

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Einfluss von Midazolam auf die
mitochondriale Funktion im Colon und in
der Leber von gesunden Ratten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nicola Elisabeth Kurth
2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Marion Rapp

In liebevoller Erinnerung
für Gisela und Franz-Josef Kurth.

Zusammenfassung

Funktionstüchtige Mitochondrien sind für die Integrität des Organismus unabdingbar, da sie eine zentrale Rolle in der Energiebereitstellung für die Zelle durch die Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP) spielen. Die Funktion der Mitochondrien kann allerdings durch Medikamente und andere schädigende Einflüsse, wie Hypoxie und Inflammation beeinträchtigt werden, was in einer unzureichenden zellulären Energieversorgung resultiert. Dysfunktionale Mitochondrien sind an der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder, wie akuter und chronischer Lebererkrankungen und der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), beteiligt. Inwieweit das weit verbreitete Anästhetikum Midazolam, welches unter anderem in der Einleitung und Aufrechterhaltung von Anästhesien, aber auch für die Langzeitsedierung auf der Intensivstation genutzt wird, die mitochondriale Funktion im Colon und in der Leber beeinflusst, ist bisher ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es daher den Effekt von Midazolam auf die mitochondriale Funktion in Colon- und Leberzellhomogenaten zu erfassen. Die Organe stammten von gesunden Wistar-Ratten, welche dann in mehreren Arbeitsschritten aufbereitet und homogenisiert wurden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration in den Gewebekomplexen erfolgte anschließend die Respirometrie mit Hilfe einer Clark-Elektrode zur Messung der mitochondrialen Funktion unter Zugabe von je unterschiedlichen Konzentrationen Midazolam. Es wurden die basale Geschwindigkeit des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs (State 2), die Geschwindigkeit des maximalen Sauerstoffverbrauchs (State 3) und die Respirationsrate nach Verbrauch von ADP (State 4) gemessen. Anhand der Ergebnisse konnte der *respiratory control index* (RCI = State 3/State 2) als Maß für die Kopplung der mitochondrialen Atmungskette an die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) und die Effizienz der OXPHOS (ADP/O-Ratio) berechnet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Einfluss von Midazolam organspezifisch ist. Während in Colonzellhomogenaten keine Konzentration die mitochondriale Respiration, gemessen als RCI, und die ADP/O-Ratio beeinflusste, waren die Effekte in Leberzellhomogenaten komplex- und konzentrationsabhängig. In Komplex II-stimulierten Leberzellhomogenaten reduzierte 500 µM Midazolam die State 3 Respiration und den RCI, ohne die Atmungskette von der OXPHOS zu entkoppeln.

Summary

Mitochondria play a central role in energy metabolism through the production of adenosine triphosphate (ATP). Accordingly, the mitochondrial function is essential for the organism. However, the function of mitochondria can be impaired by drugs and other damaging influences such as hypoxia and inflammation, resulting in an insufficient energy supply for the cell. Dysfunctional mitochondria are involved in the pathogenesis of different diseases such as acute and chronic liver diseases and the development of inflammatory bowel diseases. Midazolam is a widely accepted anesthetic drug, which is used for induction and maintenance of anesthesia but also for long-term sedation in the intensive care unit. The extent to which the benzodiazepine influences the mitochondrial function of the colon and the liver still has not been clarified.

The aim of this work was to determine the effect of midazolam on the mitochondrial function in tissue homogenates of the colon and the liver from healthy Wistar-rats. For this purpose, the organs were prepared and then homogenized in several steps. First the protein concentration in the tissue homogenates was determined, then the measurement of mitochondrial oxygen consumption was performed using a Clark-type electrode. Tissue homogenates were incubated with different concentrations of midazolam. After stimulating complexes I and II of the mitochondrial respiratory chain, the basal mitochondrial respiration in state 2 was recorded. The maximal mitochondrial respiration in state 3 was measured after the addition of adenosine diphosphate (ADP). In State 4 the mitochondrial respiration after consumption of ADP was determined. The *respiratory control index* ($RCI = \text{State 3}/\text{State 2}$) was calculated to specify the coupling between the electron transport chain system and oxidative phosphorylation (OXPHOS). In addition to that, ADP/O-ratio as a parameter for the efficacy of OXPHOS was calculated from the amount of ADP added and oxygen consumption.

Our results show an organ-specific effect of midazolam on the mitochondrial function. In colonic mitochondria, there was no effect of midazolam on mitochondrial respiration; RCI and ADP/O-ratio remained unaltered compared to the control groups. In hepatic tissue midazolam altered mitochondrial respiration at the highest concentration of 500 μM only for complex II. Indeed, Midazolam decreased state 3 respiration and RCI, which is interpreted only as downregulation of the electron transport chain system.

Abkürzungsverzeichnis

ΔO	ADP abhängiger Sauerstoffverbrauch
ADP	Adenosindiphosphat
ADP/O-Ratio	Menge an zugefügtem Adenosindiphosphat/Menge an verbrauchtem Sauerstoff
ALD	alkoholische Fettlebererkrankung
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CASP	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>
CCCP	Carbonylcyanide 3-chloro-phenylhydrazone
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRC	kolorektales Karzinom
CYP3A4	Cytochrom P-450 3A4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
et al.	et alii
FAD/FADH2	Flavinadenindinukleotid
g	Gramm
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GF	<i>germ-free</i>
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor-1α
HIF-2α	Hypoxie-induzierter Faktor-2α
IMR	Intermembranraum
IQR	<i>interquartile range</i>
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
M	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mol/l = Mol/Liter
mM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mmol/l = Millimol/Liter

