

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 im Colon im septischen Rattenmodell**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jan-Joschua Ripkens
2022

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

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Kathrin Scheckenbach

Für meine Familie.

Zusammenfassung

Aufgrund einer gestörten Immunantwort kommt es bei septischen Patienten zu einer lebensbedrohlichen (Multi-) Organdysfunktion (MODS). Angesichts fehlender therapeutischer Innovationen ist die Sterblichkeit unverändert hoch. In Tierversuchen und klinischen Studien zeigte sich, dass eine Statin-Vorbehandlung einen positiven Einfluss auf die Krankheitsentwicklung der Sepsis haben kann. Zentrale pathophysiologische Mechanismen bei MODS sind eine mitochondriale Dysfunktion und Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Der Krankheitsverlauf kann über eine Permeabilitätssteigerung im Gastrointestinaltrakt maßgeblich negativ beeinflusst werden. Über pleiotrope Effekte können Statine die Immun- und Mitochondrienfunktion (MF), vermutlich unter Vermittlung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptor- α (PPAR- α), modulieren. Die vorliegende Dissertation untersucht, inwiefern die MF und ROS-Produktion im Dickdarm durch das Statin Pravastatin (PR) unter (nicht-) septischen Bedingungen beeinflusst und, ob eine potenzielle Wirkung über den PPAR- α vermittelt wird. Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurden Wistar-Ratten mit PR, dem PPAR- α -Blocker GW 6471 (GW), der Kombination PR/GW oder dessen Trägersubstanzen (Kontrolle) vorbehandelt. 18 Stunden später wurde über operativ eingebrachte Stents im Colon ascendens eine abdominelle Sepsis induziert (CASP; n=8-10 pro Gruppe). In der Kontrollgruppe wurde die Darmwandkontinuität nicht beeinflusst (Sham; n=10 pro Gruppe). 24 Stunden danach wurde die MF *ex vivo* mittels Respirometrie ermittelt. Hierbei wurde der Sauerstoffverbrauch in Colon-Homogenaten nach Substratstimulation für Komplex I und II der Atmungskette (AK) und Zugabe von ADP mittels Clark-Elektrode bestimmt. Als Maß für die Kopplung von AK und oxidativer Phosphorylierung (OXPHOS) wurde der *Respiratory Control Index* (RCI) und als Maß für die Effizienz der ADP/O-Quotient gebildet. Als Surrogat für oxidativen Stress wurde Malondialdehyd (MDA) in Colon-Homogenaten mittels Thiobarbitursäure-Assay quantifiziert. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way ANOVA* und Tukey's post-hoc Test. Ergebnisse mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Nach PR-Gabe war der RCI im Vergleich zur Kontrolle in der Sham-Gruppe reduziert (Komplex I: Kontrolle: $5,3 \pm 2,3$; PR: $3,3 \pm 0,9^*$; Komplex II: Kontrolle: $5,0 \pm 0,9$; PR: $3,8 \pm 1,0^*$). Die RCI-Reduktion für Komplex II war zusätzlich signifikant im Vergleich zur Vorbehandlung mit GW und der Kombination PR/GW (PR: $3,8 \pm 1,0$; GW: $5,5 \pm 0,7^*$; PR/GW: $5,5 \pm 0,9^*$). Der ADP/O-Quotient wurde in der Sham-Gruppe nicht beeinflusst. Eine PR-Vorbehandlung hat in der CASP-Gruppe weder den RCI noch den ADP/O-Quotienten verändert. Die MDA-Konzentration wurde durch PR nicht modifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass PR Dickdarm-Mitochondrien nach steriler Laparotomie unter Vermittlung des PPAR- α entkoppelt, ohne die ROS-Produktion signifikant zu verändern. Unter septischen Bedingungen konnte PR die MF und ROS-Produktion im Colon nicht beeinflussen.

Summary

Due to an impaired immune response, life-threatening (multi) organ dysfunction (MODS) occurs in septic patients. In the absence of therapeutic innovations, mortality remains high. Animal experiments and clinical studies have shown that statin pretreatment can have a positive effect on the development of sepsis. Central pathophysiological mechanisms of MODS are mitochondrial dysfunction and excessive production of reactive oxygen species (ROS). The progress of disease can be significantly impaired by an increased permeability in the gastrointestinal tract. Statins can modulate immune and mitochondrial function (MF) via pleiotropic effects, possibly acting through peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α). The aim of this work was to investigate to what extent pravastatin (PR) affects MF and ROS production in the colon under (non-) septic conditions and whether a potential effect is mediated by PPAR- α . After approval, Wistar rats were pretreated with PR, the PPAR- α blocker GW 6471 (GW), the combination of PR/GW or its carrier substances (control). 18 hours later, surgically inserted stents in the ascending colon induced abdominal sepsis (CASP; n = 8-10 per group). The continuity of the colonic wall was not affected in the control group (sham; n = 10 per group). 24 hours later, the MF was determined *ex vivo* by respirometry. The oxygen consumption in colon homogenates after substrate stimulation for complex I and II of the respiratory chain (RC) and addition of ADP was measured using a Clark type electrode. The Respiratory Control Index (RCI) was calculated as an indicator for the coupling of RC and oxidative phosphorylation (OXPHOS) and the ADP/O quotient was formed as an indicator of efficiency. As a surrogate for oxidative stress, malondialdehyde (MDA) was quantified in colon homogenates using the thiobarbituric acid assay. The data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test. Results with a significance level of $p < 0.05$ are shown as mean \pm standard deviation. After PR administration, the RCI in the sham group was reduced compared to control (complex I: control: 5.3 ± 2.3 ; PR: $3.3 \pm 0.9^*$; complex II: control: 5.0 ± 0.9 ; PR: $3.8 \pm 1.0^*$). The PR-related reduction of RCI for complex II was also significant compared to the pretreatment with GW and the combination PR/GW (PR: 3.8 ± 1.0 ; GW: $5.5 \pm 0.7^*$; PR/GW: $5.5 \pm 0.9^*$). The ADP/O quotient was not influenced in the sham group. PR pretreatment did not change either the RCI or the ADP/O quotient in the CASP group. The MDA concentration was not modified by PR. It could be shown that PR uncouples colonic mitochondria after sterile laparotomy through PPAR- α , without significantly changing the ROS production. Under septic conditions, PR was unable to influence MF and ROS production in the colon.

Abkürzungsverzeichnis

(q)SOFA-Score	<i>(Quick) Sequential organ failure assessment - Score</i>	FADH₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
° C	Grad Celsius	FiO₂	Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion
ADP	Adenosindiphosphat	g	Gramm
ADP/O-Quotient	Adenosindiphosphat/Sauerstoff-Verhältnis	G	Gauge
AK	Atmungskette	GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
ANOVA	<i>Analysis of Variances</i> (= Varianzanalyse)	GW 6471	PPAR- α -Antagonist
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> (= Destilliertes Wasser)	h	Stunden
ATP	Adenosintriphosphat	H₂O	Wasser
ATPase	Adenosintriphosphatase	HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
Bzw.	Beziehungsweise	i.p.	intraperitoneal
ca.	circa	i.V.m.	in Verbindung mit
CASP	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>	IMM	Innere Mitochondrienmembran
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i>	kg	Kilogramm
cm	Zentimeter	KG	Körpergewicht
Co KG	Compagnie Kommanditgesellschaft	l	Liter
DAMPs	<i>Damage-associated Molecular Patterns</i>	LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
dl	Deziliter	LPS	Lipopolysaccharid
DMSO	Dimethylsulfoxid	MDA	Malondialdehyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MF	Mitochondriale Funktion
E. coli	Escherichia coli	mg	Milligramm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	min	Minute
et al.	et alii, -ae, -a (= und andere)	ml	Milliliter
Fa.	Firma	mm	Millimeter
		mM	Millimolar
		mm²	Quadratmillimeter

MMDS	<i>Microcirculatory and mitochondrial distress syndrome</i>	U/min.	Umdrehungen pro Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule	USA	Vereinigte Staaten von Amerika
mmol	Millimol	v.a.	vor allem
MODS	Multiorgandysfunktion	vgl.	vergleiche
n	Größe der Stichprobe	Vol.	Volumen
NaCl	Natriumchlorid	Wy-14643	PPAR- α -Agonist
NADH/ H⁺	Nikotinamidadenin-dinukleotid	ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben
nm	Nanometer	μg	Mikrogramm
nmol	Nanomol	μg	Mikrogramm
o.g.	oben genannt	μl	Mikroliter
O₂	Sauerstoff	μM	Mikromolar
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung		
pA	Picoampere		
PAMPs	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>		
pH	Potential des Wasserstoffs		
PPAR-α	Peroxisom-Proliferator-aktivieren-Rezeptor- α		
RCI	<i>Respiratory control index</i>		
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies		
s.	siehe		
s.c.	subkutan		
TBA	Thiobarbitursäure		
TierSchG	Tierschutzgesetz		
TierSch-VersV	Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren		
u.a.	unter anderem		

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Sepsis - Definition & Bedeutung	1
1.2 Pathophysiologie der Sepsis	2
1.3 Mitochondrien und Oxidativer Stress bei Sepsis	3
1.4 Sepsis und Gastrointestinaltrakt	5
1.5 Statine und Sepsis	6
2 Fragestellung / Ziele der Arbeit	8
3 Material und Methoden.....	9
3.1 Tierexperimenteller Teil	9
3.1.1 Versuchstiere	9
3.1.2 Tierexperimenteller Versuchsablauf.....	10
3.1.3 CASP- und Sham-Operation	11
3.1.4 Organentnahme	12
3.2 Laborexperimenteller Teil	14
3.2.1 Herstellung des Colon-Homogenats	14
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration im Colon-Homogenat	15
3.2.3 Bestimmung der mitochondrialen Funktion mittels Respirometrie	17
3.2.4 Bestimmung von Malondialdehyd im Colon	21
3.3 Statistische Auswertung	23
4 Ergebnisse	24
4.1 <i>In vivo</i> Pravastatin Wirkung auf die mitochondriale Funktion im Colon unter nicht-septischen Bedingungen.....	24
4.2 <i>In vivo</i> Pravastatin Wirkung auf die mitochondriale Funktion im Colon unter septischen Bedingungen	26
4.3 <i>In vivo</i> Pravastatin Wirkung auf die MDA-Konzentration im Colon unter septischen und nicht-septischen Bedingungen	28

5 Diskussion.....	29
5.1 Methodendiskussion	30
5.2 Ergebnisdiskussion.....	32
5.2.1 Effekt von Pravastatin auf die mitochondriale Funktion im Colon unter nicht-septischen Bedingungen	32
5.2.2 Effekt von Pravastatin auf die mitochondriale Funktion im Colon unter septischen Bedingungen	34
5.2.3 Einfluss von Pravastatin auf den oxidativen Stress im Dickdarm unter nicht-septischen und septischen Bedingungen.....	36
5.3 Zusammenfassung	37
6 Literaturverzeichnis.....	38
7 Anhang	46
7.1 Tabellenverzeichnis	46
7.2 Abbildungsverzeichnis	46
7.3 Materialien, Geräte und Medikamente des tierexperimentellen Versuchsteils	47
7.4 Materialien und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils.....	48
7.5 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils	50

1 Einleitung

1.1 Sepsis - Definition & Bedeutung

Sepsis bezeichnet einen Zustand, bei dem es aufgrund einer dysregulierten Immunantwort auf eine potenzielle Infektion zu einer lebensbedrohlichen (Multi-) Organdysfunktion kommt.¹ Auf der Intensivstation kann eine derart kritische Organdysfunktion mit einem Anstieg um ≥ 2 Punkte im *Sequential organ failure assessment* (SOFA)-Score identifiziert werden.^{1,2} Bei diesem Score werden mittels spezifischer Labor- und Funktionsparameter (Oxygenierungsindex nach Horowitz, Kreatinin, Bilirubin, mittlerer arterieller Druck + Katecholaminbedarf, Thrombozytenzahl, *Glasgow-Coma-Scale*) sechs Organe bzw. Organsysteme (Lunge, Niere, Leber, Herz-Kreislauf-System, Blutgerinnung und Zentrales Nervensystem) entsprechend ihrer Beeinträchtigung mit einer Punktzahl von 0 bis 4 bewertet.³ Außerhalb von Intensivstationen kann eine septische Organdysfunktion mit schlechter Prognose ohne aufwendige apparative Diagnostik mithilfe des *quick SOFA* (qSOFA)-Scores ermittelt werden.^{1,2} Die Wahrscheinlichkeit hierfür steigt, sofern zwei der folgenden drei Symptome vorhanden sind: Tachypnoe (Atemfrequenz ≥ 22 /min), Vigilanzminderung (*Glasgow-Coma-Scale* < 15), arterielle Hypotonie (Systolischer Blutdruck ≤ 100 mmHg). Kommt es zu einer Progredienz mit ausgeprägter kardiovaskulärer, zellulärer und metabolischer Dysfunktion, so liegt definitionsgemäß ein septischer Schock, die Maximalvariante der Sepsis, vor.¹ Vorausgesetzt eine Hypovolämie als Ursache wurde ausgeschlossen, müssen zur klinischen Diagnose zusätzlich die zwei folgenden Bedingungen erfüllt sein: Zum einen muss die Notwendigkeit einer Vasopressor-Therapie zur Aufrechterhaltung eines mittleren arteriellen Blutdruckes von ≥ 65 mmHg (Kreislaufdysregulation) gegeben sein. Zum anderen muss ein Serum-Lactat Wert von > 2 mmol/l bzw. 18 mg/dl (zelluläre / metabolische Funktionsstörung) vorliegen.¹

Die Inzidenz und Sterblichkeit der Sepsis variiert weltweit erheblich und ist abhängig von soziodemographischen Parametern.⁴ Nach Schätzungen von Rudd et al. gab es im Jahr 2017 weltweit 48,9 Millionen Sepsis-Fälle und 11 Millionen Todesfälle, die im Zusammenhang mit der Sepsis stehen.⁴ Fast jeder fünfte Todesfall (19,7 %)

konnte mit einer Sepsis in Verbindung gebracht werden.⁴ Einer von vier Sepsis-Patienten weltweit überlebt den septischen Schock nicht.⁵ In Deutschland stiegen die Sepsis-Fallzahlen von 2007 bis 2013 um durchschnittlich 5,7 % pro Jahr.⁶ Ein annähernd linearer Anstieg der Krankenhaussterblichkeit ab einem Lebensalter von 40 Jahren erlangt unter Berücksichtigung des demographischen Wandels besondere Bedeutung.⁶ Trotz der Fortschritte in der modernen (Intensiv-) Medizin starben 2013 immer noch 24,3 % der Sepsis-Patienten in deutschen Krankenhäusern.⁶ Auch die INSEP-Studie offenbarte für das Jahr 2013 eine Krankenhaus- und Intensivstationssterblichkeit für Patienten mit septischem Schock von 50,9 % und 44,3 %.⁷ Vor diesem Hintergrund wird die aktuelle und zukünftige sozialmedizinische Bedeutung der Sepsis deutlich.

