

Aus der  
Universitäts-Hautklinik Tübingen

Hochdosiertes Ascorbat zur Intervention bei Sepsis – eine  
in vitro Evaluation –

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Lauer, Annie Sophia Lina

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. B. Schittek

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Straub

Tag der Disputation: 14.08.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>13</b>
1.1 Sepsis.....	13
1.1.1 Definition der Sepsis.....	13
1.1.2 Vorhergehende Sepsis-Definitionen.....	15
1.1.3 Pathomechanismus der Sepsis.....	16
1.1.4 Risikofaktoren für die Entwicklung einer Sepsis.....	18
1.1.5 Krankheitsbild der Sepsis.....	19
1.1.6 Diagnose der Sepsis .....	19
1.1.7 Therapie .....	21
1.2 PBMCs .....	28
1.3 Zytokine.....	29
1.3.1 IL-1 $\beta$ .....	30
1.3.2 TNF.....	30
1.3.3 MCP-1 .....	32
1.3.4 IL-6 .....	32
1.3.5 IL-8 .....	33
1.3.6 IL-10 .....	33
1.3.7 IL-18 .....	33
1.3.8 IL-23.....	34
1.4 Ascorbat / Vitamin C.....	35
1.5 Ziel dieser Arbeit.....	37

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>39</b>
2.1	Chemikalien / Reagenzien.....	39
2.2	Verbrauchsmaterial .....	40
2.3	Geräte.....	41
2.4	Kit-Systeme .....	42
2.5	Primer .....	42
2.6	Nukleotide.....	43
2.7	Enzyme.....	43
2.8	Medikamente und Wirkstoffe .....	43
2.9	Zusammensetzung von Zellkulturmedien und Puffern .....	43
2.10	Software .....	44
2.11	Isolierung von PBMCs .....	45
2.12	Versuchsaufbau zur Testung verschiedener Pascorbin®- Konzentrationen bei LPS-Stimulierung.....	47
2.13	Versuchsaufbau zur Testung von Pascorbin® in Kombination mit ausgewählten Sepsis-Medikamenten unter LPS-Stimulierung 50	
2.14	Analyse von Zellzahl und Zellviabilität nach Behandlung...	53
2.15	Probengewinnung und -verwendung.....	53
2.16	Analyse von sezernierten Zytokinen.....	54
2.16.1	LEGENDplex™ .....	54
2.16.2	Durchflusszytometrie .....	57
2.17	Analyse der Expression ausgewählter Gene.....	59
2.17.1	RNA-Isolierung .....	59

2.17.2 cDNA-Synthese .....	60
2.17.3 Quantitative PCR.....	61
2.17.4 Statistische Analyse .....	62
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
3.1 Testung verschiedener Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulierung (VR I) .....	64
3.1.1 Viabilitätsanalyse vor der Behandlung der PBMCs mit Pascorbin®.....	65
3.1.2 Viabilitätsanalyse nach der Behandlung der PBMCs mit Pascorbin®.....	67
3.1.3 Analyse der Zytokin-Sezernierung von PBMCs nach Behandlung mit Pascorbin® .....	70
3.1.4 Analyse der Genexpression von PBMCs nach Behandlung mit Pascorbin®.....	82
3.1.5 Schlussfolgerungen aus Versuchsreihe I .....	88
3.2 Testung von Pascorbin® in Kombination mit ausgewählten Sepsis-Medikamenten (VR II).....	89
3.2.1 Viabilitätsanalyse vor der Behandlung der PBMCs mit mehreren Wirkstoffen.....	90
3.2.2 Viabilitätsanalyse nach der Behandlung der PBMCs mit mehreren Wirkstoffen .....	92
3.2.3 Analyse der Zytokin-Sezernierung von PBMCs nach Behandlung mit mehreren Wirkstoffen .....	96
3.2.4 Analyse der Genexpression von PBMCs nach Behandlung mit mehreren Wirkstoffen .....	122
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>140</b>
4.1 Schlussfolgerungen .....	149

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>150</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>152</b>
<b>7</b>	<b>Erklärungen zum Eigenanteil .....</b>	<b>168</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>170</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>171</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien / Reagenzien .....	39
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	40
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Geräte .....	41
Tabelle 4: Verwendete Kit-Systeme.....	42
Tabelle 5: Verwendete Primer für die cDNA-Synthese.....	42
Tabelle 6: Verwendete Primer für die qPCR.....	42
Tabelle 7: Verwendete Nukleotide .....	43
Tabelle 8: Verwendete Enzyme .....	43
Tabelle 9: Verwendete Medikamente und Wirkstoffe .....	43
Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien / Puffer.....	43
Tabelle 11: Verwendete Software.....	44
Tabelle 12: Analysierte Zytokine des LEGENDplex™ "Human Inflammation Panel 1".....	54
Tabelle 13: Reaktionsschritte der cDNA-Synthese.....	60
Tabelle 14: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese pro Ansatz.....	61
Tabelle 15: Reaktionsansatz für qPCR.....	61
Tabelle 16: Reaktionsschritte der qPCR.....	62
Tabelle 17: Verwendete Signifikanzniveaus .....	62

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: SOFA-Score.....	14
Abbildung 2: SIRS-Kriterien .....	15
Abbildung 3: Angeborenes und erworbenes Immunsystem .....	17
Abbildung 4: Auftrennung der Zellschichten nach Zentrifugation des Vollblutes in Leukosep™ Röhren .....	46
Abbildung 5: Behandlungsgruppen Versuchsreihe I.....	48
Abbildung 6: Plattenlayout Versuchsreihe I .....	49
Abbildung 7: Behandlungsgruppen Versuchsreihe II.....	51
Abbildung 8: Plattenlayout Versuchsreihe II .....	52
Abbildung 9: Unterscheidung der Bead-Populationen anhand ihrer Größe.....	55
Abbildung 10: Unterscheidung der Beads anhand ihrer Fluoreszenzintensität	55
Abbildung 11: Funktionsweise des Multiplex-Assays LEGENDplex™ .....	56
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.....	57
Abbildung 13: Viabilität von PBMCs vor Behandlung (VR I).....	65
Abbildung 14: Viabilität von PBMCs vor Behandlung (nach Geschlecht, VR I)	66
Abbildung 15: Viabilität von PBMCs nach Behandlung (VR I).....	68
Abbildung 16: Viabilität von PBMCs nach Behandlung (nach Geschlecht, VR I) .....	69
Abbildung 17: Verhältnis der Konzentration von 13 sezernierten Zytokinen (VR I) .....	71
Abbildung 18: Konzentration von sezerniertem MCP-1 (VR I).....	73
Abbildung 19: Konzentration von sezerniertem IL-10 (VR I).....	74
Abbildung 20: Konzentration von sezerniertem IL-23 (VR I).....	76
Abbildung 21: Konzentration von sezernierten Zytokinen (VR I, Teil 1) .....	77
Abbildung 22: Konzentration von sezernierten Zytokinen (VR I, Teil 2) .....	78
Abbildung 23: Konzentration von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR I, Teil 1).....	79
Abbildung 24: Konzentration von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR I, Teil 2).....	80
Abbildung 25: Expression von <i>ATF 3</i> (VR I) .....	83

Abbildung 26: Expression von <i>IL-6</i> (VR I).....	84
Abbildung 27: Expression von <i>TNF-<math>\alpha</math></i> (VR I).....	85
Abbildung 28: Expression verschiedener Gene nach Geschlecht (VR I).....	86
Abbildung 29: Viabilität von PBMCs vor Behandlung (VR II).....	90
Abbildung 30: Viabilität von PBMCs vor Behandlung (nach Geschlecht, VR II)	91
Abbildung 31: Viabilität von PBMCs nach Behandlung (VR I).....	93
Abbildung 32: Viabilität von PBMCs nach Behandlung (nach Geschlecht, VR I) .....	94
Abbildung 33: Verhältnis der Konzentration von 13 sezernierten Zytokinen (VR II) .....	97
Abbildung 34: Analyse von sezerniertem <i>IL-1<math>\beta</math></i> (VR II).....	99
Abbildung 35: Analyse von sezerniertem <i>TNF-<math>\alpha</math></i> (VR II).....	101
Abbildung 36: Analyse von sezerniertem <i>MCP-1</i> (VR II).....	103
Abbildung 37: Analyse von sezerniertem <i>IL-6</i> (VR II).....	105
Abbildung 38: Analyse von sezerniertem <i>IL-8</i> (VR II).....	107
Abbildung 39: Analyse von sezerniertem <i>IL-10</i> (VR II).....	109
Abbildung 40: Analyse von sezerniertem <i>IL-18</i> (VR II).....	111
Abbildung 41: Analyse von sezerniertem <i>IL-23</i> (VR II).....	113
Abbildung 42: Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR II, Teil 1).....	116
Abbildung 43: Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR II, Teil 2).....	117
Abbildung 44: Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR II, Teil 3).....	118
Abbildung 45: Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR II, Teil 4).....	120
Abbildung 46: Expression von <i>ATF 3</i> (VR II).....	123
Abbildung 47: Expression von <i>IL-6</i> (VR II).....	125
Abbildung 48: Expression von <i>TNF-<math>\alpha</math></i> (VR II).....	127
Abbildung 49: Expression von <i>MCP-1</i> (VR II).....	129
Abbildung 50: Expression von <i>IL-23</i> (VR II).....	131

Abbildung 51: Expression verschiedener Gene nach Geschlecht (VR II, Teil 1)	
.....	134
Abbildung 52: Expression verschiedener Gene nach Geschlecht (VR II, Teil 2)	
.....	136
Abbildung 53: Expression verschiedener Gene nach Geschlecht (VR II, Teil 3)	
.....	138

## Abkürzungsverzeichnis

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>Ab</b>	Antikörper (engl. antibody)
<b>ACTB</b>	β-Actin
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>ARDS</b>	akutes Atemnotsyndrom (engl. acute respiratory distress syndrome)
<b>Asc.</b>	Ascorbat bzw. Pascorbin®
<b>ATF3</b>	engl. activating transcription factor 3
<b>B1</b>	Vitamin B1
<b>CCL</b>	CC-Motiv-Chemokin-Ligand
<b>cDNA</b>	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<b>CI</b>	Konfidenzintervall
<b>cmH<sub>2</sub>O</b>	cm Wassersäule
<b>COVID-19</b>	Coronavirus-Krankheit-2019 (engl. coronavirus disease 2019)
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>d</b>	Tag
<b>dl</b>	Deziliter
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
<b>dNTPs</b>	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
<b>F</b>	Frau / engl. female
<b>Fa.</b>	Firma
<b>FBS</b>	Fetales Kälberserum (engl. fetal bovine serum)
<b>fd</b>	engl. forward
<b>FiO<sub>2</sub></b>	inspiratorische Sauerstofffraktion
<b>FL</b>	Fluoreszenzkanal
<b>FL4-H</b>	Fluoreszenzkanal 4-Histogramm
<b>FSC-H</b>	Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter height)

<b>g</b>	G-Zahl der Zentrifuge
<b>g</b>	Gramm
<b>G-CSF</b>	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (engl. granulocyte-colony stimulating factor)
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>HC</b>	Hydrocortison
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HVT</b>	Hydrocortison + Vitamin C + Thiamin
<b>IF</b>	engl. impact factor
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>ISSN</b>	engl. International Standard Serial Number
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>M</b>	Mann / engl. male
<b>MAP</b>	Mittlerer arterieller Blutdruck (engl. mean arterial pressure)
<b>MCP</b>	engl. monocyte chemoattractant protein
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm<sup>3</sup></b>	Kubikmillimeter
<b>mmHg</b>	Millimeter Quecksilbersäule
<b>MTA</b>	Medizinisch Technische/r Assistent/in
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nm</b>	Nanometer
<b>OR</b>	Odds Ratio
<b>P</b>	Pascorbin <sup>®</sup>
<b>p</b>	p-Wert bzw. Signifikanzwert

<b>PaO<sub>2</sub></b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>Pasc.</b>	Pascorbin®
<b>PBMCs</b>	periphere Blutmonozyten (engl. peripheral blood mononuclear cells)
<b>PBS</b>	engl. phosphate buffered saline
<b>PCT</b>	Procalcitonin
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>pg</b>	Pikogramm
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerasekettenreaktion (engl. quantitative polymerase chain reaction)
<b>RASS</b>	engl. Richmond Agitation Sedation Scale
<b>re</b>	engl. reverse
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute; engl. revolutions per minute
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>s</b>	Sekunde
<b>SARS</b>	Schweres akutes Atemwegssyndrom (engl. severe acute respiratory syndrome)
<b>SIRS</b>	engl. systemic inflammatory response syndrome
<b>SMD</b>	Standardisierte Mittelwertdifferenz
<b>SOFA</b>	engl. sepsis-related organ failure assessment
<b>SSC-H</b>	Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter height)
<b>TBP</b>	TATA-Box-Bindungsprotein
<b>TGF</b>	engl. transforming growth factor
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>Vit. C</b>	Vitamin C bzw. Pascorbin®
<b>VR</b>	Versuchsreihe
<b>w/o</b>	Ohne; engl. without
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

<b><math>\mu\text{l}</math></b>	Mikroliter
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	Mikromolar
<b><math>\mu\text{mol}</math></b>	Mikromol

# 1 Einleitung

Der septische Schock ist nach wie vor eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität bei schwerkranken Patienten. Obwohl viele Nahrungsergänzungsmittel bisher erfolglos getestet wurden, werden Vitamine weiterhin als therapeutische Option bei septischen Patienten erforscht. Insbesondere Vitamin C-haltige Präparate als ergänzende Therapie bei Sepsis haben viel Aufmerksamkeit erhalten (Kuhn, Meissner, Mayes, & Bartels, 2018). Vor diesem Hintergrund steht der Einsatz von Ascorbat / Vitamin C bei Sepsis im Mittelpunkt dieser Promotionsarbeit.

Während der Arbeit an dieser Dissertation wurden einige Daten bereits im Rahmen einer Publikation in einer renommierten wissenschaftlichen Zeitschrift (NUTRIENTS; Journal ISSN: 2072-6643; IF 6.706) veröffentlicht (Lauer et al., 2021). In dieser wissenschaftlichen Originalarbeit sind wichtige Ergebnisse dieser Dissertation enthalten. Mehrere wörtliche Zitate, die sich auf diese Veröffentlichungen beziehen, sind in dieser Arbeit sowohl mit "Anführungszeichen" als auch in *kursiver Schrift* mit der entsprechenden Referenz (Lauer et al., 2021) angegeben.

Im Folgenden soll ein Überblick zum Krankheitsbild der Sepsis gegeben werden. Dabei wird die Rolle, die Zytokine spielen, beleuchtet. Darüber hinaus wird eine kurze Übersicht über die Eigenschaften und therapeutischen Möglichkeiten von Ascorbat / Vitamin C gegeben. Abschließend werden die grundlegenden Fragen aufgeworfen, die diese Arbeit beantworten soll.

## 1.1 Sepsis

### 1.1.1 Definition der Sepsis

Seit der Dritten Internationalen Konsensus-Definition von 2016 wird eine Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion definiert, die durch eine fehlregulierte Immunreaktion in Folge einer Infektion ausgelöst wird (Singer, M. et al., 2016).

Durch diese ausgeprägte Immunreaktion wird auch nicht infiziertes Gewebe geschädigt und führt dadurch zum Schock, zu multiplem Organversagen und schließlich zum Tod (Czura, 2011).

Zur Beurteilung dieser speziellen Form des Organversagens wird der „*sepsis-related organ failure assessment (SOFA) Score*“ (siehe Abbildung 1) angewendet (Singer, M. et al., 2016), der die Funktionen von Lunge, Leber, Niere, Herz-/Kreislaufsystem, ZNS und Blutgerinnungssystem umfasst.

Bei bisher gesunden Patienten liegt demzufolge ein Sepsis-bedingtes Organversagen *per definitionem* immer dann vor, wenn im Rahmen einer Infektion die Ausgangspunktzahl von 0 vor der Erkrankung auf mindestens 2 Punkte unter der Erkrankung ansteigt; bei bereits vorerkrankten Patienten ist dagegen eine Verschlechterung des Scores um mindestens 2 Punkte erforderlich. Der SOFA Score ist von großer klinischer Bedeutung, da er direkt mit der Mortalität einer Sepsis korreliert (Vincent et al., 1996).

Organsystem	Score-Punkte			
	1	2	3	4
<b>Lunge</b> PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> [mmHg]	< 400	< 300	< 200 mit maschineller Beatmung	< 100
<b>Gerinnung</b> Thrombozyten x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	< 150	< 100	< 50	< 20
<b>Leber</b> Bilirubin [mg/dl] Bilirubin [µmol/l]	1,2 – 1,9 20 – 32	2,0 – 5,9 33 – 101	6,0 – 11,9 102 – 204	> 12,0 > 204
<b>Herz/Kreislauf</b>	MAP < 70 mmHg	Dopamin < 5, o. Dobutamin,	Dopamin 5,1 - 15 o. Adrenalin ≤ 0,1 o. Noradrenalin ≤ 0,1	Dopamin > 15 o. Adrenalin > 0,1 o. Noradrenalin > 0,1
<b>ZNS</b> Glasgow Coma Scale	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
<b>Niere</b> Kreatinin [mg/dl] Kreatinin [µmol/l] Diurese [ml/d]	1,2 – 1,9 110 – 170	2,0 – 3,4 171 – 299	3,5 – 4,9 300 – 400 o. < 500	> 5,0 > 440 o. > 200

**Abbildung 1: SOFA-Score**

Der „*sepsis-related organ failure assessment (SOFA) Score*“ dient der Beurteilung, ob ein Sepsis-bedingtes Organversagen vorliegt, welches ab dem Vorhandensein von mindestens 2 Punkten der Fall ist. Bei bereits vorerkrankten Patienten liegt ein Sepsis-bedingtes Organversagen ab einer Verschlechterung des Scores um mindestens 2 Punkte vor. FiO<sub>2</sub> = inspiratorische Sauerstofffraktion; PaO<sub>2</sub> = Sauerstoffpartialdruck; MAP = mittlerer arterieller Blutdruck (modifiziert nach: Vincent, J.L. et al., 1996).

### 1.1.2 Vorhergehende Sepsis-Definitionen

Mit der Sepsis-Definition von 2016 wurde die vorherige Definition seitens der amerikanischen Konsensus Konferenz von 1992 ersetzt, in der bereits verschiedene Schweregrade einer Sepsis definiert worden waren.

Eine generalisierte fehlregulierte Immunreaktion wurde unabhängig von deren Ursache als „*systemic inflammatory response syndrome*“ (SIRS) bezeichnet. Mögliche Ursachen eines SIRS können dabei neben einer Infektion beispielsweise auch eine nicht-infektiöse Entzündung eines Organs (z.B. Pankreatitis) oder ein Trauma sein (Bone et al., 1992).

Klinisch wird ein SIRS ab dem Vorhandensein von mindestens zwei der insgesamt vier SIRS-Kriterien diagnostiziert (siehe Abbildung 2). Diese SIRS-Kriterien umfassen die folgenden Körperfunktionen: Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz sowie Anzahl der weißen Blutkörperchen / Neutrophilen (Bone et al., 1992).

SIRS-Kriterien	
Fieber oder Hypothermie	$\geq 38\text{ °C}$ $\leq 36\text{ °C}$
Tachykardie	Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
Tachypnoe oder Hyperventilation	Atemfrequenz $\geq 20/\text{min}$ $\text{PaO}_2 \leq 33\text{ mmHg}$
Leukozytose oder Leukopenie oder Unreife Neutrophile im Diferentialblutbild	$> 12.000/\text{mm}^3$ $< 4.000/\text{mm}^3$ $\geq 10\%$

**Abbildung 2: SIRS-Kriterien**

Ein „*systemic inflammatory response syndrome*“ (SIRS) wird ab dem Vorhandensein von pathologischen Veränderungen von mindestens 2 der 4 SIRS-Kriterien (Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz sowie Anzahl der weißen Blutkörperchen / Neutrophilen) diagnostiziert.  $\text{PaO}_2$  = Sauerstoffpartialdruck (modifiziert nach: Bone et al., 1992).

Von Sepsis wird bei Bone et al. (1992) dagegen erst gesprochen, wenn eine Infektion eindeutig als die Ursache des SIRS identifiziert werden konnte.

Für den Fall des Vorliegens eines zusätzlichen Organversagens, einer Sepsis-induzierten Hypotension oder einer Hypoperfusion wurde der Begriff „schwere Sepsis“ eingeführt (Bone et al., 1992).

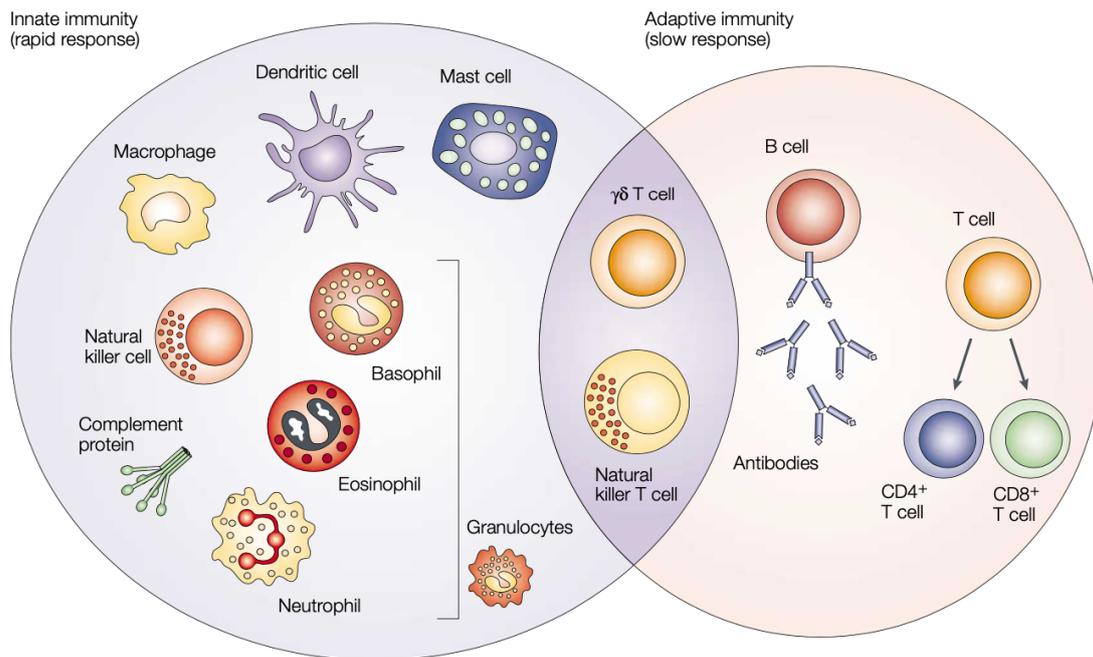
Von der Sepsis abzugrenzen sind schwerwiegende Infektionen durch Bakterien, Viren oder Pilze, bei denen zunächst („noch“) keine fehlregulierte Immunreaktion vorliegt. Patienten mit entsprechend schweren Infektionen sind allerdings gefährdet, im weiteren Verlauf eine Sepsis zu entwickeln und sollten demnach engmaschig überwacht werden (Tisoncik et al., 2012).

### 1.1.3 Pathomechanismus der Sepsis

Durch eine Infektion werden im Körper viele verschiedene Mechanismen zur Bekämpfung von Erregern ausgelöst (siehe Abbildung 3). Solche Prozesse umfassen z.B. die Chemotaxis, die Phagozytose und die Abtötung von Erregern, beispielsweise mit Hilfe der Komplementkaskade (Parkin & Cohen, 2001).

Die verschiedenen immunologischen Prozesse müssen dabei beständig den aktuellen Gegebenheiten angepasst werden und beeinflussen sich darüber hinaus auch gegenseitig (Parkin & Cohen, 2001). Dabei herrscht ein sensibles Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und entzündungshemmenden Prozessen, deren Regulation und Vernetzung hochkomplex ist (Chousterman, Swirski & Weber, 2017).

Bei der Sepsis bleibt die Immunreaktion nicht auf den ursprünglichen Ort der Entzündung begrenzt, sondern kann sich unkontrolliert ausbreiten, über längere Zeiträume aufrecht erhalten bleiben und sich sogar immer weiter aufschaukeln und verstärken (Chousterman et al., 2017).



**Abbildung 3: Angeborenes und erworbenes Immunsystem**

Das Immunsystem besteht zum einen aus dem angeborenen Teil, der auf Infektionen schnell aber dafür unspezifisch (nicht-adaptiv) reagiert, also nicht an den jeweils vorliegenden Erreger angepasst ist. Zum anderen entwickelt der Mensch nach der Geburt das sog. erworbene Immunsystem, das Erreger ganz gezielt und spezifisch bekämpft (adaptiv), dazu aber mehr Zeit braucht, um eine spezifisch auf den jeweiligen Erreger ausgerichtete Immunantwort generieren zu können. Einige Zellen (sog. „Verbindungszellen“) üben Aufgaben in beiden Teilen des Immunsystems aus (Dranoff, 2004).

Die Pathogenese der Sepsis ist äußerst komplex und beinhaltet u.a. eine überschießende Entzündungsreaktion mit Freisetzung von massenhaft Zytokinen (sog. Zytokinsturm), eine Dysfunktion des Immunsystems, mitochondriale Schäden, Störungen der Endothelzellfunktion mit Kapillarleck, eine Gerinnungsaktivierung und andere pathophysiologische Prozesse, die schließlich zu Organdysfunktionen führen (Huang, Cai, & Su, 2019).

Die Zusammensetzung des Zytokinsturms hängt vom auslösenden Erreger ab. Beispielsweise führt eine Infektion mit Schweres akutes Atemwegssyndrom (SARS)-CoV-1 hauptsächlich zur Freisetzung von Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, Interferon (IFN)- $\gamma$ , und MCP-1, während bei einer Coronavirus-Krankheit-2019

(COVID-19)-Erkrankung vor allem IL-2, IL-7, IL-10, Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) freigesetzt werden (X. D. Tang et al., 2021).

Warum die Regulierungsmechanismen des Körpers das Ausmaß der Immunreaktion bei einer Sepsis nicht durchgehend kontrollieren bzw. auf ein gewisses Maß begrenzen können, ist bisher noch unbekannt.

Diskutiert werden ein Einfluss der für die Infektion verantwortlichen Mikroorganismen (Pugin, 1996), deren Toxine (Tapper & Herwald, 2000), die Freisetzung von großen Mengen proinflammatorischer Zytokine (Chousterman et al., 2017), die Aktivierung des Komplementsystems (Karasu, Nilsson, Köhl, Lambris, & Huberlang, 2019) sowie genetische Faktoren (Frantz, Ertl, & Bauersachs, 2007).

### 1.1.4 Risikofaktoren für die Entwicklung einer Sepsis

Besonders gefährdet, eine Sepsis zu entwickeln, sind ältere Patienten (Martin, Mannino, & Moss, 2006), die so schwer erkrankt sind, dass eine intensivmedizinische Behandlung erforderlich ist (Vincent et al., 1995), oder solche Patienten, die aufgrund einer Bakteriämie (Jones & Lowes, 1996) oder einer ambulant erworbenen Pneumonie behandelt werden müssen (Dremsizov et al., 2006).

Patienten mit einem vorangegangenen Krankenhausaufenthalt, insbesondere bei Behandlung mit Antibiotika, haben in den folgenden 90 Tagen ein bis zu dreifach erhöhtes Risiko, eine Sepsis zu entwickeln (Prescott, Dickson, Rogers, Langa, & Iwashyna, 2015). Zusätzlich erhöhen eine bestehende Krebserkrankung (Williams et al., 2004), eine Immunsuppression, sowie Diabetes und Adipositas (Falagas & Kompoti, 2006) die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Sepsis.

### 1.1.5 Krankheitsbild der Sepsis

Das Krankheitsbild der Sepsis hängt stark von Art, Dynamik und Ausmaß der jeweils zugrundeliegenden Infektion ab. Zur Diagnose einer Sepsis tragen sowohl die Symptome einer Infektion als auch die Symptome der mit der Sepsis einhergehenden Organschädigungen sowie der klinische Gesamtzustand bei. Generelle Anzeichen einer Infektion sind beispielsweise eine Hyper- oder Hypothermie, Tachykardie, Hypotension, Tachypnoe, eine Leukozytose, ein erhöhtes C-reaktives Protein (CRP) oder ein erhöhtes Procalcitonin (PCT). Die Patienten weisen in der Regel einen deutlich reduzierten Allgemeinzustand auf.

Je nach Infektionsfokus kommen weitere für den jeweiligen Fokus charakteristische Symptome hinzu. So haben Patienten mit einer Pneumonie meist Dyspnoe und Husten, während Patienten mit einer Urosepsis häufig über Dysurie, Pollakisurie und Flankenschmerzen klagen.

Im weiteren Verlauf können sich Organschädigungen insbesondere in Blutgerinnungsstörungen, fehlender Darmaktivität (paralytischer Ileus), Kreislaufzentralisierung, Unruhe, Einschränkungen der Kognition und des Bewusstseins (Vigilanzminderung), Oligurie, Laktat-Anstieg sowie vielen weiteren organspezifischen Symptomen ausdrücken (Levy et al., 2003).

### 1.1.6 Diagnose der Sepsis

Neben der klinischen Beurteilung von Sepsis-Patienten (siehe Kapitel 1.1.5) und der Bestimmung des SOFA-Scores (siehe Kapitel 1.1.1) zur Identifikation von Sepsis-Patienten ist ein erfolgreicher Erregernachweis von großer Bedeutung für die optimale Behandlung von Sepsis-Patienten.

Daher sollte bei Patienten mit Verdacht auf Sepsis oder septischen Schock geeignetes Material für die mikrobiologische Diagnostik (einschließlich Blutkulturen) entnommen werden, bevor die antimikrobielle Therapie begonnen wird. Dabei darf es allerdings zu keiner wesentlichen Verzögerung in Bezug auf den Beginn der antimikrobiellen Therapie kommen (Brunkhorst et al., 2018).

Geeignete Materialien für die mikrobiologische Diagnostik sollten aus allen Lokalisationen abgenommen werden, die als potenzieller Fokus in Frage kommen. In diesem Sinne geeignete Probenmaterialien sind zum Beispiel Blutkulturen, Liquor, Urin, Wund- und Atemwegssekrete und andere Körperflüssigkeiten. Falls die Anamnese oder klinische Untersuchung eindeutig auf eine spezifische anatomische Lokalisation des Infektionsherdes hindeutet, sind Materialien von anderen Lokalisationen (mit Ausnahme der Blutkulturen) im Allgemeinen nicht sinnvoll und nicht notwendig (Brunkhorst et al., 2018).

Ein positiver Erregernachweis ist aber aus vielerlei Gründen lediglich bei 50 % aller getesteten Patienten erfolgreich; bei fehlendem Erregernachweis liegt damit definitionsgemäß eine kultur-negative Sepsis vor, in der lediglich kalkuliert antibiotisch behandelt werden kann (Gupta et al., 2016).

Bei manchen Patienten kann die Unterscheidung der Sepsis von nicht-infektiösen Entzündungsursachen schwierig sein. Momentan gibt es noch kein biochemisches Verfahren, das allein eine schnelle und zuverlässige Unterscheidung zwischen Sepsis und nicht-infektiösen Entzündungen ermöglicht. PCT ist derzeit der am meisten untersuchte Biomarker für diesen Zweck, wird aber ebenso wie das CRP und IL-6 auch nach verschiedenen nicht-infektiösen Entzündungsreaktionen freigesetzt (Bloos & Reinhart, 2014). Daher dient die Messung von PCT nach aktuellem Stand nicht der Diagnose einer Sepsis, sondern der Verlaufsbeurteilung.

Die klinische Erfahrung hat gezeigt, dass sich auch bei schwerstkranken Patienten eine Stabilisierung nicht allein durch supportive oder antimikrobielle Maßnahmen, sondern nur durch eine angemessene Fokuskontrolle erreichen lässt. Daher sollte schnell und gezielt nach einem sanierbaren Fokus, einschließlich Fremdmaterialien, gesucht werden und ggf. eine operative bzw. interventionelle Fokussanierung, wenn medizinisch sinnvoll, so schnell wie logistisch möglich erfolgen (Brunkhorst et al., 2018).

Dabei können bildgebende Verfahren (Röntgenuntersuchungen, Kernspintomografie, Sonografie) Hinweise auf die Lokalisation der Infektionsherde sowie komplikativer Verläufe (z.B. bei Vorliegen von Abszessen, ggf. auch einhergehend mit Einschmelzungen) geben (Rello, Valenzuela-Sánchez, Ruiz-Rodriguez, & Moyano, 2017).

### 1.1.7 Therapie

Die Therapie der Sepsis umfasst neben der kausalen Therapie (Therapie der Infektion) eine symptomorientierte Therapie sowie die Therapie von auftretenden Organschäden. Im Folgenden werden die kausale und die symptomatische Therapie nach dem Stand der aktuellen S3-Leitlinie „Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge“ von 2018 näher beschrieben.

#### 1.1.7.1 Kausale Therapie

Die Verabreichung einer geeigneten intravenösen antimikrobiellen Therapie sollte idealerweise innerhalb einer Stunde nach Diagnose begonnen werden. Optimalerweise wird eine empirische Breitspektrumtherapie eingesetzt, um alle wesentlichen Bakterien zu erfassen. Die häufigsten Pathogene, die einen septischen Schock verursachen, sind gram-negative Bakterien sowie gram-positive Mikroorganismen. Die Zusammensetzung der antimikrobiellen Therapie hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab und sollte immer unter Berücksichtigung der individuellen Gegebenheiten des Patienten erfolgen. Zu den wichtigsten patientenbezogenen Faktoren gehören die Art des klinischen Syndroms bzw. die Lokalisation der Infektion sowie die zugrundeliegenden Begleiterkrankungen und die medizinische Vorgeschichte des Patienten. Dabei sind besonders ein chronisches Organversagen, Medikamente, Dauerkatheter, das Vorliegen einer Immunsuppression oder einer anderen Beeinträchtigung des Immunsystems, eine kürzlich bekanntgewordene Infektion oder Kolonisierung mit spezifischen Pathogenen sowie eine Behandlung mit Antiinfektiva innerhalb der letzten drei Monate von Interesse. Außerdem müssen Faktoren wie der Aufenthaltsort des Patienten

zum Zeitpunkt der Infektion (z.B. kommunaler Bereich, Versorgungseinrichtung für chronisch Kranke, Akutversorgungshospital), die lokale Pathogenprävalenz und die lokale Resistenzlage dieser Pathogene in der Therapiewahl berücksichtigt werden. Auch die Reiseanamnese sollte immer erhoben und in die Entscheidung miteinbezogen werden. Außerdem sollte die Indikation einer zusätzlichen kalkulierten antimykotischen oder antiviralen Therapie bei Risikopatienten geprüft werden (Brunkhorst et al., 2018).

Für die meisten Infektionen empfiehlt sich eine antimikrobielle Behandlungsdauer von 7 bis 10 Tagen, bei einer Sepsis mit *Staphylococcus-aureus* Bakteriämie sollte dagegen eine längere Behandlungsdauer von mind. 14 Tagen erfolgen. Bei Patienten mit verzögertem Therapieansprechen, mit persistierenden Infektionsherden, mit bestimmten Pilz- und Virusinfektionen oder mit Immundefizienz ist ebenfalls häufig eine längere Behandlungsdauer notwendig (Brunkhorst et al., 2018).

Eine kürzere Behandlungsdauer ist dagegen bei Patienten mit schnellem klinischen Therapieansprechen, nach einer effektiven Fokuskontrolle bei intraabdominaler oder urogenitaler Sepsis und bei anatomisch unkomplizierter Pyelonephritis möglich. Hierbei können Messungen des PCT-Werts während des Krankheitsverlaufes dabei helfen, die Dauer der antimikrobiellen Therapie bei Sepsis-Patienten medizinisch sinnvoll zu verkürzen (Brunkhorst et al., 2018).

Da die Deeskalation der antimikrobiellen Therapie in mehreren Beobachtungsstudien mit einer Verbesserung der Überlebensrate assoziiert war (Garnacho-Montero et al., 2014; C. H. Weiss, Persell, Wunderink, & Baker, 2012), sollte außerdem eine tägliche Beurteilung hinsichtlich der Möglichkeit zur Deeskalation der kalkulierten antimikrobiellen Therapie erfolgen. Dies wird insbesondere durch die Isolierung eines oder mehrerer infizierender Mikroorganismen im Verlauf ermöglicht und sollte dann möglichst zeitnah erfolgen. Bei klinischer Verbesserung des Patienten innerhalb der ersten 72 Stunden sollte auch ohne Erregernachweis eine initiale Kombinationstherapie auf eine Monotherapie deeskaliert werden (Brunkhorst et al., 2018). Die Deeskalation der antimikrobiellen Therapie ist außerdem mit weniger Resistenz-Selektionsdruck, weniger Nebenwirkungen

und geringeren Kosten verbunden (Pollack et al., 2016). Falls hinreichend nachgewiesen werden kann, dass keine Infektion vorliegt, sollte die antimikrobielle Therapie daher unverzüglich beendet werden (Brunkhorst et al., 2018).

Ebenso wichtig wie eine bestmögliche antimikrobielle Therapie ist eine frühe und möglichst umfassende Fokuskontrolle zur Eindämmung des Infektionsgeschehens. Fundamentale Prinzipien der Fokuskontrolle beinhalten zum einen die schnelle Identifikation des Infektionsherdes und zum anderen dessen potenzielle chirurgische oder interventionelle Sanierung. „Zu den Infektionsherden, die gut auf Fokuskontrollmaßnahmen ansprechen, gehören intraabdominale Abszesse, gastrointestinale Perforationen, Darmischämie oder Volvulus, Cholangitis, Cholecystitis, mit einer Obstruktion oder einem Abszess verbundene Pyelonephritis, eine nekrotisierende Weichteilinfektion, andere tiefe Infektionen (z.B. Empyem oder septische Arthritis) sowie Infektionen von Implantaten (Brunkhorst et al., 2018).“ Auch intravaskuläre Zugänge können einen möglichen Ausgangspunkt für eine Sepsis darstellen und sollten daher unverzüglich entfernt werden. Generell sollten potentielle Infektionsherde so schnell wie möglich nach einer initialen Volumentherapie saniert werden (Azuhata et al., 2014; Bloos et al., 2014). Bei der Auswahl geeigneter Maßnahmen zur Fokuskontrolle müssen die Vorteile und Risiken einer spezifischen Intervention, das mit der Intervention verbundene Transportrisiko und die Erfolgswahrscheinlichkeit der betreffenden Maßnahme immer im Einzelfall abgewogen werden (Brunkhorst et al., 2018).

### 1.1.7.2 Supportive Therapie

Die supportive Therapie der Sepsis umfasst neben der hämodynamischen Stabilisierung mithilfe einer geeigneten Volumentherapie und gegebenenfalls dem Einsatz von kreislaufwirksamen Substanzen auch die Beatmung und Sedierung von Sepsis-Patienten. Zusätzlich sollte eine regelmäßige Blutzuckerkontrolle, eine Thromboseprophylaxe und bei Bedarf auch eine Stressulkusprophylaxe sowie eine künstliche Ernährung des Patienten erfolgen (Brunkhorst et al., 2018).

Eine frühzeitige wirksame Flüssigkeitstherapie ist von entscheidender Bedeutung für die Stabilisierung einer Sepsis-induzierten Gewebehypoperfusion oder eines septischen Schocks. Im Rahmen der Notfallbehandlung sollte die initiale Flüssigkeitstherapie mit 30 ml/kg unter Verwendung von balancierten kristalloiden Lösungen innerhalb der ersten drei Stunden begonnen werden. Grundsätzlich empfiehlt sich eine Flüssigkeitstherapie nach dem „Fluid-Challenge“-Prinzip, bei der die Flüssigkeitsgabe fortgesetzt wird, solange Zeichen einer Hypoperfusion vorliegen. Eine Sepsis-induzierte Hypoperfusion kann sich durch eine akute Organ dysfunktion und/oder eine Verringerung des Blutdrucks sowie durch eine Erhöhung des Serumlaktats manifestieren (Brunkhorst et al., 2018). Da erhöhte Laktatwerte unabhängig von deren Ursache mit einem schlechteren Outcome verbunden sind (Casserly et al., 2015), sollte bei Patienten, bei denen erhöhte Laktatwerte infolge einer Gewebehypoperfusion vorliegen, die hämodynamische Stabilisierung bis zu einer Normalisierung der Laktatwerte fortgeführt werden. Der Einsatz von Albumin oder Gelatine sollte bei der Behandlung von Patienten mit septischem Schock nur dann erfolgen, wenn eine adäquate Flüssigkeitstherapie mit Kristalloiden nicht in der Lage ist die hämodynamische Stabilität zu erreichen. In diesem Fall sollte Albumin oder Gelatine ergänzend zur Flüssigkeitstherapie eingesetzt werden (Brunkhorst et al., 2018).

Sollte mithilfe einer Flüssigkeitstherapie keine ausreichende hämodynamische Stabilisierung möglich sein, kommen kreislaufaktive Substanzen, insbesondere Vasopressoren zum Einsatz, wobei bevorzugt Noradrenalin verwendet werden sollte. Ein anfänglicher Zielwert für den mittleren arteriellen Druck (MAP) von 65 mmHg sollte damit erreicht werden (Brunkhorst et al., 2018).

Je nach Schwere der Erkrankung kann eine Sedierung sinnvoll sein. Sowohl bei einer kontinuierlichen oder einer diskontinuierlichen Sedierung bei beatmeten Sepsis-Patienten sollte die Sedierung bis zu festgelegten Endpunkten minimiert werden. Der Zielwert auf der Richmond Agitation Sedation Scale (RASS) für alle intensivmedizinisch behandelten Patienten ist außerhalb von speziellen Indikationen 0/-1 (0: wach und ruhig, -1: schläfrig). Die Eingrenzung der Nutzung einer

Sedierung bei kritisch erkrankten und gegebenenfalls beatmeten Patienten reduziert die Dauer der mechanischen Beatmung und die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation und im Krankenhaus und ermöglicht eine frühere Mobilisierung (Brunkhorst et al., 2018).