μM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht μmol/l = Mikromol/Liter
nM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht nmol/l = Nanomol/Liter
MCT	<i>medium chain triglycerides</i>
min	Minute
mm³	Kubikmeter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propan-sulfonsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAD⁺/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NAFLD	nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
nm	Nanometer
NSAID	<i>nonsteroidal antiinflammatory drugs</i>
NRLP3	<i>nucleotide binding domain and leucinerich repeat pyrin 3 domain</i>
O₂	Sauerstoff
OXPHOS	oxidative Phosphorylierung
pH	negativer dekadischer Logarithmus
RCI	<i>respiratory control index</i>
RCR	<i>respiratory control ratio</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SPF	<i>specific pathogen free</i>
TSPO	<i>translocator protein</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Rolle der Mitochondrien in der Zelle	1
1.2 Bedeutung der mitochondrialen Funktion für den Organismus.....	2
1.3 Intravenöse Anästhetika - Midazolam	5
1.4 Einfluss von Midazolam auf die mitochondriale Funktion	6
2 Fragestellung der Arbeit.....	9
3 Laborexperimenteller Versuchsteil.....	10
3.1 Materialien und Geräte.....	10
3.2 Chemikalien.....	10
3.3 Herstellung der Gewebehomogenate für Colon und Leber	10
3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	11
3.5 Bestimmung der mitochondrialen Funktion mittels Respirometrie.....	12
3.6 Statistik.....	15
4 Ergebnisse.....	16
4.1 Effekte von Midazolam auf die mitochondriale Funktion im Colon	16
4.2 Effekte von Midazolam auf die mitochondriale Funktion in der Leber	18
5 Diskussion	21
5.1 Ergebnisdiskussion	21
5.2 Methodendiskussion	26
5.3 Fazit.....	27
6 Literatur- und Quellenverzeichnis	28
7 Anhang	34
7.1 Materialien und Geräte.....	34
7.2 Chemikalien und Reagenzien.....	35

7.3	Puffer und Lösungen.....	37
7.3.1	Isolationspuffer.....	37
7.3.2	Respirationspuffer.....	38
7.3.3	Lösungen für die Proteinkonzentrationsbestimmung.....	38
7.3.4	Substanzen für die respirometrischen Messungen.....	39
8	Abbildungsverzeichnis.....	40
9	Tabellenverzeichnis.....	40

1 Einleitung

1.1 Die Rolle der Mitochondrien in der Zelle

1957 bezeichnete Peter Siekevitz Mitochondrien erstmalig als das Kraftwerk der Zelle (Siekevitz, 1957). Mitochondrien sind essenziell für den zellulären Energiestoffwechsel und neben der Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) durch oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) auch an der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), der Signalübertragung im Rahmen der Apoptose, der Calcium-Homöostase sowie der Kardioprotektion beteiligt (La Monaca & Fodale, 2012). Die Synthese des Hämoglobins und die von Eisen-Schwefel-Clustern sind ebenfalls in Mitochondrien lokalisiert (Protasoni & Zeviani, 2021).

Mitochondrien sind in fast allen eukaryotischen Zellen zu finden und umgeben von zwei Phospholipidmembranen, welche sich in Form und Permeabilität grundlegend unterscheiden. Die äußere mitochondriale Membran ist glatt und aufgrund einer hohen Anzahl an Poren in der Membran gut permeabel. Das mitochondriale Protein *Porin* ist Bestandteil der äußeren mitochondrialen Membran, weshalb Proteine bis zu 10000 Dalton in den Intermembranraum (IMR) passieren können (La Monaca & Fodale, 2012).

Die innere mitochondriale Membran ist gefaltet und bildet sogenannte *Cristae*, als dünne Einstülpungen der inneren Membran, aus, mit dem Ziel die Oberfläche für die OXPHOS zu vergrößern. Neben den Proteinen der Atmungskette ist das *Cardiolipin* ein wichtiger Bestandteil der inneren mitochondrialen Membran, da es die Enzyme für die OXPHOS stabilisiert (Protasoni & Zeviani, 2021; Simões et al., 2018). Aufgrund einer geringen Permeabilität der inneren mitochondrialen Membran ist der Stoffaustausch nur über Transporter und Permeasen möglich. Dadurch ist der Aufbau eines elektrochemischen Gradienten für die Atmungskette möglich. Die innere mitochondriale Membran grenzt den IMR von der Matrix ab. Die Anteile zwischen den Einstülpungen der inneren mitochondrialen Membran in die Matrix werden als innere Grenzmembran bezeichnet, verlaufen somit parallel zur äußeren mitochondrialen Membran und sind über *cristae junctions* mit den Einstülpungen verbunden (Protasoni & Zeviani, 2021; La Monaca & Fodale, 2012).

Die Hauptaufgabe von Mitochondrien besteht in der Energiegewinnung für die Zelle in Form von ATP in der Reaktionskaskade der Atmungskette. Daraus resultiert die hohe Mitochondrienzahl in metabolisch aktiven Organen, wie Herz, Gehirn, Leber und Skelettmuskulatur (La Monaca & Fodale, 2012).

Die Elektrontransportkette im Rahmen der OXPHOS ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und besteht aus vier Proteinkomplexen (Komplex I, II, III, IV), sowie

aus zwei Carriern für den Elektronentransport (Coenzym Q und Cytochrom C) entlang der inneren mitochondrialen Membran. Der Citratzyklus, lokalisiert in der Mitochondrienmatrix, generiert Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavinadenindinukleotid (FADH₂) als reduzierte Coenzyme, welche den Elektronentransport via mehrere Redoxreaktionen bis zum finalen Akzeptor Sauerstoff in Komplex IV ermöglichen. Die Energie und der aus dem Elektronentransport resultierende elektrochemische Gradient wird benötigt, um Protonen über die Komplexe I, III, IV von der Matrix in den IMR zu pumpen. Der entstehende Protonengradient wird wiederum genutzt, um mittels ATP-Synthase ATP zu produzieren und für die Zelle bereitzustellen (La Monaca & Fodale, 2012; Protasoni & Zeviani, 2021; Nolfi-Donagan et al., 2020; Guo et al., 2018).

1.2 Bedeutung der mitochondrialen Funktion für den Organismus

Aufgrund vielseitiger Funktionen, die Mitochondrien für den Organismus aufweisen, wird die mitochondriale Dysfunktion als zugrundeliegender Mechanismus vieler Krankheiten angesehen. Akute und chronische Lebererkrankungen sind mit dysfunktionalen Mitochondrien assoziiert (Ma et al., 2020).

