

Aus der Klinik für Anästhesiologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Pannen

**Der Einfluss von Gemfibrozil und Pravastatin auf die  
mitochondriale Funktion im Colon und in der Leber in vitro**

- Ein Therapieansatz bei Sepsis? –

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Eric Wilhelm Laser

(2020)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zweitgutachter: PD Dr. med. Georg Flügen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Herminghaus A, Laser E, Schulz J, Truse R, Vollmer C, Bauer I, Picker O  
Pravastatin and gemfibrozil impair hepatic but improve colonic mitochondrial function in tissue homogenates from healthy rats. *Cells*. 2019;8:983.

*In liebevoller Erinnerung*

*für*

*Otilie und Hans-Werner*

## Zusammenfassung

Trotz großer Fortschritte in der Intensivmedizin stellen die Sepsis und der septische Schock, mit daraus resultierendem Multiorganversagen (MOF), weiterhin ein großes Problem mit enorm hoher Letalität der Patienten dar. Als eine wichtige Ursache des septischen Multiorganversagens werden eine Störung, sowohl der mitochondrialen Funktionen als auch der Mikrozirkulation, insbesondere im Gastrointestinaltrakt und der Leber, vermutet. In diesem Zusammenhang könnte der Einsatz von Statinen und Fibraten vielversprechend sein.

Um zu untersuchen, ob Gemfibrozil und Pravastatin die mitochondriale Funktion im Colon und in der Leber beeinflussen, wurden Gewebehomogenate aus Colon und Leber von gesunden Ratten mit verschiedenen Dosierungen dieser Medikamente inkubiert. Die mitochondriale Funktion wurde anschließend mittels Respirometrie beurteilt.

In diesen Experimenten störte Gemfibrozil die hepatische ATP-Synthese durch Entkoppelung der Atmungskette. Pravastatin zeigte einen ähnlichen Effekt auf die ATP-Synthese, bewirkte aber keine Entkoppelung. Gemfibrozil senkte außerdem die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung.

Im Colon dagegen bewirkten beide Medikamente eher positive Effekte. Trotz Hemmung der Atmungskette kam es zu einer Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotenzials. Zudem steigerten Gemfibrozil und Pravastatin die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung.

Diesen Ergebnissen zufolge beeinflussen Gemfibrozil und Pravastatin die mitochondriale Funktion im Colon und in der Leber auf unterschiedliche Weise. Ob dies tatsächlich einen positiven Einfluss auf das Outcome einer Sepsis haben könnte, muss durch Folgeversuche geklärt werden.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ΔO</b>	Sauerstoffverbrauch	<b>NADH/H<sup>+</sup></b>	Nicotinamidadenindinukleotid
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat	<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>NO·</b>	Stickstoffmonoxid
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Hyperoxidanionen
<b>CCCP</b>	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon	<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrit-Anionen
<b>CIM</b>	Critical Illness Myopathy	<b>OXPHOS</b>	Oxidative Phosphorylierung
<b>CIP</b>	Critical Illness Neuropathy	<b>PICS</b>	<i>Persistent Inflammation and Immunosuppression Syndrome</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>pO<sub>2</sub></b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>FAD/ FADH<sub>2</sub></b>	Flavin-Adenin-Dinukleotid	<b>Prava</b>	Pravastatin
<b>Gemfi</b>	Gemfibrozil	<b>PTBS</b>	Posttraumatische Belastungsstörung
<b>GM</b>	Glutamt-Malat	<b>Q</b>	Ubichinon
<b>IL-1</b>	Interleukin 1	<b>QH<sub>2</sub></b>	Ubichinol
<b>IMR</b>	Intramembranärer Raum	<b>RCI</b>	<i>Respiratory Control Index</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid	<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>MMDS</b>	Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome	<b>S</b>	Succinat
<b>MOF</b>	Multi Organ Failure	<b>TNFα</b>	Tumornekrosefaktor α
<b>mPTP</b>	mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore		
<b>mRNA</b>	messenger Ribonucleinacid		
<b>mtDNA</b>	mitochondriale Desoxynucleinacid		
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Natriumcarbonat		

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Sepsis.....	1
1.2 Die Rolle der Mitochondrien bei einer Sepsis .....	2
1.3 Beeinflussung des Sepsis-Outcome durch Fibrat und Statine .....	4
1.4 Auswirkung von Fibraten und Statinen auf die Mitochondrienfunktion .....	5
<b>2 Fragestellung</b> .....	<b>7</b>
<b>3 Versuchstiere, Material und Methoden</b> .....	<b>8</b>
3.1 Versuchstiere .....	8
3.2 Organentnahme.....	8
3.3 Gewebehomogenisierung.....	9
3.3.1 Leber.....	9
3.3.2 Colon .....	9
3.4 Proteinbestimmung nach Lowry.....	10
3.4.1 Prinzip.....	10
3.4.2 praktisches Vorgehen bei der Proteinbestimmung .....	10
3.5 Respirometrie .....	11
3.5.1 oxidative Phosphorylierung.....	11
3.5.2 Prinzip der Respirometrie .....	13
3.5.3 Untersuchungsparameter bei der Respirometrie .....	14
3.5.3.1 State 2 Respiration .....	14
3.5.3.2 State 3 Respiration .....	14
3.5.3.3 State 4 Respiration .....	14
3.5.3.4 Respiratory Control Index (RCI) .....	14
3.5.3.5 ADP/O-Ratio.....	15
3.5.4 Praktisches Vorgehen bei der Respirometrie.....	15
3.5.4.1 Vorbereitung der Respirometrie .....	15
3.5.4.2 Qualitätskontrollen.....	16
3.5.4.3 Untersuchung der Medikamentenwirkung.....	16
3.6 Statistik.....	17
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>18</b>
4.1 Leber, Gemfibrozil.....	18

4.2 Leber, Pravastatin .....	21
4.3 Colon, Gemfibrozil .....	24
4.4 Colon, Pravastatin .....	27
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>30</b>
5.1 Ergebnisdiskussion .....	30
5.2 Methodenkritik .....	35
5.3 Fazit .....	35
<b>6 Anhang .....</b>	<b>I</b>
6.1 Literaturverzeichnis .....	I
6.2 Material und Geräte des laborexperimentellen Teils.....	VI
6.3 Hilfsdaten .....	IX

# 1 Einleitung

## 1.1 Sepsis

Per definitionem spricht man von einer Sepsis, wenn es durch eine inadäquate Immunantwort auf eine Infektion, zur Störung einer oder mehrerer Organfunktionen kommt.<sup>1</sup> Durch eine systemische Aktivierung des Immunsystems werden exzessiv Entzündungsmediatoren freigesetzt, welche durch Störung der kardiovaskulären Funktion,<sup>2</sup> Ausbildung von Gewebeödemen<sup>3</sup> und einer massiven Aktivierung der Gerinnung,<sup>3</sup> zu systemischen Perfusions- und Diffusionsstörungen führen. Des Weiteren werden Störungen der zellulären Sauerstoffverwertung als führender Pathomechanismus in Betracht gezogen.<sup>4</sup> Es kommt folglich zu Endorganschäden und nicht selten zum Multiorganversagen (MOF).<sup>5</sup> Im Jahr 2013 wurden in Deutschland 279.530 Sepsisfälle dokumentiert.<sup>6</sup> Die Sterblichkeitsrate betrug dabei 24,3%.<sup>6</sup> Somit gilt die Sepsis nach kardiovaskulären und neoplastischen Erkrankungen als dritthäufigste Todesursache in Deutschland.<sup>6</sup> Wird eine Sepsis überlebt, so sind die Langzeitfolgen meist gravierend für das weitere gesundheitliche und soziale Leben. Häufige Folgen einer überlebten Sepsis sind kognitive Störungen,<sup>7,8</sup> *critical illness myopathy* (CIM)<sup>9</sup> und *critical illness neuropathy* (CIP).<sup>9</sup> Oft können Patienten nur schwerstpflegebedürftig entlassen werden und kehren letztendlich aufgrund von dauerhaft geschädigten Organsystemen und einem kompromittierten Immunsystem (*Persistent Inflammation and Immunosuppression Syndrom*; PICS) zurück auf die Intensivstation.<sup>5</sup> Viele Patienten entwickeln, aufgrund des Erlebten, posttraumatische Belastungsstörungen (PTBS) und Depressionen.<sup>9</sup> Insbesondere Neugeborene und Menschen in hohen Lebensaltern sind gefährdet, eine Sepsis zu entwickeln, da ihr Immunsystem deutlich schwächer ausgebildet ist.<sup>6</sup> Hinzu kommt, dass mit dem Fortschritt der Medizin auch invasive Maßnahmen zunehmend auf diese extremen Altersgruppen ausgeweitet werden. Septische Komplikationen werden dadurch wahrscheinlicher.<sup>6</sup> Weil es inzwischen immer mehr invasive und immunmodulatorische Maßnahmen gibt, wird die Immunkompetenz der Patienten zunehmend auch nosokomial geschwächt. Vor allem Intensivpatienten weisen ein erhöhtes Risiko auf, eine Sepsis auszubilden.<sup>10</sup> Des Weiteren ist es durch eine sicherere Sepsis-Definition und ein erhöhtes Bewusstsein unter medizinischem Personal zu einer verstärkten Kodierung und damit statistischen Erfassung von Sepsisfällen gekommen.<sup>11</sup>

Trotz immer neuer Fortschritte in der Intensivmedizin ist die Sterblichkeitsrate der Sepsis nahezu unverändert. Starben im Jahre 2007 27% der hospitalisierten Sepsis-Patienten, so betrug die Krankenhausmortalität im Jahr 2013 immer noch 24,3%.<sup>6</sup>

Wegen der intensiven, medizinischen Bedürftigkeit von Sepsis-Patienten, sowohl stationär als auch nachfolgend ambulant, kam es im Jahre 2013 zu Kosten um die 7,7 Milliarden Euro für das deutsche Gesundheitssystem.<sup>6</sup> Darin sind noch nicht die Kosten für eine mögliche Erwerbsunfähigkeit enthalten. Das Krankheitsbild Sepsis bedeutet dementsprechend nicht nur schweres individuelles Leid für den Patienten, sondern erzeugt enorme sozioökonomische Kosten für das deutsche Gesundheitssystem. Die Entwicklung von neuen Präventions-, Früherkennungs- und Therapiemaßnahmen ist somit sowohl für den einzelnen Patienten als auch für die Gesellschaft erstrebenswert.

## 1.2 Die Rolle der Mitochondrien bei einer Sepsis

Trotz jahrelanger, intensiver Forschung ist die Pathophysiologie der Sepsis weiterhin nicht vollständig geklärt.<sup>12</sup> Seit einiger Zeit wird vermutet, dass die Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Sepsis, septischem Schock und MOF innehaben.<sup>13,14</sup> Vermutet wird, dass eine Störung der Mikrozirkulation zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion (*Microcirculatory and mitochondrial distress syndrome*; MMDS) und damit zu Gewebeschäden führt.<sup>15</sup> Eine weitere Theorie geht davon aus, dass nicht eine beeinträchtigte Mikrozirkulation verantwortlich für die Organschädigung ist, sondern vielmehr ein gestörter Sauerstoffverbrauch durch die Zellen.<sup>4</sup> Dieses Phänomen wird als zytopathische Hypoxie bezeichnet.<sup>4</sup> Gestützt wird letztere Theorie dadurch, dass der Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) im Gewebe von septischen Tieren und Patienten normal oder sogar höher ist, als bei gesunden Individuen.<sup>16,17</sup>

Bisher ist es noch nicht gelungen, die Rolle der Mitochondrien sicher in die zelluläre und molekulare Pathophysiologie der Sepsis einzuordnen.

Dazu publizierte Ergebnisse sind größtenteils kontrovers.<sup>14</sup> Einerseits wurde ein verstärkter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch in aus septischen Ratten isolierten Mitochondrien beobachtet,<sup>18,19</sup> andererseits wurde auch ein verminderter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch beschrieben.<sup>20-23</sup>

Die Auswirkungen einer Sepsis auf die mitochondriale Funktion scheinen abhängig von der untersuchten Spezies zu sein. Während die meisten Veränderungen der mitochondrialen Funktion an Nagetieren beobachtet wurden, konnten Untersuchungen an septischen Schweinen nur geringe Veränderungen der mitochondrialen Funktion nachweisen<sup>24,25</sup>. Untersuchungen an Menschen mit einer Sepsis sind aus ethischen Gründen natürlich nur bedingt durchführbar und auf Muskel- oder Blutzellen beschränkt. Dabei wurden vor allem Veränderungen der

mitochondrialen Funktion bei Patienten gefunden, die an einem septischen Schock verstorben sind.<sup>26,27</sup>

Teilweise wurde, anstatt einer Verschlechterung der mitochondrialen Funktion, eine Verminderung der Mitochondriendichte als möglicher Pathomechanismus beschrieben.<sup>28,29</sup> Passend dazu konnten Zeng et al.<sup>30</sup> in Herzmuskelzellen der Ratte nachweisen, dass es im Rahmen einer Sepsis zu einer Hochregulation der Caspase 3, einem Schlüsselenzym der mitochondrialen Apoptose, kommt.

Des Weiteren scheint die mitochondriale Funktion abhängig vom Untersuchungszeitpunkt während einer Sepsis zu sein. So konnten Singer et al.<sup>31</sup> zeigen, dass sich die mitochondriale Funktion im Verlauf der Erkrankung verändert. Initial kommt es zu einer Verbesserung der mitochondrialen Funktion. In späteren Krankheitsstadien nimmt die mitochondriale Funktion ab. Auch Herminghaus et al.<sup>32</sup> konnten im Jahre 2019 an Lebermitochondrien der Ratte beobachten, dass die mitochondriale Funktion sich im Verlauf einer Sepsis ändert. So kam es in den ersten 48 Stunden nach abdominalen Infektion zu einer Zunahme und nach 72 Stunden zu einer Abnahme der mitochondrialen Aktivität. Nach 96 Stunden erholte sich die mitochondriale Funktion. Mitochondrien des Colons schienen dagegen nicht beeinflusst zu werden.

Wie dadurch schon angedeutet wird, scheint neben der untersuchten Spezies und dem Zeitpunkt der Untersuchung, auch der Ursprung des untersuchten Gewebes eine wichtige Rolle zu spielen. In Skelettmuskelzellen, Herzmuskelzellen und Zellen des Diaphragmas von septischen Nagetieren wurde eine Verminderung der mitochondrialen Funktion beobachtet.<sup>14</sup> Dagegen kam es in Leberzellen zu einer Verbesserung der mitochondrialen Funktion.<sup>14</sup> Eine genaue Ursache für die Veränderung der mitochondrialen Funktion ist bisher noch nicht bekannt. Durch exzessive Freisetzung von Stresshormonen bei septischen Patienten, wurden biochemische Veränderungen wie verstärkter Energieverbrauch, Proteinkatabolismus, gesteigerte Lipolyse und vermehrte Gluconeogenese beobachtet,<sup>33</sup> diese konnten aber nicht als Auslöser identifiziert werden. Grip et al.<sup>12</sup> untersuchten im Jahre 2016, ob die mitochondriale Funktion, in Skelettmuskelfasern der Ratte, durch Inkubation mit dem Blutplasma von septischen Patienten, beeinträchtigt wird. Es sollte geprüft werden, ob ein im Blut zirkulierender Faktor die mitochondriale Funktion verändert. Dabei konnte keine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion beobachtet werden.

Es bleibt also weiterhin unklar, welche genaue Rolle die Mitochondrien bei der Pathophysiologie der Sepsis und dem septischen MOF übernehmen.