Dabei fehlt es immer noch an therapeutischen Innovationen, die das Behandlungsergebnis deutlich verbessern.⁸ Unabhängig davon verbessert, wie auch beim Polytrauma, akuten Herzinfarkt und Schlaganfall, eine möglichst frühe Diagnosestellung und Therapie das Behandlungsergebnis.⁹ Bei den Überlebenden variiert die Prognose erheblich. 50 % erholen sich, ein Drittel verstirbt im Folgejahr und ein Sechstel behält schwere, dauerhafte Einschränkungen.¹⁰ Diese Langzeitfolgen beinhalten neben neuen, funktionellen Einschränkungen auch milde bis schwere kognitive Beeinträchtigungen.^{10,11} Zusätzlich entwickelt ein großer Anteil der Sepsis-Überlebenden psychische Probleme wie Angststörung, Depression und posttraumatische Belastungsstörung.^{10,12} Rosendahl et al. fanden heraus, dass diese psychischen Folgeerkrankungen nicht nur die Patienten, sondern auch deren Partner betreffen.¹² Laut dem Bundesversicherungsamt ergaben sich im Jahr 2013 mittlere Leistungsausgaben von 27.467,92 € pro Sepsis-Fall in Deutschland, was für die stationäre und nachfolgende ambulante Behandlung Gesamtkosten von ca. 7,7 Milliarden Euro ausmacht.⁶

Nicht nur die unverändert schlechte Prognose für jeden einzelnen Sepsis-Patienten, sondern auch die sozialmedizinischen und sozioökonomischen Herausforderungen erfordern ein genaueres Verständnis des Krankheitsbildes Sepsis zur Identifizierung neuer Therapieansätze.

1.2 Pathophysiologie der Sepsis

In Übereinstimmung mit der aktuellen *Sepsis-3-Definition*² liegt der Schwerpunkt der Pathophysiologie nicht mehr beim Pathogen, als Auslöser einer Immunantwort,

sondern bei der abnormen, dysregulierten Wirtsantwort.⁸ Im Rahmen der physiologischen Entzündungsreaktion werden Erregerbestandteile, sogenannte *Pathogen-associated Molecular Patterns* (PAMPs), und / oder endogene Moleküle nach Zelluntergang, sogenannte *Damage-associated Molecular Patterns* (DAMPs), über die Aktivierung spezifischer Rezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*) vom Immunsystem erkannt.^{8,13} Dies führt über komplexe Signalkaskaden zur Aktivierung oder Inhibierung von endothelialen, hormonellen, bioenergetischen, metabolischen und immunologischen Signalwegen.⁸ Ziel dieser streng regulierten Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Signalen ist die Identifizierung, Eingrenzung und Elimination des Infektionserregers.⁸ Eine Dysregulation dieser Mechanismen, dessen Ursache noch nicht vollends geklärt ist, kann zu einer potenziell lebensgefährlichen Funktionsstörung des primär-betroffenen Organs oder auch entfernter Organe führen.⁸ Letztendlich kommt es u.a. durch vaskuläre, myokardiale und neuronale Veränderungen zu einer Hypotension und systemischen Hypoperfusion.⁸

1.3 Mitochondrien und Oxidativer Stress bei Sepsis

Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass der zelluläre Untergang in Form von Apoptose alleine nicht ausreicht, um die Organdysfunktion bei Sepsis zu erklären.¹⁴ Ein energetisches Defizit bzw. ein bioenergetisches Versagen sind von zentraler Bedeutung für die Ausbildung eines Multiorganversagens und das schlechtere klinische *Outcome* von septischen Patienten.^{15,16} Es liegt also nahe, dass den Mitochondrien, als den wichtigsten Zellorganellen energiebringender Stoffwechselprozesse, eine zentrale Bedeutung zukommen könnte.

Eine Störung der Mikrozirkulation kann im Verlauf einer Sepsis zu einer mitochondrialen Dysfunktion führen und die regionale Gewebeschädigung vorantreiben.¹⁷ Dies wird als *microcirculatory and mitochondrial distress syndrome* (MMDS) bezeichnet.¹⁸ Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die periphere Sauerstoffverfügbarkeit bei septischen Patienten nicht vermindert ist und nicht die gestörte Gewebeoxygenierung allein die Ursache der zellulären Dysfunktion sein kann.^{19,20} So wird der Erklärungsansatz, dass eine gestörte Zellenergetik auf einer mitochondrialen Verwertungsstörung des Sauerstoffs beruht, als zytopathische Hypoxie bezeichnet.^{21–23} Eine andere Hypothese wiederum besagt, dass die septische Organdysfunktion einen protektiven Anpassungsmechanismus des

Organismus darstellt.^{8,24} Laut Singer et al. werden organspezifische Zellfunktionen durch Abnahme der mitochondrialen Aktivität zugunsten von lebensnotwendigen, zellulären Aufgaben wie die Aufrechterhaltung der Membranintegrität reduziert.²⁴

In den Mitochondrien werden im Rahmen der Atmungskette exergone Redoxreaktionen genutzt, um eine elektrochemische Potentialdifferenz zwischen mitochondrialer Matrix und Intermembranraum aufzubauen.²⁵ Durch die unvollständige Reduktion von Sauerstoff können hierbei u.a. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Normalerweise regulieren anti-oxidative Proteine, wie die Superoxiddismutase und Glutathion, das Redoxgleichgewicht in den Mitochondrien.¹⁵ Kommt es im Rahmen eines septischen Krankheitsverlaufes zu einer übermäßigen Produktion von ROS, so führt dies bei Erschöpfung der anti-oxidativen Kapazität zu oxidativem Stress.^{8,15} Durch die Beschädigung von Proteinen, Lipiden und DNA-Bestandteilen kann dieser die mitochondriale Funktion beeinträchtigen und somit zur Zell- bzw. Organdysfunktion beitragen.^{15,26} Carré et al. konnten zeigen, dass das Überleben einer schweren Krankheit mit der frühzeitigen Aktivierung der mitochondrialen Biogenese und oxidativen Stressantwort assoziiert war.²⁷ Störungen dieser Kompensationsmechanismen führen eventuell zu einer stärkeren Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Mitochondrienschaden und somit zu Störungen des zellulären Energiestoffwechsels.²⁷

Sowohl in experimentellen Sepsis-Tiermodellen als auch in klinischen Studien an Sepsis-Patienten weist die mitochondriale Funktion eine hohe Variabilität auf.²⁸ Diese nicht eindeutige Studienlage offenbart, dass die Mitochondrienfunktion organspezifisch, variabel und abhängig vom Krankheitsverlauf ist.²⁸ Es gibt Hinweise für einen Zusammenhang zwischen mitochondrialer Dysfunktion und Sepsis-induziertem Multiorganversagen.²⁹ Sepsis-Überlebende haben eine bessere Erhaltung von Adenosintriphosphat (ATP), mitochondrialer Funktion und Biogenese-Markern.²⁹ Die genaue Bedeutung der Mitochondrien bei Sepsis-bedingter Organdysfunktion ist jedoch noch immer unklar. Auf der einen Seite kann ein septischer Krankheitsverlauf durch eine übermäßige ROS-Produktion die mitochondriale Dysfunktion begünstigen.³⁰ Auf der anderen Seite sind Mitochondrien aber auch Hauptproduzenten der ROS.³⁰ Somit bleibt ungeklärt, ob die mitochondriale Dysfunktion ursächlich für das Sepsis-induzierte Organversagen ist oder lediglich begleitend auftritt.^{29,30}

1.4 Sepsis und Gastrointestinaltrakt

Der Gastrointestinaltrakt stellt nach den unteren Atemwegen mit 28,7 % den zweithäufigsten Infektionsfokus bei septischen Patienten dar.⁷ Dabei macht eine epitheliale Dysfunktion bzw. Hyperpermeabilität der Darmschleimhaut einen wichtigen pathophysiologischen Bestandteil der Sepsis aus.³¹ Einerseits kann es durch eine gestörte Darmintegrität zu einer bakteriellen Translokation von lebenden Bakterien, Toxinen, Antigenen und anderen mikrobiellen Bestandteilen aus dem Darmlumen in den Kreislauf kommen, was wiederum zu einer systemischen Entzündung und Sepsis führen kann.³² Andererseits ist die Darmintegrität bei kritischer Krankheit bereits beeinträchtigt.³³ So zeigte sich in klinisch relevanten Sepsis-Modellen mit abdominellem und pulmonalem Fokus eine signifikante Permeabilitätssteigerung im Darm.³⁴ Schon eine Kreislaufdysregulation in Form eines hämorrhagischen Schocks kann die normale Barrierefunktion physisch stören und zumindest teilweise zu einer bakteriellen Translokation und Endotoxämie führen.³⁵ Die gezielte Behandlung einer Integritätsstörung des Darms führte dahingegen in mehreren präklinischen Studien zu einem verbesserten Überleben bei kritisch Erkrankten.³³ Der Gastrointestinaltrakt kann somit den Krankheitsverlauf bei Sepsis über eine Permeabilitätssteigerung und bakterielle Translokation entscheidend beeinflussen, unabhängig davon, ob er primärer Infektionsfokus ist oder nicht.

Wenige Studien beschäftigen sich mit der Mitochondrienfunktion im Darm des septischen Organismus. King et al. konnten nachweisen, dass eine Endotoxämie bei Ratten eine verminderte Sauerstoffverwertung der Ileumschleimhaut hervorruft.³⁶ 6 Stunden nach Induktion einer akuten Pankreatitis war die Mitochondrienfunktion im Jejunum, nicht aber im Duodenum beeinträchtigt.³⁷ In einem abdominalen Sepsis-Modell bei Ratten zeigten Herminghaus et al. wiederum für den Dickdarm, dass die mitochondriale Atmung weder in der Anfangsphase (bis 48 h) noch im späteren Zeitraum (bis 96 h) verändert war.³⁸ Das Ausmaß und die genaue Bedeutung einer beeinträchtigten Mitochondrienfunktion in den verschiedenen Darmabschnitten sind noch immer unklar. Dennoch könnte eine Funktionsstörung der Mitochondrien den septischen Krankheitsverlauf über eine veränderte Darmintegrität entscheidend beeinflussen. So zeigten Nazli et al., dass Darmepithelien unter metabolischem Stress normalerweise harmlose Bakterien (nicht-invasive *E. coli*) als bedrohlich wahrnehmen, was zu einem Verlust der

Barrierefunktion, vermehrter Bakterienpenetration in die Schleimhaut und gesteigerter Chemokin-Synthese führt.³⁹ Auch Saxena et al. fanden heraus, dass eine reduzierte Mitochondrienfunktion die Epithel-Bakterien-Interaktion stört und durch eine bakterielle Translokation eine verstärkte Immunantwort ausgelöst wird.⁴⁰ Eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion im Gastrointestinaltrakt könnte somit eine neue Therapieoption bei septischen Patienten werden.