Als erstes Beispiel kann die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) genannt werden. Diese bezeichnet man als die hepatische Manifestation eines metabolischen Syndroms, welche beginnend mit der Steatosis in einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH), Fibrose, Zirrhose und letztendlich in einem hepatozellulärem Karzinom enden kann. Die hepatischen Mitochondrien zeigen sich bei einer NAFLD vergrößert und geschwollen mit Aufhebung der typischen *Cristae*-Struktur und reduzierter Aktivität der Enzymkomplexe für die mitochondriale Atmungskette (Einer et al., 2018; Simões et al., 2018; Ma et al., 2020). Die im Rahmen einer Steatosis angehäuften freien Fettsäuren und Triglyzeride führen zu einer metabolischen Verschiebung mit verstärkter mitochondrialer Fettsäureoxidation und Stimulation des Citratzyklus, sowie der OXPHOS (Eccleston et al., 2010; Sunny et al., 2011). Durch die Stimulation der Fettsäureoxidation und des Citratzyklus fallen wiederum vermehrt reduzierte Coenzyme für die mitochondriale Atmungskette an, wodurch die mitochondriale ROS-Produktion erhöht wird. Oxidativer Stress führt neben einer Veränderung des mitochondrialen Genoms, der vermehrten Oxidation von Proteinen und der vermehrten Peroxidation von Lipiden zur Schädigung des *Cardiolipins*, als Protein der inneren mitochondrialen Membran, und somit zur Destabilisierung der Elektronentransportkette mit einhergehendem Verlust der Aktivität der Enzymkomplexe. Simões et al vermuten im Zusammenhang mit einer Schädigung der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (DNA) wiederum die Induktion des oxidativen Stresses durch die dysfunktionalen Mitochondrien, wodurch der hepatozelluläre oxidative Schaden verstärkt wird (Simões et al., 2018).

Im Rahmen der alkoholischen Fettlebererkrankung (ALD) werden oxidativem Stress und mitochondrialer Dysfunktion ebenfalls eine zentrale Rolle in der Pathogenese zugeschrieben. Ethanol verringert die Kapazität der OXPHOS und fördert die ROS-Produktion (Ma et al., 2020; García-Ruiz et al., 2013; Mantena et al., 2008).

Mitophagie wird als selektive Autophagie für geschädigte, dysfunktionale Mitochondrien bezeichnet und ist entscheidend für die Regulation der Leberhomöostase. John Lemasters beschrieb erstmals depolarisierte Mitochondrien, umgeben von lysosomalen Kompartimenten in Hepatozyten (Lemasters et al., 1998). Der Prozess der Mitophagie hat einen protektiven Effekt auf Leberzellerkrankungen, wie dem medikamenteninduzierten Leberschaden, der Pathogenese von NAFLD und ALD und der Virushepatitiden. Zum Zeitpunkt der Tumorentstehung werden die Akkumulation von dysfunktionalen Mitochondrien, oxidativer Stress, die genomische Instabilität und Inflammation durch Mitophagie unterdrückt, wohingegen in der Tumorprogression Mitophagie den Tumorzellmetabolismus unterstützt und aufrechterhält (Ma et al., 2020).

Die Beeinflussung der intestinalen Homöostase durch Mitochondrien zeigt sich in der Interaktion der Darmmikrobiota mit Mitochondrien von Mukosazellen, aber auch von Epithel- und Immunzellen. Durch die mitochondriale Signalübertragung können Immunzellen aktiviert, inflammatorische Signale induziert und proinflammatorische Zytokine produziert werden. Die Aktivierung des *nucleotide binding domain and leucinerich repeat pyrin 3 domain* (NLRP3-) Inflammasoms durch dysfunktionale Mitochondrien ist assoziiert mit der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) (Próchnicki & Latz, 2017; Bauer et al., 2010; Ip et al., 2017). Veränderungen im mitochondrialen Metabolismus, wie eine verminderte Aktivität der Elektrontransportkette, verminderte ATP-Produktion und die Akkumulation von mitochondrialen ROS, aber auch elektronenmikroskopische Veränderungen von Mitochondrien in Epithelzellen weisen auf eine CED hin (Jackson & Theiss, 2020; Söderholm et al., 2002). Eine verminderte mitochondriale Funktion in Epithelzellen und die Anhäufung von mitochondrialen ROS, aber auch ein vermindertes Sauerstoffangebot können zu einem Verlust der Integrität in der Darmbarriere und dem transzellulären Eindringen von Bakterien und Pathogenen führen (Jackson & Theiss, 2020; Vollmer et al., 2017; Truse et al., 2017). Eine Zerstörung der intestinalen Barriere während einer Infektion kann die Inflammation verschlimmern, auch wenn das Colon nicht als primärer Fokus der Infektion angesehen wird (Bischoff et al., 2014).

Das Zusammenspiel von mitochondrialen Veränderungen und einem Ungleichgewicht der Darmflora ist entscheidend in der Pathogenese von CED, aber auch in der Tumorgenese von kolorektalen Karzinomen (CRC). Tumorzellen produzieren ATP mittels Glykolyse und

OXPHOS und verändern den Gebrauch mitochondrialer Enzymkomplexe zugunsten eines schnellen Tumorzellwachstums, verminderter Apoptose und der Metastasenbildung (Jackson & Theiss, 2020; Yu et al., 2017; Ward & Thompson, 2012). Die mit CED einhergehende Inflammation induziert eine Hypoxie in Colonzellen, was als Indikator für Veränderungen im mitochondrialen Zellmetabolismus und der Progression eines CRC gilt. Der Hypoxie-induzierte Faktor-1 α (HIF-1 α) reduziert die intestinale Inflammation und stabilisiert die Epithelzellen zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion (Jackson & Theiss, 2020; Herminghaus et al., 2019c), wohingegen der Hypoxie-induzierte Faktor-2 α (HIF-2 α) eine Colitis und die Tumorprogression fördert (Jackson & Theiss, 2020; Ramakrishnan & Shah, 2016). In der Behandlung des CRCs wird eine zielgerichtete antiproliferative und zytotoxische Therapie gegen Mitochondrien diskutiert mit dem Ziel die ATP-Produktion und den Zellmetabolismus in Tumorzellen zu drosseln (Kalyanaraman et al., 2018).