### 1.3 Beeinflussung des Sepsis-Outcome durch Fibrate und Statine

Auf der Suche nach möglichen Therapieoptionen der Sepsis wurden auch immer wieder Cholesterinsenker wie Fibrate und Statine untersucht, da man beobachtet hatte, dass diese zahlreiche pleiotrope Effekte, wie eine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion, der immunologischen Antwort, sowie des Outcomes in verschiedenen Sepsismodellen entfalten. Basierend auf der Annahme, dass eine mitochondriale Fehlfunktion einen wichtigen Bestandteil in der Pathophysiologie der Sepsis darstellt, wurden zahlreiche Studien zum Einsatz von Fibraten und Statinen bei Sepsis durchgeführt. Dabei konnte mehrfach eine Verbesserung des Outcomes beobachtet werden. Merx et al.<sup>34</sup> konnten beispielsweise zeigen, dass Mäuse, die vor Sepsis-Induktion mit Simvastatin behandelt wurden, eine viermal höhere Überlebensrate haben, als unbehandelte Mäuse. Des Weiteren wurde beobachtet, dass mit Statinen behandelte Patienten seltener eine Sepsis entwickeln<sup>35</sup>, wahrscheinlich seltener Sepsis-bedingt intensivpflichtig werden<sup>36</sup> und im Falle einer Sepsis eine erniedrigte Mortalitätsrate aufweisen.<sup>37</sup> Morel et al.<sup>38</sup> zeigten im Jahr 2017, dass Statine die mitochondriale Funktion in Muskelzellen vor septischen Schäden schützen können. Eine Verbesserung des Outcomes wurde nur erreicht, wenn Statine bereits vor Sepsis-Induktion verabreicht wurden. Dagegen zeigte eine Studie aus dem Jahr 2017, von Paricahua et al.,<sup>39</sup> keinen Überlebensvorteil für Patienten, die bereits vor Beginn der Sepsis Statine einnahmen. Aufgrund der zum Teil kontroversen Ergebnisse bedarf es sicherlich weiteren Untersuchungen, um eine definitive Entscheidung über den Nutzen von Statinen als Adjuvantien in der Sepsistherapie zu fällen. Auch im Falle der Fibrate konnte ein positiver Einfluss auf das Outcome einer Sepsis beobachtet werden. Durch Budd et al.<sup>40</sup> konnte gezeigt werden, dass Mäuse nach Infektion mit Influenza-Viren oder LPS-Injektion, eine signifikant niedrigere Letalität aufweisen, wenn sie mit Gemfibrozil behandelt werden. Eine Vorbehandlung von Ratten mit Gemfibrozil verminderte in der Arbeit von Cámara-Lemarroj et al.<sup>41</sup> die Freisetzung von TNF $\alpha$ , IL-1 und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), den Gewebeschaden und den oxidativen Stress bei einer abdominalen Sepsis.

Wie diese Cholesterinsenker das Outcome einer Sepsis genau beeinflussen ist nicht sicher geklärt. Eine mögliche Ursache ist die antiinflammatorische Wirkung<sup>40,41</sup> dieser Substanzen. Denkbar wäre auch eine positive Beeinflussung der mitochondrialen Funktion, wodurch eventuell eine Schädigung der Organe durch das MMDS oder eine zytopathische Hypoxie verhindert werden könnte.

## 1.4 Auswirkung von Fibraten und Statinen auf die Mitochondrienfunktion

Wie sich Fibrate und Statine auf die mitochondriale Funktion auswirken, ist bisher unvollständig untersucht und die vorhandenen Ergebnisse sind größtenteils widersprüchlich.

Für beide Medikamentengruppen gibt es Hinweise auf eine inhibitorische Wirkung. So konnten Mullen et al.<sup>42</sup> an Skelettmuskelzellen aus Mäusen zeigen, dass 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin, *in vitro*, das mitochondriale Membranpotenzial stören. Des Weiteren zeigten sie, dass auch der mitochondriale Sauerstoffverbrauch durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin signifikant reduziert wird. Kaufmann et al.<sup>43</sup> fanden heraus, dass Cerivastatin in Skelettmuskelzellen der Ratte die Atmungskette von der ATP-Synthase entkoppelt. Auch konnten sie nachweisen, dass verschiedene Statine die mitochondriale Integrität herabsetzen, wodurch es zur Mitochondrienschwellung, Cytochrom C Freisetzung und Apoptose kommt. Insgesamt scheint die Toxizität von lipophilen Statinen (z.B. Simvastatin) deutlich höher zu sein, als die von hydrophilen Statinen (z.B. Pravastatin).<sup>43</sup> Diese Beobachtung wurde durch Godoy et al. ebenfalls bestätigt.<sup>44</sup>

Positive Effekte wurden dagegen von Bouitbir et. al.<sup>45</sup> an Herzmuskelzellen beobachtet. Sie fanden heraus, dass Statine zu einem leichten Anstieg der Menge an ROS führen können. In geringer Konzentration stimulieren mitochondriale ROS die mitochondriale Biogenese. Dies wird als Mitohormesis bezeichnet.<sup>46-48</sup> Außerdem konnten Bouitbir et. al.<sup>45</sup> eine Mengenzunahme der mtDNA in Herzmuskelzellen nachweisen.

Für Fibrate konnten ebenfalls negative und positive Auswirkungen präsentiert werden. Brunmair et al.<sup>49</sup> fanden heraus, dass Fenofibrat und Clofibrat in der Lage sind, die Aktivität der NADH-Dehydrogenase, aus homogenisierten Skelettmuskelzellen der Ratte, herabzusetzen und den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch zu reduzieren. Fenofibrat schien außerdem die ATP-Synthese zu stören.<sup>49</sup> Einige Fibrate depolarisieren, in isolierten Leber-Mitochondrien der Ratte, nachweislich das mitochondriale Membranpotenzial.<sup>50</sup> Wy-14,643 zählt, wie die therapeutisch angewandten Fibrate, zu den PPAR $\alpha$ -Agonisten. Für Wy-14,643 konnte an Ratten nach *in vivo* Gabe gezeigt werden, dass es zu einer Entkopplung von Atmungskette und ATP-Synthese in Herzmuskelzellen führt.<sup>51</sup>

Bezafibrat hemmt in Mikrogliazellen von P301S-Mäusen die Bildung von Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}\cdot$ ), durch verminderte Expression der induzierbaren  $\text{NO}\cdot$ -Synthase (iNOS).<sup>52</sup> iNOS wird von Makrophagen und Mikrogliazellen genutzt, um zytotoxisches  $\text{NO}\cdot$  zu produzieren, mit dem Bakterien abgetötet werden. Bei einem septischen Schock kommt es durch massive  $\text{NO}\cdot$ -Überproduktion zur Vasodilatation und zur Hypotonie.  $\text{NO}\cdot$  hemmt zudem die Cytochrom-C-Oxidase und beeinträchtigt somit die mitochondriale Funktion.<sup>53,54</sup> Große Mengen  $\text{NO}\cdot$  und Hyperoxid-Anionen ( $\text{O}_2^-$ ) reagieren außerdem zu Peroxinitrit-Anionen ( $\text{ONOO}^-$ ), welche die

mitochondrialen Komplexe I, II und V irreversibel inhibieren.<sup>55,56</sup> Indem Fibrate dies verhindern, könnten sie die mitochondriale Funktion schützen.

## 2 Fragestellung

Die steigende Inzidenz, die trotz intensiver Forschung unverändert hohe Mortalität und die gravierenden sozioökonomischen Folgen bedingen den dringenden Bedarf an neuen Therapieansätzen für die Sepsis. Nach aktueller Studienlage spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis. Verschiedene Untersuchungen lassen positive Effekte von Fibraten und Statinen auf das Outcome einer Sepsis vermuten. Die Wirkung von Fibraten und Statinen an den Mitochondrien ist bisher unklar. Bisher gibt es keine Untersuchungen, wie sich Fibrate und Statine auf die mitochondriale Funktion im Colon auswirken, obwohl gerade der Darm im Rahmen einer Sepsis eine wichtige Rolle zu spielen scheint.<sup>57-60</sup> Kommt es zur Schwächung der intestinalen Mucosa-Barriere, so können enterale Bakterien, bakterielle Toxine und andere Antigene in den Blutkreislauf, umliegende Gewebe und das Lymphsystem eindringen (bakterielle Translokation).<sup>61</sup> Auf diese Weise könnte eine Sepsis entstehen.<sup>61</sup> Denkbar wäre auch, dass es auf dem Boden einer Sepsis zur Störung der Mikrozirkulation, mit daraus resultierender Schwächung der intestinalen Mucosa und bakteriellen Translokation kommt.<sup>62</sup> Die eindringenden Pathogene könnten auf diese Weise eine weitere Immunantwort triggern und somit die schädliche Überreaktion des Immunsystems potenzieren.<sup>62</sup> Sowohl Nazli et. al.<sup>63</sup> als auch Saxena et. al.<sup>64</sup> konnten zeigen, dass eine Störung der mitochondrialen Funktion zu einer verstärkten bakteriellen Translokation führen kann. Daraus lässt sich ableiten, dass ein Schutz der intestinalen Mitochondrienfunktion und damit der intestinalen Mucosa, die Schwere einer Sepsis reduzieren könnte.

Es gibt auch noch keine eindeutigen Ergebnisse, wie und ob sich Fibrate und Statine auf die hepatische Mitochondrienfunktion auswirken. Da die Leber aber entscheidend an der Produktion von Akute-Phase-Proteinen beteiligt ist, wäre es denkbar, dass eine Modulation der hepatischen Mitochondrienfunktion auch die Akute-Phase-Reaktion und damit den Verlauf einer Sepsis beeinflusst. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die hepatische Zytokinproduktion, zumindest teilweise, von der mitochondrialen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies abhängt.<sup>65</sup> Selvaraj et al.<sup>66</sup> beobachteten, dass die Hemmung der mitochondrialen ROS-Produktion in hepatischen Kupffer-Zellen durch Ceriumoxid-Nanopartikel zu einer verminderten Zytokinfreisetzung und Mortalität führen.

Ausgehend von diesen Überlegungen ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Beeinflussen Pravastatin und Gemfibrozil die mitochondriale Funktion in Colon- und Leberhomogenaten von gesunden Ratten?
2. Ist die Wirkung der beiden Substanzen dosis- und/ oder abhängig?
3. Können aus der Wirkung auf die mitochondriale Funktion positive Effekte, auf das Outcome einer Sepsis, hergeleitet werden?

### **3 Versuchstiere, Material und Methoden**

Angaben zu den benutzten Substanzen und Geräten befinden sich im Anhang (s. S. V)

#### **3.1 Versuchstiere**

Colon und Leber wurden aus gesunden, ca. 2 Monate alten Wistar-Ratten (270 – 290 g) gewonnen. Es handelte sich dabei lediglich um eine Organentnahme (internes AZ: O27/12), so dass keine Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz benötigt wurde. Alle Tiere waren männlich, um zyklische, hormonelle Schwankungen und deren Einflüsse auf die Organfunktionen auszuschließen. Bis zum Tag der Organentnahme lebten die Tiere in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und wurden mit *Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse - Haltung* versorgt.

#### **3.2 Organentnahme**

Vor der Organentnahme wurden die Ratten mit einer intraperitonealen Injektion von 32 mg *Pentobarbital* narkotisiert und erhielten 1000 I.E. *Heparin-Natrium*. Nach 5 Minuten wurde untersucht, ob das Tier eine Areflexie bot und demnach tiefkomatös war. Bei Bedarf wurde in 8 mg Schritten *Pentobarbital* nachtitriert, bis die gewünschte Narkosetiefe erreicht wurde. Das tiefkomatöse Tier wurde dann mittels Dekapitation getötet. Bis zu diesem Moment erfolgte jeglicher Umgang mit den Tieren, durch Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. med. Ragnar Huhn-Wientgen (internes AZ: O27/12). Ein Stück Leber und das gesamte Colon wurden entnommen. Die Leber wurde sofort in eiskalten *Isolationspuffer* (pH 7,15) gegeben, das Colon wurde durch Ausstreichen, grob von Kot gereinigt, von anhängendem Fettgewebe befreit und ebenfalls in eiskalten *Isolationspuffer* gegeben.

### 3.3 Gewebhomogenisierung

#### 3.3.1 Leber

Von dem entnommenen Stück Leber wurde 1 g, in einem zweiten Becherglas, mit eiskaltem *Isolationspuffer*, abgewogen und mit einer Schere zerkleinert. Um das Lebergewebe von Blut zu befreien, wurde der Puffer abgegossen. Diese Schritte wurden einmal wiederholt. Dann wurden 10 ml *Isolationspuffer* zum Lebergewebe hinzugegeben. Das Lebergewebe wurde im Anschluss mittels Potter-Elvehjem-Verfahren homogenisiert. Dabei wird, unter ständiger Kühlung des Gewebes, ein rotierender *Teflonkolben* (2000 U/min.) in einem eng anliegenden (< 0,05mm) *Glaszylinder* (60 ml) fünfmal auf und ab bewegt. Durch die dabei auftretenden Scherkräfte werden die zellulären Strukturen, in dem zu homogenisierenden Gewebe, aufgeschlossen und die Zellorganellen werden freigesetzt. Dieses Verfahren gilt als besonders schonend und ist deswegen gut geeignet, um Zellorganellen zu gewinnen.

#### 3.3.2 Colon

Das gesamte entnommene Colon wurde in einem zweiten Becherglas mit eiskaltem *Isolationspuffer* abgewogen. Auf einer mit kaltem *Isolationspuffer* gefüllten Petrischale wurde das Colon dann mit einer Schere in der Längsachse aufgeschnitten. Rückständiger Kot und die Mucosa wurden, durch eine mit *Isolationspuffer* getränkte Komresse, abgerieben. Anschließend wurde das Colon für 5 Minuten mit *Trypsin-EDTA* (0,05%) versetzt. Die Menge *Trypsin-EDTA* in ml orientierte sich dabei an dem gemessenen Darmgewicht (Darmgewicht x 2). Trypsin ist eine Peptidase und spaltet die interzellulären Adhäsionsmoleküle, so dass die Zellen aus dem Zellverband herausgelöst werden. Nach Ablauf der 5 Minuten wurde das Colon in ein Becherglas mit eiskaltem *Isolationspuffer*, mit erhöhtem BSA-Gehalt (Puffermenge in ml = Darmgewicht in g x 4) und dem Protease-Inhibitor *cOMplete* (*cOMplete* in ml = ml Puffer/100) gegeben, um zu verhindern, dass neben den extrazellulären Proteinen auch intrazelluläre Proteine zerstört werden. Im Anschluss wurde das Colon ebenfalls mit einer Schere grob zerkleinert und nach dem oben beschriebenen Potter-Elvehjem-Verfahren homogenisiert. Auch dieses Homogenat wurde mittels Komresse filtriert und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis gelegt.

### 3.4 Proteinbestimmung nach Lowry

#### 3.4.1 Prinzip

Den bei der Respirometrie bestimmten Sauerstoffverbrauch normierten wir auf die Gesamtproteinmenge in den Homogenaten. Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge nutzten wir das Verfahren nach Lowry (H. Lowry, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA, 1951). Grundlegend sind dabei zwei Reaktionen. Stoffe, die mindestens 2 Peptidbindungen haben, bilden in wässrig-alkalischer Lösung, einen dunkel-violetten Komplex mit zweiwertigen Kupferionen. Gibt man nun gelbes Folin-Ciocalteu-Reagenz (Phosphomolybdat-Phosphowolframat) hinzu, so wird dieses durch den Kupfer-Peptid-Komplex zu Molybdänblau reduziert. Gleichzeitig wird das zweiwertige Kupfer zu einwertigem Kupfer reduziert. Es kommt zu einer intensiven Blaufärbung, die photometrisch bei  $\lambda = 750 \text{ nm}$  quantifiziert wird.

#### 3.4.2 praktisches Vorgehen bei der Proteinbestimmung

Zunächst wurde Lösung 1 hergestellt. Diese ist ein Gemisch aus drei verschiedenen Reagenzien:

Reagenz A: 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  werden in 500 ml 0,1 M  $\text{NaOH}$  gelöst. Da es bei der Zugabe von  $\text{NaOH}$  zu einer starken Wärmefreisetzung kommt, muss dies auf Eis erfolgen.

Reagenz B: 2 g *Kaliumnatrium-Tartrat-Tetrahydrat* werden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Reagenz C: 1 g *Kupfersulfatpentahydrat* wird in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Reagenz A, B und C wurden im Verhältnis 100:1:1 gemischt.

Lösung 2 ist ein 1:1 Gemisch aus Aqua dest. und *Folin & Ciocalteu's phenol reagent*.