Im Falle einer respiratorischen Insuffizienz sollten Sepsis-Patienten beatmet werden. Ohne akutes Atemnotsyndrom (ARDS) erfolgt eine invasive Beatmung mit einem Tidalvolumen von 6-8 ml/kg Standard-Körpergewicht. Mit ARDS sollte eine Beatmung mit einem Tidalvolumen  $\leq 6$  ml/kg Standard-Körpergewicht durchgeführt werden. Der endinspiratorische Atemwegsdruck sollte in beiden Fällen bei  $\leq 30$  cmH<sub>2</sub>O, die inspiratorische Druckdifferenz bei  $\leq 15$  cmH<sub>2</sub>O liegen. Außerdem sollte – mit Ausnahme von Patienten mit schwerem ARDS – frühzeitig (innerhalb der ersten 48 Stunden nach Intubation) auf eine unterstützende Beatmung zur Ermöglichung von Spontanatmung deeskaliert werden (Brunkhorst et al., 2018).

Bei der Behandlung von Intensivpatienten sollten Hyperglykämien, Hypoglykämien und große Schwankungen der Blutzuckerwerte vermieden werden, da dies mit einer höheren Mortalität in Zusammenhang gebracht wurde (Finfer et al., 2012; Siegelaar et al., 2010). Daher sollten die Blutzuckerwerte bei intensivmedizinisch behandelten Patienten alle ein bis zwei Stunden kontrolliert werden, bis die Blutzuckerwerte und gegebenenfalls die Insulininfusionsraten stabil sind. Danach sollte alle vier Stunden eine Kontrolle bei Patienten erfolgen, die Insulininfusionen erhalten. Es sollte bevorzugt ein oberer Blutzuckerspiegel von  $\leq 180$  mg/dl angestrebt werden. Bei Patienten mit Sepsis empfiehlt sich ein protokollierter Ansatz für das Blutzuckermanagement, bei denen die Insulingabe beginnt, wenn zwei aufeinanderfolgende Messungen einen Blutzuckerspiegel von  $> 180$  mg/dl ergeben (Brunkhorst et al., 2018).

Aufgrund der Immobilisierung sollten Sepsis-Patienten eine pharmakologische Prophylaxe einer venösen Thromboembolie mittels unfraktioniertem Heparin oder niedermolekularem Heparin erhalten, sofern keine Kontraindikationen in Bezug auf die Verwendung dieser Wirkstoffe vorliegen. Außerdem sollten Patienten

mit Sepsis oder septischem Schock, bei denen Risikofaktoren für gastrointestinale Blutungen vorliegen, eine Stressulkusprophylaxe mit Protonenpumpeninhibitoren oder Histamin-2-Rezeptor-Antagonisten erhalten. Kritisch erkrankte Patienten mit Sepsis oder septischem Schock können aufgrund einer eingeschränkten gastrointestinalen Toleranz häufig nicht "voll" enteral ernährt werden. Dennoch sollten keine reine parenterale Ernährung sondern eine kombiniert enteral / parenterale Ernährung erfolgen, sofern keine Kontraindikationen für eine enterale Ernährung vorliegen (z.B. unkontrollierte obere Gastrointestinalblutung, Darmobstruktion oder -verschluss, etc.). Eine teilweise enterale Ernährung sollte möglichst frühzeitig innerhalb der ersten 48 Stunden nach Beginn der Sepsis eingeleitet werden und innerhalb der ersten sieben Tage entsprechend der metabolischen und gastrointestinalen Toleranz gesteigert werden (Brunkhorst et al., 2018).

### 1.1.7.3 Hydrocortison bei Sepsis

Corticosteroide werden seit Mitte des 20. Jahrhunderts zur Behandlung von Patienten mit schweren Infektionen eingesetzt. Ihr Nutzen-Risiko-Verhältnis ist jedoch nach wie vor umstritten (Annane et al., 2018). Dies hat laut einer Studie von Bruno et al. zu einer erheblichen Heterogenität in der klinischen Praxis US-amerikanischer Ärzte geführt, wobei 28 % der Ärzte der (subjektiven) Auffassung waren, dass Cortikosteroide das Überleben bei septischem Schock verbessern, 27 % glaubten, dass dies nicht der Fall war, und 45 % der Ärzte waren sich nicht sicher (Bruno, Dee, Anderegg, Hernandez, & Pravinkumar, 2012).

Experimentelle und klinische Belege weisen allerdings darauf hin, dass die Sepsis unter anderem mit einer dysregulierten Reaktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse einhergeht, die sowohl die Cortisolproduktion als auch die Cortisolverwendung durch die Zellen betreffen kann (Annane, 2016).

Klinische Studien kamen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen bei der Frage, ob der Einsatz von Hydrocortison das Überleben von Sepsis-Patienten verbes-

sern kann. In einer Studie aus dem Jahr 2002 verringerte eine 7-tägige Behandlung mit niedrig dosiertem Hydrocortison und Fludrocortison das Sterberisiko bei Patienten mit septischem Schock und relativer Nebenniereninsuffizienz signifikant (Annane et al., 2002). 2008 untersuchte eine weitere Studie den Einsatz von Hydrocortison bei Patienten, die nach Flüssigkeits- und Vasopressor-Therapie hypoton blieben und deren Plasmacortisolspiegel nach der Verabreichung von Corticotropin nicht entsprechend anstiegen. Hydrocortison verbesserte hier weder das Überleben noch die Schockumkehr der Sepsis-Patienten. Allerdings konnten beide Studien einen Behandlungsnutzen in Bezug auf den hämodynamischen Status und die Organfunktion zeigen (Sprung et al., 2008).

Auch neuere Untersuchungen zeigten keinen Unterschied in der Zeit bis zur Schockumkehr, der Krankenhausverweildauer und der Sterblichkeit von Patienten mit septischem Schock, die mit Hydrocortison und Fludrocortison behandelt wurden (Lock, Gutierrez, Hand, Barthol, & Attridge, 2023).

Die aktuelle S3-Leitlinie „Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge“ von 2018 empfiehlt daher die Verwendung von intravenösem Hydrocortison bei der Behandlung von Patienten mit septischem Schock nur für den Fall, dass eine adäquate Flüssigkeitstherapie und hoch dosierte Vasopressor-Gaben nicht in der Lage sind, die hämodynamische Stabilität wiederherzustellen. In diesem Fall wird eine Dosis von 200 mg intravenösem Hydrocortison pro Tag empfohlen (Brunkhorst et al., 2018).

### 1.1.7.4 Vitamin B1 bei Sepsis

Vitamin B1 ist ein entscheidender Co-Faktor bei der Glykolyse und der oxidativen Decarboxylierung von Kohlenhydraten zur Energiegewinnung (Manzanares & Hardy, 2011). Ein schwerer Mangel an Vitamin B1 kann entsprechend zu Fehlfunktionen im aeroben Stoffwechsel und dadurch u.a. zum Anstieg von Laktat im Blut oder Hypotension führen.

In verschiedenen Studien zeigten sich Hinweise darauf, dass kritisch kranke Patienten während ihrer akuten Erkrankung einen Mangel an Vitamin B1 aufweisen

oder entwickeln können (Aline et al., 2014; Cruickshank, Telfer, & Shenkin, 1988; Donnino et al., 2010). Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen einem Mangel an Vitamin B1 und der Mortalität festgestellt werden (Aline et al., 2014).

Bei Donnino et al. verbesserte die Verabreichung von Vitamin B1 bei Patienten mit septischem Schock und erhöhtem Laktat aber weder die Laktatwerte noch die Zeit bis zur Schockumkehr, die Schwere der Erkrankung und die Sterblichkeit (Donnino et al., 2016).

## **1.2 PBMCs**

Periphere mononukleäre Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) werden häufig zum Vergleich der mitochondrialen Funktion bei Patienten mit und ohne Sepsis verwendet (S. L. Weiss et al., 2022).

Stoffwechselstörungen bei Sepsis sind auf mitochondriale Schäden zurückzuführen und tragen erheblich zu Organversagen und Sterblichkeit bei (Kraft, Chen, Suliman, Piantadosi, & Welty-Wolf, 2019). Eine mitochondriale Dysfunktion in mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurde außerdem mit einer Dysregulation des Immunsystems bei Sepsis in Verbindung gebracht (S. L. Weiss et al., 2015). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass PBMCs bei Patienten mit Sepsis-Anzeichen eine mitochondriale Schädigung aufweisen, die proportional zu den zirkulierenden frühen proinflammatorischen Zytokinspiegeln ist (Kraft et al., 2019).

Diese Aspekte zeigen an, dass die diversen Funktionen der PBMCs von besonderem Interesse für die Erforschung der Sepsis sind.

### 1.3 Zytokine

Das angeborene und adaptive Immunsystem des Menschen besteht aus Effektorzellen, die Zytokine (Interleukine, Interferone, Chemokine und zahlreiche andere Mediatoren) produzieren (Jarczak & Nierhaus, 2022). Die charakteristischen Merkmale von Zytokinen sind zum einen die Pleiotropie, d. h. die Fähigkeit eines bestimmten Zytokins, viele verschiedene Zellen zu beeinflussen und unterschiedliche Wirkungen hervorzurufen, und zum anderen ihre Redundanz, d. h. die Fähigkeit verschiedener Zytokine, dieselbe Wirkung zu erzielen. Einige Zytokine können sich gegenseitig antagonisieren, andere Zytokine, die gleichzeitig auf dieselben Zellen wirken, erzielen eine synergistische Wirkung. Eine weitere Eigenschaft von Zytokinen ist die Fähigkeit, positive und negative Rückkopplungen zu induzieren (Gierlikowska, Stachura, Gierlikowski, & Demkow, 2022).

Normalerweise wird ein fragiles Gleichgewicht von entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Wirkungen durch komplexe Regulationsmechanismen aufrechterhalten. Störungen dieser Homöostase können zu komplizierten Kettenreaktionen führen, die eine massive Freisetzung von Zytokinen zur Folge haben. Dies kann zu einer drastischen Selbstverstärkung verschiedener Rückkopplungsmechanismen führen, was letztendlich zu systemischen Schäden, Multiorganversagen oder Tod führen kann (Jarczak & Nierhaus, 2022).

Es wird angenommen, dass während der Sepsis ein biphasischer Zustand der Zytokine existiert, wobei sich ein anfänglicher hyperinflammatorischer Zustand oder Zytokinsturm hin zu einem späteren hypoinflammatorischen Zustand bis hin zur Immunparalyse wandelt (Angus & van der Poll, 2013; Cohen, 2002). Darüber hinaus treten im Verlauf der Sepsis sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine auf (Jekarl, Kim, Lee, Kim, & Kim, 2018) und auch auf Transkriptionsebene variieren sepsisbedingte Zytokine (B. M. Tang, Huang, & McLean, 2010).

Pro-inflammatorische Zytokine der IL-1- und TNF-Familie setzen eine Kaskade von Ereignissen in Gang, indem sie die Freisetzung von Chemokinen induzieren und den transendothelialen Transport von Immunzellen fördern (Striz, Brabcova, Kolesar, & Sekerkova, 2014).

Schließlich stellt das angeborene Immunsystem die Homöostase im verletzten Gewebe durch Zytokine aus der IL-10- und TGF-Familie (Transforming Growth Factor) wieder her, die hauptsächlich von Makrophagen freigesetzt werden und die in der Lage sind regulatorische T-Zellen zu induzieren, die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen zu hemmen und die Heilung des Gewebes durch Regulierung der Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen und der Angiogenese einzuleiten (Striz et al., 2014).

Von angeborenen Immunzellen produzierte Zytokine stellen dementsprechend ein attraktives Ziel für therapeutische Interventionen bei Patienten mit Sepsis, aber auch anderen entzündlichen, rheumatoiden, autoinflammatorischen Syndromen oder malignen Erkrankungen, die mit einer überschießenden Zytokinfreisetzung einher gehen können, dar (Striz et al., 2014; X. D. Tang et al., 2021).

### 1.3.1 IL-1 $\beta$

Sobald das angeborene Immunsystem aktiviert ist, steuert es die Entzündungsreaktion, indem es proinflammatorische Zytokine wie Zytokine vom Typ IL-1, insbesondere IL-1 $\beta$ , ausschüttet. IL-1 vermittelt die Expression einer ganzen Reihe von Genen, die an der sekundären Entzündung beteiligt sind. Auf IL-1 reagierende Gene koordinieren alle Aspekte der lokalen Entzündung, locken auch Zellen des adaptiven Immunsystems an den Infektionsherd und aktivieren diese dort (Weber, Wasiliew, & Kracht, 2010).

Das Zytokin IL-1 $\beta$  ist also ein Schlüsselmediator der Entzündungsreaktion, der für die Reaktion des Wirts und die Abwehr von Krankheitserregern zwar von großer Bedeutung ist, bei chronischen Krankheiten und akuten Gewebeverletzungen die Schäden aber auch verschlimmert (Lopez-Castejon & Brough, 2011).

### 1.3.2 TNF

TNF ist ein Zytokin mit vielen verschiedenen wichtigen Funktionen, das sowohl in der Homöostase als auch der Pathogenese von Krankheiten eine Rolle spielt.

TNF ist für die optimale Abwehr von Krankheitserregern, die Organogenese und Entwicklung (Architektur der Lymphorgane), die Geweberegeneration (neuronale Remyelinisierung, Herzbau, Knorpelregeneration), das Abklingen von Entzündungen (Desensibilisierung von Makrophagen, Apoptose von Entzündungszellen) und die Einleitung der Gewebereparatur erforderlich (Kalliolias & Ivashkiv, 2016).

TNF löst aber auch Entzündungen durch die Induktion von Entzündungsmediatoren (Zytokine, Lipidmediatoren) und die Rekrutierung von Entzündungszellen im Gewebe (Induktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, Aktivierung von Endothelzellen) aus und fördert das Überleben von Entzündungszellen. Außerdem fördert TNF die Zerstörung von Gewebe durch die Induktion von gewebezerstörenden Enzymen, der Apoptose und der Osteoklastogenese (Kalliolias & Ivashkiv, 2016).

Eine unkontrollierte TNF-Produktion oder -funktion wird mit der Entstehung von Entzündungskrankheiten wie Rheumatoider Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Psoriasis, und vielen anderen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Kalliolias & Ivashkiv, 2016).

TNF- $\alpha$  ist im Rahmen einer überschießenden Zytokinfreisetzung bei Sepsis-Patienten in der Lage einen Schock und eine Gewebeschädigung auszulösen (Chousterman et al., 2017). Bereits 1987 wurde die Wirkung von Anti-TNF-Antikörpern bei Bakteriämie an Affen untersucht. Eine Injektion von Anti-TNF-Antikörpern eine Stunde vor der bakteriellen Infektion schützte die Affen vor einem Schock, während die Injektion von Anti-TNF-Antikörpern zwei Stunden vor der bakteriellen Infektion die Affen ebenso vor Schock, aber auch vor Funktionsstörungen der lebenswichtigen Organe, einer anhaltenden Stresshormonausschüttung und schließlich dem Tod schützte, die bei einer Injektion eine Stunde vor der bakteriellen Infektion noch aufgetreten waren (Tracey et al., 1987).

Therapien, die darauf abzielen, die Entzündungsreaktion bei Sepsis zu hemmen, wurden nach vielversprechenden Ergebnissen der Tiermodelle auch in zahlreichen klinischen Studien mit Tausenden von Patienten getestet; allerdings konnte in keiner dieser Studien ein klarer Hinweis auf Wirkeffizienz gefunden werden

(Freeman & Natanson, 2000). Daher ist beim Menschen die Rolle der Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie bei schwerer Sepsis und septischem Schock nach wie vor umstritten.

Auf die Effekte von TNF bei Krebserkrankungen wird an dieser Stelle nicht eingegangen.

### 1.3.3 MCP-1

MCP-1, auch bekannt als CC-Motiv-Chemokin-Ligand 2 (CCL2), gehört zur Familie der CC-Chemokine. Es spielt eine wichtige Rolle im Entzündungsprozess, indem es andere Entzündungsfaktoren / Zellen anlockt (Yan Li et al., 2022) oder ihre Expression verstärkt. Durch diesen Hauptmechanismus der Migration und Infiltration von Entzündungszellen wie Monozyten / Makrophagen und anderen Zytokinen am Ort der Entzündung führt es zum Fortschreiten vieler Erkrankungen (Singh, Anshita, & Ravichandiran, 2021). Genetische MCP-1 / CCL2-Polymorphismen konnten bereits mit der Anfälligkeit für Sepsis und deren Entwicklung in Verbindung gebracht werden (He et al., 2017).

### 1.3.4 IL-6

IL-6 ist ein löslicher Mediator mit vielen verschiedenen Wirkungen auf Entzündungen, Immunreaktionen und Hämatopoese. Im Verlauf der Forschung wurden verschiedene Funktionen nachgewiesen und entsprechend ihrer biologischen Aktivität benannt, bei denen sich später herausstellte, dass sie alle von demselben Molekül – IL-6 – ausgehen. Dazu zählen der B-Zell-stimulierende Faktor 2, welcher die Differenzierung aktivierter B-Zellen in Antikörper-produzierenden Zellen induziert (Kishimoto 1985), der Hepatozyten-stimulierende Faktor, der die Akutphasenproteinsynthese in Hepatozyten induziert oder IFN- $\beta$ 2 mit seiner antiviralen IFN-Aktivität, sowie einige weitere (Tanaka, Narazaki, & Kishimoto, 2014).

### 1.3.5 IL-8

IL-8 wird von Phagozyten und mesenchymalen Zellen produziert, die Entzündungsreizen (z. B. IL-1 oder TNF) ausgesetzt sind, und aktiviert Neutrophile, indem es u.a. Chemotaxis und Exozytose auslöst. In vivo führt IL-8 zu einer massiven Anhäufung von Neutrophilen an der Injektionsstelle. IL-8 und andere verwandte Zytokine werden in verschiedenen Geweben bei Infektionen, Entzündungen, Ischämie, Traumata usw. gebildet und sind vermutlich die Hauptursache für die lokale Ansammlung von neutrophilen Granulozyten (Baggiolini & Clark-Lewis, 1992).

### 1.3.6 IL-10

Das Zytokin IL-10 ist ein wichtiger entzündungshemmender Mediator, der den Wirt vor überschießenden Reaktionen auf Krankheitserreger und Mikrobiota schützt und auch in anderen Bereichen wie sterile Wundheilung, Autoimmunität, Krebs und Homöostase eine wichtige Rolle spielt. IL-10 hemmt dabei sowohl die lokale Zytokin- und Chemokinproduktion als auch die Antigenpräsentation. Das breite Spektrum an IL-10-produzierenden und IL-10-responsiven Zellen bietet dem Immunsystem die Möglichkeit, die Immunantwort in verschiedenen Situationen und in verschiedenen Geweben zu regulieren. Seine gegensätzlichen kontextspezifischen entzündungshemmenden und stimulierenden Wirkungen machen die therapeutische Beeinflussung von IL-10 jedoch zu einer Herausforderung (Saraiva, Vieira, & O'Garra, 2020).

### 1.3.7 IL-18

IL-18 ist ein proinflammatorisches Zytokin mit vielen verschiedenen Funktionen, das zur IL-1-Familie gehört. IL-18 reguliert z.B. unterschiedliche Differenzierungen von T-Zellen (z.B. CD4+ T-Zellen) und natürlichen Killerzellen (Vecchié et al., 2021). Außerdem stimuliert IL-18 CD4+ T-Zellen und natürliche Killerzellen zur Produktion von IL-3, IL-9 und IL-13, sowie Mastzellen und Basophile zur Produktion von IL-4, IL-13 und weiteren chemischen Mediatoren wie Histamin

(Yasuda, Nakanishi, & Tsutsui, 2019). Die IL-18-vermittelte Entzündung wurde weitgehend in Tiermodellen für bakterielle, virale, parasitäre und Pilzinfektionen untersucht, die zeigen, dass entweder eine Überproduktion von IL-18 durch den Wirt oder eine Überempfindlichkeit des Wirts gegenüber IL-18 zu einer übermäßigen Entzündungslast und damit zu Gewebeschäden führen kann (Vecchié et al., 2021).

### 1.3.8 IL-23

IL-23 ist ein Zytokin, das hauptsächlich von Makrophagen und dendritischen Zellen freigesetzt wird. Diese Freisetzung von IL-23 erfolgt während einer Krankheit sehr rasch. Strategien zur gezielten Bekämpfung dieser Mediatoren mit neutralisierenden Antikörpern während der experimentellen Sepsis bei Nagetieren haben sich als wirksam erwiesen und zu einer Verbesserung der Überlebenschancen geführt (Bosmann & Ward, 2012). Während einer Sepsis beim Menschen war die mRNA-Menge für IL-23 im peripheren Blut höher als bei gesunden Personen (O'Dwyer et al., 2008). Dennoch ist derzeit nicht klar, ob sich die Verbesserung der Überlebenschancen bei Sepsis durch IL-23-Antikörper auch beim Menschen bestätigen lässt (Bosmann & Ward, 2012). Eine IL-23-Rezeptor-Mutation wurde außerdem mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Rueda et al., 2008) und monoklonale Antikörper gegen IL-23 sind bereits für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis zugelassen worden (Griffiths et al., 2010).

## 1.4 Ascorbat / Vitamin C<sup>1</sup>

Vitamin C ist ein für den Menschen essenzieller Mikronährstoff mit vielfältigen Funktionen, die mit seiner Fähigkeit, Elektronen zu spenden, zusammenhängen. Es ist ein starkes Antioxidans und ein Cofaktor für eine Familie von biosynthetischen und genregulierenden Enzymen (Carr & Maggini, 2017).

Vitamin C trägt zur Immunabwehr bei, indem es verschiedene zelluläre Funktionen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems unterstützt. Vitamin C unterstützt die epitheliale Barrierefunktion gegen Krankheitserreger und fördert die Antioxidationsfähigkeit der Haut, wodurch es potenziell vor oxidativem Umweltstress (z.B. reaktive Sauerstoffspezies) schützt (Carr & Maggini, 2017; Dietrich et al., 2021).

Vitamin C akkumuliert in phagozytischen Zellen wie Neutrophilen und kann die Chemotaxis, die Phagozytose, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und letztlich die Abtötung von Mikroorganismen fördern. Es wird auch für die Apoptose und den Abtransport der verbrauchten Neutrophilen von den Infektionsherden durch Makrophagen benötigt, wodurch die Nekrose und mögliche Gewebeschäden verringert werden (Carr & Maggini, 2017).

Ein Vitamin-C-Mangel führt zu einer Beeinträchtigung der Immunität und einer höheren Anfälligkeit für Infektionen. So ist es nicht verwunderlich, dass kritisch kranke Patienten häufig erniedrigte Konzentrationen an Vitamin C im Plasma zeigen. Zusätzlich wirken sich Infektionen wiederum, aufgrund verstärkter Entzündungen und metabolischer Anforderungen, erheblich auf den Vitamin-C-Spiegel aus (Carr & Maggini, 2017). Allerdings kann Vitamin C vom menschlichen Organismus nicht synthetisiert werden und muss daher mit der Nahrung aufgenommen werden (Dietrich et al., 2021).

---

<sup>1</sup> Anmerkung:

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die bisher synonym verwendeten Begriffe Ascorbat/ Vitamin C durch den Begriff Vitamin C ersetzt.

Dagegen scheint eine Supplementierung mit Vitamin C in der Lage zu sein, sowohl Infektionen der Atemwege als auch systemische Infektionen positiv beeinflussen zu können. Die prophylaktische Vorbeugung von Infektionen erfordert eine orale Vitamin-C-Zufuhr in einer Menge von 100–200 mg/Tag, die mindestens ausreichende, wenn nicht sogar sättigende Plasmaspiegel gewährleistet, die die Zell- und Gewebespiegel optimieren (Carr & Maggini, 2017).

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

In Deutschland liegt die Letalität der Sepsis nach wie vor bei ca. 25 %. Die jährlichen Kosten für die Behandlung der Sepsis sowie deren umfassende Folgen weisen allein in Deutschland einen Betrag von rund 8 Milliarden Euro pro Jahr auf (Fleischmann et al., 2016).

Aufgrund des breiten Erregerspektrums und der dadurch bedingten stark heterogenen Krankheitserscheinungen der Sepsis ist es bislang nicht möglich, eine einheitliche Therapie / Standardtherapie zur Behandlung der Sepsis zu definieren (Singer, M. et al., 2016). Die Weiterentwicklung neuartiger Ansätze der Sepsis-Therapie stellt also eine zentrale Aufgabe der aktuellen medizinischen Forschung dar.

In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe der *Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Eastern Virginia Medical School, Norfolk, VA, USA*, zeigte die Kombination von Vitamin C, Thiamin (Vitamin B1) und Hydrocortison in einer Fallserie erste Hinweise auf eine signifikant reduzierte Sterblichkeit von Sepsis-Patienten (Marik, Khangoora, Rivera, Hooper, & Catravas, 2017).

Vor diesem Hintergrund bestand das Ziel dieser Arbeit darin einen möglichen Beitrag von Vitamin C zur Therapie bei Sepsis, zunächst unter in vitro Bedingungen, zu untersuchen. Dazu sollte in einem ersten Teil die Wirkung von Vitamin C in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen auf das Zytokin-Profil von PBMCs getestet werden. Dabei wurden bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) als etablierter Sepsis-Stimulus verwendet (Dickson & Lehmann, 2019). Anschließend sollte ein Wirkungsvergleich der zuvor optimierten Dosis (s.o.) der Vitamin C-Therapie mit der alternativen Applikation von Hydrocortison bzw. Vitamin B1 erfolgen.

In einem weiteren Schritt sollten dann auch Kombinationen von Vitamin C mit diesen in der Sepsis-Therapie bereits etablierten Medikamenten bzgl. ihres Effektes auf das Zytokin-Profil von PBMCs evaluiert werden. Die Beurteilung der Wirkung von Vitamin C sowie von Hydrocortison und Vitamin B1 auf das Immunsystem erfolgte dabei über die Messung der Sezernierung verschiedener Standard-Zytokine (definiert im LEGENDplex™ Zytokin-Panel).

Folgende Fragestellungen sollten somit in dieser Arbeit untersucht werden:

1. Geht von Vitamin C ein zytotoxischer Effekt auf Zellen des Immunsystems aus?
2. Geht von Vitamin C ein Zytokin-alterierender Effekt auf Zellen des Immunsystems aus?
3. Wie wirkt sich Vitamin C auf Zellen des Immunsystems aus, wenn diese zuvor mit bakteriellen LPS stimuliert wurden?
4. Bei welchen Konzentrationen zeigt Vitamin C einen Effekt bzgl. der Zytokin-Muster von Zellen des Immunsystems, die zuvor mit LPS stimuliert wurden?
5. Wie verhält sich Vitamin C im Vergleich zu Hydrocortison oder Vitamin B1 bzgl. der im LEGENDplex™ Zytokin-Panel definierten Zytokine?
6. Welchen Effekt haben verschiedene Kombinationen von Vitamin C, Hydrocortison und Vitamin B1 auf die Zytokin-Muster von Zellen des Immunsystems, die zuvor mit LPS stimuliert wurden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien / Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien / Reagenzien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Mercaptoethanol (50 mM)	Life technologies Corp., Paisley, UK
5x Reverse Transkriptase Puffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Desinfektionsmittel Softasept® N	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Desinfektionsmittel Sterilium® med	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK
Gibco™ Penicillin-Streptomycin	Gibco, UK
Isopropanol	Honeywell, Moris Plains, USA
LPS von <i>E. coli</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nuclease-freies Wasser	Promega, Madison, USA
RNase-freies Wasser	Promega, Madison, USA
RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium 1640 (1X) + GlutaMAX + HEPES	Gibco, UK
Sekusept® PLUS	Ecolab, Düsseldorf, Deutschland
Trypan Blue	Invitrogen, Eugene, USA

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
24-Well-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
96-Well-Platten (Rundboden)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Platten (V-Bottom, Polypropylen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Einmalhandschuhe, nicht-steril	Ansell, München, Deutschland
Etiketten Cryo-Babies®	Diversified Biotech, Dedham, USA
Falcon® 15 ml Zentrifugenröhrchen	Corning Inc., Corning, USA
Falcon® 50 ml Zentrifugenröhrchen	Corning Inc., Corning, USA
Leukosep™ Röhrchen 12 ml, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten	Wilhelm Ulbrich GdbR, Bamberg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (TipOne®), 200 µl, 100 µl, steril	Starlab Group, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter, 10 µl, steril	PEQLAB, WWR International, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter, 1250 µl, 1000 µl, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rundboden-Röhrchen für Durchflusszytometrie, 5 ml	Corning Inc., Corning, USA
S-Monovette®, EDTA, 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Safety-Multifly®-Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Stabpipetten mit Filter (Costar®), 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml, steril	Corning Inc., Corning, USA
Zählkammer, automatisiert „Countess™ cell counting chamber slides“	Invitrogen, Eugene, USA

Zählkammer, manuell „Disposable Hemocytometer Chips (Neubauer improved)“	NanoEnTek Inc., Waltham, USA
Zellsieb (40 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

## 2.3 Geräte

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
BD LSR II flow cytometer	BD Biosciences, San Jose, USA
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus Optical Co. Ltd., Japan
LightCycler® 96	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Peltier Thermocycler	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Pipetten, 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe „Pipetboy“	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
VARIOKLAV® 500E EC	H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Vortexmischer „Vibrofix VF1“	IKA®-Werke, Staufen, Deutschland
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Zählautomat „Countess II FL“	Life technologies Corp., Bothell, USA
Zentrifuge „Biofuge fresco“	Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland
Zentrifuge „Megafuge 2. OR“	Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland

## 2.4 Kit-Systeme

Tabelle 4: Verwendete Kit-Systeme

Kit-Systeme	Hersteller
LEGENDplex™ Human Inflammation Panel 1	BioLegend Inc., San Diego, USA
RNeasy® Micro Kit	QUIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

## 2.5 Primer

Tabelle 5: Verwendete Primer für die cDNA-Synthese

Primer	Hersteller
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Tabelle 6: Verwendete Primer für die qPCR

fd = forward, re = reverse

Primer	Primer-Sequenz (5'3')	Hersteller
<i>ACTB</i> fd	ttgttacaggaagtcccttgcc	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>ACTB</i> re	atgctatcacctcccctgtgtg	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>ATF 3</i> fd	aagaggcgacgagaaagaaa	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>ATF 3</i> re	tggagtccctcccattctgag	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>GAPDH</i> fd	atcgaccactacctgggcaa	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>GAPDH</i> re	ttctgcatcacgtcccgg	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>IL-23</i> fd	gagccttctctgctccctgata	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>IL-23</i> re	gactgaggcttggaatctgctg	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>IL-6</i> fd	cacagacagccactcacctc	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>IL-6</i> re	tttctgccagtgccctttt	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>MCP 1</i> fd	agaatcacca- gcagcaagtgcc	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>MCP 1</i> re	tctgaaccacttctgcttg	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>TBP</i> fd	tgacaggagccaagagtgaa	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>TBP</i> re	cacatcacagctcccacca	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>TNF-<math>\alpha</math></i> fd	ctcttctgctgctgcactttg	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
<i>TNF-<math>\alpha</math></i> re	atgggctacaggctgtcactc	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland

## 2.6 Nukleotide

Tabelle 7: Verwendete Nukleotide

Nukleotide	Hersteller
dNTPs	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

## 2.7 Enzyme

Tabelle 8: Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
Go Taq <sup>®</sup> qPCR 2x Master Mix	Promega, Madison, USA
Maxima Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

## 2.8 Medikamente und Wirkstoffe

Tabelle 9: Verwendete Medikamente und Wirkstoffe

Medikamente	Hersteller
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pascorbin <sup>®</sup>	Pascoe pharmazeutische Präparate GmbH, Gießen, Deutschland
Vitamin B1 Injektipas <sup>®</sup>	Pascoe pharmazeutische Präparate GmbH, Gießen, Deutschland

## 2.9 Zusammensetzung von Zellkulturmedien und Puffern

Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien / Puffer

Lösung	Zusammensetzung	
RPMI-1640 Me- dium	RPMI Medium + GlutaMAX + HEPES	500 ml
	FBS	10 %
	Penicillin-Streptomycin	1 %

## 2.10 Software

Tabelle 11: Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
FACSDiva™	BD Biosciences, San Jose, USA
GraphPad Prism v 8.4	GraphPad Software, San Diego, USA
LEGENDplex™ v 8.0	BioLegend Inc., San Diego, USA
LightCycler® 96	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Microsoft® Excel	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft® Power Point	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft® Word	Microsoft Corp., Redmond, USA

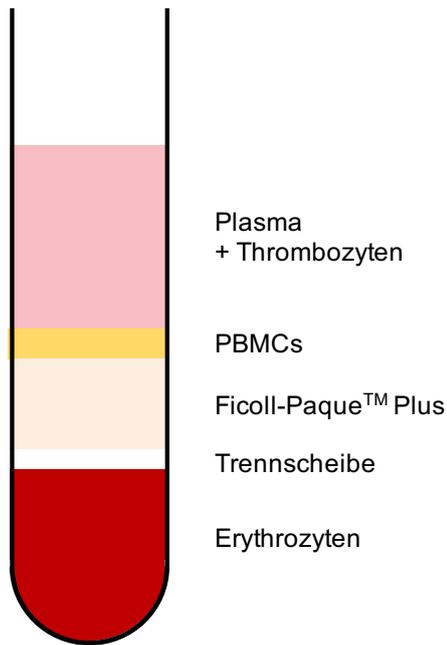
## 2.11 Isolierung von PBMCs

Das Immunsystem besteht aus vielen verschiedenen, sehr spezialisierten Zellpopulationen, die im Rahmen der Immunabwehr unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Um die unterschiedlichen Immunzell-Populationen in der Zellkultur möglichst umfangreich abzubilden, wurden aus humanem Blut von insgesamt zwölf gesunden Spendern (sechs davon weiblich, sechs männlich) PBMCs isoliert und in vitro als Modell-System verwendet.

Seitens der Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität und am Universitätsklinikum Tübingen wurde mit Datum 30.04.2020 die Entnahme und Verwendung des Blutes von freiwilligen Spendern zur Isolierung von humanen PBMCs gemäß Prüfplan vom 16.03.2020 zustimmend bewertet (Projekt-Nummer: 208/2020BO2).

Zunächst wurden dem jeweiligen Spender Blut in 2–3 S-Monovetten® (EDTA, 9 ml) abgenommen. Anschließend wurden je 5 ml des Vollblutes in Leukosep™ Röhrchen (12 ml) pipettiert, die zuvor mit 3 ml Ficoll-Paque™ Plus befüllt und kurz zentrifugiert wurden. Die befüllten Leukosep™ Röhrchen wurden dann für 10 min bei 1000 g ohne Bremse zentrifugiert; dabei werden die verschiedenen Blutzellen anhand ihrer Dichte separiert.

Es entstehen folgende Schichten: die oberste Schicht besteht aus Blutplasma und Thrombozyten; darunter befindet sich die PBMC-Schicht; direkt um die Trennscheibe befindet sich das Ficoll-Paque™ Plus und unter der Trennscheibe lagert sich die Erythrozyten-Fraktion ab.



**Abbildung 4: Auftrennung der Zellschichten nach Zentrifugation des Vollblutes in Leukosep™ Röhrchen**

Die oberste Schicht besteht aus Blutplasma und Thrombozyten ( ). Darunter befindet sich die PBMC-Schicht ( ). Direkt um die Trennscheibe ( ) befindet sich das Ficoll-Paque™ Plus ( ) und unter der Trennscheibe lagert sich die Erythrozytenfraktion ( ) ab.

PBMCs = peripheral blood mononuclear cells.

Die PBMC-Schicht wurde dann mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in ein (mit 20 ml PBS befülltes) 50 ml Falcon® Zentrifugenröhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Dieses Falcon® Zentrifugenröhrchen wurde anschließend für 10 min bei 690 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert.

Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, bis insgesamt drei Zentrifugationen bei 690 g erreicht wurden. Danach erfolgte die Resuspension mit 7 ml RPMI Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 10). Die Zelllösung wurde anschließend über ein Zellsieb in ein weiteres 50 ml Falcon® Gefäß überführt und das Zellsieb mit 3 ml RPMI Medium nachgespült.

Im Anschluss an die PBMC-Isolierung wurden sowohl die Zellzahl pro ml als auch die Zellviabilität mittels des „Countess II FL Automated Cell Counter“ gemessen. Dazu wurde die Zelllösung 1:10 mit RPMI Medium verdünnt, 1+1 mit Trypanblau vermischt und dann in die Kammer eines „Countess™ cell counting chamber slides“ pipettiert.

## **2.12 Versuchsaufbau zur Testung verschiedener Pascorbin®-Konzentrationen bei LPS-Stimulierung**

Zur Testung verschiedener Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulierung (Versuchsreihe I) wurden insgesamt acht Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 5) definiert, die an PBMCs von insgesamt zwölf gesunden Spendern angewendet wurden. Davon waren sechs Spender männlich und sechs Spenderinnen weiblich.

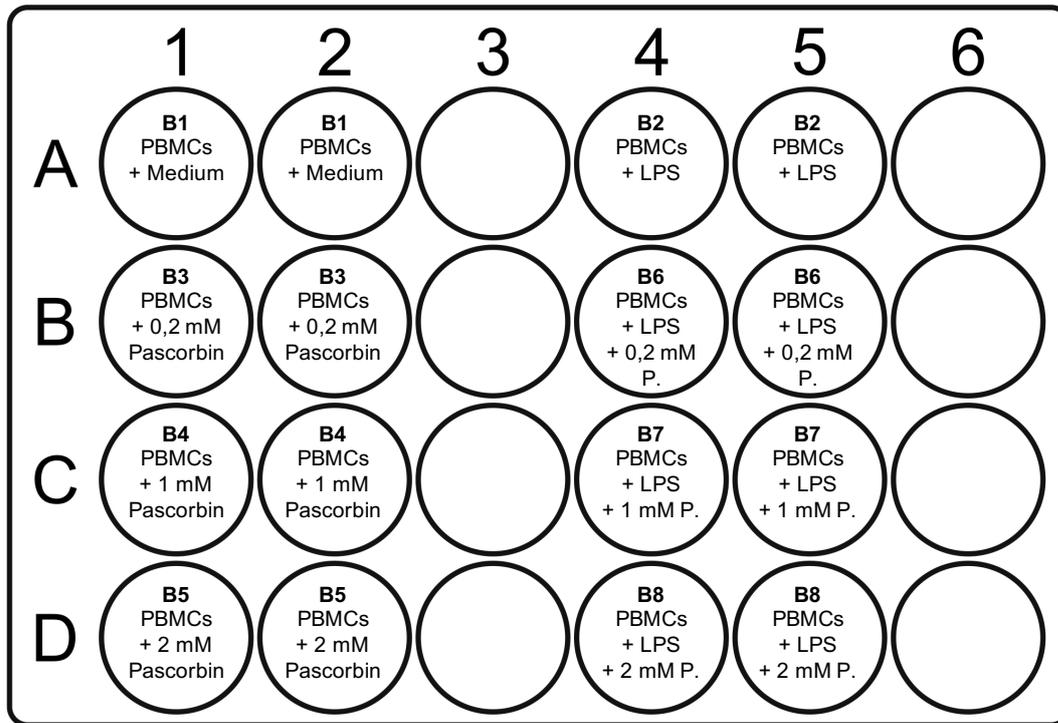
Die erste Behandlung (B1) stellt die Kontrolle dar, bei der die Zellen ausschließlich mit RPMI Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 10) behandelt wurden. Bei der zweiten Behandlung (B2) wurde den PBMCs LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml zugegeben. Dieser Wert dient als Vergleichswert für die Gruppen B6-B8, bei denen LPS mit verschiedenen Pascorbin®-Konzentrationen kombiniert wurde. In den Behandlungsgruppen B3-B5 wurden drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen ohne LPS-Stimulation an PBMCs untersucht. Die Gruppen B3 und B6 wurden mit 0,2 mM Pascorbin® behandelt, die Gruppen B4 und B7 mit 1 mM Pascorbin® und die Gruppen B5 und B8 mit 2 mM Pascorbin®.

<b>Behandlungsgruppen Versuchsreihe I</b>	
B1	500.000 PBMCs + Medium (Kontrolle)
B2	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml)
B3	500.000 PBMCs + Pascorbin® (0,2 mM)
B4	500.000 PBMCs + Pascorbin® (1 mM)
B5	500.000 PBMCs + Pascorbin® (2 mM)
B6	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml) + Pascorbin® (0,2 mM)
B7	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml) + Pascorbin® (1 mM)
B8	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml) + Pascorbin® (2 mM)

**Abbildung 5: Behandlungsgruppen Versuchsreihe I**

Die Behandlung der PBMCs erfolgte in der ersten Versuchsreihe in acht Gruppen (jeweils in Dupletts) mittels Inkubation für sechs Stunden. Die Gruppe B1 diente als Kontrolle und wurde daher nur mit Medium behandelt. Die Gruppe B2 diente als Referenzwert zur Beurteilung der Reaktion der PBMCs auf die Stimulation mit LPS. In den Gruppen B3 bis B5 wurden drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen bzgl. ihrer Effekte auf PBMCs untersucht. Im Vergleich dazu wurden die Gruppen B6 bis B8 zusätzlich mit LPS stimuliert, um die Wirkung von Pascorbin® bei Stimulation der PBMCs zu untersuchen. B = Behandlung; LPS = Lipopolysaccharid; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells.

Alle Behandlungen wurden in Dupletts in einer 24-Well-Platte durchgeführt (siehe Abbildung 6). Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für sechs Stunden bei 37 °C und einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>.



**Abbildung 6: Plattenlayout Versuchsreihe I**

Gezeigt ist der Versuchsaufbau der Versuchsreihe I. Die PBMCs wurden entsprechend der Behandlungsgruppen aus Abbildung 5 in einer 24-Well-Platte jeweils in Dupletts mittels Inkubation für sechs Stunden behandelt. B = Behandlung; LPS = Lipopolysaccharid; P. = Pascorbin®; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells.

### **2.13 Versuchsaufbau zur Testung von Pascorbin® in Kombination mit ausgewählten Sepsis-Medikamenten unter LPS-Stimulierung**

Zur Testung von Pascorbin® in Kombination mit anderen Sepsis-Medikamenten unter LPS-Stimulierung (Versuchsreihe II) wurden insgesamt neun Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 7) definiert, die an PBMCs von insgesamt zwölf Spendern angewendet wurden. Davon waren sechs Spender männlich und sechs Spenderinnen weiblich.

