

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

**Der Einfluss von Pravastatin auf die
mitochondriale Funktion in der Leber im
septischen Rattenmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Theresa Tenge

2021

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: Prof. Dr. med. Günter Niegisch

Für meine Eltern.

Zusammenfassung

Die Therapie der Sepsis stellt im klinischen Alltag aufgrund der hohen Mortalität und der Schwere ihres Verlaufes eine besondere Herausforderung dar. In klinischen Studien konnte beobachtet werden, dass Patienten/-innen, die HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (HRH) einnahmen, weniger häufig eine schwere Sepsis entwickelten und so seltener intensivpflichtig wurden. Auch in zahlreichen tierexperimentellen Studien konnte der positive Einfluss von HRH auf die Mortalität und die inflammatorische Reaktion gezeigt werden. Als Ursache für die Entwicklung eines septischen Multiorganversagens werden mikrozirkulatorische Störungen sowie eine mitochondriale Dysfunktion betrachtet. Es ist allerdings weiterhin unklar, ob HRH die mitochondriale Funktion (MF) während einer Sepsis beeinflussen. Auch molekulare Mechanismen einer Wirkung der HRH auf die MF sind nicht vollständig geklärt. Ein möglicher Wirkmechanismus könnte in der Modulation des intrazellulären Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptors- α (PPAR α) liegen. Aufgrund der besonders schwierigen Therapierbarkeit einer Sepsis-induzierten Leberinsuffizienz ist die Betrachtung der hepatischen MF besonders interessant. Eine Verbesserung der MF hepatischer Zellen könnte prognostisch günstig sein. Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob die Gabe des HRH Pravastatin in vivo die MF hepatischer Zellen unter nicht-septischen und septischen Bedingungen im Rattenmodell beeinflusst und ob dieser mögliche Effekt über den PPAR α vermittelt wird. Die Versuche wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (Az.: 84-02.04.2016.A398) durchgeführt. Insgesamt wurden 77 männliche Wistar-Ratten randomisiert in septische (n=37) und nicht-septische (n=40) Gruppen eingeteilt. Die abdominale Sepsis wurde mittels einer Colon ascendens stent peritonitis (CASP)-Operation induziert. Die nicht-septische Gruppe (Sham) wurde ebenfalls operiert, wobei der Stent hier das Colon nicht penetrierte und es somit nicht zur Sepsis kam. Innerhalb der Gruppen wurde die Wirkung auf die MF in Abhängigkeit von der zuvor applizierten, gewichtsadaptierten Gabe von Pravastatin mit oder ohne PPAR α -Blocker sowie eine Kontrolle mit den Trägersubstanzen untersucht. Es wurde 24 Stunden nach der Operation in einer erneuten Laparotomie das Lebergewebe entnommen und aufbereitet. Respirometrisch wurde im Anschluss sowohl die Sauerstoffkonzentration als auch die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit gemessen. Zur Quantifizierung der MF wurden der Respiratory Control Index (RCI) als Maß für die Kopplung zwischen Atmungskette und Adenosintriphosphat-Synthese und die Adenosindiphosphat/oxygen-ratio (ADP/O-R) errechnet. Die ADP/O-R gilt als Marker der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung, welcher sich aus der zugegebenen ADP Menge und dem verbrauchten Sauerstoff ergibt. Ebenfalls wurde im Lebergewebe die Menge an Malonyldialdehyd (MDA) als Indikator für den oxidativen Stress ermittelt. Die statistische Datenanalyse wurde mittels One-way ANOVA mit Tukey's post-hoc-Test durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ betrachtet. In der Auswertung zeigte die Vorbehandlung mit Pravastatin weder bei CASP- noch bei Sham-Tieren einen Effekt auf die Parameter der MF in der Leber. Auch die Gabe des PPAR α -Blockers hatte keinen signifikanten Einfluss auf die MF. Die hepatische MDA-Konzentration blieb ebenfalls unverändert. In der Studie konnte folglich weder ein signifikanter Effekt von Pravastatin auf die hepatische MF im nicht-septischen und septischen Rattenmodell noch auf den oxidativen Stress gezeigt werden.

Summary

The therapy of sepsis represents a special challenge in everyday clinical routine due to its high mortality rate and the severity of its course. Clinical studies have shown that patients treated with HMG-CoA reductase inhibitors (HRI) were less likely to develop a severe sepsis and therefore required intensive care less frequently. The positive influence of HRI on mortality and inflammatory response has been demonstrated in numerous animal studies. Microcirculatory disorders and mitochondrial dysfunction are considered to be the cause of the development of septic multi-organ failure. However, it remains unclear whether HRI affect mitochondrial function (MF) during sepsis. The molecular mechanisms of an effect of HRI on MF are also not fully understood. A possible mechanism of action might be the modulation of the intracellular peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). Due to the difficult treatability of sepsis-induced liver insufficiency, the consideration of hepatic MF is particularly interesting. An improvement of MF in hepatic cells could be prognostically favourable. The aim of this study is to investigate whether the administration of the HRI pravastatin influences the MF of hepatic cells under non-septic and septic conditions in the *in vivo* rat model and whether this possible effect is mediated via the PPAR α . The experiments were performed with permission of the local Animal Care and Use Committee (Az.: 84-02.04.2016.A398). 77 male Wistar rats were randomly divided into septic (n=37) and non-septic (n=40) groups. Abdominal sepsis was induced by *colon ascending stent peritonitis* (CASP) surgery. The non-septic groups (sham) were also operated, although the stent did not penetrate the colon and sepsis did not occur. Within the groups, the effect on MF was investigated depending on the weight-adapted administration of pravastatin with or without PPAR α blocker and a control. For this purpose, liver tissue was removed and prepared in a second laparotomy 24 hours after the operation. Subsequently, both oxygen concentration and oxygen consumption rate were measured respirometrically. To quantify MF, the Respiratory Control Index (RCI) was then calculated as a marker of coupling between respiratory chain and adenosine triphosphate-synthesis. Also, the adenosine diphosphate oxygen ratio (ADP/O-R) was calculated. ADP/O-R is regarded as a marker of efficiency of oxidative phosphorylation, which results from the amount of ADP added and the oxygen consumed. The amount of malonyldialdehyde (MDA) in liver tissue as an indicator of oxidative stress was also determined. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test and the results were presented as mean \pm standard deviation. P-values < 0.05 were considered statistically significant. In the statistical analysis the pre-treatment with pravastatin showed no effect on the parameters of MF in the liver, neither in CASP nor in sham animals. The administration of the PPAR α blocker had no significant effect on MF. Hepatic MDA concentration remained unchanged. The study did not show a significant effect of pravastatin on hepatic MF during abdominal sepsis or in non-septic animals. An effect on the oxidative stress could also not be shown.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	IL	Interleukin
ΔO	Delta Sauerstoff, Differenz der Sauerstoffmenge	IMR	Intermembranraum
ADP	Adenosindiphosphat	KCl	Kaliumchlorid
ADP/O-R	<i>Adenosindiphosphat-oxygen Ratio</i>	kg	Kilogramm
AF	Atemfrequenz	KG	Körpergewicht
ANOVA	Varianzanalyse	l	Liter
Aqua	Destilliertes Wasser	LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
dest.		LPS	Lipopolysaccharid
ATP	Adenosintriphosphat	M	Molar
Az.	Aktenzeichen	MA	Mitochondriale Aktivität
BGA	Blutgasanalyse	MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
BSA	Bovines Serum Albumin	MD	Mitochondriale Dysfunktion
CASP	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>	MDA	Malonyldialdehyd
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorphenylhydrazon	MF	Mitochondriale Funktion
cm	Zentimeter	mg	Milligramm
CLP	<i>ceecal ligation and puncture</i>	mm	Millimeter
CRP	C-reaktives Protein	min	Minuten
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung	ml	Milliliter
DMSO	Dimethylsulfoxid	nM	Nanomolar
(mt)DNA	(mitochondriale) Desoxyribonukleinsäure	mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
FADH₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid	mmol	Millimol
FiO₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion	MOV	Multiorganversagen
FPP	Farnesylpyrophosphat	mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
g	Gramm	MW	Mittelwert
GCS	<i>Glascow Coma Scale</i>	n	Anzahl
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung	NaCl	Natriumchlorid, Kochsalzlösung
GPP	Geranylpyrophosphat	NADH/H⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
h	Stunde	NASH	nicht-alkoholischen Steatohepatitis
HDL	<i>High density lipoprotein</i>	nm	nanometer
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A	nmol	nanomol
HRH	HMG-CoA-Reduktase-Hemmer	NO	Stickstoffmonoxid
i.p.	Intraperitoneal	(e)NOS	(endotheliale) Stickstoffmonoxid-Synthase
i.v.	Intravenös	O₂	Sauerstoff
		OP	Operation
		OxPhos	Oxidative Phosphorylierung
		p	Irrtumswahrscheinlichkeit
		pA	Pikoamper

PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PPAR	Peroxisom-Proliferator- aktivierten-Rezeptor
RCI	<i>Respiratory Control Index</i>
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
<i>rpm</i>	<i>Rounds per minute</i>
s.c.	Subcutan
SD	Standardabweichung
Sham	Schein, Kontrollgruppe
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
(q)SOFA	<i>(Quick) Sepsis-related Organ Failure Assessment-Score</i>
SR	Succinat und Rotenon
SRSS	<i>Septic Rat Severity Scores</i>
TBA	Thiobarbitursäure
TNF	Tumornekrosefaktor
USA	Verinigte Staaten von Amerika
Vol.	Volumen
µg	Mikrogramm

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Das Krankheitsbild der Sepsis	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Klinische Scores.....	1
1.1.3 Erreger und Pathogenese	2
1.1.4 Epidemiologie und Kosten.....	3
1.1.5 Therapie der Sepsis	4
1.1.6 Bedeutung der Leber in der Sepsis.....	4
1.2 Sepsis und Mitochondrien	5
1.2.1 Mitochondrien.....	5
1.2.2 Mitochondriale Funktion während einer Sepsis.....	6
1.3 Statine und Sepsis	7
1.3.1 Statine.....	7
1.3.2 Klinische Beobachtungen	9
1.3.3 Experimentelle Beobachtungen	9
1.4 Statine und Mitochondrien	10
1.5 Statine und PPARα	11
1.6 Reaktive Sauerstoffspezies	12
1.7 Ziele der Arbeit	13
2 Materialien	14
2.1 Materialien und Geräte des tierexperimentellen Teils	14
2.2 Materialien und Geräte des laborexperimentellen Teils	15
2.3 Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Teils	16
2.4 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Teils	17
3 Methoden	19
3.1 Tierexperimenteller Teil	19
3.1.1 Genehmigung.....	19
3.1.2 Versuchstiere	19

3.1.3 Versuchsablauf.....	19
3.1.4 Vorbehandlung.....	20
3.1.5 Sham-/CASP-OP.....	21
3.1.6 Intervention.....	21
3.1.7 Gewebeentnahme	22
3.2 Laborexperimenteller Teil	23
3.2.1 Gewebehomogenisierung	23
3.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry	23
3.2.3 Respirometrie.....	24
3.2.4 MDA Assay.....	28
3.3 Statistik.....	29
4 Ergebnisse	30
4.1 Einfluss auf die MF unter nicht-septischen Bedingungen.....	30
4.1.1 Messung nach Zugabe von Glutamat und Malat (Komplex I).....	30
4.1.2 Messung nach Zugabe von Succinat (Komplex II)	30
4.2 Einfluss auf die MF unter septischen Bedingungen	32
4.2.1 Messung nach Zugabe von Glutamat und Malat (Komplex I).....	32
4.2.2 Messung nach Zugabe von Succinat (Komplex II)	32
4.3 MDA-Assay.....	33
4.3.1 Einfluss auf die MDA Menge unter nicht-septischen Bedingungen	33
4.3.2 Einfluss auf die MDA Menge unter septischen Bedingungen	34
5 Diskussion.....	35
5.1 Kernaussagen	35
5.2 Methodendiskussion.....	36
5.3 Effekt von Pravastatin auf die MF der Leber unter nicht-septischen Bedingunge	39
5.4 Effekt von Pravastatin auf die MF der Leber unter septischen Bedingungen	40
5.5 Beeinflussung des PPARα durch Pravastatin.....	42
5.6 Effekt von Pravastatin auf den oxidativen Stress im Lebergewebe	43
5.7 Klinischer Bezug	44
6 Schlussfolgerung	45
7 Literatur- und Quellenverzeichnis	46
8 Anhang	52
8.1 Septic rat severity scoring system.....	52

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der SOFA-Score zum Abschätzen des Organversagens bei Sepsis	2
Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Mitochondriums.....	6
Abb. 3: Pleiotrope Effekte von Statinen.....	8
Abb. 4: Tierexperimenteller Versuchsablauf.....	20
Abb. 5: Versuchsablauf Respirometrie	26
Abb. 6: Messwerte der Respirometrie.....	26
Abb. 7: Sham Komplex I.....	31
Abb. 8: Sham Komplex II	31
Abb. 9: CASP Komplex I.....	32
Abb. 10: CASP Komplex II.....	33
Abb. 11: Sham MDA	33
Abb. 12: CASP MDA	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils	15
Tabelle 2: Materialien und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils	16
Tabelle 3: Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils	17
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteil	18
Tabelle 5: Gruppenzuordnung	20
Tabelle 6: <i>Septic rat severity scoring system</i>	52

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild der Sepsis

1.1.1 Definition

Das Krankheitsbild der Sepsis ist definiert als lebensbedrohliche Organdysfunktion durch eine dysregulierte Immunreaktion des Wirtes auf eine mutmaßliche Infektion (Singer et al., 2016). Diese Definition löste 2016 die alten Diagnosekriterien der Sepsis ab, welche aufgrund ihrer fehlenden Spezifität in der Kritik standen (Vincent et al., 2013). Dabei waren in erster Linie die Inflammation im Rahmen eines sogenannten *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) und ein Erregernachweis definierend für das septische Krankheitsbild (Bone et al., 1992). Durch den damit verbundenen diagnostischen Fokus auf die Infektion wurden sowohl Diagnosesicherung und gezielte Therapie als auch die Abgrenzung zu anderen Syndromen erschwert (Vincent et al., 2013). Heute steht das Organversagen als spezifisches Zeichen der Immunreaktion des Wirtes und nicht mehr die Inflammation selbst im Vordergrund der klinischen Diagnosefindung (Singer et al., 2016).

1.1.2 Klinische Scores

Um die Schwere einer Organdysfunktion in einfachen und objektiven Kriterien abzuschätzen, wurde der *Sepsis related Organ Failure Assessment* (SOFA)-Score entwickelt (Vincent et al., 1996). Hierbei werden insgesamt sechs Organsysteme über die respiratorische Funktion, die *Glascow Coma Scale* (GCS), den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP), die Anzahl der Blutplättchen sowie die Nieren- und Leberfunktion beurteilt (Vincent et al., 1996). Die Höhe des SOFA-Scores korreliert sowohl mit dem Auftreten von Komplikationen als auch mit der Mortalität (Seymour et al., 2016; Vincent et al., 1996). Hierfür werden die im Score berücksichtigten spezifischen Organparameter mit Punktwerten von jeweils 0-4 zusammengerechnet (siehe Abb. 1). Werte von über zwei Punkten schätzen ein Mortalitätsrisiko von über 10 % ab (Seymour et al., 2016). Der komplexe SOFA-Score ist besonders für Patienten/-innen auf der Intensivstation geeignet. Um auch potentiell septische Patienten/-innen im nicht-intensivmedizinischen *Setting* beurteilen zu können, wurde als schnelle und einfache Methode der *quick Sepsis related Organ Failure Assessment*-Score (qSOFA) entwickelt. Patienten/-innen mit zwei der drei folgenden Faktoren gelten als Risikopatienten/-innen: verändertes Bewusstsein wie Verwirrtheit und Benommenheit, Atemfrequenz (AF) größer 22/min sowie ein systolischer Blutdruck kleiner 100 mmHg (Singer et al., 2016).

SOFA score	1	2	3	4
<i>Respiration</i>				
PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg	< 400	< 300	< 200 —— with respiratory support ——	< 100
<i>Coagulation</i>				
Platelets × 10 ³ /mm ³	< 150	< 100	< 50	< 20
<i>Liver</i>				
Bilirubin, mg/dl (μmol/l)	1.2–1.9 (20–32)	2.0–5.9 (33–101)	6.0–11.9 (102–204)	> 12.0 (> 204)
<i>Cardiovascular</i>				
Hypotension	MAP < 70 mmHg	Dopamine ≤ 5 or dobutamine (any dose) ^a	Dopamine > 5 or epinephrine ≤ 0.1 or norepinephrine ≤ 0.1	Dopamine > 15 or epinephrine > 0.1 or norepinephrine > 0.1
<i>Central nervous system</i>				
Glasgow Coma Score	13–14	10–12	6–9	< 6
<i>Renal</i>				
Creatinine, mg/dl (μmol/l) or urine output	1.2–1.9 (110–170)	2.0–3.4 (171–299)	3.5–4.9 (300–440) or < 500 ml/day	> 5.0 (> 440) or < 200 ml/day

^a Adrenergic agents administered for at least 1 h (doses given are in μg/kg·min)

Abb. 1: Der SOFA-Score zum Abschätzen des Organversagens bei Sepsis

Zum Abschätzen des Grades und des Verlaufs der Organdysfunktion bei septischen Patienten/-innen werden sechs Organsysteme nach spezifischen Parametern beurteilt. Jedem System kann eine Punktzahl von 0 (normale Funktion) bis 4 (stark eingeschränkte Funktion) zugeordnet werden. PaO₂ = arterieller Sauerstoffpartialdruck, FiO₂ = Inspiratorische Sauerstofffraktion, mmHg = Millimeter-Quecksilbersäule, mm³ = Kubikmillimeter, mg/dl = Milligramm/Deziliter, μmol/l = Mikromol/Liter, ml/day = Milliliter/Tag. Quelle: Vincent et al., 1996.

1.1.3 Erreger und Pathogenese

Das Spektrum einer Sepsis umfasst bakterielle, virale, mykotische und parasitäre Erreger (Martin, 2012). Hierbei ist der Anteil an Infektionen, der durch gram-positive Bakterien ausgelöst wird, am größten, gefolgt von den gram-negativen und polymikrobiellen Infektionen (Dellinger et al., 2013). Ein Nachweis dieser Erreger erfolgt allerdings nur etwa in der Hälfte der Fälle (Cohen, 2002). Die häufigsten Infektionen, die einer Sepsis vorausgehen, sind Infektionen des Respirationstraktes, der Bauchhöhle, der Harnwege sowie primäre Infektionen der Blutbahn (Cohen, 2002). Pathophysiologisch führen diese Infektionen zu einer Immunantwort des Körpers, die über die Aktivierung pro- und antiinflammatorischer sowie nicht immunologischer Kaskaden eine Gewebhypoxie und die daraus resultierende Organdysfunktion begünstigt (Hotchkiss et al., 2013). Im Rahmen dieses Prozesses führen mikrobielle Mediatoren, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), zu einer Immunantwort des angeborenen Immunsystems (Cohen, 2002). Besonders mononukleäre Zellen setzen nach Kontakt mit einem PAMP proinflammatorische Zytokine wie IL-1 (Interleukin-1), IL-6 und TNF (Tumornekrosefaktor) frei (Cohen, 2002). Neben der Aktivierung der Entzündungskaskade aktivieren die Zytokine auch das Gerinnungssystem. Dabei entsteht durch die Proteolyse von Prothrombin Thrombin als wichtigstes Enzym der Gerinnungskaskade. Antithrombin und Protein C als Gegenspieler der Blutgerinnung werden hingegen gehemmt. Das führt zu einem Ungleichgewicht des Gerinnungssystems, welches sich in erster Linie in der sogenannten disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) äußert (Levi et al., 1993). Dadurch kommt es wiederum, vor allem in den Endstrombahnen der kleinen Gefäße, zur Hypoxie. Zum Ausgleich der anfangs überschießenden Reaktion des angeborenen Immunsystems auf die Infektion wird

gegenregulatorisch das Immunsystem heruntergefahren, indem lösliche IL-1 Rezeptor- und TNF-Rezeptor-Antagonisten sowie antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 gebildet werden und Lymphozyten in Apoptose gehen (Cohen, 2002). Es wird vermutet, dass vor allem diese kompensatorische Gegenregulation des Immunsystems zum Multiorganversagen (MOV) im Rahmen der Sepsis führt (Cohen, 2002). Der genaue Mechanismus des MOV ist jedoch nicht vollständig geklärt. Eine Rolle spielen außerdem die durch DIC bedingte Hypoperfusion, Störungen der mikrovaskulären Homöostase durch vasoaktive Substanzen wie Histamin, Gewebeexsudate und direkt schädigende Einflüsse durch lysosomale Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Sygitowicz and Sitkiewicz, 2020). Besonders die Störungen der Mikrozirkulation sind mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Sakr et al., 2004). Neben den Mikrozirkulationsstörungen kommt es über nicht vollständig verstandene Prozesse auch zu Störungen der Zellatmung in den Mitochondrien, wodurch die Energiebereitstellung für den Organismus gestört wird (Graham and Stacy, 2020).

Zusammenfassend folgt der Amplifikation der Immunreaktion pathophysiologisch eine Dysregulation. Diese fehlregulierte Antwort des Körpers mit Störungen in der Mikrozirkulation und der mitochondrialen Dysfunktion (MD) führen zum Krankheitsbild der Sepsis mit MOV.

