

**Auswirkung physischen Trainings auf  
Mortalität, Morbidität und Organschäden  
während einer schweren polymikrobiellen  
Sepsis bei Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Carolin Pflug**

geboren am 16.04.1990 in Jena

## **Gutachter**

1. apl. Prof. Dr. Ralf A. Claus, Universitätsklinikum Jena
2. apl. Prof. Dr. Reinhard Bauer, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Matthias Steinert, Universitätsklinikum Leipzig

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.02.2022**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Effekt von physischem Training auf Morbidität und Mortalität.....	1
1.2 Der Effekt von physischem Training auf Infektionserkrankungen .....	2
1.3 Die Sepsis - ein schwerwiegendes Krankheitsbild .....	3
1.4 Pathophysiologische Vorgänge bei physischem Training und Sepsis – Gemeinsamkeiten und Unterschiede .....	5
1.5 Effekte des physischen Trainings auf die Immunreaktion des Körpers .....	17
1.6 Organdysfunktion als Folge der Immunreaktion im Verlauf der Sepsis .....	25
<b>2 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>31</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.1 Chemikalien.....	33
3.2 Kits .....	36
3.3 Lösungen.....	38
3.4 Geräte, Software und sonstige Materialien.....	39
3.5 Versuchstiere.....	42
3.6 Trainingsprogramm .....	42
3.7 Studiendesign, Sepsisinduktion, Organentnahme .....	44
3.8 Krankheitsschwerescore (Clinical Severity Score) .....	45
3.9 Blutbild-Bestimmung.....	45
3.10 Klinische-Chemie-Messung.....	46
3.11 Genexpressionsanalysen .....	46
3.11.1 RNA-Isolierung aus Gewebe.....	46
3.11.2 Spektralphotometrische RNA-Konzentrationsbestimmung .....	47

3.11.3	RNA-Qualitätskontrolle .....	47
3.11.4	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription .....	49
3.11.5	Quantitative Real-time PCR .....	50
3.11.6	DNA-Aufreinigung .....	52
3.11.7	Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	52
3.11.8	Spektralphotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung .....	53
3.11.9	Effizienzbestimmung und Auswahl des Housekeeping-Gens .....	53
3.11.10	relative Quantifizierung der RT-PCR-Daten .....	54
3.12	Bestimmung der Proteinmenge .....	55
3.12.1	Probenvorbereitung für MAO-A.....	55
3.12.2	Probenvorbereitung für Hif-1alpha und HSP70.....	56
3.12.3	Quantitative Proteinbestimmung .....	56
3.12.4	SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)...	57
3.12.5	Westernblot.....	58
3.12.6	Immundetektion .....	59
3.12.7	Auswertung der Westernblot-Aufnahmen .....	61
3.13	Bestimmung der bakteriellen Keimlast .....	61
3.14	Bestimmung der Zytokinkonzentrationen .....	62
3.15	Histologie.....	63
3.15.1	Probenvorbereitung .....	63
3.15.2	HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und Auswertung.....	63
3.15.3	PAS-Reaktion (Perjodsäure-Schiff-Reaktion) und Auswertung.....	64
3.16	Statistische Auswertung .....	65
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>66</b>
4.1	Körpergewicht und relatives Herzgewicht.....	66
4.2	Überlebensanalyse und Clinical Severity Score .....	66
4.3	Blutbild.....	69
4.4	Zytokinkonzentrationen .....	71

4.5	Bakterielle Keimlast .....	73
4.6	Organspezifische Unterschiede.....	75
4.6.1	Leber.....	75
4.6.1.1	Klinische Chemie.....	75
4.6.1.2	Histologie - HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) .....	77
4.6.2	Niere .....	81
4.6.2.1	Klinische Chemie.....	81
4.6.2.2	Histologie – PAS-Färbung .....	83
4.6.2.3	Genexpression von HSP70, MAO-A und Hif-1 $\alpha$ .....	86
4.6.2.4	Proteinmenge von HSP70, MAO-A und Hif-1 $\alpha$ .....	88
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>92</b>
5.1	Überblick .....	92
5.2	Studiendesign.....	92
5.3	Regelmäßiges physisches Training moduliert das Körper- und Herzgewicht.....	94
5.4	Regelmäßiges physisches Training reduziert Mortalität und Krankheitsschwere der Sepsis .....	96
5.5	Regelmäßiges physisches Training moduliert Leukozyten- und Thrombozytenanzahl.....	98
5.6	Der Anstieg von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im Verlauf der Sepsis wird durch regelmäßiges physisches Training reduziert.....	101
5.7	Regelmäßiges physisches Training moduliert die bakterielle Keimlast im Verlauf der Sepsis .....	107
5.8	Laborchemische und histologische Zeichen der sepsisassoziierten Leberschädigung.....	111
5.9	Regelmäßiges physisches Training schützt vor sepsisassoziierten Nierenschäden .....	115
<b>6</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick .....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>127</b>

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>149</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>150</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>151</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>152</b>
<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>153</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A <sub>260</sub>	Absorbanz bei einer Wellenlänge von 260 nm
A <sub>280</sub>	Absorbanz bei einer Wellenlänge von 280 nm
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Act $\beta$	Beta-Aktin
ADAMTS-13	<i>a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs, member 13</i>
ALAT	Alanin-Aminotransferase
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
Aqua tridest.	Aqua tridestillata
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CARS	<i>Compensatory Antiinflammatory Response Syndrome</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
cDNA	codogene Desoxyribonukleinsäure
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
CO	Kohlenmonoxid
CRP	C-reaktives Protein

CSS	<i>Clinical Severity Score</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAMP	<i>Danger associated molecular patterns</i>
DEPC	Diethylidcarbonat
DIC	<i>Disseminated intravascular coagulation</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	<i>Diagnosis Related Groups</i>
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
fw	<i>Forward</i>
G	Gauge
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
gpt	Giga-Partikel
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HI	hohe Intensität
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$
Hmbs	Hydroxymethylbilan-Synthase
HMGB-1	<i>High mobility group box-1</i>
HO	Hydroxyl-Radikal
Hprt1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1



HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IL	Interleukin
IL-1Ra	IL-1 Rezeptorantagonist
KBE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilo-Dalton
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAO-A	Monoaminoxidase A
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
n	Anzahl
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalzlösung
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NI	niedrige Intensität
NLR	<i>Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Hyperoxid-Anion
PAI-1	<i>Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PAS	Perjodsäure-Schiff

PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCI	<i>Peritoneal contamination and infection</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyde
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RQI	RNA-Qualitäts-Indikator
rv	<i>Reverse</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
sTNFR	<i>Soluble TNF receptor</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TF	<i>Tissue factor</i>
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

## Zusammenfassung

Regelmäßiges physisches Training hat eine Vielzahl positiver Effekte auf die Gesundheit und ist unter anderem mit einer Reduktion der Inzidenz, der Symptomatik und der Mortalität verschiedener Erkrankungen assoziiert. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass physische Aktivität Einfluss auf den Entzündungsstatus des Körpers hat und die inflammatorische Reaktion auf verschiedene Stressoren moduliert. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von regelmäßigem physischem Training auf den Verlauf der Sepsis, einer Erkrankung mit komplexer systemischer Entzündungsreaktion, hoher Prävalenz und hoher Mortalität, zu untersuchen. Dabei sollten neben Organschäden und Überlebensraten auch Variablen der Immunantwort evaluiert werden.

Hierzu erfolgte eine tierexperimentelle Untersuchung an männlichen Mäusen. Die Tiere wurden entweder mittels sechswöchigem regelmäßigem Laufband- und freiwilligem Laufrad-Training konditioniert oder unter normalen Bedingungen gehalten. Die Induktion einer polymikrobiellen Sepsis erfolgte mittels intraperitonealer Verabreichung einer standardisierten Stuhlsuspension (peritoneal contamination & infection model, PCI). In einer ersten Untersuchungsreihe wurden allgemeine Parameter wie Körpergewicht und relatives Herzgewicht sowie der Verlauf der Sepsis anhand der Krankheitsschwere (*Clinical Severity Score*) und der Überlebenswahrscheinlichkeit in beiden Mäusepopulationen evaluiert. In einer zweiten Versuchsreihe erfolgte die Beurteilung der Wirtsreaktion der Mäuse phänotypabhängig zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (nach 6 und nach 24 Stunden) im Verlauf einer Sepsis anhand allgemeiner Parameter wie Blutbild, Zytokinkonzentrationen und der bakteriellen Keimlast. Organspezifische Veränderungen der Leber wurden anhand von ALAT, ASAT und histologischen Veränderungen evaluiert. Die Beurteilung der sepsisassoziierten Nierenschädigung erfolgte über die Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff-Stickstoff, die Einschätzung der morphologischen Gewebsintegrität und die Evaluierung von Mediatoren einer inflammatorischen Stressantwort wie Hitzeschockprotein 70 (HSP70), Monoaminoxidase A (MAO-A) und Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) auf Genexpressionsebene mittels quantitativer Reverse-Transkriptase PCR und auf Proteinebene mittels Westernblot.

Insgesamt konnte bestätigt werden, dass regelmäßiges körperliches Training im Vorfeld einer polymikrobiellen Sepsis den Verlauf der Infektion und die Überlebensrate positiv beeinflusst. Dies war mit einer niedrigeren Konzentration sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine im Blut, einer gesteigerten Fähigkeit zur Elimination von Bakterien und geringeren Zeichen einer Organschädigung insbesondere der Niere assoziiert. Auf Genexpressions- und Proteinebene konnten aktuell keine Effekte durch physisches Training nachgewiesen werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass regelmäßige physische Aktivität die Inflamationsreaktion im Verlauf einer peritonealen Sepsis moduliert und die Überlebenswahrscheinlichkeit im Tierexperiment steigert. Physisches Training scheint somit auch präventive bzw. präkonditionierende Effekte bei schweren Infektionserkrankungen zu zeigen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Effekt von physischem Training auf Morbidität und Mortalität

In der heutigen Gesellschaft spielen fehlende körperliche Bewegung und Übergewicht eine große Rolle. In Deutschland sind 61,6 % der Männer und 46,7 % der Frauen übergewichtig oder adipös (Schienkiewitz et al. 2017). Das Ausmaß des Übergewichts wird anhand des BMIs (Body Mass Index) eingeteilt. Nach den Bewertungskriterien der WHO (World Health Organisation) wird Übergewicht als ein BMI größer-gleich 25 und Adipositas als ein BMI größer-gleich 30 klassifiziert (Nuttall 2015). Ein zu hohes Körpergewicht ist mit einer Vielzahl an Beschwerden und Erkrankungen assoziiert. So haben betroffene Menschen unter anderem ein erhöhtes Risiko für Diabetes mellitus Typ 2, für kardiovaskuläre Erkrankungen und für einige Karzinomarten. Außerdem weisen übergewichtige Menschen eine geringere Lebenserwartung als normalgewichtige Menschen auf (Mensink et al. 2013). Neben dem Übergewicht ist körperliche Inaktivität jedoch ein noch größerer Risikofaktor für Morbidität und Mortalität. So hat eine niedrige kardiovaskuläre Leistungsfähigkeit einen größeren Einfluss auf die Gesamtsterblichkeit als Rauchen und Übergewicht zusammen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu sterben für Menschen mit Diabetes mellitus Typ 2 durch eine höhere körperliche Leistungsfähigkeit deutlich reduziert werden kann. So hat ein Mensch mit Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas, aber hoher körperlicher Fitness, ein geringeres Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu versterben als ein normalgewichtiger Typ 2-Diabetiker mit geringer körperlicher Fitness (Blair 2009). Regelmäßiges physisches Training reduziert außerdem neben der Inzidenz und Mortalität von Tumorerkrankungen, Schlaganfällen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen auch die Gesamtmortalität (Lollgen et al. 2009, Wen et al. 2011, Lollgen 2014). Für die Gesamtsterblichkeit und die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen konnte dieser positive Effekt auch unabhängig von BMI-Veränderungen gezeigt werden (Lee et al. 2011).

## 1.2 Der Effekt von physischem Training auf Infektionserkrankungen

Auch in Bezug auf Infektionskrankheiten konnte der positive Effekt physischen Trainings schon vielfach bewiesen werden. Besonders in kontrollierten tierexperimentellen Studien konnte ein positiver Trainingseffekt auf den Verlauf und die Mortalitätsrate von bestimmten Infektionserkrankungen gezeigt werden. So konnte schon früh nachgewiesen werden, dass Mäuse, die zuvor mehrere Wochen auf einem Laufrad trainiert wurden, bei einer anschließenden Infektion mit *Salmonella typhimurium* eine bessere Überlebensrate zeigten als untrainierte Tiere (Cannon und Kluger 1984). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass bei Mäusen nach regelmäßigem Training und anschließender Influenzainfektion weniger Symptome, eine geringere Viruslast und weniger proinflammatorische Zytokine nachweisbar waren als bei untrainierten Tieren oder auch bei Mäusen, die nur eine einzelne Trainingseinheit absolvierten (Sim et al. 2009). Bei Ratten mit einer *Streptococcus pneumoniae*-Infektion wurde sogar für eine einzelne erschöpfende Schwimmeinheit ein positiver Effekt nachgewiesen (Friman et al. 1991). Auch bei einer Studie mit Menschen, die regelmäßig moderates Training absolvieren, konnte gezeigt werden, dass sich das Risiko an einer Infektion der oberen Atemwege zu erkranken um 29 % reduzierte (Gleeson 2007). Im Gegensatz dazu zeigte eine erschöpfende Trainingseinheit bei Mäusen bei gleichzeitiger Inokulation von Coxsackie-Virus B keinen Effekt und das gleiche Training 48 Stunden nach Infektion mit den Viren sogar einen erhöhten Myokardschaden (Pedersen und Hoffman-Goetz 2000). Außerdem konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass nach exzessiver physischer Leistung wie einem Marathonlauf das Infektionsrisiko steigt (Gleeson 2007).

Für den Verlauf einer Sepsis zeigen erste tierexperimentelle Arbeiten einen protektiven Effekt durch Training. Nach der intravenösen Infusion des prokaryontischen Pathogenitätsfaktors Lipopolysaccharid (LPS) wurde bei trainierten Ratten ein geringerer Abfall von Blutzellen, eine geringere Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine und ein geringerer kardialer, hepatischer und pulmonaler Organschaden nachgewiesen als in der untrainierten Kontrollgruppe (Chen et al. 2007). Auch bei einer weiteren Studie, in der mittels *cecal ligation and puncture* (CLP) ein Darpunktionsmodell zur Sepsisinduktion verwendet wurde, konnten ein reduzierter Lungen- und distaler Organschaden und zusätzlich eine

verbesserte Überlebensrate bei trainierten Mäusen gezeigt werden (de Araujo et al. 2012).

### 1.3 Die Sepsis - ein schwerwiegendes Krankheitsbild

Die Sepsis kann definiert werden als eine komplexe systemische Entzündungsreaktion auf einen Stimulus (Gramm et al. 1995) und ist ein schwerwiegendes Krankheitsbild, welches mit einer hohen Mortalität, steigender Inzidenz und hohen Kosten für das Gesundheitssystem assoziiert ist (Martin et al. 2003, Angus et al. 2001). In den aktuellen Empfehlungen der 3. Konsensuskonferenz wird die Sepsis als lebensgefährliche Organdysfunktion definiert, welche durch eine fehlregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion hervorgerufen wird (Singer et al. 2016). Ein septischer Schock ist durch das zusätzliche Auftreten eines Kreislaufversagens definiert, das trotz adäquater Maßnahmen nicht ausreichend beherrschbar ist und den Einsatz von Vasopressoren notwendig macht (Singer et al. 2016). Trotz der gesundheitlichen und ökonomischen Bedeutung für die Bevölkerung liegen bisher wenige Arbeiten mit gut differenzierten und vergleichbaren Angaben zu Inzidenz und Mortalität der Sepsis vor. Die erhobenen Daten basieren auf der vormaligen Sepsisdefinition, bei welcher die Diagnose der Sepsis gestellt wurde, wenn bei mikrobiologisch oder klinisch nachgewiesener oder vermuteter Infektion mindestens zwei von vier Kriterien (siehe Tab. 1) eines systemischen inflammatorischen Response Syndroms (SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrom) vorlagen. Eine schwere Sepsis ging neben der Erfüllung der Sepsiskriterien mit dem Vorhandensein von mindestens einer Organdysfunktion einher (Bone et al. 1992, Reinhart et al. 2010).

**Tabelle 1: Diagnosekriterien eines SIRS - systemisches inflammatorisches Response Syndrom**

<b>systemisches inflammatorisches Response Syndrom</b>
Fieber ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) oder Hypothermie ( $\leq 36^{\circ}\text{C}$ ), bestätigt durch eine rektale, intravasale oder intravesikale Messung
Tachykardie (Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$ )
Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$ ) oder Hyperventilation ( $\text{paCO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa}$ bzw. $\leq 33 \text{ mmHg}$ )
Leukozytose ( $\geq 12.000/\text{mm}^3$ ) oder Leukopenie ( $\leq 4000/\text{mm}^3$ ) oder $\geq 10 \%$ unreife Neutrophile im Differenzialblutbild

(Bone et al. 1992)



Auf deutschen Intensivstationen wurde anhand der vormaligen Definition für die Sepsis eine Prävalenz von 12,4 % und für die schwere Sepsis und den septischen Schock eine Prävalenz von 11 % ermittelt. (Engel et al. 2007). Anhand von DRG-Daten wurde zuletzt eine Inzidenz von 335 Patienten pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland nachgewiesen. Das entspricht 279.530 Patienten im Jahr 2013 in Deutschland (Fleischmann et al. 2016). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Inzidenz der Sepsis jährlich steigt (Martin et al. 2003). Zuletzt wurde in Deutschland ein Anstieg von 5.7 % pro Jahr zwischen 2007 und 2013 nachgewiesen (Fleischmann et al. 2016).

Unzureichende Daten mit schlechter Vergleichbarkeit sind auch hinsichtlich der Mortalität der Sepsis zu finden. So reichen die Angaben für eine schwere Sepsis von 27 % Gesamtmortalität im Krankenhaus (Angus et al. 2001) bis 56 % 28-Tage-Mortalität (Brun-Buisson et al. 1995). Auf deutschen Intensivstationen beträgt die 90-Tage-Letalität für schwere Sepsis und den septischen Schock ca. 55 % (Engel et al. 2007). Die Angaben zur Sterblichkeitsrate der Sepsis allgemein liegen zwischen 5 - 37 % (Moerer und Quintel 2009). Aktuelle DRG-Daten aus Deutschland zeigen eine Krankenhaussterblichkeit für die Sepsis (einschließlich schwerer Sepsis und septischer Schock) von 24,3 %. Insgesamt ist über die letzten Jahre ein leichter Rückgang der Mortalität der Sepsis in Deutschland zu verzeichnen, sie bleibt jedoch trotz guter intensivtherapeutischer Optionen weiterhin hoch (Fleischmann et al. 2016). Insbesondere die Gesamtsterblichkeit der Sepsis im Langzeitverlauf nach 48 Monaten ist laut Auswertung des „Jenaer Sepsis-Registers“ mit 74 % sehr hoch (Schmidt et al. 2020). Mit ca. 60.000 Todesfällen pro Jahr stellt die Sepsis in Deutschland die dritthäufigste Todesursache nach der koronaren Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt dar (Bauer et al. 2006). Zusätzlich haben die Patienten, die eine Sepsis überleben, eine deutlich eingeschränkte Lebensqualität. Es zeigen sich große Defizite in der physischen Leistungsfähigkeit, unter anderem in Form von Einschränkungen bei der Bewältigung von Aufgaben im Beruf und im täglichen Leben und ein schlechterer Allgemeinzustand im Vergleich zur gesunden Bevölkerung (Perl et al. 1995). Die Langzeitfolgen nach einer Sepsis können sich insbesondere in Form von Neuropathien, Myopathien, Fatigue, chronischen Schmerzen, Depressionen und eine gesteigerte Infektanfälligkeit präsentieren (Cavaillon et al. 2020).

Zusätzlich verursacht die Sepsis eine relevante sozioökonomische Belastung. So entstehen auf deutschen Intensivstationen, unter Berücksichtigung der schwankenden Inzidenzangaben, durch die schwere Sepsis direkte Kosten von 1,02 bis 2,21 Mrd. Euro pro Jahr (Schmid et al. 2002). Dies entspricht ca. 30 % des Budgets für Intensivmedizin (Bauer et al. 2006). Außerdem werden unter anderem durch Produktivitätsverlust indirekte Kosten von 2,62 bis 5,66 Mrd. Euro verursacht. Insgesamt bedeutet dies für Deutschland eine finanzielle Belastung von 3,65 bis 7,87 Mrd. Euro jährlich (Schmid et al. 2002). Im Jahr 2011 erreichte die Sepsis auf der Liste der teuersten Erkrankungen in der USA den 1. Platz (Torio und Andrews 2013).

#### **1.4 Pathophysiologische Vorgänge bei physischem Training und Sepsis – Gemeinsamkeiten und Unterschiede**

In verschiedenen Studien konnte wiederholt gezeigt werden, dass sich die Entzündungsreaktion insbesondere in Bezug auf die Zytokinantwort bei Patienten nach intensivem physischem Training und bei Patienten nach einem Trauma oder während einer Sepsis sehr ähnlich sind. Körperliches Training aktiviert eine moderate Akute-Phase-Reaktion und ein systemisches inflammatorisches Response Syndrom (SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrom), wie es auch bei einer Sepsis oder nach einem Trauma auftritt. (Pedersen et al. 2000, Fehrenbach und Schneider 2006). Zeichen eines systemischen inflammatorischen Response Syndroms im Rahmen eines Infekts können Fieber oder Hypothermie, Tachykardie, Tachypnoe und eine Leukozytose oder Leukopenie sein (Reinhart et al. 2010). Einige dieser SIRS-Kriterien können auch nach extensivem Ausdauertraining in gewisser Art und Weise nachgewiesen werden. So kommt es nach starker körperlicher Anstrengung vorübergehend zur Inflammation, Hyperthermie (bis 44 °C Kerntemperatur), Anstieg der Leukozytenkonzentration, Tachykardie und Tachypnoe und somit zu einem SIRS-ähnlichem Zustand (Fehrenbach und Schneider 2006). Über die genauen Ursachen und die Pathophysiologie der Entstehung herrscht sowohl bei einem SIRS im Rahmen einer Infektion oder eines Traumas als auch bei einem trainingsassoziierten SIRS-ähnlichem Zustand trotz intensiver Forschung in weiten Bereichen noch Ungewissheit (Fehrenbach und Schneider 2006, Bauer et al. 2006).

Durch physisches Training werden eine Fülle an Veränderungen, wie z. B. Hypoxie und Hyperthermie, aber auch oxidativer, hormonaler und mechanischer Stress

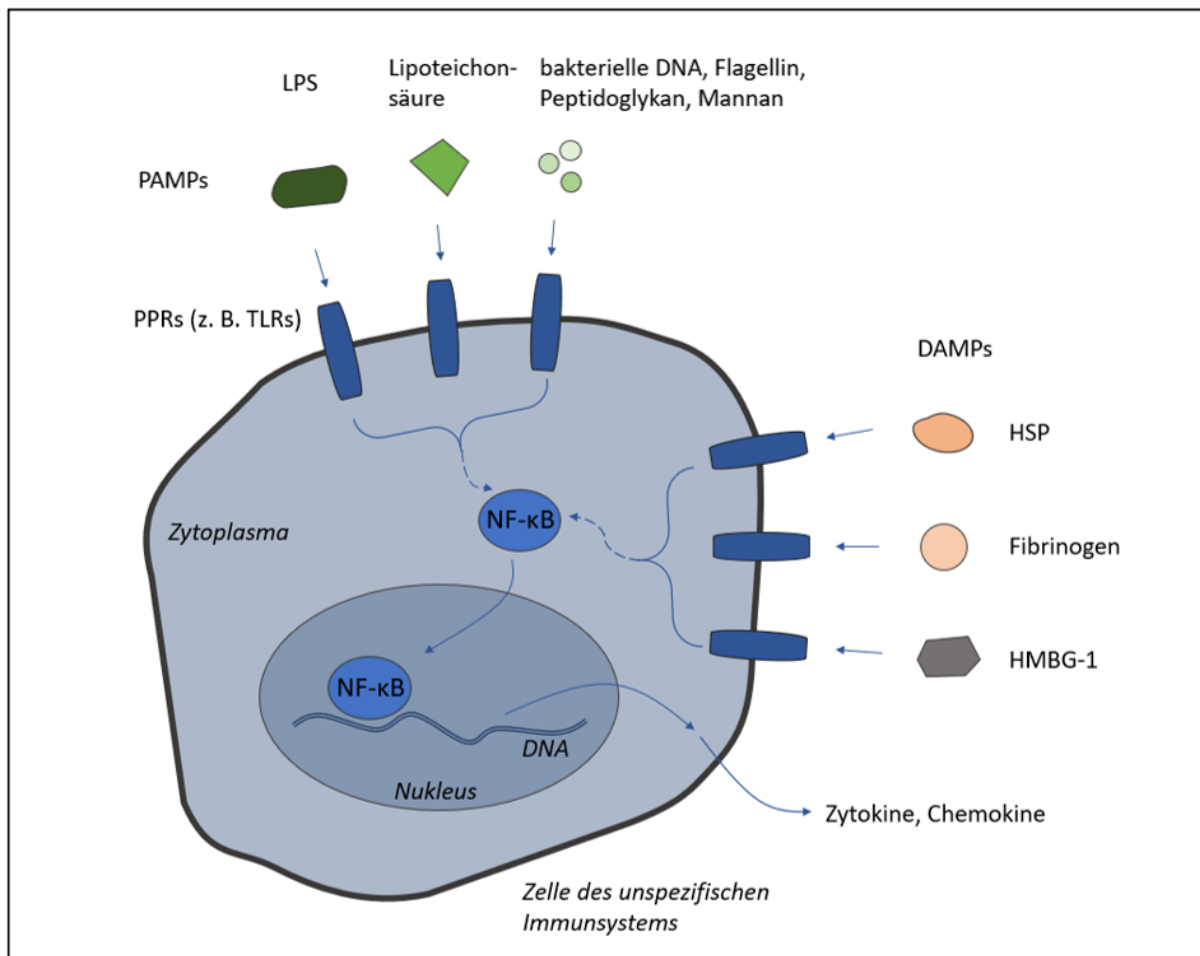
initiiert, was wiederum einen Anstieg der Zytokinausschüttung und der Entzündungsantwort zur Folge haben kann. Als wichtige Initiatoren für die Immunantwort werden im Rahmen des Trainings insbesondere oxidativer Stress und Hitzeschockproteine (HSP) vermutet (Fehrenbach und Schneider 2006). Als ein weiterer Einflussfaktor auf die Entzündungsreaktion nach körperlichem Training wird die Ischämie des Darms und die damit assoziierte Permeabilitätssteigerung diskutiert, welche unter anderem durch oxidativen Stress und Minderperfusion verursacht wird und eine Translokation von Bakterienbestandteilen über die Mukosa zur Folge hat (Pedersen et al. 2000, Fehrenbach und Schneider 2006). Die Rolle der dadurch entstehenden systemischen Endotoxämie im Kontext der Entzündungsreaktion insbesondere in Bezug auf die Aktivierung von TLRs (toll like receptors, Toll-like Rezeptoren) wird später in diesem Kapitel erläutert. Nachgewiesen werden konnte eine systemische Endotoxämie bisher jedoch nur bei extrem anstrengender langandauernder körperlicher Belastung wie einem Marathonlauf (Fehrenbach und Schneider 2006).

Bei der Entwicklung eines infektassoziierten SIRS bis hin zum septischen Schock dagegen steht eine noch komplexere, multifaktorielle Homöostasestörung des gesamten Organismus im Vordergrund. Diese ist unter anderem durch Störungen der Immunantwort, der Hämostase, der Hämodynamik und des endokrinen Systems gekennzeichnet (Bauer et al. 2006). Die häufigsten Infektionsquellen bei einer Sepsis sind mit 52 – 61 % die Lunge und mit 20 – 32 % das Abdomen (Bernard et al. 2001, Mansur et al. 2015, Schmidt et al. 2020). Während früher gramnegative Erreger bei einer Sepsis zahlreicher vertreten waren als andere Organismen, sind heute auch grampositive Keime, polymikrobielle Infektionen und Pilze zunehmend häufiger nachweisbar (Martin et al. 2003, Bernard et al. 2001, Schmidt et al. 2020). Zu Beginn einer Sepsis oder eines Infektes werden immunkompetente Zellen des unspezifischen bzw. angeborenen Immunsystems (z. B. Monozyten/ Makrophagen) über verschiedene erregerassoziierte Liganden (PAMPs, pathogen associated molecular patterns) aktiviert (Cinel und Opal 2009). Dazu gehören neben Membranbestandteilen wie Lipopolysacchariden (LPS), die bei gramnegativen Bakterien im Fokus stehen, auch die Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien. Außerdem fungieren bakterielle DNA, Flagellin und Peptidoglykan bei grampositiven und –negativen Bakterien und Mannan bei Pilzen als Liganden (Rice und Bernard 2005, Bochud und Calandra 2003). Die PAMPs binden an korrespondierende PRRs

(pattern recognition receptors), wie z. B. TLRs oder NLRs (Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors), auf oder in verschiedenen immunkompetenten Zellen und aktivieren eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege.

Es kommt sowohl bei physischer Aktivität als auch im Rahmen einer Sepsis über verschiedene Mechanismen zur Aktivierung von Toll-like Rezeptoren. Bis jetzt wurden mindestens zehn humane TLR und viele ihrer Liganden identifiziert. Zum Beispiel bindet LPS gramnegativer Erreger mit Hilfe von LBP (LPS-binding protein) und CD14 (Cluster of Differentiation 14) am TLR-4. Grampositive Erreger dagegen aktivieren Immunzellen über CD14 und TLR-2. Aber auch durch Traumata oder Ischämie, wie sie auch im Rahmen des physischen Trainings auftreten, entstandene endogene DAMPs (danger associated molecular patterns), wie z. B. Hitzeschockproteine, S-100-Proteine, Fibrinogen, Fibronectin oder high mobility group box-1 (HMGB-1), können PRRs nicht nur aktivieren, sondern auch ihre Aktivität und Expression steigern (Bochud und Calandra 2003, Cinel und Opal 2009). Auch ROS (reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies), welche sowohl bei physischem Training als auch während einer Sepsis entstehen, haben Einfluss auf die Aktivierung des TLR-4-Wegs (Fehrenbach und Schneider 2006). Die Stimulation der Rezeptoren durch PAMPs oder DAMPs initiiert die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden. Zum Beispiel wird über die Aktivierung verschiedener Kinasen die inhibitorische Untereinheit des Transkriptionsfaktors nukleärer Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) phosphoryliert und anschließend durch Proteasomen abgebaut, wodurch NF- $\kappa$ B freigesetzt wird. Nach Translokation in den Zellkern bindet der Transkriptionsfaktor spezifische DNA-Abschnitte und initiiert so gewebe- und zellabhängig unter anderem die Genexpression von Zytokinen, wie z. B. Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Akute-Phase-Proteinen, Gerinnungsfaktoren, Enzymen zur Aktivierung zellulärer Proteasen und der induzierbaren NO-Synthase (siehe Abbildung 1). Zusätzlich können die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 (Interleukin-1) selbst den NF- $\kappa$ B-Signalweg aktivieren und die Zytokinfreisetzung fördern (Cinel und Opal 2009, Jean-Baptiste 2007, Franchi et al. 2009). Die Ausschüttung früher proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. TNF- $\alpha$  und IL-1, und die Aktivierung immunkompetenter Zellen führt wiederum zur Freisetzung von weiteren Zytokinen, wie z. B. IL-6, -8, -10 und HMGB-1, Lipidmediatoren und reaktiven Sauerstoffspezies, welche die Immunreaktion auf verschiedene Art und Weise modulieren (Schulte et al. 2013). Eine weitere wichtige Rolle in der Signalkaskade spielen Chemokine bzw.

chemotaktische Zytokine, wie z. B. MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), das zur Migration und Aktivitätssteigerung insbesondere der Monozyten bzw. Makrophagen beiträgt. Ein Anstieg von MCP-1 konnte sowohl nach physischem Training als auch im Rahmen einer Sepsis nachgewiesen werden. Eine Vielzahl von Zellen können MCP-1 sezernieren (u. a. Endothel- und Muskelzellen), Hauptquelle sind jedoch Monozyten bzw. Makrophagen selbst. Die Initiierung der MCP-1-Expression ist nicht vollständig geklärt. Während der Sepsis scheinen proinflammatorische Zytokine beteiligt zu sein. Nach physischem Training kommt es jedoch sehr früh und wahrscheinlich unabhängig von TNF- $\alpha$  und IL-1 zu einem Anstieg. Eine Aktivierung durch das sympathische Nervensystem wird diskutiert (Suzuki et al. 2002, Deshmone et al. 2009, Yadav et al. 2010).



**Abbildung 1: Aktivierung des unspezifischen Immunsystems**

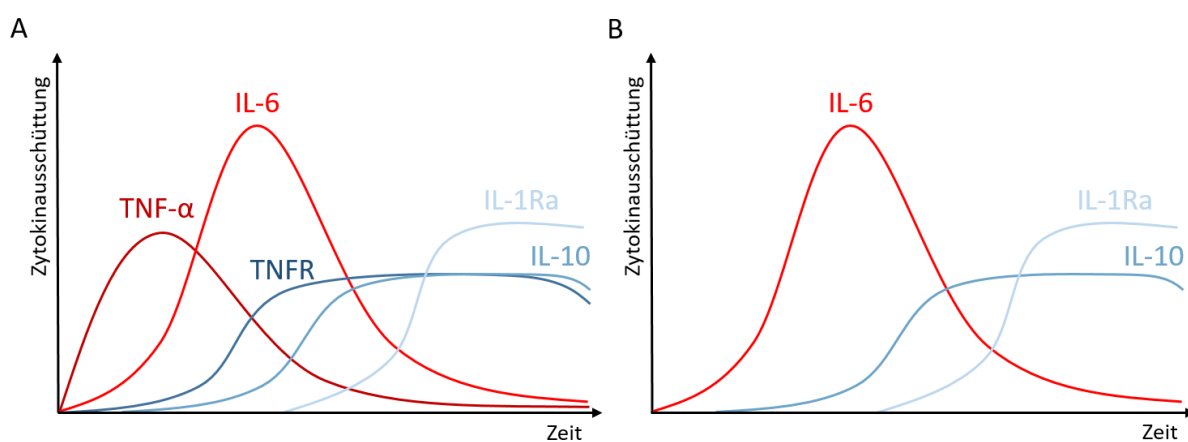
Über PRRs (z. B. TLRs) können sowohl PAMPs (z. B. LPS und Lipoteichonsäure) als auch endogene DAMPs (z. B. HSP, Fibrinogen) die Aktivierung von NF-κB fördern. Nach Translokation in den Zellkern wird die Gentranskription und anschließende Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen gesteigert. *DAMPs*: danger associated molecular patterns, *DNA*: Desoxyribonukleinsäure, *HSP*: Hitzeschockproteine, *HMBG-1*: high mobility group box-1, *LPS*: Lipopolysaccharid, *NF-κB*: nukleärer Faktor kappa B, *PAMPs*: pathogen associated molecular patterns, *PRRs*: pattern recognition receptors, *TLRs*: toll like receptors, Abbildung modifiziert nach Cinel und Opal 2009 und Schulte et al. 2013

Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF-α sind entscheidend an der Entstehung von Schockzuständen mit Hypotension und vaskulärer Permeabilität und der Aktivierung des Gerinnungssystems beteiligt (Jean-Baptiste 2007, Schulte et al. 2013). Sie tragen so maßgeblich zur Entwicklung des Multiorganversagens im Verlauf einer Sepsis bei. Zusätzlich haben beide Zytokine einen negativen inotropen

Effekt auf Kardiomyozyten und wirken pyrogen (Jean-Baptiste 2007, Schulte et al. 2013). Fieber wird jedoch nur im Rahmen des infek- oder traumaassoziiertem SIRS über ein Zusammenspiel aus Zytokinen, Prostaglandinen, Neurotransmittern und Katecholaminen ausgelöst (Jansky und Vybiral 2004). Eine Hyperthermie, wie sie sich bei einem trainingsassoziierten SIRS darstellt, basiert jedoch auf Muskelarbeit und ist nicht als Fieber zu verstehen. Unabhängig von der Ursache kann Hyperthermie wiederum zur Entstehung von freien Radikalen im Gewebe beitragen (Fehrenbach und Schneider 2006).

Während TNF- $\alpha$  bei der sepsisassoziierten Initiierung der Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle spielt, ist der Einfluss dieses proinflammatorischen Zytokins im Rahmen des SIRS-ähnlichen Zustands nach physischem Training sehr gering. Eine vergleichende Übersicht der involvierten Zytokine im Rahmen der Immunantwort bei physischem Training und Sepsis ist Abbildung 2 zu entnehmen. TNF- $\alpha$ -Erhöhung nach körperlicher Aktivität konnte bis jetzt nur nach extrem erschöpfender, langandauernder Belastung, z. B. nach einem Marathonlauf, nachgewiesen werden. Einer der wichtigsten Mediatoren ausgelöst durch Muskelarbeit dagegen ist IL-6 (Pedersen und Febbraio 2008). IL-6 hat besonders großen Einfluss auf die hepatische Genexpression und induziert so die Akute-Phase-Reaktion. Dabei wird die Synthese von positiven Akute-Phase-Proteinen, wie z. B.  $\alpha_2$ -Makroglobulin, Komplementfaktoren, Fibrinogen und C-reaktives Protein, massiv gesteigert und die von negativen Akute-Phase-Proteinen, wie z. B. Albumin, stark reduziert. Zusätzlich zu den proinflammatorischen Signalkaskaden induziert IL-6 auch antiinflammatorische Prozesse. So hemmt IL-6 die Ausschüttung von IL-1 und TNF- $\alpha$  und fördert die Freisetzung von entzündungshemmenden Mediatoren, wie z. B. IL-1Ra (IL-1 Rezeptorantagonist), sTNFRs (soluble TNF rezeptor), IL-10, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ ) und Kortisol (Bauer et al. 2006, Schulte et al. 2013). Im Rahmen eines trauma- oder infektaassoziierten SIRS erfolgt die IL-6-Freisetzung hauptsächlich über den NF- $\kappa$ B-Signalweg aus Makrophagen bzw. Monozyten und Leukozyten. Dieser scheint in Bezug auf körperliches Training dagegen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Während des physischen Trainings wird der größte Anteil des IL-6 von Myozyten selbst produziert. Somit stellt der Skelettmuskel ein endokrines Organ dar, welches über Mediatoren wie IL-6 Einfluss auf den Metabolismus des Körpers nimmt. Die genaue Signalkaskade hinter der Zytokinfreisetzung ist noch nicht vollständig geklärt.

Wie bereits erwähnt, scheint der NF- $\kappa$ B-Signalweg jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die IL-6-Sekretion aus Myozyten wird während körperlicher Aktivität vermutlich durch eine Kombination von verschiedenen Signalwegen beeinflusst. Sowohl ein niedriger Glykogengehalt des Muskels, als auch die Entstehung von NO und die Freisetzung von Kalzium konnten als potenzielle Initiatoren der Sekretion identifiziert werden. Das von Myozyten freigesetzte IL-6 steigert im Muskel die Glukoseaufnahme und Lipidoxidation und fördert gleichzeitig die Glukoneogenese in der Leber und die Lipolyse im Fettgewebe (Fehrenbach und Schneider 2006, Pedersen und Febbraio 2008).



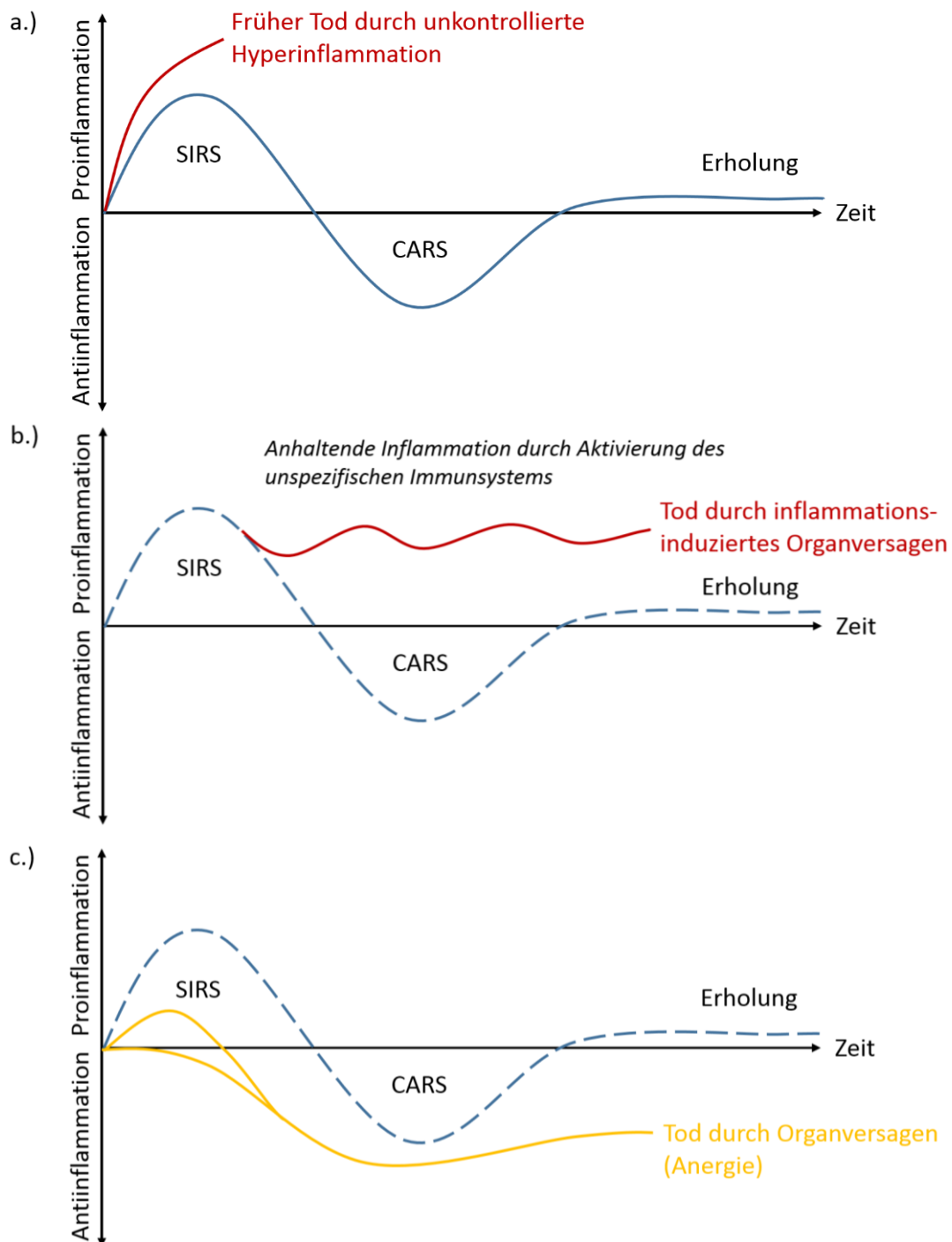
### Abbildung 2: Zytokinausschüttung bei infek- und trainingsassoziiertem SIRS

**A** Infektassoziiertes SIRS: ein früher Anstieg von TNF- $\alpha$ , gefolgt von einem IL-6-Anstieg und anschließender antiinflammatorischer Reaktion, **B** trainingsassoziiertes SIRS: IL-6-Ausschüttung TNF- $\alpha$ -unabhängig, *TNF- $\alpha$* : Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , *IL-6*: Interleukin-6, *TNFR*: TNF-Rezeptor, *IL-1RA*: Interleukin-1-Rezeptorantagonist, *IL-10*: Interleukin 10, Abbildung modifiziert nach Walsh et al. 2011

Die konsekutive Ausschüttung von entzündungshemmenden Zytokinen, wie z. B. IL-10 und IL-1Ra, ist essenziell, um eine adäquate Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen im Körper aufrechtzuerhalten (Fehrenbach und Schneider 2006). IL-10 supprimiert die Antigenexpression, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z. B. IL-1 und TNF- $\alpha$ ) und die Phagozytose der Monozyten bzw. Makrophagen. Außerdem wirkt IL-10 durch einen negativen Feedback-Mechanismus hemmend auf T-Helferzellen (Couper et al. 2008, Sabat 2010). Zusätzlich stimuliert IL-10 auch die Freisetzung von IL-1Ra und sTNFRs und reduziert so den proinflammatorischen Einfluss von IL-1 und TNF- $\alpha$  (Schulte et al.



2013). Die Sekretion von entzündungshemmenden Zytokinen dient im Rahmen des trainingsassoziierten SIRS lediglich zur Aufrechterhaltung des inflammatorischen Gleichgewichts. Eine überschießende Immunsuppression ist dadurch nicht zu erwarten (Fehrenbach und Schneider 2006). Es gibt lediglich Anzeichen dafür, dass Leistungssportler nach sehr langem und erschöpfendem Training anfälliger für Erkrankungen der oberen Atemwege sind, wobei die Ursache dafür wahrscheinlich multifaktoriell ist (Gleeson et al. 2011). Im Gegensatz dazu kann im Rahmen eines traumatisch oder infektiologisch bedingtem SIRS die antiinflammatorische Reaktion auch Schaden verursachen. Früher wurde die Pathophysiologie der Sepsis hauptsächlich in der überschießenden proinflammatorischen Reaktion (Zytokinsturm) gesehen. Heute wird vermutet, dass der frühen Phase der extremen Hyperinflammation mit Organversagen eine verzögerte Phase der Immunsuppression oder sogar Immunparalyse („compensatory antiinflammatory response syndrome“, CARS) folgt, in der die Infektion weiter fortschreitet oder das Risiko für eine zweite Infektion steigt (Bauer et al. 2006, Hotchkiss et al. 2013). Jedoch darf für diese beiden Phasen keine starre chronologische Reihenfolge vorausgesetzt werden. Vielmehr ist das Ganze als hochvariabler und dynamischer Prozess zu betrachten, in dem das Zusammenspiel von proinflammatorischen Zytokinen, antiinflammatorischen Zytokinen und löslichen Inhibitoren der proinflammatorischen Zytokine, wie z. B. sTNFRs, essentiell ist, um sowohl die Eliminierung von Pathogenen als auch die Begrenzung einer gewebeschädigenden Entzündungsreaktion sicherzustellen (Bone 1996, Bauer et al. 2006, Schulte et al. 2013). Eine unbegrenzte Immunparalyse bis hin zur Anergie kann jedoch genauso wie eine überschießende proinflammatorischer Immunreaktion zum Organversagen führen (siehe Abb. 3) (Hotchkiss et al. 2013).



**Abbildung 3: Verschiedene Möglichkeiten des Verlaufs der Immunreaktion einer Sepsis**

a.) Sepsis ist eine bipolare Störung des Immunsystems, bei der einer proinflammatorischen Phase (SIRS) eine Immunsuppression (CARS) folgt. Außerdem ist die Möglichkeit der reinen Hyperinflammation dargestellt b.) Die anhaltende Inflammation durch Aktivierung des unspezifischen Immunsystems verursacht ein Organversagen. c.) Durch eine abgeschwächte oder fehlende hyperinflammatorische Phase kann es früh zur Immunparalyse des Organismus kommen. *CARS*: kompensatorisches antiinflammatorisches

Response Syndrom, *SIRS*: systemisches inflammatorisches Response Syndrom, Abbildung modifiziert nach Bauer et al. 2006, Hotchkiss et al. 2013 und Schlegel et al. 2014

Das System der Inflammation wird bei physischem Training und im Rahmen einer Sepsis durch Hypoxie entscheidend beeinflusst. Zur Gewebhypoxie tragen unter anderem ein gesteigerter metabolischer Bedarf der Zellen und eine reduzierte Verfügbarkeit metabolischer Substrate bei (Fehrenbach und Schneider 2006, Bauer et al. 2006, Eltzschig und Carmeliet 2011). Zelluläre Anpassungsreaktionen auf eine Hypoxie werden unter anderem über den Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha) realisiert (Eltzschig und Carmeliet 2011). Sauerstoffmangel hemmt den Abbau von HIF-1 $\alpha$  und erhöht so dessen Aktivität. Jedoch kann auch unter normoxämen Bedingungen u. a. über TNF- $\alpha$ , IL-1, LPS, ROS, HSP, Hyperthermie und einen reduzierten intrazellulären Eisengehalt über eine gesteigerte Genexpression oder eine reduzierte Degradation die Wirkung von HIF-1 $\alpha$  gesteigert werden. (Hellwig-Burgel et al. 2005, Peyssonnaud et al. 2007, Eltzschig und Carmeliet 2011). HIF-1 $\alpha$  wird in den meisten Geweben exprimiert und induziert Gene, über die der Sauerstofftransport, die Angiogenese und die Nährstoffversorgung und -verwertung gefördert und der Sauerstoffverbrauch reduziert werden, mit dem Ziel, die Gewebeintegrität und -homöostase auch bei Hypoxie aufrechtzuerhalten (Rius et al. 2008, Lindholm und Rundqvist 2016). Außerdem stimuliert HIF-1 $\alpha$  die Motilität und Aggregation von myeloischen Zellen und hemmt die Apoptose von neutrophilen Granulozyten. Über den NF- $\kappa$ B-Weg wird eine zusätzliche Verbindung zwischen Inflammation und Hypoxie hergestellt. So wird einerseits die Transkription von HIF-1 $\alpha$  über die NF- $\kappa$ B-Weg reguliert. Auf der anderen Seite fördern Hypoxie und auch HIF-1 $\alpha$  direkt den NF- $\kappa$ B-Weg (zum Teil über eine gesteigerte Expression von TLRs), was wiederum die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und die Stimulation von Leukozyten bedingt (Walmsley et al. 2005, Rius et al. 2008, Eltzschig und Carmeliet 2011).