1.5 Statine und Sepsis

Statine gehören zu den am häufigsten verschriebenen Arzneimitteln der Welt und sind für die Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen und damit verbundener Sterblichkeit von hoher Relevanz.⁴¹ 2012 verwendeten in den USA mehr als 25 % der über 40-Jährigen ein Statin.⁴² Statine hemmen kompetitiv das hepatische Enzym HMG-CoA-Reduktase, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese katalysiert.⁴³

Klinisch konnte beobachtet werden, dass Patienten mit einer Statin-Vorbehandlung wahrscheinlich seltener eine schwere Form der Sepsis entwickeln und weniger häufig intensivpflichtig wurden.⁴⁴ Bei schwerkranken Sepsis-Patienten war die Statin-Vorbehandlung mit einer Abnahme der 30-Tage-Krankenhaus- und Intensivstationssterblichkeit und einer Verkürzung der Verweildauer auf der Intensivstation assoziiert.⁴⁵ Auch in abdominalen Sepsis-Modellen bei Mäusen⁴⁶ und Ratten⁴⁷ konnte eine Vorbehandlung mit einem Statin das *Outcome* verbessern. Ein Review von Ghayda et al. bestätigte, dass eine Statintherapie mit einer reduzierten Sterblichkeit aufgrund von Infektionen einhergeht.⁴⁸ Über vielfältige pleiotrope Effekte können Statine direkt und indirekt Immun- und Entzündungsreaktionen modulieren und somit potenziell das Gesamtausmaß der systemischen Dysregulation bei Sepsis positiv beeinflussen.⁴⁹

Es zeigte sich, dass Statine die Mitochondrienfunktion unter septischen und nicht-septischen Bedingungen vielfältig beeinflussen. Unter Normalbedingungen beeinträchtigen v.a. lipophile Statine (u.a. Simvastatin) Skelettmuskelmitochondrien über folgende Mechanismen: Veränderung des Membranpotentials^{50,51}, Mitochondrienschwellung⁵⁰, Cytochrom-c Freisetzung⁵⁰, DNA-Fragmentierung⁵⁰, Reduktion der mitochondrialen Atmung^{50,51} und Volumenreduktion⁵². Das hydrophile Pravastatin scheint dagegen deutlich weniger toxisch.⁵⁰ HMG-CoA-

Reduktase-Hemmer können über einen Mechanismus, der *Mitohormesis* bezeichnet wird, den menschlichen Herzmuskel schützen, indem durch milden oxidativen Stress (ROS-Produktion) die mitochondriale Biogenese stimuliert wird.⁵³ Umgekehrt bewirken sie durch zu viel oxidativen Stress (ROS-Produktion) in der Skelettmuskulatur eine Herunterregulation der mitochondrialen Biogenese, Mitochondriendysfunktion und Myopathie.⁵³ Brealey et al. vermuteten, dass Statine die mitochondriale Funktion bei der Sepsis über eine Verminderung von Ubichinon zusätzlich negativ beeinflussen könnten.⁵⁴ Im Gegensatz dazu stellten Morel et al. die Hypothese auf, dass durch eine Verringerung der mitochondrialen Aktivität die ROS-Produktion reduziert und somit bei Sepsis zu einem höheren Mitochondrien- und Zellschutz beigetragen werden kann.⁵⁵ In einem Sepsis-Modell mit abdominellem Fokus bei Ratten konnte eine Simvastatin Behandlung den reduzierten Sauerstoffverbrauch in Skelettmuskelmitochondrien wieder normalisieren und somit die mitochondriale Atmung unter septischen Bedingungen verbessern.⁴⁷

Die Zytokin-Produktion, Expression von Adhäsionsmolekülen, Apoptose und Zelldifferenzierung ist bei vielen entzündlichen Prozessen insbesondere über PPAR- α (Peroxisom-Proliferator-aktivieren-Rezeptor- α) reguliert.⁵⁶ So vermittelt dieser nukleäre Rezeptor vermutlich auch immunmodulatorische Effekte von Statinen.^{57,58} Endogene und exogene PPAR- α -Agonisten konnten den Grad einer experimentell verursachten Kolitis im Mausmodell reduzieren.⁵⁹ Simvastatin verhinderte, vermutlich über eine erhöhte Expression von PPAR- α , sowohl auf molekularer als auch auf zellulärer Ebene Organschäden eines nicht-septischen Schocks im Tierversuch.⁶⁰ Eine potenziell-protective Wirkung auf die Mitochondrienfunktion und ROS-Produktion im Darm könnte somit über den PPAR- α vermittelt sein und einen Therapieansatz bei septischen Patienten darstellen.

2 Fragestellung / Ziele der Arbeit

Aus diesen Überlegungen ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Welchen Einfluss hat Pravastatin auf die mitochondriale Funktion im Colon nach einer sterilen Laparotomie und nach Induktion einer abdominellen Sepsis im Rattenmodell?
- Beeinflusst Pravastatin die Malondialdehyd (MDA)-Konzentration, als Surrogat für oxidativen Stress, im Colon von Ratten unter septischen und nicht-septischen Bedingungen?
- Wird eine potenzielle Wirkung über den Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptor- α (PPAR- α) vermittelt?

3 Material und Methoden

3.1 Tierexperimenteller Teil

Im Anhang sind alle Medikamente, Materialien und Geräte aufgeführt, die im Rahmen des tierexperimentellen Versuchsteils benutzt wurden.

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte durch meine Betreuerin, Frau Priv.-Doz. Dr. Anna Herminghaus, und Tierärztin Frau Katharina Gross, sodass meinerseits kein Tierversuchskundenachweis gemäß § 16 der Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (TierSchVersV) erforderlich war. Eine behördliche Genehmigung gemäß § 8 Abs 1 Tierschutzgesetz (TierSchG) i.V.m. § 33 TierSchVersV wurde durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2016.A398 und der Projektnummer G 398/16 erteilt.

3.1.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an 105 juvenilen, ca. 2 Monate alten, gesunden Wistar-Ratten (Körpergewicht: 350 ± 30 g) aus einer Zucht in Janvier, Frankreich, durchgeführt. Hiervon sind 77 Versuche in die Auswertung eingeflossen. Die Tiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Um den Einfluss hormoneller Schwankungen möglichst gering zu halten, wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. In Einzelkäfigen vom Typ 3 mit Einstreu aus Weichholzgranulat (entkeimt, Fa. J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co KG, Rosenberg, Deutschland) erfolgte die Haltung unter standardisierten, klimatischen Bedingungen (Raumtemperatur 22 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 50 ± 5 %, Luftumwälzrate 16-20 x/h) und einer Beleuchtung mit weißem Kunstlicht (Beleuchtungsstärke: 300-320 Lux) im 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Standardfuttermittel für Ratten & Mäuse (Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Trinkwasser (ozonisiert, pH 2,6-3,0).

3.1.2 Tierexperimenteller Versuchsablauf

Zunächst erfolgte die Randomisierung der 77 Versuchstiere in 2 Haupt- und 4 Untergruppen. Wie in Tabelle 1 dargestellt, erhielten die Tiere entsprechend der Untergruppenzuordnung entweder eine medikamentöse, *subkutane* Vorbehandlung mit Pravastatin (200 µg/kg KG) oder dessen Trägersubstanz NaCl 0,9 % (Kochsalz). Um untersuchen zu können, ob eine mögliche Wirkung von Pravastatin über den PPAR- α (Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor- α) vermittelt wird, wurden die Tiere zusätzlich mit dem PPAR- α -Antagonist GW 6471 (1 mg/kg KG) oder dessen Trägersubstanz DMSO 5 % (Dimethylsulfoxid) *intraperitoneal* vorbehandelt. Die Dosierung und Applikationsform von Pravastatin und GW 6471 orientierte sich hierbei an der Literatur.^{61–63}

Die darauffolgende operative Intervention (= Hauptgruppe) wurde bzgl. der medikamentösen Vorbehandlung (= Untergruppe) verblindet durchgeführt. Nach 18 Stunden wurde im Rahmen einer medianen Laparotomie eine abdominelle Sepsis mittels CASP-Methode (= *colon ascendens stent peritonitis*) induziert. Auch die Kontrollgruppen (= Sham) unterzogen sich einer medianen Laparotomie, jedoch ohne einen penetrierenden Stent implantiert zu bekommen, der eine Sepsis initiiert.

Gruppe	Medikamentöse Vorbehandlung (Untergruppe)	Operation (Hauptgruppe)	Anzahl
Nr. 1	NaCl + DMSO	Sham	10
Nr. 2	Pravastatin + DMSO	Sham	10
Nr. 3	Pravastatin + GW 6471	Sham	10
Nr. 4	NaCl + GW 6471	Sham	10
Nr. 5	NaCl + DMSO	CASP	8
Nr. 6	Pravastatin + DMSO	CASP	10
Nr. 7	Pravastatin + GW 6471	CASP	9
Nr. 8	NaCl + GW 6471	CASP	10
			n = 77

Tabelle 1: Gruppeneinteilung

Die medikamentöse Vorbehandlung erfolgte 18 h vor dem operativen Eingriff. Pravastatin: 200 µg/kg KG subkutan [s.c.]; GW 6471 (PPAR- α -Antagonist): 1 mg/kg KG intraperitoneal [i.p.]; Kontrolle mit den Trägersubstanzen NaCl 0,9 % [s.c.] und DMSO 5 % [i.p.]; CASP: colon ascendens stent peritonitis; Sham: sterile Laparotomie)

3.1.3 CASP- und Sham-Operation

Zur Induktion einer Sepsis wurde die CASP-Methode (= colon ascendens stent peritonitis) angewandt, welche in der Sepsis Forschung⁶⁴ und in unserem Labor^{38,65} gut etabliert ist. Hierbei führt ein operativ eingesetzter Stent im *Colon ascendens*, der die Darmwand penetriert, über eine kotige Peritonitis zu einer abdominalen Sepsis.

Die Einleitung und Aufrechterhaltung der Kurznarkose (10-15 Minuten) erfolgte mittels Sevofluran (3,0 - 3,5 Vol.%, FiO₂ 0,5) und dem Opioid-Analgetikum Buprenorphin (0,05 mg/kg KG, s.c.) unter Spontanatmung und kontinuierlicher Überwachung der Vitalparameter (rektale Körpertemperatur, Atemfrequenz) des Tieres. Für das operative Verfahren wurden die Ratten rücklings auf einer Wärmematte gelagert und die Extremitäten mittels Klebestreifen fixiert. Nach Desinfektion des Abdomens wurde das Operationsgebiet mit einem sterilen Loch Tuch abgedeckt. Mit einer medianen Laparotomie von ca. 2 cm Länge wurde das Abdomen oberhalb der Symphyse im Unterbauch eröffnet. Das Zäkum wurde aufgesucht und chirurgisch freigelegt. Nun konnten eine Venenverweilkanüle (16 G) am ileozäkalen Übergang und ein weiterer 16 G-Katheter ca. 2 cm aboral der

Ileozäkalklappe auf der gegenüberliegenden Seite des Mesenteriums *transmural* positioniert werden. Nach Entfernung der Stahlkanüle und Kürzung des Kunststoffkatheters auf eine Länge von 8 mm, konnten diese mittels nicht-resorbierbarer Fäden (6-0, Prolene) an der äußeren Darmwand fixiert werden. Anschließend wurde das Colon in Richtung der Stents ausgestrichen bis Faeces in die Bauchhöhle trat, um die korrekte Lage und Durchgängigkeit des Stents zu überprüfen. Zuletzt erfolgte die Rückverlagerung der Eingeweide in die Bauchhöhle und der operative Verschluss der Haut- und Muskelschichten mittels resorbierbarer Fäden (4-0, Vicryl).

Das operative Vorgehen bei den Tieren der Kontrollgruppe (Sham) unterschied sich dahingehend, dass ein Stent lediglich an die äußere Wand des *Colon ascendens* angenäht wurde. Aufgrund der erhaltenen Darmwandkontinuität und somit fehlenden Verbindung zwischen Darmlumen und Bauchhöhle, kam es hierbei nicht zur Ausbildung einer kotigen Peritonitis bzw. abdominalen Sepsis.

Entsprechend der bereits beschriebenen Standards (siehe Kapitel 3.1.1) wurden die Versuchstiere postoperativ im Labor der Klinik für Anästhesiologie gehalten. Zusätzlich erhielten die Tiere alle 8 h das Opioid Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) und 0,6 ml warme Natriumchlorid-Lösung *subkutan*. Hierbei wurde der klinische Zustand mithilfe eines etablierten Bewertungssystems, dem *Septic Rat Severity Score*⁶⁵, evaluiert. Mittels Punktevergabe wurden der Allgemeinzustand (Körpergewicht, Pflegezustand, Spontan-, Provoziertes Verhalten) und zusätzlich klinische Parameter (Atemfrequenz, expiratorisches Atemgeräusch, Palpationsbefund des Abdomens, Kotbeschaffenheit) einzeln bewertet. Bei einer Summationspunktzahl von 10 wurde das Tier aus dem Versuch ausgeschlossen und fachgerecht getötet.

3.1.4 Organentnahme

24 Stunden postoperativ erhielten die Ratten eine weitere Narkose (Induktion mit 60 mg/kg KG Pentobarbital *intrapitoneal* und 0,05 mg/kg KG Buprenorphin *subkutan*, Aufrechterhaltung mit 10 mg/kg KG/h Pentobarbital *intravenös*) sowie eine Tracheotomie zur kontrollierten Beatmung, sodass im Rahmen einer weiteren Untersuchung u.a. die Mikrozirkulation im Colon mittels spektroskopischen Verfahrens bestimmt werden konnte. Im Anschluss erfolgte nach fachgerechter und schmerzfreier Exsanguination in tiefer Narkose die Entnahme eines Colon-Segmentes. Das entnommene Colon-Gewebe wurde einerseits in Stickstoff

schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung im Rahmen der Bestimmung von Malondialdehyd bei -80 °C tiefgefroren und andererseits in 4 °C Isolationspuffer (siehe Tabelle 2) zur direkten Aufbereitung auf Eis gelagert.

Die nachfolgenden laborexperimentellen Untersuchungen wurden sowohl bzgl. der medikamentösen Vorbehandlung als auch bzgl. der operativen Intervention verblindet durchgeführt.

3.2 Laborexperimenteller Teil

Im Anhang sind alle verwendeten Materialien, Geräte, Chemikalien, Pufferlösungen und Reagenzien aufgelistet.

3.2.1 Herstellung des Colon-Homogenats

Das Colon-Segment wurde zur groben Entfernung von Faeces mit einer Pinzette längs ausgestrichen. Anschließend wurde mit Hilfe einer Präzisionswaage das Nassgewicht bestimmt. Auf einer mit Isolationspuffer (siehe Tabelle 2) gefüllten Petri-Schale, die von Eis umgeben war, wurde das Darmsegment mit einer Schere längs aufgeschnitten. Makroskopisch sichtbares Fettgewebe wurde mit einer Pinzette entfernt und Faeces-Reste sowie die Mukosa mit einer Kompresse abgerieben. Zur Aufspaltung der interzellulären Adhäsionsmoleküle wurde nun ein definiertes Volumen ($V \text{ [ml]} = \text{Colon-Nassgewicht [g]} \times 2$) der Endopeptidase Trypsin (0,05 % Trypsin-EDTA) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde das Colon in ein Becherglas mit Isolationspuffer (Volumen $\text{[ml]} = \text{Colon-Nassgewicht [g]} \times 4$), mit erhöhtem Anteil bovines Serumalbumins (2 %) gegeben. Dieser enthielt zusätzlich den Proteasehemmer-Cocktail cOmplete (cOmplete $\text{[}\mu\text{l]} = \text{Colon-Nassgewicht [g]} \times 40$), damit die Aufteilung intrazellulärer Proteine verhindert wird. Nun wurde das trypsinisierte Colon mit einer Schere in ca. 2-3 mm² große Stücke zerkleinert und mittels *Potter-Elvehjem-Verfahren* homogenisiert. Hierbei erzeugt die Rotation eines Pistills (2000 U/min.) in einem stationären, enganliegenden Glaszylinder Scherkräfte, die wiederum die enthaltenen zellulären Strukturen zerstören und intakte Zellorganellen freisetzen. Die entstandene Suspension wurde durch eine Kompresse filtriert und bis zur weiteren Verarbeitung in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis gelagert.