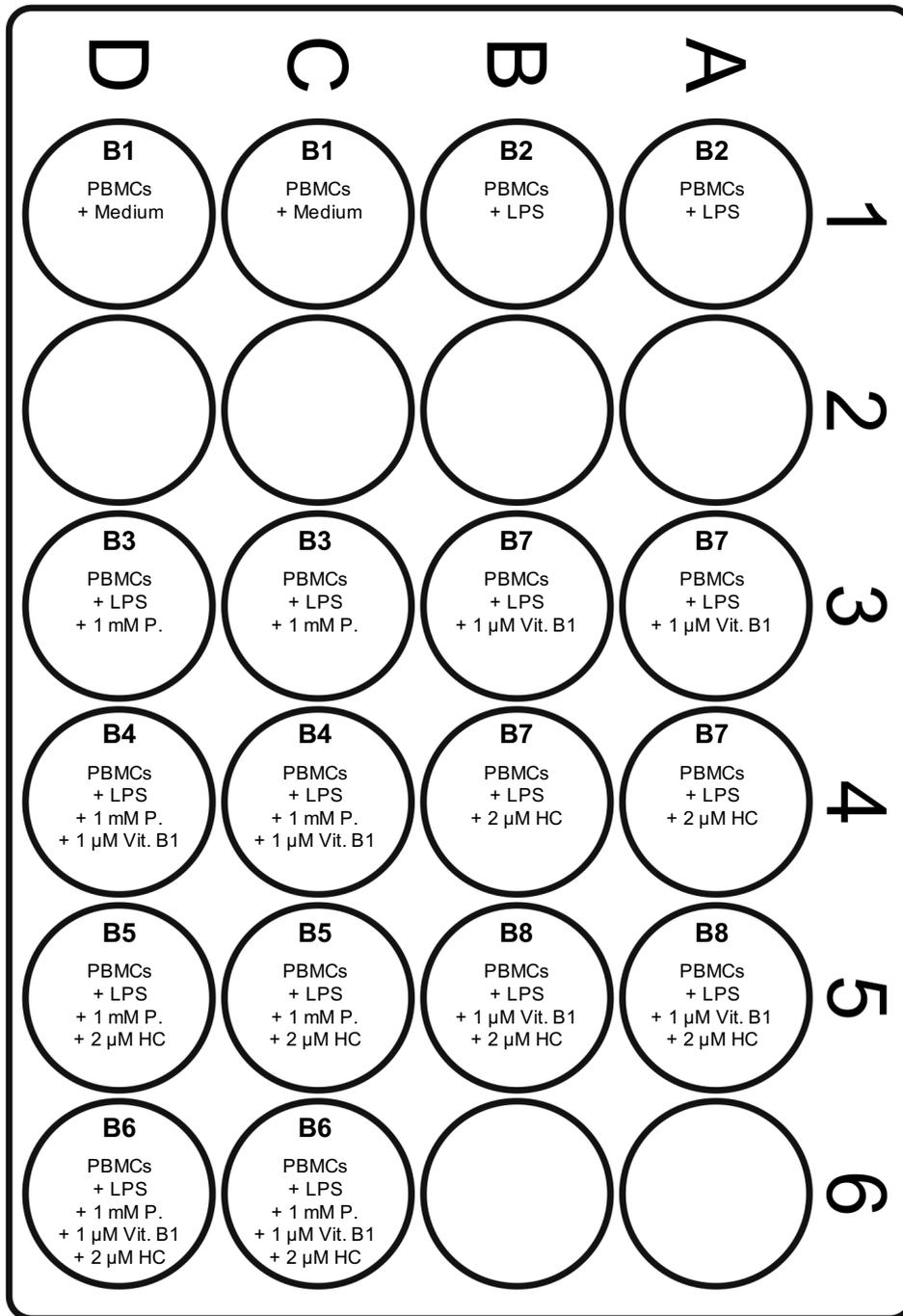
Die erste Behandlung (B1) stellt die unbehandelte Kontrolle dar, bei der die Zellen ausschließlich mit RPMI Medium (Zusammensetzung siehe Tabelle 10) behandelt wurden. Bei der zweiten Behandlung (B2) wurde den PBMCs LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml zugegeben; die Gruppe B2 entspricht also der stimulierten Kontrolle. Der Gruppe B3 wurde zusätzlich 1 mM Pascorbin® zugefügt, um Effekte, die ausschließlich von Pascorbin® erzeugt werden, erfassen zu können. Die Gruppen B4 bis B6 bilden die Kombination von Pascorbin® mit den Sepsis-Medikamenten Vitamin B1 und Hydrocortison bzw. beiden Medikamenten. Die Gruppen B7 bis B9 dienen dementsprechend als Referenz ohne Pascorbin®.

<b>Behandlungsgruppen Versuchsreihe II</b>	
B1	500.000 PBMCs + Medium (Kontrolle)
B2	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml)
B3	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml) + Pascorbin® (1 mM)
B4	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml) + Pascorbin® (1 mM) + Vitamin B1 (1 µM)
B5	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml) + Pascorbin® (1 mM) + Hydrocortison (2 µM)
B6	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml) + Pascorbin® (1 mM) + Vitamin B1 (1 µM) + Hydrocortison (2 µM)
B7	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml) + Vitamin B1 (1 µM)
B8	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml) + Hydrocortison (2 µM)
B9	500.000 PBMCs + LPS (10 ng/ml) + Vitamin B1 (1 µM) + Hydrocortison (2 µM)

**Abbildung 7: Behandlungsgruppen Versuchsreihe II**

Die Behandlung der PBMCs erfolgte in der zweiten Versuchsreihe in neun Gruppen (jeweils in Dupletts) mittels Inkubation für sechs Stunden. Die Gruppe B1 diente als Kontrolle und wurde daher nur mit Medium behandelt. Die Gruppe B2 diente als Referenzwert zur Beurteilung der Reaktion der PBMCs auf die Stimulation mit LPS. In den Gruppen B3 bis B6 wurden die Kombination von Pascorbin® mit den Sepsis-Medikamenten Vitamin B1 und Hydrocortison bzgl. ihrer Effekte auf PBMCs untersucht. Die Gruppen B7 bis B9 dienten als Referenz für die Gruppen B4 bis B6 und enthielten daher kein Pascorbin®. B = Behandlung; LPS = Lipopolysaccharid; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells.

Alle Behandlungen wurden in Dupletts in einer 24-Well-Platte durchgeführt (siehe Abbildung 8). Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für sechs Stunden bei 37 °C und einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>.



**Abbildung 8: Plattenlayout Versuchsreihe II**

Gezeigt ist der Versuchsaufbau der Versuchsreihe II. Die PBMCs wurden entsprechend der Behandlungsgruppen aus Abbildung 7 jeweils in Dupletts in einer 24-Well-Platte mittels Inkubation für sechs Stunden behandelt. B = Behandlung; HC = Hydrocortison; LPS = Lipopolysaccharid; P. = Pascorbin®; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; Vit. = Vitamin.

## **2.14 Analyse von Zellzahl und Zellviabilität nach Behandlung**

Im Anschluss an die Behandlung wurden sowohl die Zellzahl pro ml als auch die Zellviabilität in % für jede Behandlungsgruppe mittels des „Countess II FL Automated Cell Counter“ automatisiert gemessen. Dazu wurden die Zellen in der 24-Well-Platte nach 5:30 Stunden des Versuchs resuspendiert, 1+1 mit Trypanblau vermischt und dann in die Kammer eines „Countess™ cell counting chamber slides“ pipettiert.

## **2.15 Probengewinnung und -verwendung**

Nach der Messung von Zellzahl und Zellviabilität der einzelnen Behandlungsgruppen wurde die Zelllösung jedes Wells in einem 1,5 ml Eppendorf Röhrchen gesammelt und bei 4 °C für 2 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand in vier Aliquots mit je 100 µl in 0,5 ml Eppendorf Röhrchen gesammelt.

Pro Spender ergeben sich bei acht Behandlungsgruppen in Versuchsreihe I damit 16 Zellpellet-Proben und 64 Überstand-Proben pro Spender; in Versuchsreihe II ergeben sich aus neun Behandlungsgruppen insgesamt 18 Zellpellet-Proben und 72 Überstand-Proben pro Spender.

Alle Proben wurden bei - 80 °C zwischengelagert. Die Zellpellet-Proben wurden zur Isolierung von RNA, anschließender cDNA-Synthese und darauffolgend der Untersuchung der Expression verschiedener Gene mittels qPCR verwendet. Die Überstand-Proben wurden mittels LEGENDplex™ bearbeitet und anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

## 2.16 Analyse von sezernierten Zytokinen

### 2.16.1 LEGENDplex™

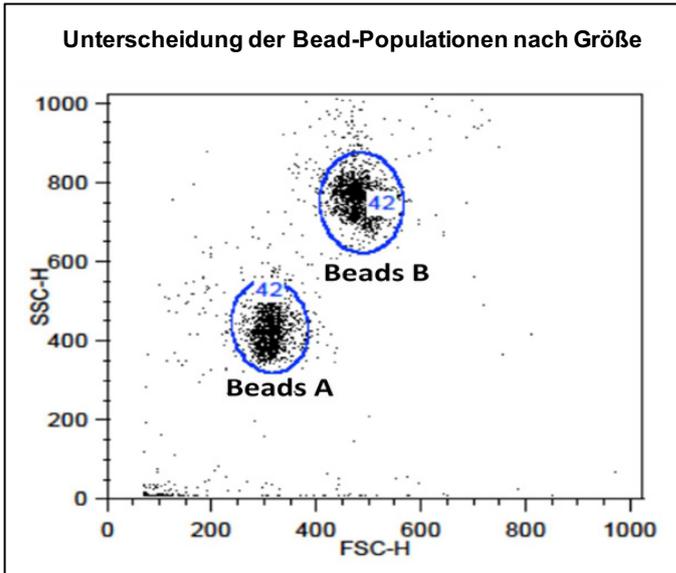
Zur Analyse von sezernierten Zytokinen wurde der immunologische Multiplex-Assay LEGENDplex™ der Firma BioLegend® verwendet. Mit dem „Human Inflammation Panel 1“ können insgesamt 13 Zytokine (Tabelle 12) untersucht werden. Der Multiplex-Assay basiert auf dem Sandwich-Prinzip, bei dem der Analyt von zwei Antikörpern gebunden wird. Durch die Verwendung unterschiedlicher sog. *Beads* können mehrere Analyten in der gleichen Probe bestimmt werden.

Die Beads sind fluoreszenz-markierte Partikel, die sich in ihrer Größe unterscheiden. Anhand dessen können die Beads in zwei Populationen (A und B) eingeteilt werden. Die Beadpopulation A umfasst die kleineren Beads; die Beadpopulation B enthält die größeren Beads (Abbildung 9). Innerhalb einer Population können die Beads zusätzlich anhand unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten unterschieden werden (Abbildung 10).

**Tabelle 12: Analytierte Zytokine des LEGENDplex™ "Human Inflammation Panel 1"**

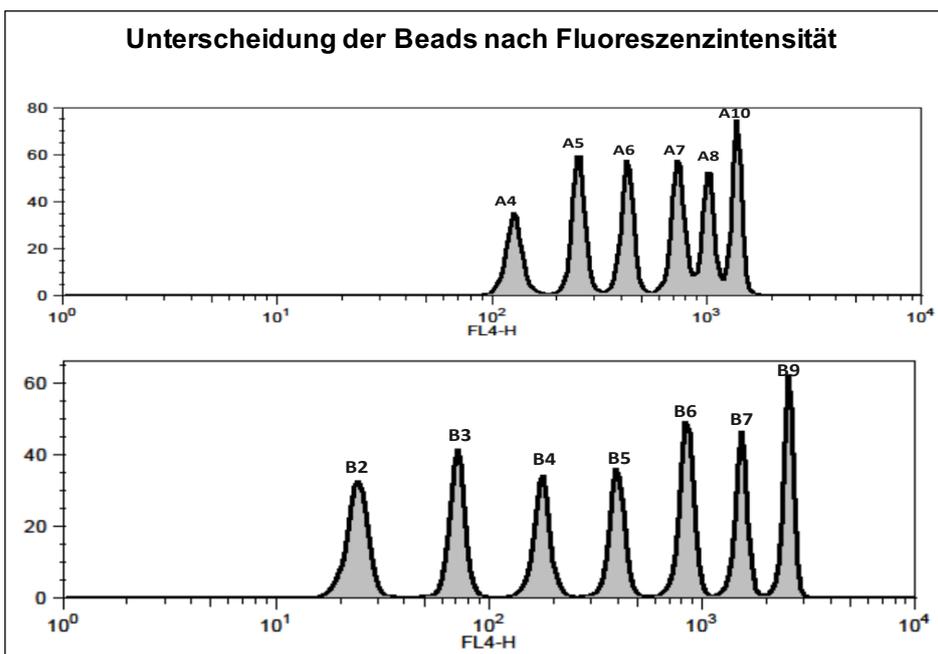
Angegeben sind die Abkürzungen der Zytokine, die jeweils zugehörige Bead-ID und die Ausgangskonzentration der Zytokine im unverdünnten Standard (modifiziert nach: BioLegend, 2015).

Zytokin	Bead ID	Konzentration im Standard (pg/ml)
IL-1 $\beta$	A4	10.000
IFN- $\alpha$ 2	A5	10.000
IFN- $\gamma$	A6	10.000
TNF- $\alpha$	A7	10.000
MCP-1	A8	10.000
IL-6	A10	10.000
IL-8	B2	10.000
IL-10	B3	10.000
IL-12p70	B4	10.000
IL-17A	B5	2.500
IL-18	B6	10.000
IL-23	B7	10.000
IL-33	B9	25.000



**Abbildung 9: Unterscheidung der Bead-Populationen anhand ihrer Größe**

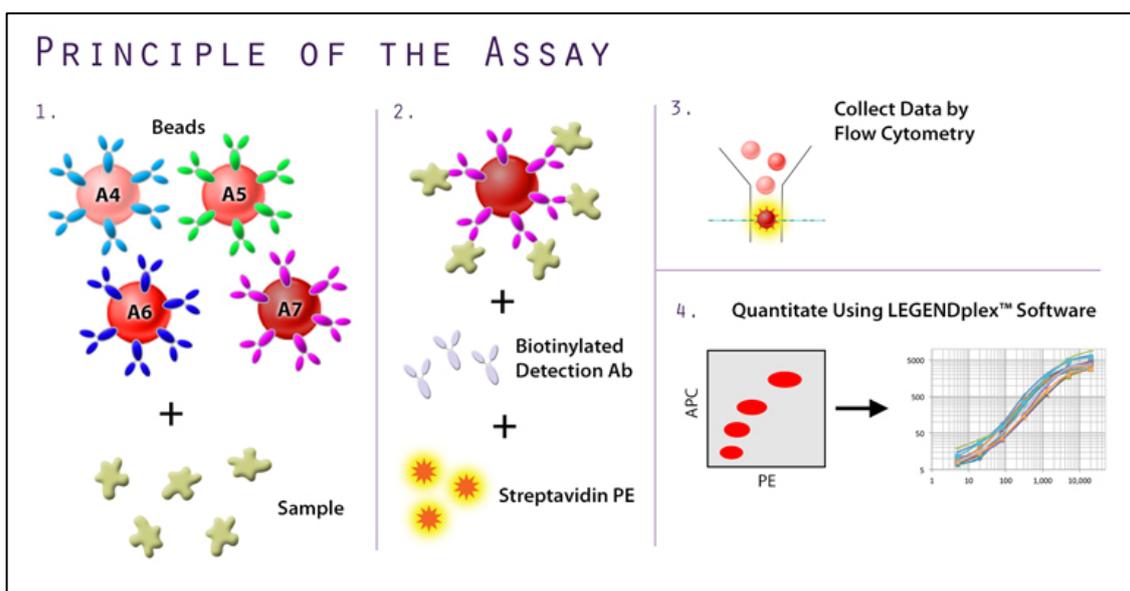
Anhand ihrer Größe und Oberflächenbeschaffenheit können zwei Beadpopulationen unterschieden werden. Die Beads der Population A sind kleiner, die Beads der Population B sind größer. Gemessen werden diese Unterschiede anhand des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes der verschiedenen Beads. SSC-H = Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter height); FSC-H = Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter height) (modifiziert nach: BioLegend, 2015).



**Abbildung 10: Unterscheidung der Beads anhand ihrer Fluoreszenzintensität**

Innerhalb der Beadpopulationen können die einzelnen Beads anhand ihrer Fluoreszenzintensität unterschieden werden. Die Beadpopulation A (oben) umfasst sechs verschiedene Beads, die Beadpopulation B (unten) enthält insgesamt sieben verschiedene Beads. FL4-H = Fluoreszenzkanal 4-Height (modifiziert nach: BioLegend, 2015).

Auf der Oberfläche der Beads befinden sich die jeweiligen Nachweisantikörper (Abbildung 11 / 1.). Nach der Bindung der Beads an die jeweiligen Analyten erfolgt die Bindung biotinylierter Detektionsantikörper an die Analyte. Durch die Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin und dessen Bindung an den biotinylierten Anteil der Detektionsantikörper, wird die Fluoreszenzintensität der Analyten gleichermaßen verstärkt und so die zur Messung nötige Fluoreszenzintensität erreicht (Abbildung 11 / 2.). Die anschließende Fluoreszenzmessung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 11 / 3.).



**Abbildung 11: Funktionsweise des Multiplex-Assays LEGENDplex™**

Im ersten Schritt (1.) werden die Proben zu den Beads dazugegeben. Über spezifische Antikörper (Nachweisantikörper) auf der Oberfläche der Beads werden bestimmte Moleküle in der Probe an unterschiedliche Beads gebunden. Im zweiten Schritt (2.) bindet ein biotinylierter Detektionsantikörper an die Moleküle aus der Probe. Bei diesem sog. Sandwich-Prinzip wird das gesuchte Molekül von zwei verschiedenen Antikörpern gebunden, dem Nachweis- und dem Detektionsantikörper. Über die Bindung von Streptavidin-PE (Phycoerythrin) wird die Fluoreszenz proportional zur Menge der gebundenen Antikörper erhöht. Dadurch wird eine quantitative Messung mittels Durchflusszytometrie (3.) möglich. Anschließend kann nach der Ermittlung einer Standardkurve die genaue Konzentration der Analyten (pg/ml) in der Probe mit Hilfe der LEGENDplex™ Analysesoftware ermittelt werden. Ab = Antikörper; PE = Phycoerythrin; APC = Allophycocyanin, (<https://www.biolegend.com/en-us/legendplex>, Stand: 27.08.2019).

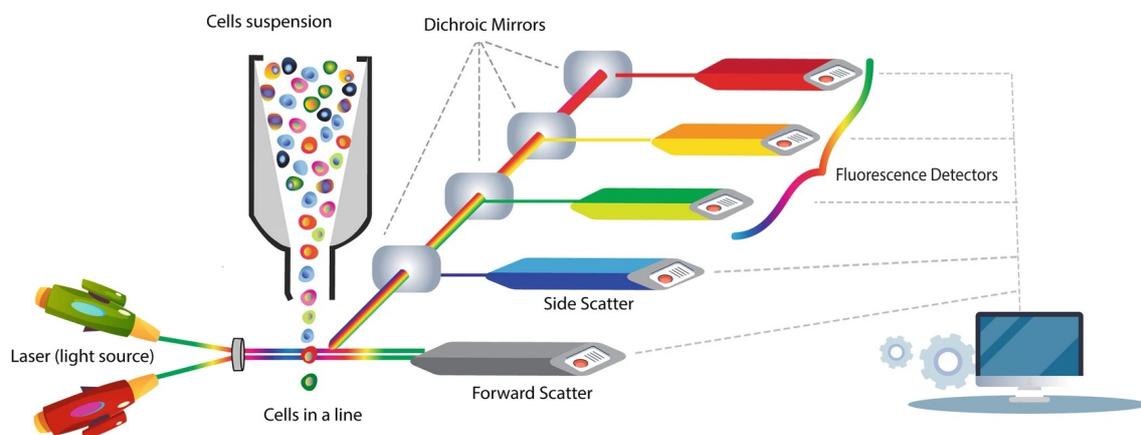
Abweichend von den Hersteller-Angaben wurde bei der Durchführung des Kits von allen Reagenzien außer dem Waschpuffer das halbe Volumen eingesetzt. Im Anschluss wurden alle Proben 1+1 mit PBS verdünnt, um die Nachweisgrenze einiger Zytokine nicht zu überschreiten.

### 2.16.2 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie können Zellen oder entsprechende Partikel (z.B. die Beads) anhand ihrer optischen Eigenschaften und ihrer Fluoreszenz unterschieden und quantitativ gemessen werden.

Dabei passieren die Zellen bei variabler Flussrate einzeln einen Mikrokanal mit einem Laserstrahl, wodurch die Zellen anhand ihrer optischen Eigenschaften unterschieden werden können (Abbildung 12). Die FSC-Diode (engl. forward scatter) misst das Vorwärtsstreulicht, das vom Volumen einer Zelle abhängt. Die SSC-Diode (engl. side scatter) misst das Seitwärtsstreulicht, das von der Granularität der Zelle, also ihrer Oberflächenbeschaffenheit, abhängt.

Zusätzlich kann auch anhand der Fluoreszenz zwischen Zellen, die mit unterschiedlichen fluoreszenz-markierten Antikörpern markiert sind, unterschieden werden. Dies erfolgt über verschiedene Fluoreszenzkanäle. Das Messergebnis ist dabei proportional zur Menge der gebundenen Antikörper.



**Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers**

Zellen passieren einen Mikrokanal mit einem Laserstrahl, wodurch die Zellen anhand ihrer optischen Eigenschaften unterschieden werden können. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) hängt vom Volumen einer Zelle ab, das Seitwärtsstreulicht (SSC) von dessen Oberflächenbeschaffenheit. Zusätzlich können die markierten Zellen über verschiedene Fluoreszenzkanäle differenziert werden (Proserpio, Conti, & Oliviero, 2022).

Für beide Versuchsreihen wurde das Durchflusszytometer BD™ LSR II mit der Analysesoftware FACSDiva™ verwendet; es wurden hierfür jeweils 400 µl der sog. Raw Beads verwendet (s. LEGENDplex™ Labor Manual). Zum Einstellen der jeweiligen Zellpopulationen, die innerhalb einer frei wählbaren Region liegen ("zum Gaten"), wurden entsprechende Grenzen gesetzt. Für die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC) wurde eine Wellenlängenemission von 575-585 nm bzw. 660 nm konfiguriert. Über die Einstellung "300 events to record, 4000 events to display" wurde die Messung nach 300 Ereignissen automatisch angehalten und die Durchflussgeschwindigkeit automatisch angepasst.

Durch die Ermittlung einer Standardkurve kann bei der Auswertung der Daten mittels der LEGENDplex™ Analysesoftware (Version 8.0) die Konzentration der Zytokine (pg/ml) bestimmt werden (Abbildung 11 / 4.).

## 2.17 Analyse der Expression ausgewählter Gene

### 2.17.1 RNA-Isolierung

#### 2.17.1.1 Versuchsreihe I

Die Isolierung der RNA aus Zellpellets erfolgte mit dem „RNeasy Micro-Kit“ der Firma Qiagen. Dabei wurden die Duplikate jeder Behandlungsgruppe eines Spenders gepoolt und anschließend zu jeder Probe 350 µl Lysepuffer mit β-Mercaptoethanol zugegeben. Diese Lösung wurde zum Aufbrechen der Zellen und zur Homogenisierung der Probe 15-mal durch eine Spritze mit einer Kanüle von 0,8 mm Durchmesser auf- und abgezogen. Anschließend wurden 350 µl 70 % Ethanol zupipettiert und danach die Lösung auf die „RNeasy MinElute spin column“ (Säule) gegeben. Diese wurde bei 11.000 g für 15 s zentrifugiert. Danach wurden 350 µl „RW1 Wash Buffer“ zugegeben und für 15 s bei 11.000 g zentrifugiert. Darauf folgte ein DNase-Verdau über 15 min bei RT, wobei jeweils 70 µl „RDD Buffer“ und 10 µl DNase auf die Säulen gegeben wurde. Im Anschluss wurden 350 µl „RW1 Wash Buffer“ zugegeben und für 15 s bei 11.000 g zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 500 µl „RPE Buffer“ auf die Säule gegeben und erneut für 15 s bei 11.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl 80 % Ethanol auf die Säule gegeben und für 2 min bei 11.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde dann für 5 min bei 11.000 g trocken zentrifugiert. Daraufhin wurde die RNA durch Zugabe von 16 µl RNase-freiem Wasser und einminütiger Zentrifugation bei 11.000 g in einem neuen 1,5 ml Röhrchen eluiert. Die RNA wurde anschließend bei - 80 °C gelagert.

#### 2.17.1.2 Versuchsreihe II

Für die Versuchsreihe II wurden die Zellpellets bei der Probengewinnung direkt in jeweils 175 µl Lysepuffer bei - 80 °C gelagert. Die Isolierung der RNA erfolgte anschließend mit dem „RNeasy Micro-Kit“ der Firma Qiagen. Dabei wurden die Duplikate jeder Behandlungsgruppe eines Spenders gepoolt und die Zellen dabei resuspendiert. Zum Aufbrechen der Zellen und zur Homogenisierung der Probe wurden die Shredder-Säulen der Firma Qiagen verwendet. Die Zentrifugation

erfolgte bei 11.000 g für 2 min. Anschließend wurden 350 µl 70 % Ethanol dazu gegeben und die Lösung wurde auf die „RNeasy MinElute spin column“ (Säule) transferiert. Diese wurde bei 11.000 g für 15 s zentrifugiert. Danach wurden 350 µl „RW1 Wash Buffer“ zugegeben und für 15 s bei 11.000 g zentrifugiert. Darauf folgte ein DNase-Verdau bei RT über 15 min, wobei jeweils 70 µl „RDD Buffer“ und 10 µl DNase auf die Säulen gegeben wurden. Im Anschluss wurden 350 µl „RW1 Wash Buffer“ zugegeben und für 15 s bei 11.000 g zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 500 µl „RPE Buffer“ auf die Säule gegeben und erneut für 15 s bei 11.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl 80 % Ethanol auf die Säule gegeben und für 2 min bei 11.000 g zentrifugiert. Die Säule wurde dann für 5 min bei 11.000 g trocken zentrifugiert. Daraufhin wurde die RNA durch Zugabe von 16 µl RNase-freiem Wasser und einminütiger Zentrifugation bei 11.000 g in einem neuen 1,5 ml Röhrchen eluiert. Die RNA wurde anschließend bei - 80 °C gelagert.

### 2.17.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit je 12,5 µl RNA durchgeführt. Der Ansatz wurde im ersten Schritt (siehe Tabelle 13) für 10 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss an das Annealing wurde der Ansatz auf Eis gestellt; es wurden unverzüglich 7,5 µl des Mastermixes (siehe Tabelle 14) hinzugefügt. Darauf folgte der zweite Schritt der Synthese (siehe Tabelle 13). Die cDNA wurde bei - 20 °C aufbewahrt.

**Tabelle 13: Reaktionsschritte der cDNA-Synthese**

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Schritt 1: Annealing	70 °C	10 min
Schritt 2: cDNA-Synthese und Hitzeinaktivierung	25 °C	10 min
	50 °C	30 min
	85 °C	5 min

Tabelle 14: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese pro Ansatz

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Nuclease-freies Wasser	1 $\mu$ l
5x Reverse Transkriptase Puffer	4 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	1 $\mu$ l
Hexamer Primer (100 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Reverse Transkriptase	0,5 $\mu$ l

### 2.17.3 Quantitative PCR

Die kodierenden Sequenzen für *ATF 3*, *TNF- $\alpha$*  und *IL-6* (VR I) bzw. *TNF- $\alpha$* , *MCP 1*, *IL-6* und *IL-23* (VR II) wurden aus cDNA mit folgendem PCR-Ansatz amplifiziert:

Tabelle 15: Reaktionsansatz für qPCR

<b>Komponenten</b>	<b>Volumen</b>
cDNA	1 $\mu$ l
Go Taq <sup>®</sup> qPCR 2x Master Mix	5 $\mu$ l
Primer forward (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ l
Primer reverse (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ l
RNase freies Wasser	3,6 $\mu$ l

Alle Proben wurden im 96-Kavitäten-Format mit dem LightCycler<sup>®</sup> 96-System der Firma Roche analysiert (Programm siehe Tabelle 16). Die Amplifikation der qPCR wurden in 40 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 16: Reaktionsschritte der qPCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Schritt 1: Inkubation	95 °C	3 min
Schritt 2: Amplifikation in 40 Zyklen	95 °C	10 s
	60 °C	10 s
	72 °C	10 s
Schritt 3: Schmelzkurve	95 °C	10 s
	60 °C	10 s
	97 °C	1 s
Schritt 4: Abkühlen auf 37 °C		

Für die Analyse der Daten wurde die LightCycler® 96-Software der Firma Roche verwendet. Die Ergebnisse wurden gegen die Expression von  $\beta$ -Actin (*ACTB*) und TATA-Box-Bindungsprotein (*TBP*) als Haushalts-Gene, die nicht reguliert werden und daher weitestgehend unabhängig von äußeren Einflüssen durch die Zelle exprimiert werden, normalisiert.

#### 2.17.4 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 8.4); der jeweils verwendete Test wurde benannt. Die verschiedenen Signifikanzniveaus sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Verwendete Signifikanzniveaus

Signifikanzniveau	Symbol	P-Wert
Statistisch signifikant	*	$\leq 0,05$
	**	$\leq 0,01$
	***	$\leq 0,001$
	****	$\leq 0,0001$

### 3 Ergebnisse

Mit dieser Arbeit sollte der Einfluss von hochdosiertem Vitamin C in Kombination mit Vitamin B1 und Hydrocortison in einem Modell mit menschlichen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) im Rahmen einer möglichen Sepsis-Dreifachtherapie untersucht werden. Als Vitamin C-Quelle wurde das klinisch zugelassene Präparat Pascorbin® der Firma Pascoe pharmazeutische Präparate GmbH (Gießen) eingesetzt, das 7.5 g Ascorbinsäure in 50 ml einer Trägerlösung, bestehend aus Natriumhydrogencarbonat und Wasser, für Injektionszwecke enthält. Weiter wurde zur Zytokin-Induktion eine standardisierte Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation (10 ng/ml) als anerkannter und etablierter Sepsis-Stimulus verwendet (Dickson & Lehmann, 2019).

Damit wurden folgende Fragestellungen in dieser Arbeit untersucht, die bereits unter Abschnitt 1.5 Ziele der Arbeit aufgeführt wurden und an dieser Stelle zur Übersicht nochmals genannt werden sollen:

1. Geht von Vitamin C ein zytotoxischer Effekt auf Zellen des Immunsystems aus?
2. Geht von Vitamin C ein Zytokin-alterierender Effekt auf Zellen des Immunsystems aus?
3. Wie wirkt sich Vitamin C auf Zellen des Immunsystems aus, wenn diese zuvor mit LPS stimuliert wurden?
4. Bei welchen Konzentrationen zeigt Vitamin C einen Effekt bzgl. der Zytokin-Muster von Zellen des Immunsystems, die zuvor mit LPS stimuliert wurden?
5. Wie verhält sich Vitamin C im Vergleich zu Hydrocortison oder Vitamin B1 bzgl. der im LEGENDplex™ Zytokin-Panel definierten Zytokine?
6. Welchen Effekt haben verschiedene Kombinationen von Vitamin C, Hydrocortison und Vitamin B1 auf die Zytokin-Muster von Zellen des Immunsystems, die zuvor mit LPS stimuliert wurden?

Anmerkung:

Teile der Daten dieser Promotionsarbeit wurden bereits im Jahr 2021 veröffentlicht (Lauer et al., 2021); dementsprechend werden in dieser Promotionsarbeit aus der englisch gefassten Originalarbeit von Lauer et al., 2021 übernommene (und ins Deutsche übertragene) Textabschnitte sowohl mit "Anführungszeichen" als auch in *kursiver Schrift* gesondert ausgewiesen, so dass die Herkunft dieser Passagen jederzeit rückführbar ist. Darüber hinaus kommen in den nachfolgenden Ergebnisteilen auch Originalabbildungen dieser Veröffentlichung zur Darstellung und werden ebenfalls als aus der Originalarbeit entnommen explizit gekennzeichnet.

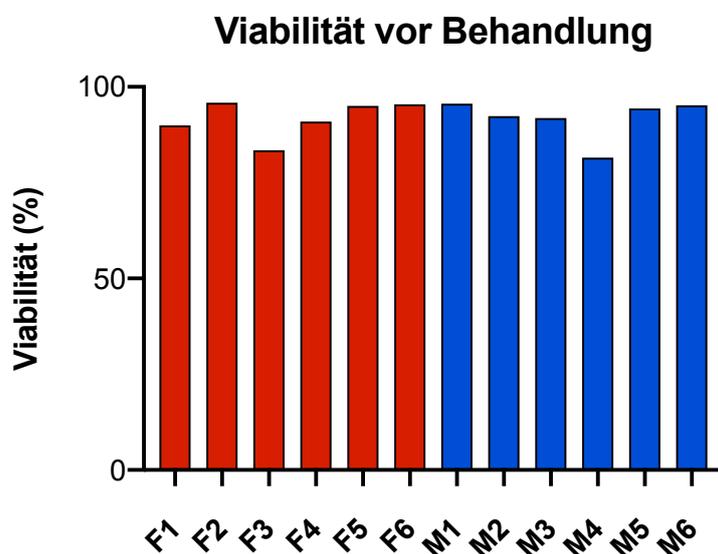
### **3.1 Testung verschiedener Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulierung (VR I)**

Die Testung verschiedener Pascorbin®-Konzentrationen mit und ohne LPS-Stimulation (Versuchsreihe I - VR I) wurde in acht Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 5) durchgeführt, die an PBMCs von zwölf Spendern angewendet wurden. Davon waren sechs Spender männlich und sechs Spenderinnen weiblich.

In Kurzform sah der Versuchsablauf wie folgt aus: Vor Beginn des Versuches erfolgte die Isolierung der PBMCs. Anschließend wurde deren Viabilität gemessen. Pro Well wurden dann 500.000 vitale PBMCs eingesetzt. Die Inkubation der PBMCs innerhalb der acht Behandlungsgruppen erfolgte über sechs Stunden. Anschließend wurde in allen Behandlungsgruppen erneut die Viabilität der PBMCs gemessen. Die Zellsuspension wurde im Anschluss in einem Eppendorf Röhrchen gesammelt und abzentrifugiert. Die daraus erhaltenen Zellpellet-Proben wurden zur Isolierung von RNA, anschließender cDNA-Synthese und schließlich der Untersuchung verschiedener Gene mittels qPCR verwendet. Der Überstand der Zellpellets wurde separat gelagert und zur Durchführung der LEGENDplex™ Analyse und der anschließenden Messung mittels Durchflusszytometrie verwendet.

### 3.1.1 Viabilitätsanalyse vor der Behandlung der PBMCs mit Pascorbin®

Im Anschluss an die Isolierung der PBMCs wurde deren Viabilität gemessen, um bei jedem Spender mit der gleichen Anzahl lebender Zellen den Versuch zu starten. Die Messung der Viabilität der PBMCs wurde automatisiert mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ durchgeführt. Pro Spender wurde je eine Messung durchgeführt. In Abbildung 13 ist der Anteil der lebenden Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der gemessenen Zellen (Viabilität in %) dargestellt. Die Werte der weiblichen Spenderinnen (F1-F6) sind rot dargestellt, während die Werte der männlichen Spender (M1-M6) blau dargestellt sind.



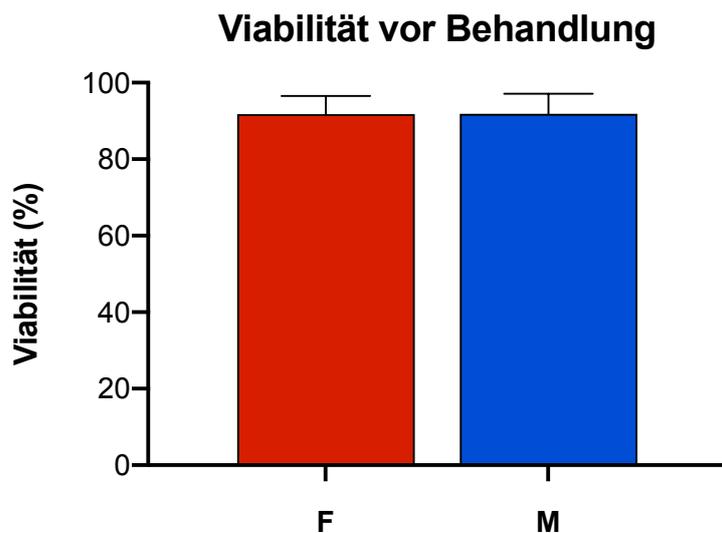
**Abbildung 13: Viabilität von PBMCs vor Behandlung (VR I)**

Die Viabilität der PBMCs wurde automatisiert mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ gemessen. Dargestellt sind die Werte in Prozent für die einzelnen Spender, wobei für jeden Spender eine Messung erfolgte. Diese Abbildung entspricht der Supplement Figure 2 aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Entsprechend der Werte aus Abbildung 13 wurden von jedem Spender pro Well 500.000 lebende Zellen im Versuch eingesetzt. Dadurch wurden die oben gezeigten Unterschiede der Zellviabilität durch den Einsatz der gleichen Anzahl viable Zellen vor Beginn des Versuches ausgeglichen.

Aus den in Abbildung 13 dargestellten Werten für die Viabilität der PBMCs ergeben sich die Mittelwerte für die sechs weiblichen Spenderinnen (F, in Rot dargestellt) und die sechs männlichen Spender (M, in Blau dargestellt) in Abbildung 14. Zwischen den beiden Geschlechtern ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Viabilität vor Behandlung mit Pascorbin®.



**Abbildung 14: Viabilität von PBMCs vor Behandlung (nach Geschlecht, VR I)**

Die Viabilität der PBMCs wurde automatisiert mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ (Life technologies Corp., Bothell, USA) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern in Prozent und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Viabilität.

F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe, Welch`s T-Test.

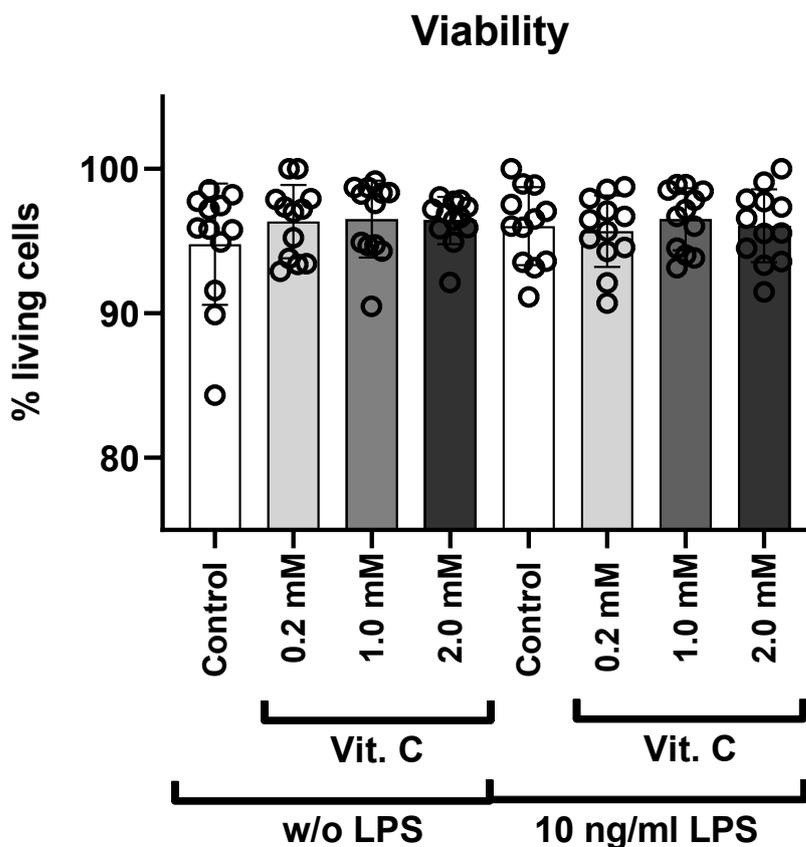
Somit konnte hier kein Einfluss des Geschlechtes auf die Viabilität von PBMCs nach deren Isolierung festgestellt werden.

### 3.1.2 Viabilitätsanalyse nach der Behandlung der PBMCs mit Pascorbin®

Diese Analyse wurde kurz gefasst wie folgt durchgeführt: Die PBMCs wurden sechs Stunden lang in acht verschiedenen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 5) inkubiert. Eine Gruppe stellt die unbehandelte Kontrolle dar (B1); die behandelte Kontrolle (B2) wurde mit LPS stimuliert, um so einen Sepsis-Zustand zu simulieren. Drei weitere Gruppen wurden mit LPS stimuliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Pascorbin® behandelt (B6-B8). Die restlichen drei Gruppen (B3-B5) entsprechen den verschiedenen Pascorbin®-Konzentrationen, wurden aber nicht mit LPS stimuliert und dienten somit als Referenz für die Gruppen B6-B8.

Im Anschluss an die LPS-Behandlung wurde die Viabilität der PBMCs automatisiert mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ gemessen. Pro Spender wurde für jede Behandlungsgruppe eine Messung durchgeführt. Diese Messung der Viabilität diente der Überprüfung möglicher von LPS und Pascorbin® ausgehender zytotoxischer Effekte. Eine folglich erhöhte Zelltodrate würde die weiteren Ergebnisse der Untersuchung von sezernierten Zytokinen verfälschen, da intrazelluläre Bestandteile freigesetzt werden könnten.

In Abbildung 15 sind die Mittelwerte aller Spender für die acht Behandlungsgruppen sowie die entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den acht Behandlungsgruppen.