Eine weitere wichtige Komponente der zellulären Reaktion auf physisches Training oder Infektionen stellt der oxidative Stress dar. Die Hauptmediatoren des oxidativen Stresses sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species), wie beispielsweise Superoxidradikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), Hydroxylradikale ( $HO^{\bullet}$ ) oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und davon abgeleitete Peroxidradikale ( $HOO^{\bullet}$ ). Diese

entstehen unter anderem durch regionale Gewebehypoxie und anschließende Reoxygenierung. Oxidativer Stress tritt auf, wenn ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung von ROS und antioxidativen Abwehrmechanismen im Körper vorliegt. ROS entstehen bei multiplen intrazellulären Prozessen, z. B. in der Atmungskette in Mitochondrien. Zusätzlich generieren viele Enzyme reaktive Sauerstoffspezies (Fehrenbach und Schneider 2006, Rocha et al. 2012).  $H_2O_2$  entsteht unter anderem bei der oxidativen Desaminierung von verschiedenen Monoaminen, wie z. B. Serotonin und Noradrenalin, durch die MAO-A (Monoaminoxidase-A), diese ist ubiquitär in allen Zellen nachweisbar (Edmondson et al. 2004, Chen 2004). Phagozyten und zum Teil auch andere Zellen, wie z. B. Fibroblasten und Endothelzellen, produzieren ROS über die NADPH-Oxidase (Rocha et al. 2012). Während körperlicher Belastung werden ROS hauptsächlich in den Mitochondrien der Muskelzellen gebildet, wobei zunehmend Daten vorliegen, dass auch andere Zellkomponenten eine wichtige Rolle spielen (Powers und Jackson 2008). Im Rahmen einer Sepsis stellen dagegen aktivierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten die Hauptproduzenten dar, insbesondere nach Hypoxie sind jedoch auch andere Zellen an der ROS-Generierung beteiligt (Rocha et al. 2012, Bosmann und Ward 2013). Reaktive Sauerstoffspezies weisen in Abhängigkeit ihrer Reaktivität und Halbwertszeit eine Vielzahl von physiologischen Effekten und Aufgaben auf. Insbesondere die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies von Phagozyten dient der Abwehr von Erregern. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass ROS jedoch auch als Modulatoren von intrazellulären Signalkaskaden fungieren. Sie regulieren viele Signalwege in neutrophilen Granulozyten, modulieren Protein- und Lipidkinasen, Phosphatasen, die HSP- und TLR-abhängige Signaltransduktion und nehmen Einfluss auf Transkriptionsfaktoren (einschließlich NF- $\kappa$ B und HIF-1 $\alpha$ ) und Apoptose (Powers und Jackson 2008, Scheele et al. 2009, Rocha et al. 2012). Sowohl die Freisetzung pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine wird gesteigert. So fördern ROS beispielsweise die IL-6-Ausschüttung aus dem Muskel bei Belastung (Scheele et al. 2009, Rocha et al. 2012). Sauerstoffradikale induzieren außerdem die Aktivierung endogener antioxidativer Abwehrmechanismen, wie z. B. die SOD (Superoxiddismutase). Wenn es jedoch zu einem Ungleichgewicht mit dem Überwiegen von reaktiven Sauerstoffspezies und dem Auftreten von oxidativem Stress kommt, sind DNA-Schädigung sowie Protein- und Fettoxidation die Folge. Es resultieren eine mitochondriale Dysfunktion und Beeinträchtigung der ATP-

Produktion bis hin zur Zellapoptose (Rocha et al. 2012, Bosmann und Ward 2013). Negative Effekte durch ROS im Rahmen von physischem Training begrenzen sich auf einen potenziellen Beitrag zur Muskelermüdung während der Belastung und einen hemmenden Einfluss auf die Muskelregeneration (Powers und Jackson 2008, Scheele et al. 2009). Die Ausschüttung von Sauerstoffradikalen während einer Sepsis dagegen führt zu einer Verschiebung des Redoxsystems in Richtung eines oxidativen Status und trägt so über mitochondriale, zelluläre und immunologische Dysfunktionen entscheidend zur Entstehung eines Multiorganversagens bei (Rocha et al. 2012, Bosmann und Ward 2013).

Zusätzlich zu den bisher dargestellten Aspekten der gemeinsamen pathophysiologischen Abläufe von physischem Training und Sepsis soll noch die Rolle der Hitzeschockproteine (HSP) porträtiert werden. HSP70 ist ein Chaperon, das ubiquitär synthetisiert und auf verschiedenen Ebenen durch ROS induziert wird. Zusätzlich können auch andere Stimuli wie Gewebhypoxie, Energie-/Glukosemangel, Azidose, Hyperthermie, Zytokine und ein reduzierter Blutfluss in viszeralen Organen die HSP70-Expression aktivieren (Kregel 2002, Fehrenbach et al. 2000, Qu et al. 2015). HSP70 hat pleiotrope protektive Effekte auf Zellen und insbesondere Mitochondrien, u. a. stabilisiert es Proteinstrukturen, repariert fehlgefaltete Proteine, hemmt die Proteinaggregation, reduziert stressinduzierte Denaturierung von Proteinen und wirkt antiapoptotisch. Jedoch ist HSP70 auch in der Lage, TLR-4 zu aktivieren und so eine Entzündungsreaktion zu initiieren (Asea 2008, Gelain et al. 2011, Qu et al. 2015). Über eine Modulierung der Aktivität von regulatorischen T-Zellen scheint HSP70 dagegen zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und Verhinderung einer überschießenden Immunreaktion beizutragen (Wachstein et al. 2012).

Die durch physisches Training und Infektionen bis hin zu Sepsis induzierten pathophysiologischen Vorgänge weisen viele Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche Unterschiede auf. Besonders hervorzuheben sind neben den akuten Abläufen die daraus resultierenden Effekte auf den Organismus. So trägt regelmäßiges physisches Training zur Steigerung der physischen Leistungsfähigkeit, Modulation des Inflammationssystems und eventuell langfristig zur Steigerung der Immunkompetenz bei. Ein Schaden aus der akuten Inflammationsreaktion ist lediglich für den Muskel oder zum Teil für den Darm zu erwarten, auch kann nach

extremer körperlicher Belastung eine kurzfristige Steigerung der Infektanfälligkeit auftreten. Während einer Infektion hingegen dienen die genannten Mechanismen zur Bekämpfung von pathogenen Erregern. Dabei kann es jedoch zu einer Fehlregulierung des Immunsystems kommen, welche schlussendlich in einem Multiorganversagen resultiert. Diese Aspekte sollen in den folgenden Kapiteln genauer porträtiert werden (Fehrenbach und Schneider 2006, Schlegel et al. 2014).

## **1.5 Effekte des physischen Trainings auf die Immunreaktion des Körpers**

Ein inaktiver Lebensstil erhöht, wie bereits ausführlich in Punkt 1.1 beschrieben, das Risiko für eine Vielzahl von Erkrankungen und deren Komplikationen. Als Ursache dafür werden unter anderem eine Erhöhung des viszeralen Fettgewebes mit konsekutiv gesteigerter Ausschüttung von Adipokinen und die Entstehung eines niedriggradigen, aber dauerhaft erhöhten systemischen Entzündungsstatus gesehen (Gleeson et al. 2011, Neto et al. 2011). Zu den Adipokinen gehören verschiedene Faktoren, darunter auch Zytokine, die vom Fettgewebe ausgeschüttet werden und inflammatorische und metabolische Vorgänge modulieren. Der Zustand der chronischen niedriggradigen Inflammation scheint ursächlich unter anderem an der Entstehung von Diabetes Mellitus Typ 2 und Arteriosklerose beteiligt zu sein. Regelmäßige körperliche Aktivität dagegen hat einen antiinflammatorischen Effekt bzw. verschiebt das Verhältnis von pro- und antiinflammatorischen Einflüssen in Richtung der Entzündungshemmung. Dies scheint zum Teil durch die Reduktion des viszeralen Fettgewebes und einer damit verbunden verringerten Ausschüttung proinflammatorischer Adipokine, aber auch durch die Induktion eines systemischen antiinflammatorischen Zustandes mit jeder Trainingseinheit verursacht zu werden (Gleeson et al. 2011, Neto et al. 2011).

Akkumulation von Körperfett, insbesondere im Bereich des Bauchs, der Leber und der Muskeln erhöht die Gesamtsterblichkeit (Pischon et al. 2008, Gleeson et al. 2011). Mit Zunahme des Fettgewebes steigt auch die Ausschüttung proinflammatorischer Adipokine, wie z. B. TNF, Leptin, MCP-1 und IL-6 (Ouchi et al. 2011). Antiinflammatorische Zytokine, wie z. B. Adiponektin, werden dagegen in geringeren Mengen ausgeschüttet. Regelmäßige körperliche Aktivität reduziert das subkutane und viszerale Fettgewebe sowie den Fettgehalt in Organen wie der Leber

und dem Muskel. Dadurch wird auch die Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren reduziert, wohingegen Adiponektin vermehrt ausgeschüttet wird (Gleeson et al. 2011, Lancaster und Febbraio 2014).

Der antiinflammatorische Zustand wird zum Teil über die Ausschüttung von IL-6 aus kontrahierendem Skelettmuskel verursacht. In Ruhe hat das im Blut zirkulierende IL-6 seinen Ursprung zu ca. 30 % im Fettgewebe, dabei produzieren die Adipozyten jedoch nur einen sehr geringen Anteil. Ungefähr 90 % werden von den gewebeständigen Makrophagen produziert. Weitere IL-6-Quellen sind Monozyten und die Leber (siehe Punkt 1.4). Besonders während andauerndem Training steigern jedoch aktive Muskeln die zelluläre und zirkulierende IL-6-Menge um das 100-fache. Der IL-6-Anstieg verhält sich exponentiell zur Trainingsdauer, ist jedoch transient und normalisiert sich meist eine Stunde nach Trainingsende (Mohamed-Ali et al. 1997, Fried et al. 1998, Fischer 2006, Pedersen 2009, Gleeson et al. 2011). Dieser vorübergehende Anstieg ist dafür verantwortlich, dass antiinflammatorische Zytokine, wie z. B. IL-10 und IL-1Ra und auch Kortisol, vermehrt und proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  geringer ausgeschüttet werden und trägt so zur Entstehung eines antiinflammatorischen Zustands bei. Zusätzlich steigert IL-6 die Lipolyse und die Fettoxidation. IL-10 hat hauptsächlich antiinflammatorische Eigenschaften. Neben den in Punkt 1.4 ausführlich beschriebenen Funktionen reduziert IL-10 zusätzlich die Expression von interzelluläre Adhäsionsmolekülen (z. B. ICAM-1) und die übergewichtassoziierte Makrophageninfiltration der Skelettmuskulatur. (Gleeson et al. 2011, Petersen und Pedersen 2005). Längerfristig ist der Plasmaspiegel von IL-6 nach regelmäßigem Training sowohl in Ruhe als auch nach Belastung eher rückläufig. Dabei werden Mechanismen wie ein gesteigerter Glykogengehalt der Muskulatur, eine gesteigerte antioxidative Kapazität und eine erhöhte Insulinsensitivität als Ursachen diskutiert (Warnberg et al. 2010).

Durch körperliches Training werden auch die Nebennierenhormone Kortisol und Adrenalin durch eine Aktivitätssteigerung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und des sympathischen Nervensystems vermehrt ausgeschüttet (Gleeson 2007, Ball 2015). Die Impulse dafür haben ihren Ursprung in den motorischen Kortizes und der arbeitenden Skelettmuskulatur. Das sympathische Nervensystem steigert die Freisetzung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark und ACTH (Adrenocorticotropes Hormon),

welches von der Hypophyse ausgeschüttet wird, fördert die Kortisolsekretion aus der Nebennierenrinde. Kortisol hat potente antiinflammatorische Effekte, so hemmt es unter anderem die Zytokinausschüttung (z. B. TNF- $\alpha$ ) und die T- und B-Lymphozytenaktivität. Zusätzlich können Katecholamine mittels Inhibition der LPS-induzierte Zytokinausschüttung (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) antiinflammatorisch wirken (Gleeson et al. 2011, Schedlowski und Schmidt 1996, Galbo 1986).

Auch die Makrophagen und T-Zell-Infiltration des Fettgewebes bei Übergewicht tragen entscheidend zur Regulation des Entzündungsstatus im Fettgewebe bei. Für die Aufrechterhaltung der Inflammation im Fettgewebe oder vaskulärem Endothel ist die Extravasation von PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) entscheidend. Die Infiltration durch Makrophagen wird vor allem von einer gesteigerten Zellgröße der Adipozyten und von Chemokinen wie MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  induziert. Es wird vermutet, dass physisches Training die Invasion von PBMCs in entzündetes Fettgewebe und die Adipozytengröße reduziert. (Gleeson et al. 2011). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Diät und Sport bei Mäusen, neben einer Reduktion der Makrophagenanzahl im Fettgewebe, auch zu niedrigeren IL-6 und MCP-1-Spiegeln im Plasma führt (Bruun et al. 2006). MCP-1-Knockout-Mäuse zeigen insgesamt weniger Makrophagen im Fettgewebe. (Lumeng et al. 2007).

Desweiteren konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die Gewebeexpression von ICAM-1-mRNA durch Training reduziert werden kann (Kawanishi et al. 2010). ICAM-1 spielt eine entscheidende Rolle für Adhäsion von Entzündungszellen am vaskulären Endothel und der extrazellulären Matrix. Außerdem ist ICAM-1 ein Mediator für die Interaktion zwischen T-Zellen und Zielzellen und beeinflusst somit die T-Zellaktivierung und Zytokinproduktion. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von ICAM-1 bei übergewichtigen Menschen erhöht ist. Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine Blockierung von ICAM-1 bei übergewichtigen Mäusen tatsächlich vor einer Makrophageninfiltration des Fettgewebes schützt (Gleeson et al. 2011).

Makrophagen liegen im Körper in zwei verschiedenen Polarisationsstatus vor. M1-Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine (z. B. IL-6, TNF) und generieren reaktive Sauerstoffspezies. M2-Makrophagen dagegen produzieren nur im geringen Maße proinflammatorische Mediatoren. Stattdessen schütten sie große

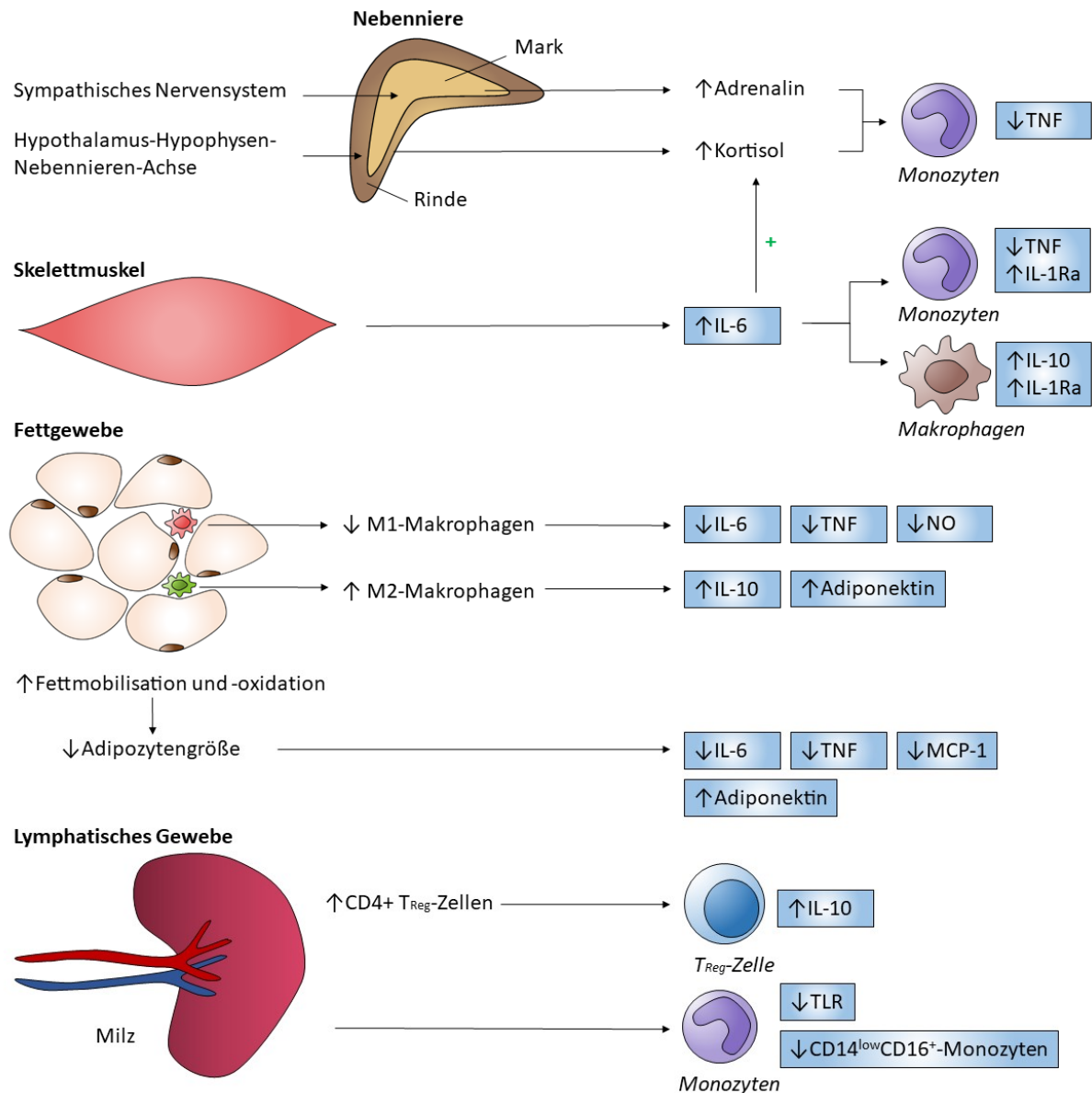


Mengen antiinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-10) aus (Mantovani et al. 2004, Lumeng et al. 2007). Fettgewebe mit einer übergewichtassoziierten leichten chronischen Entzündungsreaktion weist einen höheren Anteil an M1-Makrophagen auf. Die Ursache dafür liegt in einer gesteigerten Invasion von M1-Makrophagen, aber auch in einem Wechsel des Phänotyps von M2- zu M1-Makrophagen. Die Reduktion des entzündlichen Status des Fettgewebes durch physisches Training wiederum scheint diese Makrophageninfiltration und den Wechsel des Phänotyps zu supprimieren, wodurch eine erhöhte Anzahl an M2-Makrophagen resultiert. Dieser Trainingseffekt konnte bei übergewichtigen Mäusen auch ohne eine Gewichtsreduktion gezeigt werden (Kawanishi et al. 2010, Gleeson et al. 2011).

Ein weiterer potentieller Trainingseffekt ist die Herabregulation der TLR-Expression in verschiedenen Geweben. Monozyten im Blut von physisch aktiven Individuen zeigen in vitro eine reduzierte Entzündungsantwort auf eine Stimulation mit Endotoxinen und eine reduzierte Expression von TLR-4, was wiederum mit einer erniedrigten LPS-induzierten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen assoziiert ist. Der genaue Stimulus für die trainingsinduzierte Reduktion der TLR-Expression ist noch unklar, als potenzielle Einflussfaktoren werden antiinflammatorische Zytokine, Stresshormone und Hitzeschockproteine diskutiert. Zusätzlich werden durch regelmäßiges Training zirkulierende TLR-Liganden, wie z. B. gesättigte Fettsäuren reduziert (Gleeson et al. 2011, Lancaster und Febbraio 2014).

Desweiteren scheint die Reduktion proinflammatorischer Monozyten im Blut eine Rolle zu spielen. CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>-Monozyten exprimieren 2,5-mal mehr TLR-4 als andere Monozyten-Subgruppen und tragen entscheidend zum inflammatorischen Potenzial aller Monozyten bei. Nach einer akuten Trainingseinheit kommt es zu einem transienten Anstieg dieser proinflammatorischen Monozyten, welcher schnell reversibel ist. Regelmäßiges Training scheint den Anteil der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>-Monozyten zu reduzieren. So wurden bei inaktiven älteren Menschen doppelt so viele proinflammatorische Monozyten und höhere TNF- $\alpha$ -Spiegel im Blut nachgewiesen als bei sportlich aktiven. Sowohl die Anzahl an CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>-Monozyten als auch der TNF- $\alpha$ -Spiegel konnten in der inaktiven Gruppe durch 12 Wochen mit regelmäßigem Ausdauertraining deutlich reduziert werden. Diese Reduktion der proinflammatorischen Monozyten könnte zum antiinflammatorischen Effekt von Training beitragen (Timmerman et al. 2008, Gleeson et al. 2011).

Als einen weiteren immunmodulierenden Effekt physischer Aktivität konnte der Anstieg von regulatorischen T-Zellen ( $T_{Reg}$ ) nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass nach einem 12-Wochen Thai Chi Chuan-Trainingsprogramm die Anzahl der CD4CD25- $T_{Reg}$  im Blut deutlich erhöht war und dass isolierte mononukleäre Leukozyten der Probanden in vitro nach Antigenstimulation die  $T_{Reg}$ -Mediatoren TGF- $\beta$  und IL-10 in signifikant höherem Ausmaß produzierten (Yeh et al. 2006). Eine weitere Studie mit Mäusen zeigte, dass nur Training mit hoher Intensität eine Erhöhung von  $T_{Reg}$  sowie eine erniedrigte proinflammatorische und erhöhte antiinflammatorische Zytokinexpression zur Folge hatten. Dieser Effekt konnte bei moderatem Training nicht erreicht werden (Wang et al. 2012b). Eine Übersicht über mögliche immunmodulatorische Effekt des physischen Trainings ist Abbildung 4 zu entnehmen.



**Abbildung 4: Potentielle Effekte von physischer Aktivität auf den inflammatorischen Status**

Physisches Training führt über Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse zu einer gesteigerten Kortisolausschüttung und über das sympathische Nervensystem zu einer erhöhten Adrenalinfreisetzung. Durch den kontrahierenden Skelettmuskel wird IL-6 produziert. Zusätzlich reduziert physisches Training die Adipozytengröße sowie die Invasion von M1-Makrophagen ins Fettgewebe und den Wechsel des Phänotyps von M2- zu M1-Makrophagen, wodurch eine erhöhte Anzahl an M2-Makrophagen resultiert. Physische Aktivität steigert die Anzahl der regulatorischen T-Zellen und reduziert die Expression von TLR sowie die Anzahl proinflammatorischer CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>-Monozyten. Zusätzlich ist die Auswirkung der genannten Effekte auf die Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Zytokine dargestellt. *TNF- $\alpha$* : Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, *IL-1,-6,-10*: Interleukin-1,-6,-10,

*IL-1Ra*: Interleukin-1-Rezeptorantagonist, *T<sub>reg</sub>-Zelle*: regulatorische T-Zelle, Abbildung modifiziert nach Gleeson et al. 2011

Zusätzlich spielt eine Adaptation des Endothels durch wiederholtes physisches Training eine Rolle. Das Endothel ist ein Organ mit wichtigen autokrinen und parakrinen Funktionen, das multiple Mechanismen, wie z. B. die Vasodilatation, Leukozytenadhäsion, Thrombozytenaktivierung und Gerinnungsprozesse, reguliert. Wiederholte vaskuläre Scherkräfte im Rahmen des physischen Trainings steigern über eine Induktion der endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS, endothelial nitric oxide synthase) die NO-Freisetzung mit konsekutiver Vasodilatation. Zusätzlich führen Scherkräfte am Endothel auch zur Regulierung der SOD (Superoxid-Dismutase) und der Glutathionperoxidase, welche am Abbau von ROS beteiligt sind. Zwar tragen Scherkräfte während Training auch zur Bildung von Superoxiden bei, insgesamt ist der Gesamteffekt jedoch antioxidativ und protektiv vor höheren Scherkräften. Durch regelmäßiges Training wird, vermutlich NO-bedingt, ein Umbau induziert, der in einem vergrößertem Kapillardurchmesser resultiert. Dieser Prozess stellt einen Langzeitmechanismus zur Reduktion von Scherkräften dar, so dass die NO-Freisetzung im Verlauf regredient ist. Die Endothelfunktion ist zusätzlich empfindlich gegenüber oxidativem Stress. Hauptquelle für ROS in der Arterienwand ist die NADPH-Oxidase. Regelmäßiges Training induziert die Aktivität von antioxidativen Enzymen sowie der eNOS und reduziert die Aktivität der NADPH-Oxidase, daraus resultieren eine ROS-Reduktion und ein NO-Anstieg (Higashi und Yoshizumi 2004, Di Francescomarino et al. 2009). Der durch Training selbst verursachte oxidative Stress ist jedoch essentiell, um diese adaptiven antioxidativen Prozesse über Aktivierung entsprechender Signalwege zu initiieren. Zusätzlich kann durch regelmäßige physische Aktivität mittels VEGF und FGF die Angiogenese gefördert und so die Anzahl der Kapillaren gesteigert werden (Di Francescomarino et al. 2009).

Insgesamt konnte auch unabhängig vom Endothel gezeigt werden, dass Zellen, die rezidivierend mit geringen Mengen an oxidativem Stress exponiert werden, wie es auch bei physischem Training der Fall ist, die antioxidativen Abwehrmechanismen steigern. Das Resultat ist ein Schutz gegen auch höhere, normalerweise schädliche Level an oxidativem Stress. Bei der Induktion der Resistenz gegen oxidativen Stress

scheinen HSP70 und eine gesteigerte Biogenese von Mitochondrien eine entscheidende Rolle zu spielen (Fehrenbach et al. 2000).

Lymphozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten benötigen für eine effiziente Proliferation und Funktion eine ausreichende Menge an Glutamin, einer essentiellen Aminosäure, die hauptsächlich in der Leber, den Nieren und dem Skelettmuskel synthetisiert wird. Die Skelettmuskulatur ist stark involviert in die Synthese, Speicherung und Freisetzung von Glutamin. In vivo Studien an Menschen konnten zeigen, dass physisches Training die Glutaminfreisetzung aus dem Muskel fördert und so die Plasmaglutaminkonzentration steigert. Da in verschiedenen katabolen Situationen, wie z. B. Krebs und Sepsis, eine Reduktion der Glutaminkonzentration mit einer Schwächung der Funktion von Lymphozyten und Makrophagen assoziiert ist, wird der trainingsassoziierten Glutaminsteigerung ein potentiell protektiver Effekt zugeschrieben (Costa Rosa 2004, Neto et al. 2011). Glutamin scheint zusätzlich über eine Inhibierung proinflammatorischer Mediatoren, die über den NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert werden, antiinflammatorische bzw. immunregulatorische Eigenschaften aufzuweisen (Fillmann et al. 2007).

Insgesamt sind die Einflüsse des physischen Trainings auf das angeborene Immunsystem wahrscheinlich größer als auf das adaptive (Neto et al. 2011). Interessanterweise wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass viele der positiven immunmodulierenden Eigenschaften des Trainings auch unabhängig von einer Gewichtsreduktion auftreten (Lancaster und Febbraio 2014). Regelmäßiges physisches Training und physische Aktivität kann vor vielen chronischen Erkrankungen, wie z. B. Diabetes mellitus Typ II und Arteriosklerose, schützen. Dieser positive Effekt wird vermutlich durch antiinflammatorische und immunmodulatorische Effekte verursacht. Ob diese Mechanismen auch vor schweren Infektionskrankheiten, wie z. B. einer Sepsis, schützen oder dessen Verlauf positiv beeinflussen, ist dagegen bisher noch wenig und unvollständig erforscht (Wasinski et al. 2014).

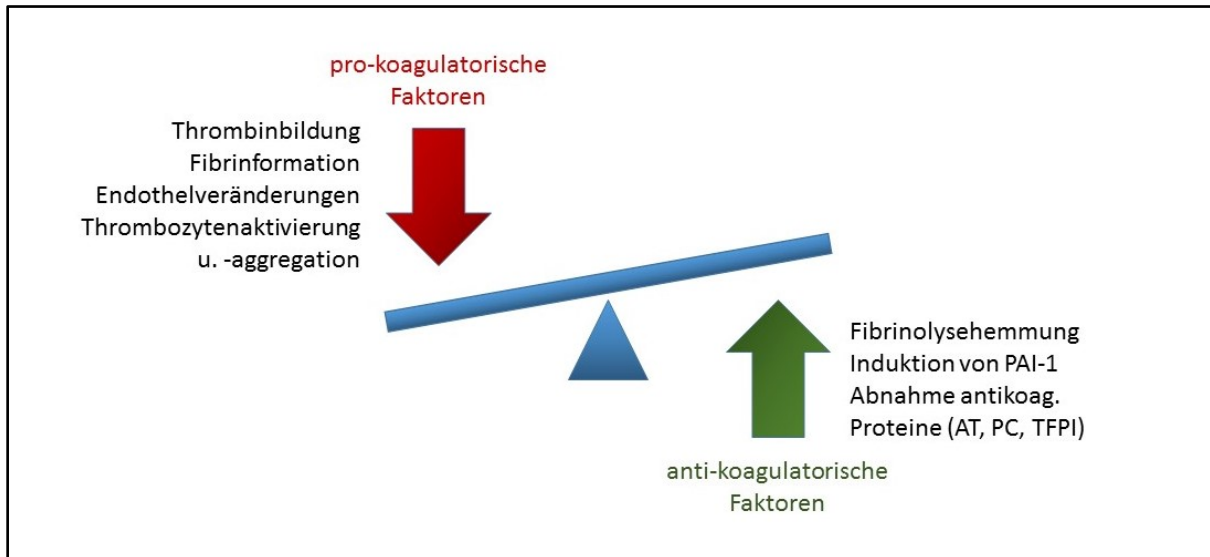
## 1.6 Organdysfunktion als Folge der Immunreaktion im Verlauf der Sepsis

Als Folge der generalisierten Entzündungsreaktion im Rahmen einer Sepsis entwickelt sich häufig eine Dysfunktion bis hin zum vollständigen Versagen multipler Organe. Als Ursachen werden neben Bakterien und ihrer Toxine vor allem die Zellen des unspezifischen Immunsystems und ihre proinflammatorischen Mediatoren verantwortlich gemacht, insbesondere dann, wenn die notwendige und angemessene Immunantwort auf einen infektiösen Stimulus von einem unkontrollierten Zytokinanstieg abgelöst wird (Bauer et al. 2006, Hotchkiss et al. 2013). Die daraus folgende Organschädigung ist multifaktorieller Genese. Im Fokus des Geschehens stehen Mikrozirkulationsstörungen und eine mikrovaskuläre Schrankenstörung, die entscheidend zum Sauerstoffmangel im Gewebe beitragen. Diese Gewebehypoxie wird durch Störungen auf verschiedenen Ebenen aggraviert. Neben einer unzureichenden O<sub>2</sub>-Aufnahme in der Lunge und einem durch Anämie bedingten eingeschränkten Sauerstoffgehalt des Blutes spielen der reduzierte Transport durch Herz-Kreislauf-Dysfunktion und die gestörte Sauerstoffabgabe und -utilisation im Gewebe eine entscheidende Rolle. Auch regionale Verteilungsstörungen und ein erhöhter Sauerstoffverbrauch durch Stress, Fieber und Hypermetabolismus tragen zum O<sub>2</sub>-Mangel im Gewebe bei (Bauer 2003, Schlegel et al. 2014, Bauer et al. 2006). Eine mikrovaskuläre Dysfunktion wird durch heterogene Pathologien im Blutfluss charakterisiert, unter anderem werden einige Kapillaren unterversorgt, während andere eine normale oder gesteigerte Perfusion aufweisen (Ince 2005).

Ein entscheidender Pathomechanismus auf mikrovaskulärer Ebene ist die endotheliale Dysfunktion und die daraus resultierende Schrankenstörung mit erhöhter Permeabilität des Endothels. Durch Defekte der sonst undurchlässigen Okkludenskontakte („tight junctions“) kommt es zur Extravasation von Flüssigkeit ins Interstitium, auch „capillary leak“ genannt. Dadurch vergrößert sich die Diffusionsstrecke des Sauerstoffs zur Zielzelle und die O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit wird reduziert. Außerdem erhöht sich durch den intravasalen Volumenmangel die Koagulabilität des Blutes, was wiederum über Mikrothrombenentstehung die Organdysfunktion aggraviert. Die Ödembildung durch extravasale Flüssigkeitsansammlung reduziert über einen erhöhten interstitiellen Druck zusätzlich

die mikrovaskuläre Perfusion (Lee und Slutsky 2010, Schlegel et al. 2014). Zu den Funktionen des Endothels gehört nicht nur ein regulierender Einfluss auf den Blutfluss, sondern auch auf die Gerinnung und die Immunreaktion. Diese beiden Systeme beeinflussen wiederum selbst die Mikrozirkulation (Ince 2005). Über die Induktion vasoaktiver Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenmonoxid (CO) und Endothelin-1 können proinflammatorische Mediatoren zusätzlich zu Störungen der Endothelfunktion und Perfusion beitragen. LPS und verschiedene proinflammatorische Zytokine steigern sowohl die Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel und somit die Anhaftung von Thrombozyten und Leukozyten als auch die Aggregation der Blutplättchen. Die Aktivierung, Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten tragen wahrscheinlich zur Mikrothrombenbildung, mechanischen Obstruktion der Kapillaren und zum Abfall der Thrombozyten im peripheren Blut bei. Insgesamt ist die Balance zwischen pro- und antithrombotischen Einflüssen auf die thrombozytäre und plasmatische Gerinnung, das Fibrinolysesystem und die Gefäßwandzellen während einer Sepsis in Richtung der intravasalen Gerinnungsaktivierung verschoben. Dabei steht eine enge bidirektionale Interaktion zwischen Inflammation und Gerinnungssystem im Vordergrund (Remick 2007, Bauer et al. 2006, Secor et al. 2010, Ince 2005). Die Störungen des Gerinnungssystems bei septischen Patienten können von einer geringen Aktivierung der Gerinnung bis hin zu einer manifesten disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC, disseminated intravascular coagulation) reichen und betreffen alle Komponenten des Hämostasesystems (Levi et al. 2013, Bauer et al. 2006). Im Zentrum der Aktivierung der plasmatischen Gerinnung steht die durch bakterielle Toxine und Zytokine induzierte Expression des Gewebefaktors (TF, tissue factor) auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen, was die Bildung von Thrombin stark steigert. (Shimaoka und Park 2008, Vollmar 2011, Bauer et al. 2006). Weiterhin tragen sepsisassoziierte Veränderungen im physiologischen Inhibitorsystem der plasmatischen Gerinnung (Antithrombin, tissue factor pathway inhibitor (TFPI) und Protein-C) und Hemmung des Fibrinolysesystems (gesteigerte Aktivität des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)) zur Hyperkoagulabilität bei. Die Entzündungsreaktion während einer Sepsis ist ein entscheidender Faktor im Prozess der Gerinnungsaktivierung. Im Gegenzug führt diese jedoch nicht nur über eine Mikrozirkulationsstörung und Gewebhypoxie wiederum zur Aktivierung der Entzündungsreaktion. Vielmehr tragen auch einzelne Mediatoren des

Gerinnungssystems, wie Thrombin und Faktor Xa, zur Aufrechterhaltung der Inflammation bei (Bauer et al. 2006). Eine Übersicht der Veränderungen des Hämostasesystems während einer Sepsis ist Abbildung 5 zu entnehmen.



**Abbildung 5: Veränderungen des Hämostasesystems während einer Sepsis**

Die systemische Entzündungsreaktion führt häufig zur Verschiebung des Gerinnungsgleichgewichts zugunsten pro-koagulatorischer Faktoren und dem Resultat der intravasalen Gerinnungsaktivierung. *PAI-1*: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, *AT*: Antithrombin, *PC*: Protein C, *TFPI*: tissue factor pathway inhibitor, Abbildung modifiziert nach Bauer et al. 2006

Störungen in der Sauerstoffverwertung sind vor allem durch eine mitochondriale Dysfunktion bedingt. Inflammatorische Prozesse verursachen neben einer funktionellen auch eine strukturelle Schädigung der Mitochondrien. Dadurch kann Sauerstoff nicht adäquat genutzt werden und die Energiegewinnung der Zellen wird eingeschränkt.

Alle diese Mechanismen auf verschiedenen Ebenen tragen entscheidend zur hypoxischen Zellschädigung und somit zur Entwicklung von Organdysfunktionen bis hin zum Multiorganversagen bei. Post-mortem-Studien zeigen das diese Organdysfunktionen wahrscheinlich nicht primär Folge von massivem Zelltod in Form von Apoptose oder Nekrose sind, sondern eventuell mehr einer funktionellen als einer strukturellen Störung der Zellen zu Grunde liegen (Bauer et al. 2006, Ince 2005, Rudiger et al. 2008, Secor et al. 2010).



Einen weiteren Pathomechanismus in der Entstehung von sepsisassoziierten Organschäden stellt der oxidative Stress dar. Aktivierte neutrophile Granulozyten und Makrophagen produzieren zur Erregerabwehr große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies. Durch den gleichzeitig vorliegenden Mangel an Antioxidanzien wie Glutathion und intrazellulärem ATP resultiert eine Störung des Gleichgewichts des Redoxsystems. Das Ergebnis sind reversible und irreversible Veränderungen an Proteinen, DNA und Lipiden, die zu Zell- und Organschäden und zu Gerinnungsstörungen führen (Bosmann und Ward 2013, Ince 2005).

Zu den besonders im Multiorganversagen betroffenen Organen zählen die Lunge, Leber, Niere sowie das Nerven- und Herz-Kreislaufsystem. Verschiedene Studien zeigen für die Prävalenz und die assoziierte Mortalität schwankende Angaben. Die Mortalitätsrate bei Dysfunktion der Leber und der Niere scheint höher zu sein als bei Fehlfunktionen der Lunge im Rahmen einer Sepsis, obwohl letztere die höhere Prävalenz aufweist (Hebert et al. 1993, Yan et al. 2014, Bellomo et al. 2017). Während der Sepsis kommt der Leber eine zentrale Rolle in der Wirtsantwort, der Beseitigung von infektiösen Stimuli und der Regulierung der Gerinnung zu. Außerdem kommt es zu einer Modulation der endokrinen Funktionen. Die Leberschädigung wird durch hämodynamische Komponenten, unter anderem in Sinne einer Hypoperfusion oder durch eine direkte und indirekte Zellschädigung durch Pathogene, Toxine und Zytokine verursacht (Yan et al. 2014, Nessler et al. 2012). Hepatische Schädigungen manifestieren sich unter anderem in Form einer sepsisinduzierten Cholestase, einer ischämischen Hepatitis oder von Leberabszessen (Trauner et al. 2003). Eine Leberdysfunktion oder ein Leberversagen tragen wiederum entscheidend zur Aggravation und Mortalität der Sepsis bei. Die pathophysiologischen Aspekte der Leber sind komplex. Das retikuloendotheliale System der Leber spielt eine entscheidende Rolle bei der Eliminierung von Bakterien aus der Blutbahn. Außerdem kommt es zu Hochregulierung der hepatischen Synthese der akute-Phase-Proteine. Insbesondere Kupferzellen produzieren proinflammatorische Zytokine (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, MCP-1) und andere gewebeschädigende Mediatoren (z. B. ROS) und können somit eine Schädigung der Leber und anderer Organe fördern. Zusätzlich beinhaltet die hepatische Wirtsantwort der Sepsis auch die Produktion antiinflammatorischer Mediatoren (z. B. IL-10). Viele leberständige Zellen stehen in kontinuierlichem Austausch mit zirkulierenden Immunzellen. Die Leber, als entscheidende Quelle

immunmodulatorischer Mediatoren im Rahmen einer Sepsis, kann somit sowohl über eine überschießende proinflammatorische Zytokinfreisetzung und einer daraus resultierenden Aggravation der systemischen Entzündungsreaktion als auch über eine Immunparalyse durch entzündungshemmende Parameter zur Steigerung der Mortalität beitragen. Daher steht die Regulierung der Leberfunktion und der hepatischen Immunantwort während einer Sepsis im Zentrum aktueller Sepsisforschung, mit dem Ziel, die Wirtsantwort und damit verbundene Organschäden positiv zu beeinflussen (Nessler et al. 2012, Yan et al. 2014).

Auch die Pathophysiologie des sepsisassoziierten Nierenversagens wird weiterhin kontrovers diskutiert und ist zu weiten Teilen noch nicht vollständig verstanden. In der Vergangenheit wurde die Ursache des sepsisinduzierten Nierenversagens in einer gestörten Mikrozirkulation aufgrund generalisierter renaler Hypoperfusion mit Zellschädigung und akuter Tubulusnekrose gesehen. Viele Studien haben jedoch widersprüchliche Daten gezeigt. Im Vergleich zur älteren Theorie mit makrovaskulär bedingter Ischämie, welche in Apoptose und Nekrose resultiert, scheinen nach aktueller Datenlage mikrozirkulatorische Dysfunktion, inflammatorische Prozesse und energetische Anpassungsreaktionen im Vordergrund der Pathogenese des Nierenversagens zu stehen und eher einen funktionellen Tubulusschaden zu initiieren (Zarbock et al. 2014). Insbesondere zu Beginn der Sepsis kommt es zu einer Vasodilatation mit erhöhtem Herzzeitvolumen und somit systemisch hyperdynamer Kreislaufsituation (John 2012). Es konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass ein Nierenversagen auch bei normalem oder erhöhtem renalem Blutfluss auftreten kann (Di Giandomasso et al. 2003). Potentielle Ursachen für einen Abfall der GFR trotz gesteigerter Nierenperfusion sind eine Umverteilung des intrarenalen Blutflusses von der Nierenrinde zum Nierenmark und eine im Verhältnis stärkere Vasodilatation des Vas efferens im Vergleich zum Vas afferens und ein damit verbundener Abfall des glomerulären Filtrationsdrucks. Zusätzlich reduzieren die interstitielle Flüssigkeitseinlagerung in der Niere mit Steigerung des intrakapsulären Drucks, eine Erhöhung des Drucks im Abdomen (z. B. Aszites) mit konsekutivem Anstieg des Drucks von extrakapsulär auf die Niere und die renale Kongestion den glomerulären Filtrationsdruck (Chvojka et al. 2008, John 2012). Über Faktoren, wie z. B. Aktivierung des Endothels und der Blutgerinnung sowie Aggregation und Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten, kommt es zu einer Obstruktion oder Okklusion der Kapillaren mit einer daraus folgenden

Gewebeischämie (Zarbock et al. 2014). Eine ausführliche Beschreibung ist unter den allgemeinen pathophysiologischen Aspekten der Sepsis bereits weiter oben in diesem Kapitel erfolgt. Zusätzlich besteht eine Assoziation zwischen einem akuten Nierenversagen und erhöhten proinflammatorischen Zytokinen, wie z. B. TNF- $\alpha$  (Murugan et al. 2010). Leukozyten, Zytokine, DAMPs, PAMPs und ROS können renale Tubuluszellen aktivieren, schädigen und funktionelle und metabolische Veränderungen hervorrufen. Die Folge sind intrazelluläre Adaptationen insbesondere der Mitochondrien zur Reduktion des Sauerstoffverbrauchs der Zellen. Dies scheint einen weiteren Zellschaden zu verhindern oder zu reduzieren. Insbesondere die frühe Phase des Nierenversagens ist eher durch einen funktionellen als durch einen strukturellen Parenchymschaden charakterisiert (Gomez et al. 2014, Zarbock et al. 2014). Durch eine sepsisassoziierte Schädigung der Niere kommt es mittels einer Flüssigkeitsretention im Körper und durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren durch die Niere selbst wiederum zur Aggravation des Multiorganversagens (John 2012).

Aus einer ausgeprägten Verminderung des peripheren Gefäßwiderstands mit daraus folgenden hohen Herzzeitvolumina resultiert insbesondere zu Beginn einer Sepsis eine hyperdynamische Herzkreislaufreaktion. Als Ursache wird unter anderem die überschießende NO-Freisetzung angesehen (Bauer et al. 2006). In dieser frühen hyperdynamischen Phase ist die Perfusion vieler Organe gesteigert und es ist ein Anstieg der Sauerstoffversorgung und des Sauerstoffverbrauchs nachweisbar. Daher wird die Rolle der globalen Ischämie als Hauptursache der Organdysfunktion vor allem in der hyperdynamischen Phase immer mehr angezweifelt. Nach dieser frühen Phase der Sepsis schließt sich eine spätere hypodynamische Kreislaufsituation mit Reduktion des Herzzeitvolumens, der Organdurchblutung sowie der Sauerstoffversorgung und Anstieg des peripheren vaskulären Widerstands an (Yang et al. 2002, Di Giantomasso et al. 2003).

## 2 Ziele der Arbeit

Die Sepsis, als komplexe systemische Entzündungsreaktion, ist mit einer hohen Prävalenz und Mortalitätsrate eine ernstzunehmende Erkrankung, deren Pathophysiologie im Ganzen noch lange nicht verstanden ist. Auch therapeutisch sind dadurch Grenzen gesetzt. Daher wäre es von hohem Interesse, neben neuen (supportiven) Therapieoptionen auch mögliche Adaptationsmechanismen zu erforschen, welche die natürliche Widerstandskraft des Körpers erhöhen, um die Überlebensraten zu steigern und das Outcome zu verbessern.

Für regelmäßiges physisches Training konnte ein protektiver Effekt für eine Vielzahl von Erkrankungen gezeigt werden. Zum Beispiel kann die Inzidenz von Diabetes mellitus Typ II, kardiovaskulären Erkrankungen und Karzinomen reduziert werden. Die Ursache liegt möglicherweise in den antiinflammatorischen Effekten von physischem Training. Diese werden unter anderem über eine Reduktion insbesondere des viszeralen Fettgewebes und einer konsekutiv reduzierten Freisetzung von Adipokinen induziert. Zusätzlich spielen eine gesteigerte Freisetzung von Kortisol, Adrenalin und IL-6, eine reduzierte Expression von Toll-like Rezeptoren, eine Hemmung der Infiltration des Fettgewebes mit Monozyten und Makrophagen sowie ein Phänotyp-Switch der Makrophagen hin zu M2-Makrophagen und eine damit verbundene Reduktion proinflammatorischer Zytokine eine Rolle. Zudem ist der Gesamteffekt des physischen Trainings im Körper antioxidativ und eine Resistenz gegenüber oxidativem Stress und hohen Scherkräften wird generiert.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob regelmäßiges physisches Training einen Einfluss auf die Mortalitätsrate einer polymikrobiellen Sepsis bei Mäusen hat. Ein besonderer Fokus sollte darüber hinaus auf der Untersuchung von funktionellen, morphologischen und molekularbiologischen Organveränderungen im Verlauf einer Sepsis und deren Abhängigkeit vom Trainingszustand liegen.

### **Hierzu wurden folgende Hypothesen formuliert:**

Der Trainingszustand beeinflusst die Überlebenswahrscheinlichkeit bei schweren bakteriellen Infektionen. Dieser Phänotyp spiegelt sich auf funktioneller, zellulärer und molekularbiologischer Ebene wider.
---

Zur Untersuchung der Arbeitshypothese wurden folgende Schwerpunkte definiert:

Als Voraussetzung für die Untersuchung der Arbeitshypothesen sollte eine randomisiert bestimmte Gruppe der Mäusepopulation ein sechswöchiges intensives kontinuierliches Laufbandtraining absolvieren. Der Zustand einer schweren bakteriellen Infektion bzw. einer Sepsis sollte mit einem modifizierten PCI - Modell (peritoneal contamination and infection, peritoneale Kontamination und Infektion) erreicht werden.

In einer ersten Untersuchung sollte die Wirtsreaktion der Mäuse im Verlauf der Sepsis anhand der Überlebenswahrscheinlichkeit und eines Clinical Severity Score evaluiert und zwischen den beiden Gruppen (trainiert, untrainiert) verglichen werden. Des Weiteren sollte ein allgemeiner Eindruck über den Trainingseffekt anhand von Parametern wie dem Körpergewicht und dem relativen Herzgewicht gewonnen werden.