Chemikalien	Konzentration
C ₆ H ₁₄ O ₆ (Mannitol)	200 mM
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ (Saccharose)	50 mM
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	5 mM
C ₇ H ₁₅ NO ₄ S (MOPS)	5 mM
C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀ (EGTA)	1 mM
Rinderserumalbumin	0,1 %
<ul style="list-style-type: none"> • Verdünnung mittels <i>Aqua dest.</i> und • Titration auf ein Ziel-pH von 7,15 mittels KOH (Kaliumhydroxid) 	

Tabelle 2: Isolationspuffer

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration im Colon-Homogenat

3.2.2.1 Die Lowry-Methode

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Lowry-Methode⁶⁶ bestimmt. Grundlage dieser kolorimetrischen Methode sind zwei biochemische Reaktionen an denen Peptidbindungen als elementarer Bestandteil von Proteinen beteiligt sind. Zuerst bilden Peptidbindungen im Rahmen der Biuret-Reaktion mit Kupfer(II)-Ionen in einer wässrig-alkalischen Lösung einen blauvioletten Farbstoffkomplex. Zweitens werden diese Kupfer(II)-Ionen durch die Peptidbindungen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert, welche in einer Folgereaktion das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau reduzieren. Die Blaufärbung der Lösung kann mittels photometrischer Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge (λ) von 750 nm quantifiziert werden. Die Messung der Extinktion einer Standardverdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin (siehe Tabelle 3) erlaubt die Berechnung der Proteinkonzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Standard	K0	K1	K2	K3	K4	K5	K6
Proteinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	62,5	125	250	500	750	1000

Tabelle 3: Standardverdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin zur Proteinbestimmung

Als Verdünnungsmittel diente *Aqua dest.*

3.2.2.2 Praktisches Vorgehen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der Zellsuspension erfolgte durch Bildung des Mittelwertes aus einer Dreifachbestimmung.

Zunächst wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:100 mit *Aqua dest.* verdünnt. 100 µl aus jeder Konzentrationsstufe der Standardverdünnungsreihe bzw. aus dem verdünnten Homogenat wurden jeweils in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl Lösung 1 (siehe Tabelle 4) gegeben, mittels Vortexmischer vermischt und bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Als Nächstes wurde in jedes Reaktionsgefäß zusätzlich 50 µl Lösung 2 (siehe Tabelle 4) überführt und nach erneutem Vermischen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge (λ) von 750 nm erfolgte aus jedem Reaktionsgefäß als Doppelbestimmung mit Bildung des Mittelwertes. Hierzu wurden zwei Mal jeweils 200 µl pro Reaktionsgefäß auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und mittels Plattenlesegerät *Synergy 2* ausgelesen.

Lowry Lösung 1	
Reagenz A:	10 g Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat) in 500 ml 0,1M NaOH (Natriumhydroxid) auflösen
Reagenz B:	2 g C ₄ H ₄ KNaO ₆ (Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat) in 100 ml Aqua dest. auflösen
Reagenz C:	1 g Cu[SO ₄]*5H ₂ O (Kupfersulfat-Pentahydrat) in 100 ml Aqua dest. auflösen
Mischen von <i>Reagenz A, B und C</i> im Verhältnis 100:1:1	
Lowry Lösung 2	
Mischen von Aqua dest. und Folin-Ciocalteu-Reagenz im Verhältnis 1:1	

Tabelle 4: Lowry Lösung 1 & 2

3.2.3 Bestimmung der mitochondrialen Funktion mittels Respirometrie

3.2.3.1 Grundlagen der Atmungskette und Oxidativen Phosphorylierung

Im Rahmen zellulärer Stoffwechselprozesse entsteht Energie, die temporär vor allem in Form der Reduktionsäquivalente Nikotinamidadenindinukleotid (NADH/H⁺) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) gespeichert wird. Zentrale Aufgabe der Mitochondrien ist die Überführung dieser gespeicherten Energie in Adenosintriphosphat (ATP), dem zentralen und unmittelbar verfügbaren Energieträger in eukaryotischen Zellen. Dies geschieht im Rahmen der Atmungskette und oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS). Die Atmungskette nutzt eine Reihe exergoner Redoxreaktionen, um eine elektrochemische Potentialdifferenz zwischen mitochondrialer Matrix und Intermembranraum aufzubauen. Hierfür werden vier große Enzymkomplexe benötigt, die an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind.

Komplex I, die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, oxidiert NADH/H⁺ und überträgt mithilfe von prosthetischen Gruppen zwei Elektronen und zwei Protonen auf Ubichinon. Die bei diesem Elektronenfluss freigewordene Energie wird genutzt, um vier Protonen von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu pumpen. Die zweite Möglichkeit, Reduktionsäquivalente in die Atmungskette einzubringen, stellt **Komplex II**, die Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase, dar. Zunächst erzeugt die Succinatdehydrogenase, die als Teil von Komplex II eine direkte Schnittstelle zum Zitratzyklus herstellt, das Reduktionsäquivalent FADH₂. Dann erfolgt im Rahmen einer weiteren Redoxreaktion der Elektronentransport von FADH₂ auf Ubichinon, jedoch ohne die elektrochemische Potentialdifferenz zu beeinflussen. Das an Komplex I und II entstandene Ubichinol wird am Komplex III, der Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, zu Ubichinon reoxidiert. Zusätzlich wird zur Aufrechterhaltung des Elektronenflusses Cytochrom-c reduziert. Der Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran wird durch vier zusätzliche Protonen im Intermembranraum weiter ausgebaut.

An Komplex IV, der Cytochrom-c-Oxidase, wird die Reoxidation von Cytochrom-c und Reduktion von O₂ zu H₂O katalysiert. Die freigewordene Energie wird genutzt um zwei Protonen in den Intermembranraum zu transportieren.

An einem weiteren Enzymkomplex, der ATP-Synthase, wird die in Form eines Protonengradienten gespeicherte Energie genutzt, um die Synthese und

Freisetzung des universellen Energieträgers ATP zu katalysieren. Als Multiprotein-Komplex besteht dieses aus zwei Untereinheiten. An der F_0 -Untereinheit, einem Protonenkanal der inneren Mitochondrienmembran, findet der Rückstrom der Protonen statt. Der elektrochemische Potentialausgleich führt zu Konformationsänderungen in der F_1 -Untereinheit und ermöglicht damit die Phosphorylierung von ADP und Freisetzung von ATP in die mitochondriale Matrix.²⁵

3.2.3.2 Grundlagen der Respirometrie

Als Maß für die mitochondriale Funktion (MF) dient die Veränderung der Sauerstoffkonzentration und deren Geschwindigkeit, die mittels Respirometrie gemessen werden kann. Diese polarographische Methode quantifiziert mithilfe einer Clark-Elektrode die Sauerstoffkonzentration einer Lösung und stellt die Messwerte als Konzentrations-Zeit-Diagramm und Respirationsrate in nmol/min/mg Protein dar.

Die 500 µl umfassende Messkammer wird zur Erzeugung einer konstanten Umgebungstemperatur von 30 °C warmen *Aqua dest.* umspült und zur Aufrechterhaltung einer homogenen Lösung mittels eines Magnetrührers kontinuierlich durchmischt. Ein Kolben, der von einer kapillaren Bohrung zur Substratinjektion durchdrungen wird, verhindert eine Beeinflussung der Sauerstoffkonzentration innerhalb der Messkammer von Extern.

3.2.3.3 Determinanten der mitochondrialen Funktion

Unter Substratstimulation werden bei der Respirometrie verschiedene Phasen und Parameter definiert, die in Anlehnung an Williams und Chance (1956)⁶⁷ folgendermaßen definiert werden:^{25,68}

Als **State 1** wird der Sauerstoffverbrauch in Abwesenheit der Reduktionsäquivalente und ADP bezeichnet. Aufgrund der Substratabhängigkeit ist die mitochondriale Arbeit hier minimal.

State 2 beginnt nach Zugabe von Substraten für Komplex I (Malat/Glutamat) und II (Succinat). Da die innere Mitochondrienmembran für die Reduktionsäquivalente NADH/H⁺ und FADH₂ nicht durchlässig ist, erfolgt der Transport indirekt, in Form von Malat, Glutamat und Succinat. In der mitochondrialen Matrix werden diese

Substanzen über spezifische Dehydrogenasen zu u.a. NADH/H⁺ und FADH₂ oxidiert. Da Atmungskette und OXPHOS streng miteinander gekoppelt sind und die Atmungskontrolle besonders durch ADP erfolgt, dient die Atmungskette in dieser Phase vor allem der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials.

In **State 3** ist der Sauerstoffverbrauch unter Substratüberschuss und Stimulation durch ADP maximal. Die mitochondriale Arbeit wird, neben der Bestimmung der Respirationsrate, durch Messung des verbrauchten Sauerstoffs (ΔO_2) quantifiziert.

Nach Verbrauch von ADP nimmt die mitochondriale Arbeit in **State 4** wieder ab. Da u.a. durch zelluläre ATPase ständig ADP entsteht, welches wiederum direkt in ATP umgewandelt wird, ist die Aktivität der Atmungskette und OXPHOS jedoch höher als in *State 2*. Bei einer Integritätsstörung der inneren Mitochondrienmembran kommt es zur Abnahme des Membranpotentials, sodass der Sauerstoffverbrauch in *State 4* erhöht wäre.

Als Maß für die Kopplung von Atmungskette und OXPHOS dient der respiratorische Kontrollquotient (engl. *Respiratory control index* = **RCI**), der sich aus den Respirationsraten von *State 3* und *State 2* berechnet. Je höher die Kopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Synthese, desto größer ist dieser Parameter.

Der Quotient aus der Menge des hinzugegebenen ADP und des gemessenen Sauerstoffverbrauchs in *State 3* (ΔO_2) fungiert als Maß für die Effizienz der OXPHOS (**ADP/O-Quotient**). Bei vollständiger Entkopplung ist dieses ADP/Sauerstoff-Verhältnis gleich 0.

3.2.3.4 Praktisches Vorgehen

Täglich wurde eine Zwei-Punkt-Kalibrierung durchgeführt. Als oberer Referenzwert (Normalwert: 500-700 pA) wurde *Aqua dest.*, welches durch Schütteln mit Sauerstoff angereichert wurde, verwendet. Natriumsulfid, das in wässriger Lösung Sauerstoff bindet, diente als unterer Referenzwert (Normalwert: < 50 pA).

Die Bestimmung der Respirometrie-Parameter erfolgte durch Bildung des Mittelwertes aus einer Dreifachbestimmung und getrennt nach Substraten für Komplex I (Glutamat/Malat) und II (Succinat).

Nachdem das Colon-Homogenat mit dem Ziel einer Proteinendkonzentration von 6 mg/ml mit 30 °C warmen Respirationspuffer (siehe Tabelle 5) vermengt und in die Messkammer pipettiert wurde, begann die Messung (**State 1**).

Eine Minute später erfolgte die Zugabe der Substrate für Komplex I und II, mit der Zielkonzentration von 2,5 mM für Glutamat und Malat und 5 mM für Succinat (**State 2**). Um eine Beeinflussung der Messung durch Komplex I zu verhindern, wurde vor Beginn der Messungen mit Succinat zusätzlich Rotenon (Zielkonzentration: 0,5 µM), ein Inhibitor der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase hinzugegeben.

Nach einer weiteren Minute wurde zur Bestimmung von **State 3** ADP (Zielkonzentration: 50 µM) in die Kammer injiziert.

Nach einer Gesamtdauer von sechs Minuten wurde die Messung beendet.

Chemikalien	Konzentration
KCl (Kaliumchlorid)	130 mM
K ₂ HPO ₄ (Dikaliumhydrogenphosphat)	5 mM
C ₇ H ₁₅ NO ₄ S (MOPS)	20 mM
C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀ (EGTA)	2,5 mM
Na ₄ P ₂ O ₇ (Tetranatriumdiphosphat)	1 µM
Rinderserumalbumin	2 %
<ul style="list-style-type: none"> • Verdünnung mittels Aqua dest. und • Titration auf ein Ziel-pH von 7,4 mittels KOH (Kaliumhydroxid) 	

Tabelle 5: Respirationspuffer

3.2.3.5 Kontrolle der mitochondrialen Integrität

In jedem Colon-Homogenat wurde im Rahmen einer Kontrollmessung die Integrität der mitochondrialen Membranen überprüft.

Bei einer Beschädigung der äußeren Mitochondrienmembran führt die externe Zugabe des Coenzym Cytochrom-c (Zielkonzentration: 2,5 µM), das als

Elektronenüberträger zwischen Komplex III und IV dient, zu einer Zunahme der OXPHOS und somit zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs.⁶⁸

Die Integrität der inneren Mitochondrienmembran (IMM) wurde durch Zugabe von Oligomycin (0,05 µg/ml) kontrolliert. Oligomycin bindet an die F₀-Untereinheit der ATP-Synthase (Komplex V) und hemmt deren Funktion.⁶⁹ Bei intakter IMM dient die Atmungskette somit lediglich der Aufrechterhaltung des Membranpotentials (vgl. *State 2*). Kommt es durch einen Integritätsverlust zu einem unkontrollierten Protonenfluss, so steigt der Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu *State 2* übermäßig an.⁶⁸

3.2.4 Bestimmung von Malondialdehyd im Colon

3.2.4.1 Der Thiobarbitursäure (TBA)-Assay

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen durch unvollständige Reduktion von Sauerstoff, u.a. im Rahmen der Atmungskette in den Mitochondrien. Diese können mit ungesättigten Fettsäuren über Peroxylradikale mitunter zu Malondialdehyd weiterreagieren. Dieser Prozess wird als Lipidperoxidation bezeichnet und stellt einen Marker für oxidativen Stress im eukaryotischen Organismus dar.⁷⁰ In Anlehnung an den Thiobarbitursäure (TBA)-Assay nach Mihara und Uchiyama⁷¹ wurde die MDA-Konzentration im Colon mittels Kolorimetrie bestimmt.