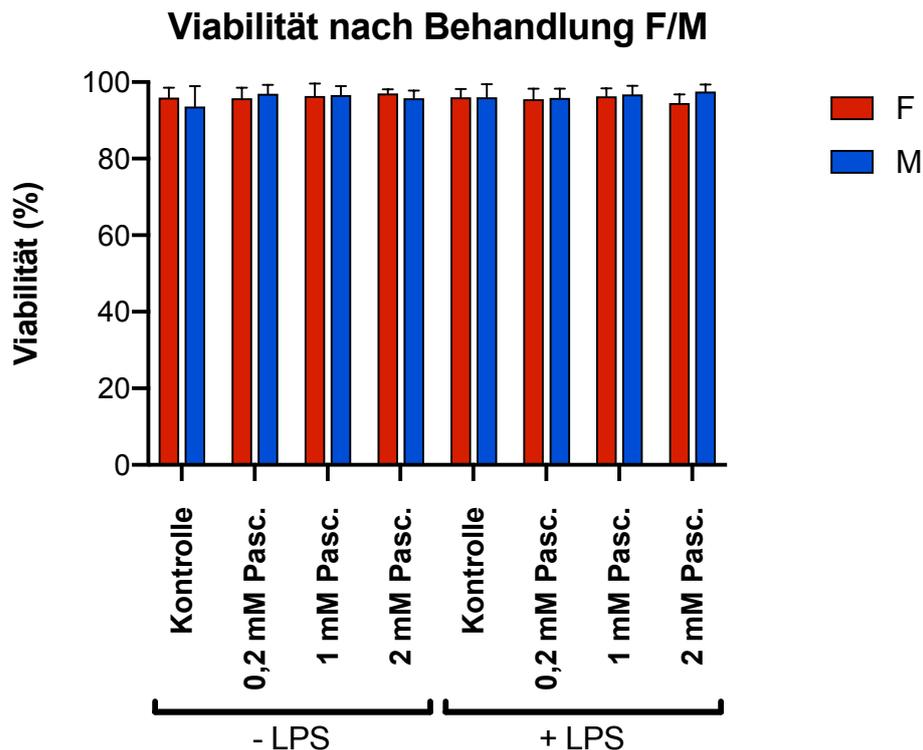
**Abbildung 15: Viabilität von PBMCs nach Behandlung (VR I)**

Die Viabilität der PBMCs wurde mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ automatisiert gemessen. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Vitamin C / Pascorbin®-Konzentrationen, sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Vitamin C / Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern in Prozent und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Viabilität. Diese Abbildung entspricht der Figure 1A aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Tukey`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, VR = Versuchsreihe, Vit. C = Vitamin C / Pascorbin®, w/o = ohne, LPS = Lipopolysaccharid.

Damit konnte festgestellt werden, dass sowohl LPS als auch Pascorbin® in den eingesetzten Konzentrationen keine zytotoxischen Effekte ausüben.

In Abbildung 16 wird, entsprechend den Werten von Abbildung 15, die Viabilität aufgetrennt nach Geschlecht gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen pro Behandlungsgruppe für beide Geschlechter.



**Abbildung 16: Viabilität von PBMCs nach Behandlung (nach Geschlecht, VR I)**

Die Viabilität der PBMCs wurde mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ automatisiert gemessen. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen, sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern in Prozent und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Viabilität, sowohl zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen als auch zwischen den beiden Geschlechtern.

Sidak`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Pasc. = Pascorbin®, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Auch zwischen den beiden Geschlechtern konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede, sowohl innerhalb einer Behandlungsgruppe als auch zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen, festgestellt werden.

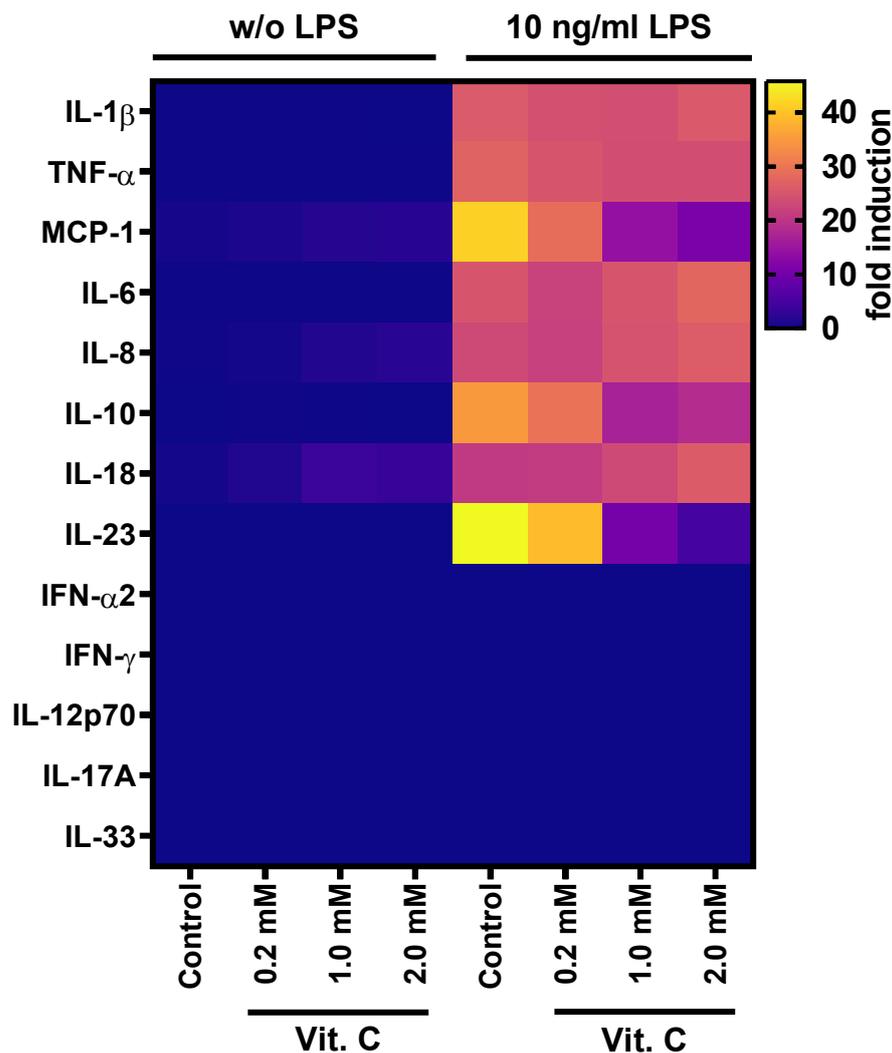
Somit kann gefolgert werden, dass von LPS und Pascorbin® in den eingesetzten Konzentrationen kein geschlechtsspezifischer Effekt auf die Viabilität der PBMCs ausgeht.

### 3.1.3 Analyse der Zytokin-Sezernierung von PBMCs nach Behandlung mit Pascorbin®

Mittels LEGENDplex™ Analyse wurde der Überstand der PBMCs von insgesamt zwölf Spendern nach sechs Stunden Behandlung (genaues Behandlungsschema siehe Abbildung 5) untersucht. Alle Proben wurden in biologischen Duplikaten gemessen. Die Auswertung der Daten nach Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgte mit der Software FACSDiva™. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden mit Hilfe einer Standardlösung mit acht verschiedenen Konzentrationen und der daraus ermittelten Standardkurve quantifiziert.

Abbildung 17 gibt einen Überblick über alle mittels LEGENDplex™ untersuchten Zytokine für die verschiedenen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 5). In dieser Heatmap-Analyse wird die relative Intensität der gemessenen Zytokine im Vergleich zur Kontrolle ohne LPS (der Wert der Kontrolle ohne LPS wurde auf 1 gesetzt; die Werte der Kontrolle mit LPS-Stimulation wurden ebenfalls ins Verhältnis zur Kontrolle ohne LPS gesetzt) dargestellt.

Von den insgesamt 13 untersuchten Analyten (siehe Tabelle 12) lagen fünf unter der Nachweisgrenze (IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , IL-12p70, IL17A und IL-33). Die anderen acht Zytokine wurden unter LPS-Stimulation deutlich mehr sezerniert als ohne LPS-Stimulation. Zur besseren Übersicht kommen daher in Abbildung 18 bis Abbildung 22 nur statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen unter LPS-Stimulation zur Darstellung.



**Abbildung 17: Verhältnis der Konzentration von 13 sezernierten Zytokinen (VR I)**

Die Konzentration von 13 verschiedenen Zytokinen wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Die Heatmap-Analyse zeigt die relative Intensität der gemessenen Zytokine im Vergleich zur Kontrolle ohne LPS. Diese Abbildung entspricht der Figure 1B aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Vit. C = Vitamin C / Pascorbin®, w/o = ohne, „fold induction“ = relative Intensität, VR = Versuchsreihe.

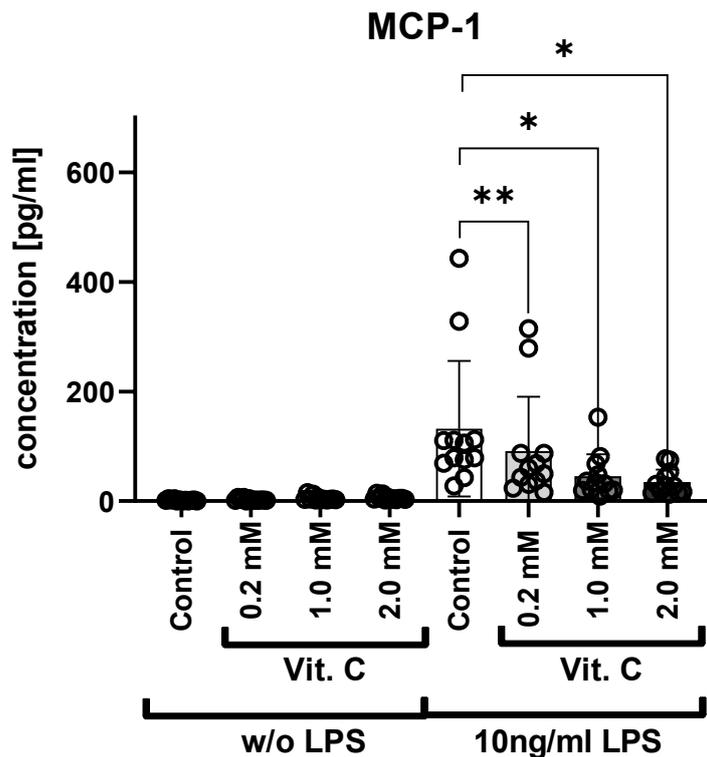
Die Ergebnisse der acht sezernierten Zytokine sind im Folgenden dargestellt. Bei drei dieser Zytokine konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Pascorbin®-Konzentrationen nach LPS-Stimulation festgestellt werden.

Ziel der Untersuchung von sezernierten Zytokinen war die Frage, ob Pascorbin® in der Lage ist, die Reaktion von PBMCs auf die Stimulation durch LPS zu beeinflussen und wenn ja, bei welcher Konzentration ein solcher Effekt auftritt. Gleichzeitig wurde untersucht, ob Pascorbin® selbst einen Zytokin-alterierenden Effekt auf PBMCs hat.

Bei den Messungen der Konzentration sezernierter Zytokine ergaben sich für alle acht Zytokine oberhalb der Nachweisgrenze hohe Standardabweichungen. Diese kommen durch die großen interindividuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern zustande, vor allem bzgl. der Höhe der gemessenen Konzentrationen an Zytokinen. Dennoch ergaben sich bei drei Zytokinen (MCP-1, IL-10 und IL-23) statistisch signifikante Unterschiede in der Sezernierung.

In Abbildung 18 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentration von sezerniertem MCP-1 aller Spender in pg/ml dargestellt. Während MCP-1 in den Behandlungsgruppen ohne LPS-Stimulation kaum sezerniert wird, konnte bei den Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation eine deutlich höhere Konzentration von MCP-1 gemessen werden. Innerhalb der vier Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation konnte eine statistisch signifikante Abnahme der MCP-1-Konzentration in den Behandlungsgruppen mit Pascorbin® gegenüber der ausschließlich mit LPS behandelten Kontrolle festgestellt werden.

Die Abnahme der absoluten MCP-1-Konzentration unter Pascorbin® korreliert mit der eingesetzten Konzentration. Die Reduktion der Konzentration von MCP-1 ist bei 0,2 mM Pascorbin® im Vergleich zur behandelten Kontrolle statistisch hoch signifikant (\*\*,  $p \leq 0,01$ ). Bei Pascorbin®-Konzentrationen von 1 mM und 2 mM ist die Konzentration von MCP-1 im Vergleich zur behandelten Kontrolle ebenfalls statistisch signifikant (\*,  $p \leq 0,05$ ) reduziert. Somit kann festgestellt werden, dass sich eine Reduktion der MCP-1-Konzentration nach LPS-Stimulation bei allen eingesetzten Pascorbin®-Konzentrationen zeigte.



**Abbildung 18: Konzentration von sezerniertem MCP-1 (VR I)**

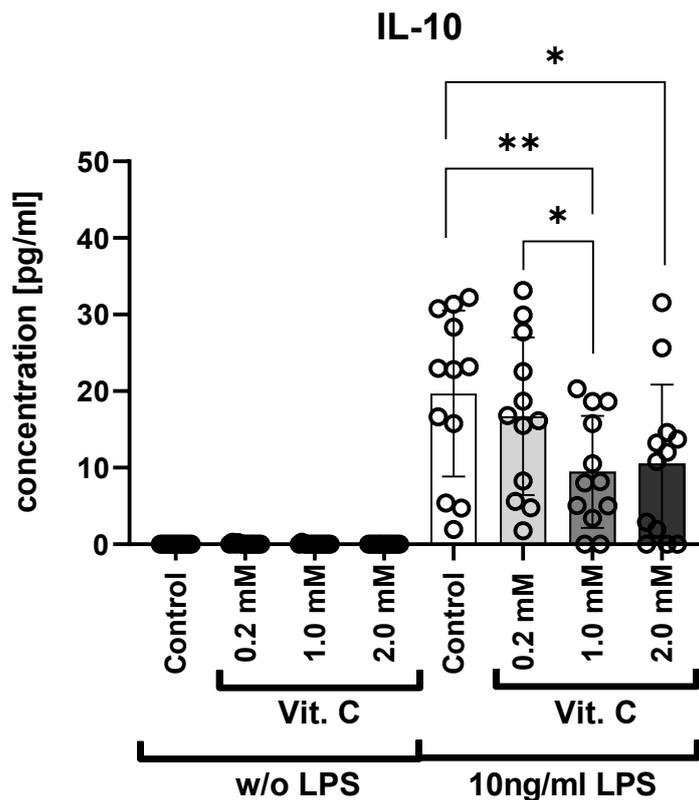
Die Konzentration von MCP-1 wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen (0,2 mM / 1 mM / 2 mM) sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Diese Abbildung entspricht der Figure 2C aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Tukey`s-multiple-comparison-Test, \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Vit. C = Vitamin C / Pascorbin®, VR = Versuchsreihe.

Weitere statistisch signifikante Veränderungen in der Sezernierung von Zytokinen ergaben sich bei IL-10. In Abbildung 19 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentration von sezerniertem IL-10 in pg/ml dargestellt.

In den Behandlungsgruppen ohne LPS-Stimulation wird IL-10 nicht sezerniert. Bei den Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation konnte dagegen eine deutlich erhöhte Konzentration von IL-10 gemessen werden.

Innerhalb der vier Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation konnte eine statistisch signifikante Abnahme der Konzentration an IL-10 in Behandlungsgruppen mit Pascorbin® gegenüber der ausschließlich mit LPS behandelten Kontrolle ab einer Pascorbin®-Konzentration von 1 mM festgestellt werden.



**Abbildung 19: Konzentration von sezerniertem IL-10 (VR I)**

Die Konzentration von IL-10 wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen (0,2 mM / 1 mM / 2 mM), sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Diese Abbildung entspricht der Figure 2F aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Tukey`s-multiple-comparison-Test, \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Vit. C = Vitamin C / Pascorbin®, VR = Versuchsreihe, (modifiziert nach: Lauer et al., 2021).

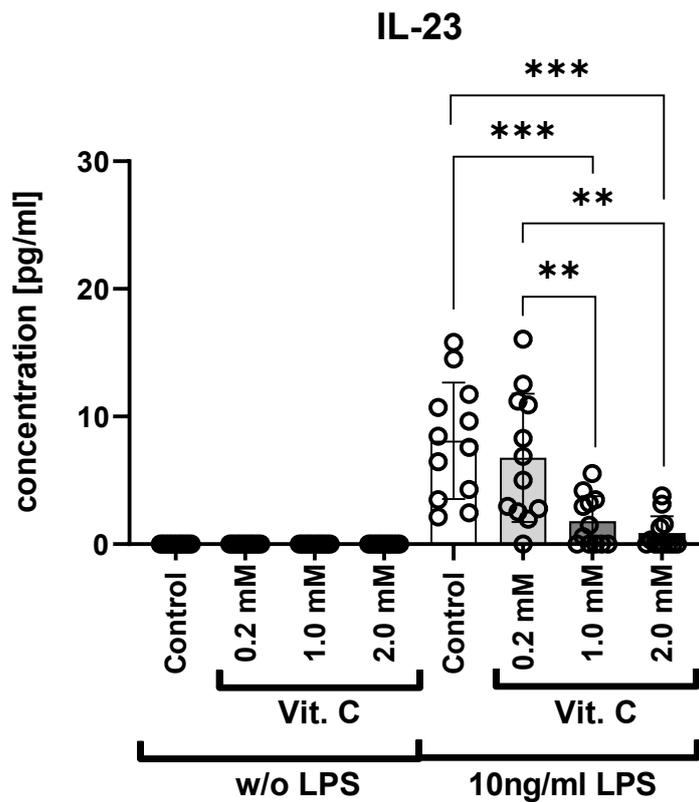
Die Reduktion der Konzentration von IL-10 ist bei 1 mM Pascorbin® im Vergleich zur behandelten Kontrolle statistisch hoch signifikant (\*\*,  $p \leq 0,01$ ). Die IL-10-Konzentration bei 1 mM Pascorbin® ist außerdem gegenüber der IL-10-Konzentration bei 0,2 mM Pascorbin® statistisch signifikant (\*,  $p \leq 0,05$ ) erniedrigt. Die Konzentration von IL-10 bei 2 mM Pascorbin® ist im Vergleich zur behandelten Kontrolle ebenfalls statistisch signifikant (\*,  $p \leq 0,05$ ) reduziert. Somit scheint Pascorbin® die Konzentration von sezerniertem IL-10 unter LPS-Stimulation ab Konzentrationen von 1 mM Pascorbin® statistisch signifikant zu reduzieren.

Das dritte Molekül, bei dem statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Behandlung mit und ohne Pascorbin® unter LPS-Stimulation festzustellen waren, ist IL-23. Abbildung 20 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Konzentration von sezerniertem IL-23 in pg/ml.

In den Behandlungsgruppen ohne LPS-Stimulation wird IL-23 nicht sezerniert. Die vier Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation zeigen im Gegensatz dazu höhere IL-23-Konzentrationen. Dabei erfolgte unter Behandlung mit Pascorbin® erneut eine statistisch signifikante Abnahme der Zytokin-Konzentration.

Bei Pascorbin®-Konzentrationen von 1 mM und 2 mM ist die Reduktion der IL-23-Konzentration gegenüber der mit LSP stimulierten Kontrolle statistisch sehr hoch signifikant (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ). Für die Pascorbin®-Konzentrationen von 0,2 mM konnte keine statistisch signifikante Reduktion der Konzentration von IL-23 nachgewiesen werden. Zudem ist die IL-23-Konzentration bei Behandlung mit 1 mM und 2 mM Pascorbin® gegenüber der unter Behandlung mit 0,2 mM Pascorbin® ebenfalls statistisch hoch signifikant (\*\*,  $p \leq 0,01$ ) erniedrigt.

Folglich ergibt sich unter den hier zur Anwendung gekommenen Untersuchungsbedingungen eine relevante Reduktion der IL-23-Konzentration unter LPS-Stimulation bei Behandlung mit einer Pascorbin®-Konzentrationen ab 1 mM.



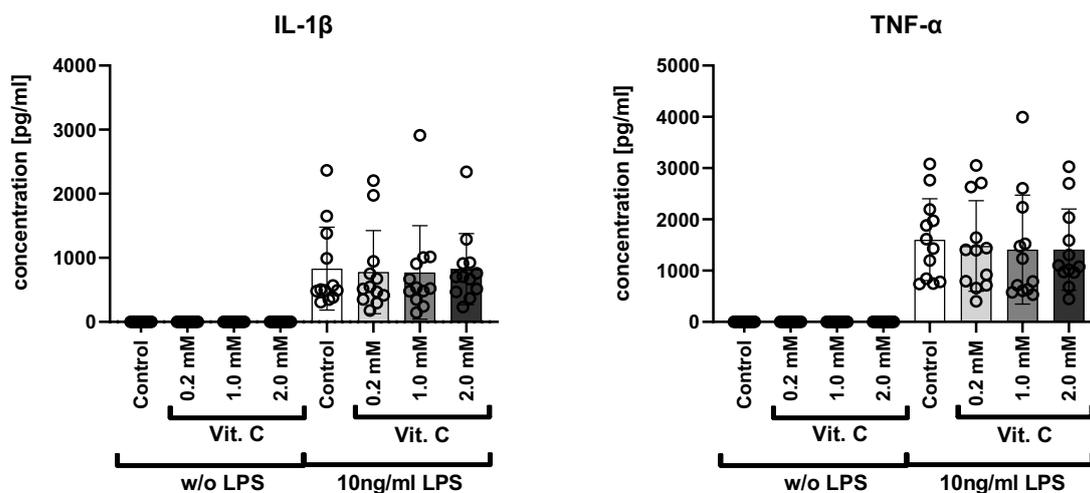
**Abbildung 20: Konzentration von sezerniertem IL-23 (VR I)**

Die Konzentration von IL-23 wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen (0,2 mM / 1 mM / 2 mM), sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Diese Abbildung entspricht der Figure 2H aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Tukey`s-multiple-comparison-Test, \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Vit. C = Vitamin C / Pascorbin®, VR = Versuchsreihe, (modifiziert nach: Lauer et al., 2021).

Die weiteren fünf Zytokine, bei denen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlung mit und ohne Pascorbin® unter LPS-Stimulation zu sehen waren, sind IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-18. Diese sind in Abbildung 21 und Abbildung 22 dargestellt. Die Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 wurden ohne LPS-Stimulation nicht sezerniert; die Zytokine IL-8 und IL-18 wurde ohne LPS-Stimulation lediglich schwach sezerniert.

Bei allen fünf Molekülen war die Zytokin-Sekretion unter LPS-Stimulation deutlich höher als ohne Behandlung mit LPS. Des Weiteren konnte bei keinem der fünf Zytokine aus Abbildung 21 und Abbildung 22 ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit oder ohne Pascorbin® festgestellt werden.

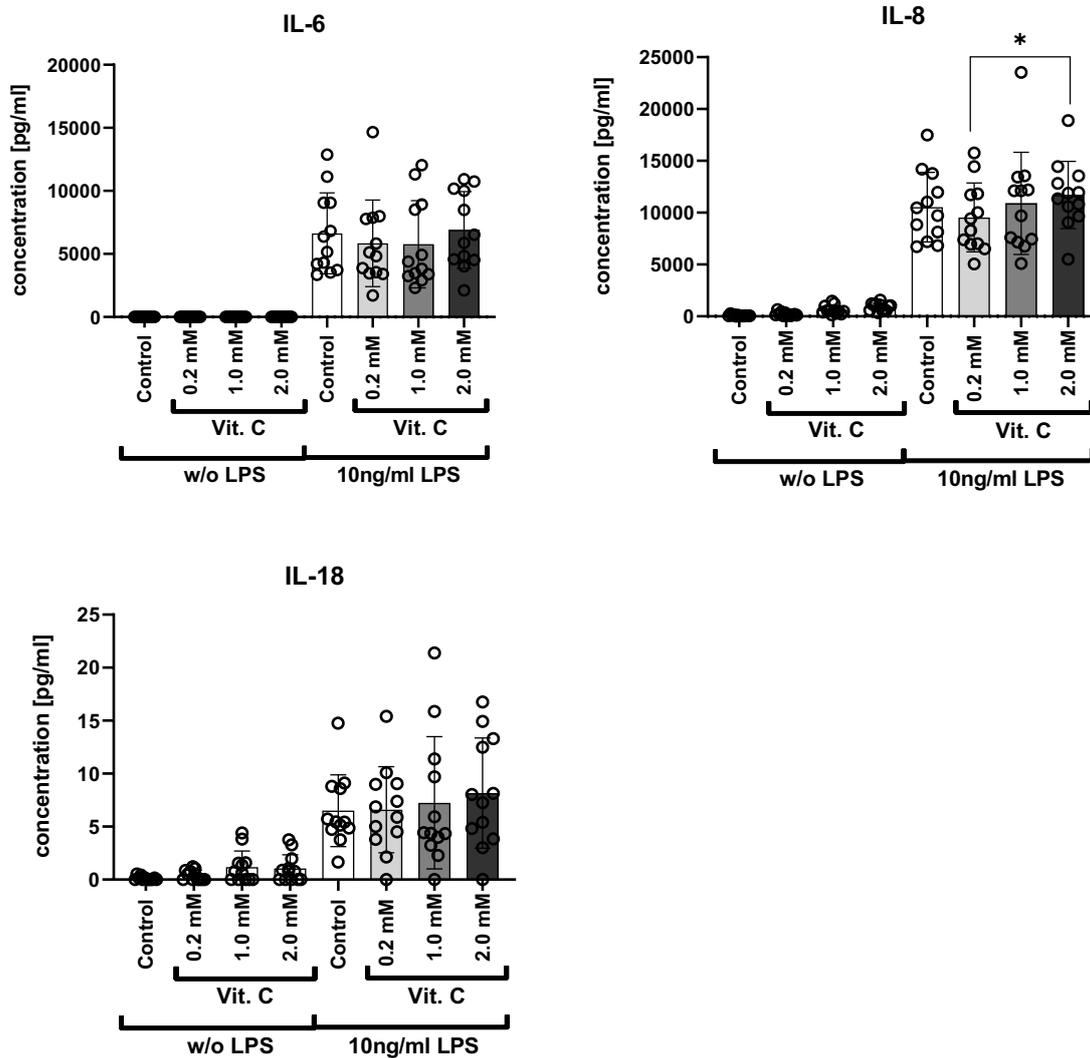


**Abbildung 21: Konzentration von sezernierten Zytokinen (VR I, Teil 1)**

Die Konzentration der sezernierten Zytokine wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen (0,2 mM / 1 mM / 2 mM), sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Sekretion von IL-1 $\beta$  bzw. TNF- $\alpha$  zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Diese Abbildung entspricht der Figure 2A/B aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Tukey`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Vit. C = Vitamin C / Pascorbin®, VR = Versuchsreihe, (modifiziert nach: Lauer et al., 2021).

Lediglich bei IL-8 ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied (\*,  $p \leq 0,05$ ) in der Konzentration zwischen der Behandlung mit 0,2 mM und 2 mM Pascorbin® unter LPS-Stimulation. Dabei war die Konzentration von sezerniertem IL-8 unter Behandlung mit 2 mM Pascorbin® höher als unter Behandlung mit 0,2 mM Pascorbin®.

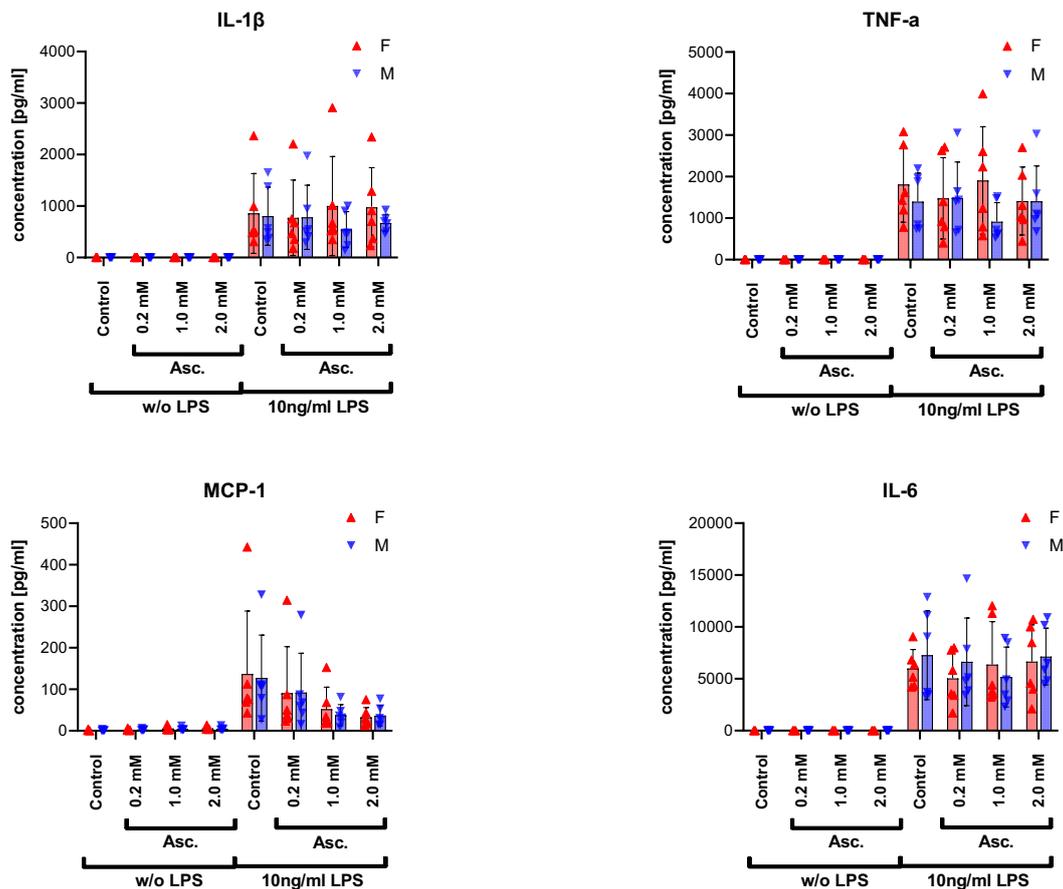


**Abbildung 22: Konzentration von sezernierten Zytokinen (VR I, Teil 2)**

Die Konzentration der sezernierten Zytokine wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen (0,2 mM / 1 mM / 2 mM), sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Diese Abbildung entspricht der Figure 2D/E/G aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Tukey's-multiple-comparison-Test, \*:  $p \leq 0.05$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Vit. C = Vitamin C / Pascorbin®, VR = Versuchsreihe, (modifiziert nach: Lauer et al., 2021).

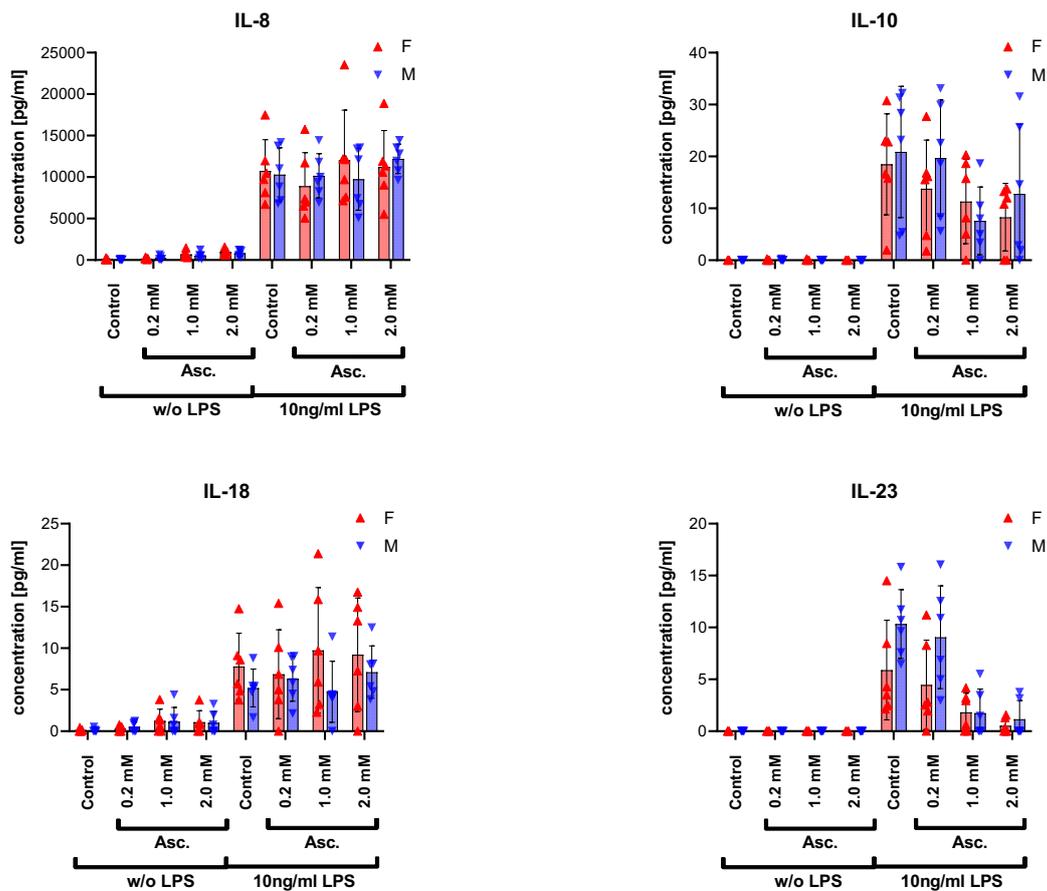
Auch im Vergleich der beiden Geschlechter ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die dazugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen für die acht messbaren Zytokine sind in Abbildung 23 und Abbildung 24 dargestellt; Frauen in Rot, Männer in blau.



**Abbildung 23: Konzentration von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR I, Teil 1)**

Die Konzentration der sezernierten Zytokine wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen, sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Sezernierung der verschiedenen Zytokine zwischen den beiden Geschlechtern. Die statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 18 bis Abbildung 21 dargestellt. Diese Abbildung entspricht der Supplement Figure 3A/B/C/D aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Sidak's-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Asc. = Ascorbat / Vitamin C / Pascorbin®, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.



**Abbildung 24: Konzentration von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR I, Teil 2)**

Die Konzentration der sezernierten Zytokine wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen (0,2 mM / 1 mM / 2 mM), sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Sezernierung der verschiedenen Zytokine zwischen den beiden Geschlechtern. Die statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 18 bis Abbildung 21 dargestellt. Diese Abbildung entspricht der Supplement Figure 3E/G/F/H aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Sidak`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Asc. = Ascorbat / Vitamin C / Pascorbin®, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Die Sezernierung der 13 untersuchten Zytokine scheint somit unter den hier gewählten Versuchsbedingungen keinem geschlechtsspezifischem Effekt zu unterliegen.

Die beiden Grafiken enthalten keine Aussagen zu statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen, da diese bereits in den vorangegangenen Abbildungen gezeigt wurden.

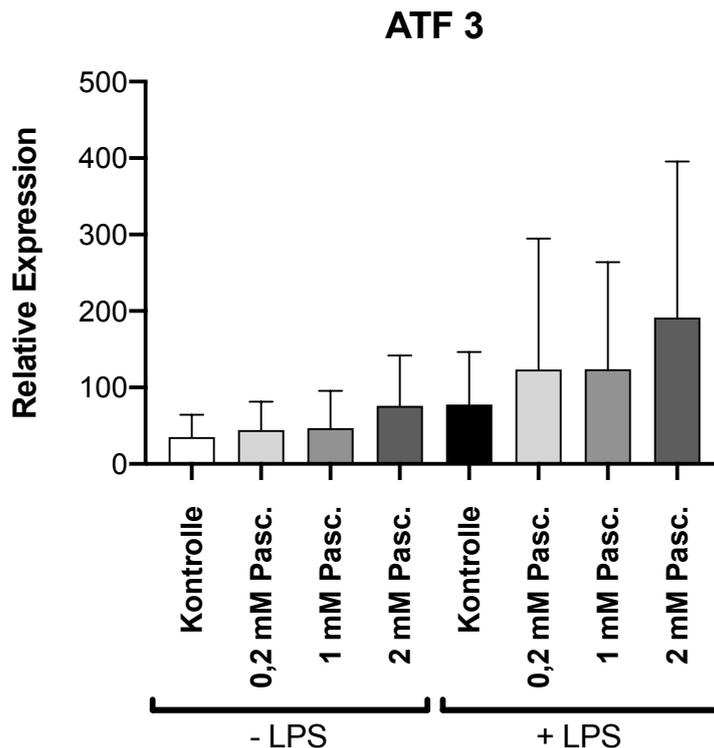
Zur besseren Übersichtlichkeit wurde die statistische Auswertung zu Abbildung 23 und Abbildung 24 ausschließlich bezüglich geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Zytokin-Sezernierung vorgenommen.

### 3.1.4 Analyse der Genexpression von PBMCs nach Behandlung mit Pascorbin®

Im Vorfeld der Genexpressionsanalyse wurde RNA aus Zellpellets isoliert (mit Hilfe des RNeasy Micro-Kits der Firma Qiagen). Diese RNA wurde anschließend in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Untersucht wurde dabei die Expression der Zytokine *IL-6* und *TNF- $\alpha$* , sowie von *ATF 3*, deren Expression durch unterschiedliche Stresssituationen in verschiedensten Zellen induziert wird (Chen et al. 1996; Hai et al. 1999).

Die Ergebnisse wurden gegen die Expression von *ACTB*, *TBP* und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) normalisiert. Diese Gene werden weitestgehend unabhängig von äußeren Einflüssen durch die Zelle exprimiert und dienen somit als Referenz für die Stoffwechselaktivität der Zellen.

In Abbildung 25 sind die Mittelwerte aller Spender für die Expression von *ATF 3* in den acht Behandlungsgruppen sowie die entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. *ATF 3* wurde in allen Behandlungsgruppen exprimiert, auch in den Behandlungsgruppen ohne LPS-Stimulation. Weder in der Behandlungsgruppen ohne LPS-Stimulation (in Abbildung 25 linksseitig dargestellt) noch in der Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation (in Abbildung 25 rechtsseitig dargestellt) ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede.

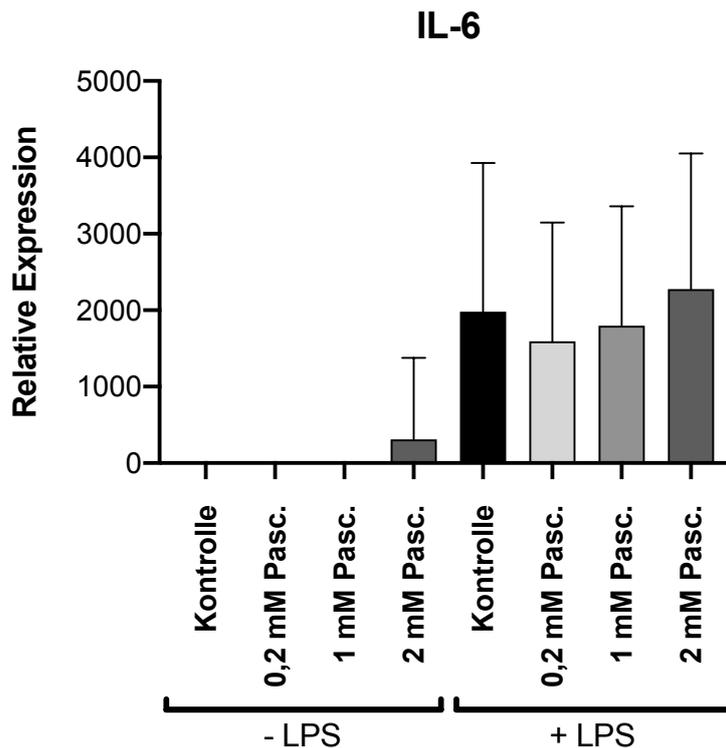


**Abbildung 25: Expression von ATF 3 (VR I)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB*, *TBP* und *GAPDH* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin<sup>®</sup>-Konzentrationen sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin<sup>®</sup>-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Expression von ATF 3.

Tukey`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Pasc. = Pascorbin<sup>®</sup>, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, *GAPDH* = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, VR = Versuchsreihe.

In Abbildung 26 sind die Mittelwerte aller Spender für die Expression von *IL-6* in den acht Behandlungsgruppen sowie die entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. In den Behandlungsgruppen ohne LPS-Stimulation wurde *IL-6* ausschließlich in der Behandlungsgruppe mit 2 mM Pascorbin<sup>®</sup> exprimiert, während in allen Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation eine Expression von *IL-6* deutlich zu sehen ist. Zur besseren Übersicht kommen daher nur statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen unter LPS-Stimulation zur Darstellung. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den vier Behandlungsgruppen unter LPS-Stimulation.

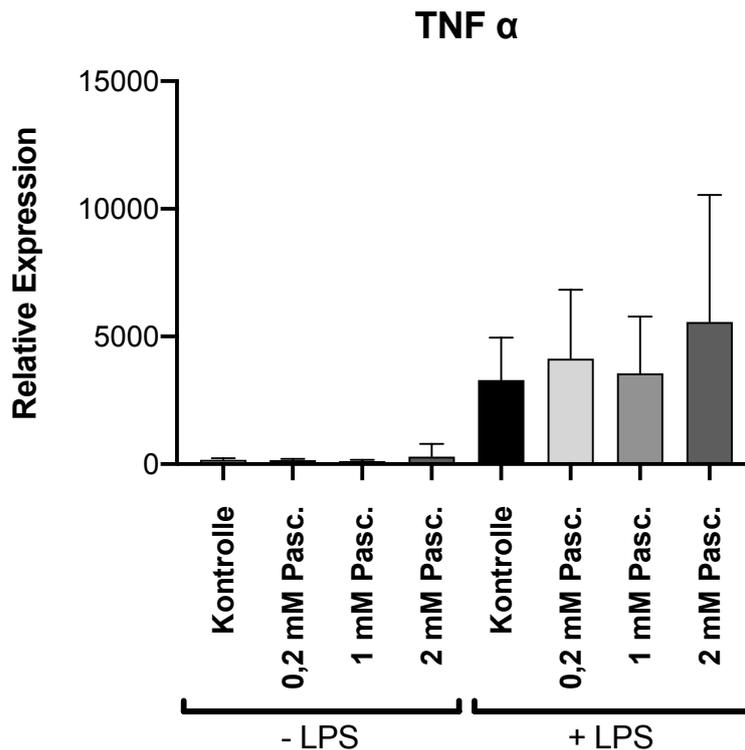


**Abbildung 26: Expression von *IL-6* (VR I)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB*, *TBP* und *GAPDH* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Expression von *IL-6*.