Die Proteinkonzentration in den Homogenaten wurde gegen eine Standardreihe aus *Bovinem Serum Albumin* (1mg/ml, pH 7,0) gemessen. Die Standardreihe setzte sich wie folgt zusammen:

---

K0:	0 µg/ml BSA (Negativkontrolle)
K1:	62,4 µg/ml BSA
K2:	125 µg/ml BSA
K3:	250 µg/ml BSA
K4:	500 µg/ml BSA
K5:	750 µg/ml BSA
K6:	1000 µg/ml BSA (Positivkontrolle)

Colon- und Leberhomogenat wurden jeweils 1:100 verdünnt.

Aus der Standardreihe, sowie aus den verdünnten Homogenaten, wurden 100 µl in Mikroreaktionsgefäße mit jeweils 500 µl Lösung 1 überführt und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 µl Lösung 2 dazugegeben und für mindestens weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden jeweils zweimal 200 µl aus den Mikroreaktionsgefäßen auf eine *96-Well-Platte* verteilt. Bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 750$  nm wurde in einem *Microplate Reader* die Gesamtproteinkonzentration photometrisch bestimmt.

### 3.5 Respirometrie

#### 3.5.1 oxidative Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) ist die Hauptaufgabe aller Mitochondrien, mit dem Ziel, aus Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP) herzustellen (s. Abb. 1). ATP ist der wichtigste Energiespeicher für alle biochemischen Vorgänge in tierischen Zellen. Im ersten Schritt der OXPHOS wird über vier Enzymkomplexe der Atmungskette ein Protonengradient zwischen Mitochondrienmatrix und dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran (intermembranärer Raum, IMR) aufgebaut. Der Hydridionenüberträger Nicotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ), welcher in seiner reduzierten Form ( $\text{NADH}/\text{H}^+$ ) hauptsächlich im Citratzyklus generiert wird, dient der Atmungskette als einer von zwei Elektronenlieferanten. Am Enzymkomplex I, der NADH-Dehydrogenase, wird  $\text{NADH}/\text{H}^+$  oxidiert. Die beiden freigesetzten Elektronen werden auf Ubichinon (Q) übertragen. Ubichinon, ein lipophiles Keton, kann sich aufgrund seiner lipophilen Seitenkette in Biomembranen, wie beispielsweise der inneren Mitochondrienmembran, bewegen. Durch die Aufnahme der beiden Elektronen aus der NADH-Dehydrogenase wird Ubichinon (Q) zu Ubichinol ( $\text{QH}_2$ ) reduziert. Die bei diesen Redoxreaktionen freiwerdende Energie wird dann

genutzt, um vier Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den IMR zu transportieren. Eine weitere Möglichkeit, Elektronen in die Atmungskette einfließen zu lassen, entsteht durch das zweite Reduktionsäquivalent Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), welches in seiner reduzierten Form,  $\text{FADH}_2$ , ebenfalls im Citratzyklus gebildet wird. Zwei Elektronen des Succinats werden auf die prosthetische Gruppe (FAD) der Succinat-Dehydrogenase (Enzymkomplex II) übertragen, welches so zu  $\text{FADH}_2$  reduziert wird. Die Succinat-Dehydrogenase nutzt die Elektronen, um Ubichinon zu Ubichinol zu reduzieren. Hierbei werden keine Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den IMR befördert. Am Enzymkomplex III, der Cytochrom-C-Reduktase, wird Ubichinol wieder zu Ubichinon oxidiert, während Cytochrom C reduziert wird. Die bei diesen Redoxreaktionen freiwerdende Energie wird wieder genutzt, um weitere vier Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den IMR zu befördern. Cytochrom C dient als Elektronenüberträger zwischen den Enzymkomplexen III und IV. Komplex IV, die Cytochrom-C-Oxidase, ist das letzte Enzym der Atmungskette und der eigentliche Verbraucher des über unsere Lungen aufgenommenen Sauerstoffs. Cytochrom C wird oxidiert. Die beiden freigesetzten Elektronen werden genutzt, um ein Molekül Sauerstoff mit vier Protonen aus der Mitochondrienmatrix zu zwei Molekülen Wasser zu reduzieren. Außerdem werden durch die Cytochrom-C-Oxidase zwei Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranärenraum transportiert. Aufgrund der Protonenübertragung aus der Mitochondrienmatrix in den IMR, entsteht an der inneren Mitochondrienmembran ein elektrochemischer Gradient. Dieser Gradient wird von einem fünften Enzymkomplex, der ATP-Synthase, zur Umwandlung von ADP zu ATP genutzt. Es werden zwei Anteile der ATP-Synthase unterschieden. Die innere Mitochondrienmembran wird vom sogenannten  $\text{F}_0$ -Teil penetriert. Dabei handelt es sich um einen Kanal, welcher den Rückfluss von Protonen aus dem IMR in die Mitochondrienmatrix ermöglicht. Mit dem  $\text{F}_0$ -Teil ist der  $\text{F}_1$ -Teil verbunden. Dieser ragt in die Mitochondrienmatrix hinein und dient der eigentlichen Verbindung von ADP und Phosphat zu ATP. Durch Rückstrom der Protonen aus dem IMR in die Mitochondrienmatrix wird Energie freigesetzt, welche nicht benötigt wird, um die Bindung zwischen ADP und Phosphat zu knüpfen, sondern um das fertige ATP von der ATP-Synthase abzulösen. Die Atmungskette unterliegt einer strengen Regulation, damit nur so viel ATP erzeugt wird, wie auch benötigt wird. Liegt ein sehr hoher Protonengradient zwischen IMR und Mitochondrienmatrix vor, so kommt es zu einer negativen Rückkopplung, indem der Elektronentransport der Atmungskette unterbunden wird. Der wichtigste Regulationsparameter der Atmungskette ist die intrazelluläre ADP-Konzentration. Eine hohe ADP-Konzentration in der Zelle signalisiert einen hohen Energiebedarf. Es kommt zur Induktion der Atmungskette. Liegt dagegen nur wenig oder kein ADP vor, so wird der Elektronentransport in der

Atmungskette unterbunden und die ATP-Synthese kommt zum Erliegen. Diesen Mechanismus bezeichnet man als Atmungskontrolle.

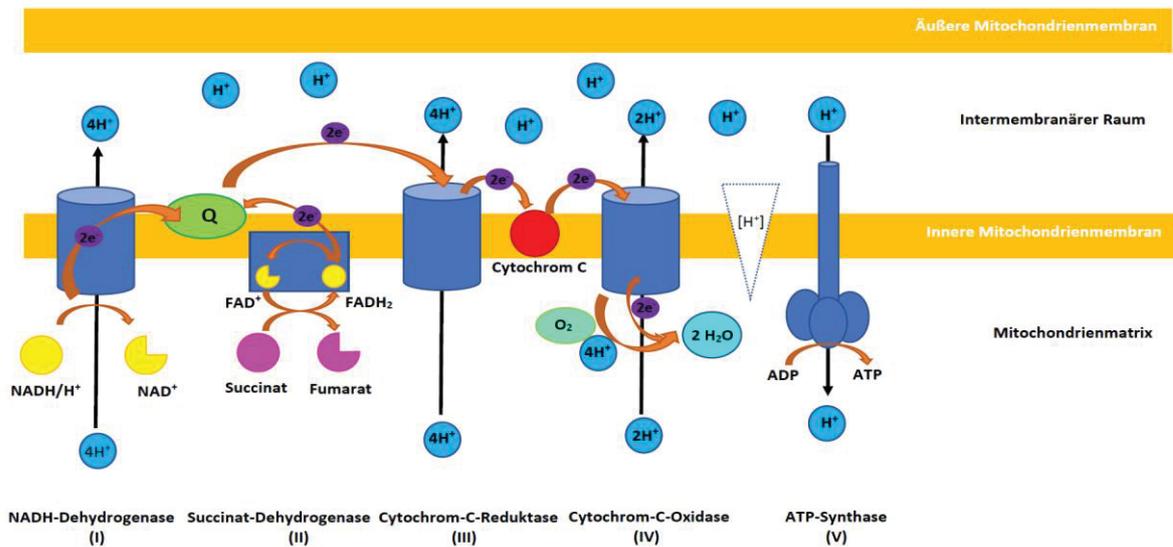


Abb. 1: Oxidative Phosphorylierung

### 3.5.2 Prinzip der Respirometrie

Bei der Respirometrie handelt es sich um die kontinuierliche Messung der Sauerstoffkonzentration und der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit, in einer Lösung. Dazu wird eine Clark-Elektrode (L. Clark, Antioch College, Yellow Springs, Ohio, USA, 1953) verwendet. Sauerstoffkonzentration und Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit sind Referenzwerte für die OXPHOS und damit für die mitochondriale Aktivität. Die Messung erfolgt unter kontrollierten Bedingungen. Dabei befindet sich die zu untersuchende Lösung in einer Messkammer, welche ständig von temperiertem Wasser umspült wird, um eine konstante Temperatur in der Messkammer aufrecht zu erhalten. Dies ist besonders wichtig, da die Geschwindigkeit der OXPHOS sehr temperaturabhängig ist. Die Messkammer wird hermetisch abgeschlossen, um keine direkte Beeinflussung der Sauerstoffkonzentration, in der zu messenden Lösung, durch Diffusion zu ermöglichen. In der Messkammer befindet sich ein Magnetrührer, welcher zu einer ständigen Durchmischung der Lösung führt. Dadurch soll verhindert werden, dass es während der Messung, lokal begrenzt an der Clark-Elektrode, zu einer Verarmung an Sauerstoff kommt. Führt man von extern Substrate des Citratzyklus hinzu, so werden diese in der Mitochondrienmatrix zu den Reduktionsäquivalenten NADH/H<sup>+</sup> bzw.

FADH<sub>2</sub> umgewandelt. Die Zugabe von ADP in die Messkammer signalisiert den Mitochondrien, dass in ihren Zellen ein Energiemangel vorliegt (Atmungskontrolle). Es kommt zur Stimulation der Atmungskette und letztendlich zur OXPHOS. Durch Induktion der Atmungskette kommt es zum Anstieg der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit und damit zum Abfall der Sauerstoffkonzentration in der Messkammer. Diese Werte werden mittels Oximeter erfasst und computergestützt visualisiert.

### 3.5.3 Untersuchungsparameter bei der Respirometrie

#### 3.5.3.1 State 2 Respiration

Die State 2 Respiration repräsentiert die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit nach Zugabe der Substrate, welche dann im Citratzyklus der Mitochondrien in die Reduktionsäquivalente, NADH/H<sup>+</sup> bzw. FADH<sub>2</sub>, umgewandelt werden. In dieser Phase ist die OXPHOS in ihrer Ruheform.

#### 3.5.3.2 State 3 Respiration

Als State 3 Respiration wird die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit nach Zugabe von ADP bezeichnet. Durch Erhöhung der ADP-Konzentration in der Messkammer, wird den Mitochondrien ein Energie-, also ATP-Mangel signalisiert. Der Sauerstoffverbrauch steigt bei gesunden Mitochondrien auf sein Maximum an, da das gesamte ADP energieaufwendig phosphoryliert wird. Außerdem wird während der State 3 Respiration die Menge an verbrauchtem Sauerstoff in mM ( $\Delta O$ ) gemessen.

#### 3.5.3.3 State 4 Respiration

Nach Verbrauch des hinzugegebenen ADP stellt sich der State 4 ein, bei dem sich die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit wieder der Geschwindigkeit in Ruhe annähert. Weil ein Teil des neugebildeten ATP sofort durch ATPasen wieder in ADP und Phosphat gespalten wird, ist die State 4 Respiration meist etwas höher als der State 2, da das ADP unter Sauerstoffverbrauch erneut zu ATP umgewandelt wird. Bei einem Protonenleck in der inneren Mitochondrienmembran steigt die State 4 Respiration an, weil über die Atmungskette versucht wird, dem Zusammenbrechen des Membranpotenzials entgegenzuwirken.

#### 3.5.3.4 Respiratory Control Index (RCI)

Der Respiratory Control Index macht Angaben über den Kopplungsgrad zwischen Atmungskette und ATP-Synthese. Er errechnet sich als:

$$\text{RCI} = \frac{\text{State 3}}{\text{State 2}}$$

Je kleiner der RCI, desto stärker die Entkopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Synthese.

#### 3.5.3.5 ADP/O-Ratio

Die ADP/O-Ratio gibt an, wie viel ADP, pro in State 3 verbrauchtem Sauerstoff, in ATP umgewandelt wurde. Sie ist somit ein Maß für die Effizienz der OXPHOS. Bei vollständiger Entkopplung der Atmungskette von der ATP-Synthese ist die ADP/O-Ratio gleich 0.

### 3.5.4 Praktisches Vorgehen bei der Respirometrie

#### 3.5.4.1 Vorbereitung der Respirometrie

Zur Messung der Sauerstoffkonzentration und der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit im Colon- bzw. Leber-Homogenat wurde ein *MT200-Respirometer*, mit einem Fassungsvermögen der Messkammer von 500 µl, verwendet. Die Messkammer des Respirometers wurde von konstant 30,0 °C warmen Wasser umspült. Zur Erwärmung des Wassers diente ein Typ *ED Wasserbad*. Sauerstoffkonzentration und Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit wurden mittels *Oximeter* errechnet und am Computer über ein *Analyseprogramm* visualisiert. Die Kalibrierung des *Oximeters* erfolgte täglich vor Beginn der Messung mit Aqua dest. und einer *Sodiumsulfidlösung*. Das destillierte Wasser wurde durch kräftiges Schütteln mit Sauerstoff angereichert und diente als Referenzwert für hohe Sauerstoffkonzentrationen (Normwert: 500 – 700 pA). *Sodiumsulfid* bindet in wässriger Lösung Sauerstoff und diente somit als Referenzwert für niedrige Sauerstoffkonzentrationen (<50 pA).

Alle Messungen erfolgten, nach Mischung des Homogenats, mit 30°C warmen *Respirationspuffer* (pH 7,4) und einer Proteinendkonzentration von 4 mg/ml (Leber) bzw. 6 mg/ml (Colon).

Als Substrate für den Citratzyklus wurden *Glutamat* (2,5 mM) und *Malat* (2,5 mM) oder *Succinat* (Leber: 10 mM; Colon: 5 mM) verwendet. Da *Succinat* zu geringen Teilen auch über die NADH-Dehydrogenase oxidiert wird, wurde zu jeder Messung mit *Succinat*, zusätzlich *Rotenon* (0,5 µM), ein Hemmstoff des Enzymkomplexes I, hinzugegeben, um selektiv die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase zu untersuchen. Die Zugabe der Substrate erfolgte stets nach einer Minute Messzeit. Nach einer weiteren Minute Messzeit, erfolgte die Zugabe von *ADP* (Leber: 250 µM; Colon: 50 µM).