Bei positivem Trainingseffekt auf das Überleben, sollte sich eine zweite Versuchsreihe anschließen, mit dem Ziel, die Wirtsreaktion der Mäuse phänotypabhängig zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (nach 6 und nach 24 Stunden) im Verlauf einer Sepsis anhand allgemeiner Parameter wie dem Blutbild, Zytokinkonzentrationen und der bakteriellen Keimlast und anhand organspezifischer Veränderungen zu evaluieren. An lebenswichtigen Organen (z. B. Leber, Niere) sollten die morphologische Gewebsintegrität, die Organfunktion und Mediatoren einer inflammatorischen Stressantwort, wie z. B. Hitzeschockprotein 70 (HSP70), Monoaminoxidase A (MAO-A) und Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien

0,1 % Ponceau S	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
0.9%iger Kochsalzlösung (NaCl)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
4 % PFA (Paraformaldehyd)	MORPHISTO GmbH (Offenbach am Main, Deutschland)
6X DNA Loading Dye	Fermentas (Waltham, USA)
Aceton	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Chlorhallhydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Entellan®	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Eosin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Glycerin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

Harris Hämatoxylin	MORPHISTO GmbH (Offenbach am Main, Deutschland)
Hirn-Herz-Glucose-Boullion	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ketamin	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH (Burgdorf, Deutschland)
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumjodat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
NuPAGE® Running Buffer (20X)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
PBS	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Periodsäurepulver	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Schiff'sches Reagenz	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

SDS	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
SYBR Green I	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
TBS	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Tissue-Tek OCT	Sakura Finetek Germany GmbH (Umkirch, Deutschland)
Tris	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
UltraPure™ Agarose	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Wasser DEPC behandelt, steril, autoklaviert	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Xylazin	Bayer AG (Leverkusen, Deutschland)
Xylol II	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Zitronensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)



### 3.2 Kits

**Tabelle 2: Kits und Inhalt**

<b>Kit/Firma</b>	<b>Inhalt</b>
BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit, BD Biosciences, Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)	Mouse IL-6 Capture Beads Mouse IL-10 Capture Beads Mouse MCP-1 Capture Beads TNF Capture Beads Mouse Inflammation PE Detection Reagent Mouse Inflammation Standards, lyophilized Cytometer Setup Beads PE Positive Control Detector FITC Positive Control Detector Wash Buffer Assay Diluent
Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma-Aldrich (München, Deutschland)	Bicinchoninic Acid Solution 4 %(w/v) CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O Solution Protein Standard Solution
cOmplete™ Lysis-M, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	Lysis-M Reagent cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets
Experion RNA StdSens Analysis Kit, Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)	RNA StdSens chips Spin filter Experion RNA StdSens Stain Experion RNA StdSens Loading Buffer Experion RNA Gel Experion™ RNA Ladder
Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate – Merck Millipore, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	Luminol Reagent Peroxide Solution
NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)	Cytoplasmic Extraction Reagent I (CER I) Cytoplasmic Extraction Reagent II (CER II) Nuclear Extraction Reagent (NER)
QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN (Hilden, Deutschland)	Buffer PE Wash buffer Buffer PBI Binding buffer QIAquick Spin Colum Collection Tubes

RevertAid first Strand cDNA Synthesis Kit, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	5x Reaction Buffer dNTP Mix (10mM) Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer Mix (100µM) Random Hexamer Primer (100µM) DEPC-treated water Revert Aid RT (200u/µl) RiboLock RNase Inhibitor (20u/µl)
RNA Standard Sens Kit, Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)	RNA Gel RNA Stain RNA Ladder Loading Buffer
RNeasy Mini Kit, QIAGEN (Hilden, Deutschland)	RPE Wash buffer concentrate RW1 Wash buffer RLT Lysis buffer RNase-free water

### 3.3 Lösungen

**Tabelle 3: Lösungen/Puffer und Zusammensetzung**

<b>Lösung/ Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Lämmli-Puffer	2 g SDS 5 ml $\beta$ -Mercaptoethanol 10 ml Glycerin 1 ml 1% Bromphenolblau 4 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8
TBS 10 X	12,11 g/ 0,1 M Tris 58,44 g/ 1 M NaCl mit Aqua tridest. auf pH 7,6 eingestellt
TBS 1 X	100 ml TBS 10 X 900 ml Aqua tridest.
TBS-Tween 1 X	100 ml TBS 10 X 900 ml Aqua tridest. 1 ml Tween 20
Lysepuffer	11 mM Tris-HCl (pH 7,5) 250 mM Saccharose 1 mM EDTA
TAE-Puffer 10 X	400 mM Tris 10 mM EDTA mit 98%iger Essigsäure auf pH 8 eingestellt mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt

### 3.4 Geräte, Software und sonstige Materialien

Aida Image Analyzer 3.5.2 Software	Elysia-raytest GmbH (Straubenhardt, Deutschland)
Automated Hematology Analyzer poch-100iV Diff	Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Axio Vision Software Rel. 4.6	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, (Oberkochen, Deutschland)
Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
DNA Engine®Peltier ThermalCycler	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Excel	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Experion RNA StdSens Chip	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Experion™ Automated Electrophoresis System:	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Experion™ Automated Electrophoresis Station	
Experion™ Vortex Station II	
Experion Priming Station	
Experion Software	
FACScan™	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
FCAP Array™ Software	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Fuji DRI-CHEM 3500i	FUJIFILM Europe GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
G:BOX F3	Syngene (Cambridge, UK)
Gel Blotting Paper, GB002	Whatman Schleicher & Schuell GmbH, (Dassel, Deutschland)
GeneSnap	GSL Biotech LLC (Chicago, USA)

GraphPad Prism 5.0 Software	GraphPad Software (San Diego, USA)
Hamilton 702 N 25ul Syringe (22s/51/2)	Hamilton Germany GmbH (Gräfelfing, Deutschland)
IBM® SPSS® Statistics 19	IBM Deutschland GmbH (Ehningen, Deutschland)
Laufband Modell T70	Tunturi® (Almere, Niederlande)
Luminescent Image Analyser LAS-3000	FUJIFILM Europe GmbH (Düsseldorf, Deutschland)
Magnetrührer Hei-Mix S	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, (Kehlheim, Deutschland)
Metall-Block-Thermostat MBT 250 (Heizgerät)	ETG Entwicklungs- und Technologie Gesellschaft mbH Ilmenau (Ilmenau, Deutschland)
Mikroplattenreader	MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland)
Mikroskop Provis AX70	Olympus Winter & Ibe GmbH (Hamburg, Deutschland)
Mini-Taumel-Wipptisch WT17	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
NanoDrop® 2000c	Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
NuPAGE® Novex® 10% Bis-Tris Gels (1.5-mm thick, 15-well)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Precision Liquid Handling System CAS-1200™ (Pipettierroboter)	Corbett Life Science (Mortlake, Australien)
QIA cube	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
QIAquick spin column	QIAGEN (Hilden, Deutschland)

Rotor-Gene Rotary Analyzer	Corbett Life Science (Mortlake, Australien)
Rotor-Gene™ 6000 Software	Corbett Life Science (Mortlake, Australien)
SpeedMill P12	Analytik Jena GmbH (Jena, Deutschland)
ThermoMixer Comfort	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
TissueLyser (Kugelmühle)	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
Transfermembran Roti®-PVDF, Porengröße 0,45 µm, Bindung hydrophob	Carl Roth GmbH + Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
ULTRA-TURRAX®	IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Vortex-Genie 2 V	Scientific Industries (New York, USA)
XCell II™ Blot Module	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
XCell SureLock Mini-Cell Elektrophoresekammer	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

### 3.5 Versuchstiere

In dieser Studie wurden erwachsene männliche Mäuse des Stammes C57BL/6NCrl (12 Wochen alt, Körpergewicht 25-30 g; Firma Charles River, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in einem Tag-Nacht-Rhythmus (14:10 h), einer Raumtemperatur von  $23 \pm 1$  °C und einer Luftfeuchtigkeit von 40 – 60 % gehalten. Sie erhielten Standardnagerfutter in Pelletform und Wasser ad libitum. Alle Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz und wurden von der zuständigen Tierschutzkommission genehmigt (Tierversuchsantrag Reg. Nr. 02-10/10).

### 3.6 Trainingsprogramm

Die Tiere wurden zu Beginn der Studie randomisiert einer Trainings- und einer Kontrollgruppe zugewiesen. Das Trainingsprogramm bestand aus freiwilligem Laufradtraining im Käfig und einem progressiven Intervalltraining auf dem Laufband über sechs Wochen. In der Trainingsgruppe wurden alle Käfige mit einem Laufrad und mit einem magnetischen Zähler ausgestattet, über den die Anzahl an vollständig durchgeführten Umdrehungen der Laufräder bestimmt werden konnte. Für das Ausdauertraining wurde der von Kemi et al. etablierte Trainingsplan modifiziert angewandt (Kemi et al. 2002). Dieser Trainingsplan stellt eine gute Methode dar, um die physische Leistungsfähigkeit der Tiere, durch Steigerung der Herzleistung und des maximalen Sauerstoffverbrauchs, zu erhöhen. Das Training wurde in der Nachtphase der Mäuse durchgeführt. Die Tiere der Trainingsgruppe wurden eine Woche vor Beginn des Trainings an das Laufband gewöhnt. Dafür liefen sie an 2 Tagen bei 0,6 km/h für 20 Minuten, gefolgt von 3 Tagen Intervalltraining (Trainingsgeschwindigkeiten siehe 1. Trainingswoche) für jeweils 25 Minuten. Das anschließende Ausdauertraining wurde 5 Tage pro Woche durchgeführt, gefolgt von 2 Tagen Trainingspause und enthielt eine stufenweise Steigerung der Trainingsdauer und -intensität. Während des Trainings wechselten sich Intervalle mit hoher Intensität (HI) für 8 Minuten und solche mit niedriger Intensität (NI) für 2 Minuten ab. Der Trainingsplan für die jeweilige Woche kann Tabelle 4 entnommen werden.

**Tabelle 4: Trainingsprogramm**

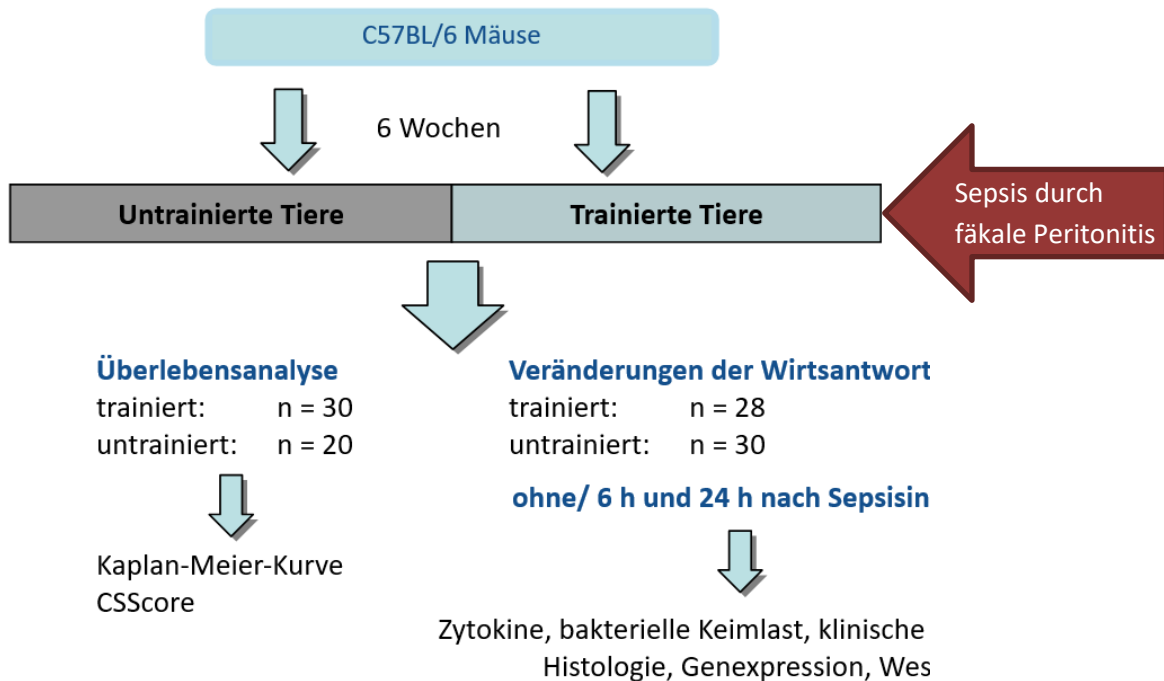
Woche	Geschwindigkeit [km/h]	HI	Geschwindigkeit [km/h]	NI	Trainingsdauer [min]
1.	1		0,6		30
2.	1		0,6		40
3.	1		0,6		50
4.	1		0,6		50
5.	1		0,6		60
6.	1,1		0,7		60

*HI*: hoher Intensität, *NI*: niedriger Intensität

Vor Beginn jedes Trainings fand ein Aufwärmprogramm bei 0,5 km/h für 5 Minuten statt. Die Steigung des Laufbandes lag während allen Trainingseinheiten konstant bei 12 %. Eine Stahlelektrode am Ende jeder Laufbahn konnte einen elektrischen Impuls (0,8 mA) abgeben, um die Tiere zu einem kontinuierlichen Training zu motivieren. Um gleiche Umgebungsbedingungen zu sichern, wurden die Kontrolltiere zwei Mal pro Woche für 30 Minuten auf das Laufband gesetzt, ohne dass sie darauf trainierten.



### 3.7 Studiendesign, Sepsisinduktion, Organentnahme



#### Abbildung 6: Studiendesign

*n*: Anzahl, CSScore: Krankheitsschwerescore (Clinical Severity Score)

Für die Überlebensstudie wurden 30 Tiere wie oben beschrieben trainiert und 20 dienten als Kontrolle. Eine Maus aus der Trainingsgruppe konnte nicht zum Laufen animiert werden und wurde deswegen aus dem Experiment ausgeschlossen. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mit Hilfe einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

Zur Untersuchung trainingsassoziiert pathophysiologischer Veränderungen wurden Blut, Gewebe und Organe von 28 trainierten und 30 untrainierten Mäusen zu drei verschiedenen Zeitpunkten (ohne Sepsisinduktion, 6 und 24 Stunden nach Sepsisinduktion) entnommen.

Die Induktion der polymikrobiellen Sepsis erfolgte am dritten Tag nach der letzten Trainingseinheit. Als Grundlage diente die von Gonnert et al. beschriebene und charakterisierte PCI-Methode (peritoneal contamination and infection) (Gonnert et al. 2011). Dabei wurde den Tieren mittels intraperitonealer Injektion einer aufgearbeiteten humanen Stuhlsuspension eine multibakterielle Peritonitis induziert. Als Erstes wurde eine humane Stuhlprobe mit 0.9%iger Kochsalzlösung im Verhältnis 1:4 verdünnt. Für die Induktion der Peritonitis wurden allen Tieren mit

einer 21G-Nadel 3,0 ml/kg Körpergewicht der Stuhlsuspension in den rechten unteren Quadranten des Abdomens narkosefrei injiziert.

Die Organ- und Blutentnahme erfolgte in tiefer Narkose. Diese wurde durch die intraperitoneale Injektion einer Narkoselösung aus Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (6,5 mg/kg) eingeleitet. Die Mäuse wurden daraufhin durch Direktpunktion des rechten Ventrikels und Entnahme des gesamten Blutvolumens getötet. Anschließend wurden den Tieren Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Musculus quadriceps und Musculus biceps entnommen. Die Organe wurden kurz in PBS gespült, danach gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Weitere vorbereitende Maßnahmen an den Organen sind in den Kapiteln zur jeweiligen Methode erklärt. Eine Übersicht des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 6 dargestellt.

### **3.8 Krankheitsschwerescore (Clinical Severity Score)**

Für die Einschätzung des Allgemeinzustandes der Tiere während der Sepsis wurde von zwei unabhängigen Beobachtern zu drei determinierten Zeitpunkten ein Krankheitsschwerescore (Clinical Severity Score) nach der Vorlage von Gonnert et al. erhoben (Gonnert et al. 2011). Die Evaluierung fand verblindet statt. Durch die Beobachter wurden folgende Merkmale bewertet: spontane Aktivität, Reaktion auf externe Stimuli und Körperhaltung. Es konnten Punkte zwischen 1 (keine Zeichen einer Erkrankung) und 5 (Tod) vergeben werden. Aus der Summe der Punkte für die verschiedenen Kriterien ergab sich der Gesamtwert für jedes Tier. Verstorbene Tiere wurden bei der weiteren Betrachtung zensiert.

### **3.9 Blutbild-Bestimmung**

Die Blutbildbestimmung wurde mit Hilfe des automatischen Hämatologie Analysers POCH-100iV Diff durchgeführt. Dieses Analysesystem basiert auf dem Prinzip der Impedanzmessung. Unter Zuhilfenahme der hydrodynamischen Fokussierung werden Erythrozyten- und Thrombozytenanzahl im Gerät in einem gemeinsamen Messvorgang bestimmt. Die Zählung der Leukozyten dagegen erfolgt nach vorheriger Lyse der Erythrozyten separat. Es wurden von 8 - 10 Tieren je Gruppe 15 µl EDTA-antikoaguliertes Blut untersucht.

### 3.10 Klinische-Chemie-Messung

Mit dem Fuji DRI-CHEM 3500i Analysesystem wurden aus Plasmaproben von 6 - 10 Tieren aus jeder Gruppe vier verschiedene Parameter gemessen. Dazu gehörten neben den Leberschädigungsmarkern Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT), auch Blut-Harnstoff-Stickstoff und Kreatinin, welche zur Evaluierung der Nierenfunktion dienten. Für die Herstellung der Plasmaproben wurde EDTA-antikoaguliertes Blut direkt nach der Entnahme bei 2.220 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand bzw. das so gewonnene Plasma wurde in ein neues Tube übertragen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Untersuchung am Fuji DRI-CHEM 3500i Analysesystem wurden die Plasmaproben auf Eis aufgetaut, gut gevortext und anschließend vermessen. Der Automat pipettiert 10 µl Probe auf einen Chip und inkubiert diesen bei 37 °C je nach Parameter für eine definierte Zeit. Die Messchips bestehen aus mehreren Schichten und parameterabhängig finden verschiedene Reaktionen statt, welche eine Farbreaktion verursachen. Zuletzt misst der Automat spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 505 nm die Dichte der optischen Reflektion. Aus dieser berechnet das Gerät über Kalibriergeraden die Konzentration des jeweiligen Parameters.

### 3.11 Genexpressionsanalysen

#### 3.11.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Für die RNA-Isolierung diente homogenisiertes Nierengewebe von 4 Mäusen je Gruppe als Ausgangsmaterial. Jeweils ca. 30 mg Gewebe wurden auf Trockeneis von gefrorenen Nieren separiert und anschließend in 600 µl RLT Lysepuffer gelöst, welcher zuvor im Verhältnis von 1:100 mit β-Mercaptoethanol versetzt wurde. Der Zellaufschluss erfolgte mechanisch mittels einer Kugelmühle für 4 Minuten bei 30 Impulsen pro Sekunde. Die homogenisierten Proben wurden für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert und das Pellet verworfen. Mit 600 µl des Überstands jeder Probe erfolgte die RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits im QIA cube. Dafür wurden zuerst 11 ml des RPE Waschpufferkonzentrat mit 44 ml 70%igem Ethanol versetzt, anschließend der QIA cube nach Herstelleranleitung mit RNase-freiem Wasser, RW1 Waschpuffer, 70%igem Ethanol und dem verdünnten RPE Waschpuffer bestückt und die RNA-Isolierung gestartet. Um die Löslichkeit der RNA

zu erhöhen, wurden die Proben nach der Isolation für 5 Minuten bei 60 °C erwärmt und anschließend auf Eis gelagert.

### 3.11.2 Spektralphotometrische RNA-Konzentrationsbestimmung

Nach der RNA-Isolation wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrops® 2000 spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, bestimmt. Die Probe überbrückt durch das Bilden einer Flüssigkeitssäule die Lücke zwischen zwei Glasfaserkabeln. Dies ermöglicht einem Spektralphotometer mit Hilfe eines linearem CCD-Arrays die Transmission des von einer Xenon Blitzlampe emittierten Lichts durch die Probe zu analysieren. Zunächst wurde am Gerät die Lichttransmission von 1 µl RNase-freiem Wasser bestimmt und als Referenzwert gespeichert. Anschließend erfolgte eine Doppelbestimmung der transmittierten Lichtintensität in jeweils 1 µl Probe. Über den negativen Logarithmus des Quotienten von Intensität der Probe und Intensität der Referenzlösung wurde vom Gerät die Absorbanz bei einer Wellenlänge von 260 nm, kurz  $A_{260}$ , und über diese mittels Lambert-Beer'schem Gesetz und einem Extinktionskoeffizienten von  $40 \text{ ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  für RNA die Nukleinsäurekonzentration bestimmt. Ein Absorbanzwert von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl. Erste Aussagen zur Reinheit konnten durch die Bildung des Quotienten aus  $A_{260}$  und  $A_{280}$  getroffen werden. Bei einer Wellenlänge von 280 nm haben Proteine ihr Absorptionsmaximum. Bei RNA ohne Proteinverunreinigung ist ein Verhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  von 2 zu finden. Ist der gemessene Wert geringer, kann neben einer Verunreinigung durch Proteine auch eine Kontamination durch Phenol und andere aromatische Substanzen, die bei oder nahe einer Wellenlänge von 280 nm stark absorbieren, der Grund sein. Im weiteren Verlauf wurden nur Proben verwendet, die einen Quotienten  $\geq 2$  aufwiesen.

### 3.11.3 RNA-Qualitätskontrolle

Für die Analyse der Genexpression ist eine hohe Qualität der isolierten RNA essentiell. Vor allem die Integrität und eine mögliche Verunreinigung durch DNA muss kontrolliert werden. Dafür wurden die Experion™ Automated Electrophoresis Station zusammen mit den Experion™ RNA StdSens Chips und dem Experion RNA StdSens Analysis Kit nach Herstellerangaben verwendet. Das System führt in

sogenannten „Microfluid-Chips“ eine Kapillar-Elektrophorese durch. Durch Elektroden wird eine Spannung angelegt, welche die Migration geladener Teilchen der Proben in den Separierungskanal des Chips induziert. Auf Grund des darin enthaltenen Gels, durchwandern die Moleküle den Kanal je nach Größe unterschiedlich schnell und werden somit aufgetrennt. Ein Fluoreszenzfarbstoff interkaliert zwischen die Basen von Nukleinsäuren. Durch Laseranregung wird anschließend eine Fluoreszenz des an RNA oder DNA gebundenen Farbstoffs induziert. Diese wird von einer Photodiode detektiert und die Experion Software stellt die Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit dar, um so ein Elektropherogramm zu erstellen. Aus diesen Daten wird ein virtuelles Gelelektrophoresebild generiert.

Mit dem Experion RNA StdSens Analysis Kit können Proben mit einer RNA-Konzentrationen zwischen 5 – 500 ng/µl untersucht werden. Proben, die diese Obergrenze überschritten, wurden mit DEPC behandeltem Wasser verdünnt. Danach wurden 2 µl aller Proben und 1,3 µl RNA Ladder mittels eines Thermocyclers 2 Minuten bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Die Reagenzien des Kits mussten für 15 Minuten bei Raumtemperatur equilibriert werden. Zur weiteren Vorbereitung wurden zunächst 600 µl RNA Gel in einen Spinfilter gegeben und bei 1.500 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend konnte eine sogenannte GS-Lösung hergestellt werden, dafür wurden 65 µl des zentrifugierten RNA Gels in ein frisches RNase freies Reaktionsgefäß pipettiert und mit 1 µl RNA Stain versetzt. Von dieser Lösung wurden 9 µl in die dafür vorgesehene Probenvertiefung (Well) des Chips pipettiert und dieser anschließend in der Experion Priming Station platziert. Dort wurde das Programm „B1“ gestartet und der Chip nach 30 Sekunden wieder entnommen. Nachdem die Quarzglasoberfläche des Chips auf Luftblasen überprüft wurde, konnten erneut 9 µl der GS-Lösung und 9 µl des RNA Gels in die entsprechenden Wells des Chips gefüllt werden. Der Loading Buffer wurde gut gevortexed, 5 µl in alle übrigen Wells gegeben und anschließend mit jeweils 1 µl Probe oder mit 1 µl RNA Ladder versetzt. Der fertig befüllte Chip wurde in der Experion™ Vortex Station II gevortexed, danach in die Experion™ Station eingesetzt und die Elektrophorese gestartet.

Auf dem virtuellen Gelelektrophoresebild sollten eine deutliche und scharf abgrenzbare 28S- und eine 18S-rRNA-Bande zu sehen sein. Verschwommene oder zusätzliche Banden können Hinweise auf eine Degradation der RNA oder eine Kontamination mit anderen Nukleinsäuren wie genomische DNA oder tRNA sein. Zur

Beurteilung der Degradation wird von der Experion Software zusätzlich ein RNA-Qualitäts-Indikator (RQI) berechnet. Dieser kann Werte zwischen 1 (degradierte RNA) und 10 (intakte RNA) annehmen. Für die weiteren Untersuchungen wurden nur Proben verwendet, die ein unauffälliges Bandenmuster im Gelelektrophoresebild und einen RQI-Wert von  $\geq 7$  aufwiesen. Die Qualität der Proben war somit als gut einzustufen.

### 3.11.4 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription

Die Reverse Transkription diente der Synthese von cDNA aus der isolierten RNA und wurde mit Hilfe des Fermentas RevertAid™ first Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt. Die Synthese erfolgte entsprechend des Protokolls zum Kit. Im ersten Schritt wurde jeweils 1  $\mu\text{g}$  RNA der Proben mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Endvolumen von 9,8  $\mu\text{l}$  verdünnt. Danach erfolgte die Zugabe von 1,2  $\mu\text{l}$  Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer Mix (100  $\mu\text{M}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  Random Hexamer Primer (100  $\mu\text{M}$ ). Oligo-dT-Primer binden spezifisch am Poly-A-Schwanz der mRNA, Random-Hexamer-Primer dagegen unspezifisch an allen RNA-Populationen. Als Nächstes wurden die Proben mittels Thermocycler für 5 Minuten auf 65 °C erwärmt, um die Primerhybridisierung zu initiieren und anschließend für 2 min bei 4 °C abgekühlt. Im zweiten Schritt wurden 8  $\mu\text{l}$  Maininkubationsmix (siehe Tabelle 5) zu allen Proben hinzugegeben. Danach erfolgte mittels Thermocycler für 5 Minuten bei 25 °C und anschließend für 60 Minuten bei 42°C die cDNA-Synthese. Das Reaktionsende wurde durch die Erhitzung der Proben für 5 Minuten auf 70 °C und die damit verbundene Deaktivierung der Enzyme erreicht. Am Ende der cDNA-Synthese wiesen alle Proben ein Volumen von 20  $\mu\text{l}$  und eine DNA-Konzentration von 50 ng/ $\mu\text{l}$  auf. Die cDNA wurde bei -20 °C bis zur Verwendung tiefgefroren.

**Tabelle 5: Zusammensetzung Maininkubationsmix für die Reverse Transkription**

Reagenz	Volumen pro Reaktion
5 X Reaction Buffer	4 $\mu\text{l}$
dNTP Mix (10 mM)	2 $\mu\text{l}$
Revert Aid RT (200 u/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
RiboLock RNase Inhibitor (20 u/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>8 <math>\mu\text{l}</math></b>

### 3.11.5 Quantitative Real-time PCR

Bei der quantitative Real-time PCR (qRT-PCR, quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) wird der zunächst inaktive Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet. Dieser bindet während der DNA-Synthese an die DNA-Stränge und wird so aktiviert. Das Fluoreszenzsignal wird in jedem Zyklus gemessen und gibt so Rückschlüsse auf die Menge der amplifizierten DNA. Eine entscheidende Größe ist der so genannte Cycle Threshold (Ct) oder Schwellenwertzyklus. Dieser gibt an, in welchem Zyklus das Fluoreszenzsignal einer Probe erstmals einen definierten Schwellenwert (Threshold) übersteigt und ist somit indirekt proportional zur Anzahl der Startkopien.

Als Untersuchungsmaterial für die qRT-PCR fungierte die bei der reversen Transkription gewonnene cDNA (siehe 3.11.4). Untersucht wurde die Genexpression von MAO-A, HSP70 und Hif-1 $\alpha$ . Zusätzlich wurde die Expression von Hmbs, Act $\beta$ , GAPDH und Hprt1 exploriert, um dadurch das stabilste Housekeeping-Gen zu eruieren. Die cDNA-Konzentration der Proben von 50 ng/ $\mu$ l in einem Volumen von 20  $\mu$ l wurde mit 180  $\mu$ l DEPC-behandeltem Wasser auf eine cDNA-Konzentration von 5 ng/ $\mu$ l verdünnt. Außerdem wurden die als Lyophilisat vorliegenden Primer nach Herstellerangaben resuspendiert, so dass Stocklösungen für Vorwärts- und Rückwärtsprimer mit jeweils einer Konzentration von 100  $\mu$ M entstanden. Die jeweiligen Primer-Sequenzen fw/rv (Firma biomers.net GmbH) können Tabelle 6 entnommen werden.

**Tabelle 6: Primer-Sequenzen real-time-PCR**

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
m_MaoA_118bp_fw	5'-atg gaa ggt gca gtt gaa gc-3'
m_MaoA_118 bp_rv	5'-gag ctg gaa cat cct tgg ac-3'
m_HSP70_145bp_fw	5'-ggc tga caa gaa gaa ggt gc-3'
m_HSP70_145bp_rv	5'-ctg gta cag ccc act gat ga-3'
m_Hif1a_101bp_fw	5'-gcc tta agc tgt ctg cca ct-3'
m_Hif1a_101bp_rv	5'-ttt tcg ctt cct ctg agc at-3'
m_Hmbs_98bp_fw	5'-gaa atc att gct atg tcc acc a-3'
m_Hmbs_98bp_rv	5'-gcg ttt tct agc tcc ttg gta a-3'
m_Actb_92bp_fw	5'-gct ctt ttc cag cct tcc tt-3'
m_Actb_92bp_rv	5'-cgg atg tca acg tca cac tt-3'
m_GAPDH_164bp_fw	5'-caa cag caa ctc cca ctc ttc-3'
m_GAPDH_164bp_rv	5'-ggg cca ggg ttt ctt act cct t-3'
m_Hprt1_94bp_fw	5'-tga cac tgg caa aac aat gca-3'
m_Hprt1_94bp_rv	5'- ggt cct ttt cac cag caa gct-3'

Firma biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland)

Anschließend wurden die verschiedenen Primermixe aus 20 µl Vorwärts-Primer, 20 µl Rückwärts-Primer und 960 µl DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. Die Konzentration beider Primer betrug somit im Primermix jeweils 2 µM. Alle folgenden Pipettierschritte wurde mit Hilfe des Precision Liquid Handling System CAS-1200™ durchgeführt. Das System wurde mit Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix, Primer-Mix, DEPC behandeltem Wasser und den Proben bestückt. Für die PCR-Reaktion bereitete der Pipettierroboter einen Supermix aus Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix und Primer-Mix im Verhältnis von 2:1 vor, um anschließend 15µl dieses Supermixes in alle Reaktionsgefäße vorzulegen. Danach wurden jeweils 5 µl jeder Probe oder 5 µl DEPC behandeltes Wasser als Negativkontrolle dazugegeben. Im Anschluss daran wurde die real-time-PCR mittels Rotor-Gene rotary analyzer durchgeführt. Die genaue Programmierung und der PCR-Ablauf sind Tabelle 7 zu entnehmen.



Tabelle 7: Ablauf der real-time-PCR mit Darstellung der Zyklusschritte und -anzahl

Zyklusschritt	Temperatur [C°]	Dauer	Zyklusanzahl
1. Polymerase Aktivierung/ primäre Denaturierung	95	10 min	1
2. Denaturierung	95	15 s	} 42
3. Primerhybridisierung (Annealing)	60	30 s	
4. Elongation/Extension	72	30 s	
5. Finale Elongation	95		1

### 3.11.6 DNA-Aufreinigung

Mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits wurde nach Herstellerangaben die amplifizierte DNA von Primern, Polymerasen, Nukleotiden und Salzen gereinigt. Das Kit ist für Fragmente von 100 bp bis 10 kb geeignet. Für jeden Primer wurden die PCR-Produkte von 5 randomisiert ausgewählte Proben gepoolt. Um ein Gesamtvolumen von 100 µl zu erreichen, wurden von den 5 Proben die jeweils vorhandenen 20µl entnommen und zusammen in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden in dieses 500 µl PBI Bindungspuffer pipettiert. Danach wurde eine QIAquick spin column in eine 2 ml collection tube platziert und die Proben auf die Säule gegeben. Im Anschluss daran wurde 1 Minute bei einer maximalen Drehzahl von 16.000 x g zentrifugiert und so die DNA in der QIAquick spin column gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen, 750 µl PE Waschpuffer zugegeben und erneut 1 Minute bei 16.000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde abermals verworfen. Anschließend wurde die Säule erneut wie in den Schritten davor zentrifugiert, danach in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 30 µl DEPC-behandeltes Wasser dazugegeben und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde ein letztes Mal 1 Minute bei 16.000 x g zentrifugiert, um die DNA zu eluieren.

### 3.11.7 Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis der PCR-Produkte bzw. deren Größe erfolgte mittels Gelelektrophorese. Als Erstes wurde der TAE-Puffer 10 X 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt und dann 40 ml mit 0,6 g Agarose versetzt, um ein 1,5%iges Gel zu

erhalten. Das Gelgemisch wurde in der Mikrowelle erhitzt bis es homogen erschien und anschließend nach kurzer Abkühlphase mit 5 µl SYBR Green I versetzt. Danach wurde das Gemisch in die Gelkammer gefüllt und lichtgeschützt gelagert, bis das Gel ausgehärtet war. Anschließend wurde dieses in die Gelelektrophoreseapparatur gelegt, die Kammer mit TAE-Puffer 1 X gefüllt und der Kamm aus dem Gel entfernt. 2 µl der gereinigten DNA (siehe Punkt 3.11.6) wurden mit 3 µl Loading Dye versetzt. In die Geltaschen wurden anschließend 5 µl der Proben und 1 µl Größenstandard (Low Range DNA Ladder) pipettiert und die Elektrophorese bei einer Spannung von 90 V für zwei Stunden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der G:Box F3 (Firma Syngene) und dem Programm GeneSnap. Mittels des Geräts G:Box F3 wurde ein Bild des Gels aufgenommen und digitalisiert. Anhand des Ladders konnte die Größe der einzelnen PCR-Produkte abgelesen und mit den Datenblättern der Primer verglichen und auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

#### 3.11.8 Spektralphotometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten DNA wurde analog zur Bestimmung der RNA-Konzentration spektralphotometrisch am NanoDrop® 2000 durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurden nur Proben verwendet, die einen Quotienten von  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$  aufwiesen. Dies gilt für DNA als Referenzwert um eine Verunreinigung durch Proteine auszuschließen.

#### 3.11.9 Effizienzbestimmung und Auswahl des Housekeeping-Gens

Für jeden Primer wurde die Effizienz der Real-time PCR bestimmt. Diese diente einerseits als Qualitätskontrolle der PCR und zusätzlich wurde die Effizienz für die Auswahl eines geeigneten Housekeeping-Gens und für die relative Quantifizierung der qRT-PCR-Daten benötigt. Dazu wurde zu Beginn die aufgereinigte DNA mit DEPC-behandeltem Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. Die anschließende Verdünnungsreihe wurde mit Hilfe des Precision Liquid Handling System CAS-1200™ pipettiert. Beginnend bei 10 ng/µl wurden die Proben zunächst auf 1 ng/µl vorverdünnt und anschließend sieben Verdünnungsstufen mit einer Verdünnung von 1:10 vom System pipettiert. Danach wurde die PCR wie in Punkt 3.11.5 beschrieben durchgeführt. Mit Hilfe der Software Rotor-Gene™ 6000 wurden die Ct-Werte graphisch gegen den dekadischen Logarithmus der Verdünnungsstufen

aufgetragen, eine lineare Regressionsgerade erstellt und mittels des Anstiegs der Geraden die PCR-Effizienz der Primer bestimmt (siehe Abb. 7). Ein Wert von 2 entspricht einer Effizienz von 100 %.

$$E = 10^{\frac{-1}{m}}$$

**Abbildung 7: Formel zur Berechnung der qRT-PCR-Effizienz eines Primers**

*E*: Effizienz, *m*: Anstieg der Regressionsgeraden, *qRT-PCR*: quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Für die Auswahl des optimalen Housekeeping-Gens wurde für Hmbs, Act-β, GAPDH und Hprt1 eine Potenz aus Effizienz des jeweiligen Primers hoch einer Differenz der Genexpression (Ct-Werte) der Kontrollgruppe und der Ct-Werte der einzelnen Tiere aus den verschiedenen Interventionsgruppen (Sepsis, physisches Training) gebildet. Als Kontrollgruppe diente das Genexpressionsprofil gesunder Mäuse ohne Laufbandtraining (Median der Ct-Werte).

Danach wurde für jede Gruppe das geometrische Mittel der Potenzen der einzelnen Proben gebildet. Anschließend wurde die Differenz aus dem maximalen und minimalen geometrischen Mittelwert (Spannweite) als Ausdruck der Variationsbreite der Genexpression des jeweiligen Referenzgens ermittelt. Für das Hmbs-Gen ergab sich die geringste Spannweite zwischen den Gruppen, daher wurde dieses Gen für die weiteren Berechnungen als Referenzgen/ Housekeeping-Gen genutzt.

### 3.11.10 relative Quantifizierung der RT-PCR-Daten

Die Ergebnisse der qRT-PCR-Untersuchungen wurden mit Hilfe der Pfaffl-Formel (Pfaffl 2001) und Microsoft Excel ausgewertet. Das Hmbs-Gen diente bei der Auswertung als Referenzgen. Für die Bestimmung des relativen Expressions-Quotienten wurde die Potenz aus der Effizienz der PCR hoch der Differenz der Ct-Werte der Kontrollgruppe und des Ct-Werts einer Probe aus der Interventionsgruppe für das Zielgen gebildet und diese durch die entsprechende Potenz des Referenzgens dividiert (siehe Abb. 8).

$$Q = \frac{E_{\text{Ziel}}^{\Delta Ct_{\text{Ziel}}(\text{control}-\text{treat})}}{E_{\text{ref}}^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control}-\text{treat})}}$$

**Abbildung 8: Formel zur Berechnung Bestimmung des relativen Expressions-Quotienten**

Q: relativer Expressionsquotient,  $E_{\text{Ziel}}$ : real-time PCR-Effizienz des Zielgentranskripts,  $E_{\text{ref}}$ : qRT-PCR-Effizienz des Referenzgentranskripts, *control*: Kontrollgruppe (Mittelwert aller Ct-Werte der Kontrollgruppe), *treat*: Probe aus Interventionsgruppe,  $\Delta Ct_{\text{Ziel}}$ : Differenz der Ct-Werte eines Zielgens,  $\Delta Ct_{\text{ref}}$ : Differenz der Ct-Werte eines Referenzgens

Anschließend wurden die Ergebnisse log<sub>2</sub>-transformiert und der Mittelwert für jede Gruppe errechnet. Ein Wert von +1 stellte eine Verdopplung und -1 eine Halbierung der Genexpressionsmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe dar und das Erreichen dieser Schwellen als biologisch signifikante Veränderung definiert.

### 3.12 Bestimmung der Proteinmenge

#### 3.12.1 Probenvorbereitung für MAO-A

Als Ausgangsmaterial für die Proteinbestimmung von MAO-A dienten die Nieren von je vier Tieren pro Gruppe. Die Auswahl wurde randomisiert getroffen. Als Erstes erfolgte die Homogenisierung der Proben. Dafür wurde anfangs 4 °C kalter Lysepuffer frisch im Verhältnis von 1:100 mit einem Proteinaseinhibitor-Mix versehen und anschließend 10 ml Lysepuffer je mg Nierengewebe zu der Organprobe gegeben. Der Gewebe- und Zellaufschluss erfolgte mechanisch mittels eines Dounce Homogenisators. Anschließend wurde das Homogenat bei 900 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Dieser Schritt diente zur Entfernung von Bindegewebe, Zellkernen und noch enthaltenen, großen Zellfragmenten. Als nächstes erfolgte die Isolation der Mitochondrien. Dafür wurde der Überstand bei 11.000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Im Pellet wurden dadurch die Mitochondrien sedimentiert und der Überstand verworfen. Um einer möglichen Kontamination des Sediments mit kleineren Zellorganellen wie Mikrosomen, Peroxysomen und zytosolischen Enzymen entgegenzuwirken, wurde das Pellet in 400 µl Lysepuffer resuspendiert, erneut bei 11.000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser

Schritt wurde noch ein zweites Mal durchgeführt. Das gereinigte mitochondriale Pellet wurde schließlich in 150 µl Lysepuffer gelöst und bei -80 °C eingefroren.

### 3.12.2 Probenvorbereitung für Hif-1alpha und HSP70

Zur Untersuchung der Proteine HIF-1 $\alpha$  und HSP70 dienten die Nieren der gleichen Versuchstiere als Ausgangsmaterial wie für die Bestimmung von MAO-A. Zwischen 22 und 41 mg Nierengewebe von jeweils vier Tieren pro Gruppe wurden untersucht. Für die Homogenisierung wurde das Complete Lysis-M Kit verwendet. 20 ml Lysepuffer wurden mit 2 Tabletten Proteaseinhibitor versetzt. Zusätzlich mussten 200 µl Natriumorthovanadat bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt und anschließend zum Puffer gegeben werden. Jeweils 200 µl Puffer wurden auf die Organstücke gegeben, diese mit einem Plastikstab grob zerkleinert und in Lysis Tubes mit speziellen Beads gegeben. Die Homogenisierung erfolgte in der SpeedMill P12 mit dem Programm Soft Tissue I zwei Mal für 1 Minute. Danach wurde das Lysat in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Um Gewebereste von den Beads zu lösen, wurden die Lysis Tubes erneut mit 300 µl Puffer befüllt und wie zuvor zwei Mal das Soft Tissue I Programm der Speedmill gestartet. Dieses zweite Homogenat wurde anschließend auch dem neuen Reaktionsgefäß zugeführt. Die so erhaltenen ca. 500 µl Gesamthomogenat des Nierengewebes wurden zusätzlich bei 16.100 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, um Zellreste und Bindegewebe zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren. Das Pellet wurde verworfen.

### 3.12.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung der Proteinmenge erfolgte kolorimetrisch mittels BCA-Reaktion und ermöglichte es im Westernblot identische Proteinmengen zu analysieren. BCA ist die Abkürzung für Bicinchoninsäure. Während der Reaktion werden in Anwesenheit von Proteinen zweiwertige Kupferionen zu einwertigen Kupferionen reduziert, welche wiederum mit zwei BCA-Molekülen einen Chelatkomplex mit violetter Farbe bilden. Das Absorbanzmaximum des Komplexes liegt bei 562 nm und die Absorbanz ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Zur Durchführung dienten das Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination und der dazugehörige Proteinstandard mit einer Konzentration von 1 mg/µl. Alle Verdünnungen wurden mit dem Lysepuffer durchgeführt, mit dem auch die

Homogenisierung stattfand. Für die spätere Berechnung der Proteinkonzentration über eine Kalibriergerade wurden zwei identische Verdünnungsreihen des Proteinstandards unabhängig voneinander pipettiert. Die gelösten Mitochondrienfraktionen wurden auf Eis aufgetaut, gut gevortext und im Verhältnis 1:10 mit Lysepuffer verdünnt. Die Gesamthomogenate für die Untersuchung der Proteine HSP70 und Hif-1alpha wurden im Verhältnis von 1:20 mit dem entsprechenden Lysepuffer verdünnt. Das BCA-Arbeitsreagenz wurde aus 50 Teilen Reagenz A und einem Teil Reagenz B hergestellt. Anschließend erfolgte die Befüllung einer 96-Well-Platte mit 25 µl der Proben, der Albuminverdünnungen und der beiden Lysepuffer als Referenzwert. Die verdünnten Proben wurden dreifach auf die Platte aufgetragen. Als letztes wurden in jede Probenvertiefung 200 µl BCA-Arbeitsreagenz pipettiert, die Platte mit einer Folie abgedeckt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Absorbanzmessung erfolgte mittels Mikroplattenreader bei einer Wellenlänge von 550 nm. Über die Absorbanzwerte der Verdünnungen des Albuminstandards konnte eine Kalibriergerade erstellt und mit Hilfe dieser die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet werden.

#### 3.12.4 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Mittels Gelelektrophorese werden Proteine in einem Polyacrylamid-Gel durch das Anlegen einer Spannung entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Als Standardpuffer wird meist ein SDS-Ladepuffer wie der Lämmli-Puffer verwendet. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, welches an das Rückgrat der Polypeptidketten bindet und ihnen eine negative Ladung verleiht, die proportional zu Kettenlänge ist. Die natürliche Ladung der Proteine wird so überdeckt. Zusätzlich erleichtern reduzierende Chemikalien wie  $\beta$ -Mercaptoethanol durch das Spalten von Disulfidbrücken und hohe Temperaturen das Auflösen der Tertiärstruktur. Die Denaturierung ist nicht nur für die Gelelektrophorese essentiell, auch das Binden von Antikörpern und darüber der visuelle Nachweis der Proteine, wird dadurch erst möglich.

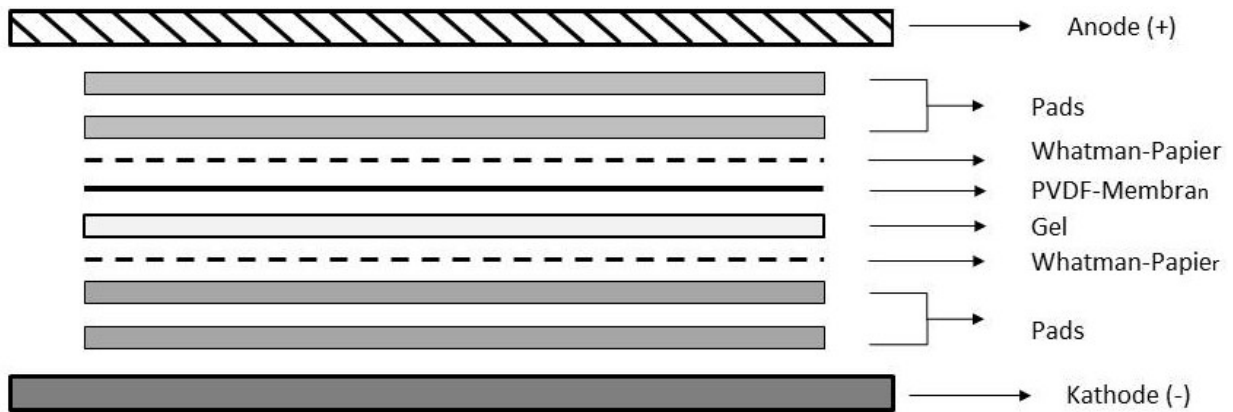
Für die Gelelektrophorese wurden die Gesamthomogenate und die Mitochondrienlysate auf Eis aufgetaut, gründlich gevortext und verdünnt. Die Gesamthomogenate wurden mit 1 X und 5 X Lämmli-Puffer und die Mitochondrienlysate mit Lysepuffer und 5 X Lämmli-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 10

ng/µl und 1 X Lämmli-puffer verdünnt und anschließend im Thermomixer 10 Minuten bei 95°C und 700 rpm erhitzt. Für die Elektrophorese wurde ein 10%iges Bis-Tris-Fertig-Gel verwendet. Dieses wurde in die SureLock Mini-Cell Elektrophoresekammer eingespannt, der 20 X Laufpuffer 1:20 mit Aqua tridest. verdünnt und dieser danach in die innere und äußere Kammer des Systems gefüllt. Anschließend wurde der Kamm für die Geltaschen aus den Gelen entfernt und alle Taschen drei Mal mit einer Hamilton Syringe Pipette und Laufpuffer gespült. Daraufhin konnten die Taschen mit Hilfe von speziellen Gel-Beladungsspitzen mit 1 µl Magic Mark Proteinstandard, 5 µl Pre-Stained Standard und mit 20 µl der verdünnten Proben befüllt werden. Die Kammer wurde an eine Stromquelle angeschlossen und die Elektrophorese für alle Proteine bei einer Stromspannung von 100 V durchgeführt. Die Elektrophoreselaufzeiten betragen für die Untersuchung der Proteine MAO-A und HSP70 120 Minuten und für die Untersuchung von Hif-1alpha 150 Minuten.

### 3.12.5 Westernblot

Mit Hilfe des Westernblots werden Proteine von einem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membran übertragen. Der Transfer der Proteine wird dabei durch ein elektrisches Feld induziert.

In der Vorbereitung wurden 50 ml des 20 X Transferpuffers mit 100 ml Methanol versetzt und mit 850 ml Aqua tridest. aufgefüllt. Die PVDF-Membran wurde 1 Minute in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit dem Whatman-Papier 10 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Die Pads für die Blotkammer wurden ebenfalls in Transferpuffer equilibriert und danach vorhandene Luftblasen entfernt. Mittels eines Gelmessers erfolgte das Aufbrechen der Gelplatten. Nach dem Abtrennen des unteren Abschnitts des Gels zusammen mit der Lauffront und des oberen Abschnitts, welcher die Geltaschen und das Sammelgel enthielt, wurde das Gel 15 Minuten in Transferpuffer equilibriert. Die verschiedenen Bestandteile für den Westernblot wurden anschließend luftblasenfrei in der in Abbildung 9 gezeigten Reihenfolge im Blotmodul positioniert und dieses daraufhin in die SureLock Mini-Cell Elektrophoresekammer eingesetzt, fixiert und mit 1 X Transferpuffer gefüllt. Die äußere Kammer wurde mit 4°C kaltem Aqua tridest. gefüllt und an eine Stromquelle angeschlossen. Der Proteintransfer wurde bei einer Stromspannung von 30 V für 75 Minuten durchgeführt.



**Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Westernblots**

Der Erfolg des Transfers wurde mit einer Ponceau-S-Färbung kontrolliert. Dafür wurde die Membran für 1 Minute in einer Lösung aus 0,1 % Ponceau S in 5%iger Essigsäure inkubiert. Ponceau S ist ein Azofarbstoff, der reversibel an positiv geladene Aminosäuren von Proteinen bindet und diese somit optisch sichtbar macht. Die Membran wurde anschließend mit Aqua bidest. gespült und im Größenbereich von 50 kDa zwischen Housekeeping-Protein und Zielprotein durchtrennt.

### 3.12.6 Immundetektion

Um die Proteine auf der Membran darstellen zu können, wurde die Methode der Chemolumineszenz verwendet. Dafür werden die Proteine durch zwei Antikörpern markiert, wobei der sekundäre Antikörper an das Enzym Meerrettichperoxidase (= HRP, horseradish peroxidase) gekoppelt ist. Diese katalysiert mit Hilfe von Hydrogenperoxid die Oxidation von Luminol, wodurch eine Chemolumineszenz entsteht, die mittels eines Detektors gemessen und abgebildet werden kann. Für die Immundetektion mussten die Membranteile als Erstes blockiert werden, um später unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Dafür wurden 100 ml 10 X TBS mit 900 ml Aqua tridest. verdünnt und mit 1 ml Tween20 versetzt. Zur Herstellung der Blockierungslösung erfolgte die Zugabe von 5 g Milchpulver (Skim milk) oder 5 g Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin) zu 95 ml des hergestellten TBS-Tween. Anschließend wurden die Membranteile zur Detektion von MAO-A 1 Stunde in 5%iger Milchlösung und zur Detektion von HSP70 und Hif-1 $\alpha$  1 Stunde in 5%iger BSA-Blockierungslösung inkubiert. Die Membranabschnitte, die das Housekeeping-Protein  $\beta$ -Aktin enthielten, wurden in der entsprechenden Lösung blockiert, in der auch das zu untersuchende Protein inkubiert wurde. Die Verdünnung



der primären Antikörper erfolgte ebenfalls in der zugehörigen Blockierungslösung. Die verschiedenen Antikörperverdünnungen und Blockierungslösungen können Tabelle 8 entnommen werden. 5 ml der Antikörperlösung wurden in ein 50 ml Falcon-tube gefüllt und der entsprechende Membranteil, auf dem sich das zu untersuchende Protein befand, hineingelegt. Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C auf einem Rolleninkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden die PVDF-Membranteile sechs Mal für 5 Minuten mit TBS-Tween auf einem Schüttelinkubator gewaschen, um den primären Antikörper vollständig zu entfernen. Anschließend wurden 10 ml Milch- oder BSA-Lösung mit 1 µl sekundären Antikörper versehen (Verhältnis 1:10.000) und die Membranteile für 1 Stunde bei Raumtemperatur darin inkubiert. Der für jeden primären Antikörper verwendete sekundäre Antikörper kann Tabelle 8 entnommen werden. Anschließend wurde die Membran erneut sechs Mal für 5 Minuten mit TBS-Tween gewaschen.