Tukey`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Pasc. = Pascorbin®, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, *GAPDH* = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, VR = Versuchsreihe.

In Abbildung 27 sind die Mittelwerte aller Spender für die Expression von *TNF- $\alpha$*  in den acht Behandlungsgruppen sowie die entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. *TNF- $\alpha$*  wurde in allen Behandlungsgruppen exprimiert, auch in den Behandlungsgruppen ohne LPS-Stimulation. Die Expression von *TNF- $\alpha$*  war in den Behandlungsgruppen unter LPS-Stimulation allerdings deutlich höher. Zur besseren Übersicht kommen daher nur statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen unter LPS-Stimulation zur Darstellung. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den vier Behandlungsgruppen unter LPS-Stimulation.

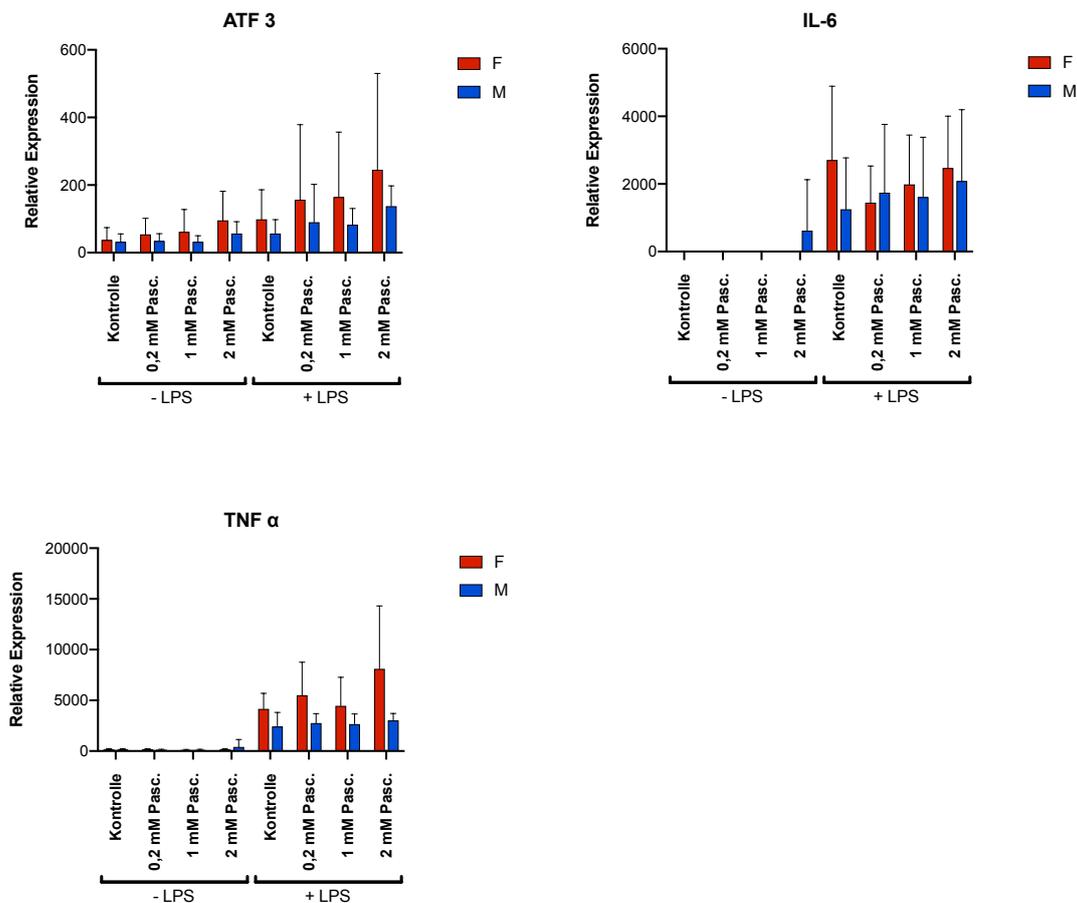


**Abbildung 27: Expression von *TNF- $\alpha$*  (VR I)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB*, *TBP* und *GAPDH* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin<sup>®</sup>-Konzentrationen sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin<sup>®</sup>-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Expression von *TNF- $\alpha$* .

Tukey`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Pasc. = Pascorbin<sup>®</sup>, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, *GAPDH* = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, VR = Versuchsreihe.

In Abbildung 28 wird, entsprechend den Werten von Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27, die Expression von *ATF 3*, *IL-6* und *TNF- $\alpha$*  aufgetrennt nach Geschlecht gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen pro Behandlungsgruppe für beide Geschlechter; Frauen in Rot, Männer in Blau.



**Abbildung 28: Expression verschiedener Gene nach Geschlecht (VR I)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB*, *TBP* und *GAPDH* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle und drei verschiedene Pascorbin®-Konzentrationen sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und die drei Pascorbin®-Konzentrationen unter LPS-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Expression verschiedener Gene zwischen den beiden Geschlechtern. Die statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 25 bis Abbildung 27 untersucht worden.

Sidak`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Pasc. = Pascorbin®, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, *GAPDH* = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Im Ergebnis dieser Analyse konnten zwischen den beiden Geschlechtern keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Expression von *ATF 3*, *IL-6* und *TNF- $\alpha$*  scheint somit unter den hier gewählten Versuchsbedingungen keinem geschlechtsspezifischem Effekt zu unterliegen.

Zur besseren Übersichtlichkeit wurde die statistische Auswertung zu Abbildung 28 ausschließlich bezüglich geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Genexpression innerhalb einer Behandlungsgruppe vorgenommen. Abbildung 28 enthält somit keine Aussagen zu statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen, da diese bereits in den vorangegangenen Abbildungen gezeigt wurden.

### 3.1.5 Schlussfolgerungen aus Versuchsreihe I

Eine relevante Reduktion der IL-10- und IL-23-Konzentration unter LPS-Stimulation im Vergleich zur mit LPS stimulierten Kontrolle wurde ab der Behandlung mit einer Pascorbin®-Konzentrationen von 1 mM statistisch signifikant. Bei MCP-1 war das bereits bei einer Pascorbin®-Konzentrationen von 0,2 mM der Fall.

Anhand dieser Ergebnisse der Zytokinseznierung des ersten Versuchsteils wurde im zweiten Versuchsteil die Behandlung mit Pascorbin® mit einer Konzentration von 1 mM durchgeführt.

In der Genexpressionsanalyse von *ATF 3*, *IL-6* und *TNF- $\alpha$*  zeigten sich in der ersten Versuchsreihe keine statistisch signifikanten Veränderungen.

Aufgrund der Ergebnisse der Zytokinseznierung von MCP-1 und IL-23 wurde die Genexpressionsanalyse im zweiten Versuchsteil um diese beiden Analyten ergänzt.

Sowohl bei der Sezernierung verschiedener Zytokine als auch bei der Expressionsanalyse verschiedener Gene ergaben sich hohe Standardabweichungen aufgrund interindividueller Unterschiede in der Höhe der gemessenen Zytokinkonzentration bzw. der Genexpression. Zum Ausgleich dieser interindividuellen Unterschiede zwischen den Spendern und der besseren Beurteilung der Auswirkung der verschiedenen Behandlungsgruppen auf die Zytokinseznierung bzw. die Genexpression, wurden die absoluten Konzentrationen an Zytokinen sowie die relative Expression verschiedener Gene im zweiten Versuchsteil gegen die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisiert. Die Konzentration der mit LPS stimulierten Kontrolle wurde dabei auf 100 % festgesetzt. Die Normalisierung erfolgte für jeden Spender einzeln. Im Anschluss erfolgte die statistische Analyse anhand der sich daraus ergebenden Mittelwerte für die verschiedenen Behandlungsgruppen.

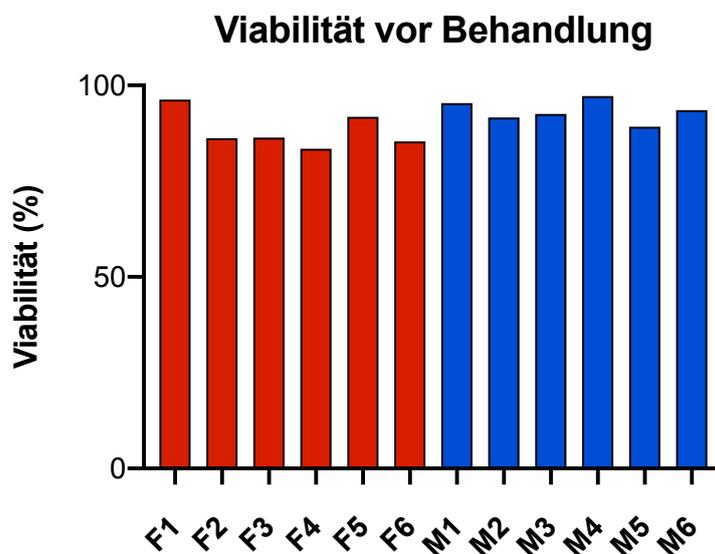
### **3.2 Testung von Pascorbin® in Kombination mit ausgewählten Sepsis-Medikamenten (VR II)**

Die Testung von Pascorbin® in Kombination mit ausgewählten Sepsis-Medikamenten (Versuchsreihe II - VR II) wurde in insgesamt neun Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 7) mit PBMCs von insgesamt zwölf Spendern durchgeführt. Davon waren sechs Spender männlich und sechs weiblich. Zusätzlich zu Pascorbin® wurden Vitamin B1 und Hydrocortison zur Behandlung der PBMCs verwendet.

Vor Beginn des Versuches erfolgte die Isolierung der PBMCs. Anschließend wurde deren Viabilität gemessen. Pro Well wurden 500.000 vitale PBMCs eingesetzt. Die Inkubation der PBMCs innerhalb der neun Behandlungsgruppen erfolgte über sechs Stunden. Anschließend wurde die Viabilität der PBMCs in allen Behandlungsgruppen erneut gemessen. Die Zellsuspension wurde im Anschluss in einem Eppendorf-Röhrchen gesammelt und abzentrifugiert. Die daraus erhaltenen Zellpellet-Proben wurden zur Isolierung von RNA, anschließender cDNA-Synthese und schließlich der Untersuchung verschiedener Gene mittels qPCR eingesetzt. Der Überstand der Zellpellets wurde separat gelagert und zur Durchführung der LEGENDplex™-Analyse und anschließender Messung mittels Durchflusszytometrie verwendet.

### 3.2.1 Viabilitätsanalyse vor der Behandlung der PBMCs mit mehreren Wirkstoffen

Im Anschluss an die Isolation der PBMCs wurde analog zur Versuchsreihe I deren Viabilität gemessen, um bei jedem Spender wieder mit der gleichen Anzahl an vitalen Zellen den Versuch zu starten. Die Messung der Viabilität der PBMCs wurde automatisiert mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ durchgeführt. Pro Spender erfolgte je eine Messung. In Abbildung 29 ist der Anteil der lebenden Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der gemessenen Zellen (Viabilität in %) für die Versuchsreihe II dargestellt. Die Werte der weiblichen Spender (F1-F6) sind rot dargestellt, während die Werte der männlichen Spender (M1-M6) blau dargestellt sind.



**Abbildung 29: Viabilität von PBMCs vor Behandlung (VR II)**

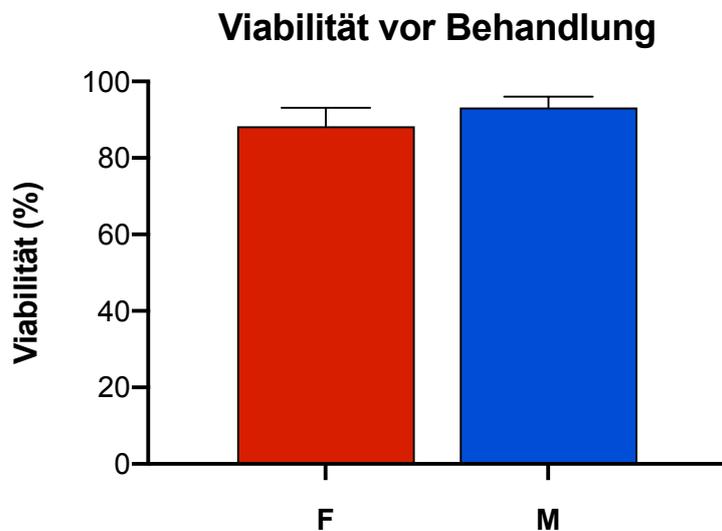
Die Viabilität der PBMCs wurde mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ automatisiert gemessen. Dargestellt sind die Werte in Prozent für die einzelnen Spender, wobei für jeden Spender eine Messung erfolgte. Diese Abbildung entspricht der Supplement Figure 4 aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Entsprechend der Werte aus Abbildung 29 wurden von jedem Spender pro Well 500.000 vitale Zellen im Versuch eingesetzt. Dadurch wurden die oben gezeigten Unterschiede der Zellviabilität durch den Einsatz der gleichen Anzahl viabler Zellen vor Beginn des Versuches ausgeglichen.

Aus den in Abbildung 29 dargestellten Werten für die Viabilität der PBMCs ergeben sich die Mittelwerte für die sechs weiblichen Spender (F, in Rot dargestellt) und die sechs männlichen Spender (M, in Blau dargestellt) (siehe Abbildung 30).

Zwischen den beiden Geschlechtern ergaben sich auch in Versuchsreihe II keine statistisch signifikanten Unterschiede bzgl. der Viabilität vor der Behandlung mit mehreren Wirkstoffen.



**Abbildung 30: Viabilität von PBMCs vor Behandlung (nach Geschlecht, VR II)**

Die Viabilität der PBMCs wurde mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ (Life technologies Corp., Bothell, USA) automatisiert gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern in Prozent und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Viabilität.

Welch`s T-Test, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

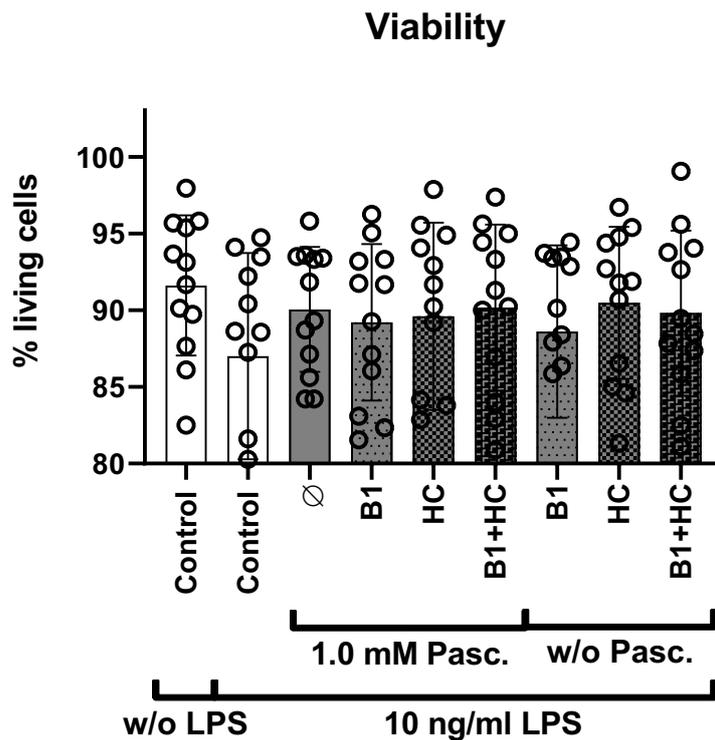
Somit konnte auch hier kein Einfluss des Geschlechts auf die Viabilität von PBMCs nach deren Isolierung festgestellt werden.

### 3.2.2 Viabilitätsanalyse nach der Behandlung der PBMCs mit mehreren Wirkstoffen

Die PBMCs wurden sechs Stunden lang in neun verschiedenen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 7) inkubiert. Eine Gruppe stellt die unbehandelte Kontrolle dar (B1); die behandelte Kontrolle (B2) wurde mit LPS stimuliert, um so einen Sepsis-Zustand zu simulieren. Der Gruppe B3 wurde zusätzlich 1 mM Pascorbin® zugefügt, um Effekte, die ausschließlich von Pascorbin® erzeugt werden, erfassen zu können. Die Gruppen B4 bis B6 bilden die Kombination von Pascorbin® mit den Sepsis-Medikamenten Vitamin B1 und Hydrocortison bzw. beiden Medikamenten. Die Gruppen B7 bis B9 dienen dementsprechend als Referenz ohne Pascorbin®.

Im Anschluss an die LPS-Behandlung wurde die Viabilität der PBMCs automatisiert mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ gemessen. Pro Spender wurde für jede Behandlungsgruppe eine Messung durchgeführt. Diese Messung der Viabilität diente der Überprüfung möglicher von LPS und Pascorbin® sowie von Vitamin B1 und Hydrocortison ausgehender zytotoxischer Effekte. Eine folglich erhöhte Zelltodrate würde die weiteren Ergebnisse der Untersuchung von sezernierten Zytokinen verfälschen, da intrazelluläre Bestandteile freigesetzt werden könnten.

In Abbildung 31 sind die Mittelwerte aller Spender für die neun Behandlungsgruppen sowie die entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den neun Behandlungsgruppen.



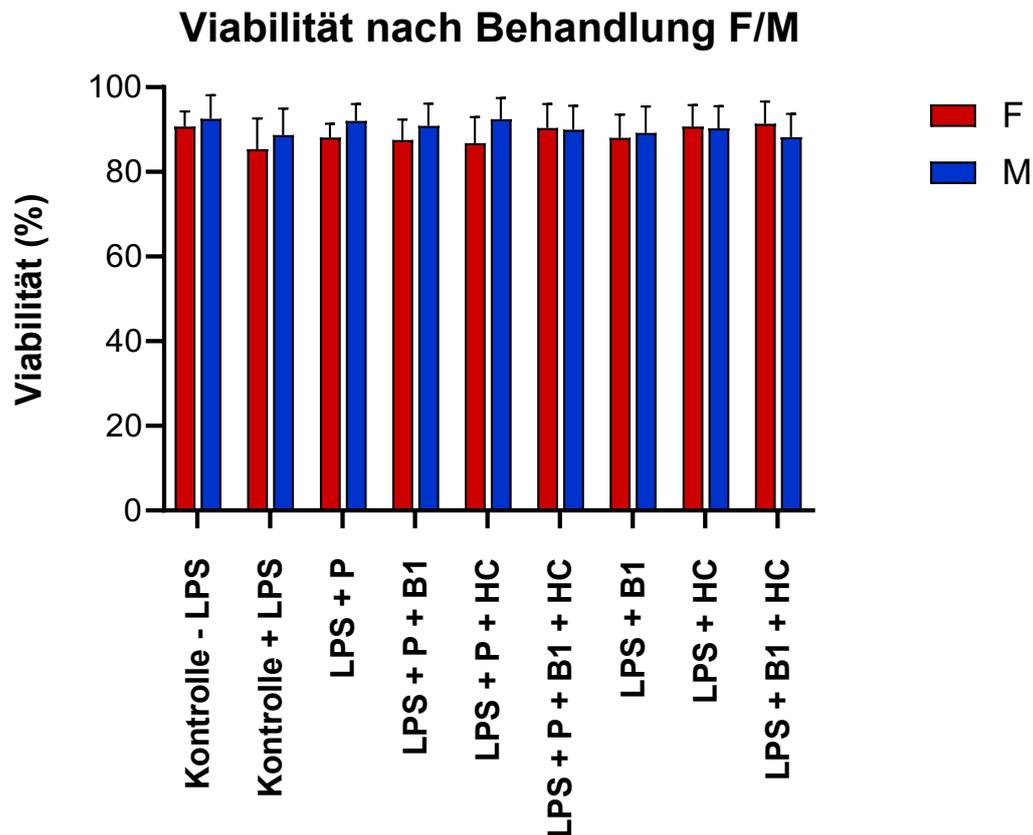
**Abbildung 31: Viabilität von PBMCs nach Behandlung (VR I)**

Die Viabilität der PBMCs wurde mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ automatisiert gemessen. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle sowie eine mit 10 ng/ml LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern in Prozent und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Viabilität. Diese Abbildung entspricht der Figure 3A aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Tukey`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Pasc. = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, w/o = ohne, VR = Versuchsreihe.

Damit konnte erneut festgestellt werden, dass sowohl LPS als auch Pascorbin® in den eingesetzten Konzentrationen keine zytotoxischen Effekte ausüben. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Vitamin B1 und Hydrocortison in den eingesetzten Konzentrationen in der Kombination miteinander und mit LPS und Pascorbin® ebenfalls keine zytotoxischen Effekte ausüben.

Abbildung 32 entspricht den Werten von Abbildung 31 aufgetrennt nach Geschlecht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen pro Behandlungsgruppe für beide Geschlechter.



**Abbildung 32: Viabilität von PBMCs nach Behandlung (nach Geschlecht, VR I)**

Die Viabilität der PBMCs wurde mit dem „Countess II FL Automated Cell Counter“ (Life technologies Corp., Bothell, USA) automatisiert gemessen. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern in Prozent und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Viabilität, sowohl zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen als auch zwischen den beiden Geschlechtern.

Sidak's-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Auch zwischen den beiden Geschlechtern konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede, sowohl innerhalb einer Behandlungsgruppe als auch zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen, festgestellt werden.

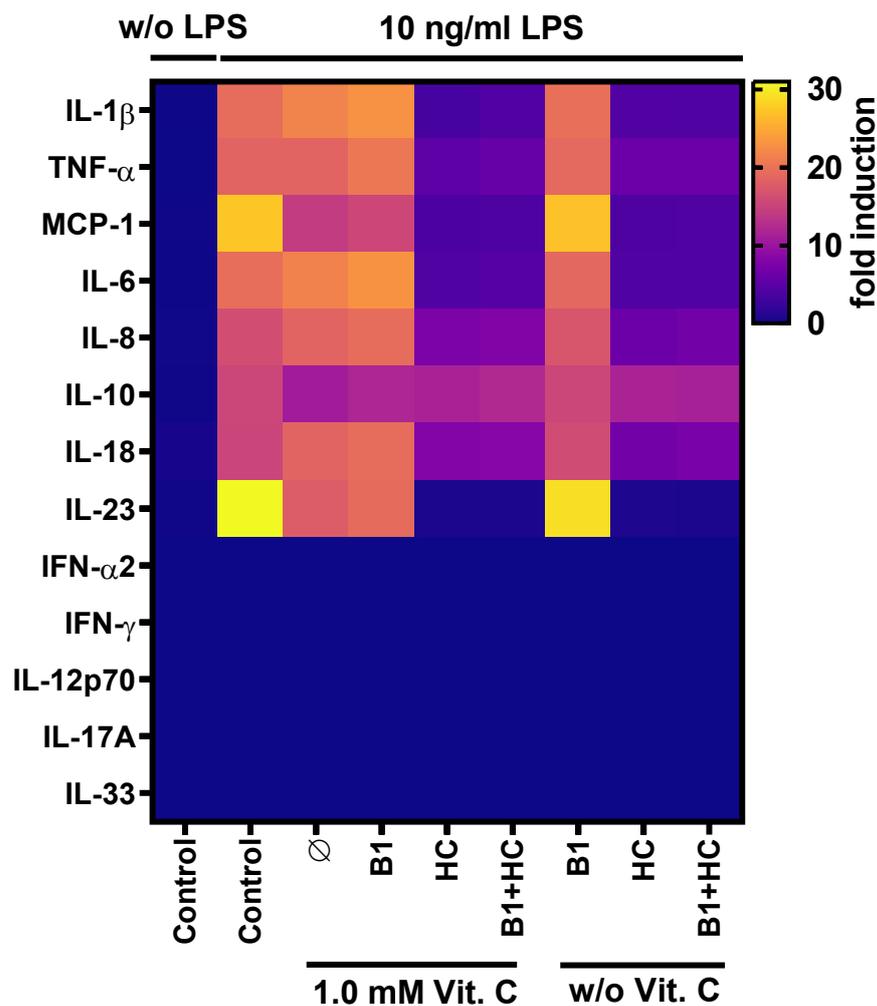
Somit kann festgestellt werden, dass von LPS und Pascorbin<sup>®</sup> sowie Vitamin B1 und Hydrocortison einzeln und in Kombination miteinander in den eingesetzten Konzentrationen kein geschlechtsspezifischer Effekt auf die Viabilität der PBMCs ausgeht.

### 3.2.3 Analyse der Zytokin-Sezernierung von PBMCs nach Behandlung mit mehreren Wirkstoffen

Mittels LEGENDplex™ Analyse wurde der Überstand der PBMCs von insgesamt zwölf Spendern nach sechs Stunden Behandlung (genaues Behandlungsschema siehe Abbildung 7) untersucht. Alle Proben wurden in biologischen Duplikaten gemessen. Die Auswertung der Daten nach Messung mittels Durchflusszytometrie erfolgte mit der Software FACSDiva™. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden mit Hilfe einer Standardlösung mit acht verschiedenen Konzentrationen und der daraus ermittelten Standardkurve quantifiziert.

Abbildung 33 gibt einen Überblick über alle mittels LEGENDplex™ untersuchten Zytokine für die verschiedenen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 5). In dieser Heatmap-Analyse wird die relative Intensität der gemessenen Zytokine im Vergleich zur Kontrolle ohne LPS (der Wert der Kontrolle ohne LPS wurde auf 1 gesetzt; die Werte der Kontrolle mit LPS-Stimulation wurden ebenfalls ins Verhältnis zur Kontrolle ohne LPS gesetzt) dargestellt.

Von den insgesamt 13 untersuchten Analyten (siehe Tabelle 12) lagen fünf erneut unter der Nachweisgrenze (INF- $\alpha$ 2, INF- $\gamma$ , IL-12p70, IL17A und IL-33). Die anderen acht Zytokine wurden unter LPS-Stimulation deutlich mehr sezerniert als ohne LPS-Stimulation.



**Abbildung 33: Verhältnis der Konzentration von 13 sezernierten Zytokinen (VR II)**

Die Konzentration von 13 verschiedenen Zytokinen wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Die Heatmap-Analyse zeigt die relative Intensität der gemessenen Zytokine im Vergleich zur Kontrolle ohne LPS. Diese Abbildung entspricht der Figure 3B aus der Originalarbeit (Lauer et al., 2021).

Nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, Vit. C = Vitamin C / Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, w/o = ohne, „fold induction“ = relative Intensität, VR = Versuchsreihe.

Die Ergebnisse der übrigen acht Zytokine sind im Folgenden dargestellt. Bei den Messungen der Konzentration sezernierter Zytokine ergaben sich für alle acht Zytokine oberhalb der Nachweisgrenze erneut hohe Standardabweichungen.

Diese kommen wieder durch die großen interindividuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern zustande, vor allem bzgl. der Höhe der gemessenen Konzentrationen an Zytokinen.

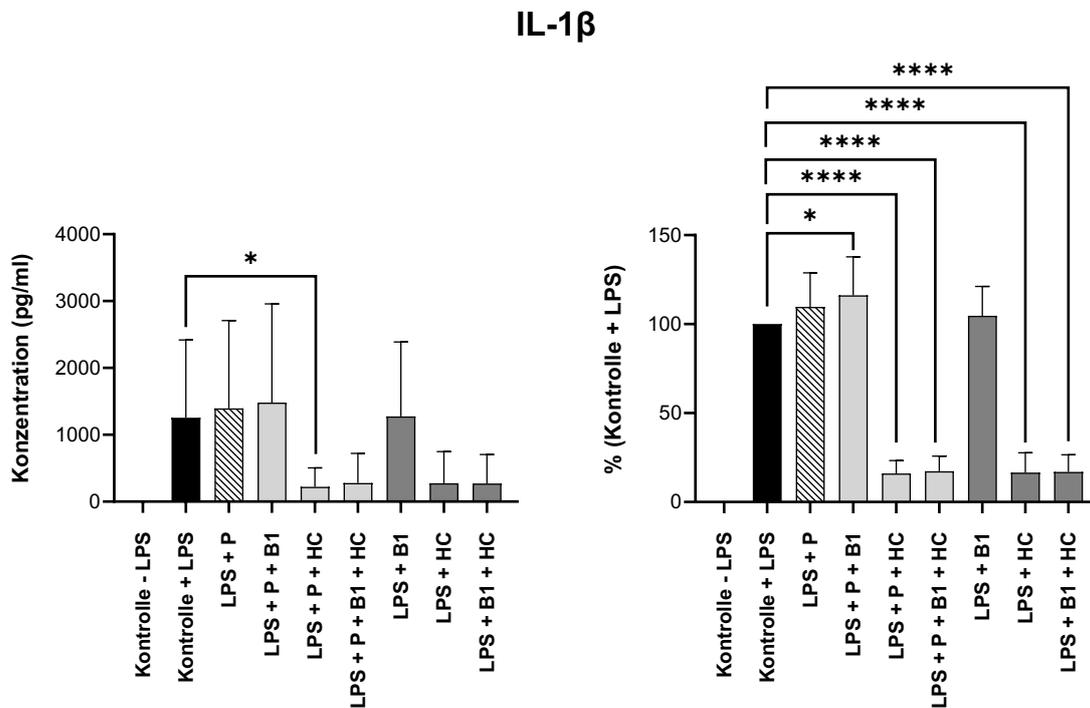
Bei vier der untersuchten Zytokine konnten statistisch signifikante Unterschiede in der Konzentration zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen festgestellt werden.

Die gemessenen absoluten Konzentrationen wurden zusätzlich gegen die mit LPS-stimulierte Kontrolle normalisiert, um die hohen interindividuellen Unterschiede in der Höhe der Konzentration der sezernierten Zytokine auszugleichen und so die Veränderung der Konzentration durch die verschiedenen Behandlungsgruppen besser beurteilen zu können. Die Konzentration der mit LPS stimulierten Kontrolle wurde dabei auf 100 % festgesetzt. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen nach der Normalisierung für jeden Spender. Nach der Normalisierung der Daten ergaben sich für alle acht Zytokine oberhalb der Nachweisgrenze statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

Die absolut gemessenen Konzentrationen sind in den folgenden Abbildungen auf der linken Seite dargestellt, die normalisierten Daten kommen auf der rechten Seite zur Darstellung. Zur besseren Übersicht wurden die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle ohne LPS-Stimulation und der Kontrolle mit LPS-Stimulation in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt.

Ziel der Untersuchung von sezernierten Zytokinen war die Frage, wie sich die Zytokinsekretion unter der Behandlung mit Pascorbin®, Vitamin B1 bzw. Hydrocortison oder bei verschiedenen Kombinationen der drei Wirkstoffe verhält. Gleichzeitig wurde mit diesem Versuch untersucht, ob Vitamin B1 oder Hydrocortison selbst einen Zytokin-erhöhenden Effekt auf PBMCs unter LPS-Stimulation haben.

In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der Sezernierung von IL-1 $\beta$  dargestellt. Auf der linken Seite sind die absolut gemessenen Konzentrationen in pg/ml dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.



**Abbildung 34: Analyse von sezerniertem IL-1 $\beta$  (VR II)**

Die Konzentration von IL-1 $\beta$  wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1  $\mu$ M) bzw. Hydrocortison (2  $\mu$ M) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, VR = Versuchsreihe.

Während IL-1 $\beta$  in der Behandlungsgruppe ohne LPS-Stimulation kaum sezerniert wird, konnte bei den Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation eine deutlich höhere Konzentration von IL-1 $\beta$  gemessen werden.

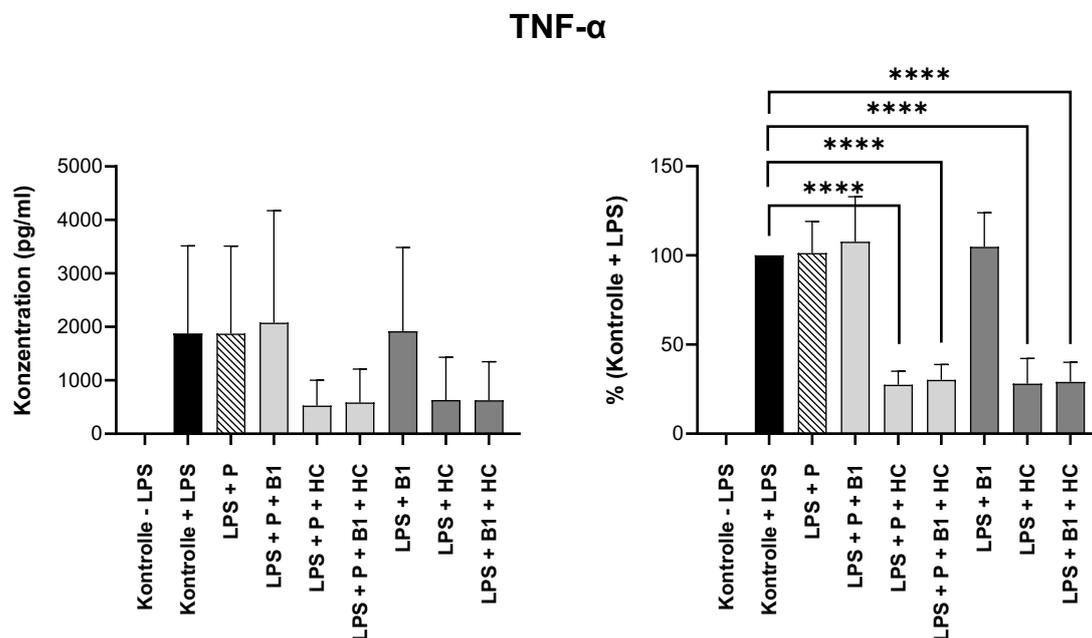
Bei der statistischen Auswertung der absolut gemessenen Konzentration an IL-1 $\beta$  zeigte sich eine signifikante (\*:  $p \leq 0,05$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-1 $\beta$  unter Behandlung mit Pascorbin<sup>®</sup> und Hydrocortison gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Bei der Behandlung mit Pascorbin<sup>®</sup> allein bzw. Hydrocortison einzeln oder in Kombination mit Vitamin B1 bzw. Vitamin B1 und Pascorbin<sup>®</sup> zeigten sich dagegen keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Sezernierung von IL-1 $\beta$  gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte eine signifikante (\*,  $p \leq 0,05$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-1 $\beta$  unter Behandlung mit Pascorbin<sup>®</sup> und Vitamin B1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Außerdem zeigen alle vier Behandlungsgruppen mit Hydrocortison eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-1 $\beta$  gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Pascorbin<sup>®</sup> oder Vitamin B1 einzeln zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Sezernierung von IL-1 $\beta$ .

Somit kann festgestellt werden, dass sich – nach Normalisierung der absolut gemessenen Konzentrationen – eine Reduktion der IL-1 $\beta$ -Konzentration bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der Sezernierung von TNF- $\alpha$ . Auf der linken Seite sind die absolut gemessenen Konzentrationen in pg/ml dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.

In der Behandlungsgruppe ohne LPS-Stimulation wird TNF- $\alpha$  nicht sezerniert. Unter LPS-Stimulation wurde TNF- $\alpha$  dagegen in allen Behandlungsgruppen sezerniert.



**Abbildung 35: Analyse von sezerniertem TNF- $\alpha$  (VR II)**

Die Konzentration von TNF- $\alpha$  wurde mittels LEGENDplex<sup>TM</sup> und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin<sup>®</sup> als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin<sup>®</sup> (1 mM) und Vitamin B1 (1  $\mu$ M) bzw. Hydrocortison (2  $\mu$ M) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

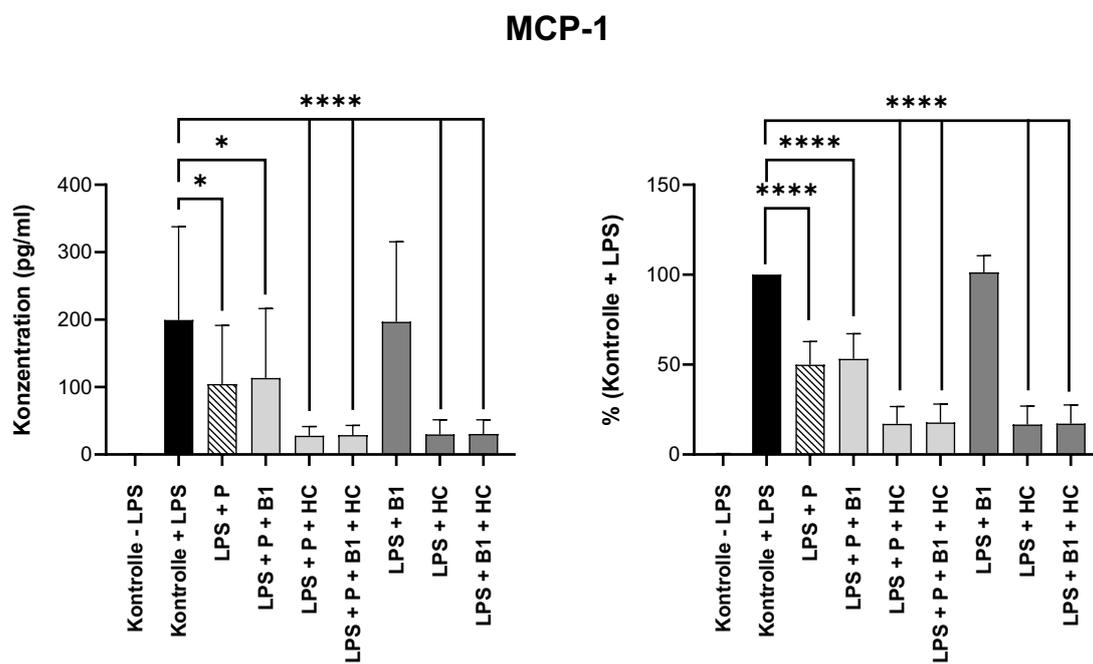
Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin<sup>®</sup>, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, VR = Versuchsreihe.

Bei der statistischen Auswertung der absolut gemessenen Konzentration an TNF- $\alpha$  ergaben sich keine signifikanten Veränderungen. Dennoch ist die Konzentration von sezerniertem TNF- $\alpha$  in den Behandlungsgruppen mit Hydrocortison sichtbar niedriger als bei der mit LPS behandelten Kontrolle.

In der statistischen Analyse der normalisierten Daten ergab sich für diese vier Behandlungsgruppen mit Hydrocortison nun eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ) Abnahme der Sezernierung von TNF- $\alpha$  gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Pascorbin® und / oder Vitamin B1 zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Sezernierung von TNF- $\alpha$ .

Somit kann festgestellt werden, dass sich – nach Normalisierung der absolut gemessenen Konzentrationen – eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -Konzentration bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Sezernierung von MCP-1 dargestellt. Auf der linken Seite sind die absolut gemessenen Konzentrationen in pg/ml dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung. Während MCP-1 in der Behandlungsgruppe ohne LPS-Stimulation kaum sezerniert wird, konnte bei den Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation eine deutlich höhere Konzentration von MCP-1 gemessen werden.



**Abbildung 36: Analyse von sezerniertem MCP-1 (VR II)**

Die Konzentration von MCP-1 wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, VR = Versuchsreihe.

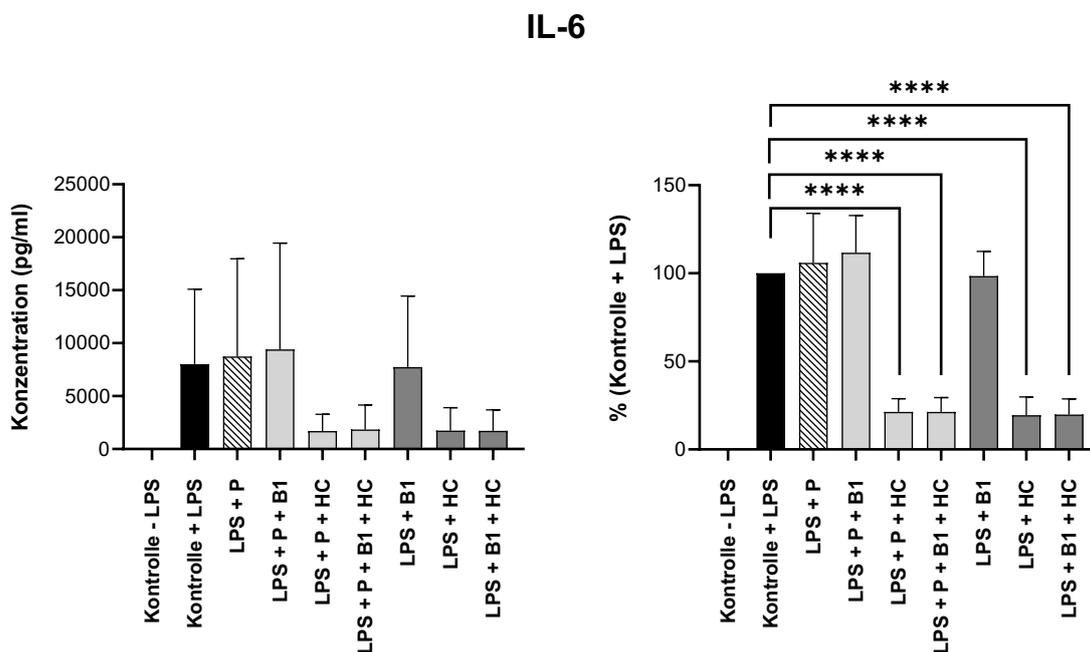
Bei der statistischen Auswertung der absolut gemessenen Konzentration an MCP-1 zeigte sich eine statistisch signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Abnahme der Sezernierung von MCP-1 unter Behandlung mit Pascorbin® sowie mit der Kombination aus Pascorbin® und Vitamin B1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Bei der Behandlung mit Hydrocortison ergab sich für alle Kombinationen eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der der Sezernierung von MCP-1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte eine nun statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Sezernierung von MCP-1 unter Behandlung mit Pascorbin® sowie mit der Kombination aus Pascorbin® und Vitamin B1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Alle vier Behandlungsgruppen mit Hydrocortison zeigten erneut eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Sezernierung von MCP-1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle.

Somit kann festgestellt werden, dass sich eine Reduktion der MCP-1-Konzentration bei allen eingesetzten Kombinationen mit Pascorbin® sowie bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der Sezernierung von IL-6 dargestellt. Auf der linken Seite sind die absolut gemessenen Konzentrationen in pg/ml dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.

Während IL-6 in der Behandlungsgruppe ohne LPS-Stimulation kaum sezerniert wird, konnte bei den Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation eine deutlich höhere Konzentration von IL-6 gemessen werden.