1.1.4 Epidemiologie und Kosten

Das komplexe klinische Syndrom der Sepsis stellt im klinischen Alltag eine besondere Herausforderung dar. In einer US-amerikanischen Kohortenstudie war die Sepsis die häufigste unmittelbare Todesursache, meist in Kombination mit anderen schweren Komorbiditäten (Rhee et al., 2019). Obwohl die Letalität der Sepsis, die bei etwa 10-30% liegt (Fleischmann et al., 2016; Martin, 2012), sinkt, steigt die Inzidenz weiterhin an (Stoller et al., 2016). Außerdem nimmt die Inzidenz an schwer therapierbaren Erregern wie nosokomialen Pilzinfektionen zu (Cohen, 2002). Insgesamt ist die Sepsis für 2% aller Krankenhausaufenthalte verantwortlich (Martin, 2012). Die durch die Hospitalisierung und damit verbundene häufig intensivmedizinische Versorgung septischer Patienten/-innen entstehenden Kosten stellen für das Gesundheitssystem eine große Herausforderung dar. Während die Sepsis in den USA zu den kostenintensivsten Krankheitsbildern im Krankenhaus zählt (Torio and Andrews, 2006), liegen die Kosten in Deutschland pro Sepsisfall im Jahr 2013 durchschnittlich bei 27.467,92 Euro (Fleischmann et al., 2016). Die Gesamtkosten für die stationäre und nachfolgende ambulante Behandlung der Sepsisfolgen liegen bei rund 7,7 Milliarden Euro (Fleischmann et al., 2016). Neben den direkten Behandlungskosten kommen neben der lange andauernden Erwerbsminderung für die Patienten/-innen auch langfristige kognitive, psychosoziale und funktionelle Einschränkungen hinzu (Iwashyna et al., 2010).

1.1.5 Therapie der Sepsis

Eine 2018 erneuerte Leitlinie der *Surviving Sepsis Campaign* hat die Wichtigkeit eines schnellen Vorgehens bei einer Sepsis im Rahmen eines *one-hour-bundle* auf Grundlage der neuen diagnostischen Mittel wie dem qSOFA verdeutlicht (Levy et al., 2018). Innerhalb einer Stunde sollte nun ein im Folgenden beschriebenes, spezifisches Maßnahmenbündel durchgeführt werden (Levy et al., 2018): Zur initialen Abschätzung wird Laktat im Blut bestimmt, welches ein Indikator für einen anaeroben Stoffwechsel und zelluläre Hypoxie ist. Ebenfalls kann der Laktatspiegel zur Verlaufsbeurteilung genutzt werden. Bevor eine Antibiotikatherapie mit breitem Erregerspektrum unter Berücksichtigung des Patientenprofils sowie lokaler Resistenzen intravenös appliziert wird, sollten Blutkulturen und weitere Laborparameter wie ein Blutbild und Infektparameter abgenommen werden. Zur Kreislaufstabilisierung werden kristalloide Infusionslösungen infundiert. Der MAP sollte stets > 65 mmHg betragen. Zur Stabilisierung kann Noradrenalin oder Vasopressin appliziert werden. Wenn trotz Noradrenalingabe keine Kreislaufstabilisation erreicht wird, kann einer Nebennierenrindeninsuffizienz mit einer zusätzlichen Gabe von Hydrocortison entgegengewirkt werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist eine intensivierete Insulintherapie mit Zielblutzuckerwerten zwischen 80-180 mg/dl. In einem Zeitfenster von 6-12 Stunden sollte eine sogenannte *source control* stattfinden. Hierbei soll eine definitive Diagnose getroffen und auch entschieden werden, ob ein sanierbarer Fokus, wie ein Abszess oder ein infizierter Katheter, entfernt werden kann. Im Verlauf der Intensivtherapie sind noch weitere therapeutische Maßnahmen möglich: lungenprotektive Beatmung, Thromboembolieprophylaxe, Stressulkus-prophylaxe sowie Komplikationsmanagement. Da trotz der Behandlungsleitlinie, die eine schnelle und umfassende Therapie gewährleisten soll, die Sterblichkeit einer Sepsis weiterhin hoch ist, sind weitere Studien mit neuen Therapieansätzen notwendig. Fokus kann auf einem Eingriff in die Entstehung und Ausbreitung einer Sepsis, Unterstützung der anti-inflammatorischen und metabolischen Körperfunktionen und Verhinderung von Sepsis bedingten Komplikationen wie der DIC liegen.

1.1.6 Bedeutung der Leber in der Sepsis

Die Leber spielt als zentrales Stoffwechselorgan eine besondere Rolle in der Abwehrfunktion des Körpers. Zu den hepatischen Funktionen gehören die Entgiftung, Energieproduktion und -speicherung, Hormonproduktion, Homöostase, Blutgerinnung, Produktion von akute Phase Proteinen und viele weitere. Bei einer Sepsis führen PAMPs, Toxine und inflammatorische Mediatoren über eine hepatozelluläre Dysfunktion gefolgt von einem Leberschaden zum irreversiblen Leberversagen, das bei einer Schädigung von 80 - 90 % der Hepatozyten auftritt (Yan et al., 2014). Laut Yan entwickeln 39,9 % der Patienten/-innen mit einer Sepsis eine hepatische Dysfunktion, 8,5 % sogar ein Leberversagen (Yan et al., 2014). Es fehlen allerdings genaue Definitionen von Sepsis-induzierten-Leberschädigungen, z.B. in Form von hypoxischer Hepatitis, Sepsis-induzierter-Cholestase und Synthesestörungen, um genaue Inzidenzen zu

ermitteln (Woźnica et al., 2018). Aufgrund der hohen Regenerationskapazität und Widerstandsfähigkeit der Leber ist die Inzidenz von Leberversagen in der Sepsis niedriger und andere Organbeteiligungen, wie das Lungen- und Nierenversagen, häufiger (Baue, 1975). Eine hepatische Mitbeteiligung gilt allerdings als prognostisch besonders ungünstig und ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Kramer et al., 2007; Woźnica et al., 2018). Neben einem therapeutisch oder supportiv durchgeführten Leberersatzverfahren fehlen etablierte diagnostische Werkzeuge zum Abschätzen eines bestehenden oder sich entwickelnden Leberschadens (Nessler et al., 2012; Woźnica et al., 2018). Eine US-amerikanische Datenbankanalyse konnte zeigen, dass Patienten/-innen, die vorbestehende Leberschäden wie z.B. eine Hepatitisinfektion oder Zirrhose hatten, im Rahmen von Infektionen häufiger eine Sepsis entwickelten (Foreman et al., 2003). Leberschäden und Sepsisprogression scheinen sich also gegenseitig zu beeinflussen. Aus diesen Gründen ist das Verhindern eines Leberschadens auch ein wichtiger therapeutischer Ansatz in der Sepsisbehandlung.

1.2 Sepsis und Mitochondrien

1.2.1 Mitochondrien

Mitochondrien werden auch als die „Kraftwerke“ der Zellen bezeichnet, da sie dem Körper durch Oxidative Phosphorylierung (OxPhos) Energie bereitstellen. Sie befinden sich im Zytoplasma eukaryotischer Zellen und ihr Zyklus findet unabhängig vom Zellzyklus statt. Aufgebaut sind sie aus einer äußeren und inneren Membran, zwischen denen ein Protonengradient für die Energiebereitstellung in Form von Adenosintriphosphat (ATP) (siehe Kapitel 3.2.3.1) aufgebaut wird. Zur Oberflächenvergrößerung ist die innere Membran, in der sich die Komplexe der Atmungskette befinden, in sogenannte Cristae aufgefaltet (siehe Abb. 2). In der Mitochondrienmatrix befindet sich außerdem die mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (mtDNA), die für die mitochondrialen Proteine kodiert. Insgesamt ähneln die Mitochondrien in ihrem Aufbau aus 2 Membranen den Bakterien. Klinisch bedeutsam ist hierbei, dass insbesondere bakterizide Antibiotika wie Flourochinolone und β -Laktamantibiotika eine MD sowie die Produktion von ROS bedingen können (Kalghatgi et al., 2013). Neben ihrer Hauptaufgabe der Energieerzeugung spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle in verschiedenen Signalwegen sowie der Kalzium- und Eisenhomöostase (Kakkar and Singh, 2007) sowie der Steuerung der Apoptose (Jeong and Seol, 2008) und sind Ort der β -Oxidation von Fettsäuren.

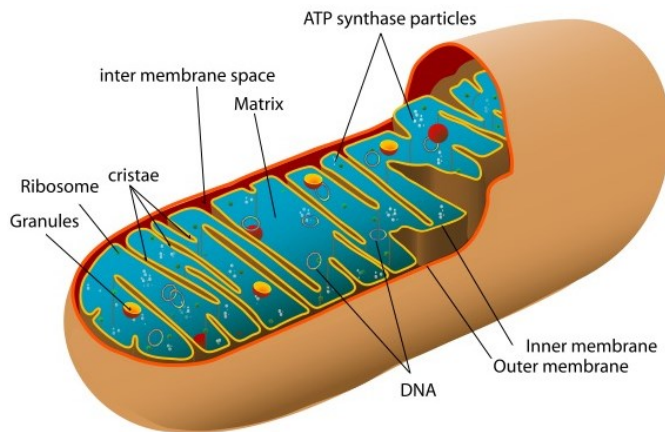


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Mitochondriums

Quelle: Ruiz, 2006.

1.2.2 Mitochondriale Funktion während einer Sepsis

Welche Rolle Mitochondrien in der Pathogenese der Sepsis spielen (Arulkumaran et al., 2016), ist ebenso wenig geklärt wie der Mechanismus der MD (Graham and Stacy, 2020). Insgesamt ist die Studienlage zur mitochondrialen Funktion (MF) verschiedener Organe im Rahmen einer Sepsis sehr variabel (Jeger et al., 2013). Auch die Studienlage zur hepatischen MF ist kontrovers: Einige Studien zeigten eine verschlechterte (Brealey et al., 2004; Jeger et al., 2015), eine unveränderte (Trumbeckaite et al., 2013) oder sogar verbesserte (Kozlov et al., 2006) MF. Ebenso ist die MF der Leber im zeitlichen Verlauf einer Sepsis unterschiedlich. In frühen Phasen einer abdominalen Sepsis sind die Kopplung von Atmungskette und OxPhos sowie die Effizienz der OxPhos nach Stimulation der Komplexe I und II der Atmungskette erhöht, während sich im weiteren Verlauf die Effizienz nach Stimulation von des Komplex I reduziert (Herminghaus et al., 2019b). So nimmt insgesamt die Effizienz der OxPhos in den frühen Phasen zu und fällt im Verlauf wieder auf Kontrollwerte ab (Herminghaus et al., 2019b; Morel et al., 2017). Ein möglicher Grund für eine Abnahme der MF im Verlauf einer Sepsis könnte eine Schutzreaktion der Zellen bei allgemeiner Abnahme der Energieverfügbarkeit im Stoffwechsel sowie der Schutz vor einer übermäßigen Produktion von toxischen ROS durch die Mitochondrien sein (Lelubre and Vincent, 2018; Singer, 2007).

Tierexperimentelle Untersuchungen, die die MD in Abhängigkeit von der Schwere der Sepsis beobachtet haben, kamen zu folgenden Ergebnissen: Bei einer milden Sepsis wird die MF kompensatorisch hochreguliert. Bei einer schweren Sepsis hingegen fallen diese adaptiv wirkenden Mechanismen weg und ein schlechtes klinisches Outcome kann begünstigt werden (Herminghaus et al., 2015). So zeigt die MF in frühen Phasen sowie bei einer moderaten Sepsis adaptive Mechanismen, die genauer untersucht werden müssen.

Mögliche Mechanismen einer MD laufen über einen poreninduzierten Kalziumeinstrom in die Mitochondrien, der Aktivierung fragmentierender Mechanismen und genetischer Veränderungen ab (Lobet et al., 2015). Ebenfalls kommt es zu erhöhten mitochondrialen ROS-Konzentrationen (Graham and Stacy, 2020). Diese ROS sind Moleküle mit einem ungepaarten Elektronenpaar, genannt freie Radikale, die hochreaktiv mit umgebenden Molekülen reagieren können und unkontrolliert schädlich wirken können (Galley, 2011). Eine experimentelle Studie konnte zeigen, dass im Lebergewebe neben dem direkten Kontakt von inflammatorischen Mediatoren wie PAMPs besonders die sekundäre Hypoxie, beispielsweise durch die Akkumulation von freiem Eisen, ebenfalls zur MD führen kann (Weidinger et al., 2013). Zur sekundären Hypoxie kommt es hierbei vor allem durch die aktivierte Gerinnung, die Ödembildung sowie durch Gefäßverschlüsse, die Teil des zuvor beschriebenen Pathomechanismus sind. Paradoxerweise führt eine Hypoxie zur Zunahme von ROS durch Elektronenabgabe aus der Atmungskette und Hemmung des Komplex II der Atmungskette mit einer Akkumulation von Succinat (Bar-Or et al., 2015). Die Zunahme von ROS sowie die Abnahme der antioxidativen Mechanismen führt über oxidativen Stress zu mitochondrialem Versagen und schlussendlich auch zum Organversagen (Duran-Bedolla et al., 2014).

Zusammenfassend bleibt die MF in ihrer Modulation und im zeitlichen Ablauf sowie die Entstehung einer MD im Rahmen einer Sepsis weiterhin nicht vollständig geklärt und es sind weitere Untersuchungen notwendig.

1.3 Statine und Sepsis

1.3.1 Statine

Statine sind bekannt als „fettsenkende“ Medikamente und zeichnen sich durch eine reversible, kompetitive Hemmung der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) aus (Istvan and Deisenhofer, 2001). Wichtige klinische Indikationen der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (HRH) sind kardiovaskuläre Erkrankungen wie Atherosklerose, die koronare Herzerkrankung und die periphere arterielle Verschlusskrankheit.

Die HMG-CoA-Reduktase katalysiert die Reduktion des HMG-CoA zu Mevalonat (Istvan and Deisenhofer, 2001). Über weitere Schritte wird anschließend das Isoprenoid Cholesterin synthetisiert, welches ein wichtiger Bestandteil der Zellmembranen und der Vorläufer von Steroidhormonen sowie Gallensäuren ist. Die „fettsenkende“ Wirkung der HRH wird durch zwei Mechanismen, der Cholesterinsynthese-hemmung sowie der Hochregulation der *low density lipoprotein* (LDL)-Rezeptoren der Leber, vermittelt. So wird vermehrt LDL, welches das hydrophobe Cholesterin im Blutplasma transportiert, in die Leber aufgenommen. HRH hemmen nicht nur die Synthese von Cholesterin, sondern auch die Synthese weiterer Isoprenoide, wie dem

Geranylpyrophosphat (GPP) und dem Farnesylpyrophosphat (FPP). Die Synthesehemmung dieser Isoprenoide führt unter anderem zu den sogenannten pleiotropen Effekte der Statine (Arnaud et al., 2005). Hierzu gehören Effekte, die antiinflammatorisch, immunmodulatorisch, antioxidativ, antithrombotisch sowie am Endothel wirken (siehe Abb. 3).

Über eine verminderte posttranslationale Modifikation der kleinen Signalmoleküle wie den Rho- und Ras-GTPasen durch die Isoprenoide GPP und FPP, der sogenannten Isoprenylation, können die entsprechenden Signalwege und Genexpressionen verändert werden (De Loecker and Preiser, 2012). Hierdurch kommt es zu einer verminderten Expression von proinflammatorischen Zytokinen und akute Phase Proteinen wie dem C-reaktiven Protein (CRP), einer Inhibition der adaptiven Immunantwort und vermehrten Aktivierung der Häm-Oxygenase zur antioxidativen Abwehr (De Loecker and Preiser, 2012). Am Endothel der Gefäße führen die Mechanismen zu protektiven Effekten durch Induktion der endothelialen Stickstoffsynthese (eNOS) und Inhibition der Proliferation von glatten Muskelzellen (Liao and Laufs, 2005).

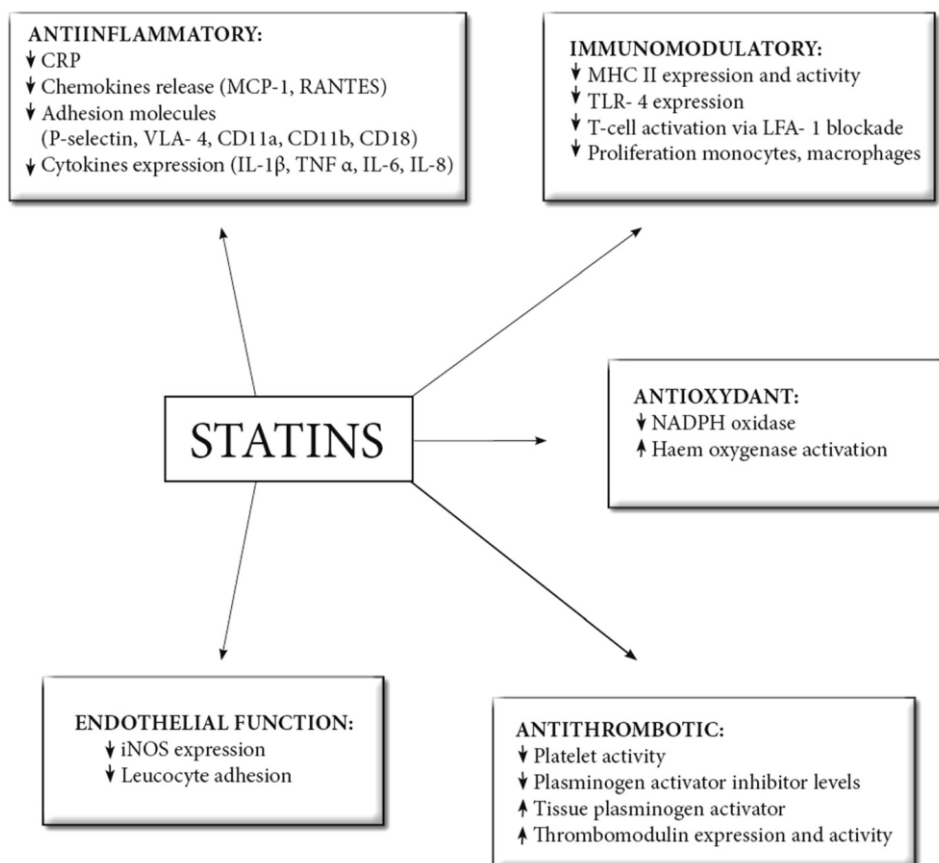


Abb. 3: Pleiotrope Effekte von Statinen

Neben ihrer fettensenkenden Eigenschaft haben Statine durch Modulation der Entzündungsreaktion antiinflammatorische, immunmodulatorische, antioxidative und antithrombotische Effekte.

CRP = C-reaktives Protein, MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex, TLR = *Toll like receptor*, LFA = *lymphocyte function antigen*, NADPH = Nicotinamidadeninucleotidphosphat, iNOS = Stickstoffmonoxid-Synthase.

Quelle: De Loecker and Preiser, 2012.

1.3.2 Klinische Beobachtungen

Ob Statine einen positiven Einfluss bei schweren Erkrankungen wie einer Sepsis haben, ist Gegenstand vieler klinischer und tierexperimenteller Studien. In einer prospektiven Kohortenstudie konnte ein Zusammenhang zwischen einer vorherigen Statineinnahme und einer selteneren Entwicklung einer Sepsis bei Infektionen und Vermeidung von intensivmedizinischen Behandlungen gezeigt werden (Almog et al., 2004). Retrospektiv konnte darüber hinaus ein Überlebensvorteil bei Bakteriämie mit fortgeführter Statineinnahme beobachtet werden (Kruger et al., 2006). Ebenfalls konnte in einer kontrollierten, randomisierten Studie ein Benefit im Hinblick auf Verhinderung einer Sepsisprogression durch eine akute Statingabe bei Statinaiven Patienten/-innen mit beginnender Sepsis beobachtet werden (Patel et al., 2012). In einer Studie, in der das Überleben von Patienten/-innen mit beatmungsassoziierten Pneumonien in Abhängigkeit von der vorherigen Gabe von Statinen oder Placebos untersucht wurde, zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied (Papazian et al., 2013). Eine Metaanalyse von 8 randomisierten, kontrollierten Studien konnte weder einen Effekt der vorherigen Statingabe auf die Mortalität noch Unterschiede zwischen hohen und niedrigen Statindosen nachweisen (Quinn et al., 2016). In einer weiteren retrospektiven Analyse zeigte sich sogar eine signifikant erhöhte Krankenhausmortalität bei Patienten/-innen mit Infektionen und vorheriger Statineinnahme (Fernandez et al., 2006). Die 2018 veröffentlichte Metaanalyse von Chen zeigte anhand von 9 randomisierten Studien keinen Vorteil einer Statingabe bei Sepsis auf die Krankenhaus- sowie 28-Tage-Mortalität (Chen et al., 2018). Eine weitere systematische Übersichtsarbeit schlussfolgerte aufgrund fehlender Mortalitäts- und Komplikationsreduktion durch Statine, dass der Einsatz von Statinen nicht empfohlen wird (Pertzov et al., 2019).