**Tabelle 8: Übersicht zu primären und sekundären Antikörpern für die Immundetektion**

<b>Antikörper</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärer Antikörper *</b>	<b>Blockierungslösung</b>
<b>Anti-MAO-A</b>	Bioworld	1:1000	Anti-Mouse	5%ige Milchlösung
<b>Anti-HSP70</b>	Abcam	1:5000	Anti-Rabbit	5%ige BSA-Lösung
<b>Anti-Hif 1α</b>	Abcam	1:1000	Anti-Rabbit	5%ige BSA-Lösung
<b>Anti-β Actin</b>	Abcam	1:5000	Anti-Rabbit	5%ige Milchlösung (für MAO-A) 5%ige BSA-Lösung (für HSP70, Hif-1α)

\* Sekundäre Antikörper: Firma Jackson ImmunoResearch

Zur Detektion der Proteine wurde das Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate Kit benutzt. Die beiden Reagenzien des Kits mussten zuerst bei Raumtemperatur equilibriert und anschließend im Verhältnis von 1:1 gemischt werden. Für jede Membran wurden 500 µl Luminol-Reagenz und 500 µl Peroxide-Lösung zusammen in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran für 5 Minuten. Dafür wurde diese zwischen zwei Folien gelegt und 1000 µl der gemischten Reagenzien darauf gegeben. Anschließend wurde im FujiFilm LAS-3000 Luminescent Image Analyzer die Chemolumineszenz der Membran in Form eines 2D-Bildes aufgenommen. Die Bildaufnahme erfolgte mit

den Bildeinstellungen Normal für die Sensitivität der Kamera und Increment für den Aufnahmemodus, mit einem Aufnahmeabstand von 10 Sekunden.

### 3.12.7 Auswertung der Westernblot-Aufnahmen

Die Auswertung der Westernblot-Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Aida Image Analyzer 3.5.2 Software. In dieser wurden die einzelnen Banden manuell definiert und die Grauwertdichten als Kurve dargestellt. Anschließend wurden die Daten nach Microsoft Excel exportiert und dort ein Quotient aus Integral des Zielproteins und Integral des Housekeeping-Proteins  $\beta$ -Aktin gebildet. Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism.

### 3.13 Bestimmung der bakteriellen Keimlast

Die bakterielle Keimlast wurde bei jeweils vier Tieren pro Gruppe in Lunge, Leber, Milz und im Blut zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden nach Sepsisinduktion bestimmt. Die Organ- und Blutproben wurden dafür in differenter Art und Weise aufgearbeitet und auf Agarplatten aufgetragen. Die Homogenisierung der Organe fand unter einem Abzug statt. Um eine Oberflächenkontamination der Organe mit Bakterien zu vermeiden, mussten diese für 10 Sekunden in 70%igem Ethanol gereinigt werden. Danach wurden in 5 ml VE25 Spezialtubes 3 ml 0,9%iges Natriumchlorid (NaCl) vorgelegt, die Organproben hinzugegeben und diese 1 Minute mit dem Ultra-Thurrax homogenisiert. Anschließend wurden unter der Sterilbank noch 2 ml Medium, welches aus einer Hirn-Herz-Glucose-Boullion bestand, zugefügt und alles 1 Minute gut gevortext. Zusätzlich wurden 100  $\mu$ l 99%iges Glycerin in 2 ml Sarstedt-Tubes vorgelegt und schließlich 900  $\mu$ l der mit Medium versetzten Organhomogenate hinzugegeben. Für die Aufarbeitung der EDTA-antikoagulierten Blutproben, wurden 20  $\mu$ l 50%iges Glycerin in 2 ml Sarstedt-Tubes vorgelegt, anschließend 50  $\mu$ l Vollblut und 30  $\mu$ l Hirn-Herz-Glucose-Boullion zugegeben und 1 Minute gut gevortext. Sowohl die Organ- als auch die Blutproben wurden bei -80 °C eingefroren.

Als nächstes erfolgte das Ausplattieren der Proben. Dafür wurden diese auf Eis aufgetaut und verdünnt. Für die Bestimmung der bakteriellen Keimlast der Blutproben, wurden die 6 Stunden nach Sepsisinduktion entnommenen Proben 1:10 und die nach 24 Stunden entnommenen Proben 1:100 mit Hirn-Herz-Glucose-Boullion verdünnt. Von den Organproben wurden die 6 h-Sepsis-Proben 1:50 und die

24 h-Sepsis-Proben 1:100 mit Hirn-Herz-Glucose-Boullion verdünnt. Anschließend wurden jeweils 25 µl der verdünnten Organhomogenate und Blutproben auf Blutagarplatten pipettiert und mit einem Spatel ausgestrichen. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37 °C und aeroben Bedingungen inkubiert. Auf allen Platten wurde die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE) bestimmt und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

### **3.14 Bestimmung der Zytokinkonzentrationen**

Für die Quantifizierung der Zytokine IL-6, IL-10, TNF-α und MCP-1 wurde das BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences, Germany) nach Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden durchflusszytometrisch mittels BD™ FACSVerse System (FACS = fluorescence activated cell sorting) analysiert.

Als Erstes erfolgte die Herstellung einer Standardreihe. Dafür wurden auf den lysophilierten Maus-Entzündungs-Standard 2 ml Assay-Verdünner gegeben, der Standard mit einer Pipette gelöst und 15 Minuten equilibriert. Anschließend wurden 300 µl Assay-Verdünner in 8 Tubes vorgelegt, 300 µl gelöster Standard in das erste Tube gegeben und mit einer Pipette gut gemischt. Daraufhin wurden 300 µl aus der ersten Verdünnungsstufe in das nächste Tube gegeben, erneut gut gemischt und danach in gleicher Art und Weise fortgefahren bis 8 Verdünnungsstufen erreicht waren. Zusätzlich wurden als Negativkontrolle 300 µl Assay-Verdünner in ein weiteres Tube pipettiert, ohne Standard hinzuzugeben. Anschließend wurden 500 µl Capture Beads (Abscheidungskügelchen) von jedem Zytokin nach gründlichem Vortexen in ein gemeinsames Tube pipettiert und somit alle Capture Beads gepoolt. 6 Stunden nach Sepsisinduktion entnommene Plasmaproben wurden 1:10 und 24 Stunden nach Sepsisinduktion entnommene Proben 1:20 mit Assay-Verdünner diluiert. Anschließend wurden 50 µl der gepoolten Capture Beads in alle Tubes vorgelegt, 50 µl der verschiedenen Verdünnungsstufen, des Standards, der Negativkontrolle oder der Testproben hinzugegeben und zusätzlich in alle Tubes 50 µl PE Detektionsreagenz pipettiert. Die Tubes wurden daraufhin lichtgeschützt 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Waschpuffer in alle Tubes pipettiert, diese bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 300 µl Waschpuffer resuspendiert. Zum Schluss wurden die Zytokinkonzentrationen der Proben nach gründlichem Vortexen am

Durchflusszytometer (FACScan) gemessen und mit Hilfe der FCAP Array™ Software ausgewertet.

### **3.15 Histologie**

#### **3.15.1 Probenvorbereitung**

Für die histologische Untersuchung wurden Teile der Lebern und Nieren der Tiere direkt nach der Entnahme in sterile physiologische Kochsalzlösung getaucht, mit Tissue-Tek OCT bedeckt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Aus den Proben wurden am Kryotom 6 µm dicke Schnitte hergestellt, jeweils 2 auf einen Objektträger aufgebracht, 10 Minuten auf der Wärmeplatte getrocknet und bis zur Verwendung trocken bei Raumtemperatur gelagert.

#### **3.15.2 HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) und Auswertung**

Für die Durchführung der HE-Färbung von histologischen Kryoschnitten der Leber wurde zunächst Hämalaun nach P. Mayer hergestellt. 1 g Hämatoxylin wurde in 1000 ml Aqua tridest. gelöst und anschließend 0,2 g Natriumjodat und 50 g Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat) zugegeben. Nachdem die Chemikalien durch Schwenken des Gefäßes gelöst wurden und eine blau-violette Farbe entstand, erfolgte die Zugabe von 50 g Chlorhallhydrat und 1 g Zitronensäure, welche durch erneutes Schwenken in Lösung gebracht wurden. Schließlich erfolgte die Filtration der Farblösung durch einen Papierfilter. Für die Herstellung der Eosinlösung wurden 100 mg Eosin in 100 ml Aqua tridest. gelöst und 2 Tropfen 2%ige Essigsäure dazugegeben.

Für die Färbung der Kryoschnitte wurden diese als Erstes zur Fixierung 10 Minuten in Aceton inkubiert, 1 Minute in Aqua dest. gewaschen und 2 Minuten in die angefertigte Hämalaunlösung getaucht. Es entstand eine braun-rote Färbung des Gewebes. Um die gewünschte Blaufärbung der Zellkerne zu erreichen, wurden die Schnitte 2 Minuten mit fließendem Leitungswasser und 1 Minute mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurden die Proben für die Färbung des Zellplasmas und anderer positiv geladener Gewebestandteile 7 Minuten in der hergestellten Eosinlösung inkubiert und erneut mit Aqua dest. differenziert bis keine Verfärbung des Wassers mehr stattfand. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 50, 60, 80, 96 und 2 x 100 % Ethanol für jeweils 1

Minute inkubiert. Zum Abschluss wurden die Proben 1 Minute in Xylol II getaucht und schließlich mit Entellan und Deckglas eingedeckt. Zur Digitalisierung wurden die Bilder mit dem Olympus Durchlichtmikroskop (Provis AX70, Olympus) mit 20facher Vergrößerung aufgenommen.

Die Beurteilung der Bilder und Einschätzung morphologischer Leberparenchymveränderungen erfolgte mit Hilfe eines Pathologen des Instituts für Rechtsmedizin Sektion Pathologie des Universitätsklinikums Jena.

### 3.15.3 PAS-Reaktion (Perjodsäure-Schiff-Reaktion) und Auswertung

Das Prinzip der PAS-Reaktion basiert auf der Oxidation von Glykolgruppen zu Aldehydgruppen. Dies ermöglicht die Bindung des Schiff'schen Reagenz. Das Resultat ist eine rot-violette Färbung von Glikogen, neutralen Mukopolysacchariden und glykoproteinhalte Strukturen wie Basalmembranen. Mit Hilfe der PAS-Reaktion wurden potentielle Gewebsschäden der Nieren histologisch untersucht. Die Durchführung der Färbung erfolgte in Kooperation mit der Universität Hannover. Als Erstes erfolgte die Fixierung der Kryoschnitte der Nieren mit 4 % PFA in 1 X PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte 3 x 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde eine 1%ige Periodsäurelösung aus 10 g Periodsäurepulver und 1000 ml Aqua dest. hergestellt und die Objektträger zur Oxidierung für 10 Minuten darin inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut 3 x 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen, für 15 Minuten in Schiff'sches Reagenz getaucht und dann in Leitungswasser für 3 Minuten gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für 3,5 Minuten in Harris Hämatoxylin und resultierte in einer Blaufärbung der Zellkerne. Anschließend wurden die Objektträger für 1 Minute in Leitungswasser gewaschen, 1 Minute in Clarifier II getaucht und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Dehydrierung erfolgte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 60, 70, 80, 96 und 100%igem Ethanol für jeweils 2 Minuten. Zum Schluss wurden die Schnitte für 2 Minuten in Xylol geklärt und mit Entellan eingedeckt.

Für die Auswertung der PAS-Reaktion wurde der Gewebeschaden des Nierenparenchyms lichtmikroskopisch evaluiert. Dazu wurden folgende 5 Kriterien bewertet: Tubulusnekrose/ Zellkernverlust, Abflachung des Tubulusepithels, Verminderung des epithelialen Bürstensaums, Ablösung von der tubulären Basalmembran oder luminale Zelltrümmer und epitheliale Vakuolisierung. Alle

Kriterien wurden von zwei Nephrologen verblindet mit einem semi-quantitativen Bewertungssystem (0-3 Punkte) in 20 randomisiert ausgewählten Hauptgesichtsfeldern des renalen Kortex für jedes Tier evaluiert. Die Punktevergabe erfolgte in vier Stufen: 0 (nicht vorhanden), 1 (leicht), 2 (mäßig), 3 (stark). Die Punkte für die verschiedenen Kriterien wurden für jedes Tier zu einer Gesamtsumme addiert. Die Evaluierung erfolgte bei 200-facher Vergrößerung am Olympus Durchlichtmikroskop (Provis AX70, Olympus) und unter Zuhilfenahme des Axio Vision Rel. 4.6 Bildbearbeitungsprogramms.

### **3.16 Statistische Auswertung**

Alle statistischen Analysen, Darstellungen und Graphen wurden entweder mit IBM® SPSS® Statistics 19 oder mit GraphPad Prism 5.0 Software erstellt.

Zur Überprüfung, ob Werte eines Kollektivs normalverteilt sind, wurde der Shapiro-Wilk-Test angewandt. Ein P-Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

Um gruppenspezifische Unterschiede aufzuzeigen wurde der parametrische Student's-t-Test für normalverteilte Daten und der Mann-Whitney-U-Test für nicht-normalverteilte Daten verwendet. P-Werte  $\leq 0,05$  (\*) wurden als statistisch signifikant angesehen. Für P-Werte  $< 0,01$  (\*\*) und  $< 0,001$  (\*\*\*) erfolgte eine gesonderte Kennzeichnung. Normalverteilte Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler oder Standardabweichung und nicht normalverteilte Daten wurden als Median  $\pm$  Interquartilsabstand angegeben.

Die Unterschiede der Überlebensraten nach Sepsisinduktion wurden mit Hilfe des Logrank-Tests auf ihre Signifikanz getestet. Auch dabei wurde ein P-Wert  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

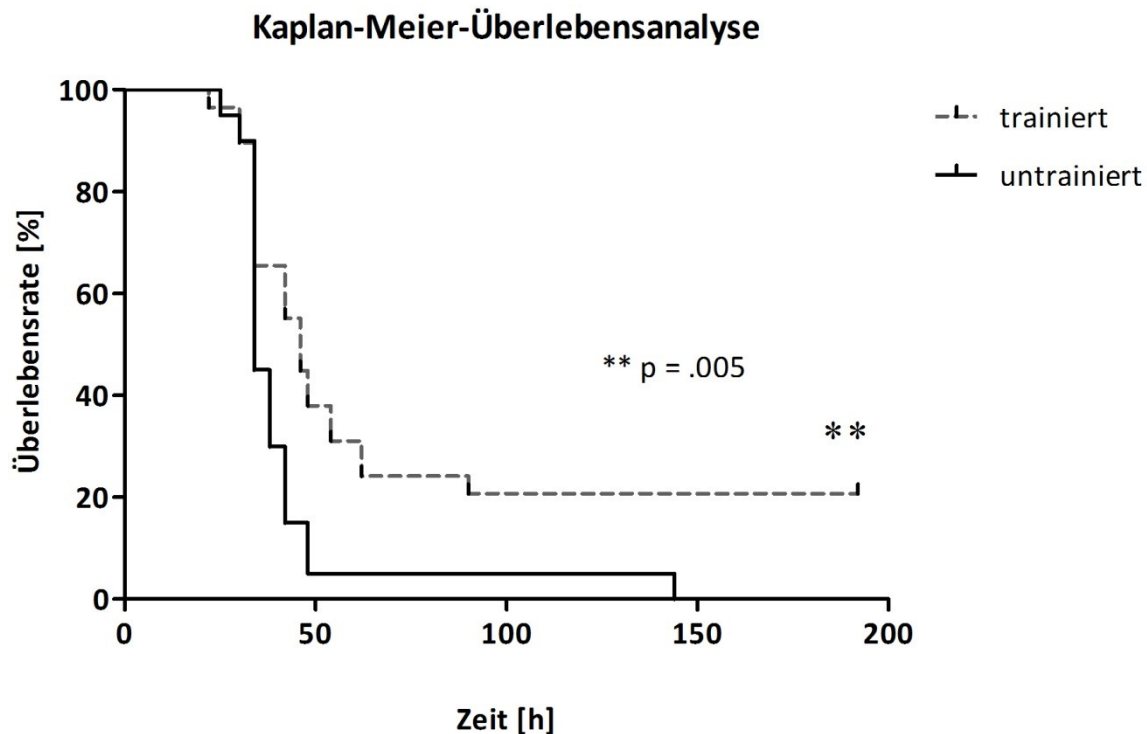
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Körpergewicht und relatives Herzgewicht

Um einen ersten Eindruck des Trainingseffektes zu erlangen, wurden das Körpergewicht und das relative Herzgewicht der Tiere analysiert. Dabei zeigte sich, dass gesunde trainierte Mäuse ein signifikant niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zu untrainierten Mäusen ( $29,6 \pm 0,3$  g vs.  $31,1 \pm 0,3$  g;  $p < 0,01$ ) aufwiesen. Das relative Gewicht des Herzens war bei trainierten Tieren signifikant höher als bei untrainierten Tieren ( $18,6 \pm 3,0$  mg/g<sup>0,78</sup> vs.  $17,4 \pm 3,0$  mg/g<sup>0,78</sup>;  $p < 0,05$ ). Die Daten zum Herzgewicht wurden wie in der Arbeit von Kemi et al. allometrisch mit dem Faktor 0,78 skaliert (Kemi et al. 2002).

### 4.2 Überlebensanalyse und Clinical Severity Score

Eine entscheidende Frage der Untersuchungen war, ob physisches Ausdauertraining einen Effekt auf die Mortalität und Morbidität während einer polymikrobiellen Sepsis hat. Dafür wurde einerseits eine Überlebensanalyse durchgeführt, um Mortalitätsraten zwischen den verschiedenen Gruppen unmittelbar vergleichen zu können und andererseits im Verlauf ein Krankheitsschwerescore (CSS, Clinical Severity Score) erhoben, um Aussagen über die Morbidität treffen zu können. Für die graphische Darstellung der Überlebenszeit nach der Induktion einer Sepsis wurde die Kaplan-Meier-Methode mit einem Beobachtungsintervall von 192 Stunden verwendet (Abb. 10). Bis 42 Stunden nach Sepsisinduktion konnte kein Unterschied zwischen der Trainings- und der Kontrollgruppe verzeichnet werden. Mit Fortschreiten der Erkrankung war jedoch eine zunehmende Divergenz zwischen der Überlebenskurve von trainierten und untrainierten Tieren zu beobachten. Schlussendlich verstarben alle untrainierten Mäuse, wohingegen 20 % der trainierten Tiere überlebten. Um diesen positiven Einfluss des Ausdauertrainings auf die Überlebensrate zu objektivieren, wurde die Divergenz der Überlebenskurven mittels Logrank-Tests auf ihre Signifikanz getestet. Es zeigte sich, dass die Mortalitätsrate bei den trainierten Mäusen signifikant niedriger war als bei den untrainierten ( $p < 0,01$ ).



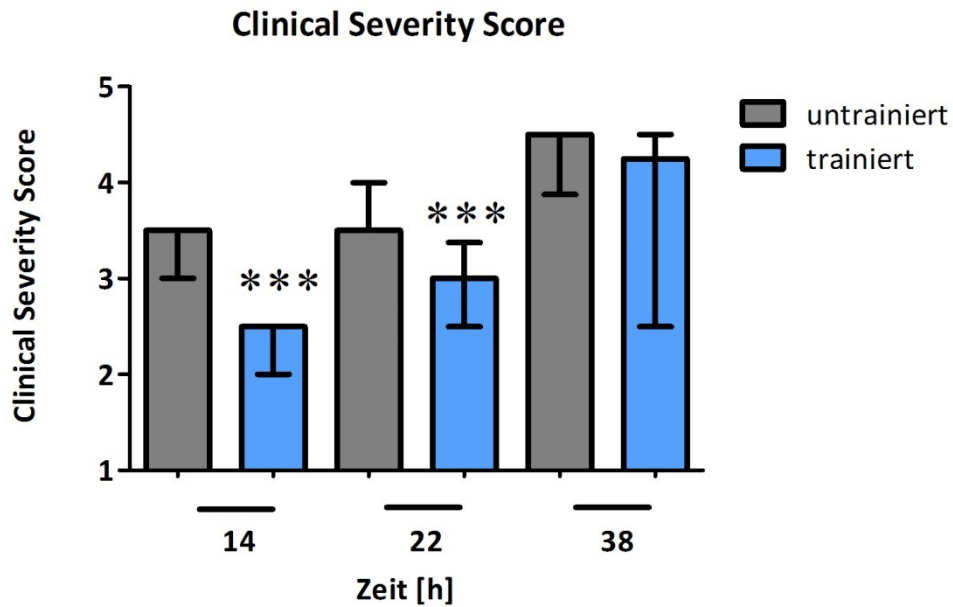
**Abbildung 10: Kaplan-Maier-Überlebensanalyse**

Nach der Induktion einer polymikrobiellen Sepsis zum Zeitpunkt 0 h wurden die Überlebensraten trainierter (n = 30) und untrainierter Mäuse (n = 20) gegen die Zeit aufgetragen. Die Signifikanztestung erfolgte mittels Logrank-Test. Ein P-Wert < 0,05 wurde als signifikant eingestuft. P-Werte < 0,01 sind mit \*\* gekennzeichnet.

Parallel zur Überlebenszeitanalyse wurde ein Krankheitsschwerescore nach der Vorlage von Gonnert et al. erhoben (Gonnert et al. 2011). Niedrige Werte im Clinical Severity Score spiegeln eine geringe und hohe Werte eine starke Einschränkung des Allgemeinzustandes bis hin zum Tod wider. Die Evaluierung zeigte eine Reduktion der Morbidität bei trainierten im Vergleich zu untrainierten Tieren zu allen Zeitpunkten der Sepsis (Abb. 11). Besonders in der Frühphase nach Sepsisinduktion (14 Stunden) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen trainierten und untrainierten Mäusen (2,5 (2,0 - 2,5) vs. 3,5 (3,0 - 3,5),  $p < 0,001$ ) nachgewiesen werden. Auch die Evaluierung nach 22 Stunden Sepsis zeigte signifikant niedrigere Werte in der Trainingsgruppe (3,0 (2,5 - 3,4) vs. 3,5 (3,5 - 4,0),  $p < 0,001$ ). Zum Zeitpunkt 38 Stunden nach Sepsisinduktion konnte immer noch eine Varianz zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden, allerdings war diese nicht mehr signifikant (trainiert 4,3 (2,5 - 4,5) vs. untrainiert 4,5 (3,9 - 4,5),  $p = 0,156$ ). Verstorbene Tiere mussten im



weiteren Verlauf nicht zensiert werden, da diese zum Zeitpunkt 38 Stunden nach Sepsisinduktion erstmals auftraten.



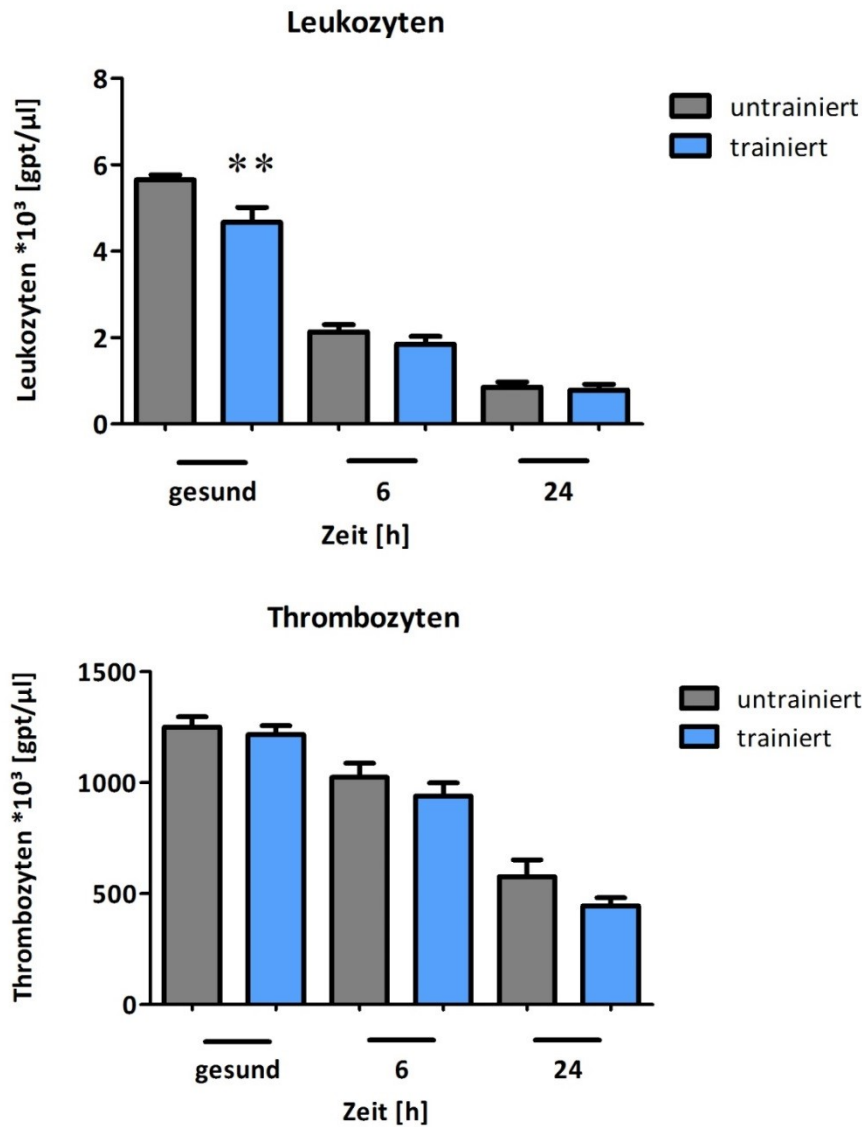
**Abbildung 11: Clinical Severity Score**

Nach Sepsisinduktion zum Zeitpunkt 0 h wurde die Einschränkung des Allgemeinzustandes von trainierten und untrainierten Mäusen miteinander verglichen. Die Evaluation umfasste Werte zwischen 1 (keine Zeichen einer Erkrankung) und 5 (Tod). Dargestellt sind die Daten als Median ( $\pm$  Interquartilsabstand). Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant definiert und p-Werte  $< 0,001$  mit \*\*\* markiert.

### 4.3 Blutbild

Die Analyse des Blutbildes zeigte, dass gesunde trainierte Mäuse ( $4,7 \pm 0,35 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l) ohne Sepsis eine signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere Basisleukozytenkonzentration aufwiesen als untrainierte Tiere ( $5,7 \pm 0,11 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l). Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsisinduktion war eine reduzierte Leukozytenanzahl bei den trainierten ( $1,85 \pm 0,18 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l) und den untrainierten ( $2,14 \pm 0,16 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l) Tieren ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auffällig. Bei der Blutkonzentration der Leukozyten manifestierte sich auch 24 Stunden nach Sepsisinduktion keine Disparität zwischen Trainings- ( $0,79 \pm 0,14 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l) und Kontrollgruppe ( $0,86 \pm 0,12 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l).

Die Analyse der Thrombozytenanzahl trainierter ( $1216 \pm 40,03 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l) und untrainierter ( $1250 \pm 46,10 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l) gesunder Mäuse ergab keinen Unterschied. Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsisinduktion wurde deutlich, dass sich die Blutkonzentration der Thrombozyten in beiden Gruppen (trainiert  $939 \pm 59,93 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l vs. untrainiert  $1025 \pm 62,84 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l) im gleichen Maße reduzierte. Auch nach 24 Stunden manifestierte sich kein gruppenspezifischer Unterschied (trainiert  $446 \pm 36,74 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l vs. untrainiert  $577 \pm 76,07 * 10^3$  gpt/ $\mu$ l). Alle Leukozyten- und Thrombozytenkonzentrationen können Abbildung 12 entnommen werden.



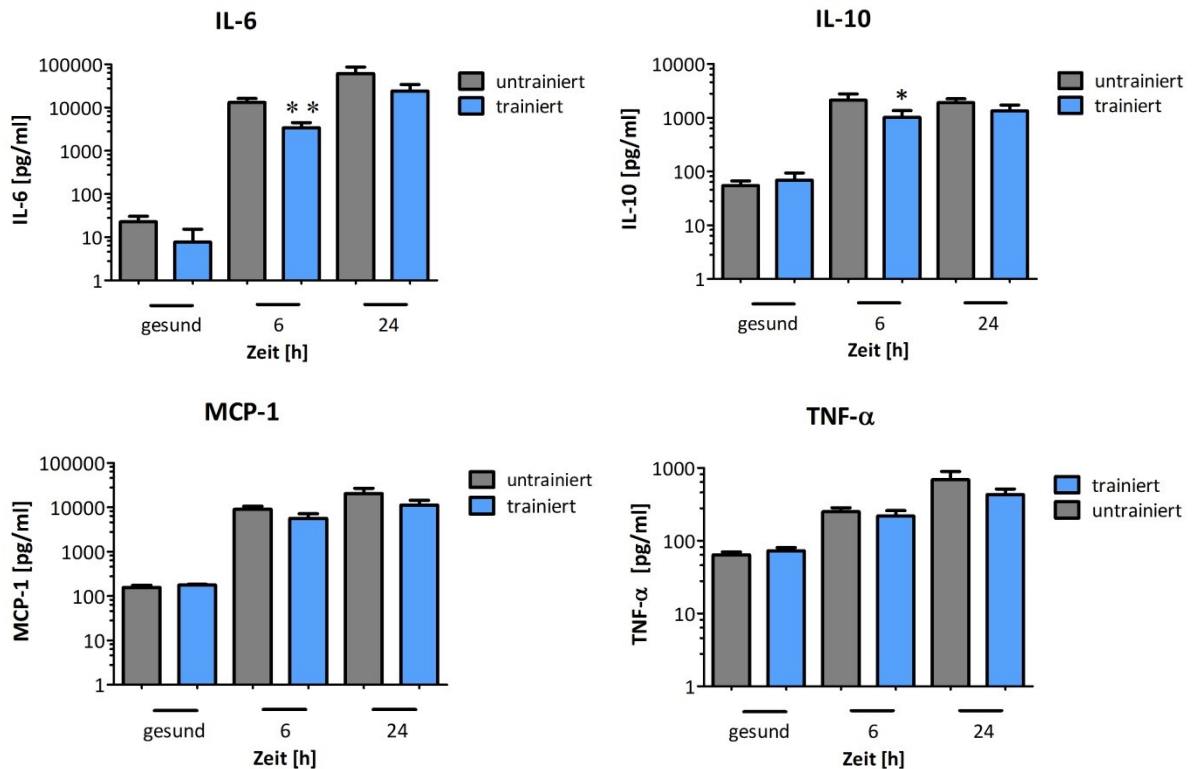
**Abbildung 12: Leukozyten- und Thrombozytenkonzentrationen**

In einer trainierten und einer untrainierten Mäusepopulation wurden die Leukozyten- und Thrombozytenkonzentrationen zu drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (gesunde Tiere, 6 und 24 h nach Sepsisinduktion). Die Darstellung der Daten erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Ein p-Wert ( $p$ ) < 0,05 wurde als signifikant gewertet. P-Werte < 0,01 sind mit \*\* gekennzeichnet.

#### 4.4 Zytokinkonzentrationen

Die Konzentrationen der Zytokine IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und MCP-1 wurden in Plasmaproben von trainierten und untrainierten Mäusen, die entweder gesund waren oder bei denen 6 Stunden oder 24 Stunden zuvor eine Sepsis induziert wurde, durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 13). Anhand der Ergebnisse wurde deutlich, dass die Plasmakonzentrationen dieser Zytokine während der Sepsis bei allen Tieren anstiegen. Allgemein war diese Progression bei den trainierten Mäusen jedoch schwächer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Bei der Betrachtung der IL-6-Spiegel von gesunden Tieren lag keine signifikante Varianz zwischen trainierten ( $7,7 \pm 7,7$  pg/ml) und untrainierten ( $22,6 \pm 7,9$  pg/ml) Mäusen vor. Dagegen stellten sich die Interleukin-6-Konzentration 6 Stunden nach Sepsisinduktion bei trainierten Tieren ( $3393 \pm 1094$  pg/ml) signifikant niedriger als bei untrainierten Tieren ( $13141 \pm 3063$  pg/ml;  $p < 0,01$ ) dar. Nach 24 Stunden zeigte sich für Interleukin-6 keine signifikante, aber doch eine deutlich höhere Progression der Konzentration in der Kontrollgruppe ( $61618 \pm 25604$  pg/ml) im Unterschied zur Trainingsgruppe ( $24147 \pm 10197$  pg/ml). Die IL-10-Konzentration von gesunden trainierten Mäusen ( $68,8 \pm 25$  pg/ml) unterschied sich nicht von der Konzentration untrainierter Mäuse ( $54,8 \pm 12$  pg/ml). 6 Stunden nach Sepsisinduktion zeigte sich dagegen, dass die Konzentration bei trainierten Mäusen ( $1017 \pm 344$  pg/ml) um ein signifikant geringeres Maß anstieg als bei untrainierten Mäusen ( $2130 \pm 651$  pg/ml;  $p < 0,05$ ). Nach 24 Stunden zeigte sich für Interleukin-10, dass in der Trainingsgruppe ( $1343 \pm 390$  pg/ml) zwar geringere Konzentrationen gemessen wurden als in der Kontrollgruppe ( $1911 \pm 354$  pg/ml), dieser Unterschied jedoch nicht signifikant ( $p = 0,102$ ) war. Anhand der MCP-1-Spiegel konnten bei gesunden Tieren (trainiert  $176,6 \pm 7,0$  pg/ml vs. untrainiert  $156 \pm 19,7$  pg/ml) keine gruppenspezifischen Unterschiede aufgezeigt werden. Nach 6 Stunden wurde jedoch eine deutliche Disparität zwischen Trainings- ( $5661 \pm 1538$  pg/ml) und Kontrollgruppe ( $9001 \pm 1684$  pg/ml) sichtbar, welche allerdings nicht signifikant ( $p = 0,061$ ) war. Auch nach 24 Stunden stellte sich eine Varianz zwischen den Gruppen (trainiert  $11264 \pm 3230$  pg/ml vs. untrainiert  $20395 \pm 6536$  pg/ml,  $p = 0,204$ ) dar, jedoch wurde auch hier das Signifikanzniveau nicht erreicht. Die Konzentrationsbestimmung von TNF- $\alpha$  bei gesunden Tieren zeigte keine gruppenspezifischen Unterschiede ( $72,8 \pm 7,6$  pg/ml vs.  $64,0 \pm 6,1$  pg/ml). Auch 6 Stunden nach Sepsisinduktion unterschied sich die Konzentration von trainierten Mäusen ( $218,4 \pm 40,3$  pg/ml) kaum von der Konzentration untrainierter Tiere ( $250,4 \pm$

34,3 pg/ml). Nach 24 Stunden zeichnete sich in der Trainingsgruppe ( $429,5 \pm 85,6$  pg/ml) eine geringere Progression ab als in der Kontrollgruppe ( $691 \pm 204,8$  pg/ml). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,348$ ).

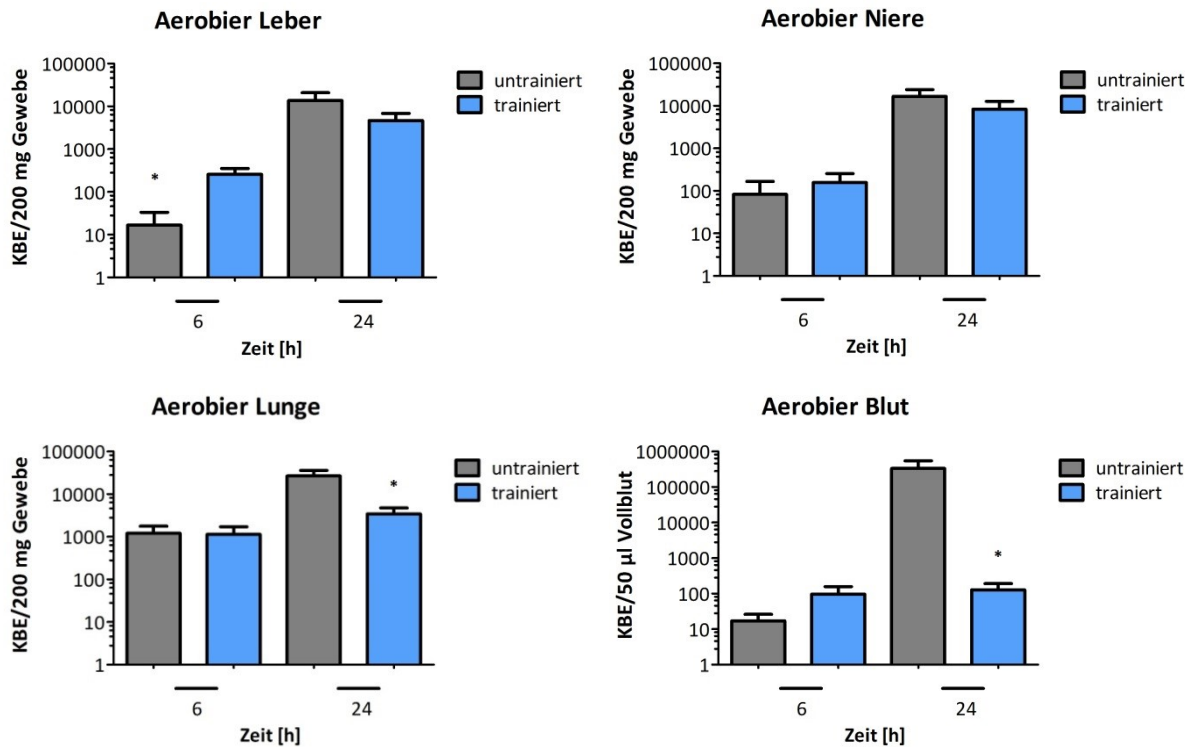


**Abbildung 13: Zytokinkonzentrationen**

Die Plasmakonzentrationen von IL-6, IL-10, MCP-1 und TNF-α wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (gesund, 6 und 24 h nach Sepsisinduktion) durchflusszytometrisch in Plasmaproben trainierter und untrainierter Mäuse bestimmt. Die Zytokinkonzentrationen wurden logarithmiert zur Basis 10. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Ein p-Wert < 0,05 (\*) wurde als signifikant gewertet. P-Werte < 0,01 sind mit \*\* gekennzeichnet. *IL-6*: Interleukin 6, *IL-10*: Interleukin 10, *MCP-1*: Monocyte Chemoattractant Protein-1, *TNF-α*: Tumornekrosefaktor-α

#### 4.5 Bakterielle Keimlast

Zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis wurde allen Tieren eine aufgearbeitete humane Stuhlsuspension intraperitoneal injiziert. Um die bakterielle Besiedlung der Organe und des Blutes mit Aerobiern im Verlauf der Sepsis und einen möglichen Einfluss des physischen Trainings auf das Ausmaß der Kolonisation und die Dissemination zu evaluieren, wurde die bakterielle Keimlast bestimmt. Die Ergebnisse sind in als Koloniebildende Einheiten (KBE) pro 50  $\mu$ l unverdünntes Vollblut oder pro 200 mg unverdünntes Gewebehomogenat der Organe dargestellt (Abb. 14). Die Resultate zeigten insgesamt, dass bei trainierten und untrainierten Tieren die Anzahl an Bakterienkolonien in allen Geweben und im Blut im Verlauf der Sepsis progredient war. Bei der spezifischen Betrachtung der Leber manifestierte sich 6 Stunden nach Sepsisinduktion eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere bakterielle Keimlast bei den trainierten Mäusen ( $258,3 \pm 96,1$ ) im Vergleich zu den untrainierten Tieren ( $16,7 \pm 16,7$ ). Nach 24 Stunden dagegen wiesen die trainierten ( $4683 \pm 2140$ ) Tiere weniger Kolonien auf als die untrainierten ( $13633 \pm 7177$ ), diese Varianz war jedoch nicht signifikant. Die Untersuchung des Nierengewebes zeigte 6 Stunden nach Sepsisinduktion keine Gruppenunterschiede (trainiert  $158,3 \pm 96,1$  vs. untrainiert  $83,3 \pm 83,3$ ). Nach 24 Stunden konnten auch geringere Kolonieanzahlen in der Trainingspopulation ( $8367 \pm 4430$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $16783 \pm 7383$ ) registriert werden, jedoch war auch dieser Unterschied nicht signifikant. Bei der Betrachtung der bakteriellen Besiedlung der Lunge mit Aerobiern wurden nach 6 Stunden keine gruppenspezifischen Unterschiede sichtbar (trainiert  $1142 \pm 580$  vs.  $1200 \pm 573$  untrainiert). Nach 24 Stunden dagegen war der Anstieg der Kolonieanzahl bei untrainierten ( $26650 \pm 9409$ ) Tieren signifikant höher als bei trainierten ( $3433 \pm 1299$ ,  $p < 0,05$ ). Im Blut konnte 6 Stunden nach Sepsisinduktion kein Einfluss von Ausdauertraining auf die Kolonieanzahl registriert werden (trainiert  $96,8 \pm 60,4$  vs. untrainiert  $17,0 \pm 9,1$ ). Nach 24 Stunden konnte jedoch eine signifikant niedrigere bakterielle Keimlast im Blut trainierter Tiere ( $128,0 \pm 63,7$ ) im Vergleich zu untrainierten Tieren ( $333561 \pm 210747$ ,  $p < 0,05$ ) gezeigt werden.



**Abbildung 14: Bakterielle Keimlast in Leber, Niere, Lunge und Blut**

Einer trainierten ( $n = 28$ ) und einer untrainierten ( $n = 30$ ) Mäusepopulation wurde intraperitoneal mittels Injektion einer humanen Faecessuspension eine Sepsis induziert und anschließend nach 6 oder 24 h Organe und Blut entnommen. Die Ergebnisse sind als Koloniebildende Einheiten (KBE) pro 50  $\mu$ l unverdünntes Vollblut oder pro 200 mg unverdünntes Gewebehomogenat der Organe dargestellt. Die Skalierung der y-Achse erfolgte logarithmisch zur Basis 10. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Ein p-Wert  $< 0,05$  (\*) wurde als signifikant gewertet.

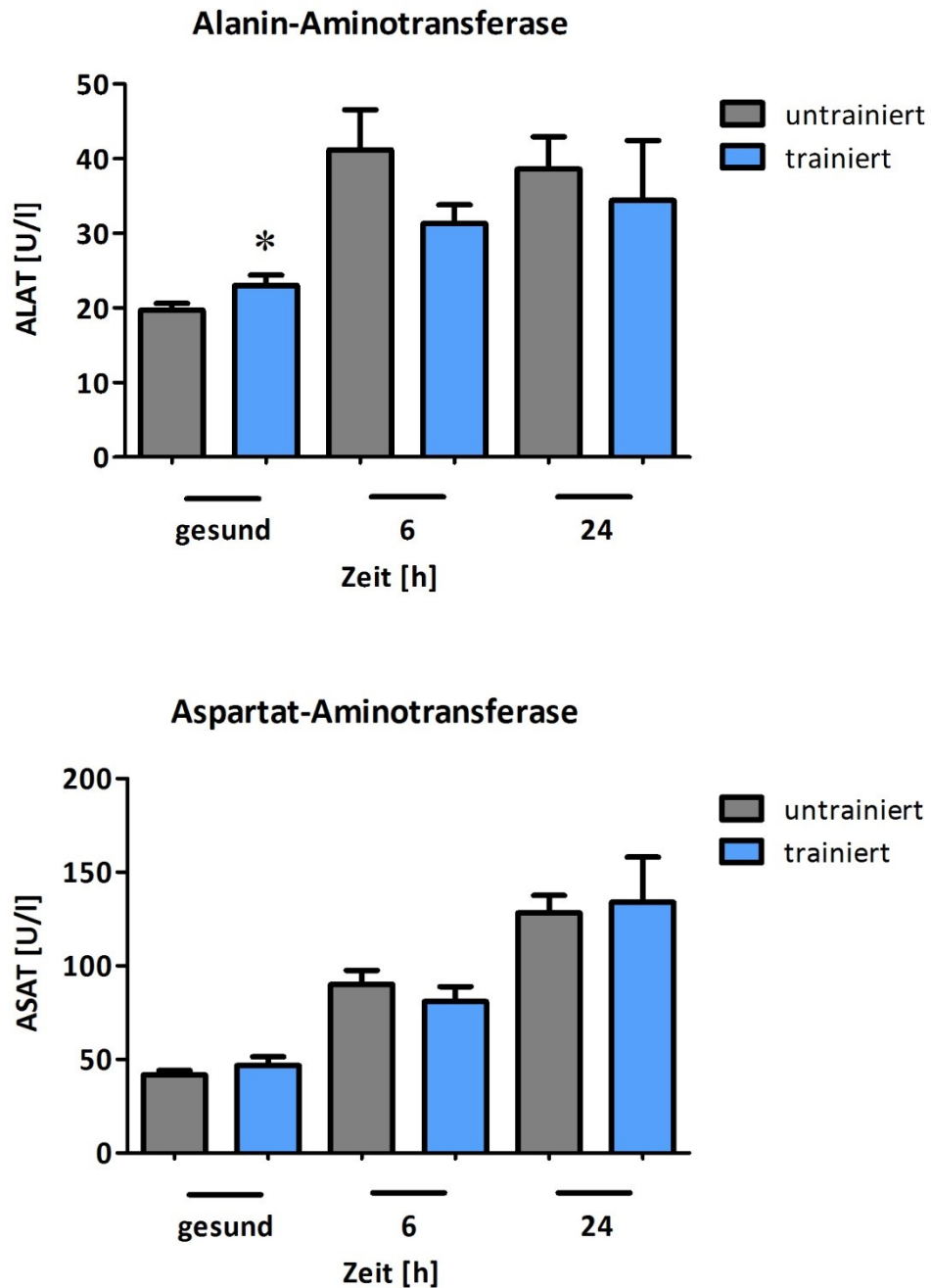
## 4.6 Organspezifische Unterschiede

### 4.6.1 Leber

#### 4.6.1.1 Klinische Chemie

Um den Einfluss von regelmäßigem physischem Training auf die sepsisassoziierte Schädigung der Leber zu untersuchen, wurden verschiedene laborchemische Parameter in Plasmaproben gemessen. Zur Beurteilung der Leberzellschädigung dienten die Transaminasen Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT). Für die Leberenzyme konnte im Verlauf der Sepsis ein Anstieg in beiden Gruppen gezeigt werden (Abb. 15). Die Messdaten der gesunden Tiere ohne Sepsis verdeutlichten eine signifikante Erhöhung der ALAT-Konzentration bei trainierten Mäusen ( $23,0 \pm 1,39$  U/l) im Gegensatz zu untrainierten Tieren ( $19,7 \pm 0,92$  U/l;  $p < 0,05$ ). Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsisinduktion zeigte sich eine leichte Tendenz mit niedrigeren ALAT-Werten in der Trainingspopulation (trainiert  $31,3 \pm 2,5$  U/l vs. untrainiert  $41,2 \pm 5,36$  U/l), diese Varianz war allerdings nicht signifikant. Nach 24 Stunden manifestierte sich kein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen (trainiert  $34,38 \pm 8,06$  U/l vs. untrainiert  $38,6 \pm 4,35$  U/l). Die Exploration der Plasmakonzentration von ASAT ergab für die gesunden trainierten ( $46,83 \pm 4,53$  U/l) und untrainierten ( $41,8 \pm 2,22$  U/l) Mäuse keinen Unterschied. Zum Untersuchungszeitpunkte 6 Stunden nach Sepsisinduktion präsentierte sich der Konzentrationsanstieg von ASAT in der Kontrollgruppe ( $90,0 \pm 7,61$  U/l) deutlicher als in der Trainingsgruppe ( $80,9 \pm 7,97$  U/l). Diese Divergenz der Gruppen war jedoch nicht signifikant. Nach 24 Stunden zeigte sich kein Unterschied zwischen trainierten ( $133,9 \pm 24,18$  U/l) und untrainierten ( $128,2 \pm 9,41$  U/l) Mäusen.