**Abbildung 37: Analyse von sezerniertem IL-6 (VR II)**

Die Konzentration von IL-6 wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, VR = Versuchsreihe.

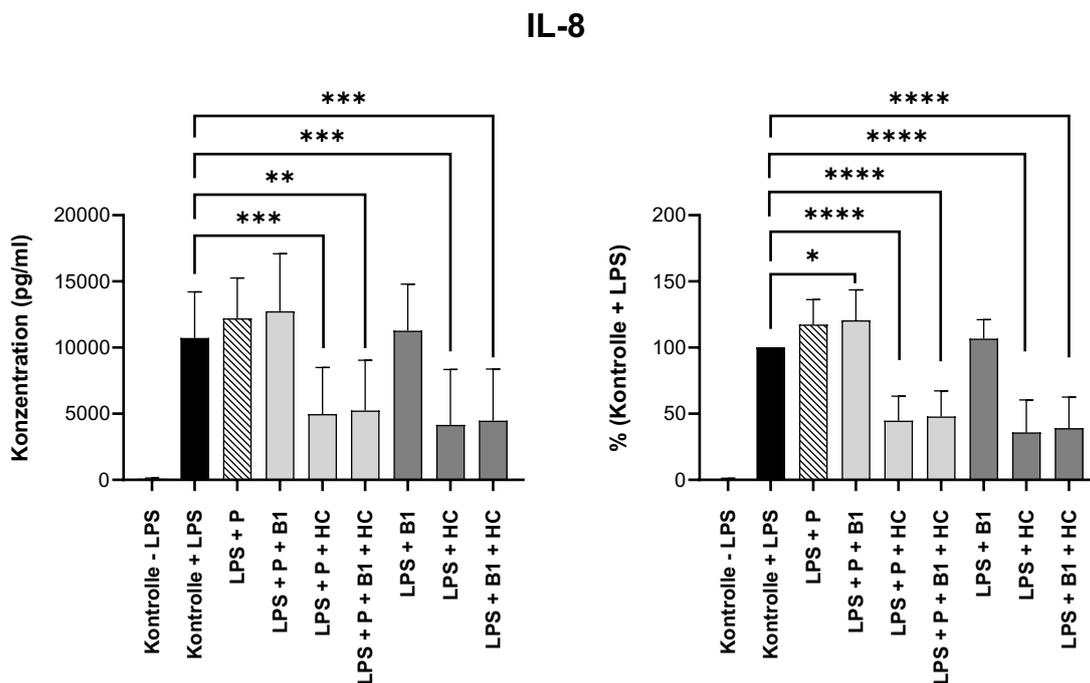
Bei der statistischen Auswertung der absolut gemessenen Konzentration an IL-6 ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen. Dennoch ist die Konzentration von sezerniertem IL-6 in allen Behandlungsgruppen mit Hydrocortison sichtbar niedriger als bei der mit LPS behandelten Kontrolle.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte dann eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-6 in diesen vier Behandlungsgruppen mit Hydrocortison gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Pascorbin® oder Vitamin B1 einzeln bzw. in Kombination miteinander zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Sezernierung von IL-6.

Somit kann festgestellt werden, dass sich – nach Normalisierung der absolut gemessenen Konzentrationen – eine Reduktion der IL-6-Konzentration bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

In Abbildung 38 sind die Ergebnisse der Sezernierung von IL-8 dargestellt. Auf der linken Seite sind die absolut gemessenen Konzentrationen in pg/ml dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.

Während IL-8 in der Behandlungsgruppe ohne LPS-Stimulation kaum sezerniert wird, konnte bei den Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation eine deutlich höhere Konzentration von IL-8 gemessen werden.



**Abbildung 38: Analyse von sezerniertem IL-8 (VR II)**

Die Konzentration von IL-8 wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, VR = Versuchsreihe.

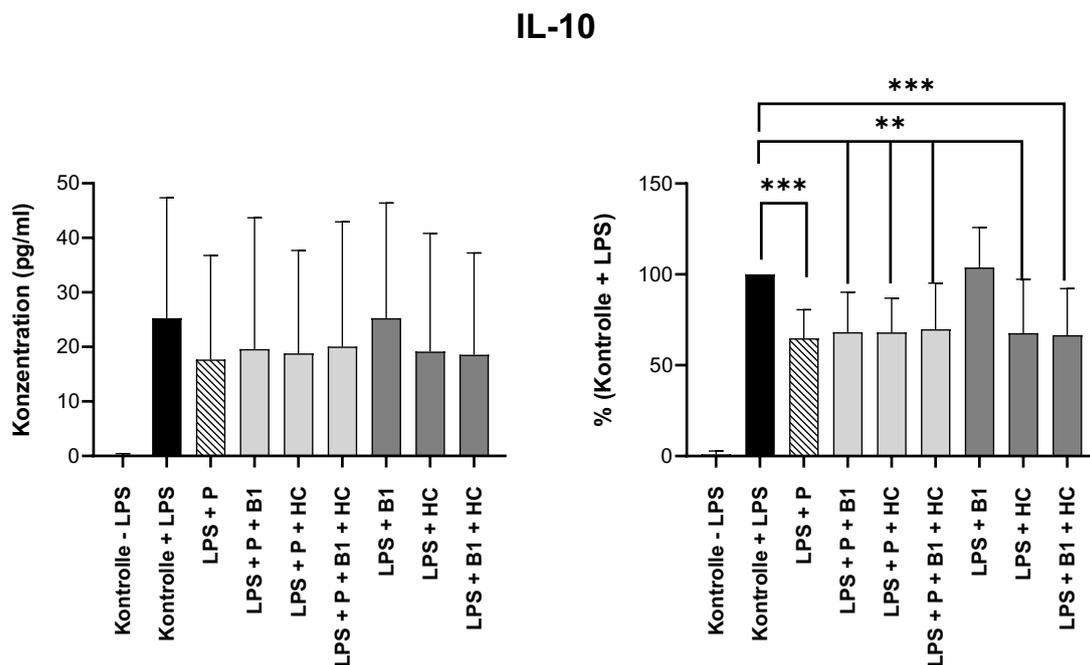
Bei der statistischen Auswertung der absolut gemessenen Konzentration an IL-8 zeigte sich eine statistisch hoch signifikante (\*\*,  $p \leq 0,01$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-8 unter Behandlung mit der Dreifachkombination aus Pascorbin<sup>®</sup>, Vitamin B1 und Hydrocortison gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Bei der Behandlung mit Hydrocortison einzeln oder in Kombination mit Pascorbin<sup>®</sup> bzw. Vitamin B1 zeigten sich dagegen eine statistisch sehr hoch signifikante (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-8 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte eine statistisch signifikante (\*,  $p \leq 0,05$ ) Zunahme der Sezernierung von IL-8 unter der Behandlung mit Pascorbin<sup>®</sup> und Vitamin B1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Außerdem zeigen alle vier Behandlungsgruppen mit Hydrocortison eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-8 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Pascorbin<sup>®</sup> oder Vitamin B1 einzeln zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Sezernierung von IL-8.

Somit kann festgestellt werden, dass sich eine Reduktion der IL-8-Konzentration bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

In Abbildung 39 sind die Ergebnisse der Sezernierung von IL-10 dargestellt. Auf der linken Seite sind die absolut gemessenen Konzentrationen in pg/ml dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.

Während IL-10 in der Behandlungsgruppe ohne LPS-Stimulation kaum sezerniert wird, konnte bei den Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation eine deutlich höhere Konzentration von IL-10 gemessen werden.



**Abbildung 39: Analyse von sezerniertem IL-10 (VR II)**

Die Konzentration von IL-10 wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, VR = Versuchsreihe.

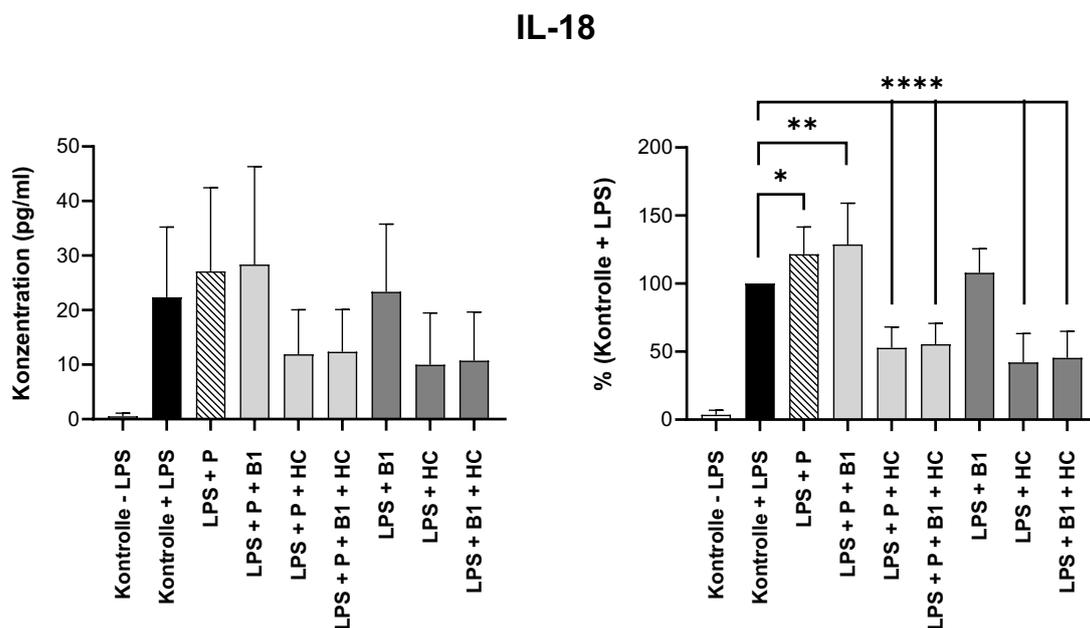
Bei der statistischen Auswertung der absolut gemessenen Konzentration an IL-10 ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte eine statistisch sehr hoch signifikante (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-10 unter der Behandlung mit Pascorbin® gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Außerdem zeigen die Behandlungen mit Pascorbin® und Vitamin B1, mit Pascorbin® und Hydrocortison, die Behandlung mit der Dreifachkombination aus Pascorbin®, Vitamin B1 und Hydrocortison sowie die Behandlung mit Hydrocortison einzeln, eine statistisch hoch signifikante (\*\*,  $p \leq 0,01$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-10 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Hydrocortison und Vitamin B1 ergab sich eine statistisch sehr hoch signifikante (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-10 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Vitamin B1 einzeln zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Sezernierung von IL-10.

Somit kann festgestellt werden, dass sich – nach Normalisierung der absolut gemessenen Konzentrationen – eine Reduktion der IL-1 $\beta$ -Konzentration bei allen eingesetzten Kombinationen mit Pascorbin® sowie bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der Sezernierung von IL-18 dargestellt. Auf der linken Seite sind die absolut gemessenen Konzentrationen in pg/ml dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.

Während IL-18 in der Behandlungsgruppe ohne LPS-Stimulation kaum sezerniert wird, konnte bei den Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation eine deutlich höhere Konzentration von IL-18 gemessen werden.



**Abbildung 40: Analyse von sezerniertem IL-18 (VR II)**

Die Konzentration von IL-18 wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, VR = Versuchsreihe.

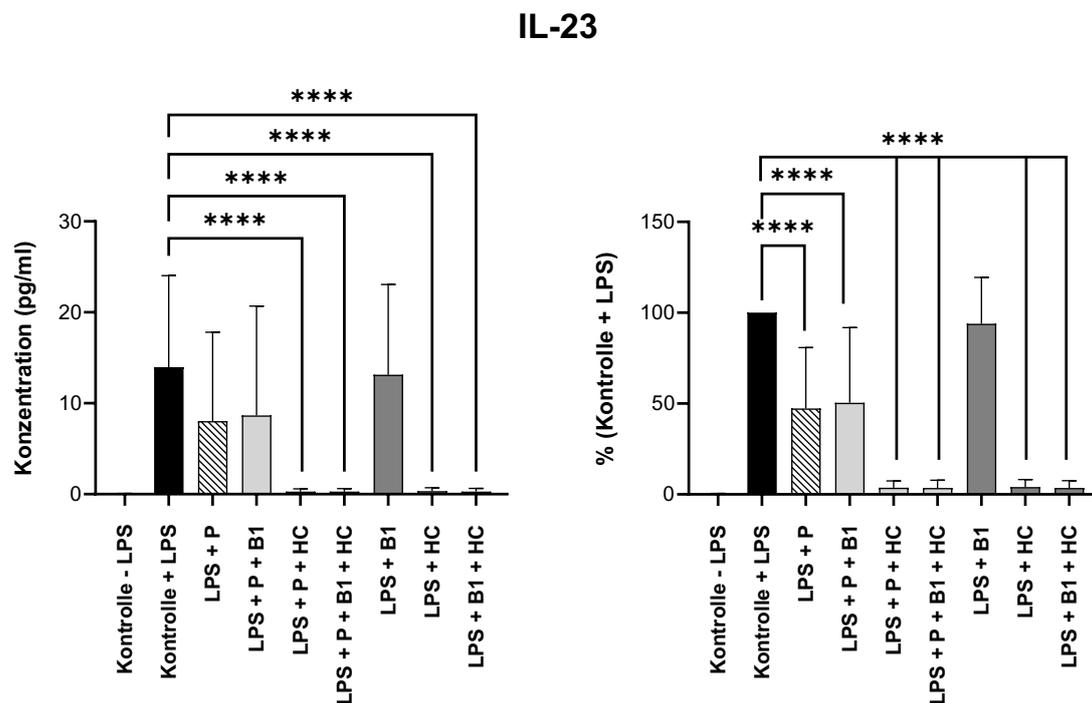
Bei der statistischen Auswertung der absolut gemessenen Konzentration an IL-18 ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen. Dennoch ist die Konzentration von sezerniertem IL-6 in allen Behandlungsgruppen mit Hydrocortison sichtbar niedriger als bei der mit LPS behandelten Kontrolle.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte eine statistisch signifikante (\*,  $p \leq 0,05$ ) Zunahme der Sezernierung von IL-18 unter Behandlung mit Pascorbin® sowie eine statistisch hoch signifikante (\*\*,  $p \leq 0,01$ ) Zunahme der Sezernierung von IL-18 unter Behandlung mit Pascorbin® und Vitamin B1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Außerdem zeigen alle vier Behandlungsgruppen mit Hydrocortison eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-18 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Vitamin B1 einzeln zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Sezernierung von IL-18.

Somit kann festgestellt werden, dass sich – nach Normalisierung der absolut gemessenen Konzentrationen – eine Reduktion der IL-18-Konzentration bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse der Sezernierung von IL-23 dargestellt. Auf der linken Seite sind die absolut gemessenen Konzentrationen in pg/ml dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.

Während IL-23 in der Behandlungsgruppe ohne LPS-Stimulation kaum sezerniert wird, konnte bei den Behandlungsgruppen mit LPS-Stimulation eine deutlich höhere Konzentration von IL-23 gemessen werden.



**Abbildung 41: Analyse von sezerniertem IL-23 (VR II)**

Die Konzentration von IL-23 wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, VR = Versuchsreihe.

Bei der statistischen Auswertung der absolut gemessenen Konzentration an IL-23 zeigte sich eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-23 in allen vier Behandlungsgruppen mit Hydrocortison gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Bei der Behandlung mit Pascorbin® allein bzw. Vitamin B1 einzeln oder in Kombination miteinander zeigten sich dagegen keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Sezernierung von IL-23 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte erneut eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-23 in allen vier Behandlungsgruppen mit Hydrocortison gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Zusätzlich ergab sich eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Sezernierung von IL-23 unter Behandlung mit Pascorbin® bzw. Pascorbin® und Vitamin B1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Vitamin B1 einzeln zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Sezernierung von IL-23.

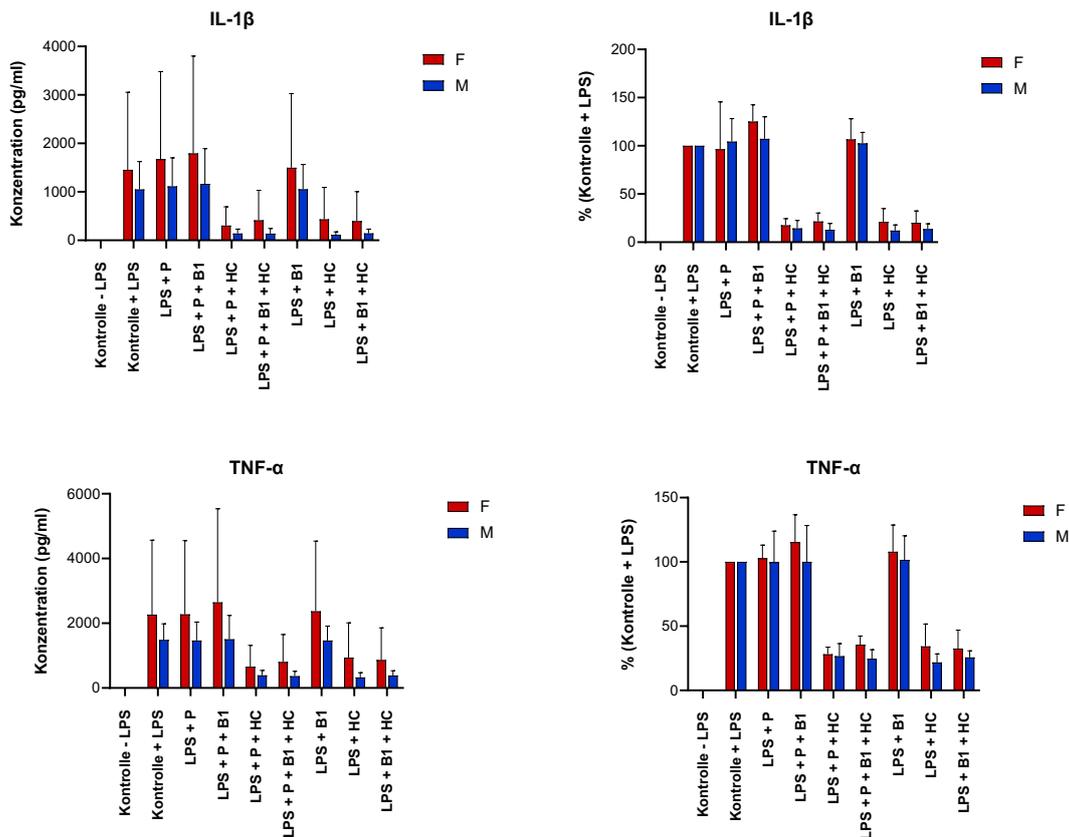
Somit kann festgestellt werden, dass sich – nach Normalisierung der absolut gemessenen Konzentrationen – eine Reduktion der IL-23-Konzentration bei allen eingesetzten Kombinationen mit Pascorbin® sowie bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

Im Vergleich der beiden Geschlechter ergaben sich bei sieben von acht Zytokinen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Lediglich bei IL-10 ergeben sich nach Normalisierung der Daten einzelne statistisch signifikante Unterschiede (Abbildung 44).

Die dazugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen für die acht messbaren Zytokine sind in Abbildung 42 bis Abbildung 45 dargestellt.

Die absolut gemessenen Konzentrationen sind in den folgenden Abbildungen auf der linken Seite dargestellt, die normalisierten Daten kommen auf der rechten Seite zur Darstellung, jeweils aufgetrennt nach Geschlecht; Frauen in Rot, Männer in blau.

Abbildung 42 zeigt die Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht für IL-1 $\beta$  sowie TNF- $\alpha$ . Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern.

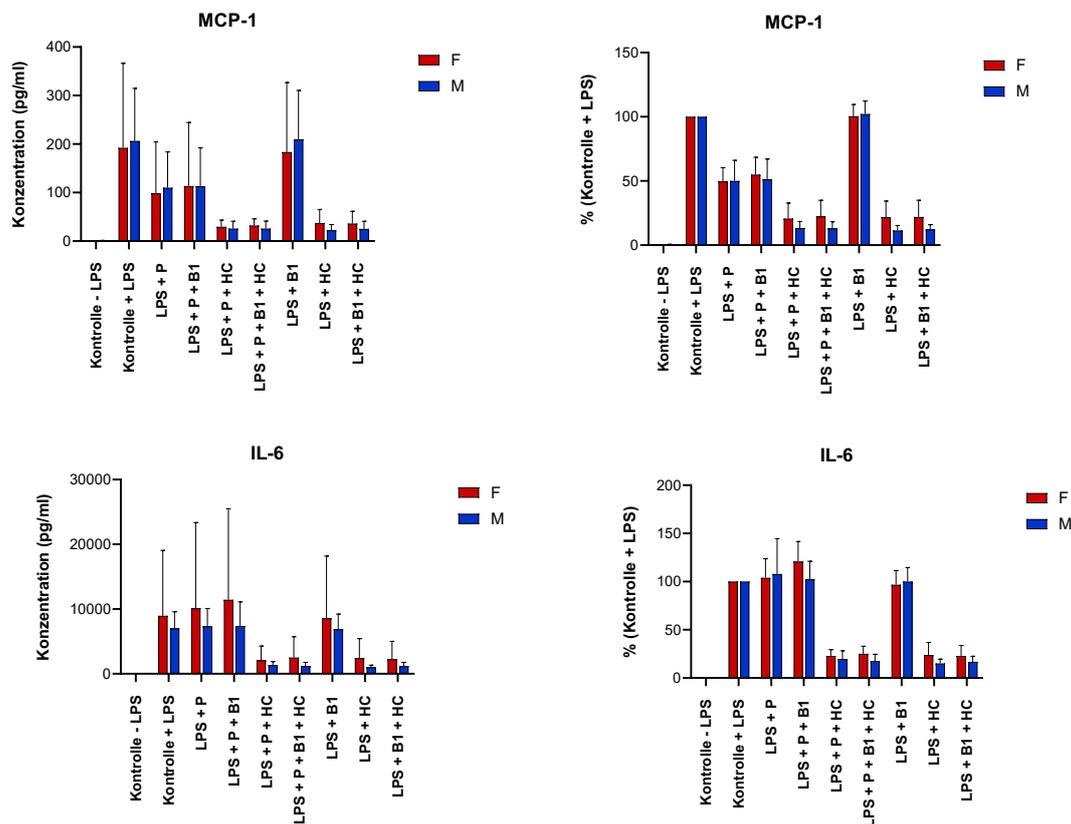


**Abbildung 42: Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR II, Teil 1)**

Die Konzentration der sezernierten Zytokine wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Sekretion der verschiedenen Zytokine zwischen den beiden Geschlechtern. Die statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 34 und Abbildung 35 dargestellt.

Sidak's-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Abbildung 43 zeigt die Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht für MCP-1 sowie IL-6. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern.

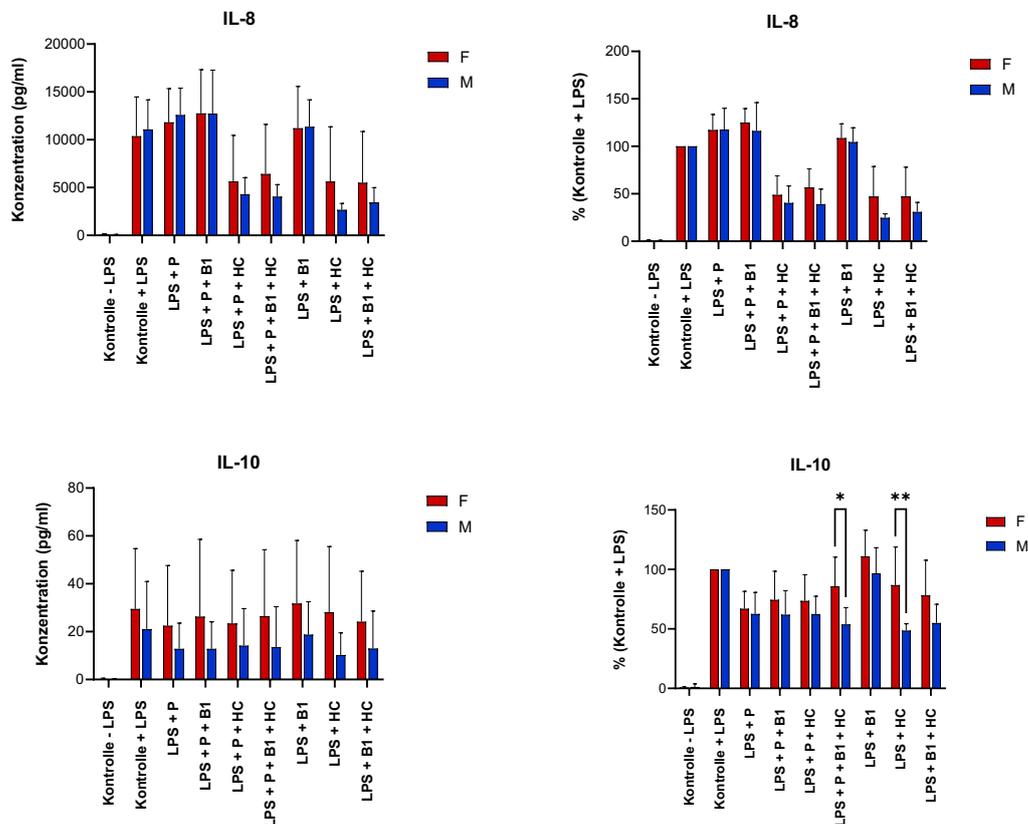


**Abbildung 43: Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR II, Teil 2)**

Die Konzentration der sezernierten Zytokine wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Sekretion der verschiedenen Zytokine zwischen den beiden Geschlechtern. Die statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 36 und Abbildung 37 dargestellt.

Sidak`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Abbildung 44 zeigt die Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht für IL-8 sowie IL-10.



**Abbildung 44: Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR II, Teil 3)**

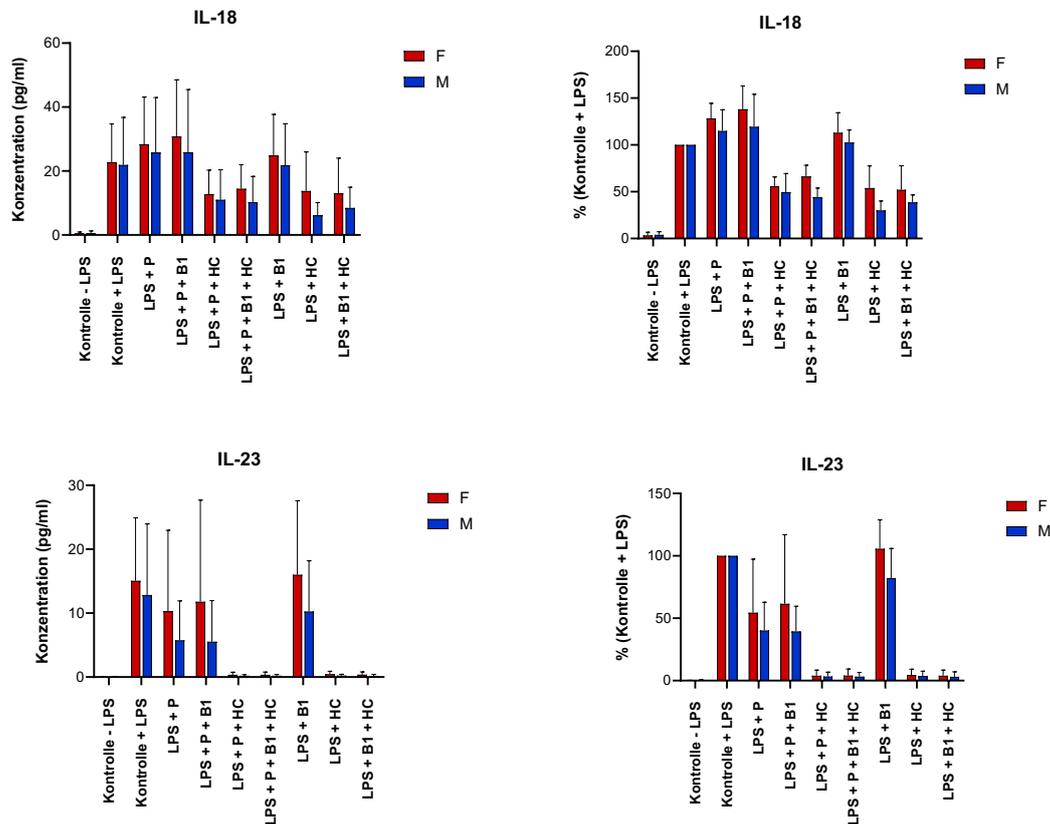
Die Konzentration der sezernierten Zytokine wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern und die Standardabweichungen, sowie die statistisch signifikanten Unterschiede (\*) zwischen den beiden Geschlechtern, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %). Die statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 38 und Abbildung 39 dargestellt.

Sidak's-multiple-comparison-Test, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

In der Sezernierung von IL-8 ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern.

Bei den absolut gemessenen Konzentrationen der Sezernierung von IL-10 ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern. Nach Normalisierung der Daten zeigte sich allerdings ein statistisch signifikanter (\*,  $p \leq 0,05$ ) Unterschied unter der Behandlung mit der Dreifachkombination aus Pascorbin<sup>®</sup>, Vitamin B1 und Hydrocortison. Dabei wurde von den Zellen der weiblichen Spender im Durchschnitt mehr IL-10 sezerniert als von den Zellen der männlichen Spender. Ein weiterer statistisch hoch signifikanter (\*\*,  $p \leq 0,01$ ) Unterschied in der Sezernierung von IL-10 zeigte sich unter der Behandlung mit Hydrocortison. Auch hier wurde von den Zellen der weiblichen Spender im Durchschnitt mehr IL-10 sezerniert als von den Zellen der männlichen Spender.

Abbildung 45 zeigt die Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht für IL-18 sowie IL-23. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern.



**Abbildung 45: Analyse von sezernierten Zytokinen nach Geschlecht (VR II, Teil 4)**

Die Konzentration der sezernierten Zytokine wurde mittels LEGENDplex™ und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender die Messung zweier biologischer Replikate erfolgte. Die linke Grafik zeigt die absolut gemessene Konzentration in pg/ml, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Sekretion der verschiedenen Zytokine zwischen den beiden Geschlechtern. Die statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 40 und Abbildung 41 dargestellt.

Sidak's-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Die Sezernierung der 13 untersuchten Zytokine scheint – mit Ausnahme von IL-10 – somit unter den hier gewählten Versuchsbedingungen keinem geschlechtsspezifischem Effekt zu unterliegen.

Die vier geschlechtsspezifischen Grafiken enthalten keine Aussagen zu statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen, da diese bereits in den vorangegangenen Abbildungen gezeigt wurden. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde die statistische Auswertung zu Abbildung 42 bis Abbildung 45 ausschließlich bezüglich geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Zytokin-Sezernierung vorgenommen.

### 3.2.4 Analyse der Genexpression von PBMCs nach Behandlung mit mehreren Wirkstoffen

Im Vorfeld der Genexpressionsanalyse wurde RNA aus Zellpellets isoliert (mit Hilfe des RNeasy Micro-Kits der Firma Qiagen). Diese RNA wurde anschließend in cDNA revers transkribiert und mittels qPCR analysiert. Untersucht wurde dabei die Expression der Zytokine *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *MCP-1* und *IL-23* sowie von *ATF 3*, dessen Expression durch unterschiedliche Stresssituationen in verschiedensten Zellen induziert wird (Chen et al. 1996; Hai et al. 1999).

Die Ergebnisse wurden gegen die Expression von *ACTB* und *TBP* normalisiert. Diese Gene werden weitestgehend unabhängig von äußeren Einflüssen durch die Zelle exprimiert und dienen somit als Referenz für die Stoffwechselaktivität der Zellen.

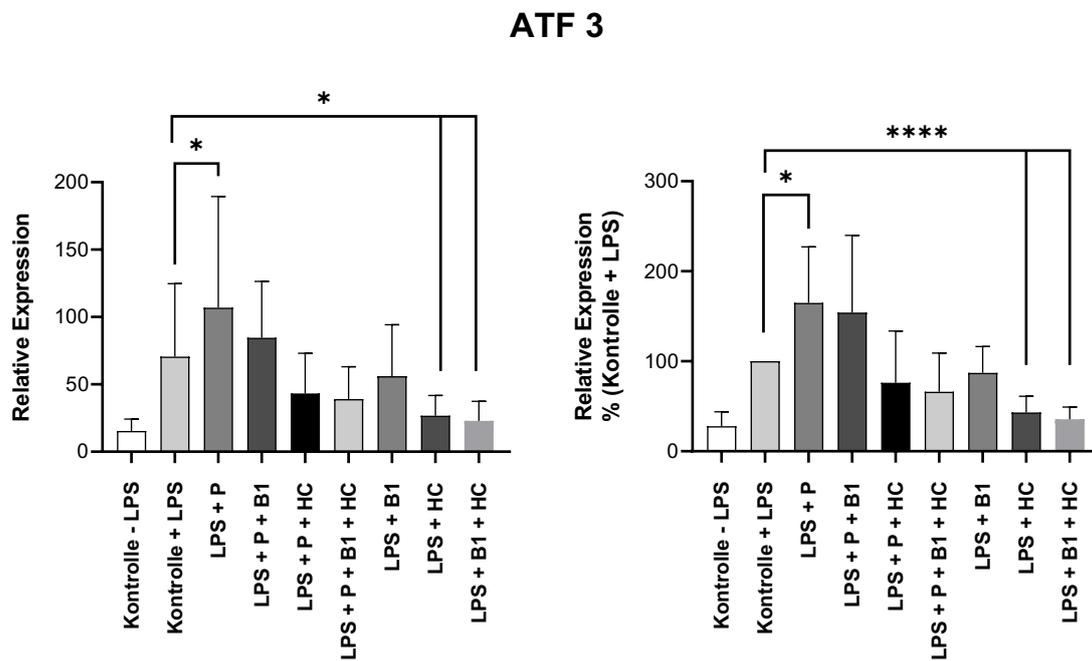
Bei der Messung der Expression verschiedener Gene ergaben sich erneut hohe Standardabweichungen. Diese kommen – wie schon in der ersten Versuchsreihe – durch interindividuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern zustande.

Die gemessene relative Expression wurde daher gegen die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisiert, um die interindividuellen Unterschiede in der Genexpression auszugleichen und so die Veränderung durch die verschiedenen Behandlungsgruppen besser beurteilen zu können. Die Konzentration der mit LPS stimulierten Kontrolle wurde dabei auf 100 % festgesetzt. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen nach der Normalisierung für jeden Spender.

Die relative Expression ist in den folgenden Abbildungen auf der linken Seite dargestellt, die normalisierten Daten kommen auf der rechten Seite zur Darstellung. Zur besseren Übersicht wurden die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle ohne LPS-Stimulation und der Kontrolle mit LPS-Stimulation in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt.

In Abbildung 46 sind die Mittelwerte aller Spender für die Expression von *ATF 3* in den neun Behandlungsgruppen sowie die entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Auf der linken Seite ist die relative Expression dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.

*ATF 3* wurde in allen Behandlungsgruppen exprimiert, auch in der Behandlungsgruppe ohne LPS-Stimulation.



**Abbildung 46: Expression von *ATF 3* (VR II)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB* und *TBP* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Die linke Grafik zeigt die relative Expression von *ATF 3*, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

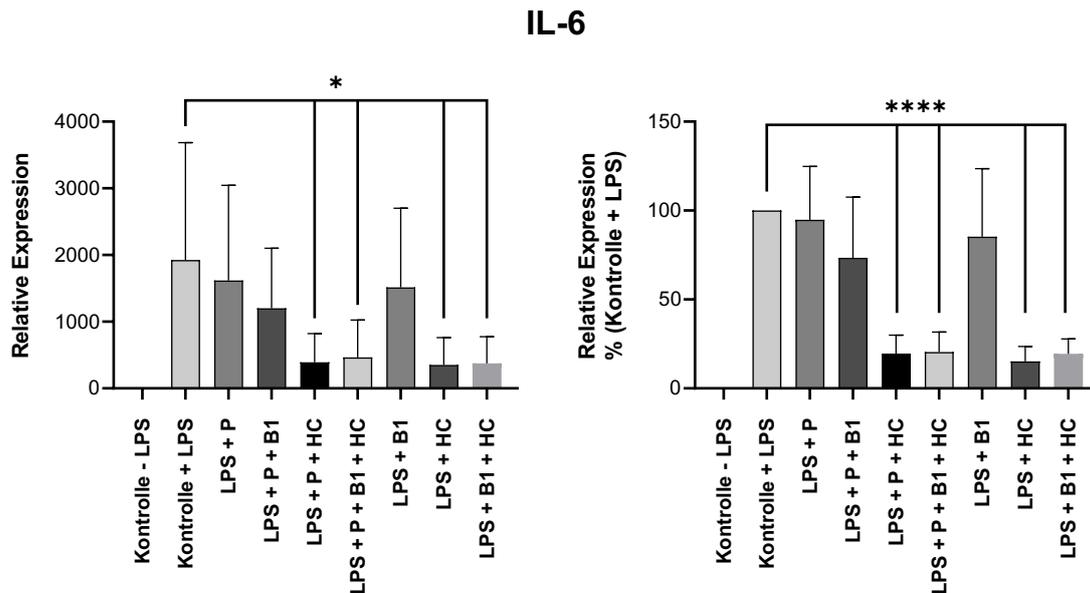
Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, VR = Versuchsreihe.

Bei der statistischen Auswertung der relativen Expression von *ATF 3* zeigte sich eine statistisch signifikante (\*,  $p \leq 0,05$ ) Zunahme der Expression von *ATF 3* unter Behandlung mit Pascorbin® gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Des Weiteren zeigte sich eine statistisch signifikante (\*,  $p \leq 0,05$ ) Abnahme der Expression von *ATF 3* unter der Behandlung mit Hydrocortison bzw. Hydrocortison und Vitamin B1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte ebenfalls eine statistisch signifikante (\*,  $p \leq 0,05$ ) Zunahme der Expression von *ATF 3* unter Behandlung mit Pascorbin® gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Expression von *ATF 3* zeigte sich dagegen unter der Behandlung mit Hydrocortison bzw. Hydrocortison und Vitamin B1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle.

Somit kann festgestellt werden, dass sich eine Reduktion der Expression von *ATF 3* unter der Behandlung mit Hydrocortison bzw. Hydrocortison und Vitamin B1 zeigte, nicht jedoch bei der Behandlung mit Pascorbin® und Hydrocortison bzw. der Dreifachkombination aus Pascorbin®, Vitamin B1 und Hydrocortison.

In Abbildung 47 sind die Mittelwerte aller Spender für die Expression von *IL-6* in den neun Behandlungsgruppen sowie die entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Auf der linken Seite ist die relative Expression dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.



**Abbildung 47: Expression von *IL-6* (VR II)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB* und *TBP* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Die linke Grafik zeigt die relative Expression von *IL-6*, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, VR = Versuchsreihe.

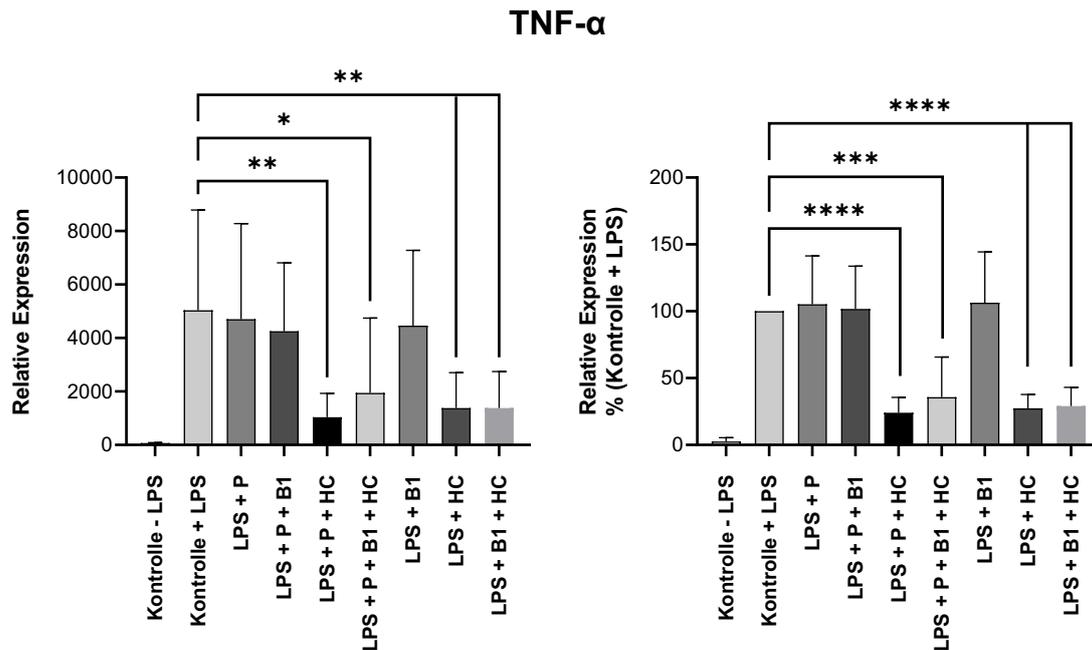
Bei der statistischen Auswertung der relativen Expression von *IL-6* zeigte sich eine statistisch signifikante (\*,  $p \leq 0,05$ ) Abnahme der Expression von *IL-6* bei allen Behandlungsgruppen mit Hydrocortison gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Bei der Behandlung mit Pascorbin® oder Vitamin B1 allein bzw. in

Kombination miteinander zeigten sich dagegen keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Expression von *IL-6* gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Expression von *IL-6* bei allen Behandlungsgruppen mit Hydrocortison gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Bei der Behandlung mit Pascorbin® oder Vitamin B1 allein bzw. in Kombination miteinander zeigten sich erneut keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Expression von *IL-6* gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle.

Somit kann festgestellt werden, dass sich eine Reduktion der Expression von *IL-6* bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

In Abbildung 48 sind die Mittelwerte aller Spender für die Expression von *TNF- $\alpha$*  in den neun Behandlungsgruppen sowie die entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Auf der linken Seite ist die relative Expression dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.