Insgesamt ist die Studienlage zur Wirksamkeit einer Statingabe zur Prävention und Behandlung von septischen Patienten/-innen uneindeutig (Dobesh and Olsen, 2014). Daher müssen bei schwerkranken Patienten/-innen nach wie vor individuell Nutzen, Risiken und Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten abgewogen werden (Omar et al., 2017).

1.3.3 Experimentelle Beobachtungen

Um die Wirkmechanismen von Statinen auf schwere Erkrankungen wie der Sepsis genauer zu verstehen, wurden *in vivo* und *in vitro* Versuche durchgeführt. Einige tierexperimentelle Studien zeigten nach Gabe eines Statins ein erhöhtes Überleben bei septischen Mäusen (Ando et al., 2000; Merx et al., 2005) sowie Ratten (Morel et al., 2017). Stolf untersuchte eine 30-tägige Statingabe vor Sepsisinduktion bei Ratten und analysierte verschiedene Parameter wie oxidativen Stresses, Enzymaktivität in Lebermitochondrien, Leberhistologien sowie Plasma- und Genmarker für Entzündungsreaktionen. Einzig konnte ein Einfluss von Statinen auf die durch Sepsis verminderte mitochondriale Enzymaktivität der Leber gemessen werden (Stolf et al., 2012). Morel untersuchte den zeitlichen Einfluss von einer Statingabe bei Sepsis im Rattenmodell. Lediglich in der Gruppe,

die Simvastatin vor Sepsisinduktion erhielt, zeigte sich ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil (Morel et al., 2017). Eine vorherige Studie der Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Pravastatin die mikrovaskuläre Sauerstoffversorgung des Darms verbessert und somit eine Translokation von Erregern vermindert werden könnte (Schulz et al., 2019). Terblanche fasst in seinem Review verschiedene Modulationswege von Statinen mit Beeinflussung von Signalwegen, Gentranskription, Induktion von der Hämoxigenase und erhöhter Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen zusammen. Über direkt und indirekte immunmodulatorische Wirkungen wird die Immunantwort des septischen Organismus moduliert und positiv beeinflusst (Terblanche et al., 2007). Die genaue Untersuchung weiterer Mechanismen von Statinen ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.4 Statine und Mitochondrien

Statine wirken über ihre fettsenkenden und pleiotropen Effekte an vielen verschiedenen zellulären Strukturen und Geweben (De Loecker and Preiser, 2012). Die Einflussnahme von Statinen auf verschiedene inflammatorische, antioxidative und antikoagulative Prozesse wurde bereits beschrieben (Liao and Laufs, 2005). Interessant ist es weiterhin, inwieweit Statine auf Mitochondrien wirken. Es wurden vier mögliche Mechanismen beschrieben, durch die Statine Mitochondrien in ihrer Morphologie und Funktion beeinflussen (Broniarek and Jarmuszkiewicz, 2016). Sie führen erstens zu einem Mangel an Ubiquinon, einem wichtigen Elektronenträger zwischen den Komplexen I, II und III der Atmungskette und begünstigen dadurch z.B. eine Myopathie (Deichmann et al., 2010; Vaughan et al., 2013). Zweitens hemmen sie direkt Komplexe der Atmungskette sowie die ATP-Synthase. Drittens vermindern sie die Isoprenylation von Signalmolekülen und induzieren viertens die mitochondriale Apoptose (Broniarek and Jarmuszkiewicz, 2016). Die Wirkung von Statinen auf Mitochondrien unterscheidet sich weiterhin in verschiedenen Gewebetypen und ist dosisabhängig (Herminghaus et al., 2019a). Während sie in Herzmuskelzellen über Mitohermesis die Biogenese von Mitochondrien und damit die oxidative Kapazität fördern, können sie in der Skelettmuskulatur über einen erhöhten oxidativen Stress zur gefürchteten Nebenwirkung der Myopathie führen (Bouitbir et al., 2012). Die Leber ist durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase in den Hepatozyten der Hauptwirkort von Statinen (Brealey et al., 2011). Allerdings ist die Studienlage zum Einfluss von Statinen auf hepatische Mitochondrien nicht ganz eindeutig. Es gibt Studien, die keinen Effekt von Pravastatin auf Mitochondrien der Leber zeigen (Kaufmann et al., 2006; Marques et al., 2018), Herminghaus konnte allerdings dosisabhängig eine Entkopplung der Atmungskette und der OxPhos ohne Beeinträchtigung der Effizienz der OxPhos zeigen (Herminghaus et al., 2019a).

Eine mögliche Toxizität von Statinen ist unter anderem abhängig vom gewählten Präparat. Hydrophile Statine wie das Pravastatin zeigt sich auf Muskelzellen weniger toxisch als vergleichbare lipophile Statine wie z.B. Atorvastatin, Simvastatin und Cerivastatin

(Kaufmann et al., 2006). Effekte von Statinen auf Mitochondrien in Thrombozyten zeigten sich *in vivo* bei hohen tierexperimentellen Dosen mit 30 mg/kg KG deutlich stärker ausgeprägt als bei therapeutischen Dosen humaner Untersuchungen mit 0,2-0,5 mg/kg KG (Vevera et al., 2016). Bei einer Dosiserhöhung mit dem Ziel der Erhöhung der Plasmakonzentrationen beim Menschen sind Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln sowie Komorbiditäten wie Leber- und Nierenfunktionsstörungen mit möglichen toxischen Folgen von Statinen zu beachten (Björkhem-Bergman et al., 2011; Herminghaus et al., 2019a).

Insgesamt bleibt der Einfluss von Statinen auf Mitochondrien verschiedener Gewebe nicht ganz verstanden und es bleibt auch im Rahmen der klinischen Anwendung bei Sepsis nicht eindeutig, ob die pleiotropen Mechanismen durch Stärkung der Immunantwort, die antioxidativen Effekte und Herunterregulierung der OxPhos oder die schädigenden Einflüsse durch gestörte Signalwege, veränderte Zellatmung und oxidativen Stress überwiegen (Morel et al., 2017).

1.5 Statine und PPAR α

Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren (PPAR) sind nukleäre Rezeptoren und dienen als Transkriptionsfaktoren zur Regulation der Genexpression (Issemann and Green, 1990). Die drei bisher identifizierten Subtypen PPAR α -, β/δ und γ unterscheiden sich in ihrer Lokalisation und ihrem Genexpressionsmuster (Tyagi et al., 2011). Während eine Aktivierung des PPAR γ , z.B. durch die Antidiabetika Rosiglitazon and Pioglitazon, die Insulinsensibilität sowie den Glukosestoffwechsel steigert, führt eine Aktivierung des PPAR β/δ zur Expression von Genen des Fettsäuremetabolismus (Balakumar et al., 2007; Tyagi et al., 2011). Der PPAR α , dessen Expression in Hepatozyten, Enterozyten sowie immunologischen und vaskulären Zellen hoch ist, spielt durch Stimulation der Glukoneogenese, der β -Oxidation von Fettsäuren und der *high density lipoprotein* (HDL)-Synthese sowie der Adipozytendifferenzierung (Schoonjans et al., 1996; Seo et al., 2008) ebenfalls eine entscheidende Rolle im Glukose- und Fettmetabolismus. Besonders Fibrate senken über direkte Bindung an den PPAR α die Triglyceridlevel im Blutplasma (Kersten, 2008). Neben den metabolischen Effekten zeigt der PPAR α auch immunmodulatorische Wirkungen. In einer tierexperimentellen Studie konnten Einflüsse des PPAR α auf die Dauer einer Immunantwort gezeigt werden (Devchand et al., 1996). Mögliche Zusammenhänge zwischen den metabolischen und inflammatorischen Funktionen des PPAR α im Rahmen einer Sepsis wurden von Paumelle untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Sepsis die PPAR α Aktivität erhöht und so über eine Aktivierung des Fettsäuremetabolismus vermehrt Ketonkörper zur Deckung des erhöhten Energiebedarfs produziert werden (Paumelle et al., 2019). Van Wyngene zeigte in seiner experimentellen Studie hingegen eine Verminderung der PPAR α -mRNA Level und -aktivität bei einer Sepsis und schlussfolgert, dass die dadurch bedingten metabolische Störungen maßgeblich an der Sepsis beteiligt sind (Van Wyngene et al., 2020). Statine, besonders

die hydrophilen wie Pravastatin, induzieren auf bislang ungeklärte Weise ebenfalls die PPAR α Promoter Aktivität, die PPAR α mRNA Expression und die PPAR α Level insgesamt (Seo et al., 2008). Im Review von Balakumar and Mahadevan wird vermutet, dass die Hochregulierung sowie Aktivierung vom PPAR α zu den pleiotropen Effekten der Statine gehört, indem sie antiinflammatorisch, kardio- und renoprotektiv sowie antithrombotisch wirken (Balakumar and Mahadevan, 2012). Insgesamt ist die Rolle und Beeinflussung des PPAR α in der Leber im Rahmen einer Sepsis unvollständig geklärt.

1.6 Reaktive Sauerstoffspezies

In vitro Beobachtungen der mitochondrialen Aktivität (MA) an humanen Zelllinien ergaben, dass die Aktivität der OxPhos durch die Hemmung der Komplexe I und IV der Atmungskette durch NO, welches im Rahmen einer Sepsis entsteht, herunterreguliert ist (Beltrán et al., 2000). Gleichzeitig steigt die Konzentration von Superoxiden als ROS, welche von den Komplexen I, II und III produziert werden, an (Arulkumaran et al., 2016). Die Superoxide können dann mit NO reagieren und weitere reaktive Stickstoffspezies (RNS) bilden (Weidinger et al., 2015). Der Mechanismus, der in den Mitochondrien nach Kontakt mit PAMPs zur ROS und RNS-Synthese führt und letztendlich eine MD verursacht, ist nicht vollständig geklärt. Vermutlich dienen die ROS und RNS zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems (V́ictor et al., 2009). Es ist unklar, wann die Erzeugung von mitochondrialen ROS aufhört, adaptiv zu sein und schädlich wird (Arulkumaran et al., 2016).

Die vermehrte Anzahl an ROS in einer lipidreichen Umgebung wie der Leber induziert hier eine Lipidperoxidation, die darauf hochreaktive aldehydische Derivate wie Malonyldialdehyd (MDA) freisetzt. Das MDA hat neben der direkt toxischen Wirkung der ROS wiederum schädigende Einflüsse auf das umgebende Gewebe, die Atmungskette und die DNA. Die MD führt nun erneut zu einer vermehrten ROS Produktion und es kommt zu einem schädigenden Kreislauf (Begrice et al., 2006). Bei einer Sepsis kommt es neben der Erhöhung des oxidativen Stresses durch ROS und RNS auch zu einem Versagen des antioxidativen Systems, z.B. bestehend aus Glutathion (Galley, 2011). Die kausalen Zusammenhänge der Ungleichgewichts zwischen oxidativem Stress und antioxidativen Mechanismen sind allerdings unklar (Brealey et al., 2004).

Ebenfalls führt ein erhöhter Energiebedarf bei einer Sepsis zu einer vermehrten Lipolyse im Fettgewebe mit folgendem Anfall von freien Fettsäuren. Durch eine verminderte PPAR α -Aktivität in der Leber mit Reduktion der β -Oxidation dieser Fettsäuren können diese akkumulieren und über Lipotoxizität mit weiterem Anfall von MDA wiederum direkt die Leber schädigen (Van Wyngene et al., 2020).

1.7 Ziele der Arbeit

Die Sepsis stellt als lebensbedrohliche Organdysfunktion durch eine dysregulierte Immunantwort des Wirtes auf eine mutmaßliche Infektion (Singer et al., 2016) auch im Zeitalter fortgeschrittener intensivmedizinischer Versorgung eine besondere Herausforderung dar (Martin, 2012). Neben Mikrozirkulationsstörungen (Sakr et al., 2004) ist auch die MD (Brealey et al., 2002) am Sepsis-induzierten Organversagen beteiligt, wobei eine Mitbeteiligung der Leber als prognostisch besonders ungünstig gilt und eine gezielte Therapie benötigt wird (Yan et al., 2014). Studien gaben Hinweise auf eine positive Beeinflussung von Statinen auf die Entwicklung und Progression einer Sepsis (Almog et al., 2004), die über die pleiotropen Effekte von Statinen vermittelt wird. Ebenfalls beeinflussen Statine die PPAR α -Aktivität und haben so einen immunmodulatorischen Einfluss (Balakumar and Mahadevan, 2012; Seo et al., 2008).

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob der HRH Pravastatin *in vivo* die MF der Leber unter nicht-septischen und septischen Bedingungen beeinflusst und ob dieser Einfluss durch Modulation am PPAR α bedingt ist. Außerdem soll untersucht werden, ob Pravastatin einen Einfluss auf den oxidativen Stress in den Mitochondrien hat und so protektiv wirkt.

Mithilfe der vorliegenden Arbeit sollen die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

1. Welchen Effekt hat Pravastatin auf die mitochondriale Funktion in der Leber unter septischen und nicht-septischen Bedingungen?
2. Wird eine Pravastatin-Wirkung auf die hepatischen Mitochondrien über den PPAR α übermittelt?
3. Hat Pravastatin einen Einfluss auf die ROS-Produktion und damit auf den oxidativen Stress in der Leber unter septischen und nicht-septischen Bedingungen?

In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür ein etabliertes CASP (*Colon ascendens stent peritonitis*)-Modell angewandt, mit dem eine abdominelle Sepsis hervorgerufen wurde. Die Kontrollgruppen wurden steril laparotomiert. Anschließend wurden Parameter der Zellatmung am septischen und nicht-septischen Lebergewebe untersucht. Mittels weiterer Analysen konnte außerdem der oxidative Stress quantitativ erfasst werden.

2 Materialien

2.1 Materialien und Geräte des tierexperimentellen Teils

4-0 Faden	VCP304H, Ethicon Vicryl Plus, Johnson-Johnson, Neuss, Deutschland
6-0 Faden	EH7403, Prolene, Ethicon Inc., Somerville, USA
Aufzeichnung hämodynamischer und respiratorischer Parameter	PowerLab, AD Instruments, Castle Hill, Australien
Beatmungsgerät	Inspira asv, Harvard Apparatus, Holliston, USA
Blutgasanalysegerät	ABL 715, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Buprenorphin	Temgesic, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland
Desinfektionsmittel	Octeniderm, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
DMSO, Dimethylsulfoxid	D8418, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Kompressen	4078217, ES-Kompressen, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Lochtuch	33040, Raucodrape, Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland
NaCl, Natriumchlorid	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Pancuroniumbromid	Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk, Trittau, Deutschland
Pentobarbital-Natrium	Narcoren, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Perfusor securia	Typ 8717/02/8, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
PPARα - Blocker GW6471	4618, Tocris Bioscience, Bristol, UK
Pravastatin	P4498, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Ringerlösung	6737462.00.01, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sevofluran	SEVOrane, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland

Spritzen	Omnifix-F, latex-free, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterile Handschuhe	Sempermed, SATRA Technology Centre Wyndham Wayy, Northamptonshire, UK
Stents/ Zugänge	Vasofix Safety, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Thermometer	EMB 2200-0, KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Waage	MT1831, Microlife AG, Windau, Schweiz
Wärmematte	Julabo 6, Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland

Tabelle 1: Materialien und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils

2.2 Materialien und Geräte des laborexperimentellen Teils

Eismaschine	AF 80, Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Falcons	15 ml und 50 ml, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Glasgefäß Homogenisierer	60 ml, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Hitzeschrank	UT 6200, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Homogenisierer	Eurostar 20 digital, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Kompresse	ES-Kompressen, Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Mikrospritzen	ITO Corporation, Shizouka, Japan
Mikrotestplatte 96 Well	82.1581, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	Synergy 2 Plate Reader, Gen5 1.11 Data Analysis Software, BioTek Instruments, Winooski, USA
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	StarLab International GmbH, Hamburg, Deutschland
Respirometer	Model 782, Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Schottland

Statistiksoftware	GraphPad Software 8.0, La Jolla, USA
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexgerät	Vortex Genie Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	Rotina 420 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 2: Materialien und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils

2.3 Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Teils

DMSO, Dimethylsulfoxid	D8418, A-6003, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Folin & Ciocalteu's phenol reagent	F9252, A-6003, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Isolationspuffer (pH 7,15)	200 mM Mannitol 50 mM Saccharose 5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 5 mM MOPS 0,1% BSA fatty acid free 1 mM EGTA
1,15% Kaliumchloridlösung	1,15 g KCl in 100 ml VE Wasser, kühl lagern
Lowry Reagenz A	10 g Natriumcarbonat in 500 ml 0,1 M Natriumhydroxid auf Eis gelöst
Lowry Reagenz B	2 g Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat in 100 ml Aqua dest. gelöst
Lowry Reagenz C	1 g Kupfersulfatpentahydrat in 100ml Aqua dest. gelöst
n-Butanol	101990, Merck, Darmstadt, Deutschland
1% Phosphorsäure	84 ml Aqua dest. mit 1 ml 85% Phosphorsäure, kühl gelagert
85% Phosphorsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Respirationspuffer (pH 7,4)	130 mM Kaliumchlorid 5 mM Kaliumdihydrogenphosphat 20 mM MOPS 2,5 mM EGTA 1 μ M Natriumdiphosphat 0,1% BSA

0,6% 2-Thiobarbitursäure-Lösung | 0,3 g TBA in 50 ml Aqua dest.
Tabelle 3: Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils

2.4 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Teils

ADP, Adenosin-5'-Diphosphat-Monokaliumsalz-Dihydrat	A5285, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
BSA, Bovine Serum Albumin	K45-001, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
BSA, Bovine Serum Albumin (fatty acid free)	A-6003, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
CCCP, Carbonylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon	C2759, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Cytochrome c	C2037, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
EGTA, Ethylenglykol-bis-(aminoethylether)-tetraessigsäure	3054.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glutamat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	60130, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	104873, Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat	108087, Merck, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfatpentahydrat	102790, Merck, Darmstadt, Deutschland
Malat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mannitol	4175.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MDA, Malonyldialdehyd	108383, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
3-MOPS, 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	6979.4, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdiphosphat	106591, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	71351, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid	106462, Merck, Darmstadt, Deutschland
Oligomycin	495455, Calbiochem by Merck, Darmstadt, Deutschland
Rotenon	477737, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Saccharose	4621.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumsulfid	S4762, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Succinat	S2378, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
2-Thiobarbitursäure	108180, Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteil

3 Methoden

3.1 Tierexperimenteller Teil

3.1.1 Genehmigung

Die Versuche wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV, Recklinghausen, Deutschland) des Landes Nordrhein-Westfalen (Az.: 84-02.04.2016.A398) im Labor der Experimentellen Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Alle an den Tierversuchen beteiligten Personen verfügten über einen Fachkundenachweis gemäß des Artikel 9 des geltenden Tierschutzgesetzes.

3.1.2 Versuchstiere

Die insgesamt 103 männlichen Wistar-Ratten (ca. 3 Monate alt, Körpergewicht zwischen 320g und 380g) stammten aus der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität. In der Auswertung wurden die Ergebnisse von 77 Versuchstieren berücksichtigt. Während des gesamten Versuches wurden die Tiere in Typ III Käfigen (Bodenfläche 810 cm²) bei Zimmertemperatur in einem 12-Stunden Hell-Dunkel-Zyklus gehalten und hatten Futter und Wasser *ad libitum*.

3.1.3 Versuchsablauf

In der hier durchgeführten randomisierten, Placebo-kontrollierten *in vivo* Studie gab es insgesamt 8 Versuchsgruppen (siehe Tabelle 5). Zu Beginn des Versuches wurden die Tiere mit jeweils zwei Substanzen, Pravastatin (200 µg/kg KG in Kochsalzlösung (NaCl)) oder NaCl und PPAR α -Blocker (1 mg/kg KG in 5% Dimethylsulfoxid (DMSO)) oder 5% DMSO, vorbehandelt. Nach 18 Stunden wurde mittels der CASP-Methode eine abdominale Sepsis induziert, indem zwei Stents in das *Colon ascendens* implantiert wurden. Die Kontrollgruppen (Sham) wurden ebenfalls operiert, durch eine sterile Laparotomie kam es aber nicht zum Krankheitsbild der Sepsis. Nach weiteren 24 Stunden mit kontinuierlicher Versorgung mit Wasser, Futter und Analgetika erfolgte nach einer dreistündigen Intervention die tierschutzkonforme Tötung durch Exsanguination in Narkose und die Organentnahme (siehe Abb. 4). Alle zuvor genannten Schritte wurden fachkundlich von Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus (Projektleiterin), Frau Claudia Hansen (Tierärztin) oder Frau Katharina Gross (Tierärztin) durchgeführt. Die Untersuchung der mitochondrialen Funktion wurde hinsichtlich der Gruppeneinteilung verblindet durchgeführt.