Neben einer Beeinflussung der intestinalen Homöostase durch die mitochondriale Funktion, können Darmmikrobiota die metabolische Aktivität des hepatischen Cytochrom P-450 3A4 (CYP3A4)-Enzymsystems *in vitro* und *in vivo* verändern (Togao et al., 2020; Collins & Patterson, 2020). Dies ist entscheidend für Medikamente, wie Midazolam, welche über das CYP3A4-Enzymsystem verstoffwechselt werden (Prommer, 2020). Es ist bisher ungeklärt, ob ein möglicher Eingriff in die Metabolisierung von Midazolam durch die Darmmikrobiota der Ratten auch Einfluss auf die Mitochondrienfunktion haben könnte.

Dysfunktionale Mitochondrien scheinen neben einer unzureichenden Mikrozirkulation auch in der Pathogenese der Sepsis und des Multiorganversagens beteiligt zu sein, wobei deren eigentliche Rolle bisher ungeklärt ist. Im Rahmen einer Sepsis induzierten Organdysfunktion ist fraglich, ob geschädigte Mitochondrien aktiv als Initiatoren, Verstärker, Zielobjekte oder nur passiv als Beobachter agieren (Herminghaus et al., 2019c; Brealey et al., 2002; Arulkumaran et al., 2016). Zudem konnte herausgestellt werden, dass die mitochondriale Funktion organspezifisch ist und abhängig vom zeitlichen Verlauf einer Sepsis. Herminghaus et al. untersuchten die mitochondriale Funktion im Colon und in der Leber nach steriler Laparotomie und abdominalen Infektion mittels *colon ascendens stent peritonitis* (CASP) über eine Zeitdauer von 96 Stunden. In der Initialphase der Sepsis zeigte sich zunächst eine Zunahme der mitochondrialen Respiration in der Leber bis zu einem Zeitpunkt von 48 Stunden, welche sich dann im Verlauf der abdominalen Infektion bis 96 Stunden wieder normalisierte. Es wird angenommen, dass hepatische Mitochondrien in der Lage sind ihre Funktion im zeitlichen Verlauf einer Sepsis anzupassen. Im Colon blieb die mitochondriale Funktion unbeeinflusst durch die induzierte abdominale Infektion. Dies könnte durch eine bessere Adaptation der Colonzellen an sich verändernde Sauerstoffkonzentrationen und eine verminderte Mitochondrienzahl in metabolisch weniger

aktiven Organen wie dem Colon erklärt werden (Herminghaus et al., 2019c; La Monaca & Fodale, 2012).

Zusammenfassend sind Mitochondrien an der Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder beteiligt. Daraus lässt sich die Bedeutung funktionstüchtiger Mitochondrien für den Organismus schließen. Es gilt die Entstehung und den Metabolismus dysfunktionaler Mitochondrien, sowie deren Einfluss auf den menschlichen Organismus weiter zu erforschen, um Krankheiten vermeiden beziehungsweise therapieren zu können. Falls sich im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Midazolam *in vitro* auf die mitochondriale Funktion im Colon und in der Leber als negativ herausstellt, bleibt zu klären inwieweit intravenöse Anästhetika wie Midazolam bei Patienten mit den oben beschriebenen Krankheitsbildern, wie Leberinsuffizienz, CED und CRC, sowie Sepsis, zu meiden beziehungsweise die Dosis gegebenenfalls zu reduzieren ist. Um eine genaue Aussage treffen zu können, wären hierfür weitere *in vivo* Versuche notwendig.

1.3 Intravenöse Anästhetika - Midazolam

Zu den intravenösen Anästhetika werden pharmakologisch heterogene Wirkstoffgruppen, wie Benzodiazepine, gezählt, deren Gemeinsamkeit in einer sedierenden Wirkung liegt. Gegenüber anderen Benzodiazepinen zählen zu den Vorteilen von Midazolam dessen Wasserlöslichkeit, wodurch die intravenöse Injektion weniger schmerzhaft ist, und eine kurze Wirkdauer. Zusätzlich weist das Medikament geringe kardiovaskuläre und respiratorische Effekte auf und löst eine anterograde Amnesie aus (Kanto, 1985; Wang et al., 2020).

Das Benzodiazepin Midazolam wirkt über eine Verstärkung der GABAergen (γ -Aminobuttersäure) Neurotransmission an den inhibitorischen Synapsen sedierend, amnestisch, angstlösend, zentral muskelrelaxierend und antikonvulsiv. Midazolam bindet an den Benzodiazepin-Rezeptor an der alpha-Untereinheit des GABA-A-Rezeptors und erhöht über eine verstärkte GABAerge Wirkung die Öffnungsfrequenz postsynaptischer Chloridkanäle, was zu einer Membranhyperpolarisation und letztendlich zur Reduktion der neuronalen Erregbarkeit führt (Prommer, 2020; Wang et al., 2020).

Die chemische Struktur von Midazolam verändert sich in Abhängigkeit von der Protonenkonzentration (pH-Wert = negativer dekadischer Logarithmus). Midazolam ist hydrophil. Bei einem pH-Wert größer vier schließt sich der Imidazolring des Benzodiazepins und das Molekül wird lipophil, wodurch ein schneller Wirkungseintritt des Medikamentes erzielt wird (Kanto, 1985; Wang et al., 2020). Midazolam kann oral, intravenös, intranasal und intramuskulär verabreicht werden. Aufgrund des ausgeprägten First-Pass-Effekt beträgt die orale Bioverfügbarkeit lediglich 40-50 %. Neben einem raschen Wirkeintritt

zeichnet sich Midazolam durch eine kurze Wirkdauer bei hohem Verteilungsvolumen von 0,8-1,7 l/kg aus. 96-98% des Midazolams werden an Plasmaproteine, hauptsächlich an Serumalbumin gebunden. Die Metabolisierung erfolgt durch das CYP3A4-Enzymsystem in Leber und Darm. Die Plasmakonzentration von Midazolam kann durch andere Arzneimittel mit der Fähigkeit der CYP3A4-Induktion oder CYP3A4-Inhibition erniedrigt beziehungsweise erhöht werden. Midazolam wird über die Nieren ausgeschieden (Prommer, 2020; Wang et al., 2020). Dementsprechend ist bei Patienten mit einer Leber- und Niereninsuffizienz, bei älteren Patienten, sowie bei kritisch kranken Patienten die Plasma-Clearance von Midazolam reduziert, sowie die Wirkdauer und Wirkstärke ausgeprägter (Bremer et al., 2004; Prommer, 2020).