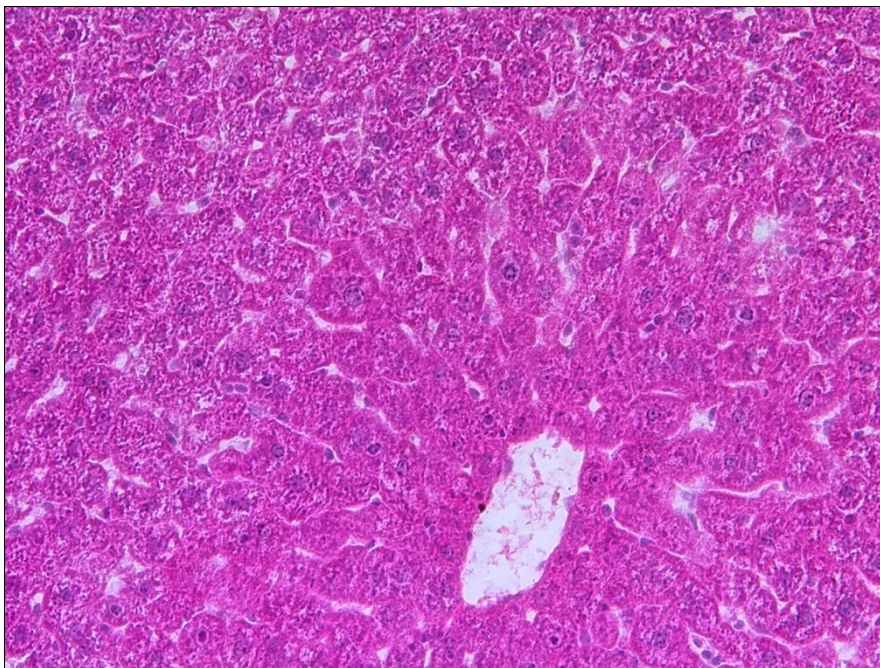
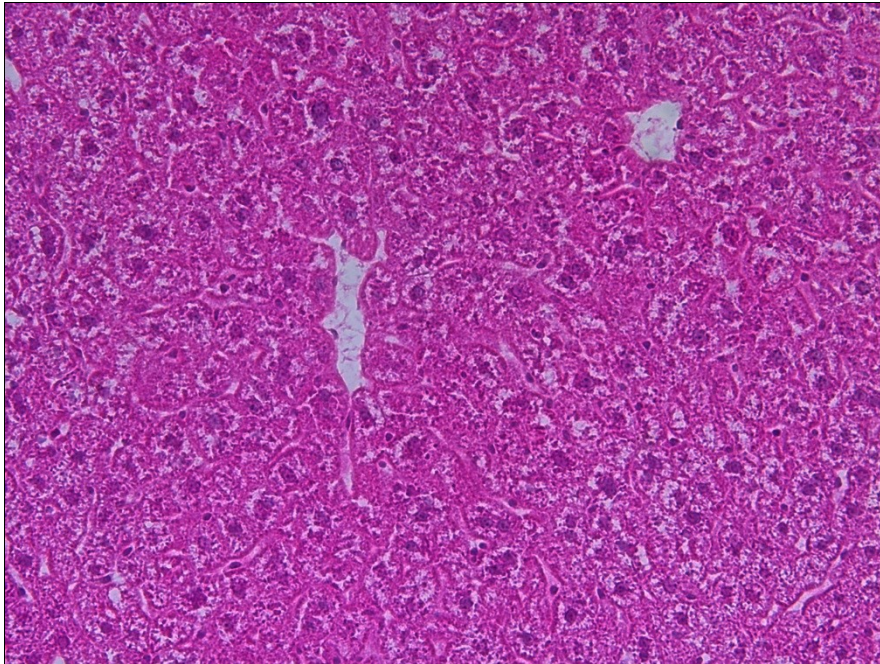
**Abbildung 15: Plasmakonzentrationen von Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT)**

Die Plasmakonzentrationen von ALAT und ASAT wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (gesund, 6 und 24 h nach Sepsisinduktion) bei trainierten und untrainierten Tieren bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Ein p-Wert  $< 0,05$  (\*) wurde als signifikant gewertet.

#### 4.6.1.2 Histologie - HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

Mittels HE-Färbung wurden trainings- und sepsisassoziierte morphologische Veränderungen der Leber histologisch untersucht. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Jena. Alle histologischen Schnitte der gesunden trainierten und untrainierten Mäuse zeigten ein normales Leberparenchym und wiesen keine morphologischen Unterschiede auf (Abb.16). Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsisinduktion manifestierte sich bei einigen Tieren, sowohl aus der trainierten als auch aus der untrainierten Mäusepopulation, eine beginnende, eher diffuse, kleintropfige Leberzellverfettung (Abb. 17). Bei einem der fünf untersuchten trainierten Tiere konnte eine geringfügige mikrovesikuläre Verfettung festgestellt werden. Die weiteren 4 Tiere wiesen keine histologischen Abweichungen des Leberparenchyms von der physiologischen Morphologie auf. In der untrainierten Mäusepopulation manifestierte sich die hepatozelluläre Vakuolisierung bei zwei von fünf Mäusen, wobei sich die Vakuolen im Vergleich zu dem betroffenen trainierten Tier größer und in höherer Anzahl darstellten. Zeichen einer Apoptose in Form von schrumpfenden Zellen mit eosinophilem Plasma und einem kleinen kompakten Zellkern waren nicht zu beobachten. Auch eine Leberzellnekrose mit typischen Zeichen, wie z. B. der fehlenden Kernanfärbbarkeit, ein eosinophiles Plasma oder der Verlust der Zellgrenzen, konnte nicht gezeigt werden. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Sepsisinduktion konnte eine deutliche Progression und eine unterschiedlich starke zonale Ausprägung der Verfettung registriert werden. Die Leberzellverfettung war im Parenchym der trainierten Tiere geringfügig stärker ausgeprägt als bei untrainierten Mäusen (Abb 18). So zeigten drei von vier Tieren der Trainingsgruppe eine deutliche disseminierte bzw. diffuse klein- bis mittelgroßtropfige Leberzellverfettung, jedoch mit zonaler Betonung peripher, d. h. im Bereich der Periportalfelder und geringerer Ausprägung zentral. Ein weiteres Tier der Population zeigte im Vergleich einen weniger stark ausgeprägten und kleintropfigeren Befund. In der untrainierten Mäusepopulation manifestierte sich bei 2 der 5 Tiere eine deutliche, überwiegend kleintropfige Leberzellverfettung, die im Ausmaß allerdings hinter der Fettvakuolenanzahl und –größe der trainierten Mäuse zurückblieb. Außerdem war das Verteilungsmuster eher peripher als diffus mit nur geringer Manifestation zentral. Zwei weitere Tiere zeigten eine geringe hepatozelluläre Verfettung und bei einem Tier der Population konnten kaum Anzeichen einer Verfettung gezeigt werden. Darüber hinaus gab es in beiden

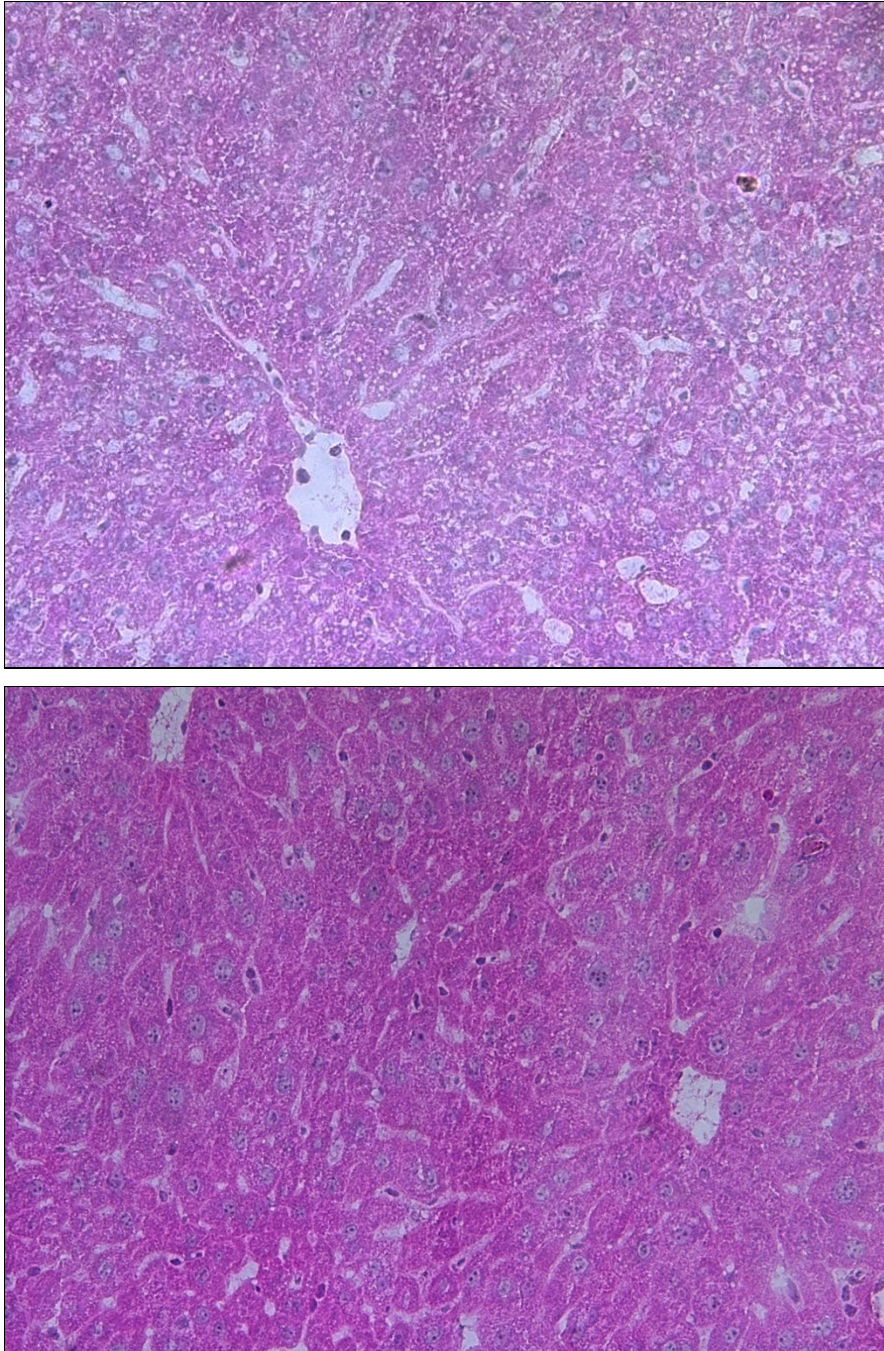
Gruppen keine sicheren Zeichen einer Leberzellschädigung im Sinne apoptotischer oder nekrotischer Zellen.



**Abbildung 16: Leber einer gesunden Maus**

Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte von Lebern einer untrainierten (Bild oben) und einer trainierten (Bild unten) gesunden Maus. Färbung: HE, 20fache Vergrößerung.

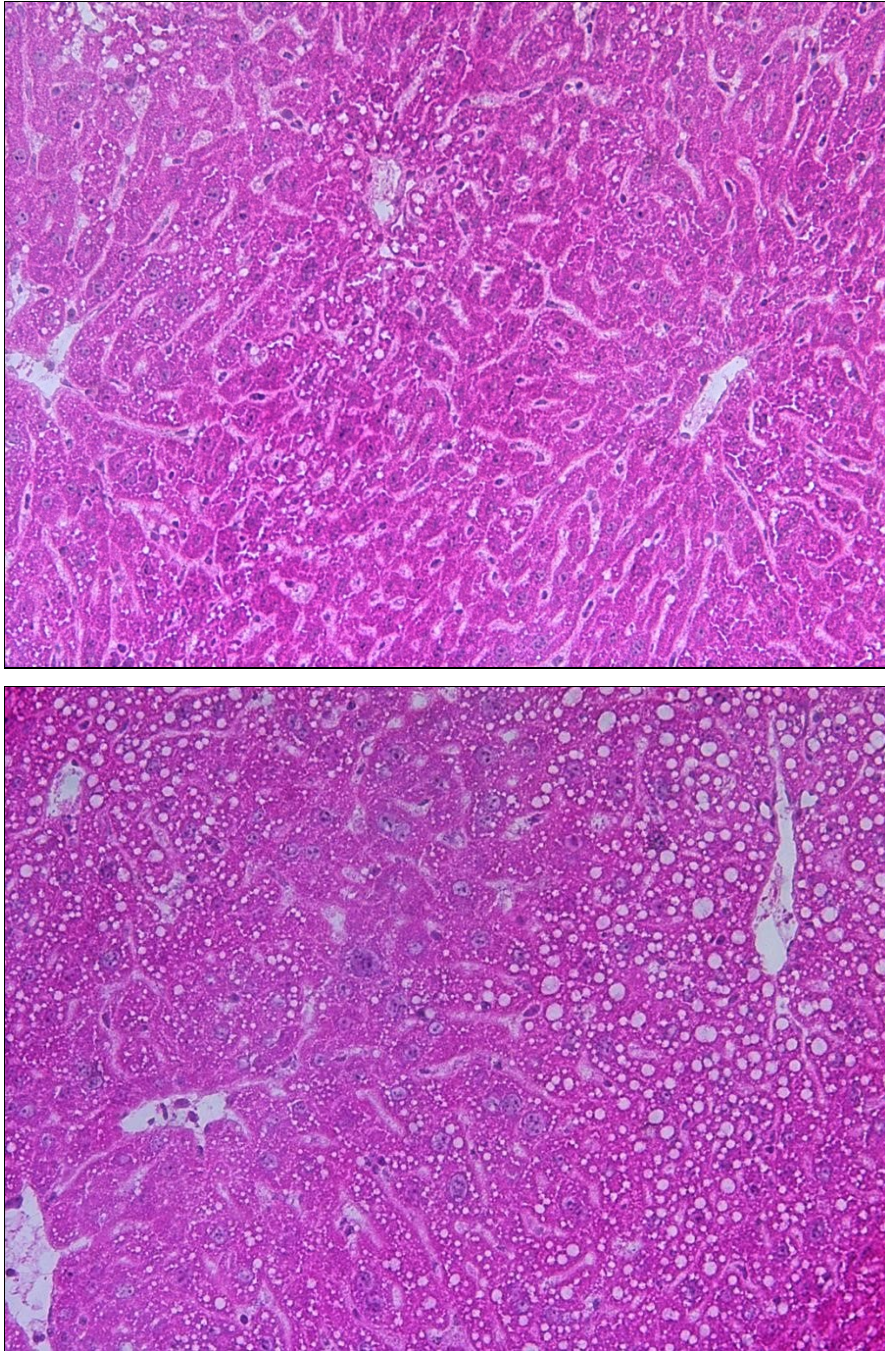




**Abbildung 17: Leber 6 Stunden nach Sepsisinduktion**

Die Abbildung zeigt repräsentative histologische Schnitte einer Leber einer untrainierten (Bild oben) und einer trainierten (Bild unten) Maus, jeweils 6 h nach Sepsisinduktion. In beiden Bildern ist eine beginnende kleintropfige Leberzellverfettung zu sehen. Färbung: HE, 20fache Vergrößerung.





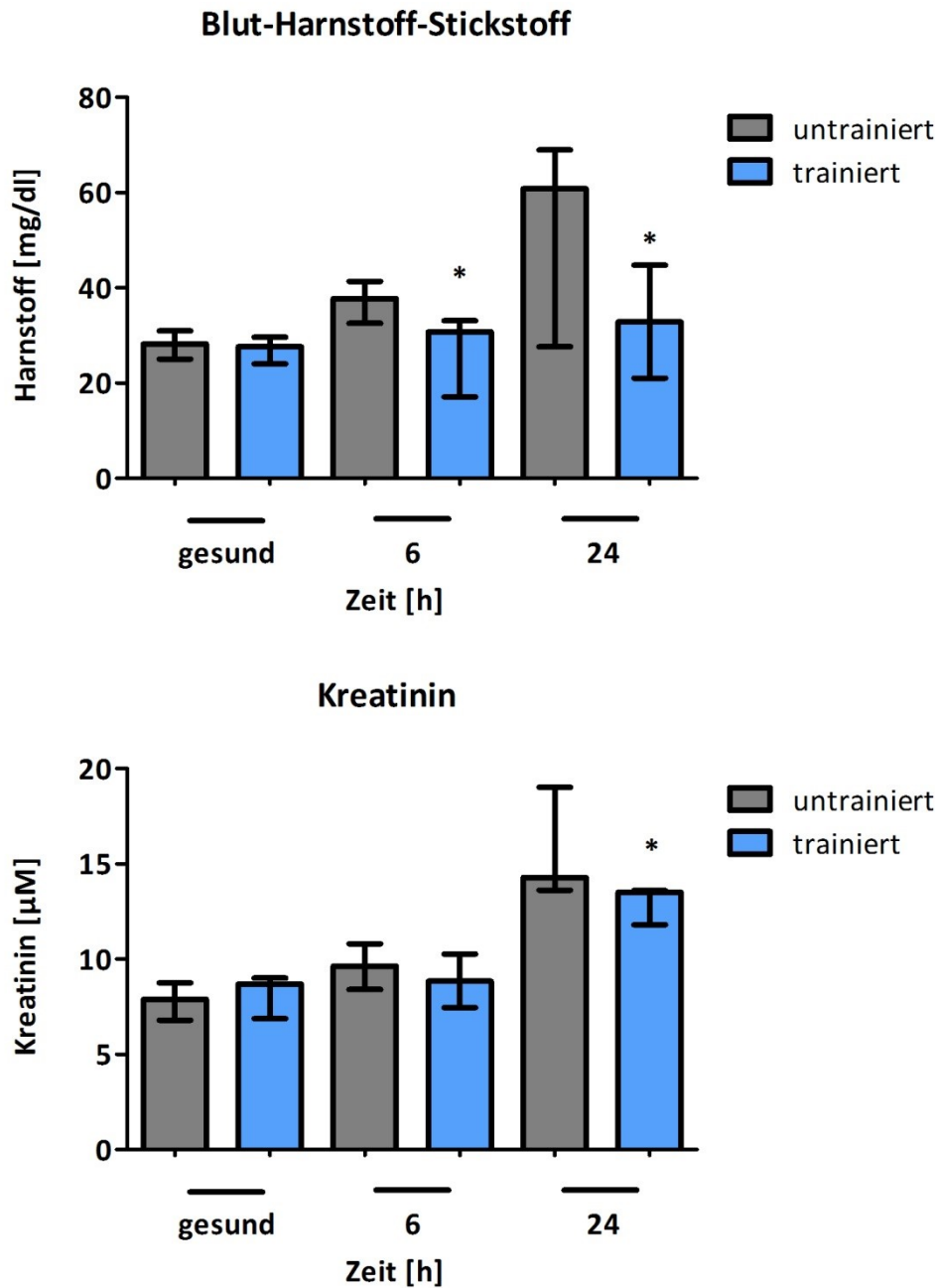
**Abbildung 18: Leber 24 Stunden nach Sepsisinduktion**

Die Abbildung zeigt repräsentative Schnitte einer Leber einer untrainierten (Bild oben) und einer trainierten (Bild unten) Maus, jeweils 24 h nach Sepsisinduktion. In beiden Bildern ist eine disseminierte klein- bis mittelgroßtropfige Leberzellverfettung mit jedoch deutlich ausgeprägterem Befund peripher im Bereich der Portalfelder. Im unteren Bild ist eine stärkere Ausprägung der Leberzellverfettung sichtbar. Färbung: HE, 20fache Vergrößerung.

## 4.6.2 Niere

### 4.6.2.1 Klinische Chemie

Um den Einfluss des regelmäßigen physischen Trainings auf die sepsisassoziierte Schädigung und die Funktion der Niere zu untersuchen, wurden die Konzentrationen von Blut-Harnstoff-Stickstoff und Kreatinin in Plasmaproben trainierter und untrainierter Mäuse gemessen. Für beide Parameter war ein Anstieg im Verlauf der Sepsis in beiden Gruppen zu verzeichnen (Abb. 19). Gesunde Tiere wiesen keinen gruppenspezifischen Unterschied für Blut-Harnstoff-Stickstoff oder Kreatinin auf. Für Blut-Harnstoff-Stickstoff zeigte sich schon 6 Stunden nach Sepsisinduktion ein signifikanter Unterschied zwischen trainierten (30,8 (17,1 – 33,1) mg/dl) und untrainierten Tieren (37,8 (32,6 – 41,4) mg/dl;  $p < 0,01$ ). Nach 24 Stunden zeigte sich eine zunehmende Deviation zwischen den beiden Gruppen. Der Anstieg der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Konzentrationen war in der Kontrollgruppe (60,9 (27,6 – 69,0) mg/dl) signifikant höher als in der Trainingsgruppe (32,8 (21,0 – 44,8) mg/dl;  $p < 0,05$ ). Während sich die Konzentrationen in der Kontrollgruppe nach 24 Stunden im Gegensatz zu den untrainierten Tieren ohne Sepsisinduktion (28,3 (25,0 – 31,0) mg/dl) verdoppelten, sind diese in der Trainingsgruppe nach 24 Stunden nur minimal erhöht im Vergleich zu den trainierten Tieren ohne Sepsisinduktion (27,6 (24,1 – 29,7) mg/dl). Auch die Bestimmung des Kreatinin-Spiegels zeigte für gesunde Mäuse ohne Sepsis keine gruppenspezifischen Unterschiede (trainiert 8,7 (6,9 - 9,0  $\mu\text{M}$  vs. untrainiert 7,9 (6,8 – 8,8)  $\mu\text{M}$ ). Nach 6 Stunden zeigte sich lediglich eine Tendenz mit geringeren Werten in der Trainingsgruppe (8,9 (7,5 – 10,3)  $\mu\text{M}$ , Kontrollgruppe 9,6 (8,4 – 10,8)  $\mu\text{M}$ ). 24 Stunden nach Sepsisinduktion konnte auch für Kreatinin ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden. So stiegen die Konzentrationen in der Kontrollgruppe (14,3 (13,6 – 19,0)  $\mu\text{M}$ ) signifikant stärker an als in der Trainingsgruppe (13,5 (11,8 – 13,6)  $\mu\text{M}$ ;  $p < 0,05$ ).



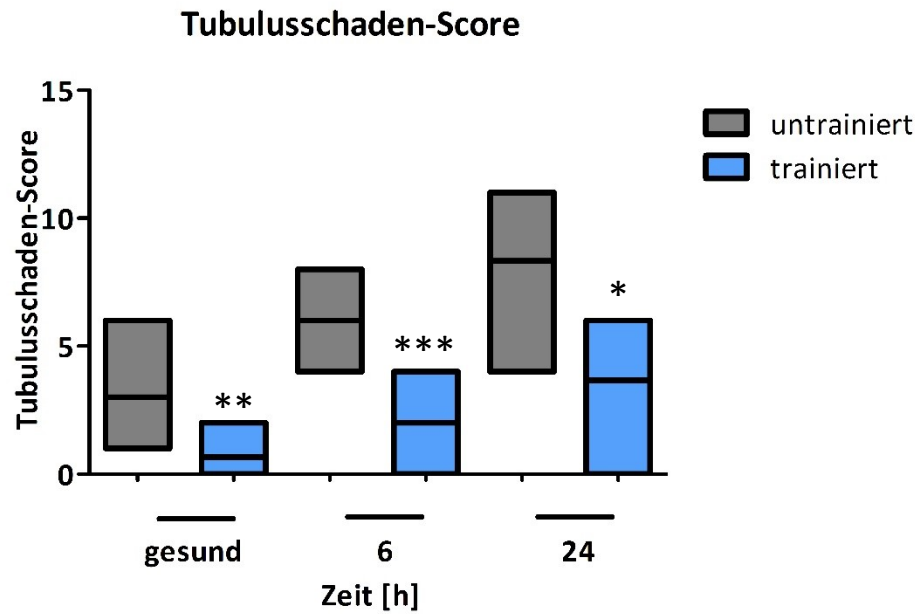
**Abbildung 19: Blut-Harnstoff-Stickstoff und Kreatinin**

In einer trainierten und einer untrainierten Mäusepopulation wurden Blut-Harnstoff-Stickstoff und Kreatinin zu drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (gesunde Tiere, 6 und 24 h nach Sepsisinduktion). Die Darstellung der Daten erfolgte als Median ( $\pm$  Interquartilsabstand). Ein p-Wert  $< 0,05$  (\*) wurde als signifikant gewertet. *Harnstoff* = Blut-Harnstoff-Stickstoff

#### 4.6.2.2 Histologie – PAS-Färbung

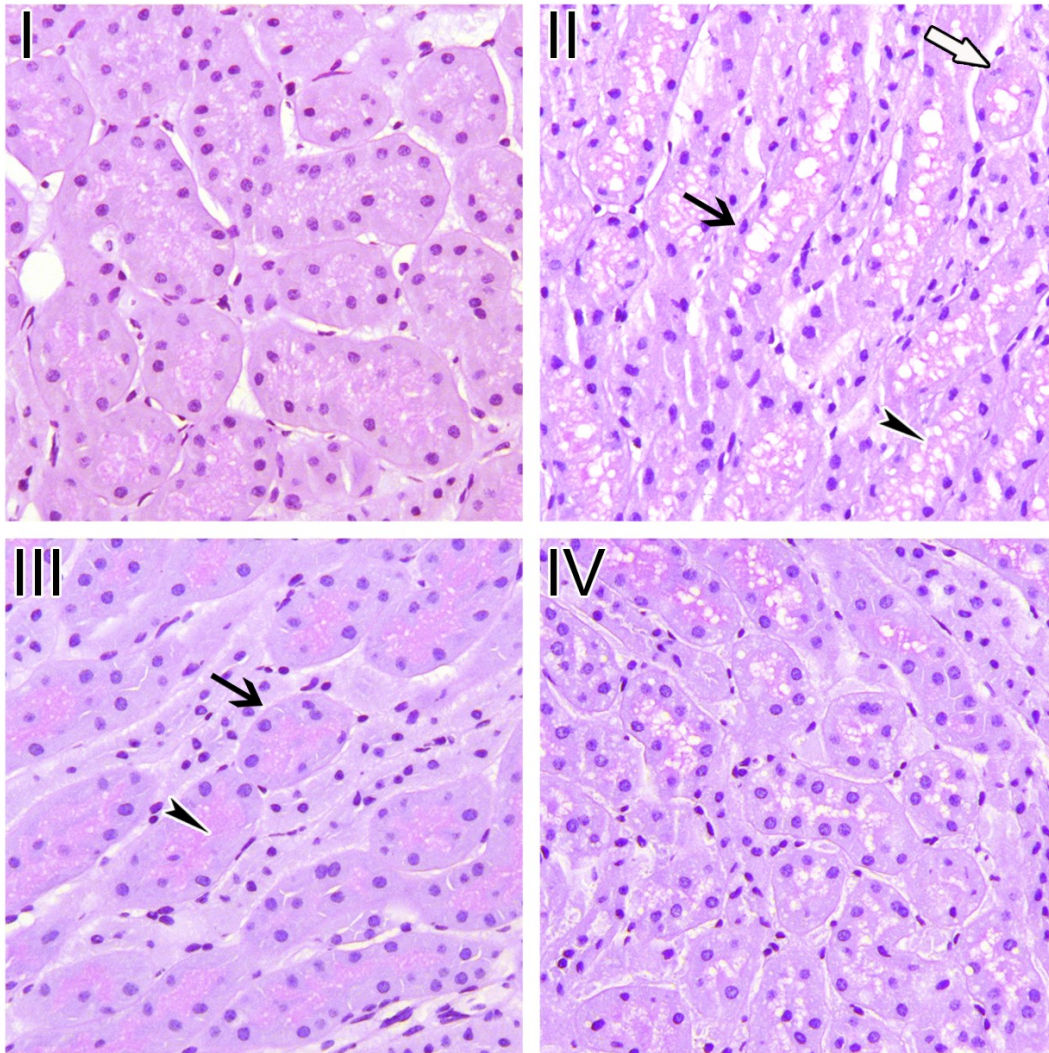
Um neben den funktionellen auch die morphologischen Veränderungen der Niere durch physisches Ausdauertraining zu evaluieren, wurde das Nierenparenchym mittels PAS-Färbung histologisch untersucht (Abb. 21) und anhand eines semi-quantitativen Punktwertungsverfahrens beurteilt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe eines Tubulusschaden-Scores für die Zeitpunkte gesund sowie 6 und 24 Stunden nach Sepsisinduktion für trainierte und untrainierte Mäuse dargestellt (Abb. 20). Es konnte gezeigt werden, dass der Tubulusschaden in beiden Gruppen im Verlauf der Sepsis progredient war. Beim gruppenspezifischen Vergleich fiel schon bei gesunden Tieren ein deutlicher Unterschied auf. Die Nieren der untrainierten Tiere zeigten einen signifikant größeren Nierenschaden (2 (1 – 6)) als die der trainierten Tiere (0 (0 – 2),  $p < 0,01$ ). Im Verlauf der Sepsis wurde eine progressive Deviation zwischen den Gruppen deutlich. 6 Stunden nach Sepsisinduktion waren die Werte der trainierten Mäuse (2 (0 – 4)) im Tubulusschaden-Score signifikant geringer als die, der untrainierten Tiere (6 (4 – 8),  $p < 0,001$ ). Auch nach 24 Stunden wurde in der Trainingspopulation (5 (0 – 6)) ein signifikant geringerer Nierenschaden beobachtet als in der Kontrollgruppe (10 (4 – 11),  $p < 0,05$ ).





**Abbildung 20: Tubulusschaden-Score**

Die semi-quantitative Auswertung des akuten Nierenschadens erfolgte mit Hilfe eines Tubulusschaden-Scores. Evaluiert wurde nach Kriterien wie Kernverlust der Tubuluszellen, Abschwächung des epithelialen Bürstensaums und epitheliale Vakoulisierung. In eine Trainings- und eine Kontrollgruppe wurden die Nieren von gesunden Mäusen und Nieren von Tieren 6 oder 24 h nach Sepsisinduktion untersucht. Die Werte sind dargestellt als Median ( $\pm$  Interquartilsabstand). p-Wert < 0,05 (\*), p-Wert < 0,01 (\*\*), p-Wert < 0,001 (\*\*\*)

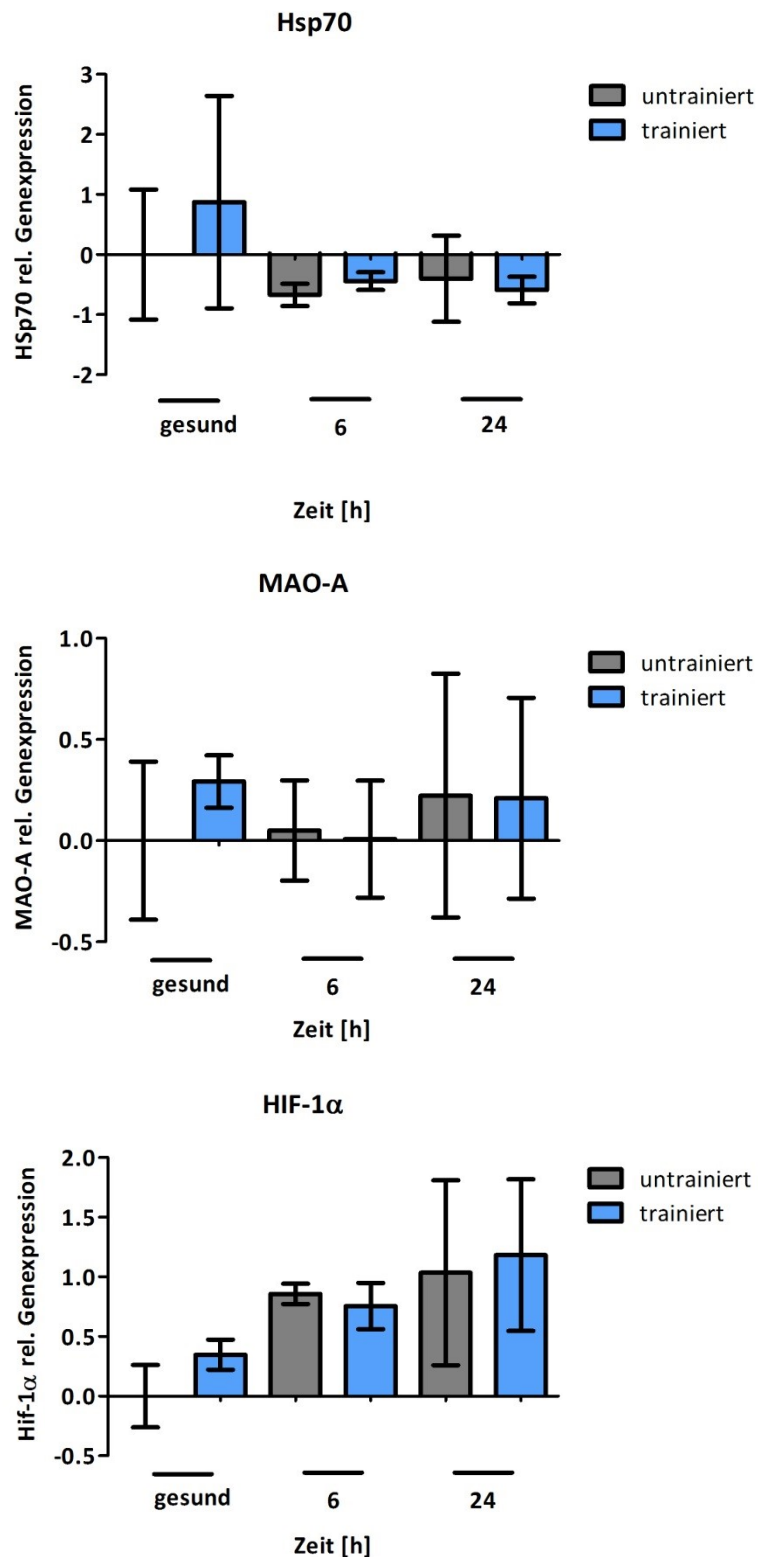


### Abbildung 21: Tubulusepithel der Niere

Das kortikale Tubulusepithel der Kontrolltiere (I) ohne Sepsisinduktion zeigte eine regelrechte Zellstruktur. Fast alle Epithelzellen wiesen intakte Zellkerne auf. Dagegen zeigten die Tiere der Kontrollgruppe nach Sepsisinduktion (II) stark ausgeprägte epitheliale Vakuolisierung (Pfeilspitze), abgeflachtes Tubulusepithel (schwarzer Pfeil) und atypisch geformte, teils nahezu aufgelöste Zellkerne (weißer Pfeil). Trainierte Tiere ohne Sepsis (III) zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine sogar intaktere, dünne und kontinuierliche luminale Linie, die Hinweis auf einen intakten Bürstensaum (Pfeilspitze) war und eine intakte tubuläre Basalmembran (schwarzer Pfeil). Trainierte septische Mäuse (IV) zeigten ein weniger abgeflachtes tubuläres Epithel und weniger Vakuolisierung als die Kontrollgruppe. Es sind repräsentative Bilder dargestellt. PAS-Färbung, Vergrößerung 200fach.

#### 4.6.2.3 Genexpression von HSP70, MAO-A und Hif-1 $\alpha$

Um mögliche Ursachen für den in Punkt 4.6.2.2 nachgewiesenen geringeren Tubulusschaden trainierter Mäuse aufzudecken, wurden anschließend Untersuchungen auf Transkriptionsebene mit Enzymen durchgeführt, die mit oxidativem Stress, Immunreaktion und Hypoxie assoziiert sind. Dazu wurde die Genexpression von HSP70, MAO-A und Hif-1 $\alpha$  mittels qRT-PCR relativ quantifiziert (Abb. 22). Als Ausgangsmaterial diente homogenisiertes Nierengewebe von trainierten und untrainierten Tieren. Ein Wert von +1 spiegelt eine Verdopplung, ein Wert von -1 eine Halbierung der Transkriptanzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe wider. Nur Werte  $\geq +1$  oder  $\leq -1$  wurden im Sinne einer biologischen Relevanz als signifikant gewertet. Bei der Untersuchung von HSP70 zeigten sich bei gesunden Tieren zwar höhere Expressionswerte in der Trainingsgruppe (0,87 ( $\pm 1,77$ )), jedoch war der Unterschied zur Kontrollgruppe (0,0 ( $\pm 1,08$ )) nicht signifikant. Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsisinduktion konnten für HSP70 keine gruppenspezifischen Unterschiede gezeigt werden (-0,44 ( $\pm 0,15$ ) trainiert vs. -0,67 ( $\pm 0,18$ ) untrainiert) und auch nach 24 Stunden wurde keine Varianz zwischen den beiden Gruppen sichtbar (0,59 ( $\pm 0,22$ ) trainiert vs. 0,40 ( $\pm 0,71$ ) untrainiert). Insgesamt war ein leichter Rückgang der Genexpression von HSP70 im Rahmen der Sepsis zu verzeichnen. Die Evaluation der Genexpression von MAO-A zeigte bei gesunden Tieren keine Disparität zwischen Trainings- (0,29 ( $\pm 0,13$ )) und Kontrollgruppe (0,00 ( $\pm 0,39$ )). Auch 6 Stunden nach Sepsisinduktion manifestierte sich kein gruppenspezifischer Unterschied in der Genexpression (trainiert 0,01 ( $\pm 0,28$ ) vs. untrainiert 0,05 ( $\pm 0,25$ )). Annähernd gleiche Werte in beiden Gruppen (trainiert 0,21 ( $\pm 0,50$ ) vs. untrainiert 0,22 ( $\pm 0,60$ )) zeigten sich auch nach 24 Stunden. Insgesamt war keine Variation der Genexpression im Verlauf der Sepsis nachweisbar. Bei der Exploration der Hif-1 $\alpha$ -Genprodukte konnte kein Unterschied zwischen gesunden trainierten (0,35 ( $\pm 0,13$ )) und untrainierten (0,00 ( $\pm 0,26$ )) Mäusen dargestellt werden. 6 Stunden nach Sepsisinduktion manifestierte sich ein simultaner Anstieg der Genprodukte in beiden Gruppen (trainierte 0,75 (0,19) vs. untrainiert 0,86 (0,09)). Nach 24 Stunden zeigte sich zwar eine fortlaufende Progression der Genexpression, jedoch keine Divergenz zwischen trainierten (1,18 ( $\pm 0,64$ )) und untrainierten (1,04 ( $\pm 0,77$ )) Tieren.



**Abbildung 22: Genexpression von HSP70, MAO-A, Hif-1α in der Niere**

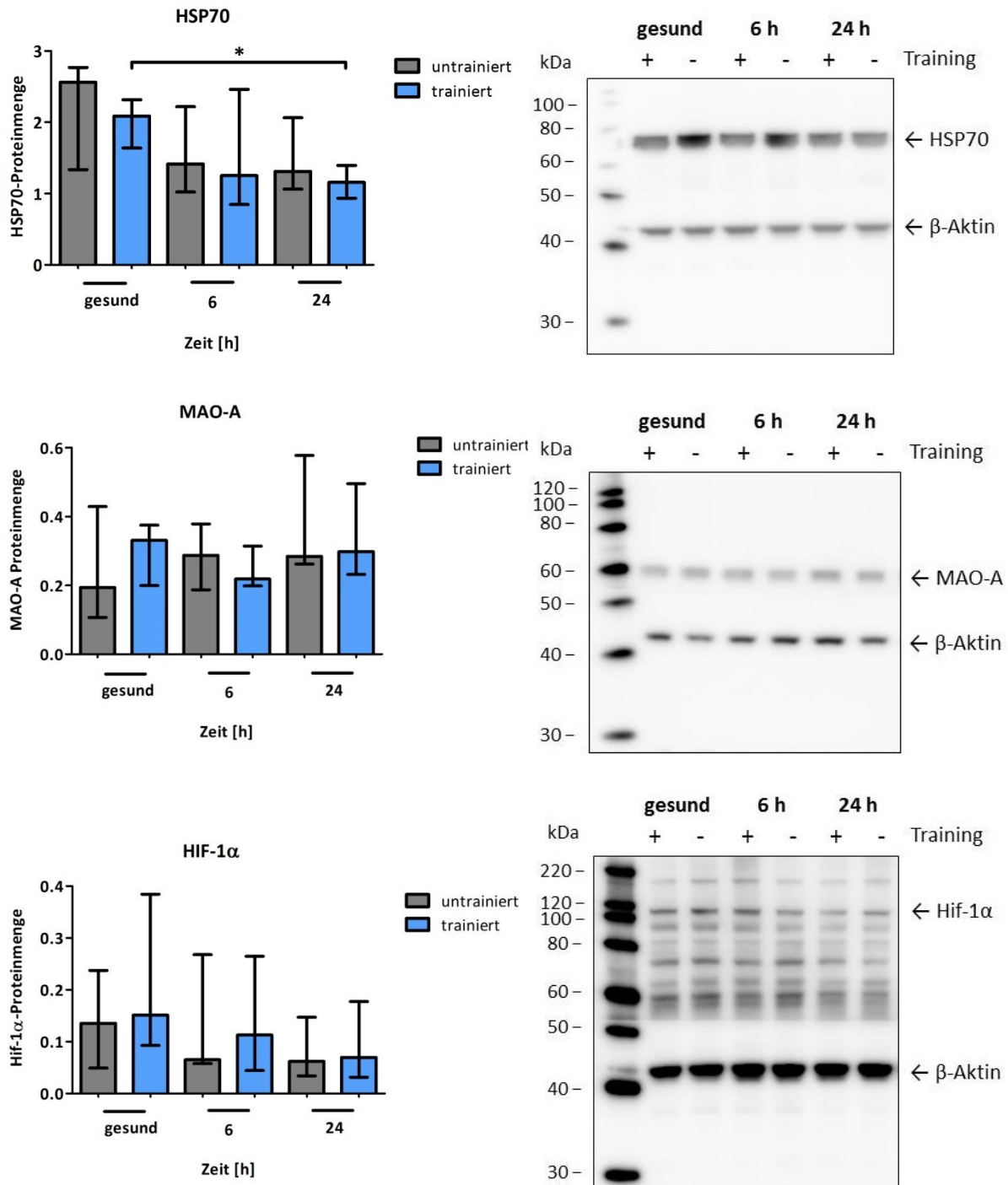
Dargestellt ist die Genexpression von HSP70, MAO-A und Hif-1α trainierter und untrainierter Tiere zu drei Zeitpunkten (gesund, 6 und 24 h nach Sepsisinduktion). Die Auswertung der Genexpression erfolgte in Form eines einheitslosen Faktors, welcher sich auf die Expressionssteigerung oder –reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Interventionen

(ohne Sepsis, ohne Training) bezog und mittels des Housekeeping-Gens *Hmbs* korrigiert wurde. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. *HSP70*: Hitzeschockprotein 70, *MAO-A*: Monoaminoxidase-A, *Hif-1 $\alpha$* : Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$

#### 4.6.2.4 Proteinmenge von HSP70, MAO-A und Hif-1 $\alpha$

Zur Einschätzung zellulärer Prozesse war neben der Genexpressionsanalyse auch die Bestimmung der Proteinmenge von HSP70, MAO-A und Hif-1 $\alpha$  essentiell. Alle Werte repräsentieren nach densitometrischer Quantifizierung eine relative Proteinmenge und sind somit ohne Einheit angegeben. Bei der Darstellung der Proteinmenge von HSP70 bei gesunden Mäusen zeigten sich geringfügig höhere Werte in der Kontrollgruppe (2,56 (1,34 – 2,77)) im Vergleich zur Trainingspopulation (2,09 (1,64 – 2,32)), jedoch war diese Deviation nicht signifikant. Nach Sepsisinduktion konnte allgemein eine Reduktion der Proteinmenge von HSP70 verzeichnet werden. Diese Regression zeigte sich bei trainierten (1,25 (0,85 – 2,46)) und untrainierten (1,41 (1,02 – 2,22)) Tieren in gleichem Ausmaß, so dass 6 Stunden nach Sepsisinduktion keine gruppenspezifischen Unterschiede sichtbar wurden. Nach 24 Stunden zeigte sich die Abnahme der Proteinmenge nur schwach progredient. Auch zu diesem späteren Zeitpunkt konnten keine Unterschiede zwischen Trainings- (1,16 (0,93 – 1,40)) und Kontrollgruppe (1,31 (1,06 – 2,06)) aufgezeigt werden. Die Reduktion der Proteinmenge im Verlauf der Sepsis zeigte sich in beiden Gruppen deutlich, in der Trainingsgruppe war dieser Unterschied nach 24 Stunden signifikant ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ). Bei der Untersuchung von MAO-A zeigten sich bei gesunden Mäusen keine Unterschiede zwischen trainierten (0,19 (0,17 – 0,43)) und untrainierten (0,33 (0,20 – 0,37)) Tieren. Nach Induktion der Sepsis war die MAO-A-Proteinmenge im Verlauf nahezu konstant. So zeigte sich nach 6 Stunden keine Veränderung im Vergleich zu gesunden Tieren und auch eine Disparität zwischen Trainings- (0,29 (0,19 – 0,38)) und Kontrollgruppe (0,22 (0,20 – 0,31)) konnte nicht beobachtet werden. 24 Stunden nach Sepsisinduktion zeigten sich ebenfalls keine gruppenspezifischen Unterschiede (trainiert 0,28 (0,26 – 0,58) vs. untrainiert 0,30 (0,23 – 0,50)). Die Darstellung der Proteinmenge von Hif-1 $\alpha$  zeigte bei gesunden Mäusen keine Varianz zwischen Trainings- (0,15 (0,09 – 0,38)) und Kontrollgruppe (0,14 (0,05 – 0,24)). Nach Sepsisinduktion konnte ebenfalls keine Veränderung der Proteinmenge von Hif-1 $\alpha$  beobachten werden. So manifestierte sich

auch nach 6 Stunden kein Unterschied zwischen trainierten (0,11 (0,04 – 0,26)) und untrainierten (0,07 (0,06 – 0,27)) Tieren. 24 Stunden nach Sepsisinduktion zeigte sich die Proteinmenge in der Trainingspopulation (0,07 (0,03 – 0,18)) ebenfalls nahezu identisch im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,06 (0,03 – 0,15)). Die jeweiligen Proteinmengen und ein exemplarisches Bild einer Blot-Membran sind für jedes Protein in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23: relative Proteinmenge und Westernblot-Membran von HSP70, MAO-A und Hif-1α**

Für die Proteine HSP70, MAO-A und Hif-1α sind jeweils die relative Proteinmenge graphisch (links) und das Bild einer Blot-Membran (rechts) im Original dargestellt. Auf der Membran sind das jeweils untersuchte Protein und das Houskeeping-Protein β-Aktin markiert. Ausgewertet wurden Tiere einer trainierten (+) und einer untrainierten (-) Mäusepopulation zu drei verschiedenen Zeitpunkten (gesund, 6 und 24 h nach Sepsisinduktion). Die relative Proteinmenge ist dargestellt als Median (± Interquartilsabstand). Auf jeder Blot-Membran ist

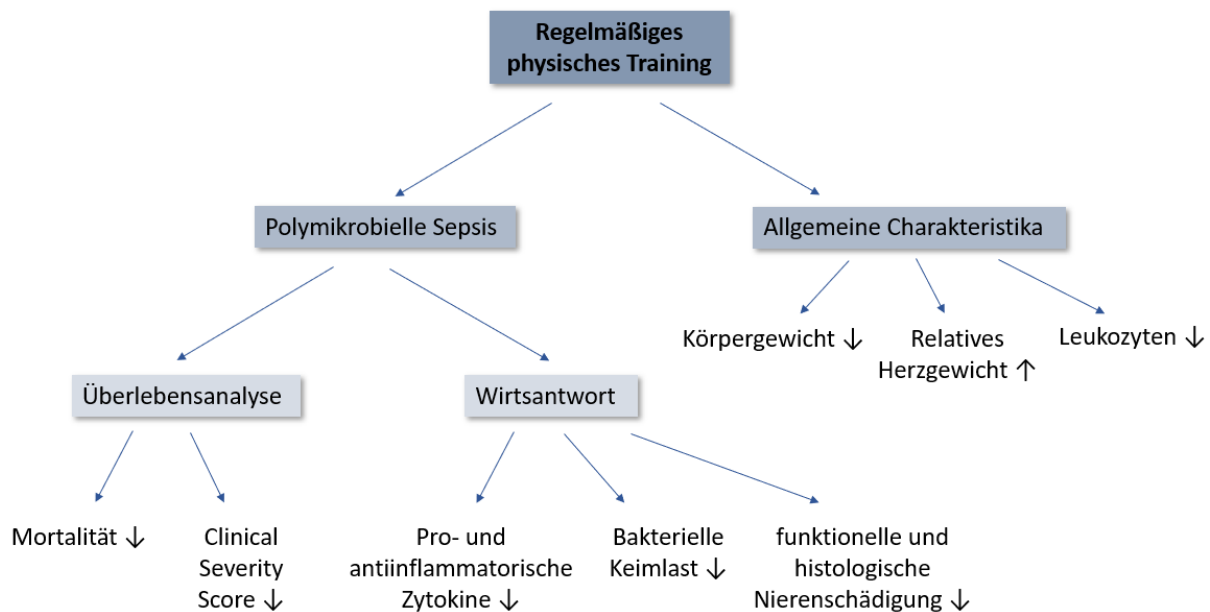
ein Größenstandard dargestellt. Die Proteingrößen sind in kDa angegeben. *HSP70*: Hitzeschockprotein 70, *MAO-A*: Monoaminoxidase-A, *Hif-1 $\alpha$* : Hypoxie-induzierter Faktor-1 $\alpha$



## 5 Diskussion

### 5.1 Überblick

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von regelmäßigem physischem Training auf den Verlauf und die Mortalität einer polymikrobiellen Sepsis untersucht. Eine Übersicht über die Ergebnisse ist in Abbildung 24 dargestellt.



#### Abbildung 24: Übersicht der Ergebnisse

Diese Abbildung zeigt einen Überblick über die wichtigsten Ergebnisse der aktuellen Arbeit. Ein Anstieg (↑) oder eine Reduktion (↓), welche durch regelmäßiges physisches Training im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe erreicht werden konnte, ist mit entsprechenden Pfeilen markiert.

### 5.2 Studiendesign

Zur Überprüfung möglicher Trainingseffekte war es notwendig, ein adäquates rezidivierendes Training mit den Tieren durchzuführen, das einen entsprechenden systemisch modulierenden Effekt hervorruft. Dabei musste ein zu schwaches Training mit potentiell zu geringen Reizen, aber auch ein erschöpfendes Training mit potentiell immunsuppressiven Effekten und eventuell sogar gesteigerter Infektanfälligkeit vermieden werden (Neto et al. 2011). Das aktuell angewandte Trainingsprogramm wurde eng an das gut etablierte Trainingsprogramm von Kemi et al. angelehnt. Dieses Trainingsregime wurde mittels Testparametern wie der

maximalen Sauerstoffaufnahme und des Respiratorischen Quotienten erstellt und kontrolliert und ist vergleichbar mit entsprechenden Trainingsprotokollen bei Ratten und Menschen (Kemi et al. 2002).