Gruppe	Versuch	n
Gruppe 1	Sham + NaCl s.c. + 5% DMSO i.p.	10
Gruppe 2	Sham + Pravastatin s.c. + 5% DMSO i.p.	10
Gruppe 3	Sham + Pravastatin s.c. + PPAR α Blocker i.p.	10
Gruppe 4	Sham + NaCl s.c. + PPAR α Blocker i.p.	10
Gruppe 5	CASP + NaCl s.c. + 5% DMSO i.p.	10
Gruppe 6	CASP + Pravastatin s.c. + 5% DMSO i.p.	8
Gruppe 7	CASP + Pravastatin s.c. + PPAR α Blocker i.p.	9
Gruppe 8	CASP + NaCl s.c. + PPAR α Blocker i.p.	10

Tabelle 5: Gruppenzuordnung

Insgesamt gab es acht Versuchsgruppen in Abhängigkeit von den vier verschiedenen Möglichkeiten der Vorbehandlung: Pravastatin (200 μ g/kg KG in Kochsalzlösung (NaCl)) oder NaCl und Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptor- α (PPAR α)-Blocker (1 mg/kg KG in 5% Dimethylsufoxid (DMSO)) oder 5% DMSO und den zwei verschiedenen Operationsmethoden (CASP = *Colon ascendens stent peritonitis* oder Sham). s.c. = Subcutan, i.p. = intraperitoneal. Anzahl (n) insgesamt = 77; n Sham = 40; n CASP = 37).

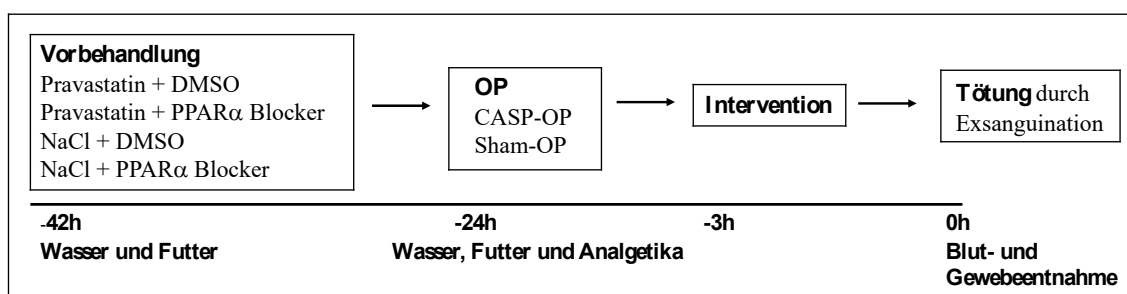


Abb. 4: Tierexperimenteller Versuchsablauf

18 Stunden (h) nach der Vorbehandlung mit jeweils zwei Substanzen, Pravastatin oder Kochsalzlösung (NaCl) und dem Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptors- α (PPAR α)-Blocker oder Dimethylsufoxid (DMSO), erfolgte die *colon ascendens stent peritonitis* (CASP)- bzw. Sham-OP. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte dann postinterventionell die Tötung und Organentnahme.

3.1.4 Vorbehandlung

Zu Beginn des Versuchs wurden die Versuchstiere randomisiert mit jeweils zwei Substanzen vorbehandelt. Den Versuchstieren wurde entweder Pravastatin (200 μ g/kg KG in 0,7 ml NaCl) oder 0,7 ml NaCl *subkutan* (s.c.) und ein PPAR α -Blocker (GW6471; 1 mg/kg KG in 0,6 ml 5% DMSO) oder 0,6 ml 5% DMSO *intraperitoneal* (i.p.) appliziert. Die Kontrollen mit NaCl und DMSO wurden durchgeführt, da es sich hierbei um die Trägersubstanz des Pravastatins bzw. das organische Lösungsmittel für den PPAR α -Blocker handelt.

3.1.5 Sham-/CASP-OP

Um die abdominelle Sepsis in den Versuchstieren zu erzeugen, wurde eine CASP-OP (Traeger et al., 2010) durchgeführt. Bei den Sham-Tieren verlief der folgende Ablauf identisch, allerdings wurde nur ein Stent von außen an die *Tunica serosa* der Darmwand befestigt, ohne diese zu penetrieren.

Die Tiere wurden inhalativ mit Sevofluran in die Narkose eingeleitet und anschließend auf dem OP-Tisch gelagert. Die Narkose wurde in einer Sauerstoffglocke unter Spontanatmung mit 3-3,5 Vol. % Sevofluran bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO_2) von 0,5 aufrechterhalten. Zur Analgesie bekamen die Versuchstiere eine gewichtsadaptierte Menge Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) s.c. appliziert. Vor Beginn des Eingriffs wurde die Narkosetiefe mittels Schmerzreiz überprüft. Der Bauch wurde mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt, desinfiziert und in der Mittellinie über die Länge von 2 cm geöffnet. Das *Caecum* wurde mit Hilfe zweier befeuchteter Tupferstäbe aufgesucht, nach außen gelagert und zwei 16 G Stents (am colocaecalem Übergang und 1 cm weiter dorsal) wurden platziert. Durch leichten Druck auf den Darm wurden die Stents mit Kot gefüllt, sodass ein kontinuierlicher Ausfluss ermöglicht wurde. Im Anschluss wurde der Darm ins Peritoneum rückverlagert und erneut mit Ringerlösung befeuchtet. Die Muskelschicht wurde mit einem 4-0 Faden fortlaufend und die Haut mit 6-0 Einzelknopfnähten zugenäht. Die OP-Wunde wurde nun noch einmal desinfiziert und begutachtet. Die OPs dauerten insgesamt zirka 15 min. Nach dem Wiegen wurden die Tiere zurück in den Käfig gelegt und anschließend alle 6-8 Stunden erneut gewogen, analgetisch mit Buprenorphin versorgt und mittels des SRSS (*Septic rat severity score*, siehe S. 53) evaluiert. Bei SRSS Werten > 10 wurden die Tiere mittels Pentobarbital (120 mg/kg KG i.p.) euthanasiert.

3.1.6 Intervention

Zu Beginn der Intervention wurden die Tiere erneut gewogen und der SRSS erhoben. Zur Narkoseeinleitung wurde Pentobarbital i.p. (60 mg/kg KG) und Buprenorphin s.c. (0,05 mg/kg KG in 0,6 ml NaCl) verabreicht. Die Tiere wurden auf einer Wärmematte platziert und zur Temperaturmessung wurde ein Thermometer rektal eingeführt. Die Narkosetiefe wurde durch einen Schmerzreflex geprüft. Im Folgenden wurden die Tiere tracheotomiert und bekamen einen venösen (*V. jugularis*) sowie arteriellen (*A. carotis communis*) Zugang. Als Standardbeatmungsparameter wurde eine AF von 75/min sowie ein Tidalvolumen von 1,8 ml eingestellt. Im weiteren Versuch wurden diese Parameter individuell angepasst. Computergestützt wurde die Atemflussgeschwindigkeit visualisiert. Nach Anlage der Zugänge wurde venös 1 ml mit 2 mg Pancuronium (1/2 Ampulle der 4 mg/2 ml Injektionslösung) als Muskelrelaxans appliziert. Anschließend wurde über den Zugang zur Narkoseaufrechterhaltung Pentobarbital (10 mg/kg KG/h) verabreicht. Über den arteriellen Zugang wurde mittels Perfusor 4 ml/h

Ringerlösung als Volumensubstitution gegeben und der Blutdruck gemessen, der ebenfalls computergestützt visualisiert wurde. Nach der Anlage der Katheter wurde nun laparotomiert und die Bauchnaht wieder aufgetrennt. Das *Caecum* wurde nach extrakorporal vorverlagert und die Stents begutachtet. Um für weitere Fragestellungen, die nicht Teil dieser Dissertation sind, die Oxygenierung der Mikrozirkulation in der Leber und im Colon zu messen, wurden 2 Messsonden auf die jeweiligen Organe platziert. Das O2C-Gerät hat diese Messwerte visualisiert. Nach einer *Baseline*-Messung von 30 min erfolgten nun fünf Blutgasanalysen (BGA)-Messungen im Abstand von 30 min Intervallen, indem am arteriellen Zugang 0,2 ml Blut abgenommen wurden. Anhand der BGA konnten die Atemparameter AF und Tidalvolumen optimiert werden. Nach der letzten Intervallphase wurde das Versuchstier über den arteriellen Zugang exsanguiniert. Direkt im Anschluss wurde das Gewebe entnommen.

3.1.7 Gewebeentnahme

Es wurde ein zirka 1x1 cm großes Leberstück des rechten Leberlappens entnommen und direkt in ein 50 ml Becherglas mit Isolationspuffer auf Eis gelagert. Unter kontinuierlicher Kühlung in einer Styroporkiste mit Eis begann direkt im Anschluss der laborexperimentelle Teil.

3.2 Laborexperimenteller Teil

Im folgenden laborexperimentellen Teil wurde die MF am vorbehandelten Lebergewebe analysiert: hierfür wurde das Gewebe homogenisiert, die in der Gewebeprobe enthaltene Proteinmenge mittels Lowry-Methode bestimmt und in der Respirometrie die Aktivität der OxPhos ermittelt.

3.2.1 Gewebhomogenisierung

Das Lebergewebe wurde auf ein Gewicht von 1 g verkleinert mit 10 ml Isolationspuffer mehrfach gespült und mittels einer Schere in 2-3 mm³ große Stücke geschnitten. Der Puffer wurde erneut weggegossen und das Becherglas mit 10 ml Isolationspuffer befüllt. Die Gewebhomogenisierung erfolgte mittels Potter-Elvehjem-Verfahren (fünf Mal, 2000 *rounds per minute* (*rpm*)). Hierbei wurden durch die entstehenden Scherkräfte zwischen dem Kolben und dem Glas die Zellen des Lebergewebes im Puffer gesprengt und es entstand ein Homogenat mit erhaltenen Zellorganellen. Das Homogenat wurde anschließend durch eine aufgeklappte unsterile Kompresse in ein 50 ml Falcon gefiltert und darauf auf Eis gelagert.

3.2.2 Proteinbestimmung nach Lowry

3.2.2.1 allgemeines Prinzip

Die Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951) ist ein Verfahren zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge in einer Probe und eine der am meisten zitierten laborexperimentellen Methoden (Van Noorden et al., 2014). Das kolorimetrische Verfahren beruht auf 2 Schritten: zuerst wird ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung gebildet, der darauf durch Zugabe einer Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagenz (Folin) diese und sein eigenes Kupfer reduziert. In Abhängigkeit von der vorhandenen Proteinmenge färbt sich die Lösung unterschiedlich intensiv blau. Die genaue Proteinmenge kann mithilfe einer Standardreihe mit *bovine serum protein* (BSA) anschließend mittels Photometrie bestimmt werden.

3.2.2.2 Ablauf

Für die Proteinmessung wurden zwei Lösungen, Lösung 1 und 2, benötigt. Zu Beginn wurde Lösung 1, bestehend aus 14 ml Reagenz A und jeweils 140 µl Reagenz B und C (siehe S. 16), hergestellt. Die verwendeten Lösungen wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Je 500 µl Lösung 1 wurden nun in zehn 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Von den zehn Gefäßen für die Proteinbestimmung waren sieben (K0.-K6.) für die Standardreihe und drei (L1.-L3.) für das Leberhomogenat. Um in der Photometrie Angaben zur Proteinkonzentration im Leberhomogenat machen zu können, wurde eine Standardreihe benötigt. Die Standardreihe wurde mittels BSA (1 mg /ml) in den folgenden Konzentrationen in beschrifteten Mikroreaktionsgefäßen (K0-K6) hergestellt:

- K0: 500 µl Aqua dest. (Negativkontrolle)
K1: 62,5 µg BSA /ml Aqua dest.
K2: 125 µg BSA /ml Aqua dest.
K3: 250 µg BSA /ml Aqua dest.
K4: 500 µg BSA /ml Aqua dest.
K5: 750 µg BSA /ml Aqua dest.
K6: 1000 µg BSA/ml Aqua dest. (Positivkontrolle)

Die hergestellte Standardreihe wurde anschließend auf Eis gelagert. Von dem Homogenat wurden nach dem Vortexen jeweils drei Mikroreaktionsgefäße (L1-L3) mit 990 µl Aqua dest. und 10 µl Homogenat angefertigt. Aus der Standardreihe sowie aus den verdünnten Homogenaten wurden nach dem Vortexen 100 µl in die Gefäße mit Lösung 1 pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Lösung 2 wurde aus 2 ml Aqua dest. und 2 ml Folin hergestellt und gut gevortext. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 µl Lösung 2 in die alle Proben pipettiert und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils zwei Mal 200 µl aus den Mikroreaktionsgefäßen auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Bei einer Wellenlänge von 750 nm wurde in einem Multi-Detektions-Plattenlesegerät die Gesamtproteinkonzentration photometrisch bestimmt.

3.2.3 Respirometrie

3.2.3.1 Biochemischer Hintergrund

Während der OxPhos entsteht in den Mitochondrien in vielen aufeinander folgenden Reaktionen ATP, welches die wichtigste Energiespeicherform des Körpers darstellt. Über die verschiedenen Abbauege der Nahrungsbestandteile Proteine, Fette und Kohlenhydrate werden direkt oder über Acetyl-CoA im Citratzyklus die Reduktionsäquivalente Nicotinamidadenindinukleotid (NADH/H⁺) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) produziert. Diese werden darauf in die Atmungskette zum Elektronentransport über die innere Mitochondrienmembran geschleust. Ebenfalls wird im Verlauf Sauerstoff benötigt. So wird in der Atmungskette über insgesamt vier Redoxsystem-Komplexe ein chemischer und elektrischer Gradient durch den Protonentransport über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut. Die ATP-Synthase nutzt nun die Energie des Protonengradienten zwischen der Mitochondrienmatrix und dem Intermembranraum (IMR) der Mitochondrien, um ATP zu erzeugen. Insgesamt werden pro NADH/H⁺, welches in die Atmungskette eintritt, 10 Protonen in den IMR gepumpt und 2,5 Moleküle ATP gewonnen. Pro FADH₂, welches erst in Komplex II eintritt, entstehen über 6 gepumpte Protonen 1,5 ATP. Reguliert wird die OxPhos über den Energiestatus: bei einem Energieüberschuss liegt wenig Adenosindiphosphat (ADP) vor, welches von der ATP-Synthase umgesetzt werden kann. Durch die Inaktivität des Enzyms stauen sich die Protonen im IMR zurück und es kommt zu einer

Hemmung der Komplexe der Atmungskette und des Citratzyklus. Manipulativ gehemmt werden kann die Atmungskette außerdem auf verschiedene Wege. Barbiturate und Rotenon hemmen den Komplex I, Blausäure den Komplex 4 und Oligomycin die ATP-Synthase. Entkopplung der Atmungskette, also die Ablösung des Elektronentransports von der ATP-Synthase, erfolgt durch Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP) sowie physiologisch durch Thermogenin zur zitterfreien Wärmebildung.

3.2.3.2 Prinzip

Bei der Respirometrie erfolgt die Messung der MA über die Aktivität der OxPhos. Diese wird durch die Sauerstoffkonzentration der Lösung in der Messkammer erfasst, die mit der Zunahme der OxPhos und damit steigender ATP Konzentration abnimmt. Über die Sauerstoffkonzentration wird dann die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit ermittelt.

Gemessen wurde mittels einer Clark-Elektrode im Respirometer. Die Lösung in der Messkammer des Respirometers wurde thermisch konstant auf 30° Celsius durch ein die Messkammer umspülendes Wasser, erhitzt durch ein Typ ED Wasserbad, gehalten. Außerdem wurde die Lösung kontinuierlich von einem Magnetrührer durchmischt. Die Kammer war abgeschlossen, durch eine kleine Öffnung konnten mittels Mikrospritzen Substanzen hinzugefügt werden. Um die MA ab Komplex I zu ermitteln, wurden als Substanzen Glutamat und Malat hinzugefügt. Das Glutamat ermöglicht über α -Ketoglutarat den Shuttle von Malat in die mitochondriale Matrix, wo über die mitochondriale Malatdehydrogenase NADH/H⁺ als Substrat für den Komplex I bereitgestellt wird. Für die Analyse der Atmungskette nach Stimulation über Komplex II wurde vor Messbeginn in das Homogenat Rotenon als Inhibitor des Komplexes I hinzugegeben. Im Verlauf der Messung wurde Succinat appliziert, welches im Komplex II, der Succinat-Dehydrogenase, zu Fumarat oxidiert wird. Über FADH₂, welches hierbei reduziert wird, kann die Atmungskette weiter ablaufen.

3.2.3.3 Ablauf

Zu Beginn jeder Messung wurde das Gerät kalibriert. Die Positivkontrolle erfolgte mittels Aqua dest. (Referenzwert 500–700 pA). Für die Negativkontrolle wurde in Aqua dest. gelöstes Natriumsulfid verwendet, welches Sauerstoff bindet und so zu Werten von <50 pA führte.

Die Messung erfolgt mit einem Gemisch aus dem zuvor hergestellten Leberhomogenat und Respirationspuffer, was auf 4 mg Protein/ml adjustiert wurde.

500 μ l des Gemisches wurde in die Messkammer der Respirometers pipettiert und die Messung wurde gestartet. Insgesamt wurden pro Versuch acht Messungen durchgeführt: je 3 Messung nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I und II sowie eine Kontrolle für Komplex I und II (siehe Abb. 5). Nach Messbeginn wurden nach einer Minute Substrate hinzugegeben: für den Komplex I Glutamat (2,5 mM) und Malat (2,5 mM), die vorher in eine Spritze zusammen

aufgezogen wurden und für den Komplex II wurde vor Messbeginn Rotenon ($0,5 \mu\text{M}$) zur Hemmung von Komplex I in die Homogenat-Puffer-Lösung hinzugegeben und anschließend erfolgte die Zugabe von Succinat (10 mM). Nach einer weiteren Messminute wurden jeweils ADP ($250 \mu\text{M}$) hinzugefügt. Insgesamt dauerten die Messungen zirka 5 Minuten. Für die Kontrollversuche (s.u.) wurden jeweils nach einer weiteren Minute Cytochrom c ($2,5 \mu\text{M}$) und dann Oligomycin ($0,05 \mu\text{g/ml}$) hinzugefügt. Darauf folgte im 30 Sekunden Abstand die dreimalige Zugabe von Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP; $0,5 \mu\text{M}$). Die Löslichkeit von Sauerstoff wurde im Versuch gemäß dem Strathkelvin-Gerätehandbuch mit $223 \mu\text{mol O}_2/\text{l}$ bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ angenommen. Die gemessenen Respirationsraten wurden anschließend in Nanomol pro Minute pro Milligramm Protein angegeben (siehe Abb. 6).

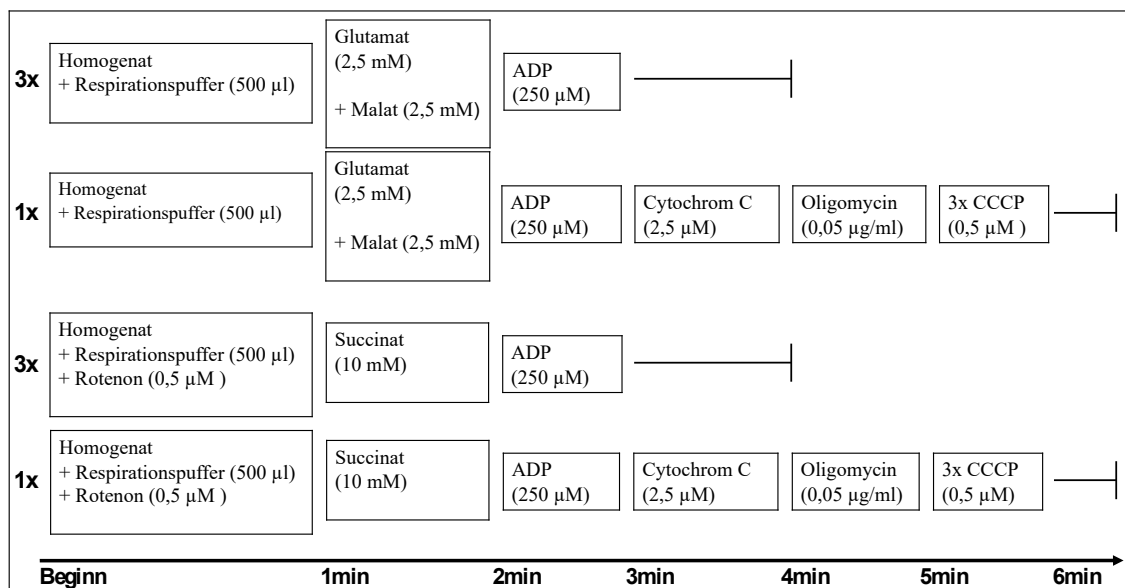


Abb. 5: Versuchsablauf Respirometrie

Die Versuche ($n = 8$) begannen mit einem Gemisch aus Homogenat und Respirationspuffer und für die Analyse des Komplexes II ebenfalls Rotenon. Nach 1 Minute (min) wurden die Substrate hinzugefügt, nach einer weiteren Minute Adenosindiphosphat (ADP) als Stimulator der Atmungskette. Für die Kontrollversuche wurden im Anschluss jeweils nach einer weiteren Minute die Kontrollsubstanzen hinzugefügt. μl = Mikroliter, μM = Mikromolar, mM = Millimolar, $\mu\text{g/ml}$ = Mikrogramm/Milliliter.