**Abbildung 48: Expression von *TNF- $\alpha$*  (VR II)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB* und *TBP* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1  $\mu$ M) bzw. Hydrocortison (2  $\mu$ M) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Die linke Grafik zeigt die relative Expression von *TNF- $\alpha$* , die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

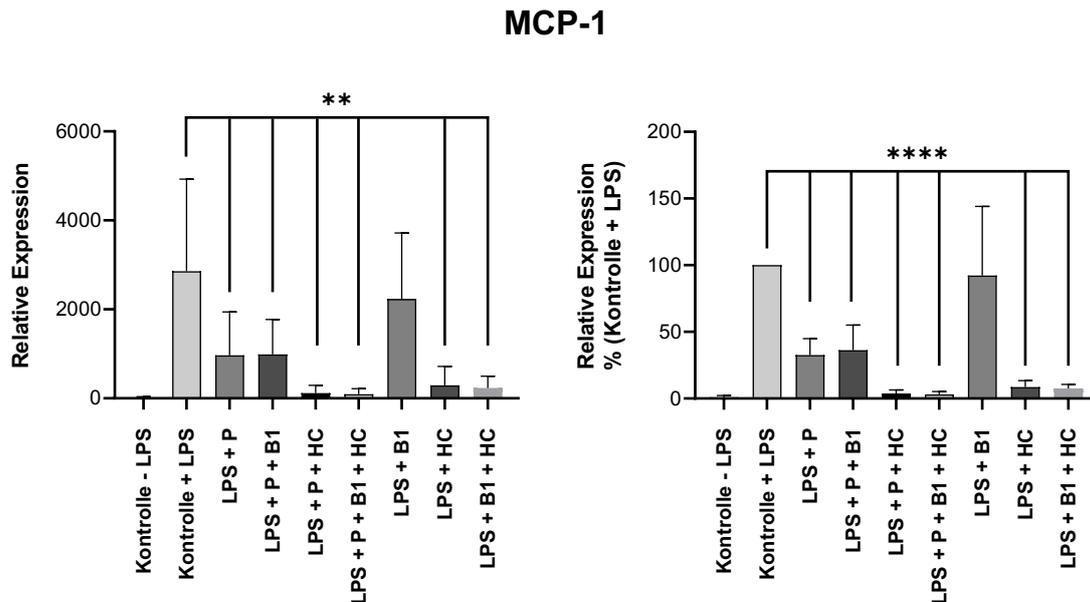
Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, VR = Versuchsreihe.

Bei der statistischen Auswertung der relativen Expression von *TNF- $\alpha$*  zeigte sich eine statistisch signifikante (\*,  $p \leq 0,05$ ) Abnahme der Expression von *TNF- $\alpha$*  unter der Behandlung mit der Dreifachkombination aus Pascorbin<sup>®</sup>, Vitamin B1 und Hydrocortison gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Bei der Behandlung mit Hydrocortison allein und Hydrocortison in Kombination mit Pascorbin<sup>®</sup> und Vitamin B1 zeigte sich eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Expression von *TNF- $\alpha$*  gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. In den Behandlungsgruppen ohne Hydrocortison ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte eine statistisch sehr hoch signifikante (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ) Abnahme der Expression von *TNF- $\alpha$*  unter der Behandlung mit der Dreifachkombination aus Pascorbin<sup>®</sup>, Vitamin B1 und Hydrocortison gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Bei der Behandlung mit den drei übrigen Hydrocortison-enthaltenden Behandlungsgruppen (Hydrocortison allein / Hydrocortison in Kombination mit Pascorbin<sup>®</sup> / Hydrocortison in Kombination mit Vitamin B1) ergab sich eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Expression von *TNF- $\alpha$*  gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. In den Behandlungsgruppen ohne Hydrocortison ergaben sich erneut keine statistisch signifikanten Veränderungen.

Somit kann festgestellt werden, dass sich eine Reduktion der Expression von *TNF- $\alpha$*  bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

In Abbildung 49 sind die Mittelwerte aller Spender für die Expression von *MCP-1* in den neun Behandlungsgruppen sowie die entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Auf der linken Seite ist die relative Expression dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.



**Abbildung 49: Expression von *MCP-1* (VR II)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB* und *TBP* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Die linke Grafik zeigt die relative Expression von *MCP-1*, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

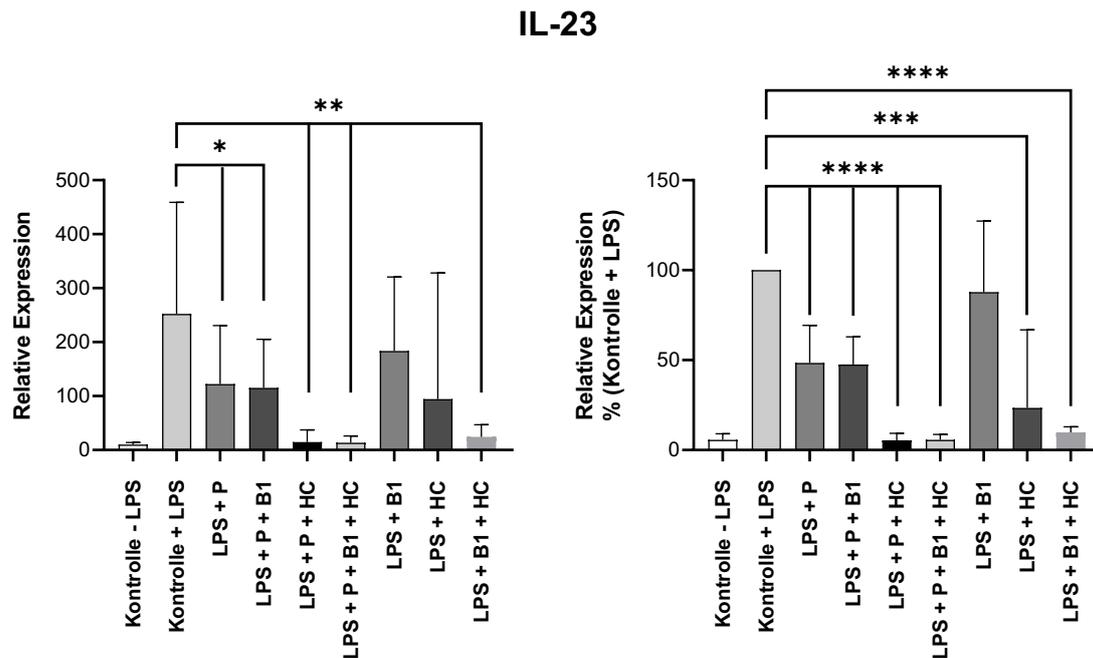
Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, VR = Versuchsreihe.

Bei der statistischen Auswertung der relativen Expression von *MCP-1* zeigte sich eine statistisch hoch signifikante (\*\*,  $p \leq 0,01$ ) Abnahme der Expression von *MCP-1* in allen Behandlungsgruppen mit Pascorbin® und / oder Hydrocortison (Pascorbin® allein / Pascorbin® in Kombination mit Vitamin B1 / Pascorbin® in Kombination mit Hydrocortison / Dreifachkombination aus Pascorbin®, Vitamin B1 und Hydrocortison / Hydrocortison allein / Hydrocortison in Kombination mit Vitamin B1) gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Vitamin B1 ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung der Expression von *MCP-1*.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Expression von *MCP-1* bei allen Behandlungsgruppen mit Pascorbin® und / oder Hydrocortison (s.o.) gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Vitamin B1 ergab sich erneut keine statistisch signifikante Veränderung der Expression von *MCP-1*.

Somit kann festgestellt werden, dass sich eine Reduktion der Expression von *MCP-1* bei allen eingesetzten Kombinationen mit Pascorbin® sowie bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

In Abbildung 50 sind die Mittelwerte aller Spender für die Expression von *IL-23* in den neun Behandlungsgruppen sowie die entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Auf der linken Seite ist die relative Expression dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.



**Abbildung 50: Expression von *IL-23* (VR II)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB* und *TBP* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwölf Spendern und die Standardabweichungen, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den Behandlungsgruppen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Die linke Grafik zeigt die relative Expression von *IL-23*, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Dunnett's-multiple-comparisons-Test, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, VR = Versuchsreihe.

Bei der statistischen Auswertung der relativen Expression von *IL-23* zeigte sich eine statistisch signifikante (\*,  $p \leq 0,05$ ) Abnahme der Expression von *IL-23* unter der Behandlung mit Pascorbin® sowie der Kombination von Pascorbin® und Vitamin B1 gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Außerdem ergab sich eine statistisch hoch signifikante (\*\*,  $p \leq 0,01$ ) Abnahme der Expression von *IL-23* bei der Behandlung mit Hydrocortison in Kombination mit Pascorbin®, Hydrocortison in Kombination mit Vitamin B1 sowie der Dreifachkombination aus Pascorbin®, Vitamin B1 und Hydrocortison gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Hydrocortison allein sowie Vitamin B1 allein ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen.

Die statistische Analyse der normalisierten Daten zeigte eine statistisch sehr hoch signifikante (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ) Abnahme der Expression von *IL-23* unter der Behandlung mit Hydrocortison allein gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Bei der Behandlung mit allen anderen Behandlungsgruppen mit Pascorbin® und / oder Hydrocortison (Pascorbin® allein / Pascorbin® in Kombination mit Vitamin B1 / Pascorbin® in Kombination mit Hydrocortison / Dreifachkombination aus Pascorbin®, Vitamin B1 und Hydrocortison / Hydrocortison in Kombination mit Vitamin B1) ergab sich eine statistisch höchst signifikante (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Abnahme der Expression von *IL-23* gegenüber der mit LPS behandelten Kontrolle. Unter der Behandlung mit Vitamin B1 allein ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung.

Somit kann festgestellt werden, dass sich – nach Normalisierung der Daten – eine Reduktion der Expression von *IL-23* bei allen eingesetzten Kombinationen mit Pascorbin® sowie bei allen eingesetzten Kombinationen mit Hydrocortison zeigte.

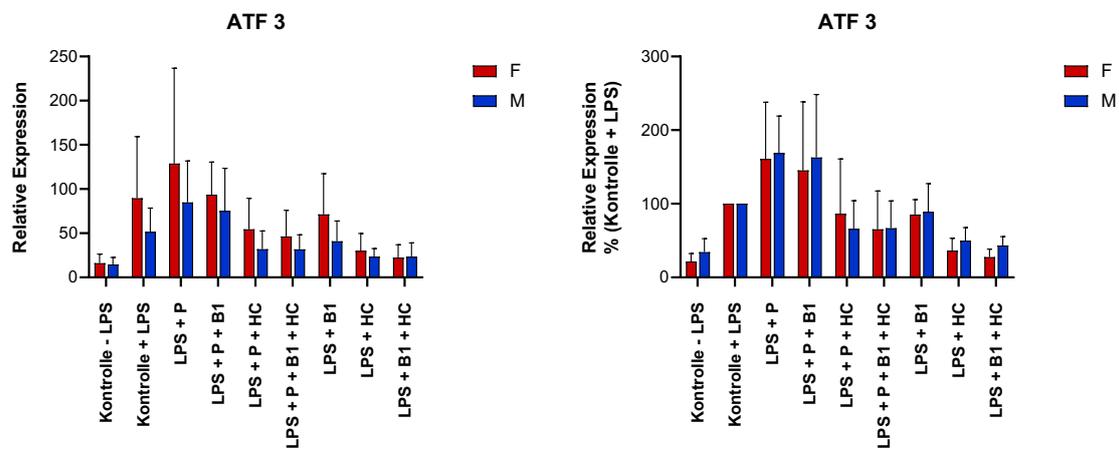
Die Mittelwerte und Standardabweichungen des Vergleiches zwischen den beiden Geschlechtern für die Expression von *ATF 3*, *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *MCP-1* und *IL-23* sind in Abbildung 51 bis Abbildung 53 dargestellt.

Die absolute relative Expression ist in den folgenden Abbildungen auf der linken Seite dargestellt, die normalisierten Daten kommen auf der rechten Seite zur Darstellung, jeweils aufgetrennt nach Geschlecht; Frauen in Rot, Männer in Blau.

Die folgenden Grafiken enthalten keine Aussagen zu statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen, da diese bereits in den vorangegangenen Abbildungen gezeigt wurden. Zur besseren Übersichtlichkeit kommt in Abbildung 51 bis Abbildung 53 ausschließlich die statistische Auswertung bezüglich geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Genexpression zur Darstellung.

Abbildung 51 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen pro Behandlungsgruppe für die Expression von *ATF 3* (entsprechend der Werte von Abbildung 46) aufgetrennt nach Geschlecht. Auf der linken Seite ist die relative Expression dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.

Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression von *ATF 3* zwischen den beiden Geschlechtern.



**Abbildung 51: Expression verschiedener Gene nach Geschlecht (VR II, Teil 1)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB* und *TBP* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Expression von *ATF 3* zwischen den beiden Geschlechtern. Die statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 46 dargestellt. Die linke Grafik zeigt die relative Expression, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Sidak`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

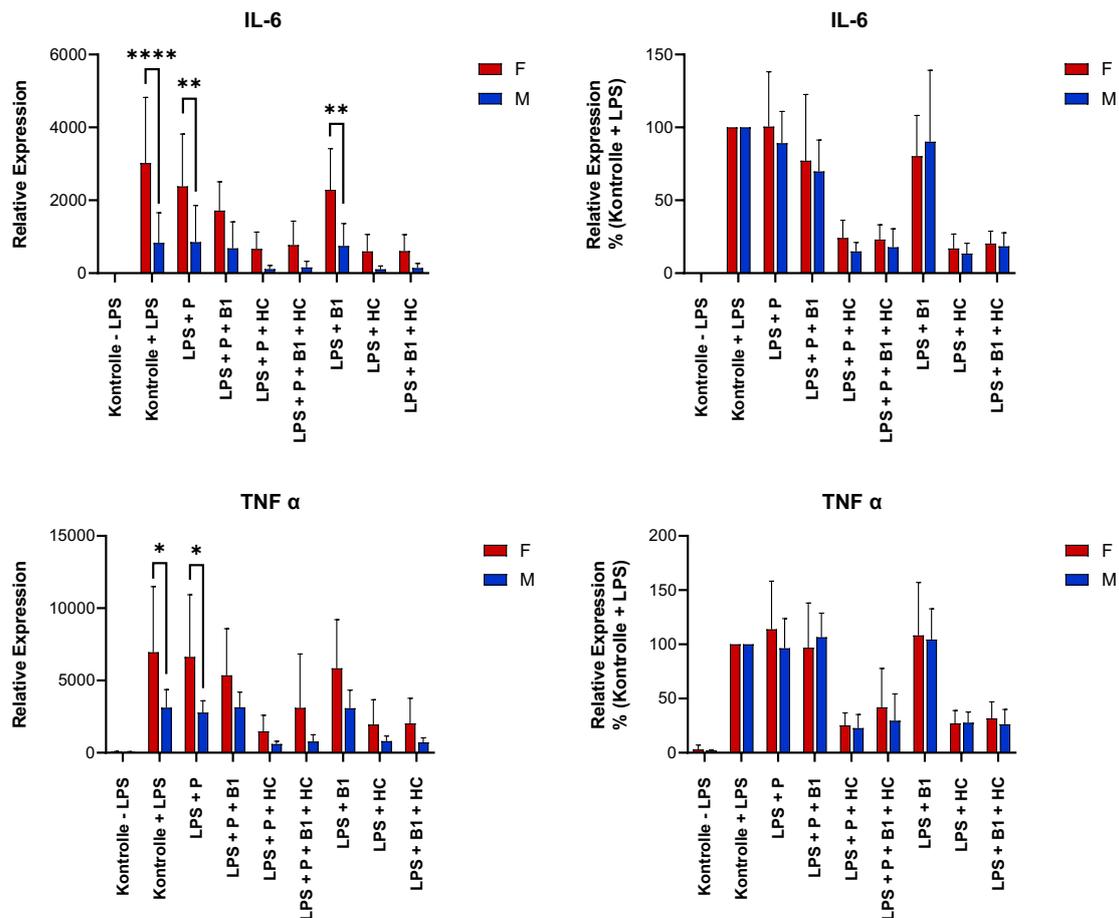
Abbildung 52 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen pro Behandlungsgruppe für die Expression von *IL-6* und *TNF- $\alpha$*  (entsprechend der Werte von Abbildung 47 und Abbildung 48) aufgetrennt nach Geschlecht. Auf der linken Seite ist die relative Expression dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normierten Daten zur Darstellung.

In der relativen Expression von *IL-6* ergab sich innerhalb der mit LPS stimulierten Kontrolle ein statistisch höchst signifikanter (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern, wobei die Zellen der weiblichen Spender deutlich mehr *IL-6* exprimierten als die Zellen der männlichen Spender. In der Behandlungsgruppe mit Pascorbin® sowie unter Behandlung mit Vitamin B1 zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter (\*\*,  $p \leq 0,01$ ) Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern, wobei die Zellen der weiblichen Spender erneut deutlich mehr *IL-6* exprimierten als die Zellen der männlichen Spender.

Nach Normalisierung der Daten zur relativen Expression von *IL-6* ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr zwischen den beiden Geschlechtern.

Bei der relativen Expression von *TNF- $\alpha$*  ergab sich innerhalb der mit LPS stimulierten Kontrolle ein statistisch signifikanter (\*,  $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern, wobei die Zellen der weiblichen Spender deutlich mehr *TNF- $\alpha$*  exprimierten als die Zellen der männlichen Spender. In der Behandlungsgruppe mit Pascorbin® zeigte sich ebenfalls ein statistisch signifikanter (\*,  $p \leq 0,05$ ) Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern, wobei die Zellen der weiblichen Spender erneut deutlich mehr *TNF- $\alpha$*  exprimierten als die Zellen der männlichen Spender.

Auch nach Normalisierung der Daten zur relativen Expression von *TNF- $\alpha$*  ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr zwischen den beiden Geschlechtern.



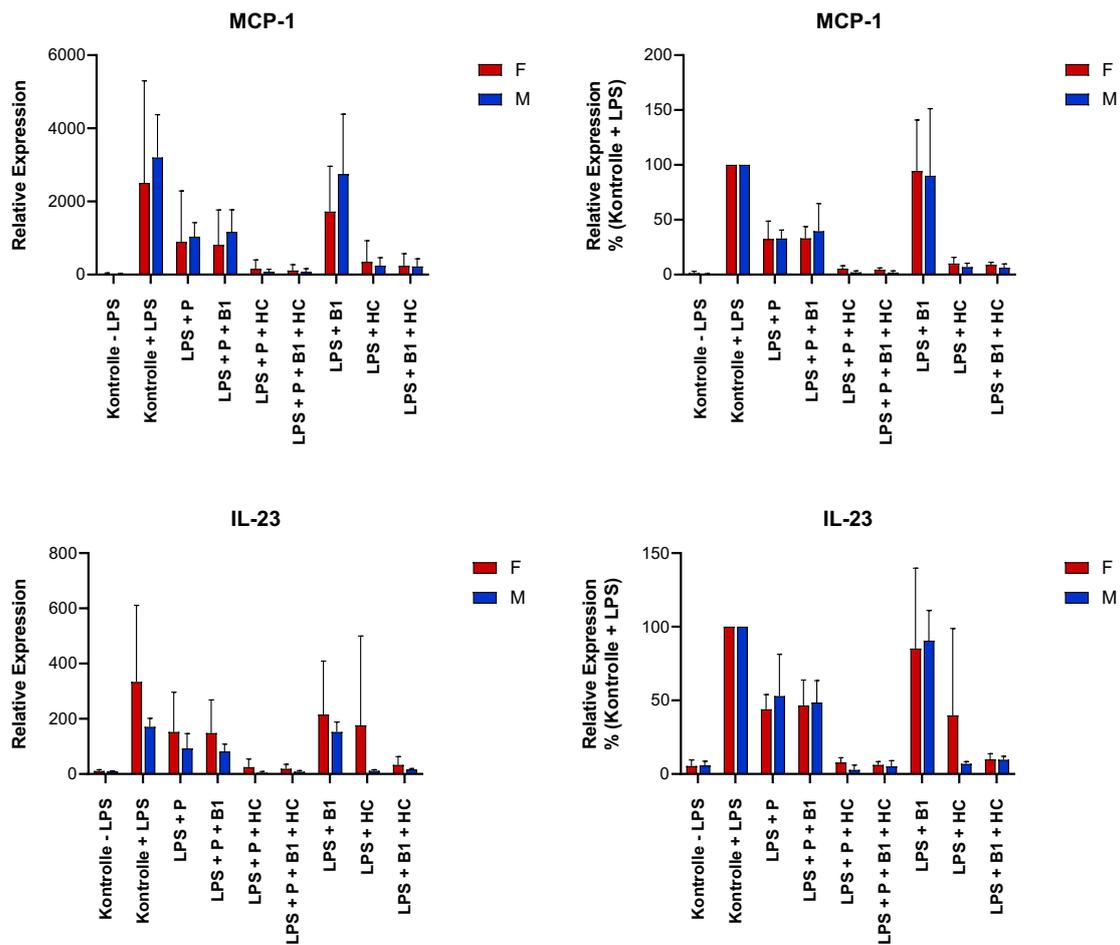
**Abbildung 52: Expression verschiedener Gene nach Geschlecht (VR II, Teil 2)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB* und *TBP* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern und die Standardabweichungen, sowie statistisch signifikante Veränderungen (\*) zwischen den beiden Geschlechtern, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Die statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 47 und Abbildung 48 dargestellt. Die linke Grafik zeigt die relative Expression, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Sidak's-multiple-comparison-Test, \*:  $p \leq 0,05$ , \*\*:  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ , nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Abbildung 53 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen pro Behandlungsgruppe für die Expression von *MCP-1* und *IL-23* (entsprechend der Werte von Abbildung 49 und Abbildung 50) aufgetrennt nach Geschlecht. Auf der linken Seite ist die relative Expression dargestellt, auf der rechten Seite kommen die normalisierten Daten zur Darstellung.

Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression von *MCP-1* und *IL-23* zwischen den beiden Geschlechtern.



**Abbildung 53: Expression verschiedener Gene nach Geschlecht (VR II, Teil 3)**

Die relative Expression wurde mittels qPCR bestimmt und die Ergebnisse gegen die Expression von *ACTB* und *TBP* normalisiert. Untersucht wurden eine unbehandelte Kontrolle, sowie eine mit LPS behandelte Kontrolle und eine Behandlung mit 10 ng/ml LPS und 1 mM Pascorbin® als Vergleichsgruppen. Des Weiteren wurden die Kombination von Pascorbin® (1 mM) und Vitamin B1 (1 µM) bzw. Hydrocortison (2 µM) sowie die Dreifachkombination unter LPS-Stimulation untersucht. Zum weiteren Vergleich wurde außerdem die Wirkung von Vitamin B1 bzw. Hydrocortison allein und in Kombination miteinander unter LPS-Stimulation untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von je sechs Spendern und die Standardabweichungen, wobei für jeden Spender eine Messung in Duplikaten erfolgte. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Veränderungen in der Expression von *MCP-1* und *IL-23* zwischen den beiden Geschlechtern. Die statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen sind in Abbildung 49 und Abbildung 50 dargestellt. Die linke Grafik zeigt die relative Expression, die rechte Grafik zeigt die auf die mit LPS stimulierte Kontrolle normalisierten Werte (Kontrolle + LPS = 100 %).

Sidak`s-multiple-comparison-Test, nach Inkubation für sechs Stunden, LPS = Lipopolysaccharid, P = Pascorbin®, B1 = Vitamin B1, HC = Hydrocortison, *ACTB* =  $\beta$ -Actin, *TBP* = TATA-Box-Bindungsprotein, F = weibliche Spender, M = männliche Spender, VR = Versuchsreihe.

Im Vergleich der beiden Geschlechter ergaben sich also bei insgesamt drei von fünf untersuchten Genen (*IL-1 $\beta$* , *MCP-1*, *IL-23*) keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression. Die Expression von *ATF 3*, *MCP-1* und *IL-23* scheint somit unter den hier gewählten Versuchsbedingungen keinem geschlechtsspezifischem Effekt zu unterliegen.

Bei *IL-6* und *TNF- $\alpha$*  ergaben sich einzelne statistisch signifikante Unterschiede in der relativen Expression (Abbildung 52). Nach Normalisierung der Daten ergaben sich allerdings auch für *IL-6* und *TNF- $\alpha$*  keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr in der Expression zwischen den beiden Geschlechtern.

## 4 Diskussion<sup>2</sup>

*"Bei der Sepsis handelt es sich um ein komplexes klinisches Syndrom, das in der Regel mit einer übermäßigen Entzündungsreaktion einschließlich einer überschießenden Freisetzung von Zytokinen einhergeht, die Gewebe und Organe des Patienten schädigt. Aufgrund der Schwere dieser Erkrankung sterben jedes Jahr schätzungsweise weltweit über 11 Millionen Menschen an Sepsis. (Lauer et al., 2021)"*

*"Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet gibt es noch immer keine spezifische Therapie für Sepsis. Bemerkenswerterweise findet sich bei vielen Sepsis-Patienten ein ausgeprägter Vitamin C-Mangel: neun von zehn Sepsis-Patienten haben eine Hypovitaminose C und jeder dritte Patient zeigt sogar einen klinischen Mangel mit Skorbut-Aspekten. Darüber hinaus korreliert ein niedriger Vitamin C-Spiegel bei Sepsispatienten, die auf der Intensivstation betreut werden müssen, mit einem höheren Bedarf an Vasopressoren, höheren SOFA-Scores (Sequential Organ Failure Assessment) und einer erhöhten Sterblichkeit. (Lauer et al., 2021)"*

*"Ausgehend von dieser Beobachtung und den durchgeführten klinischen Studien, in denen Vitamin C als Sepsistherapie bei Intensivpatienten eingesetzt wurde, war das Ziel der vorliegenden in vitro Studie, die Auswirkungen von hochdosiertem Vitamin C allein und in einer Dreifachkombination mit Vitamin B1 (Thiamin) und Hydrocortison auf die durch Lipopolysaccharid (LPS) ausgelöste Zytokinreaktion in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von gesunden menschlichen Spendern zu untersuchen. (Lauer et al., 2021)"*

---

<sup>2</sup> Anmerkung:

Teile der Daten dieser Promotionsarbeit wurden bereits im Jahr 2021 veröffentlicht (Lauer et al., 2021); dementsprechend werden in dieser Promotionsarbeit aus der englisch gefassten Originalarbeit von Lauer et al., 2021 übernommene (und ins Deutsche übertragene) Textabschnitte sowohl mit "Anführungszeichen" als auch in kursiver Schrift gesondert ausgewiesen, so dass die Herkunft dieser Passagen jederzeit rückführbar ist.

*"Unsere Ergebnisse zeigen, dass pharmakologische Dosierungen von Vitamin C bis zu 2 mM die Viabilität von menschlichen PBMCs gesunder Spender nicht beeinflussen. Wie ausgangsmäßig bereits vermutet, verringert Vitamin C die LPS-induzierte Freisetzung von Zytokinen. (Lauer et al., 2021)"*

*"Bei den untersuchten Zytokinen zeigte sich die Sekretion von MCP-1, IL-10 und IL-23 bei gleichzeitiger Vitamin C-Behandlung signifikant verringert. Die derartig nachgewiesene immunmodulatorische Wirkung von Vitamin C auf MCP-1, IL-10 und IL-23 ist von besonderem Interesse, da der septische Schock häufig mit einer übersteigerten Immunantwort und einer oft tödlichen Hyperzytokinämie verbunden ist (Chousterman et al., 2017). (Lauer et al., 2021)"*

*"Unsere Daten bestätigen auch eine dominante Wirksamkeit des Cortikosteroids Hydrocortison in den Kombinationsversuchen mit Vitamin B1 und Vitamin C. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass die Wirkung von Vitamin C auf die IL-10 Sekretion der Wirkung von Hydrocortison gleichkommt. Allerdings zeigte die Kombination von Vitamin C und Hydrocortison im Vergleich zu Hydrocortison keine zusätzliche Wirkung in Form einer verringerten Zytokinfreisetzung im Vergleich zu Hydrocortison allein; dies trifft für alle hier untersuchten Zytokine zu. Interessanterweise hatte Vitamin B1 keinen Einfluss auf die Zytokinfreisetzung. (Lauer et al., 2021)"*

*"IL-10 ist ein entzündungshemmendes Zytokin. Während einer Infektion hemmt es die Aktivität von T-Helferzellen (Th1-Zellen), natürlichen Killerzellen und Makrophagen, die alle für eine optimale Erregerbeseitigung erforderlich sind, gleichzeitig aber auch zu Gewebeschäden beitragen. Daher kann IL-10 sowohl die Beseitigung von Krankheitserregern behindern als auch die Immunpathologie fördern. IL-10 hat somit eine bifunktionale Regulationsfähigkeit bei der Sepsis und es kann nicht verallgemeinert werden, ob eine Herabregulierung z.B. durch Vitamin C oder Hydrocortison per se vorteilhaft oder schädlich ist. (Lauer et al., 2021)"*

*“Viele verschiedene Zelltypen produzieren IL-10. Die entzündungshemmende Wirkung von IL-10 wird durch seine negative Korrelation mit TNF und IL-6 verdeutlicht. IL-10 fungiert als zeitlicher Regulator des Übergangs von der frühen reversiblen Sepsis zur Spätphase des irreversiblen Schocks. (Lauer et al., 2021)“*

*“Das Einsetzen der Sepsis-bedingten Letalität findet bei IL-10<sup>-/-</sup> Knock-out Mäusen signifikant früher statt als bei IL-10<sup>+/+</sup> Wildtyp Mäusen und war mit 15-fach höheren Serumspiegeln von TNF und IL-6 verbunden (Latifi, O’Riordan, & Levine, 2002). Eine IL-10-Vorbehandlung konnte die TNF-Reaktion auf LPS bei Mäusen verhindern (Kawai et al., 1998). In einer Humanstudie war das IL-10/Lymphozyten-Verhältnis bei nicht überlebenden Patienten signifikant höher als bei überlebenden Patienten, was auf eine durch Sepsis verursachte IL-10 Immunsuppression hinweist (X. Li et al., 2017). (Lauer et al., 2021)“*

*“Die Rolle von IL-23 in der Pathologie der Sepsis wird immer deutlicher. Eine erhöhte Aktivität des IL-17/IL-23-Signalwegs wirkt sich nachteilig auf die Sepsis-induzierte Lungenentzündung aus. Es wird daher spekuliert, dass Inhibitoren von IL-23 einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Sepsis haben können (Bosmann & Ward, 2012; Cauvi, Williams, Bermudez, Armijo, & De Maio, 2014). (Lauer et al., 2021)“*

*“Es gibt immer mehr Belege für eine starke Korrelation zwischen hohen MCP-1-Werten und Organfunktionsstörungen und einer erhöhten Sterblichkeit bei Sepsis-Patienten. Außerdem deuten entsprechende Tiermodelle auf eine wichtige Rolle für MCP-1 bei der Sepsis hin (Bossink et al., 1995; Bozza et al., 2007; He et al., 2017; Hong et al., 2014; Matsukawa et al., 2000; Tsuda et al., 2004). Folglich wurden Versuche unternommen, MCP-1 bei systemischen Entzündungen gezielt einzusetzen. So schützte die prophylaktische und therapeutische Behandlung mit Bindarit, einem Blocker der MCP-1-Synthese, Mäuse signifikant vor Sepsis und Endotoxämie, was sich in einer Verringerung der Neutrophilenaktivität in Lunge und Leber zeigte (Ramnath, Ng, Guglielmotti, & Bhatia, 2008). (Lauer et al., 2021)“*

*“Daher ist die Kenntnis des genauen Einflusses der einzelnen therapeutischen Komponenten auf das Zytokinprofil von zentraler Bedeutung für die Bewertung neuer therapeutischer Ansätze für Sepsis, wie die Kombination von Vitamin C, Vitamin B1 und Hydrocortison. (Lauer et al., 2021)“*

*“Unser Ergebnis, dass Vitamin B1 weder die Zytokinfreisetzung beeinflusst noch die durch Vitamin C oder Hydrocortison vermittelten Effekte moduliert, steht im Einklang mit einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie, in der Thiamin als metabolischer Wiederbelebungsfaktor bei septischem Schock eingesetzt wurde. In dieser Studie konnte Thiamin weder die Laktatwerte noch andere Ergebnisse in der Gesamtgruppe der Patienten mit septischem Schock und erhöhtem Laktat beeinflussen. Allerdings hatten Patienten mit Thiaminmangel möglicherweise einen Nutzen (Donnino et al., 2016). Obwohl Thiamin bei septischem Schock einen gewissen Nierenschutz zu bieten scheint (Moskowitz et al., 2017), zeigten Miyamoto et al. in einer Beobachtungsstudie, dass sich kein Zusammenhang zwischen der Verabreichung von Thiamin und der 28-Tage-Mortalität bei Patienten mit septischem Schock findet (Miyamoto et al., 2020). (Lauer et al., 2021)“*

*“Vitamin C scheint in der Lage zu sein, sowohl Infektionen der Atemwege als auch systemische Infektionen vorzubeugen und zu behandeln, indem es verschiedene Funktionen der Immunzellen stärkt (Carr & Maggini, 2017; Doseděl et al., 2021). Traditionell werden diese mit antioxidativen Eigenschaften (< 10 mM Plasmakonzentration) korreliert und wurden wiederholt in vitro bestätigt. (Lauer et al., 2021)“*

*“In einer retrospektiven klinischen Vorher-Nachher-Studie wurden septische Patienten während eines Zeitraums von sieben Monaten mit intravenösem Vitamin C, Hydrocortison und Thiamin nach dem sog. Marik-Protokoll behandelt (Verumgruppe) und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe aus ebenfalls intensivmedizinisch behandelten Patienten verglichen (Marik et al., 2017). Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass die frühzeitige Gabe von intravenösem Vitamin C zusammen mit Cortikosteroiden und Thiamin eine fortschreitende Organfunktionsstörung, einschließlich akuter Nierenschäden, verhindern und die*

*Sterblichkeit von Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock verringern kann. Allerdings sind weitere Studien erforderlich, um diese vorläufigen Ergebnisse zu bestätigen (Marik et al., 2017). (Lauer et al., 2021)“*

*“Fowler et al. veröffentlichten eine in diesem Zusammenhang ebenfalls interessante Studie, die sog. CITRIS-ALI-Studie: In dieser Vorstudie an Patienten mit Sepsis und ARDS führte eine 96-Stunden-Infusion von Vitamin C im Vergleich zu Placebo zu keiner signifikanten Verbesserung der Werte für Organdysfunktionen oder der Marker für Entzündungs- und Gefäßverletzungsmarkern (Fowler et al., 2019). Interessanterweise wurde die Gesamtmortalität signifikant gesenkt, insbesondere in den ersten 96 Stunden (Hemilä & Chalker, 2020). (Lauer et al., 2021)“*

*“Eine weitere Studie, die sog. VITAMINS-Studie, verglich die Behandlung mit intravenösem Vitamin C, Hydrocortison und Thiamin mit der alleinigen Gabe von intravenösem Hydrocortison bei Patienten mit septischem Schock (Carr, 2020). Die Kombinationstherapie führte dabei nicht zu einer signifikanten Verbesserung des Gesamt-Überlebens oder der Notwendigkeit der Verabreichung von Vasopressoren über sieben Tage. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Behandlung mit intravenösem Vitamin C, Hydrocortison und Thiamin nicht zu einer schnelleren Auflösung eines septischen Schocks führt als intravenöses Hydrocortison allein (Fujii et al., 2020). Allerdings zeigten die Patienten, die die Vitamin C-haltige Kombinationstherapie erhielten, am dritten Tag niedrigere SOFA-Werte. (Lauer et al., 2021)“*

*“Auch in der sog. TESS-Studie konnten keine Verbesserungen nach Verabreichung von Vitamin C und Thiamin in der frühen Phase des septischen Schocks im Vergleich zu Placebo gesehen werden (Hwang et al., 2020; Spoelstra-de Man, Oudemans-van Straaten, & Berger, 2019; Ying Wang, Lin, Lin, & Lin, 2019). (Lauer et al., 2021)“*

*“Ähnliches gilt auch für die sog. ACTS-Studie, in der Patienten mit septischem Schock mit einer Kombination aus Vitamin C, Cortikosteroiden und Vitamin B1 behandelt wurden. Hier ergab sich keine signifikante Verringerung der SOFA Scores in den ersten 72 Stunden nach Studieneintritt, aber die Patienten hatten*

*interessanterweise mehr "schockfreie" Tage (Moskowitz et al., 2020). (Lauer et al., 2021)“*

*“Inzwischen wurden auch verschiedene Meta-Analysen zu Vitamin C bei Sepsis und kritisch kranken Patienten veröffentlicht. Die Ergebnisse sind allerdings stark umstritten: während einige Meta-Analysen eine Verringerung der Sterblichkeit, einen kürzeren Krankenhausaufenthalt und / oder einen geringeren Bedarf an Vasopressoren sehen, werden diese Effekte in anderen Meta-Analysen nicht bestätigt (Ge et al., 2021; Scholz et al., 2021). (Lauer et al., 2021)“*

*“Erwähnenswert ist eine Meta-Analyse, in der Effekte in Abhängigkeit von der gewählten Vitamin C-Dosis sieht (Ying Wang et al., 2019). Dabei zeigte sich, dass intravenös verabreichtes Vitamin C die Dauer der vasopressorischen Unterstützung und der mechanischen Beatmung verkürzt; eine i.v. Dosis im Bereich von 3-10 g Vitamin C führte zu einer niedrigeren Gesamtmortalität. (Lauer et al., 2021)“*

*“Die Behandlung septischer Patienten stellt aufgrund der Komplexität des Syndroms und der Heterogenität eine große Herausforderung dar. Da Vitamin B1 keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Zytokinsekretion hatte, ergibt sich eine Rationale, das Protokoll von Marik et al. (Marik et al., 2017) zu modifizieren, indem man die Gabe von Vitamin B1 z.B. durch die Gabe von Vitamin D ersetzt. Ein schwerer Vitamin-D-Mangel wurde mit einer erhöhten Sterblichkeit bei erwachsenen Patienten mit Sepsis in Verbindung gebracht (Yuye Li & Ding, 2020; Tosoni et al., 2021). Daher wurde die Bestimmung von Procalcitonin und Vitamin D zur Vorhersage der Sepsisprognose bei Patienten empfohlen (Tosoni et al., 2021). Eine adjuvante Vitamin-D-Therapie verbesserte einen Sepsis-Score und verringerte die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines septischen Schocks bei Neugeborenen und Kindern (Hagag, El Fragy, & Houdeeb, 2020; Yu Wang, Yang, Gao, Cao, & Wang, 2020). (Lauer et al., 2021)“*

*“Ein weiteres wichtiges Thema ist die Hypotension bei Sepsispatienten. Obwohl die Arbeit von Juraschek et al. auf eine moderate blutdrucksenkende Wirkung der Vitamin C-Supplementierung hinweist (Juraschek, Guallar, Appel, & Miller, 2012), was eine Hypotonie bei Sepsis-Patienten verschlimmern könnte, wurde*

*ein solcher Effekt in den klinischen Studien, in denen Vitamin C in einer Menge von 1,5 g alle sechs Stunden i.v. verabreicht wurde, nicht beobachtet. Vielmehr gab es entweder keine Auswirkungen auf die Verabreichung von Vasopressoren oder sogar eine Verkürzung der Zeit, in der die Verabreichung von Vasopressoren erforderlich war (Zabet, Mohammadi, Ramezani, & Khalili, 2016). (Lauer et al., 2021)“*

*“Da weitere, zum Teil sehr große Studien bei [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) registriert sind und fortlaufend weiter rekrutiert werden, bleibt abzuwarten, was diese weiteren Studien zur Erhellung der komplexen Datenlage der pharmakologischen Therapie mittels Vitamin C, Cortikosteroiden und Vitamin B1 bei Sepsis zeigen werden. (Lauer et al., 2021)“*

*“Die aktuellen klinischen Studiendaten zeigen keinen allgemeinen signifikanten Nutzen für Patienten mit septischem Schock, die eine Therapie mit Vitamin C, Cortikosteroiden und Vitamin B1 erhalten. (Lauer et al., 2021)“*

*“Möglicherweise profitieren jedoch nicht identifizierte Untergruppen von Patienten von der Kombination. Wie von Marik et al. (Marik et al., 2017) vorgeschlagen, scheint der Zeitpunkt der Intervention ein entscheidender Faktor zu sein (die Zeit von der Diagnose bis zur Therapie sollte weniger als sechs Stunden betragen) und auch die Dosierung ist ein wichtiger Faktor, denn Studien zeigten eine höhere Wirksamkeit bei höheren Dosierungen (200 mg Vitamin C/kg/Tag) (Fowler et al., 2014). Letztere Erkenntnis wurde kürzlich durch eine Meta-Analyse von neun randomisierten Kontrollstudien mit insgesamt 584 Patienten (301 in der Interventionsgruppe und 283 in der Kontrollgruppe), die eine Verringerung der Sterblichkeit auf der Intensivstation zeigte (OR = 0,60 95 % CI [0,42, 0,85],  $p = 0,004$ ) und der Dosierung der eingesetzten Vasopressoren (SMD = 20,88 95 % CI [21,48, 20,29],  $p = 0,003$ ) in der mit Vitamin C behandelten Interventionsgruppe (im Vergleich zu Placebo). Die Dauer des Aufenthalts auf der Intensivstation unterschied sich jedoch nicht zwischen den beiden Gruppen. (Lauer et al., 2021)“*

*“Daraus folgt, dass multizentrische und randomisierte kontrollierte Studien erforderlich sind, um die Sicherheit und Wirksamkeit des Einsatzes von Vitamin C zur*

*Behandlung von Patienten mit Sepsis und septischem Schock zu klären (Feng et al., 2021). (Lauer et al., 2021)“*

*“Unsere in vitro Studie liefert weitere Belege für die immunmodulatorischen Effekte von Vitamin C auf menschliche PBMCs im Zusammenhang mit der LPS-induzierten Zytokinantwort. Die allgemeine Wirkung von Vitamin C auf IL-10, IL-23 und MCP-1 war offensichtlich, die Auswirkungen wurden jedoch nicht in Proben von septischen Patienten bestimmt, dies bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. Es wäre wertvoll, Proben von septischen Patienten sowie einer größeren Anzahl von Probanden zu asservieren und daran insbesondere Mikronährstoffanalysen vorzunehmen. (Lauer et al., 2021)“*

*“Darüber hinaus wurde die aktuelle Untersuchung mit isolierten PBMCs durchgeführt, und es könnte wichtig sein, diese Ergebnisse in Vollblutproben als weiteres in vitro Modell zu bestätigen und dann – darüber hinausgehend – in einem Tiermodell auch die Auswirkungen auf das Überleben zu untersuchen. Außerdem ist anzumerken, dass LPS "lediglich" einen Stimulus von gramnegativen Bakterien darstellt; eine Sepsis kann jedoch auch durch andere Erreger, einschließlich gram-positive Bakterien, verursacht werden. Daher sollten ähnliche Wirkungen unter Verwendung zusätzlicher Komponenten wie Lipoteichonsäure aus gram-positiven Bakterien bestätigt werden. (Lauer et al., 2021)“*

*“Alle diese Aspekte sind es wert, diese Thematik weiter intensiv zu untersuchen und so schlussendlich zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen zu gelangen, was dann eine verbesserte und insbesondere gezieltere Behandlung der Sepsis-Folgen erlauben wird. (Lauer et al., 2021)“*

In einer aktuellen Meta-Analyse aus dem Jahr 2023 wurde die Wirksamkeit von (i) Hydrocortison in Kombination mit (ii) Vitamin C und (iii) Thiamin (sog. HVT-Kombination) bei der Behandlung von Sepsis / septischem Schock untersucht. Diese Meta-Analyse umfasste acht randomisierte kontrollierte Studien mit insgesamt 1.572 Patienten, in denen die Wirksamkeit von HVT und Placebo bei der Behandlung von Sepsis / septischem Schock verglichen wurde (Lu & Mao, 2023).