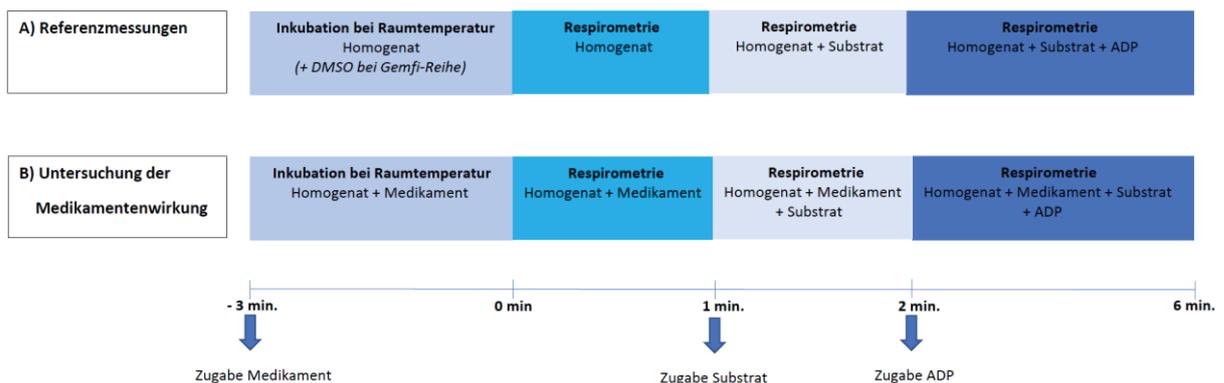
#### 3.5.4.2 Qualitätskontrollen

Durch Zugabe von *Cytochrom C* (2,5  $\mu\text{M}$ ) wurde die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran überprüft. Kommt es bei der Homogenisierung der Gewebe zu einer Beschädigung der äußeren Mitochondrienmembran, so entfernt sich *Cytochrom C* von der inneren Mitochondrienmembran, die Atmungskettenaktivität nimmt ab. Wird in diesem Fall *Cytochrom C* von extern hinzugefügt, so nimmt die Atmungskettenaktivität stark zu, was sich in einem massiven Anstieg der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit darstellt. Die Zugabe des *Cytochrom C* erfolgte auf dem Maximum der State 3 Respiration. Um das Membranpotenzial der Mitochondrien zu überprüfen, wurde *Oligomycin* (0,05  $\mu\text{g/ml}$ ) nach fehlender Reaktion auf *Cytochrom C* verabreicht. *Oligomycin* ist ein Makrolid-Antibiotikum, welches an die  $F_0$ -Untereinheit der ATP-Synthase bindet und den Protonenrückstrom aus dem IMR in die Mitochondrienmatrix verhindert. Die ATP-Synthese wird dadurch gehemmt. Der Elektronentransport in der Atmungskette dient dann lediglich der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials und wird deswegen auf den Ruhezustand (State 2) minimiert. Bei bereits gestörtem Membranpotenzial, durch einen unkontrollierten Protonenfluss über der inneren Mitochondrienmembran, kommt es nach Zugabe von *Oligomycin* nicht zu einem Abfall der Atmungskettenaktivität und damit des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, da die Atmungskette versucht, dem Protonenleck entgegen zu wirken. Im Falle der Leber wurde außerdem noch *Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon* (CCCP) in 0,5  $\mu\text{M}$ -Schritten fraktioniert verabreicht. Damit wurde überprüft, ob die Atmungskette entkoppelt werden kann. CCCP ist ein Protonophor, also ein Transporter für Protonen durch Biomembranen. Nach Zugabe von CCCP werden die im IMR akkumulierten Protonen durch die innere Mitochondrienmembran zurück in die Mitochondrienmatrix geschleust. Die Atmungskette wird von der ATP-Synthase getrennt und maximal induziert, um das Membranpotenzial aufrecht zu erhalten. Beim Colon wurde auf die Zugabe von CCCP verzichtet, da nach mehrmaliger Kontrolle mit CCCP nie eine Entkopplung beobachtet werden konnte. Die Qualitätskontrollen mit *Cytochrom C*, *Oligomycin* und CCCP wurden bei jeder Messung, einmal pro Homogenat, mit Succinat als Substrat, durchgeführt.

#### 3.5.4.3 Untersuchung der Medikamentenwirkung

Als Referenz für alle weiteren Messungen, wurden nur bei der Untersuchung der Gemfibrozilwirkung jeweils drei Messungen nach dreiminütiger Inkubation der Homogenate, bei Raumtemperatur, mit *Dimethylsulfoxid* (DMSO; 3  $\mu\text{l}$ , 9  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$ ), dem Lösungsmittel von *Gemfibrozil* durchgeführt (s. Abb. 2). Damit wurden die Wirkungen der Trägerlösung und der

drei Minuten Inkubation, bei Raumtemperatur, auf die mitochondriale Funktion berücksichtigt. Für die Pravastatin-Messreihe erfolgten diese Messungen ohne Zugabe weiterer Substanzen, da *Pravastatin* in Aqua dest. gelöst wird. Hier wurden nach dreiminütiger Inkubation lediglich die Auswirkungen der Inkubation bei Raumtemperatur untersucht. Pro Substrat wurden drei Messungen nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit *Gemfibrozil* bzw. *Pravastatin* durchgeführt (s. Abb. 2). Es wurden jeweils drei Konzentrationen von *Gemfibrozil* (100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ ) und *Pravastatin* (100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ ) untersucht. Alle Messungen des Colonomogenats erfolgten mit einer Dauer von sechs Minuten. Die Messungen der Leberhomogenate wurden nach Erreichen einer stabilen State 4 Respiration beendet. Jede Konzentration wurde an den biologischen Replikaten von mindestens  $n = 8$  Tieren untersucht. Um nachzuweisen, dass die Mitochondrien in den Leberhomogenaten nach Zugabe von 1000  $\mu\text{M}$  bzw. 300  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil durch eine Entkoppelung nahezu funktionsunfähig sind, wurde zusätzlich mittels CCCP überprüft, ob die Atmungskette unter Medikamenteneinwirkung noch weiter entkoppelt werden kann.



**Abb. 2: Untersuchungsablauf**

Die Homogenate von jedem Tier wurden für drei Minuten bei Raumtemperatur ( $\pm$ Medikament) inkubiert. Danach erfolgte eine Minute Respirometrie. Im Anschluss wurde das Substrat (GM/ SR) hinzugegeben und für eine weitere Minute gemessen. Schließlich wurde ADP hinzugefügt und es wurde für weitere vier Minuten gemessen.

### 3.6 Statistik

Die generierten Daten wurden mittels GraphPad Prism® 7 ausgewertet und visualisiert. Um die Daten auf eine Normalverteilung zu überprüfen, wurde ein Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt.

Da nicht alle Daten normal verteilt waren, wurden Kruskal-Wallis-Tests mit Dunn's Post-hoc-Tests für multiples Testen durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt. Darüber hinaus wurden p-Werte zwischen 0,05 und 0,07 als Tendenz gewertet.

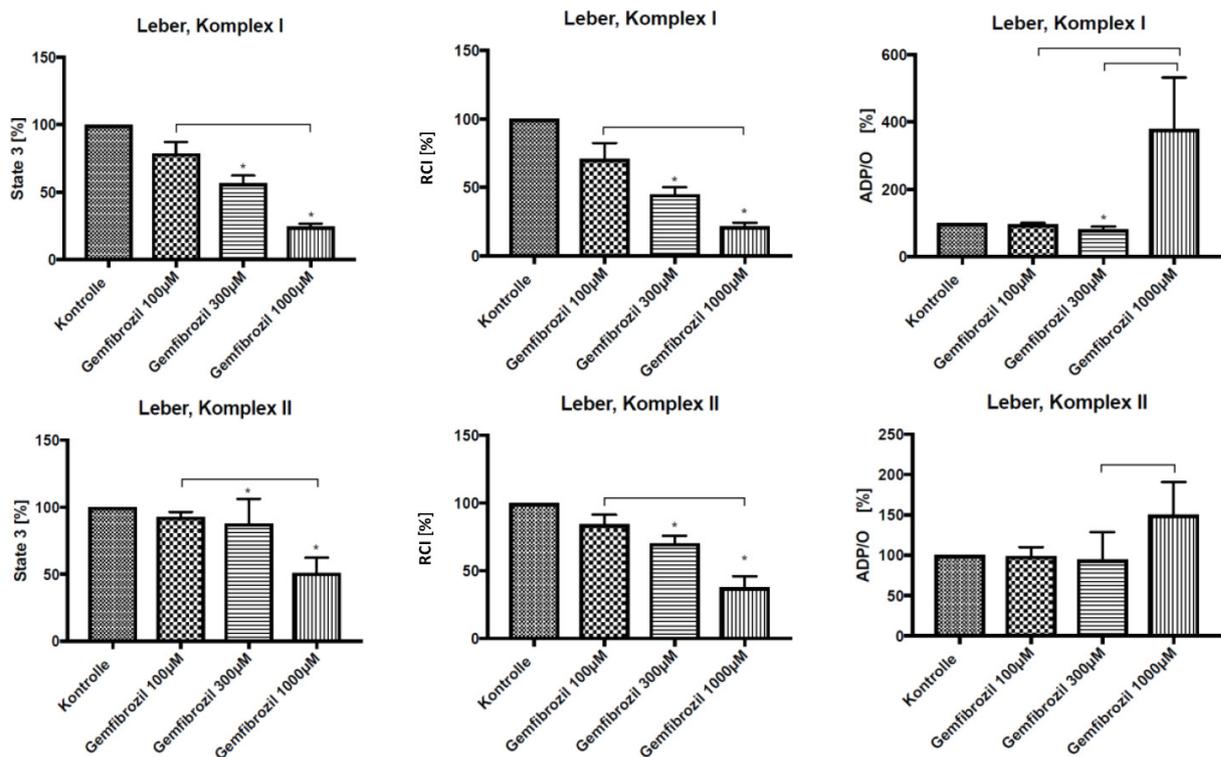
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Leber, Gemfibrozil

Um zu untersuchen, ob Gemfibrozil die mitochondriale Funktion in der Leber beeinflusst, wurden Leberhomogenate aus gesunden Wistar-Ratten für drei Minuten mit unterschiedlichen Dosierungen Gemfibrozil bei Raumtemperatur inkubiert und mit unbehandelten Proben verglichen. Die State 3 Respiration wurde sowohl in Glutamat-Malat- (GM-) als auch in Succinat- (S-) stimulierten Leberhomogenaten durch dreiminütige Inkubation mit Gemfibrozil, im Vergleich zu reinen Leberhomogenaten, reduziert. 100  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil bewirkten im Vergleich zur Kontrollprobe keine statistisch signifikante Veränderung der State 3 Respiration. Erst ab einer Dosis von 300  $\mu\text{M}$  stellte sich eine statistisch signifikante Senkung der State 3 Respiration um 43,14 % ( $\pm 5,47$  %) in GM-stimulierten Proben und um 12,16 % ( $\pm 18,46$  %) in S-stimulierten Homogenaten ein (s. Abb. 3). Nach dreiminütiger Inkubation mit 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil, wurde die mitochondriale State 3 Respiration in GM-stimulierten Homogenaten um durchschnittlich 75,62% ( $\pm 2,49$  %) und in S-stimulierten Proben um durchschnittlich 49,1 % ( $\pm 11,44$  %) signifikant reduziert (s. Abb 3).

Durch Zugabe von Gemfibrozil kam es zu einer Abnahme des mitochondrialen RCI in GM- und S-stimulierten Leberhomogenaten. 100  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil bewirkten dabei keine statistisch signifikante Veränderung des RCI. Dagegen bewirkten 300  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil eine statistisch signifikante Verminderung des RCI in GM-stimulierten Homogenaten um durchschnittlich 54,92 % ( $\pm 5,22$  %) und in S-stimulierten Proben um 29,65 % ( $\pm 5,47$  %) (s. Abb. 3). Durch 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil konnte der RCI in GM-stimulierten Proben statistisch signifikant um durchschnittlich 78,46 % ( $\pm 2,76$  %) und in S-stimulierten Homogenaten um durchschnittlich 62,24 % ( $\pm 8,27$  %) gesenkt werden (s. Abb. 3).

Durch Gemfibrozil wurde die ADP/O-Ratio beeinflusst. Die ADP/O-Ratio konnte durch 100 und 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil nicht signifikant verändert werden. 300  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil bewirkten nur in GM-stimulierten Proben eine statistisch signifikante Reduktion der ADP/O-Ratio um durchschnittlich 18,47 % ( $\pm 7,64$  %) (s. Abb. 3). Nach Behandlung der Leberhomogenate mit 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil kam es, im Vergleich zu unbehandelten Proben, zu einem deutlichen, aber nicht signifikanten Anstieg der ADP/O-Ratio, welcher am ehesten durch einen vollständigen Funktionsverlust der Mitochondrien erklärt werden kann.



**Abb. 3:** *in vitro* Gemfibrozilwirkung auf Lebermitochondrien der Ratte

State 3 Respiration, RCI und ADP/O-Ratio in GM-stimulierten (Komplex I) und S-stimulierten (Komplex II) Leberhomogenaten von gesunden Wistar-Ratten im prozentualen Vergleich vor und nach dreiminütiger Inkubation mit verschiedenen Dosierungen Gemfibrozil bei Raumtemperatur, Kruskal-Wallis + Dunn,  $p < 0,05$ , \* vs. Kontrolle,  $\square$   $p < 0,05$  zwischen den Gruppen,  $n=8$

	100 $\mu\text{M}$		300 $\mu\text{M}$		1000 $\mu\text{M}$	
	GM	S	GM	S	GM	S
<b>State 3</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	13,62 ( $\pm 1,59$ )	19,20 ( $\pm 2,66$ )	13,57 ( $\pm 2,09$ )	17,41 ( $\pm 2,51$ )	11,89 ( $\pm 1,77$ )	15,49 ( $\pm 3,21$ )
Gemfibrozil [nmol/min/mg]	10,61 ( $\pm 0,59$ )	17,76 ( $\pm 2,44$ )	7,64 ( $\pm 0,77$ )	14,95 ( $\pm 1,74$ )	2,92 ( $\pm 0,65$ )	7,65 ( $\pm 1,23$ )
Gemfibrozil vs. Kontrolle [%]	78,68 ( $\pm 8,48$ )	92,65 ( $\pm 3,82$ )	56,86 ( $\pm 5,47$ )*	87,84 ( $\pm 18,46$ )*	24,38 ( $\pm 2,49$ )*	50,90 ( $\pm 11,44$ )*
<b>RCI</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	10,38 ( $\pm 1,27$ )	7,23 ( $\pm 1,14$ )	11,73 ( $\pm 0,99$ )	7,51 ( $\pm 0,87$ )	11,39 ( $\pm 1,74$ )	7,21 ( $\pm 0,76$ )
Gemfibrozil [nmol/min/mg]	7,34 ( $\pm 1,33$ )	6,09 ( $\pm 0,89$ )	5,26 ( $\pm 0,50$ )	5,31 ( $\pm 0,85$ )	2,42 ( $\pm 0,22$ )	2,67 ( $\pm 0,36$ )
Gemfibrozil vs. Kontrolle [%]	70,85 ( $\pm 11,57$ )	84,45 ( $\pm 6,96$ )	45,08 ( $\pm 5,22$ )*	70,35 ( $\pm 5,47$ )*	21,54 ( $\pm 2,76$ )*	37,76 ( $\pm 8,27$ )*
<b>ADP/O</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	3,39 ( $\pm 0,51$ )	2,02 ( $\pm 0,30$ )	3,22 ( $\pm 0,36$ )	2,17 ( $\pm 0,51$ )	3,71 ( $\pm 0,94$ )	2,89 ( $\pm 0,72$ )
Gemfibrozil [nmol/min/mg]	3,24 ( $\pm 0,41$ )	1,99 ( $\pm 0,30$ )	2,63 ( $\pm 0,41$ )	1,95 ( $\pm 0,44$ )	13,11 ( $\pm 4,10$ )	4,18 ( $\pm 0,97$ )
Gemfibrozil vs. Kontrolle [%]	95,98 ( $\pm 4,28$ )	98,84 ( $\pm 11,30$ )	81,53 ( $\pm 7,64$ )*	94,60 ( $\pm 33,90$ )	379,15 ( $\pm 152,61$ )	150,10 ( $\pm 40,77$ )

**Tabelle 1: *in vitro* Gemfibrozilwirkung auf Lebermitochondrien der Ratte**

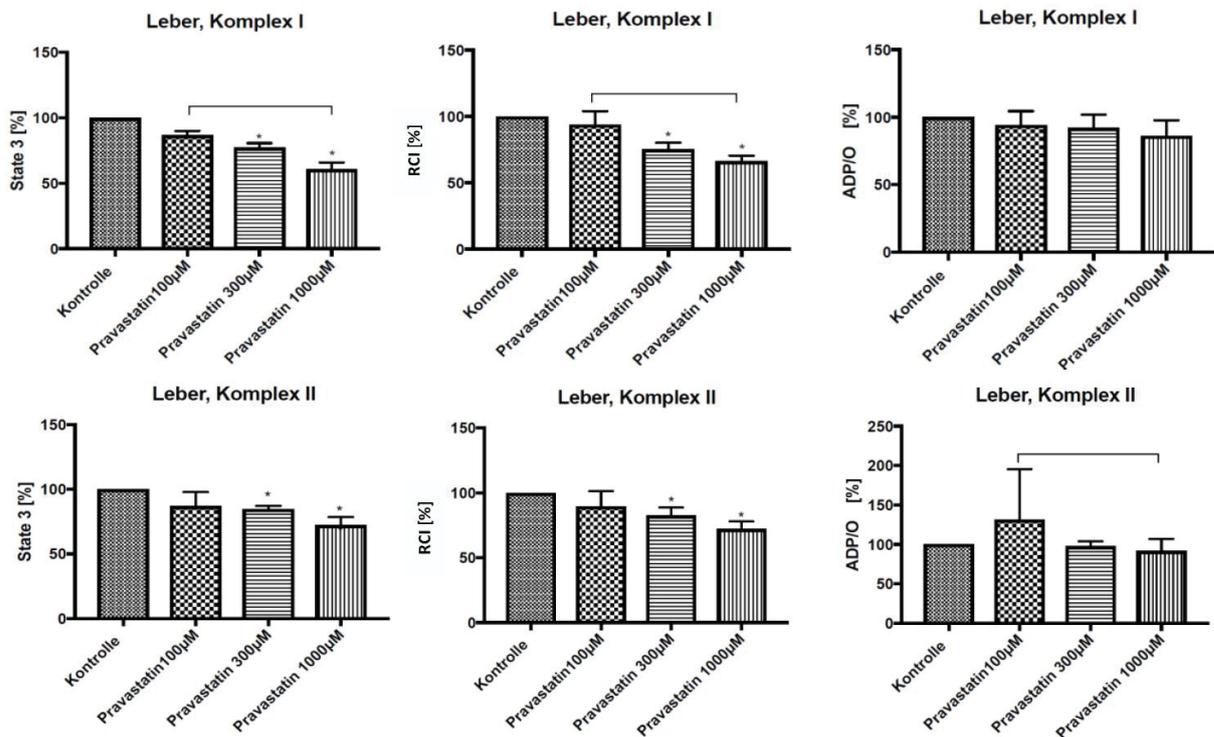
*In vitro* Effekte von verschiedenen Dosierungen Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion in Leberhomogenaten von gesunden Wistar-Ratten. Alle Werte sind Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von jeweils 8 Leberhomogenaten, vor Gemfibrozilgabe, nach dreiminütiger Inkubation mit Gemfibrozil bei Raumtemperatur und im prozentualen Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 8$