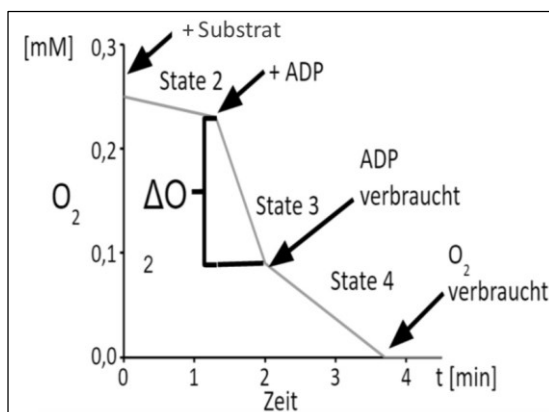


Abb. 6: Messwerte der Respirometrie

Dargestellt ist die Sauerstoffkonzentration in Nanomolar (nM) über die Zeit (t) in Minuten (min) in Abhängigkeit von der Zugabe verschiedener Substanzen. ADP = Adenosindiphosphat, O_2 = Sauerstoff. Quelle: in Anlehnung an Simonnet et al., 2014.

3.2.3.4 Messwerte

State 2 repräsentiert die basale Geschwindigkeit der OxPhos. Durch Zugabe der Substrate für den Citratzyklus werden die Reduktionsäquivalente NADH/H^+ für Komplex I und FADH_2 für Komplex II hergestellt, die Atmungskette ist dann aktiv, Sauerstoff wird verbraucht und ATP hergestellt.

State 3 beginnt mit der Zugabe von ADP, welches die OxPhos und den Sauerstoffverbrauch auf ein Maximum ansteigen lässt, da ADP als stärkster Stimulator der Atmungskette wirkt. Ebenfalls wird hier die Menge an verbrauchtem Sauerstoff in mM (ΔO) bestimmt.

State 4 stellt sich ein, nachdem das ADP verbraucht wurde und somit erreicht die OxPhos wieder ihre basale Geschwindigkeit, die allerdings etwas höher als State 2 sein kann, da das zuvor hergestellte ATP wieder in ADP und Phosphat dissoziiert und ADP die Atmungskette wiederum stimuliert.

Der *Respiratory Control Index (RCI)* spiegelt die Kopplung zwischen Atmungskette und ATP-Synthese wider. Je höher der RCI Wert, umso stärker die Kopplung.

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

Die *Adenosindiphosphat-oxygen Ratio (ADP/O-Ratio)* verdeutlicht die Effizienz der OxPhos und ergibt sich aus dem ADP, welches pro Sauerstoffatom, das während State 3 verbraucht wurde, in ATP phosphoryliert wurde.

3.2.3.5 Kontrollsubstanzen

Cytochrom c wurde im State 3 in die Messkammer appliziert, um die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran zu prüfen. Cytochrom c befindet sich frei beweglich in der inneren Membran. Kommt es zu einem Defekt der äußeren Membran, so löst sich das Cytochrom c und die Atmungskette stagniert. Wird nun Cytochrom c hinzugegeben, so würde der Sauerstoffverbrauch durch Induktion der OxPhos deutlich steigen.

Oligomycin dient der Überprüfung des Membranpotenzials. Als Makrolid-Antibiotikum hemmt es die ATP-Synthase und somit den Rückstrom der Protonen in die Mitochondrienmatrix. Die rückgestauten Protonen im IMR hemmen wiederum die Atmungskette, die dann nur noch der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials dient und dem Ruhezustand in State 2 entspricht. Ist das Membranpotential durch ein Leck in der inneren Mitochondrienmembran bereits gestört, kommt es dagegen zu einem Anstieg der Atmungskette, da durch einen erhöhten Protonentransport versucht wird, das Membranpotenzial zu erhalten.

CCCP dient als Entkoppler der Atmungskette. Durch den von der ATP-Synthase unabhängigen Transport von Protonen zurück in die Mitochondrienmatrix steigen die Aktivität der Atmungskette und dadurch der Sauerstoffverbrauch maximal an, um so das Membranpotential aufrecht zu erhalten.

3.2.4 MDA Assay

Zum Nachweis von oxidativem Stress im Gewebe wurde ein Endprodukt der Lipidoxidation, Malonyldialdehyd (MDA), nachgewiesen (Tsikas, 2017). Hierfür wurde eine Verbindung von MDA mit Thiobarbitursäure (TBA) hergestellt, die photometrisch nachgewiesen werden konnte (Janero, 1990).

Zu Beginn wurde 50 mg Lebergewebe, welches zuvor bei -80 °C gelagert wurde, in 500 µl 1,15 % Kaliumchloridlösung (KCl) homogenisiert. Die Mikroreaktionsgefäße wurden darauf auf Eis gelagert.

Für die Standardreihe aus MDA und KCl wurden fünf verschiedenen Verdünnungen angefertigt:

20 µM:	1 µl MDA-Standard + 302,5 µl KCl
20 nM:	1 µl aus 20 µM-Lösung und 999 µl KCl
10 nM:	500 µl 20 nM-Lösung und 500 µl KCl
5 nM:	500 µl 10 nM-Lösung und 500 µl KCl
2,5 nM:	500 µl 5 nM-Lösung und 500 µl KCl
0 nM:	500 µl KCl

Darauf wurde 250 µl der jeweiligen Standardlösung bzw. der Gewebehomogenate mit 1,5 ml 1% Phosphorsäure und 0,5 ml 0,6% TBA in ein 15 ml Falcon gegeben und gevortext. Die Proben wurden darauf 45 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Je nach MDA Gehalt haben die Proben eine pinke Farbe angenommen. In jedes Falcon wurden nun 2 ml n-Butanol hinzugegeben und die Proben 15 min bei 3500 *rpm* zentrifugiert. Von den Proben wurden nun 200 µl der Lösung mit je 200 µl KCl in ein Eppendorf Gefäß verdünnt und anschließend gevortext. Je 200 µl wurden nun als Doppelwerte in eine 96-Well-Platte pipettiert. Gemessen wurden im Anschluss im Multi-Detektions-Plattenlesegerät die Gesamtkonzentration bei Wellenlängen von 535 nm und 520 nm.

Um die Konzentrationen des nachgewiesenen MDA auf die Gesamtproteinkonzentration in den Proben des Lebergewebes zu beziehen, wurden ebenfalls wie in Kapitel 3.2.2 mittels des Lowry Verfahrens die Proteinkonzentrationen in den im Versuch hergestellten Gewebehomogenaten ermittelt. Im Anschluss wurde die MDA Menge als nmol MDA/mg Protein angegeben.

3.3 Statistik

Für die statistische Datenanalyse wurde das Programm GraphPad Prism 8.0 verwendet. Es wurden mit den parametrischen Daten einfaktorielle Varianzanalysen (*one-way ANOVA*) durchgeführt. Für die Ermittlung von Unterschieden zwischen den Gruppen erfolgten anschließend Tukey's *post-hoc*-Tests. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ betrachtet.

4 Ergebnisse

Um den Einfluss von Pravastatin auf die hepatische MF in nicht-septischen und septischen Tieren zu untersuchen, wurde die Atmungskette getrennt über die Komplexe I und II durch Zugabe der jeweiligen Substrate analysiert. Außerdem wurde geprüft, ob ein möglicher Effekt des Pravastatins auf die MF über die Modulation des intrazellulären PPAR α erfolgt. Dafür wurde ein selektiver PPAR α -Blocker GW6471 eingesetzt. Als Kontrolle diente 0,9% NaCl als Trägersubstanz des Pravastatins und 5% DMSO als Trägersubstanz des PPAR α -Blockers GW6471. Die Ergebnisse zeigten weder im nicht-septischen noch im septischen Lebergewebe signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der Vorbehandlung. Somit kann keine Schlussfolgerung über eine PPAR α -vermittelte Wirkung von Pravastatins auf die MF der Leber gezogen werden. Ebenfalls zeigten die Analysen des MDA als Indikator für oxidativen Stress keine Beeinflussung durch die Vorbehandlungen.

4.1 Einfluss auf die MF unter nicht-septischen Bedingungen

4.1.1 Messung nach Zugabe von Glutamat und Malat (Komplex I)

Bei der Untersuchung des Einflusses von Pravastatin auf die MF im Lebergewebe unter nicht-septischen Bedingungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier verschiedenen Vorbehandlungen (siehe Abb. 7). Untersucht wurde der Einfluss einer Vorbehandlung mit Pravastatin, Pravastatin und einem PPAR α -Blocker GW6471, dem PPAR α -Blocker alleine und einer Kontrolle mit NaCl und 5% DMSO auf die gesamte Atmungskette ab Komplex I. Hierfür wurden während des Versuches die Substrate Glutamat und Malat appliziert. Keine der Substanzen scheint einen Einfluss auf die Effizienz der OxPhos (ADP/O Ratio) (Abb. 7 A: Kontrolle: $3,97 \pm 1,35$; GW 6471: $3,96 \pm 1,33$; Pravastatin: $3,95 \pm 0,53$; Pava/GW 6471: $4,25 \pm 1,33$) sowie die Kopplung von Atmungskette und ATP-Synthese (RCI) ab Komplex I in der Atmungskette zu haben (Abb. 7 B: Kontrolle: $10,93 \pm 1,48$; GW 6471: $11,65 \pm 1,33$; Pravastatin: $10,62 \pm 1,83$; Prava/GW 6471: $10,9 \pm 1,98$).

4.1.2 Messung nach Zugabe von Succinat (Komplex II)

Um den Einfluss der verschiedenen Vorbehandlungen auf die Atmungskette nach Stimulation über Komplex II zu analysieren, wurde vor Versuchsbeginn Rotenon zur Hemmung des Komplex I in die Probe zugefügt und während des Versuchs Succinat als Substrat von Komplex II appliziert. Die Effizienz der OxPhos (ADP/O Ratio) ab Komplex II der Atmungskette zeigte keine signifikante Beeinflussung durch die verschiedenen Vorbehandlungen mit Pravastatin alleine, mit dem PPAR α Blocker als Ergänzung, dem PPAR α -Blocker alleine oder einer Kontrolle mit NaCl und 5% DMSO (Abb. 8 A: Kontrolle: $2,53 \pm 0,95$; GW 6471: $2,65 \pm 0,7$; Pravastatin: $2,38 \pm 0,51$; Prava/GW 6471: $2,52 \pm 0,95$). Ebenfalls konnte sich ein Einfluss der Vorbehandlungen auf die

Kopplung von Atmungskette und ATP-Synthese (RCI) nicht verdeutlichen (Abb. 8 B: Kontrolle: $8,24 \pm 0,79$; GW 6471: $8,63 \pm 1,1$; Pravastatin: $8,06 \pm 1,03$; Prava/GW 6471: $8,02 \pm 0,8$).

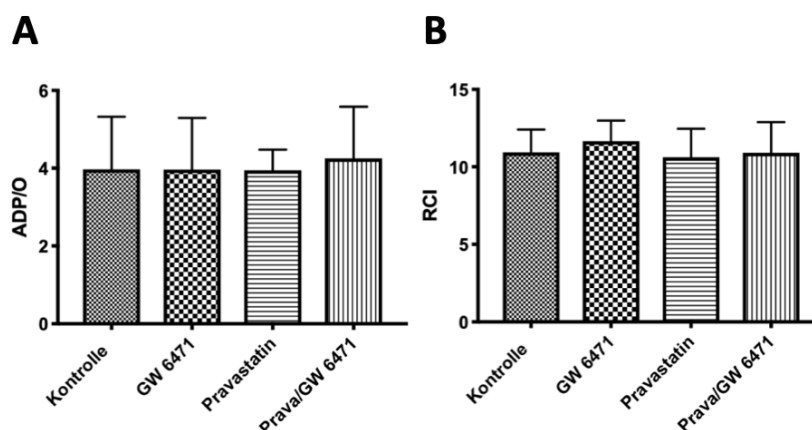


Abb. 7: Sham Komplex I

Die verschiedenen Vorbehandlungen (Kontrolle mit NaCl und 5% DMSO, PPAR α -Blocker GW6471, Pravastatin und eine Kombination aus Pravastatin und dem PPAR α -Blocker) zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der Oxidativen Phosphorylierung, errechnet als *Adenosindiphosphat-oxygen Ratio* (ADP/O-R) aus der zugegebenen ADP Menge und dem verbrauchten Sauerstoff (A) sowie auf die Kopplung zwischen Atmungskette und ATP-Synthese, erkennbar am *Respiratory Control Index* (RCI) als Maß für die Kopplung zwischen Atmungskette und ATP (Adenosintriphosphat) Synthese (State 3/State 2) (B) bei nicht-septischen Tieren nach Zugabe von Glutamat und Malat. MW \pm SD; n = 40.

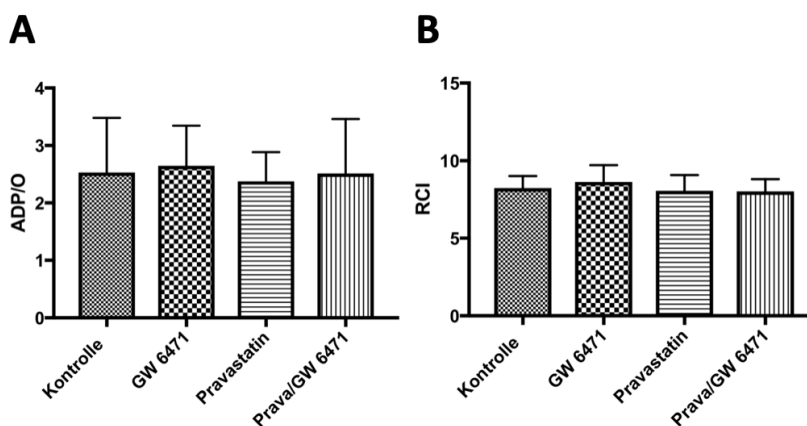


Abb. 8: Sham Komplex II

Die unterschiedlichen Vorbehandlungen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Effizienz der Oxidativen Phosphorylierung, errechnet als *Adenosindiphosphat-oxygen Ratio* (ADP/O-R) aus der zugegebenen ADP Menge und dem verbrauchten Sauerstoff (A) sowie die Kopplung zwischen Atmungskette und ATP-Synthese (B), erkennbar am *Respiratory Control Index* (RCI) als Maß für die Kopplung zwischen Atmungskette und ATP (Adenosintriphosphat) Synthese (State 3/State 2) (B) im nicht-septischen Lebergewebe nach Zugabe von Succinat. MW \pm SD; n = 40.

4.2 Einfluss auf die MF unter septischen Bedingungen

4.2.1 Messung nach Zugabe von Glutamat und Malat (Komplex I)

Ebenfalls wurde der Einfluss von Pravastatin auf die MF in septischen Tieren untersucht (siehe Abb. 9). Auch unter septischen Bedingungen zeigte sich kein signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Vorbehandlungen auf die Effizienz der OxPhos (Abb. 9 A: Kontrolle: $3,23 \pm 0,77$; GW 6471: $3,44 \pm 1,27$; Pravastatin: $3,58 \pm 1,03$; Prava/GW 6471: $4,02 \pm 0,79$) und auf die Kopplung zwischen Atmungskette und ATP-Synthese (Abb. 9 B: Kontrolle: $13,08 \pm 2,13$; GW 6471: $10 \pm 2,88$; Pravastatin: $12,04 \pm 2,49$; Prava/GW 6471: $11,65 \pm 1,99$).

4.2.2 Messung nach Zugabe von Succinat (Komplex II)

Bei der Untersuchung der MF nach Stimulation der Atmungskette über Komplex II (siehe Abb. 10) in Abhängigkeit von den vier verschiedenen Vorbehandlungen (Kontrolle, GW 6471, Pravastatin und Prava/GW 6471) zeigte sich im septischen Lebergewebe kein signifikanter Unterschied weder auf die Effizienz der OxPhos (Abb. 10 A: Kontrolle: $2,21 \pm 0,77$; GW 6471: $2,14 \pm 0,79$; Pravastatin: $2,18 \pm 0,73$; Prava/GW: 6471 $2,76 \pm 0,66$) noch auf die Kopplung zwischen Atmungskette und ATP-Synthese (Abb. 10 B: Kontrolle: $9,49 \pm 1,09$; GW 6471: $8,32 \pm 0,82$; Pravastatin: $8,41 \pm 1,04$; Prava/GW 6471: $8,84 \pm 2,64$).

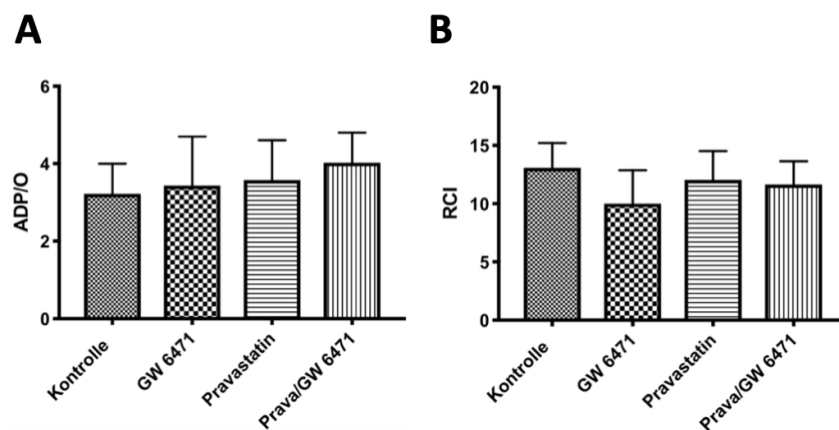


Abb. 9: CASP Komplex I

Die verschiedenen Vorbehandlungen zeigten keinen Einfluss auf die Effizienz der Oxidativen Phosphorylierung, errechnet als *Adenosindiphosphat-oxygen Ratio* (ADP/O-R) aus der zugegebenen ADP Menge und dem verbrauchten Sauerstoff (A) sowie Kopplung zwischen Atmungskette und ATP-Synthese, erkennbar am *Respiratory Control Index* (RCI) als Maß für die Kopplung zwischen Atmungskette und ATP (Adenosintriphosphat) Synthese (State 3/State 2) (B) im Lebergewebe septischer Tiere nach Zugabe von Glutamat und Malat. MW \pm SD; n = 37.

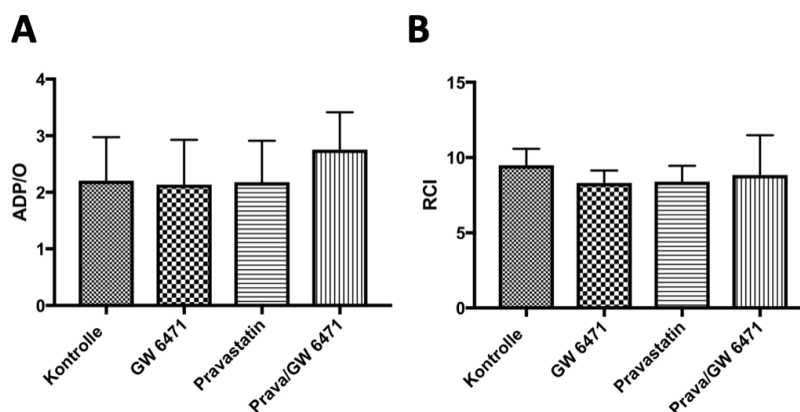


Abb. 10: CASP Komplex II

Die unterschiedlichen Vorbehandlungen zeigten keine Unterschiede in der Effizienz der OxPhos, errechnet als *Adenosindiphosphat-oxygen Ratio* (ADP/O-R) aus der zugegebenen ADP Menge und dem verbrauchten Sauerstoff (A) sowie die Kopplung zwischen Atmungskette und ATP-Synthese, erkennbar am *Respiratory Control Index* (RCI) als Maß für die Kopplung zwischen Atmungskette und ATP (Adenosintriphosphat) Synthese (State 3/State 2) (B) im Lebergewebe septischer Tiere nach Zugabe von Succinat. MW \pm SD; n = 37.

4.3 MDA-Assay

4.3.1 Einfluss auf die MDA Menge unter nicht-septischen Bedingungen

Bei der Untersuchung der Menge des MDA pro mg Protein als Indikator für oxidativen Stress im nicht-septischen Lebergewebe (siehe Abb. 11) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen (Kontrolle: $0,295 \pm 0,105$; GW 6471: $0,239 \pm 0,152$; Pravastatin: $0,261 \pm 0,132$; Prava/GW 6471: $0,327 \pm 0,199$).

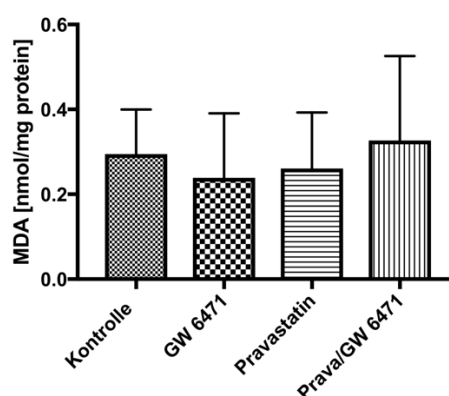


Abb. 11: Sham MDA

Die Menge an MDA in nmol/mg (Nanomol pro Milligramm) Protein im Lebergewebe nicht-septischer Tiere zeigte in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Vorbehandlungen (Kontrolle mit NaCl und 5% DMSO, der PPAR α -Blocker GW 6471, Pravastatin und eine Kombination aus Pravastatin und dem Blocker) keine signifikanten Unterschiede. MW \pm SD; n = 40.

