Nierenparenchym.</i>	51
<i>Abbildung 24: Leberfunktionsmessung nach Glycerolinjektion.</i>	52
<i>Abbildung 25: Nierenfunktionsmessung bei Glycerolinjektion.</i>	53
<i>Abbildung 26: DY-654 in der Niere nach Glycerolinjektion.</i>	54
<i>Abbildung 27: Inflammatorische Mediatoren erhöhen die Permeabilität des Endothels.</i>	67
<i>Abbildung 28: Pathophysiologische Prozesse bei Ischämie führen zur Gewebeschädigung.</i>	69
<i>Abbildung 29: DY-654 Verteilung in Mäusenieren.</i>	73
<i>Abbildung 30: Intrarenale Kinetik von DY-654 und P1-DY-654.</i>	74

D] Lebenslauf

In der elektronischen Version nicht verfügbar

E] Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

apl. Prof. Ralf Claus, Universität Jena

Prof. Michael Bauer, Universität Jena

Dr. Adrian Press, Universität Jena

Prof. Andreas Stallmach, Universität Jena

Prof. Eckhard Schulz, Hochschule Schmalkalden

Prof. Peter Schlattmann, Universität Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum Unterschrift des Verfassers