## 4.2 Leber, Pravastatin

Nach dreiminütiger Inkubation von Leberhomogenaten, bei Raumtemperatur, mit verschiedenen Dosierungen Pravastatin (100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$ ), konnte im Vergleich zu unbehandelten Proben gezeigt werden, dass Pravastatin die mitochondriale Funktion *in vitro* beeinflusst. Die State 3 Respiration wurde durch dreiminütige Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  Pravastatin nicht signifikant verändert. Erst 300  $\mu\text{M}$  Pravastatin bewirkten eine statistisch signifikante Abnahme der State 3 Respiration, in GM-stimulierten Homogenaten um durchschnittlich 22,55 % ( $\pm 3,24$  %) und in S-stimulierten Proben um gemittelt 15,17 ( $\pm 2,35$  %) (s. Abb. 4). 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin führten in GM-stimulierten Homogenaten zu einer statistisch signifikanten Reduktion der State 3 Respiration um durchschnittlich 39,35 % ( $\pm 5,34$  %) und in S-stimulierten Homogenaten um durchschnittlich 27,73 % ( $\pm 6,19$  %) (s. Abb. 4).

Durch Pravastatin wurde im Vergleich zu unbehandelten Proben der RCI beeinflusst. 100  $\mu\text{M}$  Pravastatin konnten nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur den RCI nicht signifikant verändern. 300  $\mu\text{M}$  Pravastatin bewirkten dagegen in GM-stimulierten Homogenaten einen signifikanten Abfall des RCI um durchschnittlich 24,72 % ( $\pm 5,03$  %) und in S-stimulierten Leberhomogenaten um 17,39 % ( $\pm 6,10$  %) (s. Abb. 4). Durch 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin konnte der RCI statistisch signifikant gesenkt werden (s. Abb. 4). In GM-stimulierten Leberhomogenaten kam es zu einem Abfall um durchschnittlich 33,65% ( $\pm 4,21$  %) und in S-stimulierten Proben um durchschnittlich 27,81 % ( $\pm 5,93$  %).

Pravastatin beeinflusste in keiner der untersuchten Dosierungen die ADP/O-Ratio im Vergleich zu unbehandelten Leberhomogenaten signifikant. Für 100  $\mu\text{M}$  zeigte sich nur bei den Succinat-stimulierten Homogenaten eine signifikante Erhöhung der ADP/O-Ratio im Vergleich zu 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin.



**Abb. 4** *in vitro* Pravastatinwirkung auf Lebermitochondrien der Ratte

State 3 Respiration, RCI und ADP/O-Ratio in GM-stimulierten (Komplex I) und S-stimulierten (Komplex II) Leberhomogenaten von gesunden Wistar-Ratten im prozentualen Vergleich vor und nach dreiminütiger Inkubation mit verschiedenen Dosierungen Pravastatin bei Raumtemperatur, Kruskal-Wallis + Dunn,  $p < 0,05$ , \* vs. Kontrolle,  $\square$   $p < 0,05$  zwischen den Gruppen,  $n=7-8$

	1000 $\mu\text{M}$		300 $\mu\text{M}$		1000 $\mu\text{M}$	
	GM	S	GM	S	GM	S
<b>State 3</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	12,49 ( $\pm 2,10$ )	16,17 ( $\pm 3,44$ )	11,52 ( $\pm 0,95$ )	16,10 ( $\pm 1,26$ )	10,84 ( $\pm 1,84$ )	15,76 ( $\pm 2,14$ )
Pravastatin [nmol/min/mg]	10,83 ( $\pm 1,83$ )	14,27 ( $\pm 3,89$ )	8,91 ( $\pm 0,61$ )	13,67 ( $\pm 1,23$ )	6,50 ( $\pm 0,67$ )	11,30 ( $\pm 1,02$ )
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	86,70 ( $\pm 3,39$ )	87,03 ( $\pm 10,78$ )	77,45 ( $\pm 3,24$ )*	84,83 ( $\pm 2,35$ )*	60,65 ( $\pm 5,34$ )*	72,27 ( $\pm 6,19$ )*
<b>RCI</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	10,54 ( $\pm 0,47$ )	6,45 ( $\pm 1,48$ )	11,06 ( $\pm 1,12$ )	7,95 ( $\pm 0,47$ )	9,78 ( $\pm 1,27$ )	7,89 ( $\pm 0,67$ )
Pravastatin [nmol/min/mg]	9,89 ( $\pm 0,98$ )	5,92 ( $\pm 1,75$ )	8,29 ( $\pm 0,64$ )	6,56 ( $\pm 0,53$ )	6,47 ( $\pm 0,78$ )	5,68 ( $\pm 0,48$ )
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	93,99 ( $\pm 10,04$ )	89,66 ( $\pm 11,68$ )	75,28 ( $\pm 5,03$ )*	82,61 ( $\pm 6,10$ )*	66,35 ( $\pm 4,21$ )*	72,19 ( $\pm 5,93$ )*
<b>ADP/O</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	3,72 ( $\pm 0,54$ )	1,98 ( $\pm 0,37$ )	3,32 ( $\pm 0,55$ )	1,88 ( $\pm 0,24$ )	3,19 ( $\pm 0,22$ )	1,74 ( $\pm 0,22$ )
Pravastatin [nmol/min/mg]	3,48 ( $\pm 0,44$ )	2,57 ( $\pm 1,13$ )	3,05 ( $\pm 0,59$ )	1,82 ( $\pm 0,15$ )	2,74 ( $\pm 0,30$ )	1,57 ( $\pm 0,16$ )
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	94,13 ( $\pm 10,28$ )	131,80 ( $\pm 63,73$ )	92,06 ( $\pm 9,71$ )	97,79 ( $\pm 6,36$ )	86,25 ( $\pm 11,40$ )	91,74 ( $\pm 15,23$ )

**Tabelle 2: *in vitro* Pravastatinwirkung auf Lebermitochondrien der Ratte**

*In vitro* Effekte von verschiedenen Dosierungen Pravastatin auf die mitochondriale Funktion in Leberhomogenaten von gesunden Wistar-Ratten. Alle Werte sind Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von jeweils 8 Leberhomogenaten, vor Pravastatingabe, nach dreiminütiger Inkubation mit Pravastatin bei Raumtemperatur und im prozentualen Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 7-8$

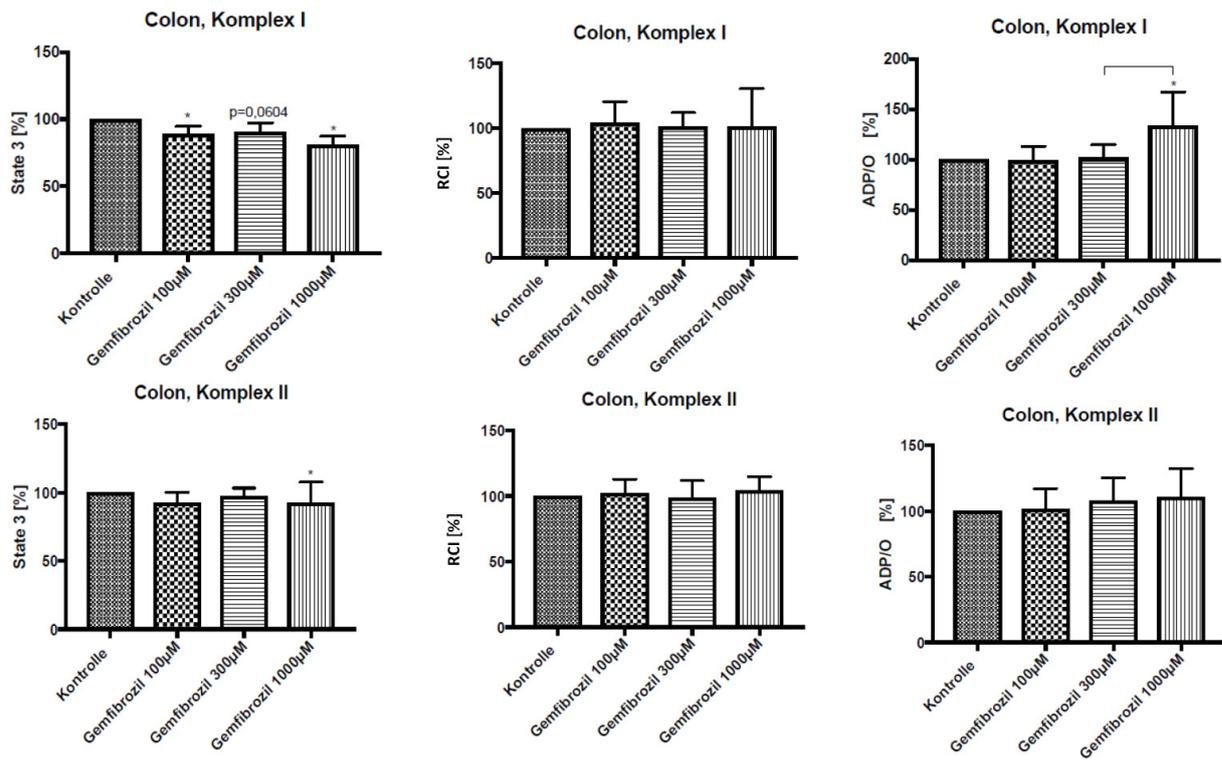
### 4.3 Colon, Gemfibrozil

Um zu überprüfen, ob Gemfibrozil die mitochondriale Funktion im Colon beeinflusst, wurden Colonomogenate von gesunden Wistar-Ratten für drei Minuten mit unterschiedlichen Dosierungen Gemfibrozil bei Raumtemperatur inkubiert und mit unbehandelten Proben verglichen.

Die State 3 Respiration in Colonomogenaten aus gesunden Wistar-Ratten wurde durch 100  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil nur in GM-stimulierten Proben statistisch signifikant um durchschnittlich 10,74 % ( $\pm 5,53$  %) reduziert (s. Abb. 5). In den GM-stimulierten Homogenaten verringerten 300  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil die State 3 Respiration im Vergleich zu den unbehandelten Proben nur tendenziell ( $p=0,0604$ ). Erst 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil reduzierten sowohl in GM-stimulierten Colonomogenaten, als auch in S-stimulierten Colonomogenaten die State 3 Respiration statistisch signifikant (s. Abb. 5). Nach GM-Stimulation betrug die Abnahme der State 3 Respiration 19,16 % ( $\pm 6,55$  %) und nach S-Stimulation 7,49 % ( $\pm 15,17$  %).

Colonomogenate die für drei Minuten mit 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  oder 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil inkubiert wurden, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Proben nur eine geringe und statistisch nicht signifikante Veränderung des RCI.

Auch die ADP/O-Ratio wurde in Colonomogenaten durch Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil nicht signifikant beeinflusst. Erst durch 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil konnte in GM-stimulierten Colon-Proben eine statistisch signifikante Zunahme der ADP/O-Ratio um 33,65 % ( $\pm 33,76$  %) beobachtet werden (s. Abb. 5). Für S-stimulierte Colonomogenate konnte jedoch kein statistisch signifikanter Effekt von 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil beobachtet werden.



**Abb. 5:** *in vitro* Gemfibrozilwirkung auf Colonmitochondrien der Ratte

State 3 Respiration, RCI und ADP/O-Ratio in GM-stimulierten (Komplex I) und S-stimulierten (Komplex II) Colonhomogenaten von gesunden Wistar-Ratten im prozentualen Vergleich vor und nach dreiminütiger Inkubation mit verschiedenen Dosierungen Gemfibrozil bei Raumtemperatur, Kruskal-Wallis + Dunn,  $p < 0,05$ , \* vs. Kontrolle,  $\square$   $p < 0,05$  zwischen den Gruppen,  $n = 8$

	100 $\mu$ M		300 $\mu$ M		1000 $\mu$ M	
	GM	S	GM	S	GM	S
<b>State 3</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	2,22 ( $\pm$ 0,24)	2,78 ( $\pm$ 0,68)	1,98 ( $\pm$ 0,46)	1,88 ( $\pm$ 0,45)	1,98 ( $\pm$ 0,38)	2,37 ( $\pm$ 0,49)
Gemfibrozil [nmol/min/mg]	1,98 ( $\pm$ 0,27)	2,58 ( $\pm$ 0,67)	1,79 ( $\pm$ 0,46)	1,84 ( $\pm$ 0,47)	1,60 ( $\pm$ 0,32)	2,21 ( $\pm$ 0,61)
Gemfibrozil vs. Kontrolle [%]	89,26 ( $\pm$ 5,53)*	92,36 ( $\pm$ 7,87)	90,58 ( $\pm$ 6,81)	97,53 ( $\pm$ 5,77)	80,84 ( $\pm$ 6,55)*	92,51 ( $\pm$ 15,17)*
<b>RCI</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	4,31 ( $\pm$ 0,79)	4,81 ( $\pm$ 0,78)	4,30 ( $\pm$ 0,88)	4,18 ( $\pm$ 1,01)	4,10 ( $\pm$ 0,91)	4,93 ( $\pm$ 0,55)
Gemfibrozil [nmol/min/mg]	4,39 ( $\pm$ 0,43)	4,91 ( $\pm$ 0,94)	4,33 ( $\pm$ 0,87)	4,14 ( $\pm$ 1,13)	4,01 ( $\pm$ 0,84)	5,14 ( $\pm$ 0,62)
Gemfibrozil vs. Kontrolle [%]	103,95 ( $\pm$ 16,46)	102,13 ( $\pm$ 10,85)	101,43 ( $\pm$ 10,57)	98,58 ( $\pm$ 13,04)	101,35 ( $\pm$ 29,05)	104,58 ( $\pm$ 10,31)
<b>ADP/O</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	1,18 ( $\pm$ 0,16)	0,96 ( $\pm$ 0,23)	1,33 ( $\pm$ 0,19)	1,36 ( $\pm$ 0,36)	1,37 ( $\pm$ 0,39)	1,10 ( $\pm$ 0,26)
Gemfibrozil [nmol/min/mg]	1,16 ( $\pm$ 0,17)	0,98 ( $\pm$ 0,29)	1,36 ( $\pm$ 0,30)	1,47 ( $\pm$ 0,52)	1,77 ( $\pm$ 0,34)	1,21 ( $\pm$ 0,37)
Gemfibrozil vs. Kontrolle [%]	99,04 ( $\pm$ 14,02)	101,69 ( $\pm$ 15,52)	101,69 ( $\pm$ 12,88)	107,68 ( $\pm$ 17,66)	133,65 ( $\pm$ 33,76)*	110,54 ( $\pm$ 21,86)