4.3.2 Einfluss auf die MDA Menge unter septischen Bedingungen

Um zu untersuchen, ob Pravastatin einen Einfluss auf den oxidativen Stress während einer Sepsis hat, wurde die Menge des MDA im septischen Lebergewebe untersucht (siehe Abb. 12). In Abhängigkeit von der vorherigen Gabe von Pravastatin sowie von Pravastatin mit PPAR α -Blocker konnte eine Reduktion der MDA Menge gefunden werden, die sich allerdings in der Tukey *post-hoc* Analyse zwischen den Gruppen als statistisch nicht signifikant darstellte. Insgesamt haben so die vier verschiedenen Vorbehandlungen zu keinen Unterschieden der MDA Menge geführt (Kontrolle: $0,341 \pm 0,14$; GW 6471: $0,325 \pm 0,118$; Pravastatin: $0,217 \pm 0,054$; Prava/GW 6471: $0,213 \pm 0,056$).

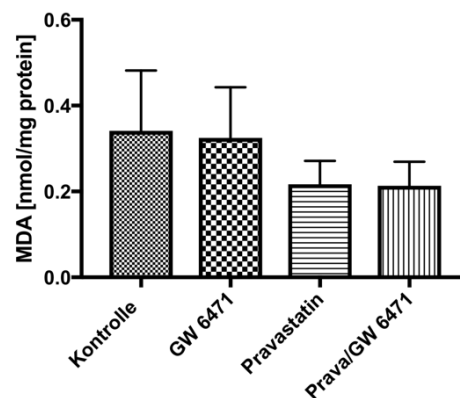


Abb. 12: CASP MDA

Die Menge an MDA in nmol/mg (nanomol pro Milligramm) Protein im Lebergewebe septischer Tiere zeigte in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Vorbehandlungen (Kontrolle mit NaCl, der PPAR α -Blocker GW 6471, Pravastatin und eine Kombination aus Pravastatin und dem Blocker) keine signifikanten Unterschiede. MW \pm SD; n = 37.

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde mittels CASP-Methode eine abdominelle Sepsis induziert, um die Effekte von Pravastatin auf die MF im Lebergewebe unter septischen Bedingungen zu untersuchen. Durch eine Sham-OP wurden die Effekte auch im nicht-septischen Lebergewebe analysiert. Ebenfalls wurde ein möglicher Wirkmechanismus des Pravastatins über den PPAR α -Rezeptor sowie der Einfluss von Pravastatin auf oxidativen Stress untersucht. Das Krankheitsbild der Sepsis ist durch die begleitende MD und Mikrozirkulationsstörungen, die auf bisher nicht vollständig verstandene Weise zum MOV führen (Arulkumaran et al., 2016), mit einer hohen Mortalität assoziiert (Fleischmann et al., 2016). Die Leber spielt eine zentrale Rolle in der Immunantwort bei Sepsis und eine hepatische Mitbeteiligung am MOV ist mit einer schlechten Prognose verbunden (Yan et al., 2014). Ein wichtiger therapeutischer Ansatz könnte also in der Modulation der hepatischen Funktionen, speziell der MF der Leber, liegen.

5.1 Kernaussagen

Aus den in Kapitel 1.7 „Ziele der Arbeit“ aufgestellten Fragestellungen lassen sich aufgrund der vorliegenden Arbeit folgende Kernaussagen treffen:

1. Eine Vorbehandlung mit Pravastatin zeigte weder bei abdomineller Sepsis noch nach einer Sham-OP eine Wirkung auf die Parameter der MF im Lebergewebe. Da kein Effekt auf die MF hepatischer Zellen in Abhängigkeit von der Pravastatingabe nachgewiesen werden konnte, können keine Schlussfolgerungen über protektive, unverändernde oder sogar schädliche Einflüsse Pravastatins in der Sepsis gezogen werden.
2. In der Beeinflussung der MF zeigten sich nach Zugabe des PPAR α -Blockers GW6471 zum Pravastatin keine Unterschiede im Vergleich zur alleinigen Pravastatin-Gabe oder Kontrolle mit NaCl. Demzufolge können keine Rückschlüsse über einen Wirkmechanismus von Pravastatin am PPAR α -Rezeptor gezogen werden.
3. Die Expression von MDA in der Leber wurde weder im nicht-septischen noch im septischen Gewebe durch die vorherige Gabe von Pravastatin mit oder ohne den PPAR α -Blocker GW6471 beeinflusst. Demnach scheinen die Substanzen keine Wirkung auf den oxidativen Stress zu haben.

5.2 Methodendiskussion

Die vorliegende Studie untersuchte *in vivo* den Einfluss von s.c. appliziertem Pravastatin im Rattenmodell auf die Parameter der MF von Leberzellen. Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe haben den Einfluss von Pravastatin auf die MF der Leber bereits im *in vitro* Modell analysiert (Herminghaus et al., 2019a).

Arbeiten, die den Einfluss von Statinen auf die MF verschiedener Organe untersuchten, zeigten heterogene und organspezifische Studienergebnisse (Bouitbir et al., 2012; Herminghaus et al., 2019a). Bislang haben die meisten Studien den Effekt von Statinen auf die MF von Muskelzellen untersucht (Bouitbir et al., 2012; Broniarek and Jarmuszkiewicz, 2016; Kaufmann et al., 2006), da die MD als Ursache für die Statin-Nebenwirkungen Myopathie und Rhabdomyolyse angesehen wird (Apostolopoulou et al., 2015). In dieser Studie wurde speziell das Lebergewebe untersucht. Die Leber ist im Hinblick auf die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase der Haupt-Wirkort von Statinen und die Pravastatin-Aufnahme nach intravenöser (i.v.) Gabe im Rattenmodell ist in der Leber am größten (Hatanaka et al., 1998). Besonders im Rahmen einer Sepsis ist die Mitbeteiligung der Leber am MOV prognostisch ungünstig und es mangelt an therapeutischen Ansätzen zur Unterstützung der hepatischen Funktion. Deshalb ist die Untersuchung der Wirkung von Statinen auf die Leber allgemein sowie speziell die MF der Leber von besonderem Interesse.

Pravastatin gehört zu den hydrophilen Statinen und hat damit eine geringere Proteinbindung im Plasma als lipophile Statine wie Atorvastatin, Simvastatin und Lovastatin (Brealey et al., 2011). Dadurch steigt bei einer Hypalbuminämie, z.B. im Rahmen von Lebererkrankungen oder Sepsis, die Konzentration des freien, aktiven Medikaments, welches dann vermehrt toxische Wirkungen haben kann, weniger stark an (Brealey et al., 2011). Außerdem wirkt Pravastatin besonders leberspezifisch und verursacht deshalb weniger extra-hepatische Nebenwirkungen wie z.B. eine Myopathie (Brealey et al., 2011). In Kaufmanns Studie wurde die Mitotoxizität verschiedener Statine auf Skelettmuskelzellen von Ratten untersucht (Kaufmann et al., 2006). Er zeigte, dass Pravastatin signifikant weniger und im Vergleich zu lipophilen Statinen erst bei deutlich höheren Dosen toxische Einflüsse auf Mitochondrien hat. Eine experimentelle Studie, die den Einfluss von hydrophilem Pravastatin und lipophilem Atorvastatin auf die MF in β -Zellen des Pankreas untersuchte, zeigte, dass nur Atorvastatin den mitochondrialen Metabolismus beeinflusst und zu erhöhtem oxidativen Stress führt (Urbano et al., 2017). In der vorliegenden Studie wurde Pravastatin aufgrund seiner geringeren Mitotoxizität sowie weniger extra-hepatischen Nebenwirkungen verwendet, um den Einfluss von Pravastatin auf die MF der Leber unter nicht-septischen Bedingungen und speziell bei Sepsis zu untersuchen. Im vorliegenden Versuch wurde den Ratten 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Pravastatin in NaCl s.c. appliziert. Diese Dosierung wurde in der

Literatur bereits bei Ratten angewandt (McGown et al., 2010) und entspricht gewichtsadaptiert ungefähr der humanen Dosis zur Therapie der Hypercholesterinämie ($200\mu\text{g} \cdot 80\text{ kg KG} = 16\text{ mg}$ Pravastatin). Eine Wirkung von s.c. verabreichtem Pravastatin auf die HMG-CoA Reduktase Aktivität und damit die Aufnahme der Substanz in Leberzellen von Ratten wurde bereits gezeigt (Joles et al., 1992). Im Gegensatz zur i.v. Applikation wurde die Aufnahme bzw. eine Bestimmung der Endkonzentration des s.c. applizierten Pravastatins im Lebergewebe bisher nicht quantitativ untersucht (Hatanaka et al., 1998). Es bleibt daher auch fraglich, ob die Endkonzentration des Pravastatins im Lebergewebe erst bei höheren s.c. applizierten Dosierungen ausreichend gewesen wäre, um in der vorliegenden Arbeit einen Effekt auf die MF zu zeigen. Auch könnte der Zeitpunkt der s.c. Applikation des Pravastatins einen Einfluss auf die zum Messzeitpunkt erreichten Endkonzentrationen gehabt haben. Klinische und experimentelle Vorstudien zeigten, dass eine vorherige Statingabe einen größeren Benefit als eine verzögerte Gabe nach Sepsisbeginn hat (Almog et al., 2004; Morel et al., 2017; Morel and Singer, 2014). Im klinischen Setting ist eine gezielte Gabe vor Sepsisbeginn in der Regel nicht umsetzbar, da Patienten/-innen meist erst mit Symptomen und bereits positiven q-/SOFA diagnostiziert werden. Bei Nachweis eines deutlichen Benefits könnte die Gabe eines Statins allerdings in das o.g. *one-hour-bundle* aufgenommen werden. In diesem Versuch wurde Pravastatin einmalig 18 Stunden vor der Sham- bzw. CASP-OP verabreicht, bevor insgesamt 42 Stunden später das Lebergewebe entnommen wurde. Eine Abnahme der Pravastatin Wirkung im Laufe der 18 bzw. 42 Stunden kann nicht ausgeschlossen werden. Eine Studie, in der die Plasmakonzentration von Pravastatin nach i.v. Gabe einer Dosis von $80\mu\text{g}/\text{kg KG}$ gemessen wurde, zeigte sich eine Plasmahalbwertszeit von 72,4 min (Koitabashi et al., 2006). Für eine s.c. Applikation sind normalerweise längere Halbwertszeiten zu erwarten. Studien zur Pharmakokinetik von s.c. applizierten Pravastatin in Ratten fehlen bisher allerdings.

Als Methode zur Messung der MA wurde die Respirometrie analog zu Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe gewählt (Herminghaus et al., 2019a, 2019b, 2015). In der Respirometrie wird die Sauerstoffkonzentration sowie der mitochondriale Sauerstoffverbrauch über die Zeit im homogenisierten Gewebe gemessen. Diese Parameter stellen allerdings nur einen Aspekt der MF dar und spiegeln nicht die Gesamtheit der komplexen Vorgänge in den Mitochondrien sowie der gesamten Zelle wider. Im Vergleich zu den deutlich aufwendigeren Messungen an intakten, isolierten Mitochondrien bietet die Messung an Gewebehomogenaten allerdings mitochondriale Parameter vergleichbarer Qualität (Pecinová et al., 2011). Zum Ausschluss von Messfehlern, die durch Störungen der Membranintegrität oder des Membranpotenzials auftreten können, erfolgten bei jeder Respirometrie die in Kapitel 3.2.3.5 beschriebenen Kontrollschritte. Außerdem wurde jede Messung dreimal wiederholt und der Mittelwert aus diesen Messungen für die Datenauswertung verwendet. In der Messkammer des Respirometers herrschten $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Diese Temperatur entspricht zwar nicht der physiologischen Körpertemperatur, ist allerdings

methodischer Standard. Ein direkter Bezug der Messdaten auf den menschlichen Organismus ist dadurch jedoch eingeschränkt.

40 Versuchstiere wurden nach der Pravastatingabe Sham-operiert. Dazu wurde ein Stent von außen an der Darmwand befestigt, ohne den Darm zu penetrieren. Die Tiere wurden zwar nicht septisch, wurden aber trotzdem einer Narkose und Operation unterzogen. Die Studienlage zum Einfluss der Sham-OP auf die MF ist variabel. Mittal untersuchte den Effekt der Sham-OP auf verschiedene Organe und beobachtete in der respirometrischen Messung keine Beeinflussung der MF der Leber (Mittal et al., 2011). In Herminghaus Vorarbeit zum Einfluss der Schwere der Sepsis auf die MF zeigten die Sham-Versuchstiere im Vergleich zu nicht-operierten Kontrolltieren ab Komplex II der Atmungskette statistisch signifikant erhöhte RCI-Werte von etwa 8,5 im Vergleich zu ca. 6 bei den Kontrolltieren (Herminghaus et al., 2015). Die RCI-Werte in den Sham-operierten Tieren dieser Studie befinden sich in einer ähnlichen Größenordnung wie die Sham-Werte in der Vorstudie ($8,24 \pm 0,79$). Das bedeutet, dass das untersuchte Lebergewebe zwar nicht septisch, aber dennoch durch die Sham-OP beeinflusst gewesen zu sein scheint und die MF der Leber erhöht wird.

Um einen Effekt von Pravastatin auf das septische Lebergewebe zu untersuchen, wurde als Sepsismodell die CASP-Methode verwendet (Traeger et al., 2010). Sie ist der humanen abdominellen Sepsis aufgrund einer Anastomoseninsuffizienz ähnlich (Lustig et al., 2007). Die CASP-Methode ist der Goldstandard für das septische Rattenmodell und sorgt für eine frühe und stetig ansteigende abdominelle und systemische Inflammation (Lustig et al., 2007). Andere Methoden wie die Lipopolysaccharid (LPS)-Injektion oder *ceecal ligation and puncture* (CLP)-Methode werden nicht empfohlen, da die CLP-Methode z.B. vermehrt zu lokalen intraabdominellen Abszessen, nicht jedoch zur systemischen Sepsis führt (Lustig et al., 2007). Die ermittelten RCI-Werte der septischen Kontrollgruppen dieser Studie (Komplex I: $13,08 \pm 2,13$, Komplex II: $9,49 \pm 1,09$) entsprechen ungefähr den Sepsis-RCI-Werten einer Vorstudie dieser Arbeitsgruppe (Herminghaus et al., 2015). Allerdings wurden im Gegensatz zur vorliegenden Studie mit zwei 16G-Stents in der Vorstudie jeweils nur einen 14G (Komplex I: ca. 11; Komplex II: ca. 8) bzw. 16G-Sent (Komplex I: ca. 15; Komplex II: ca. 9,5) verwendet (Herminghaus et al., 2015). Da in der Vorstudie der RCI nach 16G Sepsisinduktion signifikant zur nicht-operierten Kontrollgruppe sowie Sham-Gruppe erhöht war, kann vermutet werden, dass auch bei den vorliegenden Daten die RCI-Werte durch die CASP-OP gesteigert wurden (Herminghaus et al., 2015).

Nach den Sham- bzw. CASP-Operationen bekamen alle Versuchstiere zur analgetischen Therapie 0,05 mg/kg KG Buprenorphin s.c. verabreicht. Falls dieses einen Effekt auf die untersuchten Parameter haben sollte, so wäre dieser in allen Versuchsgruppen gleich. Da die Versuchstiere

außer der analgetischen keine weitere Sepsistherapie, wie in Kapitel 1.1.5 beschrieben, bekamen, ist die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf septische Patienten/-innen allerdings eingeschränkt.

5.3 Effekt von Pravastatin auf die MF der Leber unter nicht-septischen Bedingungen

In der vorliegenden Studie konnte weder ein Effekt von s.c. appliziertem Pravastatin auf den RCI noch auf die ADP/O im nicht-septischen Lebergewebe nachgewiesen werden. Insgesamt ist die Studienlage zum Einfluss von Statinen auf die MF wie bereits im Kapitel 1.4 beschrieben sehr unterschiedlich und die Daten weisen auf ein organspezifisches und dosisabhängiges Wirkungsprofil hin (Bouitbir et al., 2012; Herminghaus et al., 2019a). Auch die Resultate aus Analysen der Wirkung von Statinen auf die hepatische MF sind variabel.

Mullen zeigte in seiner Arbeit ebenfalls keinen Effekt von Statinen auf die MF von Leberzellen (Mullen et al., 2011). Er verdeutlichte, dass Simvastatin toxisch auf Muskelzellen, jedoch nicht auf hepatische Zellen wirkt und vermutet, dass Leberzellen die Toxizität von Statinen durch Aufrechterhaltung des Akt-Signalweges unterbinden (Mullen et al., 2011). Mullen verwendete in seiner Studie allerdings ausschließlich das lipophile Simvastatin und untersuchte die MF an Hep2G Zellen aus Zellkulturen. Auch Marques konnte im Mausmodell keinen Effekt einer 3-monatigen oralen Gabe von 40 mg/kg KG Pravastatin auf den RCI nachweisen (Marques et al., 2018). Die Messwerte in State 2 und State 3 wurden in Marques Studie ebenfalls respirometrisch ermittelt (Marques et al., 2018). Die *in vitro* Vorarbeit dieser Arbeitsgruppe zeigte hingegen einen dosisabhängigen Effekt von Pravastatin auf den RCI, nicht jedoch auf die ADP/O (Herminghaus et al., 2019a). Es wurden Konzentrationen von 100 bis 1000 μM Pravastatin in die Proben mit Leberhomogenat hinzugefügt (Herminghaus et al., 2019a). Erst bei einer Konzentration von 300 μM konnten in Herminghaus Studie eine verminderte MF der Leber durch Pravastatin nachgewiesen werden (Herminghaus et al., 2019a). Im Gegensatz zur vorliegenden Studie konnte im *in vitro* Versuch das Gewebe direkt vor der Messung mit einer bestimmten Konzentration von Pravastatin inkubiert werden. So können Faktoren wie die Applikationszeit und Dosierung die vorliegenden *in vivo* Ergebnisse beeinflusst haben.

Wie bereits im Abschnitt „Methodendiskussion“ verdeutlicht, kann operativer Stress im Rahmen der Sham-OP zu erhöhten RCI-Werte im Vergleich zu nicht operierten Versuchstieren führen (Herminghaus et al., 2015). Folglich führt operativer Stress vermutlich zu einer Hochregulierung der MF der Leber (Herminghaus et al., 2015). Im *in vitro* Versuch dieser Arbeitsgruppe zeigte sich eine dosisabhängige Verminderung der MF der Leber durch Pravastatin (Herminghaus et al., 2019a). Falls Pravastatin also einen hemmenden Einfluss auf State 3 und den RCI der Leber hat, könnte dieser hemmende Einfluss den steigernden Einfluss der Sham-OP auf die MF der Leber

ausgleichen. So könnte ein fehlender Effekt von Pravastatin auf die MF in Lebergewebe von Sham-operierten Ratten erklärt werden. Die Parameter der MF der Leber zeigen im vorliegenden Versuch allerdings auch zwischen den Gruppen, also mit oder ohne Pravastatingabe, keine Unterschiede. Neben der möglichen Verminderung der MF durch Pravastatin liegen vermutlich weitere Faktoren vor, die dazu führen, dass in deinem Versuch keine Beeinflussung des nicht-septischen Lebergewebes durch die verschiedenen Vorbehandlungen gezeigt werden konnte.

Eine abschließende Aussage über die Wirkung von Pravastatin auf die MF der Leber *in vivo* kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sowie der Literatur nicht getroffen werden. Eine Replikation des dosisabhängigen Effektes von Pravastatin *in vitro* konnte in der vorliegenden *in vivo* Studie sowie Mullens Vorstudien zur Wirkung von Simvastatin nicht erfolgen (Herminghaus et al., 2019a; Mullen et al., 2011). Es bleibt zu untersuchen, ob die *in vivo* Versuchsbedingungen und im Speziellen die Applikationsart sowie -zeit und weitere unbekannte Faktoren ursächlich hierfür sein könnten. Weitere Studien sind für ein besseres Verständnis der Wirkung von HRH im Lebergewebe notwendig.

5.4 Effekt von Pravastatin auf die MF der Leber unter septischen Bedingungen

In dieser Studie konnte kein Einfluss von s.c. appliziertem Pravastatin auf die Parameter der MF der Leber im Rahmen einer abdominalen Sepsis im Rattenmodell gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse sind aus der Literatur bekannt. Yorulmaz untersuchte in einem Modell mit i.p. LPS-Injektion die Wirkung von Simvastatin auf die mitochondriale Enzymaktivität der Leber (Yorulmaz et al., 2015). Sie fand jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität der Atmungskettenkomplexe in den 4 verschiedenen Versuchsgruppen (Kontrolle; LPS; LPS + Simvastatin; Simvastatin). Morel konnte in seiner Studie hingegen einen positiven Effekt einer Statingabe auf die MF im septischen Rattenmodell zeigen (Morel et al., 2017). Eine durch Sepsis verminderte MF wurde durch die Statingabe wieder auf Normwerte der Kontrolltiere gesteigert (Morel et al., 2017). Allerdings induzierte Morel die Sepsis durch i.p. Fäziesinjektion, verabreichte Simvastatin oral zu verschiedenen Zeitpunkten und untersuchte anschließend die MF an Muskelgewebe (Morel et al., 2017). Auch Stolf konnte einen positiven Statineffekt auf Leberzellen nachweisen, er verabreichte das Statin allerdings für eine Dauer von insgesamt 30 Tagen vor Sepsisinduktion mittels der CLP-Methode (Stolf et al., 2012). Stolf konnte minimale Effekte einer Atorvastatin- und Simvastatingabe auf die Enzymaktivität der Lebermitochondrien feststellen (Stolf et al., 2012).