Unter hohen Temperaturen und saurer Hydrolyse entsteht aus MDA und dem Derivatisierungsmittel TBA ein roter Farbstoffkomplex.⁷² Die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge (λ) von 532 nm und bei einer Wellenlänge (λ) von 520 nm als Referenz erlaubt die Quantifizierung der Rotfärbung. Mithilfe einer Standardverdünnungsreihe (siehe Tabelle 6) aus Malonaldehydbisdimethylacetal (1,1,3,3-Tetramethoxypropan) konnte aus der Differenz der optischen Dichte bei den o.g. Wellenlängen die MDA-Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet werden. Diese wurde zuletzt auf die Proteinkonzentration, die mittels der Lowry-Methode⁶⁶ (siehe Kapitel 3.2.2) bestimmt wurde, normiert (Einheit: nmol MDA/mg Protein).

Standard	K0	K1	K2	K3	K4
MDA-Konzentration (nM)	0	2,5	5	10	20

Tabelle 6: Standardverdünnungsreihe aus Malonaldehydbisdimethylacetal zur MDA-Konzentrationsbestimmung

Als Verdünnungsmittel diente 1,15 %ige Kaliumchlorid-Lösung.

3.2.4.2 Praktisches Vorgehen

Zunächst wurden aus 50 mg tiefgefrorenem Colon-Gewebe und 500 µl 1,15 %iger Kaliumchlorid-Lösung ein Homogenat erzeugt. Die Bestimmung der MDA-Konzentration erfolgte durch Bildung des Mittelwertes aus einer Doppelbestimmung.

Hierfür wurden zwei Mal 250 µl aus dem Colon-Homogenat bzw. aus jeder Konzentrationsstufe der Standardverdünnungsreihe mit 1500 µl 1 %iger Phosphorsäure und 500 µl 0,6 %iger 2-Thiobarbitursäure (TBA) vermengt und für 45 Minuten bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden jeweils 2000 µl n-Butanol hinzugegeben und die Lösungen für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (3500 U/min.).

Aus dem Überstand von jedem Zentrifugenröhrchen wurden zwei Mal 200 µl pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. So konnte die Extinktion bei $\lambda = 535 \text{ nm}$ und $\lambda = 520 \text{ nm}$ durch Bildung des Mittelwertes aus einer Doppelbestimmung photometrisch ermittelt werden.

3.3 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden in Tabellenform (Excel 97-2004, Microsoft) gespeichert und mithilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism (Version 8.0) statistisch analysiert. Die medikamentöse Vorbehandlung (s. Untergruppen, Kapitel 3.1.2) wurde als unabhängige Variable und die MDA-Konzentration bzw. mitochondriale Funktion als abhängige Variable definiert. Die einfache Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) kam zur Anwendung, um getrennt für die septischen und nicht-septischen Bedingungen einen Mittelwertvergleich durchzuführen. Konkretisiert wurde dies mittels Tukey's post-hoc Test. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse werden nachfolgend als Mittelwert \pm Standardabweichung und in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 *In vivo* Pravastatin Wirkung auf die mitochondriale Funktion im Colon unter nicht-septischen Bedingungen

42 h nach medikamentöser Vorbehandlung bzw. 24 h nach steriler Laparotomie erfolgte die Bestimmung der mitochondrialen Funktion *ex vivo* in Colon-Homogenaten mittels Respirometrie.

Unter Pravastatin-Vorbehandlung war der RCI nach Substratstimulation über Komplex I (Abb. 1 a) und Komplex II (Abb. 1 c) der Atmungskette signifikant reduziert im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (Komplex I: Kontrolle: $5,3 \pm 2,3$; Pravastatin: $3,3 \pm 0,9^*$; Komplex II: Kontrolle: $5,0 \pm 0,9$; Pravastatin: $3,8 \pm 1,0^*$). Die Reduktion des RCI war nach Stimulation über Komplex II zusätzlich signifikant zur Vorbehandlung mit dem PPAR- α -Blocker GW 6471 und der Kombination Pravastatin/GW 6471 (Abb. 1 c; Pravastatin: $3,8 \pm 1,0$; GW 6471: $5,5 \pm 0,7^*$; Pravastatin/GW 6471: $5,5 \pm 0,9^*$).

Der ADP/O-Quotient wurde weder unter Komplex I noch unter Komplex II Stimulation signifikant beeinflusst (Abb. 1 b und 1 d).

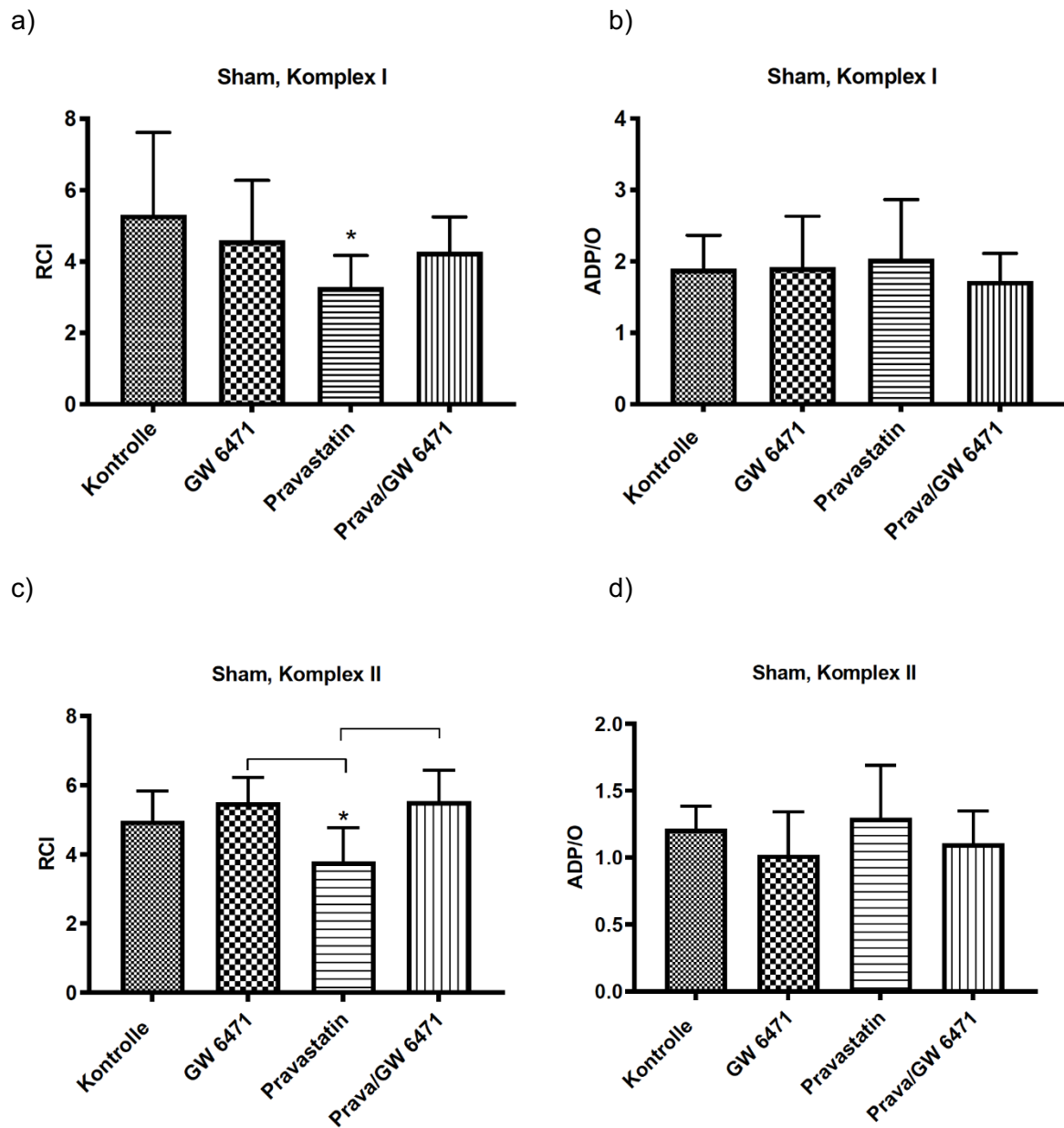


Abb. 1: Mitochondriale Funktion im Colon unter nicht-septischen Bedingungen

RCI und ADP/O nach Substratstimulation für Komplex I [a, b] und Komplex II [c, d] der Atmungskette in Colon-Homogenaten von nicht-septischen Ratten 24 h nach einer sterilen Laparotomie. Die medikamentöse Vorbehandlung erfolgte 18 h vor der Sham-Operation. Pravastatin: 200 µg/kg KG s.c. (n = 10), GW 6471 [PPAR-α-Blocker]: 1 mg/kg KG i.p. (n = 10), Pravastatin/GW 6471 (n = 10), Kontrolle mit den Trägerlösungen NaCl 0,9 % s.c. und DMSO 5 % i.p. (n = 10). Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung. One-way ANOVA + Tukey's *post-hoc* Test, * p < 0,05 vs. Kontrolle, Π p < 0,05 zwischen den Gruppen.

4.2 *In vivo* Pravastatin Wirkung auf die mitochondriale Funktion im Colon unter septischen Bedingungen

Die mitochondriale Funktion wurde 42 h nach medikamentöser Vorbehandlung bzw. 24 h nach Sepsis-Induktion in Colon-Homogenaten *ex vivo* im Respirometer ermittelt.

Durch eine medikamentöse Vorbehandlung mit Pravastatin wurden weder der RCI noch der ADP/O-Quotient für Komplex I und II signifikant beeinflusst (Abb. 2).

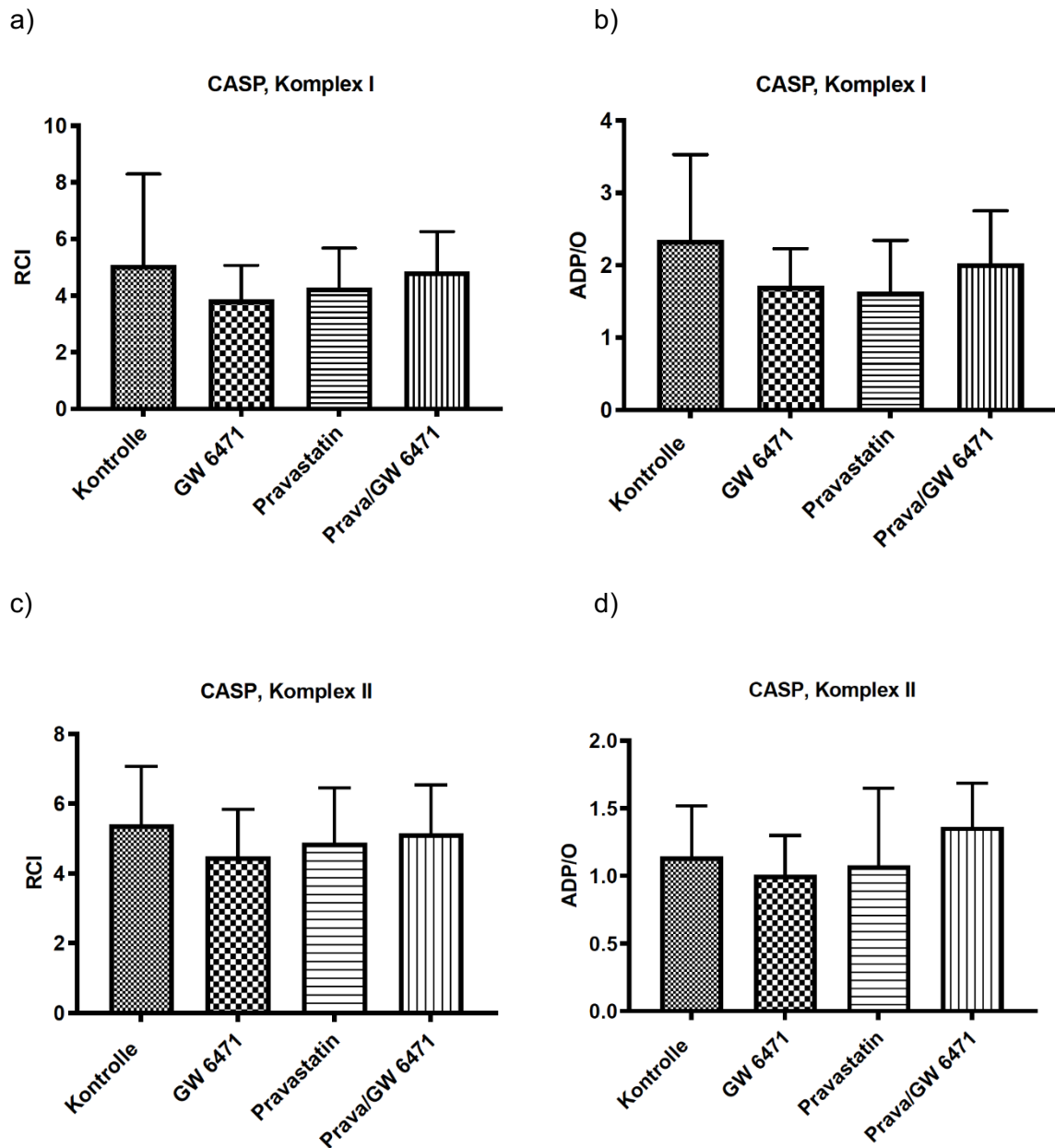


Abb. 2: Mitochondriale Funktion im Colon unter septischen Bedingungen

RCI und ADP/O nach Substratstimulation für Komplex I [a, b] und Komplex II [c, d] der Atmungskette in Colon-Homogenaten von Ratten 24 h nach Induktion einer abdominalen Sepsis. Die medikamentöse Vorbehandlung erfolgte 18 h vor der CASP-Operation. Pravastatin: 200 µg/kg KG s.c. (n = 10), GW 6471 [PPAR-α-Blocker]: 1 mg/kg KG i.p. (n = 10), Pravastatin/GW 6471 (n = 9), Kontrolle mit den Trägerlösungen NaCl 0,9 % s.c. und DMSO 5 % i.p. (n = 8). Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung. *One-way ANOVA* + *Tukey's post-hoc* Test.