Das Benzodiazepin Midazolam findet Verwendung in der Prämedikation, in der Einleitung und Aufrechterhaltung von Narkosen und in der Langzeitsedierung auf der Intensivstation. Midazolam eignet sich gut als Hypnotikum bei endoskopischen Eingriffen und in der Regionalanästhesie. Darüber hinaus wird Midazolam zunehmend in der Palliativmedizin eingesetzt (Wang et al., 2020; Prommer, 2020).

1.4 Einfluss von Midazolam auf die mitochondriale Funktion

Die Effekte von Midazolam auf die mitochondriale Funktion scheinen organspezifisch und konzentrationsabhängig zu sein und werden teilweise widersprüchlich beschrieben (Colleoni et al., 1996; Wang et al., 2018; Hirsch et al., 1989). Die Beeinflussung der mitochondrialen Funktion im Colon und in der Leber sind bisher nicht ausreichend erforscht; für das Colon fehlen nach aktuellem Wissenstand Daten über die Beeinflussung der mitochondrialen Funktion durch das Anästhetikum Midazolam. Es gibt Berichte, wonach Midazolam den mitochondrialen Elektronentransport in Leber- und Skelettmuskelzellen konzentrationsabhängig hemmt, vor allem durch die Inhibition von Komplex I und III, vermittelt durch die Bindung an mitochondriale Benzodiazepin-Rezeptoren (Colleoni et al., 1996). Im Einklang hiermit stehen bereits zuvor durchgeführte *in vitro* Versuche an Nieren von Ratten, welche die Bindung von jeweils neun Liganden, darunter drei Benzodiazepine, an mitochondriale Benzodiazepin-Rezeptoren ebenfalls als inhibierend bewerten (Hirsch et al., 1989). Auf der anderen Seite zeigte die Aktivierung von peripheren Benzodiazepin-Rezeptoren durch den Einfluss von Midazolam auch positive Effekte. In Zellen von Lungenkarzinomen und Neurogliomen konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden, dass Midazolam konzentrationsabhängig sowohl die Tumorzell-Proliferation und -Migration hemmt als auch Apoptose via *intrinsic mitochondrial pathway* durch die Anhäufung von ROS induziert. Zur Klärung der Frage inwieweit Midazolam im klinischen Setting perioperativ zur Reduktion des Tumorzellwachstums eingesetzt werden kann, bedarf es weiterer Studien (Wang et al., 2018).

Neben dem zentralen Benzodiazepin-Rezeptor wurde ein weiterer Benzodiazepin-Rezeptor in peripheren Geweben, sogenanntes *translocator protein* (TSPO), identifiziert, der als Kontaktstelle zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran fungiert. Das mitochondriale Membranprotein TSPO befindet sich an der äußeren mitochondrialen Membran und es wurden TSPO-Bindungsstellen in Geweben wie Herz, Niere, Leber und Nebennieren nachgewiesen. Es besteht Konsens darüber, dass TSPO bei vielen intrazellulären Prozessen wie OXPHOS, ROS-Produktion, Zellproliferation und Apoptose beteiligt zu sein scheint; die genauen Effekte sind teilweise widersprüchlich und bisher noch nicht ausreichend geklärt (Bonsack & Sukumari-Ramesh, 2018; Lee et al., 2020; Betlazar et al., 2020; Wang et al., 2018). Mehrere Studien beschreiben eine verminderte basale und maximale Respirationsrate, eine herabgesetzte ATP-Produktion, sowie ein erniedrigtes mitochondriales Membranpotential und eine vermehrte ROS-Produktion in TSPO-knockout-Zellen (Betlazar et al., 2020; Milenkovic et al., 2019; Bader et al., 2019; Fu et al., 2020). In peritoneal Makrophagen konnte gezeigt werden, dass TSPO-Liganden in der Lage sind, die ROS-Produktion zu reduzieren (Betlazar et al., 2020). Im Gegensatz dazu soll die Öffnung der *mitochondrial permeability transition pore*, reguliert durch TSPO, entkoppelnd auf die OXPHOS und ATP-Synthese wirken, das mitochondriale Membranpotential reduzieren und die mitochondriale ROS-Produktion fördern (Lee et al., 2020). Unterstützend hierfür vermuten Wang et al., dass eine vermehrte ROS-Produktion, bedingt durch die Bindung von Midazolam an TSPO, den *intrinsic mitochondrial pathway* stimuliert und Apoptose in Zellen von Lungenkarzinomen und Neurogliomen induziert (Wang et al., 2018).

TSPO wird bereits in der Diagnostik als Biomarker für Neuroinflammation eingesetzt, die therapeutische Bedeutung des Membranproteins und seiner Liganden in der Behandlung von neurologischen und neuropsychologischen Erkrankungen wird diskutiert (Betlazar et al., 2020; Lee et al., 2020).

Es stellt sich die Frage, inwieweit die Bindung von Midazolam an TSPO die mitochondriale Funktion in der Leber beeinflusst. Für das Vorkommen von peripheren Benzodiazepin-Rezeptoren in Zellen des Gastrointestinaltraktes gibt es bis jetzt keine eindeutige Evidenz (Ostuni et al., 2004), aber es ist nicht ausgeschlossen, dass dieses Medikament über einen Signalweg die mitochondriale Funktion im Gastrointestinaltrakt beeinflusst.

Herminghaus et al. konnten zeigen, dass lipophile Substanzen, wie Indomethacin einen entkoppelnden Effekt auf hepatische Mitochondrien in gesunden Ratten zeigen. Gleichzeitig erwies sich der Einfluss von Indomethacin auf intestinale Mitochondrien durch eine gesteigerte Effektivität der ATP-Produktion als positiv (Herminghaus et al., 2020). Lipophile leichte Säuren können die äußere mitochondriale Membran passieren und

Protonen vom Intermembranraum wieder zurück in die Mitochondrienmatrix befördern (Herminghaus et al., 2020). Es ist bisher ungeklärt, ob auch Midazolam mit seinen lipophilen Eigenschaften die Aufrechterhaltung des Protonengradienten für die mitochondriale Atmungskette schwächt und folglich die Aktivität der ATP-Synthase reduziert. Daher ist es interessant die Wirkung von Midazolam auf die mitochondriale Funktion im Hinblick auf Erkrankungen, wie der Leberzirrhose (Ma et al., 2020) und der CED (Jackson & Theiss, 2020) zu untersuchen.