**Tabelle 3: Gemfibrozilwirkung auf Colomitochondrien der Ratte**

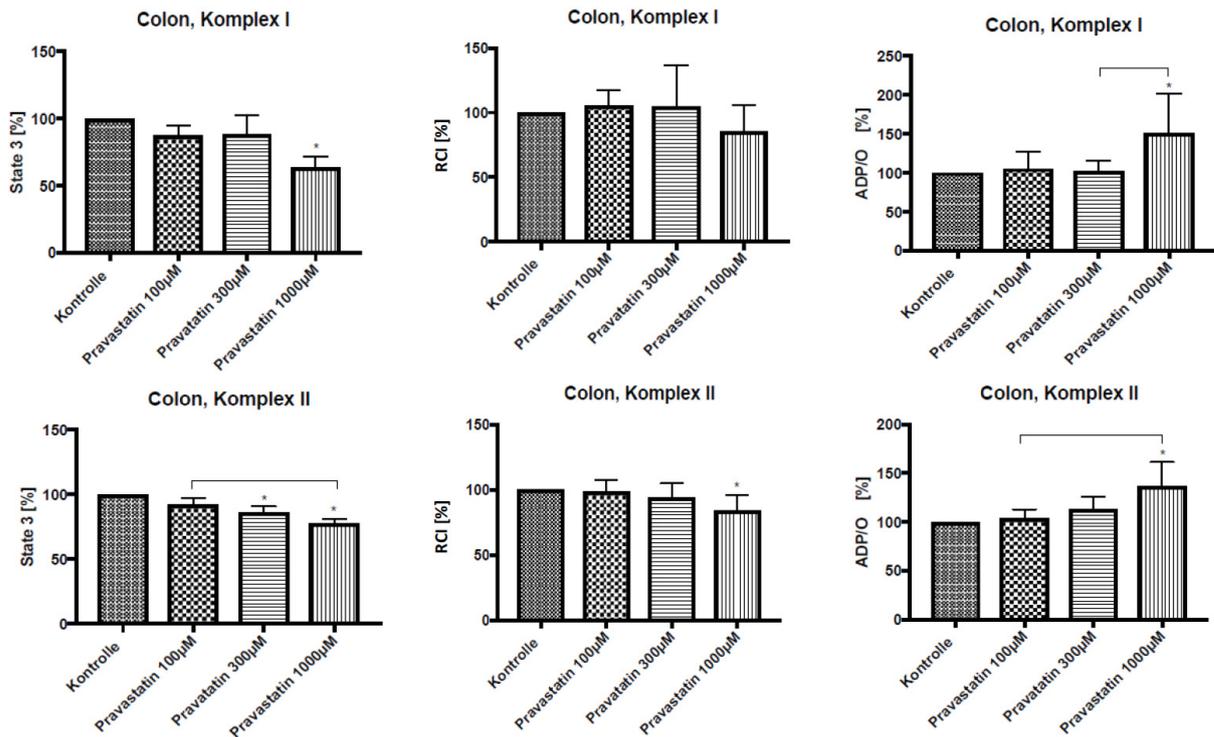
*In vitro* Effekte von verschiedenen Dosierungen Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion in Colomhogenaten von gesunden Wistar-Ratten. Alle Werte sind Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von jeweils 8 Colomhogenaten, vor Gemfibrozilgabe, nach dreiminütiger Inkubation mit Gemfibrozil bei Raumtemperatur und im prozentualen Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 8$

#### 4.4 Colon, Pravastatin

Pravastatin beeinflusste nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur in Dosen von 300  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  die mitochondriale *in vitro* Funktion in Colonomogenaten von gesunden Wistar-Ratten. In GM-stimulierten Homogenaten bewirkten 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  Pravastatin keine signifikante Veränderung der State 3 Respiration. In S-stimulierten Proben kam es erst durch 300  $\mu\text{M}$  Pravastatin zu einer statistisch signifikanten Reduktion der State 3 Respiration um 13,89 % ( $\pm 4,79$  %) (s. Abb. 6). Bei einer Pravastatin-Dosis von 1000  $\mu\text{M}$  konnte sowohl in GM-stimulierten Proben als auch in S-stimulierten Homogenaten eine statistisch signifikante Abnahme der State 3 Respiration beobachtet werden (s. Abb. 6). In GM-stimulierten Proben kam es zu einer durchschnittlichen Abnahme um 36,36 % ( $\pm 8,15$  %) und in S-stimulierten Proben um 22,70 % ( $\pm 4,09$  %).

Der RCI wurde lediglich in S-stimulierten Colonomogenaten durch 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin statistisch signifikant um 16,25 % ( $\pm 12,59$  %) reduziert (s. Abb. 6). In GM-stimulierten Proben und bei Inkubation mit niedrigeren Dosierungen Pravastatin konnte im Vergleich zu unbehandelten Colonomogenaten keine statistische Signifikanz erreicht werden.

Sowohl in GM-stimulierten Homogenaten, als auch in S-stimulierten Proben konnte durch 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin ein statistisch signifikanter Anstieg der ADP/O-Ratio beobachtet werden (s. Abb. 6). In den GM-stimulierten Colonomogenaten kam es zu einer Zunahme der ADP/O-Ratio um 51,49 % ( $\pm 50,35$  %) und in den S-stimulierten Proben zu einer Zunahme um 36,36 % ( $\pm 24,90$  %). Durch 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  Pravastatin konnten keine signifikanten Veränderungen der ADP/O-Ratio bewirkt werden.



**Abb. 6: *in vitro* Pravastatinwirkung auf Colonmitochondrien der Ratte**

State 3 Respiration, RCI und ADP/O-Ratio in GM-stimulierten (Komplex I) und S-stimulierten (Komplex II) Colonomogenaten von gesunden Wistar-Ratten im prozentualen Vergleich vor und nach dreiminütiger Inkubation mit verschiedenen Dosierungen Pravastatin bei Raumtemperatur, Kruskal-Wallis + Dunn,  $p < 0,05$ , \* vs. Kontrolle,  $\square$   $p < 0,05$  zwischen den Gruppen,  $n = 7-8$

	100 $\mu$ M					
	GM	S	GM	S	GM	S
<b>State 3</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	2,19 ( $\pm$ 0,42)	2,69 ( $\pm$ 0,68)	1,96 ( $\pm$ 0,22)	2,61 ( $\pm$ 0,51)	1,80 ( $\pm$ 0,26)	2,32 ( $\pm$ 0,47)
Pravastatin [nmol/min/mg]	1,95 ( $\pm$ 0,39)	2,63 ( $\pm$ 0,74)	1,73 ( $\pm$ 0,35)	2,24 ( $\pm$ 0,39)	1,15 ( $\pm$ 0,22)	1,80 ( $\pm$ 0,40)
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	87,64 ( $\pm$ 6,96)	92,43 ( $\pm$ 5,12)	88,20 ( $\pm$ 14,79)	86,11 ( $\pm$ 4,79)*	63,64 ( $\pm$ 8,15)*	77,30 ( $\pm$ 4,09)*
<b>RCI</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	5,28 ( $\pm$ 1,31)	4,35 ( $\pm$ 0,90)	4,49 ( $\pm$ 1,58)	4,80 ( $\pm$ 1,19)	4,54 ( $\pm$ 1,24)	4,97 ( $\pm$ 0,74)
Pravastatin [nmol/min/mg]	7,05 ( $\pm$ 5,56)	4,39 ( $\pm$ 0,76)	4,38 ( $\pm$ 0,91)	4,41 ( $\pm$ 0,61)	3,69 ( $\pm$ 0,41)	4,12 ( $\pm$ 0,56)
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	105,24 ( $\pm$ 12,02)	98,99 ( $\pm$ 8,36)	104,46 ( $\pm$ 32,23)	93,89 ( $\pm$ 11,29)	85,63 ( $\pm$ 20,59)	83,75 ( $\pm$ 12,59)*
<b>ADP/O</b>						
Kontrolle [nmol/min/mg]	1,17 ( $\pm$ 0,19)	0,88 ( $\pm$ 0,19)	1,34 ( $\pm$ 0,19)	0,98 ( $\pm$ 0,17)	1,34 ( $\pm$ 0,18)	1,06 ( $\pm$ 0,21)
Pravastatin [nmol/min/mg]	1,18 ( $\pm$ 0,18)	0,87 ( $\pm$ 0,18)	1,36 ( $\pm$ 0,23)	1,11 ( $\pm$ 0,26)	2,01 ( $\pm$ 0,62)	1,47 ( $\pm$ 0,49)
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	105,53 ( $\pm$ 12,02)	104,04 ( $\pm$ 8,82)	101,67 ( $\pm$ 15,10)	112,84 ( $\pm$ 13,07)	151,49 ( $\pm$ 50,35)*	136,36 ( $\pm$ 24,90)*

**Tabelle 4: *in vitro* Pravastatinwirkung auf Colonmitochondrien der Ratte**

*In vitro* Effekte von verschiedenen Dosierungen Pravastatin auf die mitochondriale Funktion in Colonhomogenaten von gesunden Wistar-Ratten. Alle Werte sind Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von jeweils 8 Colonhomogenaten, vor Pravastatingabe, nach dreiminütiger Inkubation mit Pravastatin bei Raumtemperatur und im prozentualen Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 7-8$

## 5 Diskussion

### 5.1 Ergebnisdiskussion

Durch die Forschungsarbeit im Rahmen dieser Dissertation können die eingangs gestellten Fragen folgendermaßen beantwortet werden:

1. Gemfibrozil und Pravastatin beeinflussen *in vitro*, organspezifisch, die mitochondriale Funktion in Colon- und Leberhomogenaten von gesunden Ratten. In der Leber führten sowohl Pravastatin als auch Gemfibrozil zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion. Im Colon scheint die Wirkung eher protektiv zu sein. Beide Substanzen vermindern die State 3 Respiration im Colon, verbessern aber gleichzeitig die Effizienz der OXPHOS.
2. Die Wirkung von Gemfibrozil und Pravastatin ist sowohl in der Leber als auch im Colon dosisabhängig. Die Wirkung unterscheidet sich zwischen beiden Geweben.
3. Anhand dieser Ergebnisse können positive Effekte auf das Outcome einer Sepsis vermutet werden. Theoretisch könnte eine Effizienzsteigerung der Atmungskette im Colon die intestinale Mucosa schützen und somit eine bakterielle Translokation verhindern oder zumindest abschwächen. Durch Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion in der Leber könnten Gemfibrozil und Pravastatin die Synthese von Akute-Phase-Proteinen vermindern und dadurch die pathologische Reaktion des Immunsystems abschwächen.

Mittels Respirometrie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Gemfibrozil die State 3 Respiration in der Leber erniedrigt. Die Abnahme der State 3 Respiration war für 300  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil signifikant. Eine höhere Dosis führte zu einer stärkeren Wirkung, so dass hier auf eine Dosis-Wirkungs-Beziehung geschlossen werden kann. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen, die Nadanaciva et. al<sup>67</sup> im Jahre 2007 machten, überein. Sie fanden heraus, dass 500 nmol/mg mitochondrialer Proteine Gemfibrozil (= 2000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil) die State 3 Respiration von aus Rattenlebern isolierten Mitochondrien um mehr als 50% hemmen. Bei niedrigeren Dosierungen (250 nmol/mg mitochondrialer Proteine) wurde dieser Effekt in geringerem Ausmaß ebenfalls beobachtet. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch in deutlich niedrigerer Dosierung ein vergleichbarer Effekt erzielt werden kann.

Dosisabhängig bewirkten 300 und 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil eine Entkoppelung der Atmungskette von der ADP-Synthese. Zhou et. al<sup>50</sup> konnten 1998 damit übereinstimmend eine signifikant entkoppelnde Wirkung von 75  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil auf isolierte Lebermitochondrien der Ratte

nachweisen. Sie führten dies auf eine Gemfibrozil-induzierte Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP) zurück. Ihre Theorie stützten Zhou et. al.<sup>50</sup> darauf, dass die entkoppelnde Wirkung von Gemfibrozil durch den mPTP-Blocker Cyclosporin A aufgehoben werden konnte. In den Untersuchungen zu dieser Dissertation konnte kein signifikant entkoppelnder Effekt durch 100  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil nachgewiesen werden. Dass Zhou et. al.<sup>50</sup> dagegen bereits bei 75  $\mu\text{M}$  eine signifikante Wirkung beobachten konnten, könnte an der Verwendung von isolierten Lebermitochondrien liegen, während in der vorliegenden Arbeit Homogenate aus Lebergewebe verwendet wurden.

Zu diesen Beobachtungen passt auch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Effizienzminderung der Glutamat-Malat-induzierten OXPHOS (ADP/O-Ratio $\downarrow$ ) durch 300  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil. Durch vermehrte Entkoppelung der Atmungskette von der ATP-Synthase kommt es zu starkem Sauerstoffverbrauch bei gleichzeitig leicht verlangsamer Umwandlung von ADP zu ATP. Dies konnten Zhou et. al.<sup>50</sup> ebenfalls bereits 1998 an isolierten Lebermitochondrien der Ratte beobachten. Nach Zugabe von 75  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil kam es zu einer signifikanten Abnahme der ADP/O-Ratio.

Nach Zugabe von 1000  $\mu\text{M}$  kam es in der vorliegenden Arbeit zu einem nicht signifikanten Anstieg der ADP/O-Ratio. Diese scheinbare Effizienzsteigerung ist darauf zurück zu führen, dass der Sauerstoffverbrauch ( $\Delta\text{O}$ ) durch 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil massiv eingebrochen ist. Durch ergänzende Messungen, mit Zugabe von CCCP nach dreiminütiger Gemfibrozil-Inkubation, konnte gezeigt werden, dass die Lebermitochondrien nach 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil nahezu funktionslos waren und somit keinen Sauerstoff verbrauchen konnten. Es liegt in dem Fall keine echte Effizienzsteigerung vor.

Für Pravastatin konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine beeinträchtigende Wirkung auf die mitochondriale Funktion in der Leber nachgewiesen werden. Die State 3 Respiration wurde sowohl bei Glutamat-Malat-, als auch bei Succinat-stimulierten Mitochondrien durch 300 und 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin signifikant gehemmt. Der Abfall der State 3 Respiration war dabei dosisabhängig. Kontrovers dazu findet sich bisher nur eine einzige Studie von Marques et. al.<sup>68</sup> aus dem Jahre 2018. In dieser Studie untersuchten Marques et. al unter anderem die Auswirkung von 40 mg Pravastatin/kg KG/d *per os* über einen Zeitraum von drei Monaten auf die mitochondriale Funktion in LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen. Dabei konnten sie keine Veränderungen der State 3 Respiration zwischen den Mäusen aus der Kontrollgruppe und den Pravastatin-behandelten Tieren beobachten. Dieser Unterschied könnte durch die *in vivo* Bedingungen des Versuchs, im Gegensatz zu den hier vorliegenden *in vitro* Bedingungen, erklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Zugabe von 300 und 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin ein Abfall des RCI beobachtet werden. Dieser Abfall kann jedoch am ehesten durch eine Abnahme der State 3 Respiration, bei gleichzeitig unveränderter oder nur geringfügig verminderter State 2 Respiration (s. Anhang S. VIII), erklärt werden. Gegen eine Entkoppelung spricht zudem eine unveränderte oder leicht verminderte State 4 Respiration (s. Anhang S. VIII) und ein nahezu unveränderter Sauerstoffverbrauch (s. Anhang S. VIII). Im Rahmen einer Entkoppelung müssten die State 4 Respiration und der Sauerstoffverbrauch stark ansteigen.

Übereinstimmend damit sind die Ergebnisse von Mullen et. al.<sup>42</sup> aus dem Jahre 2011, welche ebenfalls keine Auswirkungen von 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin auf das mitochondriale Membranpotenzial und den Sauerstoffverbrauch aus humanen HepG2-Zellen zeigten.

Velho et. al.<sup>69</sup> untersuchten aber im Jahre 2005 an Lebermitochondrien der Ratte, wie sich Statine auf die Öffnung des mPTP auswirken. Sie fanden heraus, dass Statine eine Öffnung induzieren können. 40  $\mu\text{M}$  Pravastatin hatten dabei eine schwächere Wirkung als hydrophobe Statine wie Simvastatin (40  $\mu\text{M}$ ) und Lovastatin (40  $\mu\text{M}$ ). Demnach müsste auch Pravastatin über Öffnung der mPTP zu einer Entkoppelung und somit zu einer Hemmung der ATP-Synthese führen.