4.3 *In vivo* Pravastatin Wirkung auf die MDA-Konzentration im Colon unter septischen und nicht-septischen Bedingungen

Als Produkt der Lipidperoxidation und Surrogat für oxidativen Stress wurde die Konzentration von Malondialdehyd in Colon-Homogenaten gemessen.

Pravastatin hat die MDA-Konzentration weder unter septischen (Abb. 3 b) noch unter nicht-septischen Bedingungen (Abb. 3 a) signifikant verändert. Nach steriler Laparotomie kann allerdings beobachtet werden, dass die MDA-Konzentration der Pravastatin Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen tendenziell, wenn auch nicht signifikant, geringer ist (Abb. 3 a).

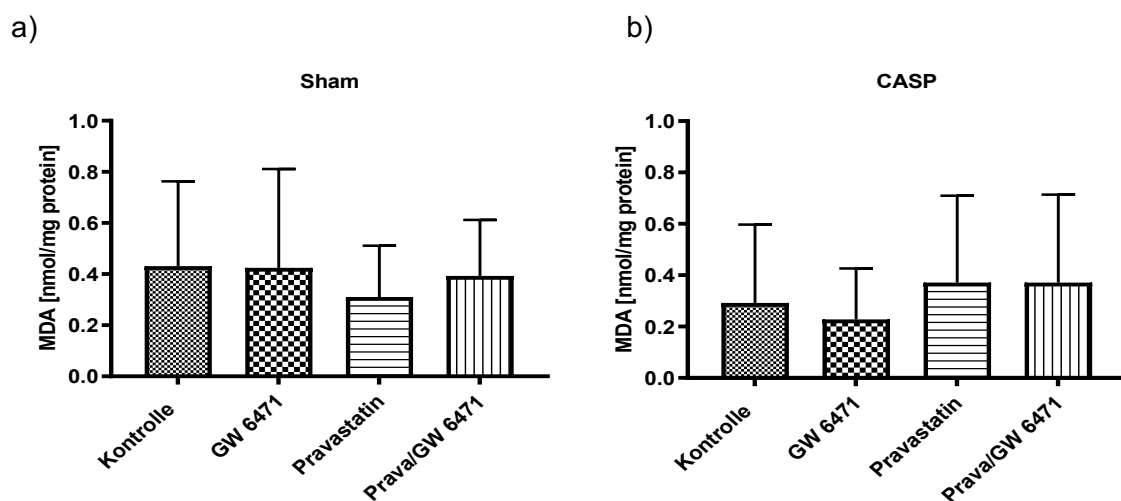


Abb. 3: MDA-Konzentration im Colon unter nicht-septischen und septischen Bedingungen

MDA-Konzentration (Einheit: nmol MDA/mg Protein) in Colon-Homogenaten von Ratten nach steriler Laparotomie [a] und nach Induktion einer abdominalen Sepsis [b]. Die medikamentöse Vorbehandlung erfolgte 18 h vor der CASP- bzw. Sham-Operation. Pravastatin: 200 µg/kg KG s.c. (CASP/Sham: n = 10), GW 6471 [PPAR-α-Blocker]: 1 mg/kg KG i.p. (CASP/Sham: n = 10), Pravastatin/GW 6471 (CASP: n = 9; Sham: n = 10), Kontrolle mit den Trägerlösungen NaCl 0,9 % s.c. und DMSO 5 % i.p. (CASP: n = 8; Sham: n = 10). Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung. *One-way ANOVA* + *Tukey's post-hoc* Test.

5 Diskussion

Die *in vivo* Wirkung von Pravastatin auf die Funktion von Dickdarm-Mitochondrien unter septischen und nicht-septischen Bedingungen wurde mittels Respirometrie *ex vivo* bestimmt. Zusätzlich wurde untersucht, ob auch die MDA-Konzentration verändert und eine potenzielle Wirkung über den PPAR- α vermittelt wird.

Die zuvor gestellten Fragen können durch die Ergebnisse dieser randomisierten, Placebo-kontrollierten *in vivo* Versuchsreihe folgendermaßen beantwortet werden:

- Pravastatin beeinträchtigt nach einer sterilen Laparotomie die mitochondriale Kopplung von AK und OXPHOS im Colon von Ratten ohne die Effizienz der OXPHOS zu beeinflussen. Dieser Effekt scheint über den PPAR- α vermittelt zu sein.
- Pravastatin hat nach Induktion einer abdominalen Sepsis keinen Einfluss auf die mitochondriale Funktion im Colon von Ratten.
- Die MDA-Konzentration, als Surrogat für oxidativen Stress, wird im Colon von Ratten durch Pravastatin weder nach steriler Laparotomie noch nach Induktion einer abdominalen Sepsis signifikant beeinflusst.

5.1 Methodendiskussion

Die Medikamentengabe erfolgte vor der operativen Intervention, weil sowohl in klinischen Studien an Patienten^{44,45} als auch in Tierversuchen an Nagern^{46,47} die Vorbehandlung mit einem verbesserten *Outcome* assoziiert war. Eine Störung der pharmakokinetischen Anflutungsphase (Liberation, Absorption und Distribution) durch pathophysiologische Mechanismen der Sepsis konnte hiermit ebenfalls vermieden werden. Es wurde das für Mitochondrien weniger toxische⁵⁰ Pravastatin verwendet, um die Vergleichbarkeit mit einer *in vitro* Studie aus unserem Labor⁷³ herzustellen. Die Applikation erfolgte *subkutan*, damit die systemische Wirkung nicht durch die geringe orale Bioverfügbarkeit⁷⁴ verzerrt wird. Die gewählten Dosierungen für Pravastatin und GW 6471 wurden an die Literatur adaptiert.^{61–63,75}

Tiermodelle der Sepsis sind unverzichtbar⁷⁶, können jedoch nicht die volle klinische Komplexität und individuelle Heterogenität von Sepsis Patienten nachahmen.⁷⁷ Trotz einer Diskrepanz zwischen präklinischen und klinischen Studien, liefern Tiermodelle Einblicke in spezifische Komponenten des septischen Krankheitsprozesses.⁷⁷

Zur Induktion einer Sepsis wurde die CASP-Methode verwendet. Über den operativ eingebrachten Stent wird durch die Darmperistaltik, ohne Beeinträchtigung der Blutzirkulation, kontinuierlich Kot in die freie Bauchhöhle transportiert.⁶⁴ Hierdurch wird ein stetig zunehmender, abdomineller Infektionsfokus erzeugt, welcher der klinischen Situation von chirurgischen Patienten mit einer Anastomosen-Insuffizienz ähnelt.⁶⁴

Ein anderes Verfahren stellt die *cecal ligation and puncture* (CLP-) Methode dar. Hier wird der Blinddarm ligiert und ein bzw. zwei Mal punktiert.⁷⁸ Da der ligierte Blinddarm 24 Stunden später bereits von Dünndarmschlingen bedeckt wird und nur geringe Mengen an Bakterien systemisch nachweisbar sind, ist die CLP-Methode ein Modell zur Erforschung der intraabdominellen Abszessbildung.⁷⁸ Aufgrund der geringfügigen systemischen Infektion⁷⁸ ist dieses Verfahren zur Untersuchung der Fragestellung dieser Arbeit nicht geeignet.

Ebenfalls häufig verwendet in der Sepsis Forschung ist das LPS-Modell. Dem Versuchstier werden systemisch Lipopolysaccharide, welche Bestandteil der Zellwände gramnegativer Bakterien sind, appliziert, um eine Endotoxämie zu simulieren.⁷⁶ Obwohl einige der akuten klinischen Reaktionen der Sepsis robust

repliziert werden können, ist dieses Modell nicht geeignet, um die Komplexität der humanen Sepsis Pathophysiologie abzubilden und wird nicht mehr von Experten als Sepsis-Modell empfohlen.⁷⁹ So wurde u.a. die Annahme von LPS als vermeintlich zentralem Sepsis Trigger widerlegt und Unterschiede in der Immunantwort bei Sepsis und nach LPS-Applikation herausgearbeitet.⁷⁹

Analog zu Vorarbeiten aus dieser Arbeitsgruppe^{38,65,73} erfolgte die Quantifizierung der Mitochondrienfunktion mittels Respirometrie. Es muss berücksichtigt werden, dass die mitochondriale Atmung ein Surrogat der Mitochondrienfunktion darstellt und nicht die Gesamtheit der komplexen Stoffwechselforgänge in diesen Zellorganellen abbildet.

Zur Bestimmung der mitochondrialen Funktion wurden Colon-Homogenate genutzt. Da diese aus verschiedenen Zelltypen bestehen, kann eine Veränderung nicht auf eine bestimmte Zellart zurückgeführt werden. Dennoch können Gewebe-Homogenate isolierte Mitochondrien bei der laborexperimentellen Bestimmung der mitochondrialen Funktion ersetzen und vergleichbare qualitative Funktionsparameter liefern.⁸⁰ Im Rahmen eines aufwendigen Isolationsprozesses können Mitochondrien selektiert, mechanisch beschädigt oder sogar zerstört werden, sodass isolierte Mitochondrien nicht mehr die Gesamtpopulation der Gewebemitochondrien repräsentieren würden.⁸⁰ Dieser Selektions-Bias konnte durch die Verwendung von Colon-Homogenaten umgangen werden.

Die Messungen erfolgten bei 30 °C *ex vivo*, was in der Forschung als methodischer Standard gilt.^{37,38,50,73,81} Da die mitochondriale Funktion auf enzymatisch-katalysierte Reaktionen beruht und diese vor allem temperaturabhängig sind, können die Ergebnisse nur begrenzt auf die *in vivo* Situation übertragen werden.

Als Abbild der oxidativen Lipidschädigung wurde Malondialdehyd im Colon-Homogenat mittels TBA-Assay *ex vivo* nachgewiesen. MDA entsteht nicht nur im Rahmen der Lipidperoxidation, sondern auch artifiziell aus Kohlenhydraten und Aminosäuren.⁷⁰ Hinzu kommt, dass TBA auch mit anderen Biomolekülen Farbstoffkomplexe bildet, die eine kolorimetrische Messung beeinflussen können.⁷⁰ Zur laborexperimentellen Messung des oxidativen Stresses gilt die Bestimmung der MDA-Konzentration dennoch als praktikabel.⁷⁰

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Effekt von Pravastatin auf die mitochondriale Funktion im Colon unter nicht-septischen Bedingungen

In den Versuchen dieser Arbeit konnte eine Pravastatin Vorbehandlung den RCI (*State 3 / State 2*) für Komplex I und II nach steriler Laparotomie im Colon-Homogenat signifikant reduzieren. Ursächlich für die signifikante Abnahme des Atmungskontrollquotienten waren einerseits eine nicht-signifikante Zunahme der *State 2* Atmung und andererseits eine nicht-signifikante Reduktion der ADP-induzierten *State 3* Atmung (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt konnte für Komplex II bereits durch eine *in vitro* Studie an gesunden Ratten beobachtet werden.⁷³ Laut Brand et al. kann eine mitochondriale Dysfunktion nur mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, wenn sowohl absolute Atmungsraten als auch Kontrollquotienten unbeeinflusst bleiben.⁸² Da der RCI als Maß für die Kopplung von AK und OXPHOS dient, liegt eine Beeinträchtigung der Atmungskontrolle vor. Bereits unter physiologischen Bedingungen sind ca. 20 % des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs, entgegen der chemiosmotischen Hypothese⁸³, entkoppelt.⁸⁴ Sowohl ein Protonen- als auch ein Elektronenleck können eine solche Störung hervorrufen.⁸⁵ Bei einer Integritätsstörung der inneren Mitochondrienmembran durch einen unkontrollierten Protonenfluss wäre zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials eine Zunahme der *State 4* Atmung zu erwarten. Dies konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch die Kontrollmessungen mit Oligomycin (siehe Kapitel 3.2.3.5) waren unauffällig (Daten nicht gezeigt). Entweder wird das Membranpotential über andere Mechanismen stabilisiert oder die mitochondriale Entkopplung ist nur moderat ausgeprägt. Es sollte bedacht werden, dass weder der Protonenfluss noch das Membranpotential direkt durch die Experimente dieser Arbeit erfasst worden sind. Um die primäre Ursache der respirometrisch ermittelten Atmungskontrollstörung zu analysieren, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Der Effekt einer Pravastatin Vorbehandlung konnte durch die zusätzliche Gabe des PPAR- α -Antagonisten GW 6471 aufgehoben werden. Da PPAR- α im Colon exprimiert wird⁸⁶, könnte die entkoppelnde Wirkung zumindest teilweise hierüber

vermittelt werden. Ähnliches konnten Zungu et al. nach Rezeptorstimulation bei isolierten Herzmuskelmitochondrien von Ratten beobachten.^{87,88} Der PPAR- α -Agonist Wy-14643 führt sowohl nach oraler, wiederholter Gabe⁸⁷ als auch nach dreiminütiger Inkubation *in vitro*⁸⁸ zu einer mitochondrialen Entkopplung. Synthetische und biologische Verbindungen können Mitochondrien direkt oder indirekt entkoppeln.⁸⁵ So kann eine Protonenleckage über die innere Mitochondrienmembran z. B. durch die Regulation von Entkopplungsproteinen und ATP/ADP-Translokase moduliert werden.⁸⁹ Passend hierzu vermuteten Zungu et al. aufgrund erhöhter Transkriptionsspiegel, dass die Wirkung des PPAR- α -Agonisten durch das Entkopplungsprotein 3 vermittelt wird.⁸⁷ In Folgestudien muss nun herausgefunden werden, auf welche Art und Weise Pravastatin über den PPAR- α die mitochondriale Atmungskontrolle stört.