2 Fragestellung der Arbeit

Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Inwieweit beeinflusst Midazolam die mitochondriale Funktion in Colon- und Leberzellhomogenaten von gesunden Ratten?
2. Ist die Wirkung des Benzodiazepins konzentrationsabhängig?

3 Laborexperimenteller Versuchsteil

3.1 Materialien und Geräte

Im Anhang befinden sich alle Angaben zu den verwendeten Materialien und Geräten (siehe S.34).

3.2 Chemikalien

Im Anhang befinden sich alle Angaben zu den verwendeten Chemikalien sowie Reagenzien und Pufferlösungen (siehe S.35 - 39)

3.3 Herstellung der Gewebehomogenate für Colon und Leber

Die Organe stammten von gesunden, männlichen Wistar-Ratten (230 – 290 g). Da es sich dabei lediglich um eine Organentnahme (internes AZ: O27/12) handelte, wurde keine Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz benötigt. Die entnommenen Organe wurden jeweils in eine vorbereitete Isolationspufferlösung (siehe Anhang S.37) auf Eis gekühlt gegeben und anschließend abgewogen.

Zur Herstellung der Lebersuspension wurde ca. 1 g Lebergewebe in 2-3 mm³ große Teile zerkleinert, der Isolationspuffer wurde vorsichtig abgekippt und unter Zugabe von 10 ml neuer Isolationspufferlösung wurde eine Verdünnung von 1:10 erreicht. Die Lebersuspension wurde zugedeckt mit Alufolie erneut auf Eis gekühlt.

Das Colon wurde von Kot und Fettgewebsresten befreit, längs aufgeschnitten und danach wurde die Mukosa mit einer Kompresse vorsichtig abgerieben. Dann erfolgte die Inkubation mit *Trypsin*-EDTA (0,05 %) für 5 Minuten (min) zur Lockerung der Zellverbände. Die Menge des *Trypsin*-EDTA in ml errechnete sich aus dem jeweils abgewogenen Gewicht für das Colon ($\text{Trypsin-EDTA in ml} = \text{Darmgewicht in g} \times 2$). Anschließend wurde das Gewebe in eine Isolationspufferlösung (siehe Anhang S.37) gegeben, die zusätzlich 20 mg/ml bovines Serumalbumin (Puffermenge in ml = Darmgewicht in g \times 4) und den Proteaseinhibitor *cOmplete*[™] ($\text{cOmplete}^{\text{™}} \text{ in ml} = \text{Puffermenge in ml}/100$) enthielt. Auch hier wurde das Gewebe in 2-3 mm³ große Teile zerkleinert und dann direkt abgedeckt auf Eis gekühlt.

Die Leber- und Colonsuspension wurden jeweils in einen auf Eis gekühlten S-Behälter gefüllt und nach dem Potter-Elvehjem-Verfahren bei 2000 *revolutions per minute* (rpm) mittels Homogenisierungsstab 4x (Leber) bzw. 6x (Colon) homogenisiert. Die Homogenate wurden in je ein 50ml-Falcon filtriert und wieder auf Eis gestellt.

3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Gewebehomogenaten erfolgte anhand der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951). Zur Standardisierung der Messungen diente *Bovine Serum Albumin* (BSA), zur Verdünnung wurde *Aqua dest.* (destilliertes Wasser) verwendet. Die Standardverdünnungsreihe ist in Tabelle 1: Standardverdünnungsreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung abgebildet.

Tabelle 1: Standardverdünnungsreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung

	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	BSA 1000 $\mu\text{g/ml}$ (μl)	<i>Aqua dest.</i> (μl)
K0	0	0	500
K1	62,4	31,2	468,7
K2	125	62,5	437,5
K3	250	125	375
K4	500	250	250
K5	750	375	125
K6	1000	500	0

$\mu\text{g/ml}$ = Mikrogramm/Milliliter, μl = Mikroliter

Zunächst wurde das jeweilige Homogenat per Dreifachbestimmung im Verhältnis 1:100 mit *Aqua dest.* verdünnt. Dann wurden jeweils 100 μl der Probenverdünnung sowie 100 μl der Standardreihe zu je 500 μl der vorbereiteten Lösung 1 (siehe Anhang S.38) gegeben, gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 50 μl der Lösung 2 (siehe Anhang S.38) in die Reaktionsgefäße, wurden die Gemische erneut gevortext. Es folgte eine 30-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Anschließend wurden per Doppelbestimmung je 200 μl /Well von der Standardreihe und der Proben in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert, um dann die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 750 nm durchführen zu können. Die nachfolgende Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels der Software *SynergyTM 2 Multi-Mode Microplate Reader* mit dem Programm Gen51.11. Aus je drei Replikaten der Proben für die Leber als auch für das Colon wurde anhand der Ergebnisse ein Mittelwert berechnet.

3.5 Bestimmung der mitochondrialen Funktion mittels Respirometrie

Die mitochondriale Funktion im Colon und in der Leber wurde per Respirometrie, d.h. der Messung des Sauerstoffverbrauchs bzw. der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs (Respirationsrate) der mitochondrialen Atmungskette, bestimmt. Die kontinuierliche Messung erfolgte, nach Kalibrierung der Clark-Elektrode, welche sich in einer wasserummantelten Kammer befand (0,5 ml), mit *Aqua dest.* als Positivkontrolle und Natriumsulfatlösung als Negativkontrolle durch das Respirometriesystem der Firma Strathkelvin Instruments (Strathkelvin 782 System). Die Sauerstofflöslichkeit betrug 223 $\mu\text{mol O}_2/\text{l}$ bei 30° Celsius (Herstellerangaben). Anschließend wurden die von der Clark-Elektrode gemessenen Sauerstoffkonzentrationswerte an das Computerprogramm weitergeleitet und graphisch aufgezeichnet. Die Respirationsraten wurden in $\text{nmol O}_2/\text{min}/\text{mg}$ Protein angegeben.