Geht man davon aus, dass Statine tatsächlich zu einer mPTP-Öffnung führen, so könnte die fehlende Entkoppelung durch unterschiedliche Inkubations- und damit Einwirkzeiten erklärt werden. Eventuell führen erst längere Inkubationszeiten zu einer mPTP-Öffnung und Entkoppelung. Velho et al.<sup>69</sup> machten dazu keine Angaben.

Im Gegensatz zu Gemfibrozil konnte nach dreiminütiger Inkubation mit Pravastatin keine signifikante Veränderung der Effizienz der OXPHOS gemessen werden. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass auch der Sauerstoffverbrauch nahezu unverändert blieb. Zu diesem Ergebnis gibt es ebenfalls keine direkt vergleichbaren Daten in der Literatur. Satoh et. al.<sup>70</sup> untersuchten im Jahre 1995 die Wirkung von Pravastatin auf die mitochondriale Funktion in ischämischen Hundeherzen. Dabei konnten sie keine signifikante Veränderung der ADP/O-Ratio beobachten. Allerdings beobachteten Satoh et. al.<sup>70</sup> in diesem Versuchsmodell auch keine entkoppelnde Wirkung von Pravastatin.

Zusammenfassend kann die Wirkung von Gemfibrozil und Pravastatin auf die mitochondriale Funktion in der Leber als hemmend bewertet werden. Welche Effekte diese Medikamente an Mitochondrien aus septischen Tieren entfalten, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Ob dabei positive Effekte auf das Outcome einer Sepsis erzielt werden können, muss durch weitere Untersuchungen an septischen Tieren geklärt werden.

Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Auswirkung von Gemfibrozil und Pravastatin auf die mitochondriale Funktion im Colon.

Gemfibrozil bewirkte in der vorliegenden Arbeit eine Verminderung der State 3 Respiration. Die Wirkung war bei Glutamat-Malat-stimulierten Mitochondrien für 100 und 1000  $\mu\text{M}$  signifikant, bei 300  $\mu\text{M}$  zeigte sich lediglich eine inhibitorische Tendenz. Succinat-stimulierte Mitochondrien zeigten nur nach Zugabe von 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil eine verminderte State 3 Respiration. Weder bei Glutamat-Malat-, noch bei Succinat-stimulierten Mitochondrien kam es zu einer Entkoppelung der Atmungskette von der ATP-Synthese. Auch ein Anstieg der State 4 Respiration, als weiterer Indikator für eine Entkoppelung, blieb aus. Die State 4 Respiration sank sogar signifikant und dosisabhängig bei Glutamat-Malat-stimulierten Mitochondrien (s. Anhang S. VIII). Succinat-stimulierte Mitochondrien zeigten eine signifikant verminderte State 4 Respiration nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil, paradoxerweise jedoch nicht bei 300 und 1000  $\mu\text{M}$ . Eine Abnahme der State 4 Respiration nach Gemfibrozilgabe könnte auf eine Stabilisierung des Membranpotenzials hinweisen. Das Membranpotenzial könnte in diesem Fall mit einer geringeren Atmungskettenaktivität aufrechterhalten werden.

Im Gegensatz zur Leber kann die Hemmung der State 3 Respiration somit nicht durch eine Entkoppelung erklärt werden. Gemfibrozil scheint eine direkte Auswirkung auf mitochondriale Enzymkomplexe oder andere Strukturen zu haben. Um dies weiter zu evaluieren sind molekularbiologische Studien notwendig.

Die ADP/O-Ratio, als Marker für die Effizienz der mitochondrialen Respiration, wurde in Glutamat-Malat-stimulierten Mitochondrien durch 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil signifikant erhöht. Dies wird bedingt durch einen verminderten Sauerstoffverbrauch, bei gleichbleibendem ADP-Umsatz.

Insgesamt führt Gemfibrozil im Colon zwar zu einem verlangsamten Sauerstoffverbrauch nach ADP-Stimulation, verbessert dabei aber teilweise die Effizienz der OXPHOS und scheint das mitochondriale Membranpotenzial zu stabilisieren. Im Vergleich zur Wirkung auf Lebermitochondrien, scheint Gemfibrozil im Colon eher Mitochondrien-protektiv zu agieren.

Es gibt bisher keine vergleichbaren Daten, die eine direkt Mitochondrien-protective Wirkung von Fibraten bestätigen. Dumont et. al<sup>52</sup> konnten aber nach Bezafibrat-Applikation eine verminderte Menge an iNOS und deren mRNA nachweisen. Denkbar wäre somit eine indirekte Verbesserung der mitochondrialen Funktion durch verminderte NO $\cdot$ -Synthese. Johri et. al<sup>71</sup> konnten an einem Chorea Huntington Mausmodell (R 6/2 Mäuse) beobachten, dass eine dreimonatige Diät mit 0,5% Bezafibrat zu einer vermehrten Expression von Cytochrom C und

ATP-Synthasen in Hirn- und Muskelzellen führt. Durch Bastin et. al<sup>72</sup> konnte nachgewiesen werden, dass eine dreitägige Inkubation mit 200 und 400  $\mu\text{M}$  Bezafibrat *in vitro*, die Aktivität der Atmungskettenkomplexe I, III und IV in humanen Fibroblasten und Myoblasten steigert. Außerdem beobachteten sie einen Anstieg der Respirationsraten und eine Mengenzunahme der mRNA für Atmungskettenkomplexe.

Da die Kontaktzeit zwischen Mitochondrien und Gemfibrozil in der vorliegenden Arbeit nur drei Minuten betrug, ist nicht davon auszugehen, dass Gemfibrozil die mitochondriale Funktion durch Beeinflussung der Genexpression verbessert hat. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die direkte Wirkung von Gemfibrozil auf die Mitochondrien des Colons zu verstehen.

Auch Pravastatin bewirkt im Colon eine Hemmung der State 3 Respiration.

Die Abnahme war nach Glutamat-Malat-Stimulation für 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin signifikant. In Succinat-stimulierten Mitochondrien stellte sich bereits bei 300  $\mu\text{M}$  eine signifikante Abnahme der State 3 Respiration dar. Dieser Unterschied könnte ein Hinweis darauf sein, dass Pravastatin eher die Succinatdehydrogenase, als die NADH-Dehydrogenase beeinflusst. Genauere Untersuchungen gibt es dazu bisher nicht.

Eine entkoppelnde Wirkung von Pravastatin konnte bei den Colon-Homogenaten nicht beobachtet werden. Nach 1000  $\mu\text{M}$  kam es zwar bei Succinat-Stimulation zu einem signifikanten Abfall des RCI, dieser lässt sich aber durch eine Abnahme der State 3 Respiration, bei nahezu gleichbleibender State 2 Respiration (s. Anhang S. IX) erklären. Gegen eine Entkoppelung der Atmungskette spricht zudem eine Abnahme der State 4 Respiration nach 300 und 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin (s. Anhang S. IX). Dies kann als Hinweis auf eine Stabilisierung des Membranpotenzials gewertet werden.

Für 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin wurde sowohl nach Glutamat-Malat-Stimulation, als auch nach Succinat-Stimulation eine signifikante Zunahme der ADP/O-Ratio beobachtet. Dieser Effekt scheint im Falle der Succinat-Stimulation dosisabhängig zu sein, war aber nur bei 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin signifikant. ATP wird mit geringerem Sauerstoffverbrauch hergestellt. Dies könnte eventuell bei einer Gewebhypoxie, zum Beispiel im Rahmen einer Sepsis, die zelluläre Energiebereitstellung sichern.

Zusammenfassend kann gemutmaßt werden, dass Pravastatin eher einen positiven Effekt auf die mitochondriale Funktion im Colon hat.

## 5.2 Methodenkritik

Es handelte sich um *in vitro*-Versuche bei gesunden Ratten. Dadurch kann nicht mit hundertprozentiger Sicherheit, auf die *in vivo*-Wirkung geschlossen werden. Wie die Wirkung beim septischen Tier ist, kann durch diese Arbeit ebenfalls nicht beantwortet werden. Die Sepsis könnte das Zusammenspiel von Medikamenten und Mitochondrien vollständig verändern. Stolf et. al<sup>73</sup> konnten beispielsweise in einer *in vivo* Studie an septischen Ratten beobachten, dass eine 30-tägige Verabreichung von Simvastatin oder Atorvastatin, vor Sepsis-Induktion, zu einer Verbesserung der mitochondrialen Funktion in der Leber führt.

Es sind lediglich theoretische Überlegungen über einen eventuellen Nutzen im Rahmen der Sepsis-Therapie möglich. Eine *in vivo* Studie zur Wirkung von Pravastatin bei septischen Ratten ist bereits in Arbeit. Außerdem ist eine *in vivo* Studie mit Gemfibrozil geplant.

Da nur Ratten untersucht wurden, können auch keine Aussagen über die Wirkung bei anderen Lebewesen (Problem der Interspezies) gemacht werden. Sollten die Ergebnisse der *in vivo* Studie ebenfalls vielversprechend sein, so müssten erst nähere Untersuchungen über die Wirkung im menschlichen Organismus erfolgen, bevor klinisch-pharmakologische Studien initiiert werden könnten, um einen eventuellen Nutzen in der humanen Sepsis-Therapie zu untersuchen.

## 5.3 Fazit

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Cholesterinsenker Gemfibrozil und Pravastatin die mitochondriale Funktion in Colon und Leber beeinflussen. Beide Medikamente scheinen im Colon eher Mitochondrien-protektiv, in der Leber eher Mitochondrien-toxisch zu wirken. In Folgeuntersuchungen muss nun gezeigt werden, ob diese Wirkung auch im septischen Tiermodell vorliegt und ob daraus positive Effekte auf das Outcome einer Sepsis entstehen.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016;315:801.
2. Flynn A, Chokkalingam Mani B, Mather PJ. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail Rev*. 2010;15:605–611.
3. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101:3765–3777.
4. Fink MP. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit Care*. 2002;6:491–499.
5. Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, Ang D, Bihorac A, McKinley BA, Moldawer LL, Moore FA. Persistent inflammation and immunosuppression: A common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;72:1491–1501.
6. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus. *Dtsch Arztebl Int*. 2016;113:159–166.
7. Sepsis-Stiftung. Sepsis\_inDeutschland.pdf. [http://www.sepsis-stiftung.eu/wp-content/uploads/1/2016/10/Sepsis\\_inDeutschland.pdf](http://www.sepsis-stiftung.eu/wp-content/uploads/1/2016/10/Sepsis_inDeutschland.pdf). Available at [http://www.sepsis-stiftung.eu/wp-content/uploads/1/2016/10/Sepsis\\_inDeutschland.pdf](http://www.sepsis-stiftung.eu/wp-content/uploads/1/2016/10/Sepsis_inDeutschland.pdf).
8. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *Jama*. 2010;304:1787–1794.
9. Hagel S, Brunkhorst F. Sepsis. *Intensivmed Notfallmedizin*. 2011;48:57–73.
10. Angus DC, Pires Pereira CA, Silva E. Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocr Metab Immune Disord-Drug Targets Former Curr Drug Targets-Immune Endocr Metab Disord*. 2006;6:207–212.
11. Rhee C, Gohil S, Klompas M. Regulatory mandates for sepsis care—reasons for caution. *N Engl J Med*. 2014;370:1673–1676.
12. Grip J, Jakobsson T, Tardif N, Rooyackers O. The effect of plasma from septic ICU patients on healthy rat muscle mitochondria. *Intensive Care Med Exp*. 2016;4. doi:10.1186/s40635-016-0093-2.
13. Balestra GM, Legrand M, Ince C. Microcirculation and mitochondria in sepsis: getting out of breath: *Curr Opin Anaesthesiol*. 2009;22:184–190.
14. Jeger V, Djafarzadeh S, Jakob SM, Takala J. Mitochondrial function in sepsis. *Eur J Clin Invest*. 2013;43:532–542.
15. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005;9:S13.

16. Boekstegers P, Pilz G, Werdan K, others. Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: comparison to limited infection and cardiogenic shock. *Infection*. 1991;19:317–323.
17. Sair M, Etherington PJ, Winlove CP, Evans TW. Tissue oxygenation and perfusion in patients with systemic sepsis. *Crit Care Med*. 2001;29:1343–1349.
18. Takeyama N, Itoh Y, Kitazawa Y, Tanaka T. Altered hepatic mitochondrial fatty acid oxidation and ketogenesis in endotoxic rats. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1990;259:E498–E505.
19. Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA. Oxidative Metabolism in Rat Hepatocytes and Mitochondria during Sepsis. 1997;ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS:278–288,.
20. Brealey D. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286:491R – 497.
21. Larche J, Lancel S, Hassoun SM, Favory R, Decoster B, Marchetti P, Chopin C, Neviere R. Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition Prevents Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction and Mortality. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:377–385.
22. Nin N, Cassina A, Boggia J, Alfonso E, Botti H, Peluffo G, Trostchansky A, Batthyany C, Radi R, Rubbo H, Hurtado FJ. Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care Med*. 2004;30:2271–2278.
23. Llesuy S, Evelson P, González-Flecha B, Peralta J, Carreras MC, Poderoso JJ, Boveris A. Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Radic Biol Med*. 1994;16:445–451.
24. Corrêa TD, Vuda M, Blaser AR, Takala J, Djafarzadeh S, Dünser MW, Silva E, Lensch M, Wilkens L, Jakob SM. Effect of treatment delay on disease severity and need for resuscitation in porcine fecal peritonitis: *Crit Care Med*. 2012;40:2841–2849.
25. Rgueira T, Djafarzadeh S, Brandt S, Gorrasi J, Borotto E, Porta F, Takala J, Bracht H, Shaw S, Lepper PM, Jakob SM. Oxygen transport and mitochondrial function in porcine septic shock, cardiogenic shock, and hypoxaemia: Comparison of septic, cardiogenic, and hypoxic shock. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012;56:846–859.
26. Japiassú AM, Santiago APSA, d'Avila J da CP, Garcia-Souza LF, Galina A, Castro Faria-Neto HC, Bozza FA, Oliveira MF. Bioenergetic failure of human peripheral blood monocytes in patients with septic shock is mediated by reduced F1Fo adenosine-5'-triphosphate synthase activity\*: *Crit Care Med*. 2011;39:1056–1063.
27. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet*. 2002;360:219–223.
28. Fredriksson K, Tjäder I, Keller P, Petrovic N, Ahlman B, Schéele C, Wernerman J, Timmons JA, Rooyackers O. Dysregulation of Mitochondrial Dynamics and the Muscle Transcriptome in ICU Patients Suffering from Sepsis Induced Multiple Organ Failure. *PLoS ONE*. 2008;3:e3686.
29. Fredriksson K, Hammarqvist F, Strigard K, Hultenby K, Ljungqvist O, Wernerman J, Rooyackers O. Derangements in mitochondrial metabolism in intercostal and leg muscle of critically ill patients with sepsis-induced multiple organ failure. *AJP Endocrinol Metab*. 2006;291:E1044–E1050.
30. Zeng X-M, Liu D-H, Han Y, Huang Z-Q, Zhang J-W, Huang Q. Assessment of inflammatory markers and mitochondrial factors in a rat model of sepsis-induced myocardial dysfunction. ;:11.

31. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *The Lancet*. 2004;364:545–548.
32. Herminghaus A, Papenbrock H, Eberhardt R, Vollmer C, Truse R, Schulz J, Bauer I, Weidinger A, Kozlov AV, Stiban J, Picker O. Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Med Exp*. 2019;7:4.
33. Tappy L, Chioléro R. Substrate utilization in sepsis and multiple organ failure: *Crit Care Med*. 2007;35:S531–S534.
34. Merx MW. HMG-CoA Reductase Inhibitor Simvastatin Profoundly Improves Survival in a Murine Model of Sepsis. *Circulation*. 2004;109:2560–2565.
35. Daniel G Hackam, Muhammad Mamdani, Ping Li, Donald A Redelmeier. Statins and sepsis in patients with cardiovascular disease: a population-based cohort analysis. *Lancet*. 2006;367:413–18.
36. Almog Y. Prior Statin Therapy Is Associated With a Decreased Rate of Severe Sepsis. *Circulation*. 2004;110:880–885.
37. Dobesh PP, Klepser DG, McGuire TR, Morgan CW, Olsen KM. Reduction in mortality associated with statin therapy in patients with severe sepsis. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther*. 2009;29:621–630.
38. Morel J, Hargreaves I, Brealey D, Neergheen V, Backman JT, Lindig S, Bläss M, Bauer M, McAuley DF, Singer M. Simvastatin pre-treatment improves survival and mitochondrial function in a 3-day fluid-resuscitated rat model of sepsis. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2017;131:747–758.
39. Parichhua LI. Sepsis Mortality in Critical Care and Prior Statin Therapy: A Retrospective Cohort Study in Central Argentina. *J Clin Diagn Res*. 2017. doi:10.7860/JCDR/2017/25810.9992.
40. Budd A, Alleva L, Alsharifi M, Koskinen A, Smythe V, Mullbacher A, Wood J, Clark I. Increased Survival after Gemfibrozil Treatment of Severe Mouse Influenza. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:2965–2968.
41. Cámara-Lemarroy CR, Guzman-De La Garza FJ, Cordero-Perez P, Ibarra-Hernandez JM, Munoz-Espinosa LE, Fernandez-Garza NE. Gemfibrozil attenuates the inflammatory response and protects rats from abdominal sepsis. 2015.
42. Mullen PJ, Zahno A, Lindinger P, Maseneni S, Felser A, Krähenbühl S, Brecht K. Susceptibility to simvastatin-induced toxicity is partly determined by mitochondrial respiration and phosphorylation state of Akt. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2011;1813:2079–2087.
43. Kaufmann P, Török M, Zahno A, Waldhauser KM, Brecht K, Krähenbühl S. Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63:2415–2425.
44. Godoy JC, Niesman IR, Busija AR, Kassan A, Schilling JM, Schwarz A, Alvarez EA, Dalton ND, Drummond JC, Roth DM, Kararigas G, Patel HH, Zemljic-Harpe AE. Atorvastatin, but not pravastatin, inhibits cardiac Akt/mTOR signaling and disturbs mitochondrial ultrastructure in cardiac myocytes. *FASEB J*. 2019;33:1209–1225.
45. Bouitbir J, Charles A-L, Echaniz-Laguna A, Kindo M, Daussin F, Auwerx J, Piquard F, Geny B, Zoll J. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a ‘mitohormesis’ mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur Heart J*. 2012;33:1397–1407.

46. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metab.* 2007;6:280–293.
47. Sano M, Fukuda K. Activation of Mitochondrial Biogenesis by Hormesis. *Circ Res.* 2008;103:1191–1193.
48. Gems D, Partridge L. Stress-Response Hormesis and Aging: “That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger.” *Cell Metab.* 2008;7:200–203.
49. Brunmair B. Fenofibrate Impairs Rat Mitochondrial Function by Inhibition of Respiratory Complex I. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311:109–114.
50. Zhou S, Wallace KB. The effect of peroxisome proliferators on mitochondrial bioenergetics.pdf. 1999.
51. Zungu M, Young ME, Stanley WC, Essop MF. Chronic treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonist Wy-14,643 attenuates myocardial respiratory capacity and contractile function. *Mol Cell Biochem.* 2009;330:55–62.
52. Dumont M, Stack C, Elipenahli C, Jainuddin S, Gerges M, Starkova N, Calingasan NY, Yang L, Tampellini D, Starkov AA, Chan RB, Di Paolo G, Pujol A, Beal MF. Bezafibrate administration improves behavioral deficits and tau pathology in P301S mice. *Hum Mol Genet.* 2012;21:5091–5105.
53. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys.* 1996;328:85–92.
54. Borutaitė V, Brown GC. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem J.* 1996;315:295–299.
55. Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1994;308:89–95.
56. Borutaite V, Budriunaite A, Brown GC. Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 2000;1459:405–412.
57. Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness: *Curr Opin Crit Care.* 2003;9:143–151.
58. Fredenburgh LE, Suárez Velandia MM, Ma J, Olszak T, Cernadas M, Englert JA, Chung SW, Liu X, Begay C, Padera RF, Blumberg RS, Walsh SR, Baron RM, Perrella MA. Cyclooxygenase-2 Deficiency Leads to Intestinal Barrier Dysfunction and Increased Mortality during Polymicrobial Sepsis. *J Immunol.* 2011;187:5255–5267.
59. Klingensmith NJ, Coopersmith CM. The Gut as the Motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness. *Crit Care Clin.* 2016;32:203–212.
60. Haak BW, Wiersinga WJ. The role of the gut microbiota in sepsis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2:135–143.
61. Nagpal R, Yadav H. Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview. *Ann Nutr Metab.* 2017;71:11–16.

62. Balzan S, De Almeida Quadros C, De Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22:464–471.
63. Nazli A, Yang P-C, Jury J, Howe K, Watson JL, Söderholm JD, Sherman PM, Perdue MH, McKay DM. Epithelia Under Metabolic Stress Perceive Commensal Bacteria as a Threat. *Am J Pathol*. 2004;164:947–957.
64. Saxena A, Lopes F, McKay DM. Reduced intestinal epithelial mitochondrial function enhances in vitro interleukin-8 production in response to commensal *Escherichia coli*. *Inflamm Res*. 2018;67:829–837.
65. Supinski GS, Schroder EA, Callahan LA. Mitochondria and Critical Illness. *Chest*. 2020;157:310–322.
66. Selvaraj V, Nepal N, Rogers S, Manne NDPK, Arvapalli R, Rice KM, Asano S, Fankhanel E, Ma JJ, Shokuhfar T, Maheshwari M, Blough ER. Inhibition of MAP kinase/NF- $\kappa$ B mediated signaling and attenuation of lipopolysaccharide induced severe sepsis by cerium oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2015;59:160–171.
67. Nadanaciva S, Dykens JA, Bernal A, Capaldi RA, Will Y. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;223:277–287.
68. Marques AC, Busanello ENB, de Oliveira DN, Catharino RR, Oliveira HCF, Vercesi AE. Coenzyme Q10 or Creatine Counteract Pravastatin-Induced Liver Redox Changes in Hypercholesterolemic Mice. *Front Pharmacol*. 2018;9. doi:10.3389/fphar.2018.00685.
69. Velho JA, Okanobo H, Degasperi GR, Matsumoto MY, Alberici LC, Cosso RG, Oliveira HCF, Vercesi AE. Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition. *Toxicology*. 2006;219:124–132.
70. Satoh K, Yamato A, Nakai T, Hoshi K, Ichihara K. Effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors on mitochondrial respiration in ischaemic dog hearts. *Br J Pharmacol*. 1995;116:1894–1898.
71. Johri A, Calingasan NY, Hennessey TM, Sharma A, Yang L, Wille E, Chandra A, Beal MF. Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington’s disease. *Hum Mol Genet*. 2012;21:1124–1137.
72. Bastin J, Aubey F, Rötig A, Munnich A, Djouadi F. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Pathway Stimulates the Mitochondrial Respiratory Chain and Can Correct Deficiencies in Patients’ Cells Lacking Its Components. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:1433–1441.
73. Stolf AM, Lívero F dos R, Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Fabosi IA, Alves de Souza CE, Gomes L de O, Chicorski R, Brandt AP, Cadena SMS, Telles JEQ, Hauser AB, Elferink RO, Zampronio AR, Acco A. Effects of statins on liver cell function and inflammation in septic rats. *J Surg Res*. 2012;178:888–897.

## 6.2 Material und Geräte des laborexperimentellen Teils

<b>96-Well-Platte</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
<b>ADP</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse – Haltung</b>	Ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
<b>Analyseprogramm zur Respirometrie</b>	Strathkelvin 782 System Version 4.4 HID, Strathkelvin Instruments, Motherwell, Großbritannien
<b>Bovines Serum Albumin</b>	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
<b>cCOMPLETE</b>	Roche Diagnostics GmbH, Heiligenhaus, Deutschland
<b>Cytochrom C</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Dimethylsulfoxid</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>ED Wasserbad</b>	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
<b>Folin &amp; Ciocalteu's phenol reagent</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Gemfibrozil</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Glaszylinder (60 ml)</b>	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
<b>Glutamat</b>	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
<b>Heparin-Natrium</b>	25.000 I.E./ 5 ml; Rotexmedica GmbH, Trittau, Deutschland
<b>Isolationspuffer</b>	200mM Mannitol, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; 50 mM Sucrose, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; 5 mM MOPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; 0,1% BSA essentially fatty acid free, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; 1 mM EGTA, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Isolationspuffer, mit erhöhtem BSA-Gehalt</b>	20 mg/ml BSA essentially fatty acid free, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

<b>Kaliumnatrium-Tartrat-Tetrahydrat</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kupfersulfatpentahydrat</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Malat</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Microplate-Reader</b>	Synergy 2 Plate Reader, Gen5.1.11 Data Analysis Software, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA
<b>MT200-Respirometer</b>	Strathkelvin Instruments, Motherwell, Großbritannien
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>NaOH</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Oligomycin</b>	Calbiochem by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Oximeter</b>	Oxygen Meter Model 782; Strathkelvin Instruments, Motherwell, Großbritannien
<b>Pentobarbital</b>	Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
<b>Pravastatin</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Respirationspuffer</b>	130 mM KCl, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz; 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; 20 mM MOPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; 2,5 mM EGTA, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland; 1 μM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA; 0,1% BSA essentially fatty acid free, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

<b>Rotenon</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Sodiumsulfidlösung</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Succinat</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Teflonkolben</b>	IKA Eurostar 20 digital Homogenisator, IKA GmbH + Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
<b>Trypsin-EDTA</b>	Gibco®, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

## 6.3 Hilfsdaten

	300 $\mu\text{M}$		1000 $\mu\text{M}$	
	GM	S	GM	S
<b>State 2</b>				
Kontrolle [nmol/min/mg]	1,05 ( $\pm 0,12$ )	2,04 ( $\pm 0,19$ )	1,12 ( $\pm 0,15$ )	2,01 ( $\pm 0,30$ )
Pravastatin [nmol/min/mg]	1,08 ( $\pm 0,10$ )	2,11 ( $\pm 0,31$ )	1,01 ( $\pm 0,12$ )	2,01 ( $\pm 0,33$ )
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	103,33 ( $\pm 6,89$ )	103,25 ( $\pm 10,18$ )	91,04 ( $\pm 6,47$ )	100,04 ( $\pm 5,38$ )
<b>State 4</b>				
Kontrolle [nmol/min/mg]	2,98 ( $\pm 0,18$ )	4,82 ( $\pm 0,59$ )	2,81 ( $\pm 0,18$ )	4,69 ( $\pm 0,50$ )
Pravastatin [nmol/min/mg]	2,70 ( $\pm 0,20$ )	4,86 ( $\pm 0,60$ )	2,64 ( $\pm 0,25$ )	5,06 ( $\pm 0,30$ )
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	90,74 ( $\pm 5,79$ )*	101,89 ( $\pm 16,14$ )	93,84 ( $\pm 6,61$ )	108,91 ( $\pm 13,41$ )
<b><math>\Delta\text{O}</math></b>				
Kontrolle [nmol/min/mg]	19,46 ( $\pm 3,59$ )	34,00 ( $\pm 5,32$ )	19,83 ( $\pm 1,20$ )	36,73 ( $\pm 5,09$ )
Pravastatin [nmol/min/mg]	21,22 ( $\pm 3,99$ )	34,59 ( $\pm 3,07$ )	23,16 ( $\pm 2,66$ )	40,26 ( $\pm 4,27$ )
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	109,38 ( $\pm 12,24$ )	102,54 ( $\pm 6,14$ )	117,06 ( $\pm 14,00$ )	111,15 ( $\pm 17,78$ )

**Pravastatinwirkung auf Lebermitochondrien der Ratte**

*In vitro* Effekte von 300  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin auf die mitochondriale Funktion in Leberhomogenaten von gesunden Wistar-Ratten. Alle Werte sind Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von jeweils 8 Leberhomogenaten, vor Pravastatingabe, nach dreiminütiger Inkubation mit Pravastatin bei Raumtemperatur und im prozentualen Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 7-8$

	1000 $\mu\text{M}$	
	GM	S
<b>State 4</b>		
Kontrolle [nmol/min/mg]	1,22 ( $\pm 0,32$ )	1,55 ( $\pm 0,46$ )
Gemfibrozil [nmol/min/mg]	0,96 ( $\pm 0,27$ )	1,39 ( $\pm 0,50$ )
Gemfibrozil vs. Kontrolle [%]	79,19 ( $\pm 13,00$ )*	89,14 ( $\pm 15,86$ )

**Gemfibrozilwirkung auf die State 4 Respiration in Colonmitochondrien der Ratte**

*In vitro* Effek von 1000  $\mu\text{M}$  Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion in Leberhomogenaten von gesunden Wistar-Ratten. Alle Werte sind Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von jeweils 8 Colonhomogenaten, vor Gemfibrozilgabe, nach dreiminütiger Inkubation mit Gemfibrozil bei Raumtemperatur und im prozentualen Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 8$

	1000 $\mu\text{M}$	
	GM	S
<b>State 2</b>		
Kontrolle [nmol/min/mg]	0,43 ( $\pm 0,12$ )	0,48 ( $\pm 0,09$ )
Pravastatin [nmol/min/mg]	0,32 ( $\pm 0,06$ )	0,44 ( $\pm 0,06$ )
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	79,23 ( $\pm 20,74$ )	94,21 ( $\pm 10,85$ )

**Pravastatinwirkung auf die State 2 Respiration in Colonmitochondrien der Ratte**

*In vitro* Effekt von 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin auf die State 2 Respiration in Colonomogenaten von gesunden Wistar-Ratten. Alle Werte sind Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von jeweils 8 Colonomogenaten, vor Pravastatingabe, nach dreiminütiger Inkubation mit Pravastatin bei Raumtemperatur und im prozentualen Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen.

\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 7-8$

	300 $\mu\text{M}$		1000 $\mu\text{M}$	
	GM	S	GM	S
<b>State 4</b>				
Kontrolle [nmol/min/mg]	1,07 ( $\pm 0,21$ )	1,48 ( $\pm 0,33$ )	1,12 ( $\pm 0,34$ )	1,36 ( $\pm 0,30$ )
Pravastatin [nmol/min/mg]	0,88 ( $\pm 0,24$ )	1,35 ( $\pm 0,33$ )	0,69 ( $\pm 0,18$ )	1,05 ( $\pm 0,21$ )
Pravastatin vs. Kontrolle [%]	81,61 ( $\pm 9,91$ )*	91,04 ( $\pm 9,57$ )*	67,08 ( $\pm 24,52$ )	77,90 ( $\pm 8,76$ )*

**Pravastatinwirkung auf die State 4 Respiration in Colonmitochondrien der Ratte**

*In vitro* Effekte von 300  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  Pravastatin auf die State 4 Respiration in Colonomogenaten von gesunden Wistar-Ratten. Alle Werte sind Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) von jeweils 8 Colonomogenaten, vor Pravastatingabe, nach dreiminütiger Inkubation mit Pravastatin bei Raumtemperatur und im prozentualen Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle,  $n = 7-8$

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Olaf Picker für das Angebot und das Vertrauen bedanken, diese Dissertation unter seiner Betreuung und seinem Namen zu erarbeiten.

Den sicherlich größten Dank hat meine wissenschaftliche Betreuerin Frau Dr. Anna Herminghaus verdient, die durch ihr großes Engagement und ihre Geduld die Vollendung dieser Arbeit erst möglich gemacht hat.

Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. Inge Bauer für jegliche Unterstützung, egal ob in Wort oder Tat.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen aber auch die guten MTA-Seelen der experimentellen Anästhesiologie Frau Claudia Dohle und Frau Birgitt Berke, denen ich für die unermüdliche praktische, theoretische und nicht zu guter Letzt seelische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche zu dieser Arbeit sehr dankbar bin.

Außerdem möchte ich mich bei den zahlreichen Mit-Doktoranden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ragnar Huhn-Wientgen für die Bereitstellung und Operation der Tiere bedanken.

Zu guter Letzt gilt natürlich ein ganz besonderer Dank all meinen Freunden und meiner Familie für die stetige Unterstützung, den guten Zuspruch und die Motivation immer weiterzumachen, auch wenn es einmal schwierig ist. Danke, dass Ihr immer zu mir haltet und mich in all meinen Macken und Maroden unterstützt.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass diese Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 08.06.2020

*E. Laser*

Eric Laser