Was könnten Gründe für den vorliegenden fehlenden Nachweis der Pravastatinwirkung auf die MF im septischen Lebergewebe sein?

Vorstudien dieser Arbeitsgruppe konnten unter ähnlichen methodischen Bedingungen zeigen, dass das verwendete CASP-Sepsismodell zu Veränderungen der hepatischen MF geführt hat (Herminghaus et al., 2019b, 2015). Eine Vorarbeit zeigte den zeitlichen Verlauf der MF im Rahmen der Sepsis und beschreibt einen initialen (bis 48h nach Sepsisinduktion) Anstieg von RCI und ADP/O nach Stimulation von Komplex I und II (Herminghaus et al., 2019b). Weiterhin konnte in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe ein dosisabhängiger Effekt von Pravastatin mit Verminderung des RCI in gesunden Leberzellen *in vitro* beobachtet werden (Herminghaus et al., 2019a). Es könnte also sein, dass ähnlich wie nach einer Sham-OP, die Sepsis zu einem RCI Anstieg führt, der durch die Pravastatingabe wieder aufgehoben wird. Eine weitere Erklärung für den fehlenden Effekt könnte sein, dass nach einer s.c. Applikation keine ausreichende Gewebekonzentration vorhanden war, um den Effekt auf die Mitochondrien zu erreichen. Die genaue Konzentration von Pravastatin im Lebergewebe nach s.c. Injektion ist, wie bereits beschrieben, nicht bekannt. Es fehlen *in vivo* Studien, die einen dosisabhängigen Effekt untersuchen. Ebenfalls kann Sepsis einen Einfluss auf die Pharmakokinetik haben (Morel et al., 2017). Morel zeigte in seiner Studie eine deutliche Varianz an Simvastatin-Plasmakonzentrationen bei Gabe von 80 mg/Tag bei Statin-naiven Patienten mit *acute lung injury* (Morel et al., 2017). Er vermutet, dass die Pharmakokinetik von Statinen in kritisch kranken Organismen sehr variabel ist und so die spezifische Wirkung individuell verschieden sein könnte. Folglich sind aber auch Studien, die eine Pravastatinwirkung zwischen nicht-septischen und septischen Bedingungen vergleichen, von besonderem Interesse.

Wie bei den geschilderten experimentellen Studien, ist die Studienlage zum Einfluss von Statinen bei Sepsis auch in klinischen Studien kontrovers. Einige Studien gaben Hinweise, dass Statine bei Sepsis einen positiven Effekt auf das *Outcome* haben (Almog et al., 2004; Patel et al., 2012). Übersichtsarbeiten zweifeln allerdings an einem deutlichen Effekt. So kritisiert Chen die Metaanalyse von Janda, die bei 20 eingeschlossenen Studien nur 1 randomisierte kontrollierte Studie beinhaltet und auf Grundlage dessen einen protektiven Effekt von Statinen bei Sepsis beschreibt (Chen et al., 2018; Janda et al., 2010). Pertzov kritisiert in seiner systematischen Übersichtsarbeit, dass die bisherigen Studien mit positiven Statin-Effekten meist retrospektive Studien waren, die Patienten/-innen mit und ohne Statineinnahme vor Sepsis analysiert haben (Pertzov et al., 2019). Es sei zu bedenken, dass eine *indication bias* mit der Statineinnahme als *Confounder* sowie eine *well-managed-patient bias* der Statin-therapierten Gruppe vorliegen könnten (Pertzov et al., 2019). Es könnte also sein, dass die Patienten/-innen mit Statineinnahme sowieso die „gesünderen“ und „medizinisch besser versorgten“ Patienten/-innen sind und ein positiver Effekt nicht direkt auf die Statineinnahme, sondern auf weitere unbekannte Faktoren zurück zu führen ist. Weitere klinische sowie experimentelle Studien sind folglich notwendig, um zu ergründen, welche Rolle HRH im Rahmen einer Sepsis und speziell bei der MF der septischen Leber spielen.

5.5 Beeinflussung des PPAR α durch Pravastatin

In dieser Studie zeigte sich keine Veränderung der Pravastatinwirkung auf die Parameter der MF der Leber unter nicht-septischen und septischen Bedingungen durch die zusätzliche Gabe des PPAR α -Blockers. Zur Untersuchung einer Modulation des PPAR α durch Pravastatin wurde der PPAR α -Blocker GW6471 alleine sowie in Kombination mit Pravastatin verabreicht. Bereits in Vorstudien war bei einer i.p. Applikation von GW6471 eine Dosis von 1 mg/kg KG angewandt worden (More et al., 2017).

Wie die Rolle der Mitochondrien sowie die MF bei Sepsis, ist auch die Studienlage in Bezug auf die Bedeutung des PPAR α im Rahmen der Sepsis insgesamt sehr heterogen. Es ist weder geklärt, ob die PPAR α -Aktivität bei Sepsis hoch- oder herunterreguliert und wie sie in verschiedenen Geweben ausgeprägt ist, noch durch welche genauen Mechanismen sie beeinflusst wird (Van Wyngene et al., 2020). Es wird vermutet, dass bei einer Sepsis PPAR α -bedingt die MF sowie die Fettsäureoxidation in den Mitochondrien herunterreguliert ist und dadurch wiederum lipotoxische Schäden bedingt werden (Van Wyngene et al., 2020). Dass Statine einen Einfluss auf PPAR α haben, konnte in einigen Studien gezeigt werden. Seo untersuchte den Einfluss verschiedener Statine auf die PPAR α Promotoraktivität sowie PPAR α mRNA und zeigte, dass im Vergleich zu anderen HRH von Pravastatin deutlich höhere Dosen verwendet werden mussten, um einen Effekt auf die untersuchten Parameter zu haben (Seo et al., 2008). Balakumar und Mahadevan fassten in ihrem Review verschiedene Studien zusammen, die einen Einfluss von Statinen auf PPAR α und PPAR γ beschreiben und schlussfolgern, dass die pleiotropen Effekte von Statinen über diese PPAR vermittelt sind (Balakumar and Mahadevan, 2012). Keine dieser Studien untersuchte allerdings explizit die PPAR α im Lebergewebe. Lediglich in einer anderen tierexperimentellen Studie bei Hamstern konnte eine Aktivierung von PPAR α durch Pravastatin in der Leber festgestellt werden (Dong et al., 2011).

Auch wenn andere Studien einen Einfluss von Statinen auf PPAR α zeigen konnten (Balakumar and Mahadevan, 2012; Seo et al., 2008), wurde in dieser Studie keine Veränderung durch die zusätzliche Gabe des PPAR α -Blockers GW6471 sichtbar. Da allerdings auch keine Veränderungen der MF durch Pravastatingabe gezeigt werden konnten, kann ein Wirkmechanismus von Pravastatin über den PPAR α in der Leber weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Weitere Studien zur genauen Analyse des Rezeptorstatus in Abhängigkeit vom Zustand des Organismus sowie der Modulation durch Statine sind daher notwendig.

5.6 Effekt von Pravastatin auf den oxidativen Stress im Lebergewebe

In der vorliegenden Studie konnte weder im nicht-septischen noch im septischen Lebergewebe ein Effekt von Pravastatin auf den oxidativen Stress, gemessen an der MDA-Menge als Indikator der Lipidperoxidation, festgestellt werden. Bereits in Vorstudien dieser Arbeitsgruppe wurde in verschiedenen Versuchen MDA gemessen (Herminghaus et al., 2019b, 2015). In Abhängigkeit von der Schwere der Sepsis zeigte sich im CASP-Modell 24 Stunden nach Sepsisinduktion keine Veränderungen in den MDA Konzentrationen im Vergleich zur Sham-Gruppe oder Kontrolle ohne Operation (Herminghaus et al., 2015). In einer Arbeit von 2019 wurde die MDA Konzentration in Sham- und CASP-Ratten im Zeitverlauf gemessen (Herminghaus et al., 2019b). In beiden Gruppen zeigten sich im Vergleich zur nicht-operierten Kontrollgruppe nach 24 Stunden jedoch deutlich erhöhte MDA Konzentrationen, die im Verlauf stetig und nach 96 Stunden signifikant abfielen (Herminghaus et al., 2019b). Da in der zuvor genannten Studie initial auch die Parameter der hepatischen MF erhöht waren und Mitochondrien Hauptproduzent von ROS und oxidativem Stress sind, war eine Erhöhung der MDA Konzentration im untersuchten Sepsismodell zu erwarten. Die ermittelten MDA Konzentrationen der vorliegenden Studie sind vergleichbar mit den Werten der Arbeit von 2015 (Herminghaus et al., 2015), in der keine Erhöhung durch die Sham- oder CASP-OP sichtbar war. Folglich kann es sein, dass die Operationen in diesem Versuch gar nicht zu erhöhten MDA Konzentrationen geführt haben und auch nicht durch die Vorbehandlungen und speziell Pravastatin gesenkt werden konnten.

Studien zum Einfluss von Statinen auf den oxidativen Stress wurden im systematischen Review mit Metaanalyse von Zinellu untersucht, in den 35 Studien eingeschlossen wurden (Zinellu et al., 2019). Insgesamt zeigte sich zwar eine signifikante Reduktion der MDA Plasmakonzentration nach Statingabe, dennoch ist zu beachten, dass die eingeschlossenen Studien sehr heterogen sind. Auch untersuchten nur drei der eingeschlossenen Studien den Effekt von Pravastatin (Karatzis et al., 2005; Murrow et al., 2012; Zhang et al., 1995). Nur eine davon zeigte eine signifikante Verminderung von MDA nach oraler Gabe bei Patienten/-innen mit instabiler *Angina pectoris* (Karatzis et al., 2005). Murrow konnte in seiner Studie zeigen, dass nur Atorvastatin, nicht aber das hydrophile Pravastatin, nach 12-wöchiger Therapie bei Patienten/-innen mit metabolischem Syndrom zu einer signifikanten Reduktion von MDA führt (Murrow et al., 2012). Stoffs Studie zum Einfluss einer 30-tägigen Statingabe auf Parameter des oxidativen Stresses zeigte ebenfalls keine protektiven Effekte von Statinen (Stolf et al., 2012). Van Wyngene untersuchte in seiner Studie einen Zusammenhang der Wirkung auf oxidativen Stress mit dem PPAR α (Van Wyngene et al., 2020). Durch den PPAR α -Agonisten Pemafibrat ließ sich ein durch die CLP-induzierte Sepsis bedingter MDA Anstieg um 45% reduzieren.

In der vorliegenden Studie konnte im Lebergewebe kein Einfluss von Pravastatin mit oder ohne den PPAR α -Blocker GW6471 auf die Parameter der Mitochondrien, die Hauptproduzent von oxidativem Stress sind, nachgewiesen werden. Übereinstimmend dazu wurde eben auch kein Einfluss auf den oxidativen Stress, gemessen mittels MDA-Konzentrationen, festgestellt.

5.7 Klinischer Bezug

Auch im fortgeschritten intensivmedizinischen Zeitalter bleibt die Therapie der Sepsis eine besondere Herausforderung. Neben den bestehenden Therapiesäulen mit Erreger-eliminierenden und Körperabwehr-unterstützenden Ansätzen wird intensiv nach weiteren Therapiestrategien gesucht - bislang zeigte sich kein bahnbrechender Erfolg (Dellinger et al., 2013).

Einige klinische sowie experimentelle Studien deuten auf einen positiven Effekt von Statinen im Rahmen einer Sepsis hin (Almog et al., 2004; Janda et al., 2010; Merx et al., 2005; Morel et al., 2017). Statine könnten dann als kostengünstige Therapieergänzung zur Sepsistherapie eingesetzt werden. Als Grund für den positiven Effekt werden Beeinflussungen der Mikrozirkulation, der Stoffwechsellage, der antiinflammatorischen Systeme sowie der Mitochondrien vermutet (Terblanche et al., 2007). In dieser tierexperimentellen Studie konnte im septischen Rattenmodell keine Beeinflussung der MF der Leber durch Pravastatin gezeigt werden. Insgesamt bleibt die Studienlage zum klinischen Einfluss von Statinen bei einer Sepsis wie auch zu den molekularen Effekten von Statinen auf Organe, Gewebe und Zellen kontrovers. So sind auch die immunmodulatorischen Wirkmechanismen von Statinen nicht genug erforscht. Bei der klinischen Anwendung muss ebenfalls das Nebenwirkungsprofil von Statinen mit der kürzlich in den Hintergrund tretenden Lebertoxizität (Francis and Forman, 2020) sowie der Myotoxizität mit Rhabdomyolyse-Gefahr (du Souich et al., 2017) bedacht werden.

6 Schlussfolgerung

Auch wenn in dieser Studie kein Einfluss von Pravastatin auf die Parameter der MF im Lebergewebe sichtbar war, gibt es Hinweise, dass Pravastatin als HRH auf Mitochondrien wirkt und positive Effekte bei Sepsis haben könnte. Möglicherweise spielt hier die Modulation am PPAR α mit sogenannten pleiotropen Effekten eine Rolle. Auch könnte durch die Pravastatingabe der oxidative Stress in Zellen mit den möglichen Folgen bis zum Organversagen reduziert werden. Bis dato sind allerdings die Meinungen zu Handlungsempfehlungen und zum Einsatz von Statinen im klinischen Sepsis-*Setting* kontrovers. Weitere klinische sowie experimentelle Studien zur genauen Analyse sind folglich notwendig. Dabei müssen besonders Unterschiede durch die verwendeten HRH sowie Einflüsse durch verschiedene Versuchsbedingungen, Messmethoden und mögliche *Confounder* untersucht werden. Weitere interessante Fragestellungen sind weiterhin: Wirkt Pravastatin auf gesunde Mitochondrien eher schädlich, auf dysfunktionale Mitochondrien hingegen protektiv? Gibt es einen Zeitverlauf im Wirkungsprofil von Pravastatin? Wirkt Pravastatin in frühen Phasen einer Sepsis protektiv, im späteren Verlauf hingegen schädlich? Oder hat Pravastatin gar keinen Effekt auf die MF der Leber?

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Almog, Y., Shefer, A., Novack, V., Maimon, N., Barski, L., Eizinger, M., Friger, M., Zeller, L., et al., 2004. Prior statin therapy is associated with a decreased rate of severe sepsis. *Circulation* 110, 880–885.
- Ando, H., Takamura, T., Ota, T., Nagai, Y., Kobayashi, K., 2000. Cerivastatin improves survival of mice with lipopolysaccharide-induced sepsis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 1043–1046.
- Apostolopoulou, M., Corsini, A., Roden, M., 2015. The role of mitochondria in statin-induced myopathy. *Eur. J. Clin. Invest.* 45, 745–754.
- Arnaud, C., Veillard, N.R., Mach, F., 2005. Cholesterol-independent effects of statins in inflammation, immunomodulation and atherosclerosis. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 5, 127–134.
- Arulkumaran, N., Deutschman, C.S., Pinsky, M.R., Zuckerbraun, B., Schumacker, P.T., Gomez, H., Gomez, A., Murray, P., et al., 2016. Mitochondrial function in sepsis. *Shock Augusta Ga* 45, 271–281.
- Balakumar, P., Mahadevan, N., 2012. Interplay between statins and PPARs in improving cardiovascular outcomes: a double-edged sword? *Br. J. Pharmacol.* 165, 373–379.
- Balakumar, P., Rose, M., Ganti, S.S., Krishan, P., Singh, M., 2007. PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? *Pharmacol. Res.* 56, 91–98.
- Bar-Or, D., Carrick, M.M., Mains, C.W., Rael, L.T., Slone, D., Brody, E.N., 2015. Sepsis, oxidative stress, and hypoxia: Are there clues to better treatment? *Redox Rep.* 20, 193–197.
- Baue, A.E., 1975. Multiple, progressive, or sequential systems failure. A syndrome of the 1970s. *Arch. Surg. Chic. Ill* 1960 110, 779–781.
- Begrache, K., Igoudjil, A., Pessayre, D., Fromenty, B., 2006. Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6, 1–28.
- Beltrán, B., Orsi, A., Clementi, E., Moncada, S., 2000. Oxidative stress and S-nitrosylation of proteins in cells. *Br. J. Pharmacol.* 129, 953–960.
- Björkhem-Bergman, L., Lindh, J.D., Bergman, P., 2011. What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 72, 164–165.
- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., Sibbald, W.J., 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644–1655.
- Boutbir, J., Charles, A.-L., Echaniz-Laguna, A., Kindo, M., Daussin, F., Auwerx, J., Piquard, F., Geny, B., et al., 2012. Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a “mitohormesis” mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur. Heart J.* 33, 1397–1407.
- Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., Davies, N.A., Cooper, C.E., et al., 2002. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet* 360, 219–223.
- Brealey, D., Karyampudi, S., Jacques, T.S., Novelli, M., Stidwill, R., Taylor, V., Smolenski, R.T., Singer, M., 2004. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286, R491–497.
- Brealey, D., Singer, M., Terblanche, M., 2011. Potential metabolic consequences of statins in sepsis. *Crit. Care Med.* 39, 1514–1520.
- Broniarek, I., Jarmuszkiewicz, W., 2016. Statins and mitochondria. *Postepy Biochem.* 62, 77–84.
- Chen, M., Ji, M., Si, X., 2018. The effects of statin therapy on mortality in patients with sepsis: A meta-analysis of randomized trials. *Medicine (Baltimore)* 97, e11578.
- Cohen, J., 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885–891.
- De Loecker, I., Preiser, J.-C., 2012. Statins in the critically ill. *Ann. Intensive Care* 2, 19.

- Deichmann, R., Lavie, C., Andrews, S., 2010. Coenzyme Q10 and Statin-Induced Mitochondrial Dysfunction. *Ochsner J.* 10, 16–21.
- Dellinger, R.P., Levy, M.M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S.M., Sevransky, J.E., Sprung, C.L., et al., 2013. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* 41, 580–637.
- Devchand, P.R., Keller, H., Gonzalez, F.J., Wahli, W., 1996. The PPAR α -leukotriene 8 4 pathway to inflammation control. *Nature* 384, 39–43.
- Dobesh, P.P., Olsen, K.M., 2014. Statins role in the prevention and treatment of sepsis. *Pharmacol. Res.* 88, 31–40.
- Dong, S.H., Lee, J., Koh, D.H., Choi, M.H., Jang, H.J., Kae, S.H., 2011. Pravastatin activates PPAR α /PPAR γ expression in the liver and gallbladder epithelium of hamsters. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 10, 185–190.
- du Souich, P., Roederer, G., Dufour, R., 2017. Myotoxicity of statins: Mechanism of action. *Pharmacol. Ther.* 175, 1–16.
- Duran-Bedolla, J., Montes de Oca-Sandoval, M.A., Saldaña-Navor, V., Villalobos-Silva, J.A., Rodriguez, M.C., Rivas-Arancibia, S., 2014. Sepsis, mitochondrial failure and multiple organ dysfunction. *Clin. Investig. Med. Med. Clin. Exp.* 37, 58–69.
- Fernandez, R., De Pedro, V.J., Artigas, A., 2006. Statin therapy prior to ICU admission: protection against infection or a severity marker? *Intensive Care Med.* 32, 160–164.
- Fleischmann, C., Thomas-Rueddel, D.O., Hartmann, M., Hartog, C.S., Welte, T., Heublein, S., Dennler, U., Reinhart, K., 2016. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int.* 113:159-66.
- Foreman, M.G., Mannino, D.M., Moss, M., 2003. Cirrhosis as a Risk Factor for Sepsis and Death: Analysis of the National Hospital Discharge Survey. *Chest* 124, 1016–1020.
- Francis, P., Forman, L., 2020. Use of Statins in Patients With and Without Liver Disease. *Clin. Liver Dis.* 15, 40–45.
- Galley, H.F., 2011. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br. J. Anaesth.* 107, 57–64.
- Graham, J.-K., Stacy, K., 2020. Mitochondrial Dysregulation in Sepsis: A Literature Review. *Clin. Nurse Spec. CNS* 34, 170–177.
- Hatanaka, T., Honda, S., Sasaki, S., Katayama, K., Koizumi, T., 1998. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation for tissue-selective inhibition of cholesterol synthesis by pravastatin. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 26, 329–347.
- Herminghaus, A., Barthel, F., Heinen, A., Beck, C., Vollmer, C., Bauer, I., Weidinger, A., Kozlov, A.V., Picker, O., 2015. Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver. *Mitochondrion* 24, 122–128.
- Herminghaus, A., Laser, E., Schulz, J., Truse, R., Vollmer, C., Bauer, I., Picker, O., 2019a. Pravastatin and Gemfibrozil Modulate Differently Hepatic and Colonic Mitochondrial Respiration in Tissue Homogenates from Healthy Rats. *Cells* 8:983.
- Herminghaus, A., Papenbrock, H., Eberhardt, R., Vollmer, C., Truse, R., Schulz, J., Bauer, I., Weidinger, A., et al., 2019b. Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Med. Exp.* 7, 4.
- Hotchkiss, R.S., Monneret, G., Payen, D., 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 862–874.
- Issemann, I., Green, S., 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645–650.
- Istvan, E.S., Deisenhofer, J., 2001. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science* 292, 1160–1164.
- Iwashyna, T.J., Ely, E.W., Smith, D.M., Langa, K.M., 2010. Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. *JAMA* 304, 1787–1794.