Zunächst wurde das jeweilige Gewebehomogenat zu einer Respirationspufferlösung (s. Anhang S.38) gegeben, sodass eine Proteinkonzentration von 4 mg/ml (Leber) bzw. 6 mg/ml (Colon) erreicht werden konnte. Der Respirationspuffer für das Colonomogenat enthielt zusätzlich 20 mg/ml bovines Serumalbumin. Nach Zugabe von Midazolam und 3-minütiger Inkubationszeit, wurde die Probe aus Homogenat, Respirationspufferlösung und Midazolam in die Messkammer pipettiert. Hierbei wurden mehrere Versuchsreihen, unter Zugabe von je unterschiedlichen Konzentrationen Midazolam zu den Leber- bzw. Colonomogenaten, durchgeführt, um den Einfluss des Anästhetikums auf die mitochondriale Funktion zu erfassen (siehe Tabelle 2: Konzentrationsreihen für die Versuchsreihen Leber und Colon). Zur Kontrolle wurde bei gleichen Bedingungen Natriumchlorid (NaCl) verwendet.

Tabelle 2: Konzentrationsreihen für die Versuchsreihen Leber und Colon

Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ (μM)	n
0,25	6
5	6
50	6
100	6
500	6

$\mu\text{mol/l}$ = Mikromol/Liter, n = Anzahl der biologischen Replikate

Im Rahmen der Messungen wurden dann die basale Geschwindigkeit der Atmungskette (State 2), die Geschwindigkeit des maximalen Sauerstoffverbrauchs (State 3) und die Respirationsrate nach Verbrauch von ADP (State 4) gemessen.

Zunächst wurde nach einer Minute Substrat für Komplex I (2,5 mM Glutamat und 2,5 mM Malat) oder Substrat für Komplex II (Colon: 5 mM bzw. Leber: 10 mM Succinat) der Atmungskette in die Messkammer gespritzt. Zu den Messungen, die mit dem Substrat Succinat durchgeführt worden sind, wurde zusätzlich Rotenon (0,5 μM), als Hemmstoff für den Enzymkomplex I gespritzt. Auf diese Weise wurde die basale Geschwindigkeit (State 2: Substrat abhängige Respiration) gemessen. Im Zuge der Oxidation von Glutamat zu α -Ketoglutarat durch das mitochondriale Enzym Glutamat-Dehydrogenase wird NAD^+ zu NADH reduziert. Dementsprechend wird Malat durch die Malat-Dehydrogenase zu Oxalacetat oxidiert, wobei ebenfalls durch Reduktion von NAD^+ NADH entsteht. Die Oxidation von Succinat zu Fumarat durch die Succinat-Dehydrogenase liefert dann durch Reduktion von FAD zu FADH_2 , wie auch das reduzierte Coenzym NADH, Elektronen für die Atmungskette.

Nach zwei Minuten wurden durch Zugabe von ADP (Colon: 105 μM bzw. Leber: 210 μM) in die Messkammer dann die maximale mitochondriale Respirationsrate (State 3: ADP abhängige Respiration) sowie der ADP-abhängige Sauerstoffverbrauch (ΔO) gemessen. Das ADP wird durch die ATP-Synthase zu ATP, dem Hauptenergiespeicher der Zelle, umgewandelt. Hierbei findet die Kopplung der exogenen mitochondrialen Atmung an die endogene OXPHOS statt. Der aufgebaute Protonengradient liefert Energie für die OXPHOS durch die ATP-Synthase. Im State 4 nimmt die mitochondriale Atmung durch die Umwandlung von ADP in ATP wieder ab. Nach Erreichen des State 4, dem Verbrauch des hinzugegebenen ADP, wurden die Messungen beendet (siehe Abb. 1: Respirometrie - Sauerstoffverbrauch während der OXPHOS).