Der ADP/O-Quotient als Maß für die Effizienz der OXPHOS wurde nach steriler Laparotomie nicht signifikant beeinflusst. Auch dies spricht für eine nur moderat ausgeprägte Entkopplung. Bei vollständiger Entkopplung wäre der Sauerstoffverbrauch unabhängig von der hinzugegebenen Menge ADP massiv erhöht und der ADP/O-Quotient somit erniedrigt. Im Gegensatz hierzu erhöhte Pravastatin (1000 μ M) *in vitro* den ADP/O-Quotienten und verbesserte somit die Effizienz der mitochondrialen Atmung im Colon von gesunden Ratten.⁷³ Bei der Bewertung dieser Abweichung sollten jedoch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen berücksichtigt werden. Aufgrund der fehlenden *in vivo* Biokinetik kann die tatsächliche biologische Aktivität einer Verbindung durch *in vitro* Versuche unzureichend eingeschätzt werden.⁹⁰ Niedrigere Wirkstoffkonzentrationen sowie eine abweichende zeitliche Medikamentenexposition im Zielgewebe können Gründe hierfür sein.⁹⁰

5.2.2 Effekt von Pravastatin auf die mitochondriale Funktion im Colon unter septischen Bedingungen

Der Effekt von Statinen auf die mitochondriale Funktion unter septischen Bedingungen wurde bisher nicht im Dickdarm untersucht. Schulz et al. konnten zeigen, dass Pravastatin 24 Stunden nach CASP-Intervention die mikrovaskuläre Sauerstoffversorgung im Dickdarm verbessert.⁷⁵ In Anbetracht der MMDS-Hypothese¹⁸ könnte eine verbesserte Darmoxygenierung die Mitochondrienfunktion somit positiv beeinflussen. Dennoch konnten die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass Pravastatin nach Induktion einer abdominalen Sepsis weder die Kopplung von AK und OXPHOS noch deren Effizienz im Colon von Ratten verändert.

Im Gegensatz hierzu zeigten einerseits Morel et al. an Skelettmuskeln von Ratten, dass Simvastatin nach mehrmaliger Gabe die mitochondriale Atmung in einem Sepsis-Modell mit abdominalem Fokus verbessern konnte.⁴⁷ Andererseits konnte laut Stolf et al. eine wiederholte Vorbehandlung mit Simvastatin oder Atorvastatin die bei Sepsis reduzierte mitochondriale Aktivität in der Leber teilweise wiederherstellen.⁹¹ In diesen Studien erfolgte die Respirometrie bei 37 °C, was aufgrund der Temperaturabhängigkeit enzymatischer Reaktionen berücksichtigt werden sollte. Außerdem muss bedacht werden, dass der Mitochondrien protektive Effekt in diesen Experimenten durch lipophile Statine (Simvastatin und/oder Atorvastatin) bewirkt wurde. Auch die Organspezifität der mitochondrialen Funktion²⁸ muss bei der Interpretation der abweichenden Ergebnisse erwähnt werden.

Das Zusammenspiel zweier Mechanismen könnte ursächlich für einen fehlenden, biologischen Wirkeffekt des hydrophilen Pravastatin unter septischen Bedingungen sein:

Einerseits könnten pathophysiologische Mechanismen der Sepsis die medikamentöse Wirkung im Nachhinein moduliert haben. So weisen hydrophile Medikamente bei der Sepsis, u.a. als Folge eines Kapillarlecks und einer Flüssigkeitsretention in den dritten Raum, ein erhöhtes Verteilungsvolumen auf.⁹² Dies könnte die lokale Wirkstoffkonzentration und somit den Wirkeffekt von Pravastatin im Dickdarm negativ beeinflusst haben.

Andererseits zeigt Pravastatin besondere pharmakokinetische Verteilungseigenschaften. Es wird hauptsächlich von Geweben (Leber und Niere) aufgenommen, die über ein spezifisches Transportsystem für organische Anionen verfügen.⁹³ Die Aufnahme in anderen Geweben wie beispielsweise dem (Dünn-) Darm ist zu vernachlässigen.⁹³ Eine zu geringe Wirkstoffkonzentration im Effektor-Organ Dickdarm könnte durch die einmalige Medikamentengabe also zusätzlich verschärft worden sein.

5.2.3 Einfluss von Pravastatin auf den oxidativen Stress im Dickdarm unter nicht-septischen und septischen Bedingungen

Eine Pravastatin Vorbehandlung bewirkt nach steriler Laparotomie keine signifikante Veränderung der MDA-Konzentration im Colon. Dennoch konnte ein nicht signifikanter Trend beobachtet werden. Im Vergleich zu den anderen medikamentösen Vorbehandlungen zeigte sich bei der Pravastatin Gruppe eine geringfügige Reduktion der MDA-Konzentration. Dass Pravastatin in den Experimenten dieser Arbeit zusätzlich eine milde mitochondriale Entkopplung bewirkt hat, könnte in Zusammenhang mit dem in der Literatur beschriebenen Feedback-Mechanismus⁹⁴ zwischen mitochondrialer Entkopplung und ROS-Produktion stehen. Eine milde Entkopplung der Atmungskette kann die ROS-Produktion von Mitochondrien reduzieren.^{94,95} In Anbetracht der fehlenden statistischen Signifikanz dieses Mittelwertvergleiches bleibt dennoch unklar, ob dieser Effekt tatsächlich vorliegt. Weiterhin sollte in die Bewertung solcher Ergebnisse einfließen, dass auch das Vorhandensein einer statistischen Signifikanz keine kausalen Rückschlüsse auf die tatsächliche biologische Bedeutung *in vivo* erlaubt. ROS können, abhängig von weiteren zellulären Einflüssen, entweder schädlich oder nützlich sein.⁹⁶ So vermuteten Hamanaka et al., dass die Therapie von Krankheiten in Zukunft durch eine Modulation der mitochondrialen ROS im Gegensatz zur alleinigen Reduktion optimiert werden könnte.⁹⁶

In dieser Arbeit hatte Pravastatin keinen messbaren Effekt auf die Lipidperoxidation im Colon von Ratten nach Induktion einer abdominellen Sepsis. Dies steht bei Berücksichtigung des bereits beschriebenen Feedback-Mechanismus⁹⁴ im Einklang mit der unveränderten mitochondrialen Atmung (siehe Kapitel 5.2.2). Im Gegensatz hierzu zeigten Wang et al., dass Simvastatin nach mehrmaliger *intraperitonealer* Gabe die MDA-Spiegel im (Dünn-) Darm von Ratten nach CLP-Intervention erniedrigen und somit den oxidativen Stress reduzieren konnte.⁹⁷ Um diesen Unterschied einzuordnen, sollte bedacht werden, dass das lipophile Simvastatin in dieser Studie⁹⁷ mehrmals in lokaler, direkter Nähe zum Wirkort appliziert wurde. Die bereits erläuterten Besonderheiten der Pharmakokinetik von Pravastatin (siehe Kapitel 5.2.2) könnten neben den verschiedenen Sepsis Tiermodellen und Darmanteilen zur Erklärung herangezogen werden.

5.3 Zusammenfassung

Es konnte mit dieser randomisierten, Placebo-kontrollierten *in vivo* Studie gezeigt werden, dass Pravastatin Dickdarm-Mitochondrien nach steriler Laparotomie unter Vermittlung des PPAR- α entkoppelt. Trotz fehlender Signifikanz sollte eine Verminderung der ROS-Produktion in Erwägung gezogen werden. So müssen weiterführende Arbeiten den genauen Mechanismus und die Bedeutung dieser Entkopplung für den Dickdarm untersuchen.

Unter septischen Bedingungen konnte Pravastatin die mitochondriale Funktion und ROS-Produktion im Colon nicht beeinflussen. Angesichts der pharmakokinetischen Besonderheiten sollte jedoch erforscht werden, ob die Funktion von Dickdarm-Mitochondrien und ROS-Entstehung unter septischen Bedingungen erst nach *in vivo* Langzeitgabe oder bei höheren Wirkstoffdosierungen verändert wird.

6 Literaturverzeichnis

1. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801 (2016).
2. Seymour, C. W. *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 762 (2016).
3. Vincent, J.-L. *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med.* **22**, 707–710 (1996).
4. Rudd, K. E. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet* **395**, 200–211 (2020).
5. Fleischmann-Struzek, C. *et al.* Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* **46**, 1552–1562 (2020).
6. Fleischmann, C. *et al.* Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis: An Analysis of Hospital Episode (DRG) Statistics in Germany From 2007 to 2013. *Dtsch. Arzteblatt Online* (2016) doi:10.3238/arztebl.2016.0159.
7. SepNet Critical Care Trials Group. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med.* **42**, 1980–1989 (2016).
8. Arina, P. & Singer, M. Pathophysiology of sepsis. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **34**, 77–84 (2021).
9. Rhodes, A. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* **43**, 304–377 (2017).
10. Prescott, H. C. & Angus, D. C. Enhancing Recovery From Sepsis: A Review. *JAMA* **319**, 62 (2018).
11. Iwashyna, T. J., Ely, E. W., Smith, D. M. & Langa, K. M. Long-term Cognitive Impairment and Functional Disability Among Survivors of Severe Sepsis. *JAMA* **304**, 1787 (2010).
12. Rosendahl, J., Brunkhorst, F. M., Jaenichen, D. & Strauss, B. Physical and

Mental Health in Patients and Spouses After Intensive Care of Severe Sepsis: A Dyadic Perspective on Long-Term Sequelae Testing the Actor–Partner Interdependence Model*. *Crit. Care Med.* **41**, 69–75 (2013).

13. Denning, N.-L., Aziz, M., Gurien, S. D. & Wang, P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front. Immunol.* **10**, 2536 (2019).
14. Hotchkiss, R. S. *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction: *Crit. Care Med.* **27**, 1230–1251 (1999).
15. Nagar, H., Piao, S. & Kim, C.-S. Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Sepsis. *Acute Crit. Care* **33**, 65–72 (2018).
16. Brealey, D. *et al.* Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet* **360**, 219–223 (2002).
17. Ince, C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit. Care* **9**, S13 (2005).
18. Spronk, P. E., Kanoore-Edul, V. S. & Ince, C. Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome (MMDS): A New Look at Sepsis. in *Functional Hemodynamic Monitoring* (eds. Pinsky, M. R. & Payen, D.) vol. 42 47–67 (Springer-Verlag, 2005).
19. Boekstegers, P., Weidenhöfer, St., Pilz, G. & Werdan, K. Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: Comparison to limited infection and cardiogenic shock. *Infection* **19**, 317–323 (1991).
20. Sair, M., Etherington, P. J., Peter Winlove, C. & Evans, T. W. Tissue oxygenation and perfusion in patients with systemic sepsis: *Crit. Care Med.* **29**, 1343–1349 (2001).
21. Fink, M. Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **41**, 87–95 (1997).
22. Fink, M. P. Cytopathic Hypoxia: Mitochondrial Dysfunction as Mechanism Contributing to Organ Dysfunction in Sepsis. *Crit. Care Clin.* **17**, 219–237 (2001).
23. Fink, M. P. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit. Care* **6**, 491 (2002).
24. Singer, M., De Santis, V., Vitale, D. & Jeffcoate, W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *The Lancet* **364**, 545–548 (2004).
25. Brandt, U. Mitochondrien – Organellen der ATP-Gewinnung. in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (eds. Heinrich, P. C., Müller, M. &

- Graeve, L.) 235–251 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-17972-3_19.
26. Kozlov, A. V. *et al.* Mitochondrial dysfunction and biogenesis: do ICU patients die from mitochondrial failure? *Ann. Intensive Care* **1**, 41 (2011).
 27. Carré, J. E. *et al.* Survival in Critical Illness Is Associated with Early Activation of Mitochondrial Biogenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 745–751 (2010).
 28. Jeger, V., Djafarzadeh, S., Jakob, S. M. & Takala, J. Mitochondrial function in sepsis. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 532–542 (2013).
 29. Singer, M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* **5**, 66–72 (2014).
 30. Arulkumaran, N. *et al.* Mitochondrial Function in Sepsis. *Shock* **45**, 271–281 (2016).
 31. Fink, M. P. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness: *Curr. Opin. Crit. Care* **9**, 143–151 (2003).
 32. Nagpal, R. & Yadav, H. Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview. *Ann. Nutr. Metab.* **71**, 11–16 (2017).
 33. Klingensmith, N. J. & Coopersmith, C. M. The Gut as the Motor of Multiple Organ Dysfunction in Critical Illness. *Crit. Care Clin.* **32**, 203–212 (2016).
 34. Yoseph, B. P. *et al.* Mechanisms of Intestinal Barrier Dysfunction in Sepsis. *Shock* **46**, 52–59 (2016).
 35. Russell, D. H., Barreto, J. C., Klemm, K. & Miller, T. A. Hemorrhagic shock increases gut macromolecular permeability in the rat. *Shock* **4**, 50–55 (1995).
 36. King, C. J., Tytgat, S., Delude, R. L. & Fink, M. P. Ileal mucosal oxygen consumption is decreased in endotoxemic rats but is restored toward normal by treatment with aminoguanidine: *Crit. Care Med.* **27**, 2518–2524 (1999).
 37. Mittal, A. *et al.* Early organ-specific mitochondrial dysfunction of jejunum and lung found in rats with experimental acute pancreatitis. *HPB* **13**, 332–341 (2011).
 38. Herminghaus, A. *et al.* Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Med. Exp.* **7**, 4 (2019).
 39. Nazli, A. *et al.* Epithelia Under Metabolic Stress Perceive Commensal