Die Sepsisinduktion erfolgte mittels PCI-Methode, über die eine multibakterielle Peritonitis verursacht wurde. Dies hat sich als einfaches, zuverlässiges und reproduzierbares Verfahren etabliert. Die PCI-Methode induziert einen systemischen Zytokinanstieg und ein progredientes Multiorganversagen bis hin zum Tod und reflektiert viele Eigenschaften einer Sepsis bei Menschen (Gonnert et al. 2011). Damit zeigt sie Vorteile gegenüber den bisher üblichen Methoden, wie z. B. LPS (Lipopolysaccharide) und CLP (cecal ligation and puncture), letzter hat vor allem Limitierung aufgrund einer schlechten Reproduzierbarkeit und hoher Abhängigkeit vom Operateur mit daraus folgendem variablem Krankheitsverlauf und schwankender Mortalität. Das LPS-Modell als Endotoxinämie reflektiert unzureichend die Komplexität der Sepsis bei Menschen (Gonnert et al. 2011, Seemann et al. 2017). Da die Sepsis prinzipiell interindividuell sehr variabel verläuft (Kumpf und Schumann 2008), ist es wichtig, ein reproduzierbares Tiermodell zu verwenden, das zusätzlich dem Verlauf der menschlichen Sepsis nahekommt. Das aktuelle Design dieser Arbeit hat Limitierungen insbesondere hinsichtlich Alter und Geschlechtsverteilung (alle Mäuse sind jung und männlich). Bei Menschen sind vor allem ältere und vorerkrankte Patienten häufiger von einer Sepsis betroffen und haben einen schwereren Krankheitsverlauf (Esmon 2004). Außerdem konnte belegt werden, dass Frauen, insbesondere über 50 Jahre, eine geringere Mortalität als Männer während einer Sepsis aufzeigen (Adrie et al. 2007). Zusätzlich erhalten Menschen normalerweise eine supportive Therapie, u. a. in Form einer Flüssigkeitsgabe und einer antibiotischen Therapie. Dies fehlt in den meisten tierexperimentellen Studien und kann somit einen potentiellen Therapieeffekt verändert darstellen (Esmon 2004). Zusätzlich ist zu beachten, dass sich die Genantwort von Menschen und Mäusen auf einen infektiösen Stimulus stark unterscheidet und dies die Frage aufbringt, ob tierexperimentelle Studien überhaupt ausreichend geeignet sind, die Komplexität der humanen Wirtsantwort widerzuspiegeln (Seok et al. 2013, Cavillon et al. 2020). Des Weiteren ist zu beachten, dass der Sepsisursprung Einfluss auf multiple Parameter wie Mortalität und Organdysfunktion hat. So ist die Prognose bei Menschen mit einer Sepsis pulmonaler Genese schlechter als bei einem abdominellen Fokus (Jeganathan et al.

2017). Die aktuellen Ergebnisse dieser Arbeit können somit nur begrenzt auf alte oder weibliche Mäuse, auf Menschen während einer Sepsis und auf Infektfokuse außerhalb des Abdomens übertragen werden. Aufgrund der Komplexität des Versuchsaufbaus mit zwei Studienarmen sowie jeweils sechswöchigem Ausdauertraining war die maximale Anzahl der Tiere je Gruppe begrenzt. Es ergeben sich daher zum Teil sehr kleine Gruppengrößen mit eingeschränkter statistischer Aussagekraft.

### **5.3 Regelmäßiges physisches Training moduliert das Körper- und Herzgewicht**

Die Darstellung eines erniedrigten Körpergewichts in der Trainingsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe bestätigt Daten aus der Literatur (Marques et al. 2010, Peppler et al. 2017). Es ist in diesem Zusammenhang auch eine Reduktion des viszeralen und subkutanen Fettgewebes durch freiwilliges Laufbandtraining beschrieben (Peppler et al. 2017). Wiederholt wurde jedoch auch in verschiedenen Studien dargestellt, dass Training oder freiwilliges Laufen nicht zu einem Gewichtsverlust bzw. nicht zu einer geringeren Gewichtszunahme bei Mäusen und Ratten führt (Kemi et al. 2002, Tyml et al. 2017). Bei Schwimmtraining von Mäusen kann anhand der Daten aus der Literatur eine Assoziation des Gewichtsverlust zu Trainingsparametern vermutet werden, da ein signifikant geringeres Körpergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe erst bei hoher Intensität des Trainings oder langandauerndem Training über 6 Wochen beschrieben wird (Evangelista et al. 2003). Ein ausreichender Trainingseffekt wurde jedoch auch ohne Gewichtsverlust, z. B. über den Anstieg der maximalen Sauerstoffaufnahme, in der Literatur objektiviert (Tyml et al. 2017). Auch sind sowohl für die Sepsis als auch für viele chronische Erkrankungen multiple positive Trainingseffekte unabhängig von einer Gewichtsreduktion beschrieben (Blair 2009, Lee et al. 2011, Tyml et al. 2017). Eine zu geringe physische Aktivität bei Menschen ist mit einem gesteigerten Risiko an einer Sepsis zu Versterben unabhängig von anderen Risikofaktoren assoziiert. Für den Einfluss des Körpergewichts auf die Mortalität einer Sepsis gibt es jedoch kontroverse Daten. So konnte für Menschen sowohl für einen erhöhten BMI als auch für einen erhöhten Hüftumfang ein gesteigertes Risiko gezeigt werden, an einer Sepsis zu versterben (Williams 2013). Auch für Mäuse mit gesteigertem

Körpergewicht und Fettanteil nach fettreicher Nahrung ist eine erhöhte Mortalität beschrieben (Strandberg et al. 2009). Oppositäre Studien zeigen jedoch keinen (Sakr et al. 2008) oder sogar einen protektiven Einfluss eines erhöhten BMIs auf die Mortalität einer Sepsis (Prescott et al. 2014). Da aktuell in dieser Arbeit ein niedrigeres Körpergewicht der trainierten Tiere nachgewiesen werden konnte, ist eine Beeinflussung der Ergebnisse sowohl durch einen Trainingseffekt als auch durch ein geringeres Körpergewicht nicht auszuschließen und die Effekte beider Variablen sind nicht voneinander abgrenzbar.

Der Nachweis eines höheren relativen Herzgewichts durch regelmäßiges Training in der aktuellen Arbeit ergänzt die Literatur, in der ein gesteigertes Gewicht des gesamten Herzens oder des linken Ventrikel durch verschiedene Trainingsformen wiederholt dargestellt wurde (Kaplan et al. 1994, Allen et al. 2001, Kemi et al. 2002, Evangelista et al. 2003). Die meisten Studien verwenden das absolute Herzgewicht oder einen Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht. Zwischen Gewicht des Herzens und dem gesamten Körpergewicht besteht jedoch keine lineare Beziehung. Das Gewicht des linken Ventrikels steigt langsamer an als die Körpermasse. Daher wurde in der aktuellen Arbeit, wie in der Literatur empfohlen, eine allometrische Skalierung angewandt. Limitierend muss jedoch erwähnt werden, dass der entsprechende Skalierungswert bei Menschen bestimmt wurde. (Batterham et al. 1997, Kemi et al. 2002). Für Mäuse liegen jedoch keine vergleichbaren Untersuchungen vor.

In unserer Arbeitsgruppe erfolgte zusätzlich eine Beurteilung der lebenden Mäuse mittels transthorakaler Echokardiographie (in dieser Arbeit jedoch kein Untersuchungsgegenstand). Die Messungen der linksventrikulären Vorderwand zeigten bei einem vergleichbaren Studiendesign signifikant höhere Werte in der Trainingsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Schlagvolumen, die linksventrikuläre Ejektionsfraktion und die linksventrikuläre Verkürzungsfraktion waren ebenfalls erhöht bei trainierten Mäusen, dies war jedoch nicht signifikant (Sossdorf et al. 2013). Daten aus der Literatur lassen jedoch vermuten, dass die nicht-invasive Echokardiographie methodisch bedingt bei Mäusen weniger sensitiv in der Detektion einer myokardialen Hypertrophie als die Bestimmung des Herzgewichts post mortem ist (Kemi et al. 2002).

Eine niedrige physische Aktivität ist mit einer erhöhten Inzidenz und erhöhten Mortalität von kardiovaskulären Erkrankung assoziiert (Blair et al. 1996, Myers 2003).

Kardiovaskuläre Erkrankungen wiederum, insbesondere ein durchlebter Herzinfarkt, steigern sowohl das Risiko an einer Sepsis zu erkranken (Wang et al. 2012a), als auch das Risiko, daran zu versterben (Williams 2013). Mehrmals konnte in der Literatur bereits ein positiver Trainingseffekt auf einen Myokardinfarkt im Sinne eines kleineren Infarktareals und besseren funktionellen kardialen Parametern aufgrund multipler präkonditionierenden Anpassungsreaktionen durch physische Aktivität beschrieben werden (Zhang et al. 2007, Frasier et al. 2011). Eine schwerwiegende Komplikation der Sepsis ist die septische Kardiomyopathie. Zwar ist die Ischämie bei der septischen Kardiomyopathie globaler im Vergleich zum Myokardinfarkt, viele pathophysiologischen Vorgänge, z. B. in Bezug auf oxidativen Stress, ähneln sich jedoch (Frasier et al. 2011, Martin et al. 2017). Somit könnte physisches Training einen protektiven Effekt auf kardiale Adaptationsmechanismen haben und darüber den myokardialen Schaden während einer Sepsis reduzieren. Diesbezüglich wären jedoch weitere Untersuchungen der septischen Kardiomyopathie notwendig (Chung et al. 2017).

#### **5.4 Regelmäßiges physisches Training reduziert Mortalität und Krankheitsschwere der Sepsis**

Der aktuelle Nachweis einer erniedrigten Mortalität der trainierten Tiere während einer polymikrobiellen Sepsis reiht sich in die Daten der Literatur ein, wobei bisher jedoch sehr wenige Studien vorliegen und aufgrund von unterschiedlichen Tieren (z. B. Ratten), verschiedenen Trainingsmethoden und variierenden Modellen zur Sepsisinduktion Vergleiche nur schwerlich gezogen werden können. Zusätzlich werden oft nur systemische Effekte, aber keine Mortalitätsunterschiede untersucht (Chen et al. 2007, de Araujo et al. 2012, Kim und Kang 2019). Unsere Arbeitsgruppe zeigt somit erstmals, dass regelmäßiges progressives Laufbandtraining bei Mäusen die Mortalität einer polymikrobiellen Sepsis reduziert. Für den Zusammenhang des Trainingsstatus und der Sepsismortalität bei Menschen liegen kaum Daten vor. Es ist jedoch eine Steigerung der Mortalität einer Sepsis durch eine zu geringe physische Aktivität beschrieben (Williams 2013). Neueste Daten zeigen bei Mäusen sogar eine Reduktion der Mortalität durch leichtes Laufbandtraining, auch wenn das Training erst nach Induktion der Sepsis begonnen wird (Irahara et al. 2016). Insgesamt ist die Mortalität in der aktuellen Arbeit in beiden Gruppen entsprechend der Intention der

Induktion eines schweren Verlaufs hoch. Dies ist eventuell durch eine fehlende supportive Therapie wie Flüssigkeits-/Antibiotikagabe oder Vasopressoreinsatz zu erklären. Zusätzlich muss die hohe Dosierung der Stuhlprobe erwähnt werden, welche zur Induktion des erwünschten schweren Sepsisverlaufs verwendet wurde. In der Literatur liegt die Mortalität bei Ratten mit einer Sepsis, induziert mittels PCI-Methode, trotz Flüssigkeitssubstitution bei 100 %, die Sterblichkeit kann jedoch durch zusätzliche antibiotische Therapie auf 50 % gesenkt werden (Gonnert et al. 2011). Die antibiotische Intervention gleicht das Modell der klinischen Situation zwar näher an, doch wurde in der vorliegenden Arbeit einem eher letalen Modell der Vorzug eingeräumt. Diese Vorgehensweise entspricht einer schon älteren Beobachtung, dass die Effektgröße einer zu überprüfenden antiinflammatorischen Intervention unmittelbar mit der Krankheitsschwere und dem Mortalitätsrisiko der zu Grunde liegenden polymikrobiellen Infektion (sei es Mensch oder Maus) korreliert (Eichacker et al. 2002). Da es sich beim vorliegenden Studiendesign um die erste, rein explorative Studie zur Untersuchung des Trainingsstatus auf das Sterberisiko im Verlauf einer polymikrobiellen Sepsis handelte, wurde ausdrücklich zur Vermeidung des Übersehens einer möglicherweise nur moderat ausgeprägten Wirkstärke des Trainings auf ein Modell mit hoher Krankheitslast und hoher Mortalitätsrate zurückgegriffen. In nachfolgenden Studien müsste nun die Fragestellung aufgegriffen werden, ob sich der beobachtete positive Trainingseffekt auch bei weniger stark ausgeprägten Verläufen – auch mit supportiver und antibiotischer Therapie – reproduzieren lässt. Dazu sind aller Voraussicht nach höhere Tierzahlen erforderlich, die zum Zwecke der hier durchgeführten Untersuchungen nicht zur Verfügung standen.

Zur Beurteilung körperlicher Einschränkungen während des Verlaufs der Sepsis ist die Erhebung des Clinical Severity Scores ein etabliertes Verfahren (Gonnert et al. 2011). In dieser Arbeit war im Verlauf der Sepsis ein Anstieg der Krankheitsschwere nachweisbar, dies stimmt mit den Daten verschiedener Studien überein (Gonnert et al. 2011, Recknagel et al. 2013, Seemann et al. 2017). Erstmals konnte jedoch eine Abschwächung des Anstiegs durch physisches Training dargestellt werden. Der Tod geht mit 5 Punkten in die Score-Erhebung ein. Somit könnte ein Einfluss der Mortalitätsrate auf den Clinical Severity Score diskutiert werden. Jedoch war die Differenz zwischen Trainings- und Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 14 Stunden und 22 Stunden nach Sepsisinduktion signifikant und zu diesen Zeitpunkten war kein

Mortalitätsunterschied nachweisbar. Generell waren zu beiden Zeitpunkten keine verstorbenen Tiere zu verzeichnen. Um den Einfluss der Mortalitätsrate auf den Clinical Severity Score zu reduzieren, war ursprünglich geplant, verstorbene Tiere im weiteren Verlauf zu zensieren. Dies war jedoch nicht notwendig, da erstmals zur letzten Erhebung der Krankheitsschwere 38 Stunden nach Sepsisinduktion verstorbene Tiere registriert worden.

## **5.5 Regelmäßiges physisches Training moduliert Leukozyten- und Thrombozytenanzahl**

Änderungen der Leukozyten und ihrer Subpopulationen nach einer akuten Trainingseinheit sind gut charakterisiert. So steigen die Neutrophilen biphasisch während und erneut nach dem Training an, wohingegen die Lymphozyten während der physischen Aktivität ansteigen und danach auf ein Niveau unterhalb des Ausgangswerts abfallen. Einige Stunden nach der akuten Trainingseinheit erreichen die Leukozytensubpopulationen schließlich wieder ihr Ausgangsniveau (Hansen et al. 1991, Fehrenbach und Schneider 2006). Deutlich weniger untersucht sind bisher die längerfristigen Effekte des physischen Trainings auf die Leukozytenanzahl. Der Nachweis niedrigerer Leukozytenwerte im Blut trainierter Mäuse in der aktuellen Arbeit bestätigt jedoch Daten aus der Literatur bei Menschen, wo nach wiederholtem körperlichen Training ein Abfall der Leukozyten nachgewiesen werden konnte (Malm et al. 2004, Hamedinia et al. 2009). Ungeklärt bleiben die Ursache und die Folgen dieser transienten Leukopenie. Moduliert wird die Leukozytenanzahl im Blut von multiplen Parametern, wie z. B. der Produktion, der Emigration aus dem Knochenmark, dem Anheften an der Gefäßwand, der Auswanderung ins Gewebe, der Speicherung in der Milz und dem Lymphsystem sowie dem Abbau der Leukozyten. Beeinflusst werden die einzelnen pathophysiologischen Vorgänge unter anderem über Katecholamine, Wachstumsfaktoren und Cortisol (Opdenakker et al. 1998, Pedersen und Steensberg 2002). Als mögliche Ursachen der trainingsassoziierten Leukopenie werden u. a. ein Anstieg von Adhäsionsmolekülen mit konsekutiver Anheftung der Leukozyten an der Endothelwand, eine Migration der Leukozyten ins Gewebe und eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine diskutiert (Malm et al. 2004, Hamedinia et al. 2009). Auch die Effekte der Leukopenie sind unklar. Einerseits konnte eine Assoziation zwischen der reduzierten Leukozyten-

anzahl nach Training und eine Steigerung respiratorischer Infekte der oberen Atemwege nachgewiesen werden (Malm et al. 2004). Interessanterweise ist dagegen die Leukozytenanzahl mit der Gesamtsterblichkeit assoziiert. Bei nur gering erhöhten Leukozyten ist schon ein deutlicher Anstieg der Mortalität bei Menschen zu verzeichnen (Weijenberg et al. 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Gruppenunterschied der Leukozyten auch im Verlauf der Sepsis untersucht. Dabei ist ein Abfall der Leukozyten in beiden Gruppen ohne gruppenspezifischen Unterschied nachzuweisen, somit war jedoch formal der Leukozytenrückgang in der Trainingsgruppe bei niedrigerem Ausgangsleukozytenwert etwas geringer. Die Abnahme der Leukozytenanzahl im Verlauf der Sepsis reiht sich in die Daten anderer tierexperimenteller Studien mit unterschiedlichen Methoden der Sepsis- bzw. Inflammationsinduktion ein (Remick et al. 2000, Gonnert et al. 2011). Die Arbeitsgruppe von Chen et al. konnte außerdem ein geringeres Ausmaß der Leukopenie bei einer nicht-tödlichen LPS-Infusion bei Ratten durch regelmäßiges körperliches Training nachweisen (Chen et al. 2007). Im Vergleich zu Mäusen und Ratten ist die Leukopenie in der menschlichen Sepsis jedoch eher selten und mit einer höheren Mortalität assoziiert als die Leukozytose (Bosch und Walkey 2019). Limitierend muss außerdem erwähnt werden, dass in dieser Arbeit keine Leukozytensubpopulationen und nicht die Aktivität der verschiedenen Leukozyten untersucht wurden.

Daten zum Einfluss von physischem Training auf die basale Thrombozytenanzahl und -funktion liegen bisher nur unvollständig vor und können in die bekannten pathophysiologischen Adaptationsprozesse durch Training bislang begrenzt eingeordnet werden (El-Sayed et al. 2005, Heber und Volf 2015). Der Effekt einer akuten Trainingseinheit ist entscheidend von der Trainingsart und -intensität sowie dem Trainings- und Gesundheitszustand abhängig (El-Sayed et al. 2005) Insgesamt scheint eine akute intensive Trainingseinheit jedoch am ehesten zu einem Anstieg der Thrombozytenanzahl, -aktivität und -aggregation zu führen. Relevant könnten in diesem Zusammenhang eine Erhöhung des Von-Willebrand-Faktors sowie ein Abfall der ADAMTS-13-Aktivität sein (El-Sayed et al. 2005, Claus et al. 2006, Heber und Volf 2015). Diese Veränderungen auf die Hämostase nach einer Trainingseinheit ähneln denen im Rahmen einer systemischen Entzündungsreaktion (Claus et al. 2006, Chen und Chung 2018). Regelmäßige physische Aktivität dagegen kann diese akuten Trainingseffekte reduzieren, zum Teil verhindern oder sogar umkehren. Auch



in Ruhe ist nach regelmäßigem Training eine Reduktion der Plättchenadhäsion und -aggregation sowie teilweise eine leichte Erniedrigung der Thrombozytenanzahl nachweisbar. Insgesamt ist der langfristige Effekt damit am ehesten antithrombotisch (El-Sayed et al. 2005, Heber und Volf 2015). In dieser Arbeit konnte in Hinblick auf die Thrombozytenanzahl der gesunden Tiere kein Gruppenunterschied zwischen trainierten und untrainierten Mäusen nachgewiesen werden. In den letzten Jahrzehnten ist der Zusammenhang zwischen Inflammation und Gerinnungssystem insbesondere im Verlauf einer Sepsis immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Die Thrombozytopenie ist generell mit einer erhöhten Mortalität der Sepsis assoziiert (de Stoppelaar et al. 2014). Zusätzlich ist die Mortalität mit der absoluten Anzahl der Thrombozyten assoziiert, im Sinne von weiter steigender Mortalitätsrate bei niedrigeren Thrombozytenzahlen (Venkata et al. 2013, de Stoppelaar et al. 2014). In dieser Arbeit ist trotz der beschriebenen geringeren Mortalität in der Trainingsgruppe kein Unterschied in der Thrombozytenanzahl zwischen den Gruppen nachweisbar. Insgesamt spiegelt die progrediente Thrombopenie im Verlauf der Sepsis in beiden Gruppen die Ergebnisse tierexperimenteller und humaner Studien wider. Die zugrunde liegende Ursache ist multifaktoriell, u. a. spielen Plättchenaktivierung, -verbrauch und -destruktion eine Rolle (Recknagel et al. 2013, Venkata et al. 2013). Aktuelle Daten der Literatur zeigen bei gesunden Mäusen nach freiwilligem Laufbandtraining ebenfalls keine Gruppenunterschiede in Hinblick auf die Anzahl der Thrombozyten zwischen trainierten und untrainierten Tieren. Im Verlauf der Sepsis waren jedoch signifikant niedrigere Thrombozyten in der untrainierten Gruppe nachweisbar. Die Untersuchungen erfolgten jedoch gezielt an älteren Mäusen, somit könnte eine Assoziation des Trainingseffekts mit dem Alter bestehen (Tymel et al. 2017). In der Literatur konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die Effekte von physischem Training auf die Hämostase zwischen gesunden und erkrankten Individuen unterscheiden. Es wäre daher möglich, dass in der aktuellen Arbeit keine Gruppenunterschiede aufgezeigt werden konnten, da die Untersuchung an gesunden und jungen Mäusen erfolgte. Zusätzlich könnten laut Literatur die prozentuale Abnahme der Thrombozyten oder ein fehlender Wiederanstieg der Plättchen im späteren Verlauf der Sepsis bessere Prädiktoren für die Mortalität darstellen als die absolute Thrombozytenanzahl (Venkata et al. 2013). Zu detaillierteren Beurteilung des Trainingseffektes wäre zusätzlich die Untersuchung

der Thrombozytenadhäsion und -aggregation sowie weitere Parameter der Hämostase relevant (Claus et al. 2006, Heber und Volf 2015).

## **5.6 Der Anstieg von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im Verlauf der Sepsis wird durch regelmäßiges physisches Training reduziert**

Die Ausschüttung verschiedener Zytokine soll möglicherweise über eine Modulation des chronischen Entzündungszustands im Organismus an den positiven Effekten durch regelmäßiges physisches Training involviert sein (Warnberg et al. 2010). Ob auch ein potentieller Einfluss auf den Verlauf und die Mortalität einer Sepsis durch einen veränderten Zytokinstatus aufzuzeigen ist, war unter anderem Gegenstand dieser Arbeit.

Der akute Effekt von Training auf den IL-6-Spiegel im Blut ist bekannt. So kommt es während bzw. kurz nach einer Trainingseinheit zu einem Anstieg des Serum-IL-6-Spiegels. Dieser normalisiert sich meist jedoch nach wenigen Stunden wieder (Warnberg et al. 2010). Es wird vermutet, dass dieser durch jede Trainingseinheit wiederholte transiente Anstieg von IL-6 zur Generierung eines antiinflammatorischen Zustandes beiträgt (Gleeson et al. 2011). Bezüglich des Effekts auf den basalen IL-6-Spiegel im Blut durch physisches Training liegen jedoch kontroverse Daten vor. In dieser Arbeit konnten keine gruppenspezifischen Unterschiede zwischen trainierten und untrainierten Mäusen in Hinblick auf den basalen IL-6-Spiegel nachgewiesen werden. Dies spiegelt die Ergebnisse einer Vielzahl von Studien wider (Adamopoulos et al. 2002, You et al. 2013, Libardi et al. 2012). Eine Reduktion des IL-6-Spiegels im Blut durch regelmäßiges Training konnte in verschiedenen Arbeiten zum Teil für ältere, adipöse oder vorerkrankte (z. B. Herzinsuffizienz) Individuen nachgewiesen werden und damit für Situationen, in denen ein erhöhter chronischer Entzündungsstatus im Körper vorliegt (Adamopoulos et al. 2002, Ben Ounis et al. 2009, Warnberg et al. 2010, Bruun et al. 2006).

Im Verlauf der Sepsis konnten wir einen deutlichen Anstieg von IL-6 im Blut der Mäuse nachweisen. Dieser Anstieg war in der Trainingsgruppe jedoch geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe (zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsisinduktion signifikant geringer). Der generelle Anstieg von IL-6 im Verlauf einer Sepsis ist

sowohl bei Menschen also auch im Tiermodell bekannt (Gonnert et al. 2011, Seemann et al. 2017, Oberholzer et al. 2005). Unserem Erkenntnisstand nach konnten wir jedoch erstmals einen Einfluss von physischem Training auf den IL-6-Spiegel im Blut im Verlauf einer Sepsis darstellen. Dies ist von besonderer Relevanz, da die Höhe des IL-6-Spiegels im Blut von Sepsispatienten mit dem Risiko eines Organversagens und einer schlechten Prognose assoziiert ist (Damas et al. 1992, Oberholzer et al. 2005, Chawla et al. 2007). Ähnliche tierexperimentelle Untersuchungen mit alternativen Sepsismodellen konnten keinen Gruppenunterschied durch körperliches Training auf den IL-6-Spiegel im Blut aufzeigen. Durch verschiedene Arbeiten wurden bisher lediglich niedrigere IL-6-Werte bei trainierten Tieren während eine Sepsis in der bronchoalveolären Lavage oder der Peritonealflüssigkeit nachgewiesen (de Araujo et al. 2012, Tymi et al. 2017, Kim und Kang 2019).

Auch IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin soll entscheidend an der trainingsinduzierten Reduktion des Inflammationszustandes des Körpers beteiligt sein (Gleeson et al. 2011). In der aktuellen Arbeit konnte kein Unterschied des basalen Serum-IL-10-Spiegels zwischen gesunden trainierten und untrainierten Mäusen nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich zu diesem Thema insbesondere bei gesunden Individuen wenige und zum Teil inkongruente Daten. So konnte oftmals bei gesunden Mäusen oder Ratten ebenfalls keine Veränderung des Serum-IL-10-Spiegels durch physische Aktivität nachgewiesen werden (Gomez-Merino et al. 2007, Nunes et al. 2008). Zum Teil waren sogar erniedrigte IL-10-Spiegel nach Ausdauertraining im Blut nachweisbar (Rowsey et al. 2009). Außerdem seien erhöhte IL-10-Spiegel im Blut von Menschen mit einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert (Baune et al. 2011). Dies erscheint überraschend, da bei verschiedenen Erkrankungen, wie z. B. Adipositas, Diabetes mellitus Typ II, dem metabolischen Syndrom und Herzinsuffizienz sowie im Alter erniedrigte IL-10-Spiegel nachgewiesen werden können. Gerade für diese Erkrankungen und für ältere Individuen konnte mehrmals gezeigt werden, dass durch regelmäßiges Ausdauertraining ein Anstieg des Serum-IL-10 erreicht werden kann (Jankord und Jemiolo 2004, Nunes et al. 2008, Farinha et al. 2015, Dorneles et al. 2016, Kadoglou et al. 2007).

Im Verlauf der Sepsis konnten wir in beiden Gruppen einen Anstieg des IL-10-Spiegels nachweisen, in der Gruppe der trainierten Mäuse fiel der Anstieg jedoch geringer aus (zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsisinduktion signifikant). Dieser IL-10-Anstieg im Verlauf einer Sepsis reflektiert die Daten der Literatur (Gonnert et al. 2011, Seemann et al. 2017) und wird u. a. durch die IL-6-Ausschüttung gefördert (Schulte et al. 2013). Wenige und insbesondere kontroverse Daten liegen jedoch zum Trainingseffekt auf den IL-10-Verlauf im Rahmen der Sepsis vor. Kim et al. konnten keinen gruppenspezifischen Effekt durch Training auf den IL-10-Spiegel im Blut während einer Sepsis nachweisen, auffällig waren jedoch erhöhte IL-10-Werte in der Peritonealflüssigkeit trainierter Mäuse (Kim und Kang 2019). Die Arbeitsgruppe von De Araujo et al. zeigte dagegen erhöhte IL-10-Spiegel sowohl im Blut als auch in der peritonealen und bronchialen Lavageflüssigkeit der trainierten Tiere. Dies war assoziiert mit einer Reduktion der Apoptose in verschiedenen Organen. Die Kollegen diskutieren daher einen potentiell protektiven Effekt der modulierten Entzündungsreaktion (de Araujo et al. 2012). In unserer Arbeit waren jedoch erniedrigte IL-10-Spiegel im Blut zusammen mit einem geringerem Organschaden und reduzierter Mortalität bei trainierten Tieren nachweisbar. Insgesamt liegen mit lediglich 3 Arbeiten, die uns bekannt sind, zu wenige Daten vor um weitere Rückschlüsse ziehen zu können. Zu betonen ist jedoch, dass die Versuche der Kollegen auf der Sepsisinduktion mittels CLP-Methode beruhen und die Zytokinfreisetzung der verschiedenen Sepsismodelle im zeitlichen Verlauf stark variiert (Seemann et al. 2017). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Höhe des IL-10-Spiegels im Blut bei der CLP-Methode abhängig von der Größe der verwendeten Punktionsnadel ist (Walley et al. 1996). Somit liegen multiple Faktoren vor, die eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Arbeiten deutlich reduzieren. Für die Mortalität der Gesamtheit der Sepsispatienten besteht beim Menschen am ehesten keine sichere Assoziation mit der Höhe des IL-10-Spiegels im Blut (Oberholzer et al. 2005). Für einige Subgruppen, wie z. B. adipöse Mäuse oder Patienten mit einer stressbedingten Hyperglykämie, war jedoch ein erhöhter IL-10-Spiegel mit einer gesteigerten Mortalität im Verlauf der Sepsis assoziiert (Strandberg et al. 2009, Leonidou et al. 2007). Im Gegenteil dazu führt auch das komplette Fehlen von IL-10 bei IL-10-knockout Mäusen zu einer Übersterblichkeit im Rahmen einer Sepsis (Latifi et al. 2002).

TNF- $\alpha$  spielt in der Pathophysiologie der trainingsassoziierten Inflammationsreaktion eine deutlich untergeordnete Rolle (Walsh et al. 2011). Wenig überraschend erscheint daher, dass wir in der gesunden Mäusepopulation zwar TNF- $\alpha$  nachweisen konnten, es gelang jedoch nicht, einen Gruppenunterschied zwischen trainierten und untrainierten Tieren aufzuzeigen. Dies spiegelt die Daten der Literatur für TNF- $\alpha$  bei gesunden Menschen und Tieren im Blut wider (Adamopoulos et al. 2002, Gollisch et al. 2009, Rowsey et al. 2009, Libardi et al. 2012). Selbst für die Untersuchungen bei älteren oder vorerkrankten Individuen, bei denen erhöhte basale TNF- $\alpha$ -Werte nachweisbar sind, liegen eher kontroverse Daten zu Trainingseffekten vor. So konnten verschiedene Studien für Menschen oder Tiere mit Vorerkrankungen, wie z. B. Übergewicht, Herzinsuffizienz oder Diabetes mellitus Typ II, sowohl unveränderte (Gielen et al. 2003, Bruun et al. 2006, Kadoglou et al. 2007, Hedayati et al. 2012, Leggate et al. 2012, de Gonzalo-Calvo et al. 2012) als auch reduzierte TNF- $\alpha$ -Spiegel im Blut trainierter Individuen im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachweisen (Ben Ounis et al. 2009, Adamopoulos et al. 2002, Santos et al. 2012, Farinha et al. 2015).

Als proinflammatorisches Zytokin ist TNF- $\alpha$  bekanntermaßen entscheidend an der Initiierung der systemischen Entzündungsreaktion sowie der Entstehung von Schockzuständen im Verlauf einer Sepsis beteiligt (Jean-Baptiste 2007, Schulte et al. 2013). Auch in dieser aktuellen Arbeit konnte ein Anstieg des TNF- $\alpha$ -Spiegels im Blut im Verlauf der Sepsis nachgewiesen werden. Dieser fiel in der Trainingsgruppe leicht geringer aus als in der Kontrollgruppe, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Zur Untersuchung eines möglichen Trainingseffektes auf den Verlauf des TNF- $\alpha$ -Spiegels im Rahmen einer Sepsis liegen bisher kaum Daten vor. Insbesondere ist dies nach unseren Erkenntnissen die erste Arbeit, die den Aspekt im Rahmen eines PCI-Sepsismodells untersuchte. Die Kollegen um Chen et al. konnten jedoch zeigen, dass trainierte Tiere einen signifikant geringeren TNF- $\alpha$ -Spiegel nach LPS-Infusion aufzeigten als untrainierte Ratten (Chen et al. 2007). In einer weiteren Untersuchung waren bei trainierten Mäusen 6 Stunden nach Sepsisinduktion mittels CLP-Methode ebenfalls niedrigere TNF- $\alpha$ -Werte nachweisbar, nach 20 Stunden konnte jedoch kein Unterschied mehr zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Kim und Kang 2019). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass im Blut trainierter Menschen nach Stimulation mit LPS eine geringere TNF- $\alpha$ -Ausschüttung nachzuweisen ist als bei untrainierten

Individuen (Sloan et al. 2007). In Zusammenschau der wenigen Untersuchungen in der Literatur und der Ergebnisse der aktuellen Arbeit ist somit eine trainingsassoziierte Reduktion des TNF- $\alpha$ -Anstiegs im Verlauf einer Sepsis zu vermuten.

MCP-1 ist als chemotaktisches Zytokin entscheidend an der Aktivierung von Monozyten bzw. Makrophagen und deren Infiltration in verschiedene Gewebe beteiligt. Außerdem induziert es wiederum die IL-1- und IL-6-Produktion (Suzuki et al. 2002). Erhöhte MCP-1-Werte sind bei verschiedenen Erkrankungen, wie z. B. Adipositas, Herzinsuffizienz sowie der koronaren Herzerkrankung und dem metabolischem Syndrom nachweisbar (Adamopoulos et al. 2001, Troseid et al. 2004, Bruun et al. 2006, Niessner et al. 2006). Physisches Training induziert über einen kurzen Zeitraum ebenfalls einen Anstieg des MCP-1-Spiegels (Suzuki et al. 2002). Wenig ist jedoch über den längerfristigen Effekt physischer Aktivität auf den Serum-MCP-1-Spiegel bekannt. Wir konnten in dieser Arbeit keinen Unterschied zwischen trainierten und untrainierten Mäusen in Bezug auf die basalen MCP-1-Werte im Blut der Tiere nachweisen. Verschiedene Arbeiten aus der Literatur konnten für gesunde Individuen und auch für Menschen oder Tiere mit Erkrankungen, bei denen erhöhte MCP-1-Werte bekannt sind, zum Teil ebenfalls keinen Trainingseffekt zeigen (Troseid et al. 2004, Lira et al. 2010, Ogawa et al. 2010). Oft gelang jedoch auch der Nachweis reduzierter MCP-1-Werte nach regelmäßiger körperlicher Aktivität (Adamopoulos et al. 2001, Niessner et al. 2006, Sakurai et al. 2009, Leggate et al. 2012, Ihalainen et al. 2018). Aufgrund der chemotaktischen Wirkung auf Makrophagen erfolgten in der Vergangenheit vor allem viele Untersuchungen, die MCP-1 im Fettgewebe und nicht im peripheren Blut untersuchten. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass physische Aktivität MCP-1 und zum Teil auch den oxidativen Stress im viszeralen Fettgewebe reduzieren kann (Sakurai et al. 2009, Vieira et al. 2009, Ahn und Kim 2014). Insgesamt wird ein protektiver Effekt durch die Reduktion von MCP-1 unter anderem über eine verminderte Invasion von Makrophagen ins Fettgewebe und in arteriosklerotische Plaques vermutet (Lumeng et al. 2007, Niessner et al. 2006). Hohe MCP-1-Werte sind dagegen mit einer deutlich gesteigerten kardiovaskulären Mortalität assoziiert (de Lemos et al. 2003). Interessanterweise ist MCP-1 außerdem einer der besten Prädiktoren von Organversagen und Mortalität im Rahmen einer Sepsis. Patienten, die eine Sepsis nicht überleben, weisen deutlich höhere MCP-1 Werte auf (Bozza et al. 2007, Zhu et

al. 2017). In dieser Arbeit konnte ein Anstieg der MCP-1-Werte im Verlauf der Sepsis bestätigt werden. Dieser war in der Trainingsgruppe deutlich geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe, das Signifikanzniveau wurde jedoch verfehlt. Generell ist der Anstieg von MCP-1 als Teil der Inflammationsreaktion im Verlauf einer Sepsis bekannt (Hillenbrand et al. 2010). Zur Untersuchung eines Trainingseffekts auf den MCP-1-Spiegel im Blut während einer Sepsis liegt unseres Wissens jedoch nur eine weitere Arbeit vor. Die Kollegen von Kim et al. konnten 8 Stunden nach Sepsisinduktion mittels CLP-Methode niedrigere MCP-1-Spiegel im Blut trainierter Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. 20 Stunden nach Sepsisinduktion konnte kein Unterschied mehr aufgezeigt werden (Kim und Kang 2019). Eine weitere Arbeit untersuchte lediglich die MCP-1-Expression im Fettgewebe nach LPS-Injektion. Die Kollegen konnten einen geringeren Anstieg der MCP-1-Expression im inguinalen Fettgewebe in der Trainingsgruppe nachweisen (Peppler et al. 2017).

In Zusammenschau der aktuellen Ergebnisse war im Verlauf der Sepsis ein Anstieg aller untersuchten Zytokine nachweisbar. Dieser fiel jedoch in der trainierten Mäusepopulation sowohl für die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und MCP-1 als auch für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 und das dual wirkende IL-6 geringer aus. Es deutet sich daher an, dass die Entzündungsreaktion im Verlauf einer Sepsis durch regelmäßiges physisches Training abgeschwächt wird und gemäßiger bzw. balancierter abläuft. Sowohl eine überschießende als auch eine zu geringe Immunantwort können den Verlauf einer Sepsis negativ beeinflussen (Hotchkiss et al. 2013). Der aktuelle Nachweis einer geringeren Ausschüttung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zusammen mit einer reduzierten Organschädigung und Mortalität in der Trainingsgruppe deutet auf einen protektiven Effekt von physischem Training im Sinne einer Regulierung der Inflammationsreaktion hin. Da eine medikamentöse Hemmung oder komplette Ausschaltung einzelner Zytokine bisher in der Sepsistherapie keine eindeutigen positiven Ergebnisse lieferten (Schulte et al. 2013, Gotts und Matthay 2016), scheint eine zu starke und nur punktuelle Hemmung der Entzündungsreaktion sich nicht positiv auf den Verlauf einer Sepsis auszuwirken. Der protektive Effekt durch Trainings lässt sich somit nach aktuellem Stand der Wissenschaft nicht medikamentös nachahmen.

Die Ursache für einen fehlenden Nachweis signifikanter Gruppenunterschiede für einige Zytokine und Zeitpunkte ist am ehesten multifaktoriell. Zu betonen ist, dass die Serumzytokinkonzentration nur einen Teil des Inflammationsstatus des Körpers widerspiegelt. So konnten unter anderem Trainingseffekte in verschiedenen Arbeiten nur bei der Untersuchung der Zytokinkonzentration oder -expression in den Organen (z. B. Fettgewebe, Muskel) nicht aber im Serum nachgewiesen werden (Gomez-Merino et al. 2007, Gollisch et al. 2009, Leggate et al. 2012). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nach physischem Training trotz konstanter oder nur gering veränderter Serumzytokinkonzentration deutlich erhöhte Zytokinwerte im Urin nachweisbar waren (Suzuki et al. 2002). Somit sollten die Umverteilung, Ausscheidung und der Abbau der Zytokine bei der Beurteilung der Konzentration im Blut als modulierende Variablen beachtet werden. Neueste Untersuchungen zeigen außerdem, dass die Funktion bzw. Wirkung von Zytokinen durch Training moduliert wird ohne nachweisbare Änderung der Zytokinkonzentration im Serum. Ein Effekt des physischen Trainings auf intrazelluläre Signalwege wird diskutiert (Barry et al. 2018). Als letzter Aspekt soll noch erwähnt werden, dass in der aktuellen Arbeit junge und gesunde Tiere untersucht wurden. Es ist zu vermuten, dass ein protektiver Trainingseffekt bei älteren oder vorerkrankten Individuen mit chronisch erhöhtem Inflammationsstatus eventuell stärker ausfällt und sich deutlicher in der Zytokinkonzentration widerspiegelt.

## **5.7 Regelmäßiges physisches Training moduliert die bakterielle Keimlast im Verlauf der Sepsis**

Im Gegensatz zu der Vermutung, dass die geringere Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen eventuell zu einer reduzierten Abwehr bzw. Bekämpfung von Bakterien führen könnte, zeigten sich 24 Stunden nach Sepsisinduktion sowohl im Blut als auch in den Organen (Leber, Niere und Lunge) trainierter Mäuse eine geringere Anzahl an Bakterien. Bei der Untersuchung des Lungengewebes und des Blutes war der Unterschied signifikant. Allgemein ist eine höhere bakterielle Keimlast im Verlauf einer Sepsis mit einer aggravierten Schädigung von Organen und einer gesteigerten Mortalität assoziiert (Yagupsky und Nolte 1990, Ashare et al. 2006). Die niedrigere Anzahl an Bakterien im Organismus trainierter Tiere und die damit vermutlich gesteigerte Fähigkeit Bakterien zu



eliminieren, könnte somit entscheidend an der verbesserten Überlebensrate der Trainingsgruppe und geringeren Freisetzung von Zytokinen beteiligt sein.

Interessanterweise zeigte sich jedoch zu einem früheren Zeitpunkt im Verlauf der Sepsis (6 Stunden nach Sepsisinduktion) in der Leber der trainierten Mäuse eine höhere bakterielle Keimlast als in der Kontrollgruppe. Im Blut, der Niere und der Lunge waren keine Unterschiede aufzuzeigen. Diese erhöhte Anzahl von Bakterien in der Leber könnte den protektiven Effekt von physischem Training sogar noch unterstreichen. Die Leber spielt in der Bekämpfung von pathogenen Erregern und deren Bestandteile während einer Sepsis eine entscheidende Rolle. Innerhalb kürzester Zeit kann die intakte Leber einen Großteil der über die Blutbahn transportierten Bakterien herausfiltern und binden. An diesem Abwehrmechanismus sind neben Hepatozyten, Kupffer-Zellen und Endothelzellen der Lebersinusoide unter anderem auch Thrombozyten beteiligt. Zusätzlich migrieren neutrophile Granulozyten in die Lebersinusoide und tragen zum Teil über die Bildung von neutrophilen extrazellulären Fallen (Neutrophil Extracellular Traps, abgekürzt NETs) entscheidend zur Bindung und auch zur Eliminierung von Bakterien bei. Über diese Mechanismen kann die systemische Ausbreitung von Erregern verhindert oder zumindest reduziert werden (Yan et al. 2014, Strnad et al. 2017). In der Literatur finden sich wiederholt Nachweise, dass eine reduzierte Kapazität der Leber Bakterien abzufangen oder zu bekämpfen, zu einem Anstieg der Bakteriämie, der Gewebeschäden in anderen Organen und der Mortalität im Verlauf der Sepsis führt (Ashare et al. 2006, Scharrig et al. 2015). Der aktuelle Nachweis einer erhöhten bakteriellen Keimlast der Leber bei trainierten Tieren im frühen Verlauf der Sepsis könnte daher für eine erhöhte Bindungs- und Eradikationskapazität der Leber für Bakterien sprechen, über die schlussendlich aufgrund einer geringeren Dissemination der Erreger niedrigere Bakteriennachweise im Blut und den zusätzlich untersuchten Organen im Verlauf der Sepsis erklärt werden könnten. Vergleichbare Untersuchungen sind in der Literatur unseres Wissens nicht zu finden. Daten liegen nur zur Untersuchung des Trainingseffekts auf die Anzahl von Bakterienkolonien in der Peritonealflüssigkeit nach Sepsisinduktion vor. Dabei zeigte sich in einer Arbeit kein Unterschied zwischen trainierten und untrainierten Tieren (Tymal et al. 2017). In einer weiteren Untersuchung konnte 20 Stunden nach Sepsisinduktion eine geringere bakterielle Keimlast in der Peritonealflüssigkeit bei trainierten Mäusen nachgewiesen werden (Kim und Kang 2019). Für den Nachweis möglicher pathophysiologischer

Mechanismen, die den Zusammenhang zwischen physischem Training und einer gesteigerten Eradikationskapazität für pathogene Erreger erklären, wären weitere experimentelle Untersuchungen notwendig. Aktuell können potentielle Zusammenhänge nur über Umwege vermutet werden. So erscheint die Generierung von NETs durch Neutrophile Granulozyten und der physiologische Gegenspieler, die Desoxyribonuklease (DNase), eine interessantes Erklärungsmodell. NETs bestehen aus einem dichten Netz aus nukleärer DNA sowie Histonen und Proteasen und ermöglichen so das Einfangen von Bakterien und tragen zur Bekämpfung der Erreger während einer Sepsis bei (McDonald et al. 2012, Strnad et al. 2017). Insbesondere eine frühe Hemmung der NET-Bildung im Verlauf der Sepsis ist mit einer geringeren Bindung von Bakterien, einer gesteigerten Dissemination der Erreger im Organismus, einer gesteigerten Schädigung von Organen und einer progredienten Mortalität assoziiert. Eine Hemmung der NETs im späteren Verlauf der Sepsis könnte jedoch, eventuell über die Verhinderung einer überschießenden Inflammationsreaktion, einen protektiven Effekt haben und zu einer Reduktion der Mortalität beitragen (Meng et al. 2012, Mai et al. 2015, Scharrig et al. 2015, Czaikoski et al. 2016). Insgesamt wird vermutet, dass sowohl eine zu geringe als auch eine überschießende NET-Generierung negative Folgen haben können. Physisches Training führt ebenfalls zur Ausschüttung von NETs, aber auch von deren Gegenspieler, der DNase (Beiter et al. 2015). Zu den chronischen Effekten des physischen Trainings auf die NET-Generierung und die bakterielle Keimlast liegen nahezu keine Daten vor. In einer Arbeit von Shi et al. konnte jedoch nachgewiesen werden, dass ein fünfwöchiges Ausdauertraining zu einer Reduktion der extensiven NET-Generierung in der Lunge und des akuten Lungenversagens nach intraperitonealer LPS-Injektion führte. Die Kollegen propagieren daher, dass durch regelmäßiges Training eine Balance zwischen ausreichender Kontrolle der Lungeninfektion und Verhinderung einer überschießenden Formation von NETs, welche selbst wiederum die Schädigung des Lungengewebes aggravieren könnte, generiert wird. Eine Untersuchung der bakteriellen Keimlast war aufgrund des LPS-Modells jedoch nicht möglich (Shi et al. 2020).

In der Literatur konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass durch wiederholte Gaben einer geringen nichttödlichen Menge LPS eine Präkonditionierung stattfindet, die eine Art Toleranz gegenüber inflammatorischen Reizen generiert bzw. den Organismus auf diese Stimuli vorbereitet. Nach einer Präkonditionierung mit LPS

waren bei anschließender Gabe einer höheren, potentiell tödlichen LPS-Dosis oder Induktion einer bakteriellen Sepsis die NET-Produktion gesteigert, in den produzierten NETs mehr Bakterien gebunden sowie im Blut und peritoneal weniger Bakterien und im Plasma weniger pro- und antiinflammatorische Zytokine nachweisbar als in den Kontrollgruppen. Zusätzlich konnten Organschäden und die Mortalität reduziert werden (Wheeler et al. 2008, Shi et al. 2011, Landoni et al. 2012, Lopez-Collazo und del Fresno 2013). Diese Form der Toleranz spiegelt eine Anpassung der Immunreaktion auf stärkere inflammatorische Reize wider und stellt somit einen immunmodulatorischen Prozess dar, eine Immunparalyse ist eher nicht zu erwarten (Wheeler et al. 2008, Shi et al. 2011). Ein ähnlicher präkonditionierender Effekt könnte auch für regelmäßiges physisches Training propagiert werden. Durch wiederholte Generierung eines geringen entzündlichen Status mit jeder Trainingseinheit und damit verbundener Ausschüttung von NETs und DNase kann die Inflammationsreaktion eventuell nachhaltig moduliert und eine Art Toleranz gegenüber schweren infektiösen Stimuli generiert werden (Camicia et al. 2014, Beiter et al. 2015).

Ein weiterer potentieller Zusammenhang besteht zwischen der Schwere der Thrombozytopenie und der bakteriellen Keimlast. Neben der bekannten Assoziation einer gesteigerten Mortalität in Abhängigkeit des Ausmaßes der Thrombozytopenie konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen, denen eine Thrombozytopenie medikamentös induziert wurde, eine deutlich erhöhte Anzahl von Bakterien im Blut sowie Lunge, Leber und Milz im Verlauf einer Sepsis nachweisbar waren (de Stoppelaar et al. 2014). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch eine Depletion der Thrombozyten oder Hemmung der Thrombozyten-Neutrophilen-Interaktion weniger NETs generiert und deutlich weniger Bakterien in den Lebersinusoiden gebunden werden können (McDonald et al. 2012). Zwar konnte in der aktuellen Arbeit kein protektiver Trainingseffekt im Sinne einer geringeren Thrombozytopenie in der Trainingsgruppe im Verlauf der Sepsis gezeigt werden, den Kollegen Tyml et al. gelang dies jedoch (Tyml et al. 2017). Um einen potentiellen Zusammenhang von physischem Training, Thrombozytenanzahl und bakterieller Keimlast im Kontext der Sepsis darzustellen, wären dennoch weiterführende Untersuchungen notwendig.