Im Ergebnis zeigte sich, dass die HVT-Behandlung weder die Gesamtsterblichkeit noch die Krankenhaussterblichkeit oder die Sterblichkeit auf der Intensivstation reduzierte. Darüber hinaus gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der HVT- und der Kontrollgruppe in Bezug auf die Veränderung des SOFA-Scores, die Dauer des Aufenthalts auf der Intensivstation, die Dauer des Krankenhausaufenthalts, die Dauer des Einsatzes von Vasopressoren, das Auftreten akuter Nierenschäden und die beatmungsfreien Tage (Lu & Mao, 2023).

Auf dieser Basis ziehen die Autoren den Schluss, dass die HVT-Behandlung nicht zu einer Verringerung der Sterblichkeit von Patienten mit Sepsis / septischem Schock führte und keine signifikante Verbesserung der Behandlungsergebnisse erzielt werden kann. Kritisch führen die Autoren allerdings weiter aus, dass weitere randomisierte klinische Studien mit hoher Qualität und großem Stichprobenumfang erforderlich sind, um diese vorläufigen Ergebnisse weiter zu bestätigen (Lu & Mao, 2023).

In einer weiteren Meta-Analyse, ebenfalls aus dem Jahr 2023, wurden insgesamt 24 randomisierte kontrollierte Studien untersucht (Wen et al., 2023).

Im Ergebnis zeigte sich dabei, dass intravenöses Vitamin C die kurzfristige Sterblichkeit und die Gesamtsterblichkeit von Patienten mit Sepsis verbessern kann. Außerdem verbesserte sich der SOFA-Score von Patienten mit Sepsis nach einer Behandlung mit Vitamin C über 72 Stunden signifikant (Wen et al., 2023).

Auch bei dieser Meta-Analyse merken die Autoren allerdings kritisch an, dass die untersuchten Studien häufig bzgl. ihrer Qualität als mäßig einzuschätzen waren und kommen dementsprechend gleichermaßen zu dem Schluss (siehe oben), dass weitere hochwertige, multizentrische randomisierte klinische Studien benötigt werden, um die Wirksamkeit und Sicherheit von intravenös verabreichtem Vitamin C bei Sepsis besser belegen zu können (Wen et al., 2023).

## 4.1 Schlussfolgerungen

In dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass Vitamin C eine modulierende Wirkung auf bestimmte Zytokine ausübt. Allerdings sind Untersuchungen in weiteren Sepsis-Modellen erforderlich, um die Auswirkungen von Vitamin C auf die Abschwächung eines Zytokinsturms und damit den Erfolg einer dezidierten Sepsistherapie zu bewerten.

Trotz der interessanten Aspekte, die für Vitamin C gezeigt wurden, fand sich in diesem *in vitro* PBMC-Sepsismodell eine dominante Wirkung von Hydrocortison in Bezug auf die Zytokinfreisetzung. Angesichts der Tatsache, dass Vitamin B1 keinen Einfluss auf die Zytokinfreisetzung hatte, könnte das Protokoll von Marik (Marik et al., 2017) zur Sepsis-Behandlung dahingehend modifiziert werden, dass Vitamin B1 zum Beispiel durch Vitamin D ersetzt wird.

Da Vitamin C einen lebenswichtigen Mikronährstoff darstellt, sollte die Wiederherstellung physiologisch angemessener Serum-Konzentrationen an Vitamin C ein zentraler Bestandteil eines jeden therapeutischen Ansatzes sein. Inwiefern supraphysiologische Serum-Konzentrationen von Vitamin C mit zusätzlichen therapeutischen Vorteilen bei Sepsis-Patienten verbunden sind, muss in weiteren klinischen Studien überprüft werden.

## 5 Zusammenfassung

Bei der Sepsis kommt es komplikativ regelhaft zu einer überschießenden Freisetzung von Zytokinen, was in einer Schädigung der Gewebe und der Organe betroffener Patienten resultiert. Ein möglicher Ansatz zur gezielten pharmakologischen Intervention ergibt sich aus der Beobachtung, dass sich bei vielen Sepsis-Patienten ein ausgeprägter Vitamin C-Mangel findet, der wiederum mit einem höheren Bedarf an Vasopressoren, höheren SOFA-Scores und einer erhöhten Sterblichkeit korreliert.

Das Ziel der hier vorliegenden in vitro Studie war es, die Auswirkungen von hochdosiertem Vitamin C allein und in einer Dreifachkombination mit Vitamin B1 (Thiamin) und Hydrocortison auf die durch Lipopolysaccharid (LPS) ausgelöste Zytokinreaktion in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) von gesunden menschlichen Spendern zu untersuchen.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden in vitro Studie zeigen, dass pharmakologische Dosierungen von Vitamin C bis zu 2 mM die Viabilität von menschlichen PBMCs gesunder Spender nicht beeinflussen. Wie eingangs bereits vermutet, verringert Vitamin C allerdings die LPS-induzierte Freisetzung von Zytokinen, was die therapeutische Wertigkeit einer solchen Intervention bei Sepsis-Patienten unterstreicht.

Bei den untersuchten Zytokinen zeigte sich die Sekretion von MCP-1, IL-10 und IL-23 bei gleichzeitiger Vitamin C-Behandlung signifikant verringert. Die derartig nachgewiesene immunmodulatorische Wirkung von Vitamin C auf MCP-1, IL-10 und IL-23 ist von besonderem Interesse, da der septische Schock häufig mit einer übersteigerten Immunantwort und einer oft tödlichen Hyperzytokinämie verbunden ist.

Unsere Daten bestätigen auch eine dominante Wirksamkeit des Cortikosteroids Hydrocortison in den Kombinationsversuchen mit Vitamin B1 und Vitamin C. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass die Wirkung von Vitamin C auf die IL-10 Sekretion der Wirkung von Hydrocortison gleichkommt. Allerdings

zeigte die Kombination von Vitamin C und Hydrocortison im Vergleich zu Hydrocortison keine zusätzliche Wirkung in Form einer verringerten Zytokinfreisetzung im Vergleich zu Hydrocortison allein; dies trifft für alle hier untersuchten Zytokine zu. Interessanterweise hatte Vitamin B1 keinen Einfluss auf die Zytokinfreisetzung.

In dieser Promotionsarbeit konnte somit gezeigt werden, dass Vitamin C eine modulierende Wirkung auf bestimmte entzündliche Zytokine ausübt. Allerdings sind Untersuchungen in weiteren Sepsis-Modellen erforderlich, um die Auswirkungen von Vitamin C auf die Abschwächung eines Zytokinsturms und damit den Erfolg einer dezidierten Sepsistherapie zu bewerten.

Trotz der interessanten Aspekte, die für Vitamin C erbracht wurden, zeigte sich in diesem in vitro PBMC-Sepsismodell eine dominante Wirkung von Hydrocortison in Bezug auf die Zytokinfreisetzung. Angesichts der Tatsache, dass Vitamin B1 keinen Einfluss auf die Zytokinfreisetzung hatte, könnte das Protokoll von Marik (Marik et al., 2017) zur Sepsis-Behandlung dahingehend modifiziert werden, dass Vitamin B1 zum Beispiel durch Vitamin D ersetzt wird.

Da Vitamin C einen lebenswichtigen Mikronährstoff darstellt, sollte die Wiederherstellung physiologisch angemessener Serum-Konzentrationen an Vitamin C ein zentraler Bestandteil eines jeden therapeutischen Ansatzes sein. Inwiefern supraphysiologische Serum-Konzentrationen von Vitamin C mit zusätzlichen therapeutischen Vorteilen bei Sepsis-Patienten verbunden sind, muss in weiteren klinischen Studien überprüft werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aline, N., Gut, A. L., Dorna, M. D. S., Alexandre, J., Pimentel, C., Maria, S., ... Minicucci, M. F. (2014). Serum thiamine concentration and oxidative stress as predictors of mortality in patients with septic shock. *Journal of Critical Care*, 29(2), 249–252. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.12.004>
- Angus, D. C., & van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *The New England Journal of Medicine*, 369(9), 840–851. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1208623>
- Annane, D. (2016). The Role of ACTH and Corticosteroids for Sepsis and Septic Shock: An Update. *Frontiers in Endocrinology*, 7, 70. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00070>
- Annane, D., Renault, A., Brun-Buisson, C., Megarbane, B., Quenot, J.-P., Siami, S., ... Bellissant, E. (2018). Hydrocortisone plus Fludrocortisone for Adults with Septic Shock. *The New England Journal of Medicine*, 378(9), 809–818. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1705716>
- Annane, D., Sébille, V., Charpentier, C., Bollaert, P.-E., François, B., Korach, J.-M., ... Bellissant, E. (2002). Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*, 288(7), 862–871. <https://doi.org/10.1001/jama.288.7.862>
- Azuhata, T., Kinoshita, K., Kawano, D., Komatsu, T., Sakurai, A., Chiba, Y., & Tanjho, K. (2014). Time from admission to initiation of surgery for source control is a critical determinant of survival in patients with gastrointestinal perforation with associated septic shock. *Critical Care (London, England)*, 18(3), R87. <https://doi.org/10.1186/cc13854>
- Baggiolini, M., & Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Letters*, 307(1), 97–101. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80909-z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80909-z)
- BioLegend. (2015). *LEGENDplex Multi-Analyte Flow Assay Kit*. Retrieved from

<https://www.biolegend.com/en-us/products/legendplex-human-inflammation-panel-1-13-plex-with-v-bottom-plate-16929>

- Bloos, F., & Reinhart, K. (2014). Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence*, 5(1), 154–160. <https://doi.org/10.4161/viru.27393>
- Bloos, F., Thomas-Rüddel, D., Rüddel, H., Engel, C., Schwarzkopf, D., Marshall, J. C., ... Reinhart, K. (2014). Impact of compliance with infection management guidelines on outcome in patients with severe sepsis: a prospective observational multi-center study. *Critical Care (London, England)*, 18(2), R42. <https://doi.org/10.1186/cc13755>
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., ... Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 101(6), 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
- Bosmann, M., & Ward, P. A. (2012). Therapeutic potential of targeting IL-17 and IL-23 in sepsis. *Clinical and Translational Medicine*, 1(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2001-1326-1-4>
- Bossink, A. W., Paemen, L., Jansen, P. M., Hack, C. E., Thijs, L. G., & Van Damme, J. (1995). Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood*, 86(10), 3841–3847.
- Bozza, F. A., Salluh, J. I., Japiassu, A. M., Soares, M., Assis, E. F., Gomes, R. N., ... Bozza, P. T. (2007). Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Critical Care (London, England)*, 11(2), R49. <https://doi.org/10.1186/cc5783>
- Brunkhorst, F., Weigand, M., Pletz, M., Gastmeier, P., Lemmen, S., Meier-Hellmann, A., ... H, A. (2018). *S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge*. Retrieved from [https://register.awmf.org/assets/guidelines/079-001I\\_S3\\_Sepsis-Prävention-Diagnose-Therapie-Nachsorge\\_2020-03\\_01.pdf](https://register.awmf.org/assets/guidelines/079-001I_S3_Sepsis-Prävention-Diagnose-Therapie-Nachsorge_2020-03_01.pdf)
- Bruno, J. J., Dee, B. M., Anderegg, B. A., Hernandez, M., & Pravinkumar, S. E.

- (2012). US practitioner opinions and prescribing practices regarding corticosteroid therapy for severe sepsis and septic shock. *Journal of Critical Care*, 27(4), 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2011.12.011>
- Carr, A. C. (2020, April). Is the VITAMINS RCT indicating potential redundancy between corticosteroids and vitamin C? *Critical Care (London, England)*, Vol. 24, p. 129. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02853-2>
- Carr, A. C., & Maggini, S. (2017). Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/nu9111211>
- Casserly, B., Phillips, G. S., Schorr, C., Dellinger, R. P., Townsend, S. R., Osborn, T. M., ... Levy, M. M. (2015). Lactate measurements in sepsis-induced tissue hypoperfusion: results from the Surviving Sepsis Campaign database. *Critical Care Medicine*, 43(3), 567–573. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000742>
- Cauvi, D. M., Williams, M. R., Bermudez, J. A., Armijo, G., & De Maio, A. (2014). Elevated expression of IL-23/IL-17 pathway-related mediators correlates with exacerbation of pulmonary inflammation during polymicrobial sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 42(3), 246–255. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000207>
- Chen, B. P., Wolfgang, C. D., & Hai, T. (1996). Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 1157–1168. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.3.1157>
- Chousterman, B. G., Swirski, F. K., & Weber, G. F. (2017). Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Seminars in Immunopathology*, 39(5), 517–528. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0639-8>
- Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420(6917), 885–891. <https://doi.org/10.1038/nature01326>
- Cruickshank, A. M., Telfer, A. B., & Shenkin, A. (1988). Thiamine deficiency in the critically ill. *Intensive Care Medicine*, 14(4), 384–387.

<https://doi.org/10.1007/BF00262893>

- Czura, C. J. (2011). "Merinoff symposium 2010: Sepsis"-speaking with one voice. *Molecular Medicine*, 17(1–2), 2–3. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00001.commentary>
- Dickson, K., & Lehmann, C. (2019). *Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models*.
- Dietrich, M., Märtens, M., von der Forst, M., Bruckner, T., Uhle, F., Fiedler, M., ... Weigand, M. A. (2021). Vitamin C and thiamine in septic shock – A retrospective before-and-after study on surgical patients. *Anesthesiologie Und Intensivmedizin*, 62(2), 63–69. <https://doi.org/10.19224/ai2021.063>
- Donnino, M. W., Andersen, L. W., Chase, M., Berg, K. M., Tidswell, M., Giberson, T., ... Cocchi, M. N. (2016). Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Thiamine as a Metabolic Resuscitator in Septic Shock: A Pilot Study. *Critical Care Medicine*, 44(2), 360–367. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001572>
- Donnino, M. W., Carney, E., Cocchi, M. N., Barbash, I., Chase, M., Joyce, N., ... Ngo, L. (2010). Thiamine deficiency in critically ill patients with sepsis. *Journal of Critical Care*, 25(4), 576–581. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2010.03.003>
- Doseděl, M., Jirkovský, E., Macáková, K., Krčmová, L. K., Javorská, L., Pourová, J., ... Oemonom, O. B. O. T. (2021). Vitamin C-Sources, Physiological Role, Kinetics, Deficiency, Use, Toxicity, and Determination. *Nutrients*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/nu13020615>
- Dranoff, G. (2004). *CYTOKINES IN CANCER CANCER THERAPY*. 4(January). <https://doi.org/10.1038/nrc1252>
- Dremsizov, T., Clermont, G., Kellum, J. A., Kalassian, K. G., Fine, M. J., & Angus, D. C. (2006). Severe sepsis in community-acquired pneumonia: when does it happen, and do systemic inflammatory response syndrome criteria help predict course? *Chest*, 129(4), 968–978.

<https://doi.org/10.1378/chest.129.4.968>

- Falagas, M. E., & Kompoti, M. (2006). Obesity and infection. *The Lancet. Infectious Diseases*, 6(7), 438–446. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70523-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70523-0)
- Feng, F., Yang, H., Yang, W., Li, M., Chang, X., & Chen, Y. (2021). Effect of vitamin C in critically ill patients with sepsis and septic shock: A meta-analysis. *Science Progress*, 104(1), 36850421998175. <https://doi.org/10.1177/0036850421998175>
- Finfer, S., Liu, B., Chittock, D. R., Norton, R., Myburgh, J. A., McArthur, C., ... Robinson, B. G. (2012). Hypoglycemia and risk of death in critically ill patients. *The New England Journal of Medicine*, 367(12), 1108–1118. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1204942>
- Fleischmann, C., Thomas-Rueddel, D. O., Hartmann, M., Hartog, C. S., Welte, T., Heublein, S., ... Reinhart, K. (2016). Fallzahlen und sterblichkeitsraten von sepsis-patienten im krankenhaus. *Deutsches Arzteblatt International*, 113(10), 159–166. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0159>
- Fowler, A. A. 3rd, Syed, A. A., Knowlson, S., Sculthorpe, R., Farthing, D., DeWilde, C., ... Natarajan, R. (2014). Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis. *Journal of Translational Medicine*, 12, 32. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-32>
- Fowler, A. A. 3rd, Truwit, J. D., Hite, R. D., Morris, P. E., DeWilde, C., Priday, A., ... Halquist, M. (2019). Effect of Vitamin C Infusion on Organ Failure and Biomarkers of Inflammation and Vascular Injury in Patients With Sepsis and Severe Acute Respiratory Failure: The CITRIS-ALI Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 322(13), 1261–1270. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.11825>
- Frantz, S., Ertl, G., & Bauersachs, J. (2007). Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine*, 4(8), 444–454. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0938>
- Freeman, B. D., & Natanson, C. (2000). Anti-inflammatory therapies in sepsis

- and septic shock. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(7), 1651–1663. <https://doi.org/10.1517/13543784.9.7.1651>
- Fujii, T., Luethi, N., Young, P. J., Frei, D. R., Eastwood, G. M., French, C. J., ... Bellomo, R. (2020). Effect of Vitamin C, Hydrocortisone, and Thiamine vs Hydrocortisone Alone on Time Alive and Free of Vasopressor Support Among Patients With Septic Shock: The VITAMINS Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 323(5), 423–431. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22176>
- Garnacho-Montero, J., Gutiérrez-Pizarra, A., Escobresca-Ortega, A., Corcia-Palomo, Y., Fernández-Delgado, E., Herrera-Melero, I., ... Márquez-Vácaro, J. A. (2014). De-escalation of empirical therapy is associated with lower mortality in patients with severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Medicine*, 40(1), 32–40. <https://doi.org/10.1007/s00134-013-3077-7>
- Ge, Z., Huang, J., Liu, Y., Xiang, J., Gao, Y., Walline, J. H., ... Li, Y. (2021). Thiamine combined with vitamin C in sepsis or septic shock: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Emergency Medicine: Official Journal of the European Society for Emergency Medicine*, 28(3), 189–195. <https://doi.org/10.1097/MEJ.0000000000000812>
- Gierlikowska, B., Stachura, A., Gierlikowski, W., & Demkow, U. (2022). The Impact of Cytokines on Neutrophils' Phagocytosis and NET Formation during Sepsis-A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/ijms23095076>
- Griffiths, C. E. M., Strober, B. E., van de Kerkhof, P., Ho, V., Fidelus-Gort, R., Yeilding, N., ... Menter, A. (2010). Comparison of ustekinumab and etanercept for moderate-to-severe psoriasis. *The New England Journal of Medicine*, 362(2), 118–128. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810652>
- Gupta, S., Sakhuja, A., Kumar, G., McGrath, E., Nanchal, R. S., & Kashani, K. B. (2016). Culture-Negative Severe Sepsis: Nationwide Trends and Outcomes. *Chest*, 150(6), 1251–1259. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.08.1460>
- Hagag, A. A., El Fragy, M. S., & Houdeeb, H. A. (2020). Therapeutic Value of Vitamin D as an Adjuvant Therapy in Neonates with Sepsis. *Infectious*

- Disorders Drug Targets*, 20(4), 440–447.  
<https://doi.org/10.2174/1871526519666190626141859>
- Hai, T., Wolfgang, C. D., Marsee, D. K., Allen, A. E., & Sivaprasad, U. (1999). ATF3 and stress responses. *Gene Expression*, 7(4–6), 321–335.
- He, J., Chen, Y., Lin, Y., Zhang, W., Cai, Y., Chen, F., ... Shao, Y. (2017). Association study of MCP-1 promoter polymorphisms with the susceptibility and progression of sepsis. *PloS One*, 12(5), e0176781.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176781>
- Hemilä, H., & Chalker, E. (2020). Reanalysis of the Effect of Vitamin C on Mortality in the CITRIS-ALI Trial: Important Findings Dismissed in the Trial Report. *Frontiers in Medicine*, 7, 590853.  
<https://doi.org/10.3389/fmed.2020.590853>
- Hong, T.-H., Chang, C.-H., Ko, W.-J., Lin, C.-F., Liu, H.-H., Chow, L.-P., ... Chen, Y.-S. (2014). Biomarkers of early sepsis may be correlated with outcome. *Journal of Translational Medicine*, 12, 146. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-146>
- Huang, M., Cai, S., & Su, J. (2019). The pathogenesis of sepsis and potential therapeutic targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21).  
<https://doi.org/10.3390/ijms20215376>
- Hwang, S. Y., Ryoo, S. M., Park, J. E., Jo, Y. H., Jang, D.-H., Suh, G. J., ... Kim, W. Y. (2020). Combination therapy of vitamin C and thiamine for septic shock: a multi-centre, double-blinded randomized, controlled study. *Intensive Care Medicine*, 46(11), 2015–2025.  
<https://doi.org/10.1007/s00134-020-06191-3>
- Jarczak, D., & Nierhaus, A. (2022). Cytokine Storm-Definition, Causes, and Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19).  
<https://doi.org/10.3390/ijms231911740>
- Jekarl, D. W., Kim, K. S., Lee, S., Kim, M., & Kim, Y. (2018). Cytokine and molecular networks in sepsis cases: a network biology approach. *European*

- Cytokine Network*, 29(3), 103–111. <https://doi.org/10.1684/ecn.2018.0414>
- Jones, G. R., & Lowes, J. A. (1996). The systemic inflammatory response syndrome as a predictor of bacteraemia and outcome from sepsis. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 89(7), 515–522. <https://doi.org/10.1093/qjmed/89.7.515>
- Juraschek, S. P., Guallar, E., Appel, L. J., & Miller, E. R. 3rd. (2012). Effects of vitamin C supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(5), 1079–1088. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.027995>
- Kalliolias, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews. Rheumatology*, 12(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169>
- Karasu, E., Nilsson, B., Köhl, J., Lambris, J. D., & Huber-lang, M. (2019). *Targeting Complement Pathways in Polytrauma- and Sepsis-Induced Multiple-Organ Dysfunction*. 10(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00543>
- Kawai, S., Sakayori, S., Watanabe, H., Nakagawa, T., Inoue, G., & Kobayashi, H. (1998). The Role of Interleukin-10 in Systemic Inflammatory Response Syndrome with Sepsis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 4(3), 121–127. <https://doi.org/10.1007/BF02491513>
- Kraft, B. D., Chen, L., Suliman, H. B., Piantadosi, C. A., & Welty-Wolf, K. E. (2019). Peripheral Blood Mononuclear Cells Demonstrate Mitochondrial Damage Clearance During Sepsis. *Critical Care Medicine*, 47(5), 651–658. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003681>
- Kuhn, S.-O., Meissner, K., Mayes, L. M., & Bartels, K. (2018). Vitamin C in sepsis. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 31(1), 55–60. <https://doi.org/10.1097/ACO.0000000000000549>
- Latifi, S. Q., O’Riordan, M. A., & Levine, A. D. (2002). Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. *Infection and Immunity*, 70(8), 4441–4446.

<https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4441-4446.2002>

- Lauer, A., Burkard, M., Niessner, H., Leischner, C., Renner, O., Vollbracht, C., Michels, H., Busch, C., Sinnberg, T., & Venturelli, S. (2021). Ex Vivo Evaluation of the Sepsis Triple Therapy High-Dose Vitamin C in Combination with Vitamin B1 and Hydrocortisone in a Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Model. *Nutrients*, 13(7), 2366. <https://doi.org/10.3390/nu13072366>.
- Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., ... Ramsay, G. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine*, 29(4), 530–538. <https://doi.org/10.1007/s00134-003-1662-x>
- Li, X., Xu, Z., Pang, X., Huang, Y., Yang, B., Yang, Y., ... Li, Y. (2017). Interleukin-10/lymphocyte ratio predicts mortality in severe septic patients. *PloS One*, 12(6), e0179050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179050>
- Li, Yan, He, J., Shao, Y.-M., Chen, L., Li, M., Tang, D., ... Chen, Y. (2022). Study on the association between the polymorphism of MCP-1 rs1024611 and the genetic susceptibility of type 2 diabetes with sepsis. *Medicine*, 101(32), e29903. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000029903>
- Li, Yuye, & Ding, S. (2020). Serum 25-Hydroxyvitamin D and the risk of mortality in adult patients with Sepsis: a meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 189. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4879-1>
- Lock, A. E., Gutierrez, G. C., Hand, E. O., Barthol, C. A., & Attridge, R. L. (2023). Fludrocortisone Plus Hydrocortisone Versus Hydrocortisone Alone as Adjunctive Therapy in Septic Shock: A Retrospective Cohort Study. *The Annals of Pharmacotherapy*, 10600280231164210. <https://doi.org/10.1177/10600280231164210>
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>

- Lu, D., & Mao, W. (2023). Hydrocortisone Combined with Vitamin C and Thiamine in the Treatment of Sepsis/Septic Shock: A Systematic Review with Meta-Analysis and Trial Sequential Analysis. *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique et Experimentale*, 46(1), E36-49. <https://doi.org/10.25011/cim.v46i1.40275>
- Manzanares, W., & Hardy, G. (2011). Thiamine supplementation in the critically ill. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(6), 610–617. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834b8911>
- Marik, P. E., Khangoora, V., Rivera, R., Hooper, M. H., & Catravas, J. (2017). Hydrocortisone, Vitamin C, and Thiamine for the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock: A Retrospective Before-After Study. *Chest*, 151(6), 1229–1238. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.11.036>
- Martin, G. S., Mannino, D. M., & Moss, M. (2006). The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Critical Care Medicine*, 34(1), 15–21. <https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000194535.82812.ba>
- Matsukawa, A., Hogaboam, C. M., Lukacs, N. W., Lincoln, P. M., Strieter, R. M., & Kunkel, S. L. (2000). Endogenous MCP-1 influences systemic cytokine balance in a murine model of acute septic peritonitis. *Experimental and Molecular Pathology*, 68(2), 77–84. <https://doi.org/10.1006/exmp.1999.2296>
- Miyamoto, Y., Aso, S., Iwagami, M., Yasunaga, H., Matsui, H., Fushimi, K., ... Doi, K. (2020). Association Between IV Thiamine and Mortality in Patients With Septic Shock: A Nationwide Observational Study. *Critical Care Medicine*, 48(8), 1135–1139. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004394>
- Moskowitz, A., Andersen, L. W., Cocchi, M. N., Karlsson, M., Patel, P. V., & Donnino, M. W. (2017). Thiamine as a Renal Protective Agent in Septic Shock. A Secondary Analysis of a Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Trial. *Annals of the American Thoracic Society*, 14(5), 737–741. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201608-656BC>
- Moskowitz, A., Huang, D. T., Hou, P. C., Gong, J., Doshi, P. B., Grossestreuer,

- A. V., ... Donnino, M. W. (2020). Effect of Ascorbic Acid, Corticosteroids, and Thiamine on Organ Injury in Septic Shock: The ACTS Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 324(7), 642–650. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.11946>
- O'Dwyer, M. J., Mankan, A. K., White, M., Lawless, M. W., Stordeur, P., O'Connell, B., ... Ryan, T. (2008). The human response to infection is associated with distinct patterns of interleukin 23 and interleukin 27 expression. *Intensive Care Medicine*, 34(4), 683–691. <https://doi.org/10.1007/s00134-007-0968-5>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet (London, England)*, 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Pollack, L. A., van Santen, K. L., Weiner, L. M., Dudeck, M. A., Edwards, J. R., & Srinivasan, A. (2016). Antibiotic Stewardship Programs in U.S. Acute Care Hospitals: Findings From the 2014 National Healthcare Safety Network Annual Hospital Survey. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(4), 443–449. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw323>
- Prescott, H. C., Dickson, R. P., Rogers, M. A. M., Langa, K. M., & Iwashyna, T. J. (2015). Hospitalization Type and Subsequent Severe Sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192(5), 581–588. <https://doi.org/10.1164/rccm.201503-0483OC>
- Proserpio, V., Conti, L., & Oliviero, S. (2022). Flow Cytometry for Beginners: Hints and Tips for Approaching the Very First Single-Cell Technique. In A. T. Ooi (Ed.), *Single-Cell Protein Analysis: Methods and Protocols* (pp. 27–41). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1771-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1771-7_3)
- Pugin, J. (1996). *Recognition of Bacteria and Bacterial Products by Host Immune Cells in Sepsis BT - Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* (J.-L. Vincent, Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Ramnath, R. D., Ng, S. W., Guglielmotti, A., & Bhatia, M. (2008). Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. *International Immunopharmacology*, 8(6), 810–

818. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.01.033>
- Rello, J., Valenzuela-Sánchez, F., Ruiz-Rodríguez, M., & Moyano, S. (2017). Sepsis: A Review of Advances in Management. *Advances in Therapy*, 34(11), 2393–2411. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0622-8>
- Rueda, B., Orozco, G., Raya, E., Fernandez-Sueiro, J. L., Mulero, J., Blanco, F. J., ... Martin, J. (2008). The IL23R Arg381Gln non-synonymous polymorphism confers susceptibility to ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(10), 1451–1454. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.080283>
- Saraiva, M., Vieira, P., & O'Garra, A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>
- Scholz, S. S., Borgstedt, R., Ebeling, N., Menzel, L. C., Jansen, G., & Rehberg, S. (2021). Mortality in septic patients treated with vitamin C: a systematic meta-analysis. *Critical Care (London, England)*, 25(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03438-9>
- Siegelaar, S. E., Hermanides, J., Oudemans-van Straaten, H. M., van der Voort, P. H. J., Bosman, R. J., Zandstra, D. F., & DeVries, J. H. (2010). Mean glucose during ICU admission is related to mortality by a U-shaped curve in surgical and medical patients: a retrospective cohort study. *Critical Care (London, England)*, 14(6), R224. <https://doi.org/10.1186/cc9369>
- Singer, M., et al., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J., Craig, M., Hotchkiss, R. S., ... Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis. *Jama*, 315(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Singh, S., Anshita, D., & Ravichandiran, V. (2021). MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *International Immunopharmacology*, 101(Pt B), 107598. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>
- Spoelstra-de Man, A. M. E., Oudemans-van Straaten, H. M., & Berger, M. M.

- (2019, December). Adjuvant vitamin C for sepsis: mono or triple? *Critical Care (London, England)*, Vol. 23, p. 425. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2717-x>
- Sprung, C. L., Annane, D., Keh, D., Moreno, R., Singer, M., Freivogel, K., ... Briegel, J. (2008). Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *The New England Journal of Medicine*, 358(2), 111–124. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa071366>
- Striz, I., Brabcova, E., Kolesar, L., & Sekerkova, A. (2014). Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 126(9), 593–612. <https://doi.org/10.1042/CS20130497>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). *IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease*. 6(Kishimoto 1989), 1–16.
- Tang, B. M., Huang, S. J., & McLean, A. S. (2010). Genome-wide transcription profiling of human sepsis: a systematic review. *Critical Care (London, England)*, 14(6), R237. <https://doi.org/10.1186/cc9392>
- Tang, X. D., Ji, T. T., Dong, J. R., Feng, H., Chen, F. Q., Chen, X., ... Ma, W. T. (2021). Pathogenesis and treatment of cytokine storm induced by infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222313009>
- Tapper, H., & Herwald, H. (2000). Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases. *Blood*, 96(7), 2329–2337.
- Tisoncik, J. R., Korth, M. J., Simmons, C. P., Farrar, J., Martin, T. R., & Katze, M. G. (2012). Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 16–32. <https://doi.org/10.1128/mmbr.05015-11>
- Tosoni, A., Cossari, A., Paratore, M., Impagnatiello, M., Passaro, G., Vallone, C. V., ... Group, O. B. O. T. I. M. S. S. (2021). Delta-Procalcitonin and Vitamin D Can Predict Mortality of Internal Medicine Patients with Microbiological Identified Sepsis. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 57(4).

<https://doi.org/10.3390/medicina57040331>

- Tracey, K. J., Fong, Y., Hesse, D. G., Manogue, K. R., Lee, A. T., Kuo, G. C., ... Cerami, A. (1987). Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*, 330(6149), 662–664. <https://doi.org/10.1038/330662a0>
- Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D. N., & Suzuki, F. (2004). CCL2, a product of mice early after systemic inflammatory response syndrome (SIRS), induces alternatively activated macrophages capable of impairing antibacterial resistance of SIRS mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(2), 368–373. <https://doi.org/10.1189/jlb.1203645>
- Vecchié, A., Bonaventura, A., Toldo, S., Dagna, L., Dinarello, C. A., & Abbate, A. (2021). IL-18 and infections: Is there a role for targeted therapies? *Journal of Cellular Physiology*, 236(3), 1638–1657. <https://doi.org/10.1002/jcp.30008>
- Vincent, J. L., Bihari, D. J., Suter, P. M., Bruining, H. A., White, J., Nicolas-Chanoin, M. H., ... Hemmer, M. (1995). The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA*, 274(8), 639–644.
- Vincent, J. L., Moreno, R., Takala, J. et al., Willatts, S., De Mendonca, A., Bruining, H., ... Thijs, L. G. (1996). The SOFA score to describe organ dysfunction/ failure. *Intensive Care Med*, 22, 707–10.
- Wang, Ying, Lin, H., Lin, B.-W., & Lin, J.-D. (2019). Effects of different ascorbic acid doses on the mortality of critically ill patients: a meta-analysis. *Annals of Intensive Care*, 9(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13613-019-0532-9>
- Wang, Yu, Yang, Z., Gao, L., Cao, Z., & Wang, Q. (2020). Effects of a single dose of vitamin D in septic children: a randomized, double-blinded, controlled trial. *The Journal of International Medical Research*, 48(6), 300060520926890. <https://doi.org/10.1177/0300060520926890>
- Weber, A., Wasiliew, P., & Kracht, M. (2010). Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) processing

- pathway. *Science Signaling*, 3(105), 2–4.  
<https://doi.org/10.1126/scisignal.3105cm2>
- Weiss, C. H., Persell, S. D., Wunderink, R. G., & Baker, D. W. (2012). Empiric antibiotic, mechanical ventilation, and central venous catheter duration as potential factors mediating the effect of a checklist prompting intervention on mortality: an exploratory analysis. *BMC Health Services Research*, 12, 198.  
<https://doi.org/10.1186/1472-6963-12-198>
- Weiss, S. L., Henrickson, S. E., Lindell, R. B., Sartori, L. F., Zhang, D., Bush, J., ... Wallace, D. C. (2022). Influence of Immune Cell Subtypes on Mitochondrial Measurements in Peripheral Blood Mononuclear Cells From Children with Sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 57(5), 630–638.  
<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001903>
- Weiss, S. L., Selak, M. A., Tuluc, F., Perales Villarroel, J., Nadkarni, V. M., Deutschman, C. S., & Becker, L. B. (2015). Mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells in pediatric septic shock. *Pediatric Critical Care Medicine : A Journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*, 16(1), e4–e12. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000000277>
- Wen, C., Li, Y., Hu, Q., Liu, H., Xu, X., & Lü, M. (2023). IV Vitamin C in Sepsis: A Latest Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Clinical Practice*, 2023, 15–17. <https://doi.org/10.1155/2023/6733465>
- Williams, M. D., Braun, L. A., Cooper, L. M., Johnston, J., Weiss, R. V., Qualy, R. L., & Linde-Zwirble, W. (2004). Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. *Critical Care (London, England)*, 8(5), R291-8. <https://doi.org/10.1186/cc2893>
- Yasuda, K., Nakanishi, K., & Tsutsui, H. (2019). Interleukin-18 in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3).  
<https://doi.org/10.3390/ijms20030649>
- Zabet, M. H., Mohammadi, M., Ramezani, M., & Khalili, H. (2016). Effect of high-dose Ascorbic acid on vasopressor's requirement in septic shock. *Journal of*

*Research in Pharmacy Practice*, 5(2), 94–100. <https://doi.org/10.4103/2279-042X.179569>

## 7 Erklärungen zum Eigenanteil

Diese Dissertation wurde im Rahmen einer Kooperation zwischen der Universitäts-Hautklinik Tübingen (Prof. Dr. Birgit Schitteck / Dr. Tobias Sinnberg) und zunächst dem Institut für Vegetative und Klinische Physiologie der Universität Tübingen (Stellvertretender Direktor Prof. Dr. Dr. Venturelli) durchgeführt. Seit 2019 fungiert Prof. Dr. Dr. Venturelli als Leiter des Fachgebietes Biochemie der Ernährung am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Hohenheim; parallel hierzu ist Prof. Dr. Dr. Venturelli in Teilzeit zur Ausübung seiner fortgeführten interdisziplinären Forschungstätigkeit auch am Universitätsklinikum Tübingen (Abteilung Innere Medizin VIII, Medizinische Onkologie und Pneumologie) angestellt; entsprechend wurden Teile der praktischen Arbeiten auch in den Laboratorien der Abteilung Innere Medizin VIII des Universitätsklinikums Tübingen erstellt.

Finanziert wurde das Projekt über Drittmittel seitens der Fa. Pascoe pharmazeutische Präparate GmbH, Gießen, deren Präparate Pascorbin® und Vitamin B1 Injektopas® im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Mitarbeiter der Universitäts-Hautklinik Tübingen (Dr. Tobias Sinnberg) und des Institutes für Vegetative und Klinische Physiologie der Universität Tübingen bzw. der Abteilung Innere Medizin VIII des Universitätsklinikums Tübingen (Dr. Markus Burkard, Dipl.-Biochem. Christian Leischner, MTA Andrea Schenk, MTA Irina Smirnow) von mir eigenständig durchgeführt.

Lediglich Teile der RNA-Isolierung, der cDNA-Synthese sowie der qPCR wurden von Herrn Dr. Sinnberg, MTA Frau Smirnow und MTA Frau Schenk mit bearbeitet.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich (unter Anleitung durch Herrn Dr. Tobias Sinnberg und Herrn Dr. Markus Burkard).

Einige Daten dieser Promotionsarbeit wurden im Jahr 2021 bereits im Rahmen einer Publikation in der wissenschaftlichen Zeitschrift NUTRIENTS (Journal ISSN: 2072-6643; IF 6.706) veröffentlicht(Lauer et al., 2021).

Die Erstautorschaft dieser Originalarbeit wurde aufgeteilt zwischen Frau Annie Lauer (A.L.) und Herrn Dr. Burkard (M.B.). Letztautoren und korrespondierende Autoren sind Dr. Sinnberg (T.S.) und Prof. Dr. Dr. Venturelli (S.V.). Als Koautoren fungieren Dr. Heike Niessner (H.N.), Dipl. Biochem. Christian Leischner (C.L.), Dr. Olga Renner (O.R.), Dr. Claudia Vollbracht (C.V.), Dr. Holger Michels (H.M.) und PD Dr. Christian Busch (C.B.).

Die jeweiligen Beiträge der Autoren stellen sich wie folgt dar: Konzeption und Design: C.B., T.S., S.V. Entwicklung der Methodik: A.L., M.B., H.N., C.L., C.B., T.S., S.V. Erfassung der Daten: A.L., M.B., H.N., C.L., T.S., S.V. Analyse und Interpretation der Daten: A.L., M.B., H.N., C.L., T.S., S.V. Verfassen und Durchsicht oder/und Überarbeitung des Manuskripts: A.L., M.B., H.N., C.L., O.R., C.V., H.M., C.B., T.S., S.V. Alle Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskripts gelesen und ihr zugestimmt.

Ich, Annie Sophia Lina Lauer, geboren am 15.09.1995 in Tübingen, versichere, diese Dissertation selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 28.12.2023

---

Unterschrift

## 8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits innerhalb der folgenden Publikation veröffentlicht:

**Lauer A**, Burkard M, Niessner H, Leischner C, Renner O, Vollbracht C, Michels H, Busch C, Sinnberg T, Venturelli S. *Ex Vivo* Evaluation of the Sepsis Triple Therapy High-Dose Vitamin C in Combination with Vitamin B1 and Hydrocortisone in a Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Model. **Nutrients**. 2021 Jul 10;13(7):2366. doi: 10.3390/nu13072366.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Prof. Dr. Birgit Schittek von der Universitäts-Hautklinik Tübingen sowie Herrn Prof. Dr. Dr. Sascha Venturelli für die Überlassung des sehr interessanten, komplexen und klinisch sehr relevanten Themas der Intervention bei Sepsis mittels hochdosiertem Ascorbat sowie die jederzeit hervorragende Betreuung ganz herzlich bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Tobias Sinnberg und Frau Dr. Niessner, beide ebenfalls von der Universitäts-Hautklinik Tübingen, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Verfügung standen.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Dr. Sascha Venturelli sowie auch seiner gesamten Arbeitsgruppe, die mich bei der Durchführung meiner Promotionsarbeit immer unterstützt haben. Besonders erwähnen und hervorheben möchte ich dabei Herrn Dr. Markus Burkard und Herrn Dipl.-Biochemiker Christian Leischner. Bei Fragen oder Diskussionsbedarf jeglicher Art standen die Türen immer offen.

Ein großer Dank geht auch an die medizintechnischen Assistentinnen Irina Smirnow und Andrea Schenk, die mich exzellent in die verschiedenen Methoden eingeführt haben.