- Janda, S., Young, A., FitzGerald, J.M., Etminan, M., Swiston, J., 2010. The effect of statins on mortality from severe infections and sepsis: A systematic review and meta-analysis. *J. Crit. Care* 25, 656.e7-656.e22.
- Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 515–540.
- Jeger, V., Brandt, S., Porta, F., Jakob, S.M., Takala, J., Djafarzadeh, S., 2015. Dose Response of Endotoxin on Hepatocyte and Muscle Mitochondrial Respiration In Vitro. *BioMed Res. Int.* 2015:353074.
- Jeger, V., Djafarzadeh, S., Jakob, S.M., Takala, J., 2013. Mitochondrial function in sepsis. *Eur. J. Clin. Invest.* 43, 532–542.
- Jeong, S.-Y., Seol, D.-W., 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep.* 41, 11–22.
- Joles, J., Willekes-Koolschijn, N., Koomans, H., Van Tol, A., Geelhoed-Mieras, T., Crommelin, D., Van Bloois, L., Krajnc-Franken, M., Cohen, L., Griffioen, M., 1992. Subcutaneous administration of HMG-CoA reductase inhibitors in hyperlipidaemic and normal rats. *Lab. Anim.* 26, 269–280.
- Kakkar, P., Singh, B.K., 2007. Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Mol. Cell. Biochem.* 305, 235–253.
- Kalghatgi, S., Spina, C.S., Costello, J.C., Liesa, M., Morones-Ramirez, J.R., Slomovic, S., Molina, A., Shirihai, O.S., Collins, J.J., 2013. Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. *Sci. Transl. Med.* 5:192,85.
- Karatzis, E., Lekakis, J., Papamichael, C., Andreadou, I., Cimponeriu, A., Aznaouridis, K., Papaioannou, T.G., Protogerou, A., Mavrikakis, M., 2005. Rapid effect of pravastatin on endothelial function and lipid peroxidation in unstable angina. *Int. J. Cardiol.* 101, 65–70.
- Kaufmann, P., Török, M., Zahno, A., Waldhauser, K.M., Brecht, K., Krähenbühl, S., 2006. Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2415–2425.
- Kersten, S., 2008. Peroxisome Proliferator Activated Receptors and Lipoprotein Metabolism. *PPAR Res.* 2008, 1–11.
- Koitabashi, Y., Kumai, T., Matsumoto, N., Watanabe, M., Sekine, S., Yanagida, Y., Kobayashi, S., 2006. Orange juice increased the bioavailability of pravastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitor, in rats and healthy human subjects. *Life Sci.* 78, 2852–2859.
- Kozlov, A.V., Staniek, K., Haindl, S., Piskernik, C., Öhlinger, W., Gille, L., Nohl, H., Bahrami, S., Redl, H., 2006. Different effects of endotoxic shock on the respiratory function of liver and heart mitochondria in rats. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 290, 543–549.
- Kramer, L., Jordan, B., Druml, W., Bauer, P., Metnitz, P.G.H., Austrian Epidemiologic Study on Intensive Care, ASDI Study Group, 2007. Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients—a prospective multicenter study. *Crit. Care Med.* 35, 1099–1104.
- Kruger, P., Fitzsimmons, K., Cook, D., Jones, M., Nimmo, G., 2006. Statin therapy is associated with fewer deaths in patients with bacteraemia. *Intensive Care Med.* 32, 75–79.
- Lelubre, C., Vincent, J.-L., 2018. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. *Nat. Rev. Nephrol.* 14, 417–427.
- Levi, M., ten Cate, H., van der Poll, T., van Deventer, S.J., 1993. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 270, 975–979.
- Levy, M.M., Evans, L.E., Rhodes, A., 2018. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med.* 44, 925–928.
- Liao, J.K., Laufs, U., 2005. Pleiotropic effects of statins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 89–118.
- Lobet, E., Letesson, J.-J., Arnould, T., 2015. Mitochondria: A target for bacteria. *Biochem. Pharmacol.* 94, 173–185.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

- Lustig, M.K., Bac, V.H., Pavlovic, D., Maier, S., Gründling, M., Grisk, O., Wendt, M., Heidecke, C.-D., et al., 2007. Colon ascendens setent peritonitis- a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock*. 28, 59–64.
- Marques, A.C., Busanello, E.N.B., de Oliveira, D.N., Catharino, R.R., Oliveira, H.C.F., Vercesi, A.E., 2018. Coenzyme Q10 or Creatine Counteract Pravastatin-Induced Liver Redox Changes in Hypercholesterolemic Mice. *Front. Pharmacol.* 9:685.
- Martin, G.S., 2012. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 10, 701–706.
- McGown, C.C., Brown, N.J., Hellewell, P.G., Reilly, C.S., Brookes, Z.L.S., 2010. Beneficial microvascular and anti-inflammatory effects of pravastatin during sepsis involve nitric oxide synthase III. *Br. J. Anaesth.* 104, 183–190.
- Merx, M.W., Liehn, E.A., Graf, J., van de Sandt, A., Schaltenbrand, M., Schrader, J., Hanrath, P., Weber, C., 2005. Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation* 112, 117–124.
- Mittal, A., Hickey, A.J.R., Chai, C.C., Loveday, B.P.T., Thompson, N., Dare, A., Delahunt, B., Cooper, G.J.S., et al., 2011. Early organ-specific mitochondrial dysfunction of jejunum and lung found in rats with experimental acute pancreatitis. *HPB* 13, 332–341.
- More, V.R., Campos, C.R., Evans, R.A., Oliver, K.D., Chan, G.N., Miller, D.S., Cannon, R.E., 2017. PPAR- α , a lipid-sensing transcription factor, regulates blood–brain barrier efflux transporter expression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 1199–1212.
- Morel, J., Hargreaves, I., Brealey, D., Neergheen, V., Backman, J.T., Lindig, S., Bläss, M., Bauer, M., et al., 2017. Simvastatin pre-treatment improves survival and mitochondrial function in a 3-day fluid-resuscitated rat model of sepsis. *Clin. Sci.* 131, 747–758.
- Morel, J., Singer, M., 2014. Statins, fibrates, thiazolidinediones and resveratrol as adjunctive therapies in sepsis: could mitochondria be a common target? *Intensive Care Med. Exp.* 2:9.
- Mullen, P.J., Zahno, A., Lindinger, P., Maseneni, S., Felser, A., Krähenbühl, S., Brecht, K., 2011. Susceptibility to simvastatin-induced toxicity is partly determined by mitochondrial respiration and phosphorylation state of Akt. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1813, 2079–2087.
- Murrow, J.R., Sher, S., Ali, S., Uphoff, I., Patel, R., Porkert, M., Le, N.-A., Jones, D., Quyyumi, A.A., 2012. The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: Atorvastatin versus pravastatin. *J. Clin. Lipidol.* 6, 42–49.
- Nessler, N., Launey, Y., Aninat, C., Morel, F., Mallédant, Y., Seguin, P., 2012. Clinical review: The liver in sepsis. *Crit. Care* 16, 235.
- Omar, A.S., Hanoura, S., Al-Janubi, H.M., Mahfouz, A., 2017. Statins in critical care: to give or not to give? *Minerva Anesthesiol.* 83, 502–511.
- Papazian, L., Roch, A., Charles, P.-E., Penot-Ragon, C., Perrin, G., Roulier, P., Goutorbe, P., Lefrant, J.-Y., Wiramus, S., Jung, B., Perbet, S., Hernu, R., Nau, A., Baldesi, O., Allardet-Servent, J., Baumstarck, K., Jouve, E., Moussa, M., Hraiech, S., Guervilly, C., Forel, J.-M., STATIN-VAP Study Group, 2013. Effect of statin therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia: a randomized clinical trial. *JAMA* 310, 1692–1700.
- Patel, J.M., Snaith, C., Thickett, D.R., Linhartova, L., Melody, T., Hawkey, P., Barnett, A.H., Jones, A., Hong, T., Cooke, M.W., Perkins, G.D., Gao, F., 2012. Randomized double-blind placebo-controlled trial of 40 mg/day of atorvastatin in reducing the severity of sepsis in ward patients (ASEPSIS Trial). *Crit. Care* 16, R231.
- Paumelle, R., Haas, J., Hennuyer, N., Bauge, E., Deleye, Y., Mesotten, D., Langouche, L., Vanhoutte, J., et al., 2019. Hepatic PPAR α is critical in the metabolic adaptation to sepsis. *J. Hepatol.* 70, 963–973.
- Pecinová, A., Drahotka, Z., Nůsková, H., Pecina, P., Houštěk, J., 2011. Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion* 11, 722–728.

- Pertzov, B., Eliakim-Raz, N., Atamna, H., Trestioreanu, A.Z., Yahav, D., Leibovici, L., 2019. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors (statins) for the treatment of sepsis in adults - A systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 280–289.
- Quinn, M., Moody, C., Tunnicliffe, B., Khan, Z., Manji, M., Gudibande, S., Murphy, N., Whitehouse, T., et al., 2016. Systematic review of statins in sepsis: There is no evidence of dose response. *Indian J. Crit. Care Med. Peer-Rev. Off. Publ. Indian Soc. Crit. Care Med.* 20, 534–541.
- Rhee, C., Jones, T.M., Hamad, Y., Pande, A., Varon, J., O'Brien, C., Anderson, D.J., Warren, D.K., et al., 2019. Prevalence, Underlying Causes, and Preventability of Sepsis-Associated Mortality in US Acute Care Hospitals. *JAMA Netw. Open* 2, e187571.
- Ruiz, M., 2006. Animal mitochondrion diagram.
- Sakr, Y., Dubois, M., Backer, D.D., Creteur, J., Vincent, J., 2004. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock*. *Crit. Care Med.* 32, 1825–1831.
- Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J., 1996. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 93–109.
- Schulz, J., Vollmer, C., Truse, R., Bauer, I., Beck, C., Picker, O., Herminghaus, A., 2019. Effect of Pravastatin Pretreatment and Hypercapnia on Intestinal Microvascular Oxygenation and Blood Flow During Sepsis. *Shock.* 53, 88-94.
- Seo, M., Inoue, I., Ikeda, M., Nakano, T., Takahashi, S., Katayama, S., Komoda, T., 2008. Statins Activate Human PPAR Promoter and Increase PPAR mRNA Expression and Activation in HepG2 Cells. *PPAR Res.* 2008, 1–11.
- Seymour, C.W., Liu, V.X., Iwashyna, T.J., Brunkhorst, F.M., Rea, T.D., Scherag, A., Rubenfeld, G., Kahn, J.M., et al., 2016. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis. *JAMA* 315, 762–774.
- Simonnet, H., Vigneron, A., Pouysségur, J., 2014. Chapter Eight - Conventional Techniques to Monitor Mitochondrial Oxygen Consumption, in: Galluzzi, L., Kroemer, G. (Eds.), *Methods in Enzymology.* 542, 151–161.
- Singer, M., 2007. Mitochondrial function in sepsis: Acute phase versus multiple organ failure. *Crit. Care Med.* 35, 441–448.
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., et al., 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315, 801–810.
- Stolf, A.M., dos Reis Lívero, F., Dreifuss, A.A., Bastos-Pereira, A.L., Fabosi, I.A., de Souza, C.E.A., de Oliveira Gomes, L., Chicorski, R., et al., 2012. Effects of statins on liver cell function and inflammation in septic rats. *J. Surg. Res.* 178, 888–897.
- Stoller, J., Halpin, L., Weis, M., Aplin, B., Qu, W., Georgescu, C., Nazzal, M., 2016. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. *J. Crit. Care* 31, 58–62.
- Sygitowicz, G., Sitkiewicz, D., 2020. Molecular mechanisms of organ damage in sepsis: an overview. *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.* 24, 552–560.
- Terblanche, M., Almog, Y., Rosenson, R.S., Smith, T.S., Hackam, D.G., 2007. Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels. *Lancet Infect. Dis.* 7, 358–368.
- Torio, C.M., Andrews, R.M., 2006. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief #160, in: *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs.*
- Traeger, T., Koerner, P., Kessler, W., Cziupka, K., Diedrich, S., Busemann, A., Heidecke, C.-D., Maier, S., 2010. Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J. Vis. Exp. JoVE* 18, 2299.

- Trumbeckaite, S., Kuliaviene, I., Deduchovas, O., Kincius, M., Baniene, R., Virketyte, S., Bukauskas, D., Jansen, E., et al., 2013. Experimental acute pancreatitis induces mitochondrial dysfunction in rat pancreas, kidney and lungs but not in liver. *Pancreatology* 13, 216–224.
- Tsikakos, D., 2017. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal. Biochem., Lipid Methodology* 524, 13–30.
- Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A.S., Kaushal, C., Sharma, S., 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2, 236–240.
- Urbano, F., Bugliani, M., Filippello, A., Scamporrino, A., Mauro, S.D., Pino, A.D., Scicali, R., Noto, D., et al., 2017. Atorvastatin but Not Pravastatin Impairs Mitochondrial Function in Human Pancreatic Islets and Rat β -Cells. Direct Effect of Oxidative Stress. *Sci. Rep.* 7, 1–17.
- Van Noorden, R., Maher, B., Nuzzo, R., 2014. The top 100 papers. *Nat. News* 514, 550.
- Van Wyngene, L., Vanderhaeghen, T., Timmermans, S., Vandewalle, J., Van Looveren, K., Souffriau, J., Wallaey, C., Eggermont, M., et al., 2020. Hepatic PPAR α function and lipid metabolic pathways are dysregulated in polymicrobial sepsis. *EMBO Mol. Med.* 12, e11319.
- Vaughan, R.A., Garcia-Smith, R., Bisoffi, M., Conn, C.A., Trujillo, K.A., 2013. Ubiquinol rescues simvastatin-suppression of mitochondrial content, function and metabolism: implications for statin-induced rhabdomyolysis. *Eur. J. Pharmacol.* 711, 1–9.
- Vevera, J., Fišar, Z., Vrablík, M., Zlatohlávek, L., Hroudová, J., Singh, N., Raboch, J., Valeš, K., 2016. Statin-Induced Changes in Mitochondrial Respiration in Blood Platelets in Rats and Human With Dyslipidemia 65, 12.
- Víctor, V.M., Espulgues, J.V., Hernández-Mijares, A., Rocha, M., 2009. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infect. Disord. Drug Targets* 9, 376–389.
- Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, A., Bruining, H., Reinhart, C.K., Suter, P.M., et al., 1996. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 22, 707–710.
- Vincent, J.-L., Opal, S.M., Marshall, J.C., Tracey, K.J., 2013. Sepsis definitions: time for change. *Lancet Lond. Engl.* 381, 774–775.
- Weidinger, A., Dungal, P., Perlinger, M., Singer, K., Ghebes, C., Duvigneau, J.C., Müllebner, A., Schäfer, U., et al., 2013. Experimental data suggesting that inflammation mediated rat liver mitochondrial dysfunction results from secondary hypoxia rather than from direct effects of inflammatory mediators. *Front. Physiol.* 4, 138.
- Weidinger, A., Müllebner, A., Paier-Pourani, J., Banerjee, A., Miller, I., Lauterböck, L., Duvigneau, J.C., Skulachev, V.P., et al., 2015. Vicious inducible nitric oxide synthase-mitochondrial reactive oxygen species cycle accelerates inflammatory response and causes liver injury in rats. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 572–586.
- Woźnica, E., Ingłot, M., Woźnica, R., Łysenko, L., 2018. Liver dysfunction in sepsis. *Adv. Clin. Exp. Med.* 27, 547–552.
- Yan, J., Li, Song, Li, Shulin, 2014. The role of the liver in sepsis. *Int. Rev. Immunol.* 33, 498–510.
- Yorulmaz, H., Ozkok, E., Erguven, M., Ates, G., Aydın, I., Tamer, S., 2015. Effect of simvastatin on mitochondrial enzyme activities, ghrelin, hypoxia-inducible 8, 3640–3650.
- Zhang, A., Vertommen, J., Van Gaal, L., De Leeuw, I., 1995. Effects of pravastatin on lipid levels, in vitro oxidizability of non-HDL lipoproteins and microalbuminuria in IDDM patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 29, 189–194.
- Zinellu, A., Paliogiannis, P., Usai, M.F., Carru, C., Mangoni, A.A., 2019. Effect of statin treatment on circulating malondialdehyde concentrations: a systematic review and meta-analysis. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 10, 2040622319862714.

8 Anhang

8.1 *Septic rat severity scoring system*

Untersuchungsbogen

Experiment: _____ OP Datum: _____

Stentdurchmesser: _____ G Ratte-Nr: _____ Stentimplantation: _____ Uhr

Klinische Untersuchung:

	Ergebnis	Beurteilung	Uhrzeit																				
Körpergewicht	1. präop. Gewicht (pG) _____ g 2. Momentanwert (mW) _____ g 3. Δ = % des mW vom pG _____ Δ % 5% = _____ g 15% = _____ g	Δ % < 5 \Rightarrow 0 P Δ % < 15 \Rightarrow 1 P Δ % < 20 \Rightarrow 2 P Δ % > 20 \Rightarrow 3 P																					
Erscheinung	1. normale Erscheinung, Fell anliegend, sauber geputzt 2. geringes Pflegedefizit, Fell gestäubt 3. zunehmendes Pflegedef., Ränder an Auge/Anus 4. deutliches Pflegedef., Augen verklebt, Einstreuhafet am Anus	\Rightarrow 0 P \Rightarrow 1 P \Rightarrow 2 P \Rightarrow 3 P																					
Verhalten spontan	1. Ratte (R) erkundet Käfig, aktiv 2. R sitzt auf einer Stelle, Ganzkörperbewegung vorhanden 3. buckelige Haltung, schwankender Gang 4. immobil, Seitenlage	\Rightarrow 0 P \Rightarrow 1 P \Rightarrow 2 P \Rightarrow 3 P																					
Verhalten provoziert	1. R flieht bei Käfigöffnung, starker Muskeltonus 2. R flieht erst bei Annäherung der Hand 3. R flieht erst bei Berührung 4. Fluchtreflex erloschen	\Rightarrow 0 P \Rightarrow 1 P \Rightarrow 2 P \Rightarrow 3 P																					
Atemfrequenz	1. präop. Wert (pW) _____ 1/s 2. Momentanwert (mW) _____ 1/s 3. Δ = % des mW vom pW _____ Δ %	Δ % < 10 \Rightarrow 0 P Δ % < 20 \Rightarrow 1 P Δ % < 50 \Rightarrow 2 P Δ % > 50 \Rightarrow 3 P																					
Exp. Atemgeräusch	Nein Ja	\Rightarrow 0 P \Rightarrow 1 P																					
Abd.-palpation	1. kein Druckschmerz bei AP, weiches Abdomen 2. geringe Reaktion auf AP, weiches Abdomen 3. deutliche Schmerzzeichen auf AP, abd. Resistenz 4. deutl. Schmerzzeichen auf AP, hartes Abdomen	\Rightarrow 0 P \Rightarrow 1 P \Rightarrow 2 P \Rightarrow 3 P																					
Kotbeschaffenheit	1. viel normaler Kot im Käfig, koten während der Untersuchung 2. viel Kot im Käfig, Kot blutig, dünnflüssig oder schleimig 3. kein Kot im Käfig	\Rightarrow 0 P \Rightarrow 1 P \Rightarrow 2 P																					

Auswertung:

Erklärung: bewertet wird jeweils nur einmal die maximal erreichte Punktzahl pro Kategorie. Ist in wenigstens zwei Kategorien die maximal erreichbare Punktzahl von 3 Punkten erreicht, werden alle 3-Punkte Werte auf 4 Punkte aufgewertet. Die Gabe von Schmerzmittel wird durch Umkreisung dokumentiert. Opferung des Tieres bei 12 und mehr Punkten!																							
Untersucher																							

Obduktionsbefund:

Tabelle 6: *Septic rat severity scoring system*

Danksagung

Herzlich möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der letzten Jahre bei meinem Promotionsvorhaben unterstützt haben. Ich blicke auf eine spannende, lehrreiche und intensive Zeit zurück.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Olaf Picker für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und seine kontinuierliche Unterstützung und Beratung. Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Scheckenbach danke ich für die Übernahme der Ko-Betreuung.

Bei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Unterstützung bei meinem Start in die wissenschaftliche Tätigkeit, ihr immer offenes Ohr für Fragen und ihre Zuverlässigkeit. Danke auch für die kritische Durchsicht dieser Arbeit. Als habilitierte Ärztin ist sie mir in ihrer klinisch-praktischen und wissenschaftlichen Tätigkeit ein Vorbild.

Gedankt sei auch Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer für das Schaffen der Rahmenbedingungen der Labortätigkeit, die Möglichkeit der thematischen Vertiefung im Rahmen des Wahlfachs und die Begleitung bei der Vorbereitung meines Vortrags auf dem Symposium der *Medical Research School* Düsseldorf. Auch bedanke ich mich bei der Med.-Tech. Assistentin Claudia Dohle, deren Bürotür im Labor immer geöffnet ist und die mich mit Rat und Tat unterstützt hat. Den Tierärztinnen Claudia Hansen und Katharina Gross danke ich für ihre Unterstützung beim tierexperimentellen Teil. Meinem „Mit-Doktoranden“ Jan-Joschua Ripkens gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit bei den laborexperimentellen Versuchen.

Zuletzt möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern, Geschwistern, Freunden und besonders meinem Freund Bahne für die Unterstützung danken. Danke, dass ihr mich in meinem wissenschaftlichen Interesse anspornt und motiviert.