Limitierend muss noch erwähnt werden, dass eine antibiotische Therapie den Einfluss verschiedener Mechanismen bei der Bekämpfung pathogener Erreger

wahrscheinlich entscheidend moduliert (Czaikoski et al. 2016) und dieser Aspekt in der aktuellen und den meisten anderen Arbeiten nicht adressiert wird.

## **5.8 Laborchemische und histologische Zeichen der sepsisassoziierten Leberschädigung**

Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) werden als Marker zur Evaluierung einer Hepatozytenschädigung verwendet und eine Erhöhung ist unter anderem mit Erkrankungen, wie z. B. einer Insulinresistenz, dem metabolischen Syndrom, Adipositas und einer nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), assoziiert (Straznicky et al. 2012, Devries et al. 2008). Untersuchungen zu möglichen protektiven Effekten von physischem Training auf die Leber liegen vor allem für Menschen oder Tiere mit Zeichen einer Leberzellverfettung vor. So konnte wiederholt gezeigt werden, dass negative Veränderungen durch eine fettreiche Ernährung wie eine Erhöhung der Leberenzyme, Zeichen der hepatischen Entzündung sowie eine Fettleber durch physisches Training teilweise reduziert oder auch komplett ausgeglichen werden konnten (Kawanishi et al. 2012, Schultz et al. 2012). In der aktuellen Arbeit erfolgte die Bestimmung von ALAT und ASAT sowie die histologische Untersuchung des Lebergewebes zur Beurteilung möglicher Leberparenchymschädigungen. Beim Vergleich der Kontrollgruppe und der Trainingsgruppe jeweils ohne Sepsis zeigten sich für ASAT und bei der morphologischen Beurteilung des Leberparenchyms keine gruppenspezifischen Unterschiede. Im Blut trainierter Tiere waren jedoch überraschenderweise erhöhte ALAT-Werte nachweisbar. Im Rahmen vergleichbarer Untersuchungen an gesunden und normalgewichtigen Individuen waren ebenfalls keine histologischen Unterschiede nachweisbar. Einige Arbeiten konnten jedoch eine Abnahme der ALAT durch physisches Training nachweisen, andere wiederum zeigten keine Unterschiede für ALAT und ASAT zwischen gesunden Trainings- und Kontrollgruppen (Devries et al. 2008, Marques et al. 2010, Kawanishi et al. 2012). Die in dieser Arbeit erhöhten ALAT-Werte bei trainierten Mäusen lassen sich nicht mit bisherigen pathophysiologischen Trainingsaspekten und bekannten Daten aus der Literatur in Einklang bringen und die Ursache bleibt aktuell unklar.

Die Leber erfüllt neben Funktionen, wie z. B. der Speicherung von Nährstoffen, der Energieproduktion, der Beteiligung am Hormonhaushalt und der Regulierung der

Gerinnung, auch wichtige immunologische Aufgaben. Im Verlauf der Sepsis reguliert die Leber unter anderem über eine Eliminierung von Bakterien und Toxinen, Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen und Zytokinen sowie metabolische Adaptationen die Immunreaktion und trägt so entscheidend zur Immunabwehr, aber auch zur Inflammation, Immunosuppression und zum Multiorganversagen bei. Die Leber ist jedoch auch selbst betroffen von sepsisbedingten Schäden (Yan et al. 2014, Strnad et al. 2017). Eine typische Sepsismanifestation ist die ischämische Hepatitis, welche mit einer frühen Erhöhung der Leberenzyme einhergeht (Trauner et al. 2003).

Im Verlauf der Sepsis konnte in dieser Arbeit in beiden untersuchten Gruppen ein Anstieg der ALAT und ASAT ohne signifikante gruppenspezifische Unterschiede aufgezeigt werden. Zum Zeitpunkt 6 Stunden nach Sepsisinduktion war jedoch ein Trend für niedrigere ALAT-Werte bei trainierten Tieren nachweisbar. Der Nachweis eines generellen Anstiegs der Leberenzyme als mögliches Zeichen einer Leberparenchymschädigung im Verlauf einer Sepsis reiht sich in die Ergebnisse aus anderen Untersuchungen der Literatur ein und könnte unter anderem als Zeichen der ischämischen Hepatitis gewertet werden (Lee et al. 2002, Seemann et al. 2017).

Im Rahmen der histologischen Untersuchung des Lebergewebes war in beiden Gruppen die Entwicklung einer sepsisassoziierten Steatosis vordergründig. Zur Beurteilung der morphologischen Manifestation der Sepsis im Leberparenchym liegen wenige histologische Untersuchungen vor. Post mortem Leberbiopsien von Menschen, die an einer Sepsis verstorben sind, zeigten ebenfalls eine Steatosis, aber auch Zeichen einer Inflammation sowie Apoptose und Nekrose (Koskinas et al. 2008). Bei Ratten konnten 48 Stunden nach Sepsisinduktion mittels CLP-Methode histologisch eine Steatosis, die Invasion von Entzündungszellen, Nekrosen und Ballonzellen (ballonierte Degeneration von Hepatozyten) nachgewiesen werden (Muftuoglu et al. 2006). In der aktuellen Arbeit waren Apoptose, Nekrose und die Invasion von Entzündungszellen im Leberparenchym nicht auffällig. Die Ursache dafür könnte im frühen Untersuchungszeitpunkt liegen. So erfolgte die histologische Untersuchung beim Mensch post mortem nach längerem Sepsisverlauf und vor allem die Zeichen der portalen Inflammation waren eher bei Patienten mit einem prolongierten Aufenthalt auf Intensivstation nachweisbar (Koskinas et al. 2008). Zusätzlich sind zur Entstehung von Nekrosen wahrscheinlich mindestens 24 Stunden

notwendig (Trauner et al. 2003). Das Ausmaß der Leberzellverfettung war 6 Stunden nach Sepsisinduktion bei der untrainierten Mäusepopulation geringgradig stärker ausgeprägt. Nach 24 Stunden war jedoch in der Trainingsgruppe eine ausgeprägtere Steatosis nachzuweisen. Limitierend muss jedoch die geringe Fallzahl und fehlende Quantifizierung mittels Scores oder Graduierung sowohl der Steatosis als auch weiterer histologischer Parameter erwähnt werden.

Vergleichbare Untersuchungen in Hinblick auf Trainingseffekte im Verlauf der Sepsis sowohl auf Blutparameter als auch auf histologische Veränderungen liegen kaum vor. In einer Arbeit mit einer nichttödlichen LPS-Dosis konnten die Kollegen von Chen et al. einen geringen Anstieg von ALAT und ASAT sowie eine geringere morphologische Schädigung der Leber bei trainierten Mäusen nachweisen (Chen et al. 2007). In zwei weiteren Arbeiten konnte ebenfalls eine Verringerung der histologischen Leberschädigung durch physisches Training im Verlauf der Sepsis nachgewiesen werden (de Araujo et al. 2012, Kim und Kang 2019). Limitierend muss jedoch erwähnt werden, dass in den genannten Untersuchungen ebenfalls methodische Einschränkungen vorliegen (z. B. LPS-Modell, fehlende Quantifizierung, isolierte Betrachtung einzelner histologischer Merkmale). In einem Modell der Leberischämie mit anschließender Reperfusion sowie einer Untersuchung des hämorrhagischen Schocks konnten jeweils auch protektive Trainingseffekte mit geringeren ALAT und ASAT-Werten sowie einer geringeren histologischen Leberparenchymschädigung bei trainierten Tieren nachgewiesen werden. Diese Arbeiten untersuchten zwar Erkrankungen, die wie die Sepsis mit einer systemischen Entzündungsreaktion und Ischämie oder Hypoxie der Leber einhergehen, jedoch erfolgte keine Konfrontation der Leber mit Bakterien (Lee et al. 2010, Yazdani et al. 2020). Die in unserer Arbeit etwas auffälligere histologische Leberschädigung nach 24 Stunden in der Trainingsgruppe widerspricht den bisher bekannten Untersuchungen aus der Literatur, ist jedoch aus pathophysiologischer Sicht nicht ganz abwegig. Nachweislich kann eine potentiell höhere Akkumulation von Bakterien in der Leber zu einer verstärkten lokalen Entzündungsreaktion und Parenchymschädigung führen. Die geringeren Schäden in anderen Organen durch eine verstärkte Eradikation der Bakterien in der Leber könnte somit von Nachteil für die Leber selbst sein (McDonald et al. 2012). Da sich die histologischen Veränderungen nicht laborchemisch widerspiegeln, sondern insbesondere ALAT und auch die systemischen Zytokine in der Trainingsgruppe nicht erhöht sind und auch

die Mortalität der trainierten Tiere geringer ist, bleibt die Bedeutung der morphologischen Leberzellschädigung aktuell unklar. Zur genaueren Beurteilung der Trainingseffekte wären weiterführende Untersuchungen verschiedener pathophysiologischer Vorgänge insbesondere auch im späteren Verlauf der Sepsis notwendig. Die Arbeitsgruppe von Pepler et al. konnte zum Beispiel einen geringeren Anstieg der Genexpression verschiedener Zytokine (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1) und erhöhte HSP70-Proteinwerte in der Trainingsgruppe nach LPS-Injektion in der Leber nachweisen, ohne dass sich Gruppenunterschiede bei systemischen Zytokinwerten, ALAT und histologischen Leberparenchymveränderungen darstellen ließen. Auch die Genese vor allem der Leberzellverfettung im Verlauf der Sepsis ist bisher weitestgehend unbekannt. Bei der primären Form der Steatosis bzw. NASH werden unter anderem erhöhte Zytokinpiegel (insbesondere TNF- $\alpha$ ), eine gesteigerte Verfügbarkeit und Einschränkungen in der Verwertung von freien Fettsäuren, erhöhte Cortisolspiegel, die Modulation verschiedener metabolischer Vorgänge, insbesondere eine gesteigerte Insulinresistenz, Erhöhung von oxidativem Stress (z. B. ROS) und eine Dysfunktion von Mitochondrien als pathophysiologische Aspekte in der Entstehung diskutiert. Daraus ergeben sich wiederum Einschränkungen in der ATP-Synthese und eine reduzierte Toleranz der Fettleber für Ischämie und Hypoxie (Day 2002, Basaranoglu und Ormeci 2014). Dies spiegelt sich in einer verminderten Fähigkeit zur Erregereradikation mit gesteigerten Inzidenz von Infektionen und einer erhöhten Mortalität der Sepsis bei Patienten mit vorbekannten Lebererkrankungen (insbesondere Leberzirrhose) wider (Strnad et al. 2017, Nesseler et al. 2012). Alle der genannten Faktoren könnten auch potentiell an der Entstehung der sepsisassoziierten Steatosis beteiligt sein und eventuell durch physisches Training moduliert werden. Außerhalb von Sepsisstudien konnte gezeigt werden, dass regelmäßiges Training die Resistenz gegenüber Hypoglykämien, die Kapazität zum Laktatabbau, die gespeicherte Glukogenmenge, Hitzeschockproteine, die Insulinsensitivität und die Aktivität von antioxidativen Substanzen in der Leber steigert. Der Fettgehalt und Marker für oxidativen Stress in den Mitochondrien werden dagegen reduziert (Shephard und Johnson 2015). Somit könnte durch physisches Training die Toleranz der Leber gegenüber Stressoren im Verlauf der Sepsis gesteigert und eventuell auch eine Balance zwischen pro- und antiinflammatorischer Reaktion der Leber gefördert werden.

## 5.9 Regelmäßiges physisches Training schützt vor sepsisassoziierten Nierenschäden

Für die funktionellen Nierenparameter Kreatinin und Harnstoff-Stickstoff im Blut konnte bei gesunden Mäusen kein Unterschied durch physisches Training gezeigt werden. Interessanterweise konnten jedoch histologisch bei gesunden untrainierten Tieren leichte Schädigungen im Bereich des Tubulusepithels nachgewiesen werden, daraus ergab sich ein signifikant niedrigerer Tubulusschaden-Score bei trainierten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es liegen nur wenige Arbeiten aus der Literatur vor, bei denen der Effekt von physischem Training auf die Niere von gesunden Individuen untersucht wurde. Zumeist konnte in den entsprechenden Studien kein Effekt auf funktionelle, inflammatorische oder histologische Parameter nachgewiesen werden (Coelho et al. 2010, Miyagi et al. 2014, Muller et al. 2018). Mehr Untersuchungen liegen jedoch zu dem Einfluss von physischem Training bei Nierenerkrankungen vor. Insbesondere bei Patienten oder Tieren mit chronischer Niereninsuffizienz konnten wiederholt positive Effekte durch Training bestätigt werden. Nierenschädigungen in experimentellen Untersuchungen, z. B. durch subtotale Nephrektomie, fett- oder zuckerreiche Ernährung, Induktion eines Diabetes mellitus oder nephrotoxische Medikamente, präsentieren sich unter anderem auf funktioneller und morphologischer Ebene oder in Form einer Proteinurie. In verschiedenen Arbeiten konnten diese Veränderungen durch physisches Training in unterschiedlichem Ausmaß moduliert, reduziert und zum Teil auch nivelliert werden. Dabei spielen neben systemischen Effekten, wie einer Reduktion des Blutdrucks und inflammatorischer Parameter im Blut, auch der direkte Einfluss auf die Niere eine Rolle. Letzterer ist bisher jedoch deutlich weniger untersucht. Physisches Training scheint jedoch unter anderem über eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität, Modulation der Inflammationsparameter im Nierenparenchym und Reduktion der Apoptose die Resilienz der Niere gegenüber verschiedenen nephrotoxischen Bedingungen zu steigern. Effekte auf die Nierenretentionsparameter bleiben jedoch oft aus (Heifets et al. 1987, Yoshida et al. 2003, Coelho et al. 2010, Ishikawa et al. 2012, Howden et al. 2012, Miyagi et al. 2014, Muller et al. 2018).

Auch im Rahmen der Sepsis kommt es häufig zu einer starken Schädigung der Niere und zu einem Nierenversagen, was wiederum den Verlauf der Sepsis aggravieren kann und einen unabhängigen Risikofaktor für die Mortalität darstellt. Die Ätiologie



der sepsisassoziierten Nierenschädigung ist a. e. multifaktoriell und bisher unzureichend verstanden (John 2012). In der aktuellen Arbeit konnte insbesondere in der Kontrollgruppe ein deutlicher Anstieg der funktionellen Nierenparameter Kreatinin und Harnstoff-Stickstoff im Verlauf der Sepsis nachgewiesen werden. In der Trainingsgruppe war dagegen kein oder nur ein geringer Anstieg aufzuzeigen, sodass für Kreatinin nach 24 Stunden und für Harnstoff-Stickstoff nach 6 und nach 24 Stunden signifikant niedrigere Blutwerte bei trainierten Mäusen nachweisbar waren. In der zusätzlich durchgeführten histologischen Beurteilung der Niere zeigten sich vor allem in der Kontrollgruppe im Sepsisverlauf morphologische Schäden in Form von einer stark ausgeprägten epithelialen Vakuolisierung, einem abgeflachten Tubulusepithel, atypisch geformten Zellkernen oder Zellkernverlusten und Bürstensaumdefekten. In der Trainingsgruppe fiel der Tubulusschaden signifikant niedriger aus. Insbesondere die Vakuolisierung war deutlich geringer ausgeprägt. In keiner Gruppe waren Zeichen einer Tubulusnekrose vordergründig. Ein Anstieg von Kreatinin und Harnstoff bzw. Harnstoff-Stickstoff im Verlauf der Sepsis reflektiert die Daten aus der Literatur (Lee et al. 2002, Gonnert et al. 2011). In Bezug auf die Beurteilung der morphologischen Nierenveränderungen liegen viele, zum Teil auch kontroverse, Untersuchungen vor. Insgesamt ist bisher jedoch die Vakuolisierung der Tubuluszellen die häufigste histologische Manifestation des sepsisassoziierten Nierenschädigung bei tierexperimentellen Untersuchungen. Weitere beschriebene Veränderungen sind unter anderem ein Verlust des Bürstensaums oder Tubuluszellschwellungen. Die Tubuluszellnekrose- und -apoptose sind dagegen seltener als früher vermutet nachweisbar. Insbesondere die Nekrose ist vermutlich mit einem reduzierten renalen Blutfluss assoziiert (Kosaka et al. 2016, Garofalo et al. 2019). Da jedoch unspezifische Veränderungen des Tubulusepithels vordergründig sind, ist aktuell die Annahme, dass die generalisierte Hypoperfusion der Niere nicht die Hauptursache der sepsisassoziierten Nierenschädigung ist. Es liegen sogar Arbeiten vor, die einen Anstieg der Nierenretentionsparameter im Verlauf der Sepsis ohne relevante histologische Schädigungen des Nierenparenchyms nachweisen konnten (Maiden et al. 2016). Aktuell wird daher vermutet, dass insbesondere im frühen Verlauf der Sepsis eher eine funktionelle als eine strukturelle Schädigung der Niere vorliegt. Limitierend ist jedoch zu erwähnen, dass die histologischen Veränderungen wahrscheinlich stark vom verwendeten Sepsismodell und der Tierart im Versuchsaufbau abhängen (Kosaka et al. 2016). Auch die Übertragbarkeit auf den

Menschen bleibt zu unklar. Humane histologische Untersuchungen erfolgten meist post mortem nach prolongiertem Sepsisverlauf und zeigten zusätzlich zu den genannten morphologischen Veränderungen u. a. eine Infiltration mit Leukozyten sowie eine gesteigerte Rolle der Apoptose (Lerolle et al. 2010).

Bezüglich möglicher Trainingseffekte auf funktionelle oder histologische Nierenschäden im Verlauf der Sepsis liegen nahezu keine vergleichbaren Daten vor. Die Kollegen von Chen. et al. konnten ebenfalls niedrigere Kreatinin- und Harnstoff-Stickstoff-Werte bei trainierten Tieren im Rahmen eines LPS-Modells nachweisen, eine weiterführende Untersuchung erfolgte jedoch nicht (Chen et al. 2007). Bei der Untersuchung des Nierengewebes im Rahmen eines CLP-Sepsismodells waren weniger apoptotische Zellen in der Trainingsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar, weitere histologische Parameter wurden jedoch nicht evaluiert (de Araujo et al. 2012). Interessanterweise konnten auch für andere Ursachen der Nierenschädigung protektive Trainingseffekte nachgewiesen werden. Im Rahmen tierexperimentelle Untersuchungen mit Induktion eines hämorrhagischen Schocks oder einer Ischämie mit Reperfusion konnten sowohl laborchemische als auch histologische Marker der Nierenschädigung durch Ausdauertraining im Vorfeld deutlich reduziert werden (Lee et al. 2010, de Lima et al. 2019). Auch für ein cisplatininduziertes akutes Nierenversagen konnten durch regelmäßiges physisches Training der Anstieg von Kreatinin, Harnstoff, proinflammatorischen Zytokinen systemisch und lokal und die morphologische Schädigung des Nierenparenchyms vermindert werden (Miyagi et al. 2014, Estrela et al. 2017).

Da die Genese der sepsisassoziierten Nierenschädigung bisher unvollständig verstanden ist, kann auch über die Ursache der nachgewiesenen nephroprotektiven Effekte von regelmäßigem Training aktuell nur spekuliert werden. Im Zentrum pathophysiologischer Mechanismen in der Entstehung des sepsisassoziierten Nierenversagens stehen nach aktuellem Kenntnisstand eine mikrozirkulatorische Dysfunktion, inflammatorische Prozesse und eine Aktivierung der Blutgerinnung. Gewebeischämie, Generierung von oxidativem Stress, die Aktivierung und Schädigung von Tubulusepithelzellen sowie funktionelle und metabolische Veränderungen sind die Folge. Intrazelluläre energetische Anpassungsreaktion insbesondere der Mitochondrien zur Reduktion des Sauerstoffverbrauchs der Zellen scheinen einen weiteren Zellschaden zu verhindern oder zumindest zu reduzieren.

Insbesondere die frühe Phase des Nierenversagens ist daher eher durch einen funktionellen als durch einen strukturellen Parenchymschaden charakterisiert (Gomez et al. 2014, Zarbock et al. 2014). Auch die Ursache der Vakoulenbildung als histologisches Zeichen der Nierenparenchymschädigung im Verlauf der Sepsis ist bisher unklar. Es konnten jedoch hydroptische Mitochondrien und Lysosomen bzw. Autophagolysosomen als elektronenmikroskopisches Korrelat nachgewiesen werden (Takasu et al. 2013, Kosaka et al. 2016). Ein Zusammenhang mit oxidativem Stress und Mechanismen zur Reduktion des Energieverbrauchs der Zelle werden diskutiert (Gomez et al. 2014, Zarbock et al. 2014). Potentielle nephroprotektive Effekte von regelmäßigem Training könnten daher in der Steigerung der antioxidativen Kapazität und Modulation verschiedener zellulärer Enzyme liegen, um insbesondere Mitochondrien vor oxidativem Stress zu schützen und die Widerstandsfähigkeit gegenüber proapoptotischen Stimuli zu erhöhen (Kavazis 2009, Galley 2010). Zur genaueren Untersuchung dieser Theorie erfolgte die Untersuchung von MAO-A, HSP70 und Hif-1 $\alpha$  im Nierengewebe gesunder und septischer Mäuse.

Die MAO-A ist ein mitochondriales Enzym, das mittels oxidativer Desaminierung von biogenen Aminen (z. B. Serotonin und Noradrenalin) an der Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie an der Schädigung von Mitochondrien, an apoptotischen Signalwegen von Zellen und an endothelialer Dysfunktion beteiligt ist. Die Aktivität der MAO-A steigt im Alter, bei Diabetes mellitus und bei arterieller Hypertonie an. Interessanterweise schützen die Hemmung sowie die Ausschaltung der MAO-A im Tierexperiment vor kardialen Schäden nach Ischämie und Reperfusion (Ou et al. 2006, Kavazis 2009, Campos et al. 2013, Casas et al. 2015, Sturza et al. 2019). Durch LPS kann die Genexpression von MAO-A in der Aorta gesteigert werden. Eine Hemmung der MAO-A wiederum reduziert die LPS-induzierte Steigerung von ROS und Endotheldysfunktion bei Mäusen in der Gefäßwand (Ratiu et al. 2018). Bei weiteren Untersuchungen konnte ein Anstieg der Genexpression sowie der Proteinmenge von MAO-A in Leukozyten im Verlauf einer Sepsis bei Menschen nachgewiesen werden. Durch eine medikamentöse Inhibierung der MAO-A im Sepsismodell konnte bei Mäusen eine Reduktion der Organschäden und der Mortalität, der bakteriellen Keimlast im Blut sowie der ROS-Generierung in Granulozyten erzielt werden. Die Hemmung der MAO-A könnte daher einen neuen Therapieansatz in der Behandlung der Sepsis darstellen. (Otto et al. 2010). Eine Reduktion der MAO-A-Proteinmenge durch physisches Ausdauertraining konnte bereits für kardiale Mitochondrien

nachgewiesen werden (Kavazis 2009). Aufgrund der bisher vorliegenden Daten könnte daher propagiert werden, dass physisches Training zu einer Reduktion von MAO-A und darüber zu einer Verringerung von oxidativem Stress, mitochondriale Dysfunktion und Apoptose in Situationen mit gesteigerter ROS-Generierung, wie z. B. Ischämie oder Infekten, beiträgt. In der aktuellen Arbeit konnte jedoch im Rahmen der Untersuchungen der Genexpression und Proteinmenge der MAO-A im Nierengewebe weder eine Änderung im Verlauf der Sepsis noch Unterschiede zwischen Trainings- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Rolle der MAO-A in Bezug auf sepsisassoziierte Nierenschäden und potentielle Trainingseffekte auf die MAO-A im Nierengewebe bleiben daher aktuell ungewiss. Vergleichbare Untersuchungen aus der Literatur liegen unserer Einschätzung nach nicht vor. Aufgrund oben genannter Arbeiten, wäre vor allem die Untersuchung von Trainingseffekten auf die MAO-A in Blutleukozyten, Kardiomyozyten und Endothelzellen in Zusammenhang mit einer Sepsis interessant.

Physischer und chemischer Stress führt in Zellen unter anderem zu einer Generierung von HSP70. Diese Enzyme sind an der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Proteinintegrität sowie an verschiedenen zellulären Reparaturprozessen beteiligt. HSP70 schützt Zellen und Mitochondrien vor stressinduzierten Schäden und nimmt Einfluss auf apoptotische Zellprogramme. Außerdem moduliert HSP70 die Antigenpräsentation, die T-Lymphozytenaktivierung, Zytokinproduktion und Aktivität von natürlichen Killerzellen und ist somit an der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase beteiligt. Insgesamt spiegeln erhöhte HSP70-Werte gesteigerten oxidativen Stress und systemische Inflammation im Körper wider und sind assoziiert mit Diabetes mellitus, COPD, Entzündungen und Mortalität. Niedrige HSP70-Spiegel sind unter anderem im Alter, bei Arteriosklerose sowie bei Fettlebererkrankungen nachweisbar. (Bruemmer-Smith et al. 2001, Kregel 2002, Wachstein et al. 2012, Qu et al. 2015). HSP70 ist an der Generierung einer gewissen Toleranz gegenüber verschiedenen Stressoren (z. B. Ischämie, Hitze, Zytokine, LPS) und damit einem gesteigerten Überleben von Zellen auf sonst tödliche Einflüsse beteiligt. Eine Überexpression und Freisetzung von HSP70 kann sich jedoch über eine Aktivierung des Immunsystems mit Generierung einer unspezifischer Immunstimulation eventuell auch ungünstig auf den Organismus auswirken (Kregel 2002, Radons und Multhoff 2005, Lau et al. 2000). Auch im Verlauf einer Sepsis ist ein Anstieg von HSP70 im Blut nachweisbar. Dieser ist mit

Zeichen des erhöhten oxidativen Stress und mit Mortalität assoziiert (Aneja et al. 2006, Gelain et al. 2011, Qu et al. 2015). Untersuchungen zu HSP70 in den verschiedenen Organen im Verlauf der Sepsis liegen kaum vor. In der aktuellen Arbeit war eine leichte Abnahme der Proteinmenge und der Genexpression im Nierengewebe während des Fortschreitens der Sepsis auffällig. Castoldi et al. konnten dagegen einen Anstieg der HSP70-Expression im Nierenparenchym durch Anwendung eines CLP-Sepsis-Modells nachweisen (Castoldi et al. 2012). Nach LPS-Gabe dagegen konnte in Kardiomyozyten keine Veränderung der HSP70-Genexpression (Lau et al. 2000) und im Leberparenchym keine Modulation der HSP70-Proteinmenge nachgewiesen werden (Peppler et al. 2016). Aktuell bleibt somit die Veränderung und der potentielle Einfluss von HSP70 im Verlauf einer Sepsis insbesondere in den einzelnen Organen unklar. Ob erhöhte oder niedrige HSP70-Werte protektiv für den Sepsisverlauf sind, ist ebenfalls nicht abschließend geklärt. Insgesamt konnte jedoch wiederholte gezeigt werden, dass durch eine Erhöhung oder die Substitution von HSP70 in tierexperimentellen Sepsisuntersuchungen eine Reduktion der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Apoptose, Organschäden sowie Mortalität und eine Besserung der Hämodynamik erreicht werden konnten (Klosterhalfen et al. 1997, Lau et al. 2000, Bruemmer-Smith et al. 2001, Kustanova et al. 2006, Aschkenasy et al. 2011). Die Assoziation erhöhter HSP70-Werte mit einer gesteigerten Mortalität könnte daher eher Ausdruck für ein fortgeschrittenes Krankheitsbild sein, als dass HSP70 zwangsläufig selbst an der Generierung von Zellschädigung und Organdysfunktion beteiligt ist. Die Wirkung von physischem Training auf HSP70 ist ebenfalls unzureichend untersucht. Eine akute Trainingseinheit führt über die Generierung von Hypoxie, erhöhter Temperatur und oxidativem Stress eher zu einem Anstieg von HSP70 im Blut, im Muskel und auch im Nierengewebe (Fehrenbach et al. 2000, Lollo et al. 2013, Mee-Inta et al. 2019). Zum Effekt von regelmäßigem Training auf HSP70 liegen jedoch wenig Daten vor. Wir konnten aktuell keinen Trainingseffekt auf die Genexpression oder Proteinmenge von HSP70 im Nierengewebe gesunder Mäuse nachweisen. Auch im Verlauf der Sepsis konnten keine Unterschiede zwischen Trainings- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von Blut bzw. Leukozyten konnten andere Arbeiten wiederholt zeigen, dass regelmäßiges physisches Training eher zu einer Abnahme von HSP70 führt (Fehrenbach et al. 2000, Ogawa et al. 2010). Im Lebergewebe konnte dagegen ein Anstieg der HSP70-

Proteinmenge durch regelmäßiges Training nachgewiesen werden, ein Einfluss von Training auf den Verlauf von HSP70 nach Induktion einer systemischen Inflammation mittels LPS war nicht nachweisbar (Peppler et al. 2016). Bei Ratten konnte in der Niere durch chronisches Training ein Anstieg der Proteinmenge von HSP72 bei unveränderter Genexpression aufgezeigt werden. Durch eine akute Trainingseinheit war ein Anstieg der HSP72 mRNA und Proteinmenge nachweisbar, dieser fiel interessanterweise in der Trainingsgruppe höher aus als in einer Kontrollgruppe mit untrainierten Ratten (Lappalainen et al. 2018). In einem weiteren Tierversuch konnte durch ein Modell der Schwerelosigkeit eine morphologische Nierenparenchymschädigung zusammen mit gesteigerter HSP70-Proteinmenge in der Niere nachgewiesen werden. Durch physisches Training konnten die histologischen Zeichen der Nierenschädigung reduziert werden, es war jedoch parallel auch ein Rückgang der HSP70-Proteinmenge auffällig (Ding et al. 2011). Zusammenfassend lässt sich somit sagen, der Zusammenhang von HSP70, physischem Training, Sepsis und Organschädigung ist aktuell unzureichend geklärt. Unklar bleibt auch, ob regelmäßiges Training Einfluss auf die Genexpression oder Proteinsynthese von HSP70 hat oder ob antioxidative Enzyme und vorangeschaltete Prozesse wie die Generierung von ROS so moduliert werden, dass die Zellen mit einer veränderten HSP70-Synthese reagieren (Fehrenbach et al. 2000). Interessanterweise konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine Präkonditionierung mit repetitiven geringen HSP70-Gaben zu einer abgeschwächten Immunreaktion im Tiermodell nach LPS-Injektion führt (Aneja et al. 2006). Ein ähnlicher Effekt könnte auch für regelmäßiges Training propagiert werden. Eine potentielle Modulation der Immunantwort könnte über rezidivierende HSP70-Freisetzung durch die einzelnen Trainingseinheiten eventuell zu einer Modulation der Immunantwort beitragen, ohne dass die basale HSP70-Proteinmenge sich ändert. Anhand der genannten Literatur wird zusätzlich der Eindruck erweckt, dass verschiedene Prozesse sich unterschiedlich auf HSP70 im Blut sowohl frei als auch intrazellulär und im Gewebe auswirken und HSP70 selbst je nach Ursprung in unterschiedlichen Situationen wiederum variierende Effekte aufzeigen könnte. Interessant wären daher weitere Untersuchungen von HSP70 im Blut und in verschiedenen Organen sowohl in Bezug auf regelmäßiges physisches Training als auch im Sepsismodell.

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  steigert nach posttranslationaler Modifikation und Translokation in den Zellkern Signalwege, die Einfluss auf die Sauerstoffversorgung der Zelle nehmen. Ein Anstieg von HIF-1 $\alpha$  kann einerseits über einen Sauerstoffmangel im Gewebe und andererseits hypoxieunabhängig u. a. durch ROS, Zytokine, LPS, erhöhte Glukosespiegel, Hyperthermie, Azidose, einen reduzierten intrazellulären Eisengehalt und den NF- $\kappa$ B-Weg induziert werden. Mittels der entsprechenden Zielgene steigert HIF-1 $\alpha$  den Sauerstofftransport (z. B. Steigerung der Erythropoese und der Angiogenese), verbessert die Funktion von Zellen bei niedrigem Sauerstoffgehalt bzw. die saustoffunabhängige ATP-Synthese (z. B. Steigerung der Expression von Glukosetransportern und Enzymen der Glykolyse) und reduziert bei Hypoxie die mitochondriale Funktion und somit den zellulären Sauerstoffverbrauch (Hellwig-Burgel et al. 2005, Rius et al. 2008, Eltzschig und Carmeliet 2011, Ohno et al. 2012, Zepeda et al. 2013, Sharma 2016, Lindholm und Rundqvist 2016). Außerdem werden Gene zur Kontrolle von oxidativem Stress und Apoptose aktiviert. HIF-1 $\alpha$  reguliert zusätzlich viele Funktionen von myeloischen Zellen, u. a. wird die Aktivität gesteigert und die Apoptose inhibiert. Außerdem werden die Differenzierung und Proliferation von regulatorischen T-Zellen stimuliert (Peyssonnaud et al. 2005, Eltzschig und Carmeliet 2011). Die Veränderungen und deren Auswirkungen von HIF-1 $\alpha$  während einer Sepsis oder im Rahmen von Nierenerkrankungen sind bisher wenig untersucht und die Ergebnisse werden teilweise kontrovers diskutiert. In der aktuellen Arbeit war im Verlauf der Sepsis ein Anstieg der HIF-1 $\alpha$ -Genexpression nachweisbar. Die Proteinmenge dagegen blieb unverändert. Ähnliche Untersuchungen in der Literatur konnten im Rahmen eines CLP- und eines LPS-Modells einen Anstieg der HIF-1 $\alpha$ -Genexpression und -proteinmenge aufzeigen (Castoldi et al. 2012, Ogura et al. 2014). Derzeit bleibt unklar, ob eine Erhöhung von HIF-1 $\alpha$  auf den Verlauf einer Sepsis und sepsisassoziierte Nierenschäden protektiv oder eher schädlich ist. Einerseits wurde nachgewiesen, dass HIF-1 $\alpha$ -depletierte Makrophagen eine geringere Kapazität haben, Bakterien abzutöten sowie proinflammatorische Zytokine zu produzieren und eine Steigerung der bakteriellen Keimlast in Blut und Milz im Verlauf einer Infektion die Folge sein kann (Peyssonnaud et al. 2005). Auf der anderen Seite konnten wiederholt protektive Effekte durch eine HIF-1 $\alpha$ -Hemmung auf sepsisassoziierte Veränderungen nachgewiesen werden. So führte eine Deletion von HIF-1 $\alpha$  in T-Zellen zu einer geringeren Menge an Bakterien in Leber und Lunge und einem

gesteigerten Überleben im CLP-Sepsismodell (Thiel et al. 2007). Außerdem konnte nach LPS-Injektion durch eine Hif-1 $\alpha$ -Depletion in Makrophagen eine Reduktion der Mortalität und mittels medikamentöser generalisierter Hemmung von HIF-1 $\alpha$  ein Rückgang von proinflammatorischen Zytokine, Apoptose und morphologischen Zeichen einer Lungenschädigung aufgezeigt werden (Peyssonnaud et al. 2007, Yeh et al. 2011). Die Rolle von HIF-1 $\alpha$  im Verlauf der Sepsis vor allem in Bezug auf Organveränderungen bleibt aktuell unklar. HIF-1 $\alpha$  scheint sowohl an einer Aktivierung des Immunsystems als auch an immunsuppressiven Effekten beteiligt zu sein (Vanderhaeghen et al. 2020). Ähnliche Diskrepanzen sind für den Zusammenhang von HIF-1 $\alpha$  und verschiedene Nierenerkrankungen auffällig. HIF-1 $\alpha$  ist vor allem in den Tubuluszellen nachweisbar und es sind sowohl pro- als auch antiapoptotische Wirkungen beschrieben. Wiederholt konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung von HIF-1 $\alpha$  im Tierexperiment in der Niere über verschiedene Adaptationsprozesse vor einer akuten Nierenschädigung schützen kann. So wird z. B. der funktionelle und morphologische Schaden durch eine akute Ischämie der Niere mittels vorheriger Steigerung von HIF-1 $\alpha$  deutlich reduziert (Matsumoto et al. 2003, Eckardt et al. 2005, Bernhardt et al. 2006, Yeh et al. 2011). Andererseits ist HIF-1 $\alpha$  bei chronischen Nierenerkrankungen erhöht und mittels Induktion profibrotischer Gene an der Entstehung einer Fibrose im Nierenparenchym beteiligt (Eckardt et al. 2005, Wang et al. 2014). Eine Hemmung von HIF-1 $\alpha$  wirkt sich in diesem Fall protektiv auf die Nierenhistologie aus (Kimura et al. 2008). Insgesamt scheint der Effekt von HIF-1 $\alpha$  entscheidend vom jeweiligen Stressor bzw. Schädigungsmodell und vom untersuchten Organ abhängig zu sein. Auch die Art der HIF-1 $\alpha$ -Modulation (z. B. genetische Modifikation der Tiere oder pharmakologisch) verändert bereits erheblich die Studienergebnisse (Helton et al. 2005, Siddiq et al. 2005, Bernhardt et al. 2006, Wang et al. 2014). Zusätzlich wurde in der aktuellen Arbeit der Effekt von physischem Training auf die Genexpression und Proteinmenge von HIF-1 $\alpha$  untersucht. Dabei zeigte sich weder bei gesunden Mäusen noch im Verlauf der Sepsis ein Gruppenunterschied zwischen trainierten und untrainierten Tieren. Vergleichbare Arbeiten liegen nach aktuellem Kenntnisstand nicht vor. Eine einzelne akute Trainingseinheit kann den Anstieg von HIF-1 $\alpha$  im Skelettmuskel verursachen. Durch wiederholtes Ausdauertraining ist jedoch keine Modulation der HIF-1 $\alpha$ -mRNA im Skelettmuskel nachweisbar. Eine Arbeit konnte jedoch einen Anstieg der HIF-1 $\alpha$ -Proteinmenge im Muskel durch regelmäßiges Training



nachweisen. Interessant ist außerdem, dass durch wiederholte physische Aktivität der Anstieg von HIF-1 $\alpha$  durch eine einzelne Trainingseinheit abgeschwächt wird (Lundby et al. 2006, Ohno et al. 2012, Abe et al. 2015, Lindholm und Rundqvist 2016). Bei Mäusen mit Diabetes mellitus konnte gezeigt werden, dass moderates Ausdauertraining zu einem Anstieg von HIF-1 $\alpha$  zusammen mit einer Reduktion von Markern des oxidativen Stresses führt (Ishikawa et al. 2012). Insgesamt ist jedoch zu betonen, dass die Rolle von HIF-1 $\alpha$  im Rahmen von Anpassungsreaktionen und Modulation von Organschäden weiterhin unzureichend untersucht ist.

Somit kann eine Modulation der Proteinmenge oder Genexpression von MAO-A, HSP70 und Hif-1 $\alpha$  aktuell nicht als pathophysiologische Grundlage der nephroprotektiven Effekte von physischem Ausdauertraining bestätigt werden. Dies schließt einen Einfluss dieser Parameter jedoch nicht aus und weiterführende Untersuchungen könnten eventuell Aufschluss bringen. Bei fehlendem Gruppenunterschied in der bakteriellen Keimlast der Niere, ergibt sich auch daraus keine Erklärungsgrundlage. Da eine Assoziation zwischen erhöhten systemischen proinflammatorischen Zytokinen und dem Auftreten eines akuten Nierenversagens im Rahmen einer Sepsis besteht (Murugan et al. 2010), könnte die geringere Freisetzung von Zytokinen in der Trainingsgruppe eine potentielle Ursache für die geringere Schädigung der Niere darstellen. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe von Chen et al. nachweisen, dass trainierte Ratten eine geringere arterielle Hypotonie im LPS-Modell entwickelten als untrainierte Tiere (Chen et al. 2007). Ein möglicher Zusammenhang zwischen trainingsassoziiierter Modulation der Hämodynamik und Parenchymschädigung ist somit nicht auszuschließen.

## 6 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass regelmäßiges körperliches Training im Vorfeld einer polymikrobiellen Sepsis den Verlauf der Infektion und die Überlebensrate positiv beeinflusst. Dies war mit geringeren Zeichen einer Organschädigung insbesondere der Niere assoziiert. Auf der Suche nach möglichen zugrundeliegenden Pathomechanismen konnte nachgewiesen werden, dass bei trainierten Tieren eine niedrigere Konzentration sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine im Blut nachweisbar und die Fähigkeit Bakterien zu eliminieren dennoch gesteigert war. Physisches Training könnte somit spezifische zelluläre Adaptationen im Sinne einer Art Präkonditionierung induzieren, die es ermöglichen, auf einen potentiell tödlichen Stimulus mit einer kontrollierteren und gemäßigten Immunantwort zu reagieren, die aber gleichzeitig ausreichend oder sogar noch effektiver in der Bekämpfung des entsprechenden Stressors ist. Weiterführende Untersuchungen von Modulatoren des oxidativen Stresses (MAO-A, HSP70, Hif-1 $\alpha$ ) im Nierengewebe der Tiere zur genaueren Identifizierung möglicher Trainingseffekte erbrachten aktuell jedoch keinen Hinweis auf weitere zugrundeliegende Mechanismen.

Zur Steigerung des Verständnisses für trainingsassoziierte pathophysiologische Veränderungen sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Diese sollten sich vor allem auf die Evaluation weiterer Organe, wie z. B. Lunge und Herz, auf Parameter der Hämodynamik und Organdurchblutung sowie auf systemische und zelluläre Signalwege in Zusammenhang mit Inflammation und Hypoxie fokussieren. Ein interessanter Aspekt wäre außerdem der Vergleich verschiedener Variablen auf Zell- und Organebene zwischen trainierten Mäusen, die eine Sepsis überleben und denen die daran versterben. Zu betonen ist dabei, dass die Reaktionen auf einen Trainingsreiz sowie der Verlauf einer Sepsis interindividuell stark variabel sind und daher allgemeingültige Aussagen nur mit Vorsticht getroffen werden können.

Die Entdeckung weiterer, durch physisches Training positiv modifizierter, Signalwege könnte darüber hinaus helfen, neue medikamentöse Therapieansätze der Sepsis zu detektieren. Wobei zu betonen ist, dass Anpassungsreaktionen durch physisches Training sehr komplex sind und eine pharmakologische Modifikation einzelner Stellschrauben wahrscheinlich nicht ausreichend ist, um den Effekt nachzuahmen.

In dieser Arbeit wurden lediglich junge und gesunde Mäuse untersucht. Anhand der Datenlage könnte vermutet werden, dass protektive Trainingseffekte bei älteren und/oder vorerkrankten Tieren eventuell deutlicher ausfallen. Ein Versuchsaufbau mit entsprechenden Mäusen würde zusätzlich eher die betroffene Patientenpopulation der menschlichen Sepsis widerspiegeln.

Weitere Untersuchungen könnten darüber hinaus aufklären, in welchem Ausmaß Sport betrieben werden muss, um entsprechende Ergebnisse zu erzielen und auch wie lange die Effekte nach Beendigung der physischen Aktivität anhalten. Zusätzlich wäre die Evaluation der Trainingseffekte auf weniger starke inflammatorische Reize mit geringer oder fehlender Mortalität, ggf. auch in humanen Experimenten, von Interesse.

Insbesondere da die Sepsis ein schwerwiegendes Krankheitsbild mit eingeschränkten Therapieoptionen darstellt, ist der Nachweis protektiver Effekte durch regelmäßiges physisches Training in dieser Arbeit von besonderer Relevanz. Eine Präkonditionierung mittels physischer Aktivität könnte in ausgewählten Situationen auch präoperativ angewandt werden und so eventuell vor allem ischämische und septische Komplikationen reduzieren. Interessant wäre auch zu evaluieren, ob durch regelmäßiges körperliches Training vor dem Auftreten einer Sepsis auch Einfluss auf die Langzeitkomplikationen nach dem Überleben der systemischen Infektion etabliert werden kann und ob gewisse Formen der physischen Aktivität, wenn sie erst zu Beginn oder im Verlauf der Sepsis begonnen werden, noch protektive Effekte erzielen können. Für beide Varianten liegen aktuell erste Daten aus der Literatur vor.

## 7 Literaturverzeichnis

Abe T, Kitaoka Y, Kikuchi DM, Takeda K, Numata O, Takemasa T. 2015. High-intensity interval training-induced metabolic adaptation coupled with an increase in Hif-1alpha and glycolytic protein expression. *J Appl Physiol* (1985), 119 (11):1297-1302.

Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, Georgiadis M, Karatzas D, Karavolias G, Koniavitou K, Coats AJ, Kremastinos DT. 2001. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J*, 22 (9):791-797.

Adamopoulos S, Parissis J, Karatzas D, Kroupis C, Georgiadis M, Karavolias G, Paraskevaidis J, Koniavitou K, Coats AJ, Kremastinos DT. 2002. Physical training modulates proinflammatory cytokines and the soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 39 (4):653-663.

Adrie C, Azoulay E, Francois A, Clec'h C, Darques L, Schwebel C, Nakache D, Jamali S, Goldgran-Toledano D, Garrouste-Orgeas M, Timsit JF, OutcomeRea Study G. 2007. Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal. *Chest*, 132 (6):1786-1793.

Ahn N, Kim K. 2014. Combined influence of dietary restriction and treadmill running on MCP-1 and the expression of oxidative stress-related mRNA in the adipose tissue in obese mice. *J Exerc Nutrition Biochem*, 18 (3):311-318.

Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. 2001. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* (1985), 90 (5):1900-1908.

Aneja R, Odoms K, Dunsmore K, Shanley TP, Wong HR. 2006. Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J Immunol*, 177 (10):7184-7192.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29 (7):1303-1310.

Aschkenasy G, Bromberg Z, Raj N, Deutschman CS, Weiss YG. 2011. Enhanced Hsp70 expression protects against acute lung injury by modulating apoptotic pathways. *PLoS One*, 6 (11):e26956.

Asea A. 2008. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*, (183):111-127.

Ashare A, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky T, Hunninghake GW. 2006. Severe bacteremia results in a loss of hepatic bacterial clearance. *Am J Respir Crit Care Med*, 173 (6):644-652.

Ball D. 2015. Metabolic and endocrine response to exercise: sympathoadrenal integration with skeletal muscle. *Journal of Endocrinology*, 224 (2):R79.

- Barry JC, Simtchouk S, Durrer C, Jung ME, Mui AL, Little JP. 2018. Short-term exercise training reduces anti-inflammatory action of interleukin-10 in adults with obesity. *Cytokine*, 111:460-469.
- Basaranoglu M, Ormeci N. 2014. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnosis, pathogenesis, and management. *Turk J Gastroenterol*, 25 (2):127-132.
- Batterham AM, George KP, Mullineaux DR. 1997. Allometric scaling of left ventricular mass by body dimensions in males and females. *Med Sci Sports Exerc*, 29 (2):181-186.
- Bauer M. 2003. [Early goal-directed therapy in sepsis. Old wine in new skins?]. *Anaesthesist*, 52 Suppl 1:S16-19.
- Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K. 2006. [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist*, 55 (8):835-845.
- Baune BT, Rothermundt M, Ladwig KH, Meisinger C, Berger K. 2011. Systemic inflammation (Interleukin 6) predicts all-cause mortality in men: results from a 9-year follow-up of the MEMO Study. *Age (Dordr)*, 33 (2):209-217.
- Beiter T, Fragasso A, Hartl D, Niess AM. 2015. Neutrophil extracellular traps: a walk on the wild side of exercise immunology. *Sports Med*, 45 (5):625-640.
- Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J, Maiden M, Bagshaw SM, Glassford NJ, Lankadeva Y, Vaara ST, Schneider A. 2017. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med*, 43 (6):816-828.
- Ben Ounis O, Elloumi M, Lac G, Makni E, Van Praagh E, Zouhal H, Tabka Z, Amri M. 2009. Two-month effects of individualized exercise training with or without caloric restriction on plasma adipocytokine levels in obese female adolescents. *Ann Endocrinol (Paris)*, 70 (4):235-241.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr. 2001. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 344 (10):699-709.
- Bernhardt WM, Campean V, Kany S, Jurgensen JS, Weidemann A, Warnecke C, Arend M, Klaus S, Gunzler V, Amann K, Willam C, Wiesener MS, Eckardt KU. 2006. Preconditional activation of hypoxia-inducible factors ameliorates ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 17 (7):1970-1978.
- Blair SN. 2009. Physical inactivity: the biggest public health problem of the 21st century. *Br J Sports Med*, 43 (1):1-2.
- Blair SN, Kampert JB, Kohl HW, 3rd, Barlow CE, Macera CA, Paffenbarger RS, Jr., Gibbons LW. 1996. Influences of cardiorespiratory fitness and other precursors on cardiovascular disease and all-cause mortality in men and women. *JAMA*, 276 (3):205-210.
- Bochud PY, Calandra T. 2003. Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ*, 326 (7383):262-266.

Bone RC. 1996. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med*, 24 (7):1125-1128.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101 (6):1644-1655.

Bosch NA, Walkey AJ. 2019. Leukopenia: SIRS or Sepsis-Defining Organ Dysfunction? D104 CRITICAL CARE: A FINE BALANCE - SEPSIS DEFINITIONS, OUTCOMES AND EPIDEMIOLOGY. A7163-A7163.

Bosmann M, Ward PA. 2013. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol*, 34 (3):129-136.

Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. 2007. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care*, 11 (2):R49.

Bruemmer-Smith S, Stuber F, Schroeder S. 2001. Protective functions of intracellular heat-shock protein (HSP) 70-expression in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*, 27 (12):1835-1841.

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B. 1995. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA*, 274 (12):968-974.

Bruun JM, Helge JW, Richelsen B, Stallknecht B. 2006. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290 (5):E961-967.

Camicia G, Pozner R, de Larranaga G. 2014. Neutrophil extracellular traps in sepsis. *Shock*, 42 (4):286-294.

Campos JC, Gomes KM, Ferreira JC. 2013. Impact of exercise training on redox signaling in cardiovascular diseases. *Food Chem Toxicol*, 62:107-119.

Cannon JG, Kluger MJ. 1984. Exercise enhances survival rate in mice infected with *Salmonella typhimurium*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 175 (4):518-521.