- Bacteria as a Threat. *Am. J. Pathol.* **164**, 947–957 (2004).
40. Saxena, A., Lopes, F. & McKay, D. M. Reduced intestinal epithelial mitochondrial function enhances in vitro interleukin-8 production in response to commensal *Escherichia coli*. *Inflamm. Res.* **67**, 829–837 (2018).
41. Borges, R. de P., Degobi, N. A. H. & Bertoluci, M. C. Choosing statins: a review to guide clinical practice. *Arch. Endocrinol. Metab.* (2020) doi:10.20945/2359-3997000000306.
42. Gu, Q. & Kit, B. K. Prescription Cholesterol-lowering Medication Use in Adults Aged 40 and Over: United States, 2003–2012. *8* (2014).
43. Mach, F. *et al.* 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* **41**, 111–188 (2020).
44. Almog, Y. *et al.* Prior Statin Therapy Is Associated With a Decreased Rate of Severe Sepsis. *Circulation* **110**, 880–885 (2004).
45. Chinaeke, E. E., Love, B. L., Magagnoli, J., Yunusa, I. & Reeder, G. The impact of statin use prior to intensive care unit admission on critically ill patients with sepsis. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* **41**, 162–171 (2021).
46. Merx, M. W. *et al.* HMG-CoA Reductase Inhibitor Simvastatin Profoundly Improves Survival in a Murine Model of Sepsis. *Circulation* **109**, 2560–2565 (2004).
47. Morel, J. *et al.* Simvastatin pre-treatment improves survival and mitochondrial function in a 3-day fluid-resuscitated rat model of sepsis. *Clin. Sci.* **131**, 747–758 (2017).
48. Ghayda, R. A. *et al.* The effect of statins on mortality among patients with infection: umbrella review of meta-analyses. *11*.
49. Terblanche, M., Almog, Y., Rosenson, R. S., Smith, T. S. & Hackam, D. G. Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 358–368 (2007).
50. Kaufmann, P. *et al.* Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2415–2425 (2006).
51. Mullen, P. J. *et al.* 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 (2011).
52. Paiva, H. *et al.* High-dose statins and skeletal muscle metabolism in

- humans: A randomized, controlled trial. *Clin. Pharmacol. Ther.* **78**, 60–68 (2005).
53. Bouitbir, J. *et al.* 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 (2012).
54. Brealey, D. A., Singer, M. & Terblanche, M. Potential metabolic consequences of statins in sepsis*: *Crit. Care Med.* **39**, 1514–1520 (2011).
55. Morel, J. & Singer, M. Statins, fibrates, thiazolidinediones and resveratrol as adjunctive therapies in sepsis: could mitochondria be a common target? *Intensive Care Med. Exp.* **2**, 9 (2014).
56. Moraes, L. A., Piqueras, L. & Bishop-Bailey, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol. Ther.* **110**, 371–385 (2006).
57. Balakumar, P. & Mahadevan, N. Interplay between statins and PPARs in improving cardiovascular outcomes: a double-edged sword?: Modulatory role of statins on PPARs. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 373–379 (2012).
58. Esposito, E. *et al.* Anti-inflammatory effect of simvastatin in an experimental model of spinal cord trauma: involvement of PPAR- α . *J. Neuroinflammation* **9**, 562 (2012).
59. Cuzzocrea, S. *et al.* Role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferators activated receptors alpha (PPAR- α) in the development of inflammatory bowel disease in mice. *Lab. Invest.* **84**, 1643–1654 (2004).
60. Rinaldi, B. *et al.* PPAR α mediates the anti-inflammatory effect of simvastatin in an experimental model of zymosan-induced multiple organ failure. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 609–623 (2011).
61. McGown, C. C., Brown, N. J., Hellewell, P. G., Reilly, C. S. & Brookes, Z. L. S. Beneficial microvascular and anti-inflammatory effects of pravastatin during sepsis involve nitric oxide synthase III. *Br. J. Anaesth.* **104**, 183–190 (2010).
62. Han, X. *et al.* MG53 Protects against Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction by Upregulating Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α . *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 1–16 (2020).
63. More, V. R. *et al.* PPAR- α , a lipid-sensing transcription factor, regulates blood–brain barrier efflux transporter expression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37**, 1199–1212 (2017).
64. Lustig, M. K. *et al.* Colon ascendens stent peritonitis - a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock*

28, 59–64 (2007).

65. Herminghaus, A. *et al.* Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver. *Mitochondrion* **24**, 122–128 (2015).
66. Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. L. & Randall, Rose J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
67. Chance, B. & Williams, G. R. The Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation. in *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology* (ed. Nord, F. F.) 65–134 (John Wiley & Sons, Inc., 2006).
doi:10.1002/9780470122624.ch2.
68. Gnaiger, E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis. 5th ed. (2020) doi:10.26124/BEC:2020-0002.
69. Symersky, J., Osowski, D., Walters, D. E. & Mueller, D. M. Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 13961–13965 (2012).
70. Robert Koch-Institut. Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht: Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **51**, 1464–1482 (2008).
71. Uchiyama, M. & Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **86**, 271–278 (1978).
72. Janero, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 515–540 (1990).
73. Herminghaus, A. *et al.* Pravastatin and Gemfibrozil Modulate Differently Hepatic and Colonic Mitochondrial Respiration in Tissue Homogenates from Healthy Rats. *Cells* **8**, 983 (2019).
74. Hatanaka, T. Clinical pharmacokinetics of pravastatin: mechanisms of pharmacokinetic events. *Clin. Pharmacokinet.* **39**, 397–412 (2000).
75. Schulz, J. *et al.* Effect of Pravastatin Pretreatment and Hypercapnia on Intestinal Microvascular Oxygenation and Blood Flow During Sepsis. *Shock* **53**, 88–94 (2020).
76. Rittirsch, D., Hoesel, L. M. & Ward, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 137–143 (2007).
77. Poli-de-Figueiredo, L. F., Garrido, A. G., Nakagawa, N. & Sannomiya, P.

- Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock* **30**, 53–59 (2008).
78. Maier, S. *et al.* Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* **21**, 505–512 (2004).
79. Libert, C. *et al.* Part II: Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies (MQTiPSS) for Types of Infections and Organ Dysfunction Endpoints. *Shock* **51**, 23–32 (2019).
80. Pecinová, A., Drahota, Z., Nůsková, H., Pecina, P. & Houštěk, J. Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion* **11**, 722–728 (2011).
81. Herminghaus, A. *et al.* Propofol improves colonic but impairs hepatic mitochondrial function in tissue homogenates from healthy rats. *Eur. J. Pharmacol.* **853**, 364–370 (2019).
82. Brand, M. D. & Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **435**, 297–312 (2011).
83. Mitchell, P. & Moyle, J. Chemiosmotic Hypothesis of Oxidative Phosphorylation. *Nature* **213**, 137–139 (1967).
84. Rolfe, D. F. & Brown, G. C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* **77**, 731–758 (1997).
85. Demine, Renard, & Arnould. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. *Cells* **8**, 795 (2019).
86. Mansén, A., Guardiola-Diaz, H., Rafter, J., Branting, C. & Gustafsson, J.-Å. Expression of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) in the Mouse Colonic Mucosa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 844–851 (1996).
87. Zungu, M., Young, M. E., Stanley, W. C. & Essop, M. F. Chronic treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor α agonist Wy-14,643 attenuates myocardial respiratory capacity and contractile function. *Mol. Cell. Biochem.* **330**, 55–62 (2009).
88. Zungu, M., Felix, R. & Faadiel Essop, M. Wy-14,643 and fenofibrate inhibit mitochondrial respiration in isolated rat cardiac mitochondria. *Mitochondrion* **6**, 315–322 (2006).
89. Carré, J. E. & Singer, M. Cellular energetic metabolism in sepsis: The need for a systems approach. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1777**, 763–771

(2008).

90. Saeidnia, S., Manayi, A. & Abdollahi, M. From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. *Curr. Drug Discov. Technol.* **12**, 218–224 (2016).

91. Stolf, A. M. *et al.* Effects of statins on liver cell function and inflammation in septic rats. *J. Surg. Res.* **178**, 888–897 (2012).

92. Fujii, M. *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in antimicrobial therapy for sepsis. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **16**, 415–430 (2020).

93. Yamazaki, M., TOKUIT, T., Ishigamiy, M. & Sugiyamas, Y. Tissue-selective uptake of Pravastatin in rats: contribution of a specific carrier-mediated uptake system. 15.

94. Brookes, P. S. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 12–23 (2005).

95. Brand, M. D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* **10** (2000).

96. Hamanaka, R. B. & Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 505–513 (2010).

97. Wang, Y., Wang, X., Yang, W., Zhao, X. & Zhang, R. Effect of Simvastatin on the Intestinal Rho/ROCK Signaling Pathway in Rats With Sepsis. *J. Surg. Res.* **232**, 531–538 (2018).

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung	11
Tabelle 2: Isolationspuffer	15
Tabelle 3: Standardverdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin zur Proteinbestimmung	15
Tabelle 4: Lowry Lösung 1 & 2	16
Tabelle 5: Respirationspuffer	20
Tabelle 6: Standardverdünnungsreihe aus Malonaldehydbisdimethylacetal zur MDA-Konzentrationsbestimmung	22

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Mitochondriale Funktion im Colon unter nicht-septischen Bedingungen ..	25
Abb. 2: Mitochondriale Funktion im Colon unter septischen Bedingungen	27
Abb. 3: MDA-Konzentration im Colon unter nicht-septischen und septischen Bedingungen	28

7.3 Materialien, Geräte und Medikamente des tierexperimentellen Versuchsteils

Beatmungsgerät	Inspira Advanced Safety Ventilator, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
<i>Bestimmung von u.a. hämodynamischen Parametern (im Rahmen anderer Studien)</i>	<i>PowerLab, AD Instruments, Castle Hill, Australien</i>
Blutdruckmessgerät	Gould Statham Druckwandler P23ID, Gould, Elk Grove, Kalifornien, USA
Blutgasanalysegerät	ABL 800 Flex, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Buprenorphin	Temgesic, Reckitt Benkiser, Mannheim, Deutschland
Desinfektionsmittel	Octeniderm, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid) 5 %	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Einmalspritzen	Omnifix-F, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Faden, nicht resorbierbar, 6-0	Prolene, Ethicon Inc., Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Faden, resorbierbar, 4-0	Vicryl Plus, Ethicon Inc., Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
Lochtuch	Raucodrape, Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Narkoseapparate	Sulla 808, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland

Pentobarbital	Narcoren, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Perfusor	Secura Typ 8717/02/8, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
PPAR- α -Antagonist GW 6471	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich
Pravastatin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Sevofluran	Sevorane, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Thermometer	VT 1831, Microlife AG, Widnau, Schweiz
Venenverweilkanüle	Vasofix Safety, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Waage	EMB 2200-0, KERN & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland

7.4 Materialien und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils

96-Well-Mikrotiterplatte	Mikrotestplatte 96 Well F/R/K, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Eismaschine	AF 80, Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Gewebehomogenisator, Potter- Elvehjem-Verfahren	Eurostar 20 digital, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Glaszylinder zur Gewebehomogenisierung, 60ml	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Kompressen, 5x5 cm, 17-fädig, 12-fach	ES-Kompressen, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

pH-Meter	Digital pH-Meter Typ 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Pipetten	Pipettensatz Research 5 µl bis 5000 µl, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Plattenlesegerät	Synergy 2, Software Gen5 (Version 1.11), BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA
Reaktionsgefäße, 2 ml	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Respirometer	MS200 System (MT200 + SI782), Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Schottland
Respirometer-Software	782 System Version 5.1, Strathkelvin Instruments Limited, North Lanarkshire, Schottland
Statistiksoftware	GraphPad Prism, Version 8.0, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
Vortexmischer	Vortex-Genie 1 Touch Mixer, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage	EMB 2200-0, KERN & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Wärmeschrank	UT 6200, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Wasserbad	HE-4 Umwälzthermostat, JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	Rotina 420 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

7.5 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils

Trypsin-EDTA, 0,05 %	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
2-Thiobarbitursäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ADP	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
cOmplete (Proteasehemmer)	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Cytochrom-c	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EGTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Glutamat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz (heute: Honeywell Fluka/Fisher Scientific GmbH)
Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz (heute: Honeywell Fluka/Fisher Scientific GmbH)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kupfersulfat-Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Malat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mannitol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MOPS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
n-Butanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz (heute: Honeywell Fluka/Fisher Scientific GmbH)
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oligomycin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Phosphorsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Rotenon	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumsulfid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Succinat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Tetranatriumdiphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren bei der Umsetzung dieses Promotionsvorhabens unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Olaf Picker für die Überlassung dieses Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Vielen Dank für Ihre Unterstützung, konstruktive Kritik und stetig währende Beratung.

Ebenfalls möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Scheckenbach für die Co-Betreuung dieser Promotion bedanken.

Ganz besonders danke ich Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus für die Aufnahme in ihre Projektgruppe. Danke für die geduldige Einarbeitung, die intensive Unterstützung während meiner ersten wissenschaftlichen „Gehversuche“, Dein stets offenes Ohr, Deine Zuverlässigkeit und die mühevollen Durchsicht dieser Arbeit. Dein Engagement hat dieses Promotionsvorhaben erst möglich gemacht!

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer. Als Laborleiterin standen Sie mir allzeit mit Rat und Tat zur Seite. Den „guten Seelen“ des Labors, Frau Birgitt Berke und Claudia Dohle, danke ich für die Einarbeitung in die Laborarbeit und Schaffung der Rahmenbedingungen für diese experimentelle Versuchsreihe.

Ein Dank gilt meiner Mit-Doktorandin und Tierärztin Katharina Gross für die Durchführung des tierexperimentellen Versuchsteils.

Meinen Mit-Doktoranden Theresa Tenge, Johannes Buitenhuis und Max Sonnenschein danke ich für die Unterstützung und gute Zusammenarbeit. Die freundschaftliche Atmosphäre hat mir in so manchen motivationslosen Momenten wieder neuen Antrieb verschafft. Ein großer Dank gilt Julia Ehren für die akribische und konstruktive Korrektur dieses Manuskriptes aus germanistischer Sichtweise.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden bedanken. Ohne Eure Unterstützung und Motivation wäre dieses Projekt erst gar nicht möglich gewesen.