Casas AI, Dao VT, Daiber A, Maghzal GJ, Di Lisa F, Kaludercic N, Leach S, Cuadrado A, Jaquet V, Seredenina T, Krause KH, Lopez MG, Stocker R, Ghezzi P, Schmidt HH. 2015. Reactive Oxygen-Related Diseases: Therapeutic Targets and Emerging Clinical Indications. *Antioxid Redox Signal*, 23 (14):1171-1185.

Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, Aguiar CF, Bassi EJ, Correa-Silva R, Elias RM, Salvador F, Moraes-Vieira PM, Cenedeze MA, Reis MA, Hiyane MI, Pacheco-Silva A, Goncalves GM, Saraiva Camara NO. 2012. TLR2, TLR4 and the MYD88

signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. *PLoS One*, 7 (5):e37584.

Cavaillon JM, Singer M, Skirecki T. 2020. Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. *EMBO Mol Med*, 12 (4):e10128.

Chawla LS, Seneff MG, Nelson DR, Williams M, Levy H, Kimmel PL, Macias WL. 2007. Elevated plasma concentrations of IL-6 and elevated APACHE II score predict acute kidney injury in patients with severe sepsis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2 (1):22-30.

Chen HI, Hsieh SY, Yang FL, Hsu YH, Lin CC. 2007. Exercise training attenuates septic responses in conscious rats. *Med Sci Sports Exerc*, 39 (3):435-442.

Chen J, Chung DW. 2018. Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13. *Blood*, 132 (2):141-147.

Chen K. 2004. Organization of MAO A and MAO B promoters and regulation of gene expression. *Neurotoxicology*, 25 (1-2):31-36.

Chung HY, Kollmey AS, Schreppe A, Kohl M, Blass MF, Stehr SN, Lupp A, Graler MH, Claus RA. 2017. Adjustment of Dysregulated Ceramide Metabolism in a Murine Model of Sepsis-Induced Cardiac Dysfunction. *Int J Mol Sci*, 18 (4).

Chvojka J, Sykora R, Krouzecky A, Radej J, Varnerova V, Karvunidis T, Hes O, Novak I, Radermacher P, Matejovic M. 2008. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. *Crit Care*, 12 (6):R164.

Cinel I, Opal SM. 2009. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med*, 37 (1):291-304.

Claus RA, Bockmeyer CL, Sossdorf M, Lösche W, Hilberg T. 2006. Physical stress as a model to study variations in ADAMTS-13 activity, von Willebrand factor level and platelet activation. *J Thromb Haemost*, 4 (4):902-905.

Coelho BL, Rocha LG, Scarabelot KS, Scheffer DL, Ronsani MM, Silveira PC, Silva LA, Souza CT, Pinho RA. 2010. Physical exercise prevents the exacerbation of oxidative stress parameters in chronic kidney disease. *J Ren Nutr*, 20 (3):169-175.

Costa Rosa LF. 2004. Exercise as a Time-conditioning Effector in Chronic Disease: a Complementary Treatment Strategy. *Evid Based Complement Alternat Med*, 1 (1):63-70.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*, 180 (9):5771-5777.

Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, Sonogo F, Castanheira FV, Melo PH, Scortegagna GT, Silva RL, Barroso-Sousa R, Souto FO, Pazin-Filho A, Figueiredo F, Alves-Filho JC, Cunha FQ. 2016. Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. *PLoS One*, 11 (2):e0148142.

- Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M. 1992. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg*, 215 (4):356-362.
- Day CP. 2002. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 16 (5):663-678.
- de Araujo CC, Silva JD, Samary CS, Guimaraes IH, Marques PS, Oliveira GP, do Carmo LG, Goldenberg RC, Bakker-Abreu I, Diaz BL, Rocha NN, Capelozzi VL, Pelosi P, Rocco PR. 2012. Regular and moderate exercise before experimental sepsis reduces the risk of lung and distal organ injury. *J Appl Physiol* (1985), 112 (7):1206-1214.
- de Gonzalo-Calvo D, Fernandez-Garcia B, de Luxan-Delgado B, Rodriguez-Gonzalez S, Garcia-Macia M, Suarez FM, Solano JJ, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. 2012. Long-term training induces a healthy inflammatory and endocrine emergent biomarker profile in elderly men. *Age (Dordr)*, 34 (3):761-771.
- de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. 2003. Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 107 (5):690-695.
- de Lima WV, Visona I, Schor N, Almeida WS. 2019. Preconditioning by aerobic exercise reduces acute ischemic renal injury in rats. *Physiol Rep*, 7 (14):e14176.
- de Stoppelaar SF, van 't Veer C, Claushuis TA, Albersen BJ, Roelofs JJ, van der Poll T. 2014. Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice. *Blood*, 124 (25):3781-3790.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 29 (6):313-326.
- Devries MC, Samjoo IA, Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA. 2008. Effect of endurance exercise on hepatic lipid content, enzymes, and adiposity in men and women. *Obesity (Silver Spring)*, 16 (10):2281-2288.
- Di Francescomarino S, Sciartilli A, Di Valerio V, Di Baldassarre A, Gallina S. 2009. The effect of physical exercise on endothelial function. *Sports Med*, 39 (10):797-812.
- Di Giantomasso D, May CN, Bellomo R. 2003. Vital organ blood flow during hyperdynamic sepsis. *Chest*, 124 (3):1053-1059.
- Ding Y, Zou J, Li Z, Tian J, Abdelalim S, Du F, She R, Wang D, Tan C, Wang H, Chen W, Lv D, Chang L. 2011. Study of histopathological and molecular changes of rat kidney under simulated weightlessness and resistance training protective effect. *PLoS One*, 6 (5):e20008.
- Dorneles GP, Haddad DO, Fagundes VO, Vargas BK, Kloecker A, Romao PR, Peres A. 2016. High intensity interval exercise decreases IL-8 and enhances the immunomodulatory cytokine interleukin-10 in lean and overweight-obese individuals. *Cytokine*, 77:1-9.



- Eckardt KU, Bernhardt WM, Weidemann A, Warnecke C, Rosenberger C, Wiesener MS, Willam C. 2005. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int Suppl*, (99):S46-51.
- Edmondson DE, Mattevi A, Binda C, Li M, Hubalek F. 2004. Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Curr Med Chem*, 11 (15):1983-1993.
- Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C. 2002. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 166 (9):1197-1205.
- El-Sayed MS, Ali N, El-Sayed Ali Z. 2005. Aggregation and activation of blood platelets in exercise and training. *Sports Med*, 35 (1):11-22.
- Eltzschig HK, Carmeliet P. 2011. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*, 364 (7):656-665.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33 (4):606-618.
- Esmon CT. 2004. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med*, 32 (5 Suppl):S219-222.
- Estrela GR, Wasinski F, Batista RO, Hiyane MI, Felizardo RJ, Cunha F, de Almeida DC, Malheiros DM, Camara NO, Barros CC, Bader M, Araujo RC. 2017. Caloric Restriction Is More Efficient than Physical Exercise to Protect from Cisplatin Nephrotoxicity via PPAR-Alpha Activation. *Front Physiol*, 8:116.
- Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. 2003. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res*, 36 (12):1751-1759.
- Farinha JB, Steckling FM, Stefanello ST, Cardoso MS, Nunes LS, Barcelos RP, Duarte T, Kretzmann NA, Mota CB, Bresciani G, Moresco RN, Duarte MM, Dos Santos DL, Soares FA. 2015. Response of oxidative stress and inflammatory biomarkers to a 12-week aerobic exercise training in women with metabolic syndrome. *Sports Med Open*, 1 (1):19.
- Fehrenbach E, Schneider ME. 2006. Trauma-induced systemic inflammatory response versus exercise-induced immunomodulatory effects. *Sports Med*, 36 (5):373-384.
- Fehrenbach E, Passek F, Niess AM, Pohla H, Weinstock C, Dickhuth HH, Northoff H. 2000. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 32 (3):592-600.
- Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ. 2007. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and

down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology*, 236 (3):217-226.

Fischer CP. 2006. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev*, 12:6-33.

Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. 2016. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int*, 113 (10):159-166.

Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G. 2009. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*, 227 (1):106-128.

Frasier CR, Moore RL, Brown DA. 2011. Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. *J Appl Physiol* (1985), 111 (3):905-915.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. 1998. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*, 83 (3):847-850.

Friman G, Ilback NG, Crawford DJ, Neufeld HA. 1991. Metabolic responses to swimming exercise in *Streptococcus pneumoniae* infected rats. *Med Sci Sports Exerc*, 23 (4):415-421.

Galbo H. 1986. The hormonal response to exercise. *Diabetes Metab Rev*, 1 (4):385-408.

Galley HF. 2010. Bench-to-bedside review: Targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. *Crit Care*, 14 (4):230.

Garofalo AM, Lorente-Ros M, Goncalvez G, Carriedo D, Ballen-Barragan A, Villar-Fernandez A, Penuelas O, Herrero R, Granados-Carreno R, Lorente JA. 2019. Histopathological changes of organ dysfunction in sepsis. *Intensive Care Med Exp*, 7 (Suppl 1):45.

Gelain DP, de Bittencourt Pasquali MA, C MC, Grunwald MS, Ritter C, Tomasi CD, Alves SC, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Moreira JC. 2011. Serum heat shock protein 70 levels, oxidant status, and mortality in sepsis. *Shock*, 35 (5):466-470.

Gielen S, Adams V, Mobius-Winkler S, Linke A, Erbs S, Yu J, Kempf W, Schubert A, Schuler G, Hambrecht R. 2003. Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 42 (5):861-868.

Gleeson M. 2007. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* (1985), 103 (2):693-699.

Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. 2011. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*, 11 (9):607-615.

- Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, Goodyear LJ. 2009. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297 (2):E495-504.
- Gomez-Merino D, Drogou C, Guezennec CY, Chennaoui M. 2007. Effects of chronic exercise on cytokine production in white adipose tissue and skeletal muscle of rats. *Cytokine*, 40 (1):23-29.
- Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, Kellum JA. 2014. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock*, 41 (1):3-11.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*, 170 (1):e123-134.
- Gotts JE, Matthay MA. 2016. Sepsis: pathophysiology and clinical management. *BMJ*, 353:i1585.
- Gramm HJ, Hannemann L, Reinhart K, Lode H. 1995. [Sepsis: a conception in change. Possibilities and limitations of diagnosis based on clinical criteria]. *Dtsch Med Wochenschr*, 120 (14):498-502.
- Hamedinia M, Haghghi A, Ravasi A. 2009. The Effect of Aerobic Training on Inflammatory Markers of Cardiovascular Disease Risk in Obese Men.
- Hansen JB, Wilsgard L, Osterud B. 1991. Biphasic changes in leukocytes induced by strenuous exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 62 (3):157-161.
- Heber S, Volf I. 2015. Effects of Physical (In)activity on Platelet Function. *Biomed Res Int*, 2015:165078.
- Hebert PC, Drummond AJ, Singer J, Bernard GR, Russell JA. 1993. A Simple Multiple System Organ Failure Scoring System Predicts Mortality of Patients Who Have Sepsis Syndrome. *Chest*, 104 (1):230-235.
- Hedayati M, Safarzade A, Gharakhanlou R, Talebi-Garakani E. 2012. The Effect of 4 Weeks Resistance Training on Serum Vaspin, IL-6, CRP and TNF- $\alpha$  Concentrations in Diabetic Rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 14:68-74.
- Heifets M, Davis TA, Tegtmeyer E, Klahr S. 1987. Exercise training ameliorates progressive renal disease in rats with subtotal nephrectomy. *Kidney Int*, 32 (6):815-820.
- Hellwig-Burgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W. 2005. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res*, 25 (6):297-310.
- Helton R, Cui J, Scheel JR, Ellison JA, Ames C, Gibson C, Blouw B, Ouyang L, Dragatsis I, Zeitlin S, Johnson RS, Lipton SA, Barlow C. 2005. Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage. *J Neurosci*, 25 (16):4099-4107.

- Higashi Y, Yoshizumi M. 2004. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther*, 102 (1):87-96.
- Hillenbrand A, Knippschild U, Weiss M, Schrezenmeier H, Henne-Bruns D, Huber-Lang M, Wolf AM. 2010. Sepsis induced changes of adipokines and cytokines - septic patients compared to morbidly obese patients. *BMC Surg*, 10:26.
- Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. 2013. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*, 13 (3):260-268.
- Howden EJ, Fassett RG, Isbel NM, Coombes JS. 2012. Exercise training in chronic kidney disease patients. *Sports Med*, 42 (6):473-488.
- Ihalainen JK, Peltonen H, Paulsen G, Ahtiainen JP, Taipale RS, Hamalainen M, Moilanen E, Mero AA. 2018. Inflammation status of healthy young men: initial and specific responses to resistance training. *Appl Physiol Nutr Metab*, 43 (3):252-258.
- Ince C. 2005. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*, 9 Suppl 4:S13-19.
- Irahara T, Sato N, Inoue K, Otake K, Ohtsuru S, Koike K, Fushiki T, Yokota H. 2016. Low-intensity exercise in the acute phase of lipopolysaccharide-induced sepsis improves lipid metabolism and survival in mice by stimulating PGC-1 $\alpha$  expression. *J Trauma Acute Care Surg*, 80 (6):933-940.
- Ishikawa Y, Gohda T, Tanimoto M, Omote K, Furukawa M, Yamaguchi S, Murakoshi M, Hagiwara S, Horikoshi S, Funabiki K, Tomino Y. 2012. Effect of exercise on kidney function, oxidative stress, and inflammation in type 2 diabetic KK-A(y) mice. *Exp Diabetes Res*, 2012:702948.
- Jankord R, Jemiolo B. 2004. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men. *Med Sci Sports Exerc*, 36 (6):960-964.
- Jansky L, Vybiral S. 2004. Thermal homeostasis in systemic inflammation: modulation of neuronal mechanisms. *Front Biosci*, 9:3068-3084.
- Jean-Baptiste E. 2007. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med*, 22 (2):63-72.
- Jeganathan N, Yau S, Ahuja N, Otu D, Stein B, Fogg L, Balk R. 2017. The characteristics and impact of source of infection on sepsis-related ICU outcomes. *J Crit Care*, 41:170-176.
- John S. 2012. Niere und Sepsis. *Der Nephrologe*, 7 (4):298-306.
- Kadoglou NP, Iliadis F, Angelopoulou N, Perrea D, Ampatzidis G, Liapis CD, Alevizos M. 2007. The anti-inflammatory effects of exercise training in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 14 (6):837-843.

- Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, Malhotra A, Geenen DL, Nakouzi A, Leinwand LA, Buttrick PM. 1994. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am J Physiol*, 267 (3 Pt 2):H1167-1173.
- Kavazis AN. 2009. Exercise preconditioning of the myocardium. *Sports Med*, 39 (11):923-935.
- Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. 2010. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev*, 16:105-118.
- Kawanishi N, Yano H, Mizokami T, Takahashi M, Oyanagi E, Suzuki K. 2012. Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. *Brain Behav Immun*, 26 (6):931-941.
- Kemi OJ, Loennechen JP, Wisloff U, Ellingsen O. 2002. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985), 93 (4):1301-1309.
- Kim D, Kang H. 2019. Exercise training modifies gut microbiota with attenuated host responses to sepsis in wild-type mice. *FASEB J*, 33 (4):5772-5781.
- Kimura K, Iwano M, Higgins DF, Yamaguchi Y, Nakatani K, Harada K, Kubo A, Akai Y, Rankin EB, Neilson EG, Haase VH, Saito Y. 2008. Stable expression of HIF-1alpha in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295 (4):F1023-1029.
- Klosterhalfen B, Hauptmann S, Tietze L, Tons C, Winkeltau G, Kupper W, Kirkpatrick CJ. 1997. The influence of heat shock protein 70 induction on hemodynamic variables in a porcine model of recurrent endotoxemia. *Shock*, 7 (5):358-363.
- Kosaka J, Lankadeva YR, May CN, Bellomo R. 2016. Histopathology of Septic Acute Kidney Injury: A Systematic Review of Experimental Data. *Crit Care Med*, 44 (9):e897-903.
- 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*, 14 (9):1389-1393.
- Kregel KC. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* (1985), 92 (5):2177-2186.
- Kumpf O, Schumann RR. 2008. Genetic influence on bloodstream infections and sepsis. *Int J Antimicrob Agents*, 32 Suppl 1:S44-50.
- Kustanova GA, Murashev AN, Karpov VL, Margulis BA, Guzhova IV, Prokhorenko IR, Grachev SV, Evgen'ev MB. 2006. Exogenous heat shock protein 70 mediates sepsis manifestations and decreases the mortality rate in rats. *Cell Stress Chaperones*, 11 (3):276-286.
- Lancaster GI, Febbraio MA. 2014. The immunomodulating role of exercise in metabolic disease. *Trends Immunol*, 35 (6):262-269.

- Landoni VI, Chiarella P, Martire-Greco D, Schierloh P, van-Rooijen N, Rearte B, Palermo MS, Isturiz MA, Fernandez GC. 2012. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin Exp Immunol*, 168 (1):153-163.
- Lappalainen J, Oksala NKJ, Laaksonen DE, Khanna S, Kokkola T, Kaarniranta K, Sen CK, Atalay M. 2018. Suppressed heat shock protein response in the kidney of exercise-trained diabetic rats. *Scand J Med Sci Sports*, 28 (7):1808-1817.
- Latifi SQ, O'Riordan MA, Levine AD. 2002. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infect Immun*, 70 (8):4441-4446.
- Lau SS, Griffin TM, Mestral R. 2000. Protection against endotoxemia by HSP70 in rodent cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278 (5):H1439-1445.
- Lee CJ, Peng TC, Hsu BG, Harn HJ, Chao YF, Lee RP. 2010. Lack of exercise decreases survival and increases organ damage after hemorrhagic shock in rats. *Biol Res Nurs*, 12 (2):198-205.
- Lee DC, Sui X, Artero EG, Lee IM, Church TS, McAuley PA, Stanford FC, Kohl HW, 3rd, Blair SN. 2011. Long-term effects of changes in cardiorespiratory fitness and body mass index on all-cause and cardiovascular disease mortality in men: the Aerobics Center Longitudinal Study. *Circulation*, 124 (23):2483-2490.
- Lee R, Wang D, Lin NT, Chen HI. 2002. Physiological and chemical indicators for early and late stages of sepsis in conscious rats. *J Biomed Sci*, 9 (6 Pt 2):613-621.
- Lee WL, Slutsky AS. 2010. Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med*, 363 (7):689-691.
- Leggate M, Carter WG, Evans MJ, Vennard RA, Sribala-Sundaram S, Nimmo MA. 2012. Determination of inflammatory and prominent proteomic changes in plasma and adipose tissue after high-intensity intermittent training in overweight and obese males. *J Appl Physiol* (1985), 112 (8):1353-1360.
- Leonidou L, Mouzaki A, Michalaki M, DeLastic AL, Kyriazopoulou V, Bassaris HP, Gogos CA. 2007. Cytokine production and hospital mortality in patients with sepsis-induced stress hyperglycemia. *J Infect*, 55 (4):340-346.
- Lerolle N, Nochy D, Guerot 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*, 36 (3):471-478.
- Levi M, Schultz M, van der Poll T. 2013. Sepsis and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 39 (5):559-566.
- Libardi CA, De Souza GV, Cavaglieri CR, Madruga VA, Chacon-Mikahil MP. 2012. Effect of resistance, endurance, and concurrent training on TNF-alpha, IL-6, and CRP. *Med Sci Sports Exerc*, 44 (1):50-56.
- Lindholm ME, Rundqvist H. 2016. Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise. *Exp Physiol*, 101 (1):28-32.

- Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Souza HA, Caperuto EC, Carnevali LC, Jr., Seelaender M, Damaso AR, Oyama LM, de Mello MT, Santos RV. 2010. Endotoxin levels correlate positively with a sedentary lifestyle and negatively with highly trained subjects. *Lipids Health Dis*, 9:82.
- Lollgen H. 2014. [Importance and evidence of regular physical activity for prevention and treatment of diseases]. *Dtsch Med Wochenschr*, 139 (8):395.
- Lollgen H, Bockenhoff A, Knapp G. 2009. Physical activity and all-cause mortality: an updated meta-analysis with different intensity categories. *Int J Sports Med*, 30 (3):213-224.
- Lollo PC, Moura CS, Morato PN, Amaya-Farfan J. 2013. Differential response of heat shock proteins to uphill and downhill exercise in heart, skeletal muscle, lung and kidney tissues. *J Sports Sci Med*, 12 (3):461-466.
- Lopez-Collazo E, del Fresno C. 2013. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Crit Care*, 17 (6):242.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 117 (1):175-184.
- Lundby C, Gassmann M, Pilegaard H. 2006. Regular endurance training reduces the exercise induced HIF-1alpha and HIF-2alpha mRNA expression in human skeletal muscle in normoxic conditions. *Eur J Appl Physiol*, 96 (4):363-369.
- Mai SHC, Khan M, Dwivedi DJ, Ross CA, Zhou J, Gould TJ, Gross PL, Weitz JI, Fox-Robichaud AE, Liaw PC, Group ftCCCTB. 2015. Delayed but not Early Treatment with DNase Reduces Organ Damage and Improves Outcome in a Murine Model of Sepsis. *Shock*, 44 (2):166-172.
- Maiden MJ, Otto S, Brealey JK, Finnis ME, Chapman MJ, Kuchel TR, Nash CH, Edwards J, Bellomo R. 2016. Structure and Function of the Kidney in Septic Shock. A Prospective Controlled Experimental Study. *Am J Respir Crit Care Med*, 194 (6):692-700.
- Malm C, Ekblom O, Ekblom B. 2004. Immune system alteration in response to increased physical training during a five day soccer training camp. *Int J Sports Med*, 25 (6):471-476.
- Mansur A, Klee Y, Popov AF, Erlenwein J, Ghadimi M, Beissbarth T, Bauer M, Hinz J. 2015. Primary bacteraemia is associated with a higher mortality risk compared with pulmonary and intra-abdominal infections in patients with sepsis: a prospective observational cohort study. *BMJ Open*, 5 (1):e006616.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25 (12):677-686.
- Marques CM, Motta VF, Torres TS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 2010. Beneficial effects of exercise training (treadmill) on insulin resistance and

nonalcoholic fatty liver disease in high-fat fed C57BL/6 mice. *Braz J Med Biol Res*, 43 (5):467-475.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348 (16):1546-1554.

Martin L, Derwall M, Thiemermann C, Schürholz T. 2017. Herz in der Sepsis. *Der Anaesthetist*, 66 (7):479-490.

Matsumoto M, Makino Y, Tanaka T, Tanaka H, Ishizaka N, Noiri E, Fujita T, Nangaku M. 2003. Induction of renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J Am Soc Nephrol*, 14 (7):1825-1832.

McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. 2012. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*, 12 (3):324-333.

Mee-Inta O, Zhao ZW, Kuo YM. 2019. Physical Exercise Inhibits Inflammation and Microglial Activation. *Cells*, 8 (7).

Meng W, Paunel-Gorgulu A, Flohe S, Hoffmann A, Witte I, MacKenzie C, Baldus SE, Windolf J, Logters TT. 2012. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care*, 16 (4):R137.

Mensink G, Schienkiewitz A, Haftenberger M, Lampert T, Ziese T, Scheidt-Nave C. 2013. Overweight and obesity in Germany - Results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1) *Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung*.

Miyagi MY, Seelaender M, Castoldi A, de Almeida DC, Bacurau AV, Andrade-Oliveira V, Enju LM, Pisciotano M, Hayashida CY, Hiyane MI, Brum PC, Camara NO, Amano MT. 2014. Long-term aerobic exercise protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by modulating the expression of IL-6 and HO-1. *PLoS One*, 9 (10):e108543.

Moerer O, Quintel M. 2009. [Sepsis in adult patients - definitions, epidemiology and economic aspects]. *Internist (Berl)*, 50 (7):788, 790-784, 796-788.

Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 (12):4196-4200.

Muftuoglu MA, Aktekin A, Ozdemir NC, Saglam A. 2006. Liver injury in sepsis and abdominal compartment syndrome in rats. *Surg Today*, 36 (6):519-524.

Muller CR, Americo ALV, Fiorino P, Evangelista FS. 2018. Aerobic exercise training prevents kidney lipid deposition in mice fed a cafeteria diet. *Life Sci*, 211:140-146.

Murugan R, Karajala-Subramanyam V, Lee M, Yende S, Kong L, Carter M, Angus DC, Kellum JA, Genetic, Inflammatory Markers of Sepsis I. 2010. Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int*, 77 (6):527-535.



- Myers J. 2003. Cardiology patient pages. Exercise and cardiovascular health. *Circulation*, 107 (1):e2-5.
- Nessler N, Launey Y, Aninat C, Morel F, Malledant Y, Seguin P. 2012. Clinical review: The liver in sepsis. *Crit Care*, 16 (5):235.
- Neto JC, Lira FS, de Mello MT, Santos RV. 2011. Importance of exercise immunology in health promotion. *Amino Acids*, 41 (5):1165-1172.
- Niessner A, Richter B, Penka M, Steiner S, Strasser B, Ziegler S, Heeb-Elze E, Zorn G, Leitner-Heinschink A, Niessner C, Wojta J, Huber K. 2006. Endurance training reduces circulating inflammatory markers in persons at risk of coronary events: impact on plaque stabilization? *Atherosclerosis*, 186 (1):160-165.
- Nunes RB, Tonetto M, Machado N, Chazan M, Heck TG, Veiga AB, Dall'Ago P. 2008. Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats. *J Appl Physiol* (1985), 104 (6):1641-1647.
- Nuttall FQ. 2015. Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. *Nutrition today*, 50 (3):117-128.
- Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP, Moldawer LL. 2005. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock*, 23 (6):488-493.
- Ogawa K, Sanada K, Machida S, Okutsu M, Suzuki K. 2010. Resistance exercise training-induced muscle hypertrophy was associated with reduction of inflammatory markers in elderly women. *Mediators Inflamm*, 2010:171023.
- Ogura Y, Jesmin S, Yamaguchi N, Oki M, Shimojo N, Islam MM, Khatun T, Kamiyama J, Sakuramoto H, Hagiya K, Kawano S, Mizutani T. 2014. Potential amelioration of upregulated renal HIF-1 $\alpha$ -endothelin-1 system by landiolol hydrochloride in a rat model of endotoxemia. *Life Sci*, 118 (2):347-356.
- Ohno H, Shirato K, Sakurai T, Ogasawara J, Sumitani Y, Sato S, Imaizumi K, Ishida H, Kizaki T. 2012. Effect of exercise on HIF-1 and VEGF signaling. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 1 (1):5-16.
- Opendakker G, Fibbe WE, Van Damme J. 1998. The molecular basis of leukocytosis. *Immunol Today*, 19 (4):182-189.
- Otto GP, Sossdorf M, Lemm J, Scholz S, Claus RA, Bauer M. 2010. Monoamine oxidase-A function and potential benefit of its inhibition in sepsis. *Critical Care*, 14 (2):P44.
- Ou XM, Chen K, Shih JC. 2006. Monoamine oxidase A and repressor R1 are involved in apoptotic signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (29):10923-10928.
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11 (2):85-97.

- Pedersen BK. 2009. Edward F. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. *J Appl Physiol* (1985), 107 (4):1006-1014.
- Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. 2000. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*, 80 (3):1055-1081.
- Pedersen BK, Steensberg A. 2002. Exercise and hypoxia: effects on leukocytes and interleukin-6-shared mechanisms? *Med Sci Sports Exerc*, 34 (12):2004-2013.
- Pedersen BK, Febbraio MA. 2008. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*, 88 (4):1379-1406.
- Pedersen BK, Bruunsgaard H, Ostrowski K, Krabbe K, Hansen H, Krzywkowski K, Toft A, Sondergaard SR, Petersen EW, Ibfelt T, Schjerling P. 2000. Cytokines in aging and exercise. *Int J Sports Med*, 21 Suppl 1:S4-9.
- Peppler WT, Anderson ZG, Sutton CD, Rector RS, Wright DC. 2016. Voluntary wheel running attenuates lipopolysaccharide-induced liver inflammation in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 310 (10):R934-942.
- Peppler WT, Anderson ZG, MacRae LM, MacPherson REK, Wright DC. 2017. Habitual physical activity protects against lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse adipose tissue. *Adipocyte*, 6 (1):1-11.
- Perl TM, Dvorak L, Hwang T, Wenzel RP. 1995. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. *JAMA*, 274 (4):338-345.
- Petersen AM, Pedersen BK. 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (1985), 98 (4):1154-1162.
- Peyssonnaud C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. 2007. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol*, 178 (12):7516-7519.
- Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson RS. 2005. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest*, 115 (7):1806-1815.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, Bergmann M, Schulze MB, Overvad K, van der Schouw YT, Spencer E, Moons KG, Tjonneland A, Halkjaer J, Jensen MK, Stegger J, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Chajes V, Linseisen J, Kaaks R, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Bamia C, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, May AM, Bueno-de-Mesquita HB, van Duynhoven FJ, Hallmans G, Weinehall L, Manjer J, Hedblad B, Lund E, Agudo A, Arriola L, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quiros JR, Key T, Bingham S, Khaw KT, Boffetta P, Jenab M, Ferrari P, Riboli E. 2008. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med*, 359 (20):2105-2120.
- Powers SK, Jackson MJ. 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 88 (4):1243-1276.

- Prescott HC, Chang VW, O'Brien JM, Jr., Langa KM, Iwashyna TJ. 2014. Obesity and 1-year outcomes in older Americans with severe sepsis. *Crit Care Med*, 42 (8):1766-1774.
- Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. 2015. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones*, 20 (6):885-892.
- Radons J, Multhoff G. 2005. Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. *Exerc Immunol Rev*, 11:17-33.
- Ratiu C, Utu D, Petrus A, Norbert P, Olariu S, Duicu O, Sturza A, Muntean DM. 2018. Monoamine oxidase inhibition improves vascular function and reduces oxidative stress in rats with lipopolysaccharide-induced inflammation. *Gen Physiol Biophys*, 37 (6):687-694.
- Recknagel P, Gonnert FA, Halilbasic E, Gajda M, Jbeily N, Lupp A, Rubio I, Claus RA, Kortgen A, Trauner M, Singer M, Bauer M. 2013. Mechanisms and functional consequences of liver failure substantially differ between endotoxaemia and faecal peritonitis in rats. *Liver Int*, 33 (2):283-293.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, Kern W, Kreymann G, Kruger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stuber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T, German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care M, German Sepsis S. 2010. [Prevention, diagnosis, treatment, and follow-up care of sepsis. First revision of the S2k Guidelines of the German Sepsis Society (DSG) and the German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care Medicine (DIVI)]. *Anaesthesist*, 59 (4):347-370.
- Remick DG. 2007. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*, 170 (5):1435-1444.
- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*, 13 (2):110-116.
- Rice TW, Bernard GR. 2005. Therapeutic intervention and targets for sepsis. *Annu Rev Med*, 56:225-248.
- Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. 2008. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature*, 453 (7196):807-811.
- Rocha M, Herance R, Rovira S, Hernandez-Mijares A, Victor VM. 2012. Mitochondrial dysfunction and antioxidant therapy in sepsis. *Infect Disord Drug Targets*, 12 (2):161-178.
- Rowsey PJ, Metzger BL, Carlson J, Gordon CJ. 2009. Long-term exercise training selectively alters serum cytokines involved in fever. *Biol Res Nurs*, 10 (4):374-380.

- Rudiger A, Stotz M, Singer M. 2008. Cellular processes in sepsis. *Swiss Med Wkly*, 138 (43-44):629-634.
- Sabat R. 2010. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21 (5):315-324.
- Sakr Y, Madl C, Filipescu D, Moreno R, Groeneveld J, Artigas A, Reinhart K, Vincent JL. 2008. Obesity is associated with increased morbidity but not mortality in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 34 (11):1999-2009.
- Sakurai T, Izawa T, Kizaki T, Ogasawara JE, Shirato K, Imaizumi K, Takahashi K, Ishida H, Ohno H. 2009. Exercise training decreases expression of inflammation-related adipokines through reduction of oxidative stress in rat white adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 379 (2):605-609.
- Santos RV, Viana VA, Boscolo RA, Marques VG, Santana MG, Lira FS, Tufik S, de Mello MT. 2012. Moderate exercise training modulates cytokine profile and sleep in elderly people. *Cytokine*, 60 (3):731-735.
- Scharrig E, Carestia A, Ferrer MF, Cedola M, Pretre G, Drut R, Picardeau M, Schattner M, Gomez RM. 2015. Neutrophil Extracellular Traps are Involved in the Innate Immune Response to Infection with *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9 (7):e0003927.
- Schedlowski M, Schmidt RE. 1996. [Stress and the immune system]. *Naturwissenschaften*, 83 (5):214-220.
- Scheele C, Nielsen S, Pedersen BK. 2009. ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. *Trends Endocrinol Metab*, 20 (3):95-99.
- Schienkiewitz A, Mensink G, Kuhnert R, Lange C. 2017. Overweight and obesity among adults in Germany Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung.
- Schlegel N, Flemming S, Meir M, Germer CT. 2014. [Is a different view on the pathophysiology of sepsis the key for novel therapeutic options?]. *Chirurg*, 85 (8):714-719.
- Schmid A, Burchardi H, Clouth J, Schneider H. 2002. Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *Eur J Health Econ*, 3 (2):77-82.
- Schmidt K, Gensichen J, Fleischmann-Struzek C, Bahr V, Pausch C, Sakr Y, Reinhart K, Vollmar HC, Thiel P, Scherag A, Gantner J, Brunkhorst FM. 2020. Langzeitüberleben nach Sepsis. *Dtsch Arztebl International*, 117 (46):775-782.
- Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. 2013. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets; An Updated View. *Mediators Inflamm*, 2013:16.
- Schultz A, Mendonca LS, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. 2012. Swimming training beneficial effects in a mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Toxicol Pathol*, 64 (4):273-282.

- Secor D, Li F, Ellis CG, Sharpe MD, Gross PL, Wilson JX, Tymi K. 2010. Impaired microvascular perfusion in sepsis requires activated coagulation and P-selectin-mediated platelet adhesion in capillaries. *Intensive Care Med*, 36 (11):1928-1934.
- Seemann S, Zohles F, Lupp A. 2017. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *J Biomed Sci*, 24 (1):60.
- Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, Lopez CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG, Inflammation, Host Response to Injury LSCRP. 2013. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (9):3507-3512.
- Sharma K. 2016. Obesity and Diabetic Kidney Disease: Role of Oxidant Stress and Redox Balance. *Antioxid Redox Signal*, 25 (4):208-216.
- Shephard RJ, Johnson N. 2015. Effects of physical activity upon the liver. *Eur J Appl Physiol*, 115 (1):1-46.
- Shi DW, Zhang J, Jiang HN, Tong CY, Gu GR, Ji Y, Summah H, Qu JM. 2011. LPS pretreatment ameliorates multiple organ injuries and improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis. *Inflamm Res*, 60 (9):841-849.
- Shi Y, Liu T, Nieman DC, Cui Y, Li F, Yang L, Shi H, Chen P. 2020. Aerobic Exercise Attenuates Acute Lung Injury Through NET Inhibition. *Front Immunol*, 11:409.
- Shimaoka M, Park EJ. 2008. Advances in understanding sepsis. *Eur J Anaesthesiol Suppl*, 42:146-153.
- Siddiq A, Ayoub IA, Chavez JC, Aminova L, Shah S, LaManna JC, Patton SM, Connor JR, Cherny RA, Volitakis I, Bush AI, Langsetmo I, Seeley T, Gunzler V, Ratan RR. 2005. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase inhibition. A target for neuroprotection in the central nervous system. *J Biol Chem*, 280 (50):41732-41743.
- Sim YJ, Yu S, Yoon KJ, Loiacono CM, Kohut ML. 2009. Chronic exercise reduces illness severity, decreases viral load, and results in greater anti-inflammatory effects than acute exercise during influenza infection. *J Infect Dis*, 200 (9):1434-1442.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith 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*, 315 (8):801-810.
- Sloan RP, Shapiro PA, Demeersman RE, McKinley PS, Tracey KJ, Slavov I, Fang Y, Flood PD. 2007. Aerobic exercise attenuates inducible TNF production in humans. *J Appl Physiol* (1985), 103 (3):1007-1011.

- Sossdorf M, Fischer J, Meyer S, Dahlke K, Wissuwa B, Seidel C, Schrepper A, Bockmeyer CL, Lupp A, Neugebauer S, Schmerler D, Rodel J, Claus RA, Otto GP. 2013. Physical exercise induces specific adaptations resulting in reduced organ injury and mortality during severe polymicrobial sepsis. *Crit Care Med*, 41 (10):e246-255.
- Strandberg L, Verdrengh M, Enge M, Andersson N, Amu S, Onnheim K, Benrick A, Brisslert M, Bylund J, Bokarewa M, Nilsson S, Jansson JO. 2009. Mice chronically fed high-fat diet have increased mortality and disturbed immune response in sepsis. *PLoS One*, 4 (10):e7605.
- Straznicky NE, Lambert EA, Grima MT, Eikelis N, Nestel PJ, Dawood T, Schlaich MP, Masuo K, Chopra R, Sari CI, Dixon JB, Tilbrook AJ, Lambert GW. 2012. The effects of dietary weight loss with or without exercise training on liver enzymes in obese metabolic syndrome subjects. *Diabetes Obes Metab*, 14 (2):139-148.
- Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. 2017. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14 (1):55-66.
- Sturza A, Popoiu CM, Ionica M, Duicu OM, Olariu S, Muntean DM, Boia ES. 2019. Monoamine Oxidase-Related Vascular Oxidative Stress in Diseases Associated with Inflammatory Burden. *Oxid Med Cell Longev*, 2019:8954201.
- Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, Sugawara K. 2002. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Cytokine kinetics. Exerc Immunol Rev*, 8:6-48.
- Takasu O, Gaut JP, Watanabe E, To K, Fagley RE, Sato B, Jarman S, Efimov IR, Janks DL, Srivastava A, Bhayani SB, Drewry A, Swanson PE, Hotchkiss RS. 2013. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 187 (5):509-517.
- Thiel M, Caldwell CC, Kreth S, Kuboki S, Chen P, Smith P, Ohta A, Lentsch AB, Lukashev D, Sitkovsky MV. 2007. Targeted deletion of HIF-1alpha gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival. *PLoS One*, 2 (9):e853.
- Timmerman KL, Flynn MG, Coen PM, Markofski MM, Pence BD. 2008. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol*, 84 (5):1271-1278.
- Torio CM, Andrews RM. 2013. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief #160. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. Rockville (MD).
- Trauner M, Fickert P, Stauber R. 2003. Sepsis und Leber. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 40 (6):475-483.
- Troscid M, Lappegard KT, Claudi T, Damas JK, Morkrid L, Brendberg R, Mollnes TE. 2004. Exercise reduces plasma levels of the chemokines MCP-1 and IL-8 in subjects with the metabolic syndrome. *Eur Heart J*, 25 (4):349-355.

- Tymk K, Swarbrick S, Pape C, Secor D, Koropatnick J, Feng Q, Veldhuizen RAW, Gill SE. 2017. Voluntary running exercise protects against sepsis-induced early inflammatory and pro-coagulant responses in aged mice. *Crit Care*, 21 (1):210.
- Vanderhaeghen T, Vandewalle J, Libert C. 2020. Hypoxia-inducible factors in metabolic reprogramming during sepsis. *FEBS J*, 287 (8):1478-1495.
- Venkata C, Kashyap R, Farmer JC, Afessa B. 2013. Thrombocytopenia in adult patients with sepsis: incidence, risk factors, and its association with clinical outcome. *J Intensive Care*, 1 (1):9.
- Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, Woods JA. 2009. Effects of diet and exercise on metabolic disturbances in high-fat diet-fed mice. *Cytokine*, 46 (3):339-345.
- Vollmar B. 2011. [Pathophysiological basis of surgery-linked sepsis]. *Chirurg*, 82 (3):199-207.
- Wachstein J, Tischer S, Figueiredo C, Limbourg A, Falk C, Immenschuh S, Blasczyk R, Eiz-Vesper B. 2012. HSP70 enhances immunosuppressive function of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) T regulatory cells and cytotoxicity in CD4(+)CD25(-) T cells. *PLoS One*, 7 (12):e51747.
- Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. 1996. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun*, 64 (11):4733-4738.
- Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, Sobolewski A, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N, Chilvers ER. 2005. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med*, 201 (1):105-115.
- Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P. 2011. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 17:6-63.
- Wang HE, Shapiro NI, Griffin R, Safford MM, Judd S, Howard G. 2012a. Chronic medical conditions and risk of sepsis. *PLoS One*, 7 (10):e48307.
- Wang J, Song H, Tang X, Yang Y, Vieira VJ, Niu Y, Ma Y. 2012b. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sports*, 22 (5):643-652.
- Wang Z, Zhu Q, Li PL, Dhaduk R, Zhang F, Gehr TW, Li N. 2014. Silencing of hypoxia-inducible factor-1alpha gene attenuates chronic ischemic renal injury in two-kidney, one-clip rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306 (10):F1236-1242.
- Warnberg J, Cunningham K, Romeo J, Marcos A. 2010. Physical activity, exercise and low-grade systemic inflammation. *Proc Nutr Soc*, 69 (3):400-406.
- Wasinski F, Gregnani MF, Ornellas FH, Bacurau AV, Camara NO, Araujo RC, Bacurau RF. 2014. Lymphocyte glucose and glutamine metabolism as targets of the

anti-inflammatory and immunomodulatory effects of exercise. *Mediators Inflamm*, 2014:326803.

Weijenberg MP, Feskens EJ, Kromhout D. 1996. White blood cell count and the risk of coronary heart disease and all-cause mortality in elderly men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16 (4):499-503.

Wen CP, Wai JP, Tsai MK, Yang YC, Cheng TY, Lee MC, Chan HT, Tsao CK, Tsai SP, Wu X. 2011. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet*, 378 (9798):1244-1253.

Wheeler DS, Lahni PM, Denenberg AG, Poynter SE, Wong HR, Cook JA, Zingarelli B. 2008. Induction of endotoxin tolerance enhances bacterial clearance and survival in murine polymicrobial sepsis. *Shock*, 30 (3):267-273.

Williams PT. 2013. Inadequate exercise as a risk factor for sepsis mortality. *PLoS One*, 8 (12):e79344.

Yadav A, Saini V, Arora S. 2010. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta*, 411 (21-22):1570-1579.

Yagupsky P, Nolte FS. 1990. Quantitative aspects of septicemia. *Clin Microbiol Rev*, 3 (3):269-279.

Yan J, Li S, Li S. 2014. The role of the liver in sepsis. *Int Rev Immunol*, 33 (6):498-510.

Yang S, Chung CS, Ayala A, Chaudry IH, Wang P. 2002. Differential alterations in cardiovascular responses during the progression of polymicrobial sepsis in the mouse. *Shock*, 17 (1):55-60.

Yazdani HO, Kaltenmeier C, Morder K, Moon J, Traczek M, Loughran P, Zamora R, Vodovotz Y, Li F, Wang JH, Geller DA, Simmons RL, Tohme S. 2020. Exercise training decreases hepatic injury via changes in immune response to liver ischemia/reperfusion in mice. *Hepatology*.

Yeh CH, Cho W, So EC, Chu CC, Lin MC, Wang JJ, Hsing CH. 2011. Propofol inhibits lipopolysaccharide-induced lung epithelial cell injury by reducing hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression. *Br J Anaesth*, 106 (4):590-599.

Yeh SH, Chuang H, Lin LW, Hsiao CY, Eng HL. 2006. Regular tai chi chuan exercise enhances functional mobility and CD4CD25 regulatory T cells. *Br J Sports Med*, 40 (3):239-243.

Yoshida K, Kawamura T, Xu HL, Ji L, Mori N, Kohzuki M. 2003. Effects of exercise training on glomerular structure in fructose-fed spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, 26 (11):907-914.

You T, Arsenis NC, Disanzo BL, Lamonte MJ. 2013. Effects of exercise training on chronic inflammation in obesity : current evidence and potential mechanisms. *Sports Med*, 43 (4):243-256.



Zarbock A, Gomez H, Kellum JA. 2014. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care*, 20 (6):588-595.

Zepeda AB, Pessoa A, Jr., Castillo RL, Figueroa CA, Pulgar VM, Farias JG. 2013. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochem Funct*, 31 (6):451-459.

Zhang KR, Liu HT, Zhang HF, Zhang QJ, Li QX, Yu QJ, Guo WY, Wang HC, Gao F. 2007. Long-term aerobic exercise protects the heart against ischemia/reperfusion injury via PI3 kinase-dependent and Akt-mediated mechanism. *Apoptosis*, 12 (9):1579-1588.

Zhu T, Liao X, Feng T, Wu Q, Zhang J, Cao X, Li H. 2017. Plasma Monocyte Chemoattractant Protein 1 as a Predictive Marker for Sepsis Prognosis: A Prospective Cohort Study. *Tohoku J Exp Med*, 241 (2):139-147.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung des unspezifischen Immunsystems.....	9
Abbildung 2: Zytokinausschüttung bei infek- und trainingsassoziiertem SIRS.....	11
Abbildung 3: Verschiedene Möglichkeiten des Verlaufs der Immunreaktion einer Sepsis.....	13
Abbildung 4: Potentielle Effekte von physischer Aktivität auf den inflammatorischen Status .....	22
Abbildung 5: Veränderungen des Hämostasesystems während einer Sepsis.....	27
Abbildung 6: Studiendesign .....	44
Abbildung 7: Formel zur Berechnung der qRT-PCR-Effizienz eines Primers .....	54
Abbildung 8: Formel zur Berechnung Bestimmung des relativen Expressions-Quotienten.....	55
Abbildung 9: Schematischer Aufbau des Westernblots .....	59
Abbildung 10: Kaplan-Maier-Überlebensanalyse.....	67
Abbildung 11: Clinical Severity Score.....	68
Abbildung 12: Leukozyten- und Thrombozytenkonzentrationen .....	70
Abbildung 13: Zytokinkonzentrationen.....	72
Abbildung 14: Bakterielle Keimlast in Leber, Niere, Lunge und Blut.....	74
Abbildung 15: Plasmakonzentrationen von Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Aspartat-Aminotransferase (ASAT) .....	76
Abbildung 16: Leber einer gesunden Maus .....	78
Abbildung 17: Leber 6 Stunden nach Sepsisinduktion .....	79
Abbildung 18: Leber 24 Stunden nach Sepsisinduktion .....	80
Abbildung 19: Blut-Harnstoff-Stickstoff und Kreatinin .....	82
Abbildung 20: Tubulusschaden-Score.....	84
Abbildung 21: Tubulusepithel der Niere.....	85
Abbildung 22: Genexpression von HSP70, MAO-A, Hif-1 $\alpha$ in der Niere.....	87
Abbildung 23: relative Proteinmenge und Westernblot-Membran von HSP70, MAO-A und Hif-1 $\alpha$ .....	90
Abbildung 24: Übersicht der Ergebnisse.....	92

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosekriterien eines SIRS - systemisches inflammatorisches Response Syndrom .....	3
Tabelle 2: Kits und Inhalt .....	36
Tabelle 3: Lösungen/Puffer und Zusammensetzung .....	38
Tabelle 4: Trainingsprogramm .....	43
Tabelle 5: Zusammensetzung Maininkubationsmix für die Reverse Transkription ...	49
Tabelle 6: Primer-Sequenzen real-time-PCR .....	51
Tabelle 7: Ablauf der real-time-PCR mit Darstellung der Zyklusschritte und -anzahl	52
Tabelle 8: Übersicht zu primären und sekundären Antikörpern für die Immundetektion .....	60

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Fertigstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Maik Soßdorf für die Mitentwicklung des Promotionsthemas sowie die gute Betreuung im Verlauf der experimentellen Versuche und der Anfertigung des schriftlichen Teils der Arbeit. Als Ansprechpartner war er immer motivierend und stets verfügbar. Dank gilt darüber hinaus Dr. Gordon Otto, der mir erst den Zugang zu diesem interessanten Thema ermöglichte.

Prof. Dr. Ralf A. Claus möchte ich meinen herzlichen Dank für die Betreuung vor allem während der Anfertigung der Niederschrift meiner Promotion aussprechen.

Dank gilt auch Dr. med. Bernhard Theis und PD Dr. med. Clemens L. Bockmeyer, ohne die eine histologische Auswertung in dieser Form und Qualität nicht möglich gewesen wäre.

Mein herzlicher Dank gebührt außerdem allen Mitarbeitern der AG Experimentelle Anästhesie für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Ein besonderer Dank gilt hier Brigitte Specht, Esther Fröhlich, Edith Walther, Barbara Schmidt und Danny Himsel für die kompetente Vermittlung experimenteller Grundlagen und die gute kollegiale Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch beim Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), welches mir die Durchführung dieser Arbeit durch die Gewährung eines Promotionsstipendiums überhaupt erst ermöglicht hat.

Ein liebevolles Dankeschön gebührt meinem Ehemann Alexander Pflug, der mir stets emotional zur Seite stand und mich nicht nur motivierte, sondern auch fachlich unterstützte. Außerdem danke ich meiner Tochter Lara Pflug, die mir die Zeit schenkte, die Arbeit fertigzustellen.

Letztendlich möchte ich mich auch bei meiner Familie bedanken, die mich immer wieder liebevoll an die Fertigstellung der Dissertation erinnerte. Besonderer Dank gebührt Ina Kopp für die geleistete Unterstützung im Rahmen der Fertigstellung der Arbeit.

## 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:

- Prof Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Alexander Claus
- Dr. phil. Maik Soßdorf
- Dr. med. Bernhard Theis
- Priv.-Doz. Dr. med. Clemens L. Bockmeyer,

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.

Jena, 23.06.2021

Carolin Pflug

## Veröffentlichungen

### Publikation:

Sossdorf M, Fischer J, Meyer S, Dahlke K, Wissuwal B, Seidel C, Schrepper A, Bockmeyer C L, Lupp A, Neugebauer S, Schmerler D, Rödel J, Claus RA, Otto GP, 2013. Physical exercise induces specific adaptations resulting in reduced organ injury and mortality during severe polymicrobial sepsis. Crit Care Med, 41 (10):e246-255.