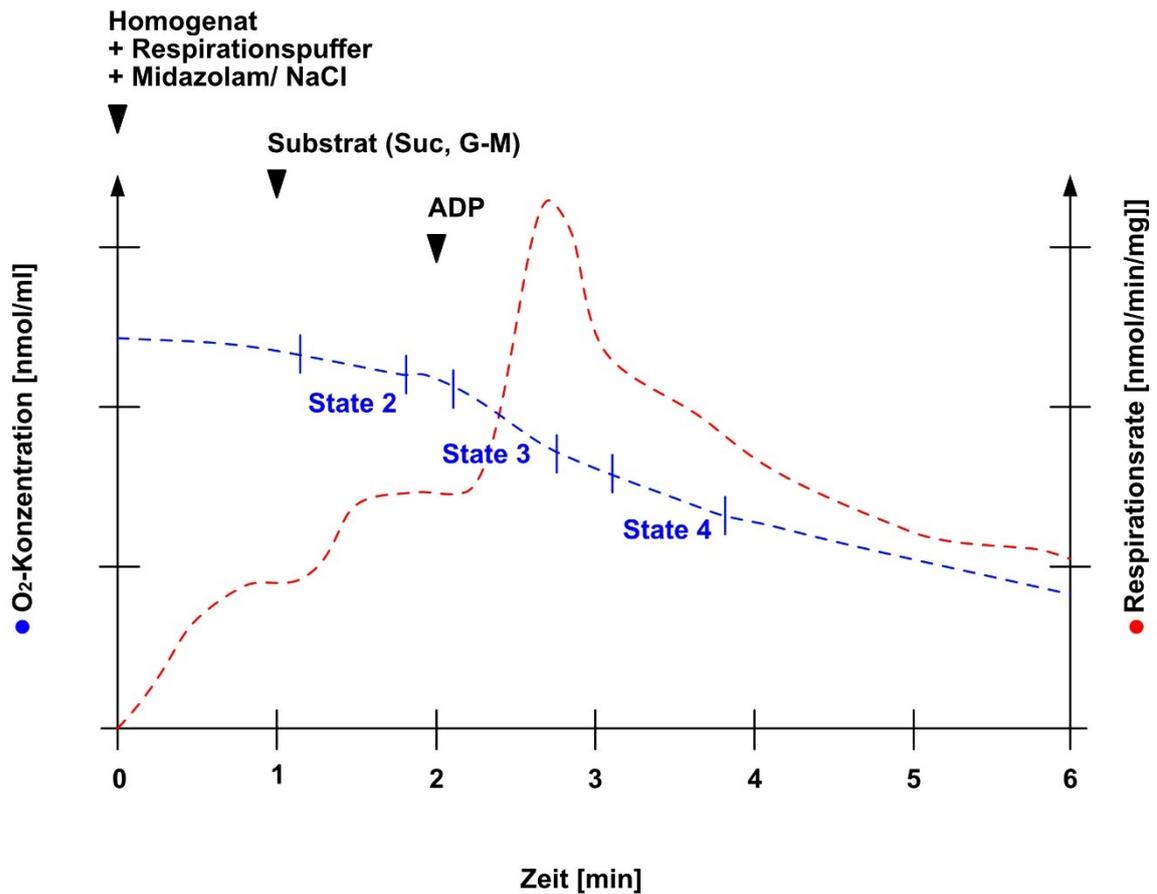


Abb. 1: Respirometrie - Sauerverbrauch während der OXPHOS

State 2: basale Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von Substrat (Komplex I: Glutamat-Malat (G-M), Komplex II: Succinat (Suc)), State 3: Geschwindigkeit des maximalen Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von ADP, State 4: Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach ADP-Verbrauch. O₂-Konzentration [nmol/ml] = Nanomol/Milliliter, Respirationsrate [nmol/min/mg] = Nanomol/Minute/Milligramm, Zeit [min] = Minute. Modifiziert nach (Papenbrock, 2019).

Anhand der Ergebnisse wurde abschließend der *respiratory control index* (RCI) als Maß für die Kopplung der mitochondrialen Atmungskette an die OXPHOS bestimmt. Der RCI berechnete sich aus dem Verhältnis von State 3 zu State 2. Je höher der RCI, desto stärker ist die Kopplung zwischen Substratoxidation und ATP-Synthese. Zudem ergab sich die Effizienz der ATP-Synthese und damit der gesamten OXPHOS schließlich aus dem Quotienten von zugegebenem ADP und dem Sauerstoffverbrauch während des States 3 (ADP/O-Ratio).

Es wurden Qualitätskontrollen mit Cytochrom C, Oligomycin und Carbonylcyanide 3-chloro-phenylhydrazon (CCCP) jeweils einmal pro Homogenat mit jeweils Glutamat/Malat bzw. Succinat als Substrat durchgeführt. Um mögliche Beschädigungen der mitochondrialen Membran im Zuge der Homogenisierung ausschließen zu können, wurde nach Zugabe von

ADP (siehe oben), d.h. im State 3 der Respiration, Cytochrom C (2,5 μM) in die Messkammer gespritzt. Im Falle eines Verlustes der Integrität der äußeren mitochondrialen Membran kommt es durch die externe Zugabe von Cytochrom C zu einem Anstieg der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit. Nach fehlender Reaktion auf Cytochrom C wurde die ATP-Synthese durch Oligomycin (0,05 $\mu\text{g/ml}$) gehemmt. Das Makrolid-Antibiotikum bindet an die F_0 -Untereinheit der ATP-Synthase und blockiert den Protonenrückstrom aus dem IMR in die Mitochondrienmatrix. Die Atmungskette wird in den State 2 zurückversetzt, da der Elektronentransport über die mitochondriale Membran dann lediglich der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials dient. Im Falle eines gestörten Membranpotentials wird über die Atmungskette versucht dem Protonenleck und damit einem unkontrolliertem Protonenfluss über die mitochondriale Membran entgegenzusteuern. Es zeigt sich dann kein Abfall der Atmungskettenaktivität bzw. des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs. Um zu überprüfen, ob die Atmungskette von der OXPHOS entkoppelt werden kann, wurde dem Leberhomogenat zusätzlich CCCP (3 x 0,5 μM) fraktioniert hinzugeführt. CCCP bewirkt als Protonentransporter den Rücktransport der im IMR akkumulierten Protonen über die innere mitochondriale Membran in die Mitochondrienmatrix. Es kommt zur Entkopplung der Atmungskette von der OXPHOS. Die Atmungskette wird maximal induziert mit dem Ziel das Membranpotential aufrecht zu erhalten. Durch die Zugabe von Antimycin A (2,5 μM) wird der Enzymkomplex III (Cytochrom-C-Reduktase) gehemmt. Hierbei wird die Atmungskette vollständig blockiert, sodass die nicht mitochondriale Atmung, bspw. durch sich in der Messkammer befindende Bakterien, gemessen werden kann. Die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit fällt auf ein Minimum ab und die Messung der Qualitätskontrollen wurde beendet.

3.6 Statistik

Die abschließende statistische Auswertung der Versuchsreihe erfolgte mittels *GraphPad Prism*® 8. Anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft. Da die generierten Daten nicht normalverteilt waren, wurden Kruskal-Wallis-Tests mit Dunn's Post-hoc Tests für multiples Testen angewandt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ gewählt.

4 Ergebnisse

4.1 Effekte von Midazolam auf die mitochondriale Funktion im Colon

Um einen möglichen Einfluss von Midazolam auf die mitochondriale Funktion im Colon zu untersuchen, wurden Colonzellhomogenate für drei Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen Midazolam (0,25 μM ; 5 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 500 μM) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kontrollen wurden bei gleichen Bedingungen mit NaCl anstatt Midazolam durchgeführt.

Die State 3 Respiration zeigte sowohl für Komplex I als auch für Komplex II keine statistisch signifikanten Unterschiede unter dem Einfluss von Midazolam im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Auch der RCI, sowie die ADP/O-Ratio blieben für jede Medikamentenkonzentration unverändert gegenüber der Kontrolle (siehe Abb. 2: Komplex I (A – C), Komplex II (D – F)).

Allerdings konnten zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen von Midazolam signifikante Veränderungen der mitochondrialen Funktion nachgewiesen werden.

In Komplex I-stimulierten Colonzellhomogenaten zeigte sich eine Erhöhung der ADP/O-Ratio im Vergleich von 0,25 μM zu 50 μM Midazolam (siehe Abb. 2 (C): 0,25 μM : Median 88,5 %, *interquartile range* (IQR) 73,64 % bis 103,5 %; 50 μM : Median 146,8%, IQR 120,7 % bis 153,3 %).

Der RCI war reduziert zwischen den Konzentrationen von 50 μM und 500 μM Midazolam für Komplex II (siehe Abb. 2 (E): 50 μM : Median 112 %, IQR 99,95 % bis 116 %; 500 μM : Median 89,95 %, ICR 86,54 % bis 95,5 %).

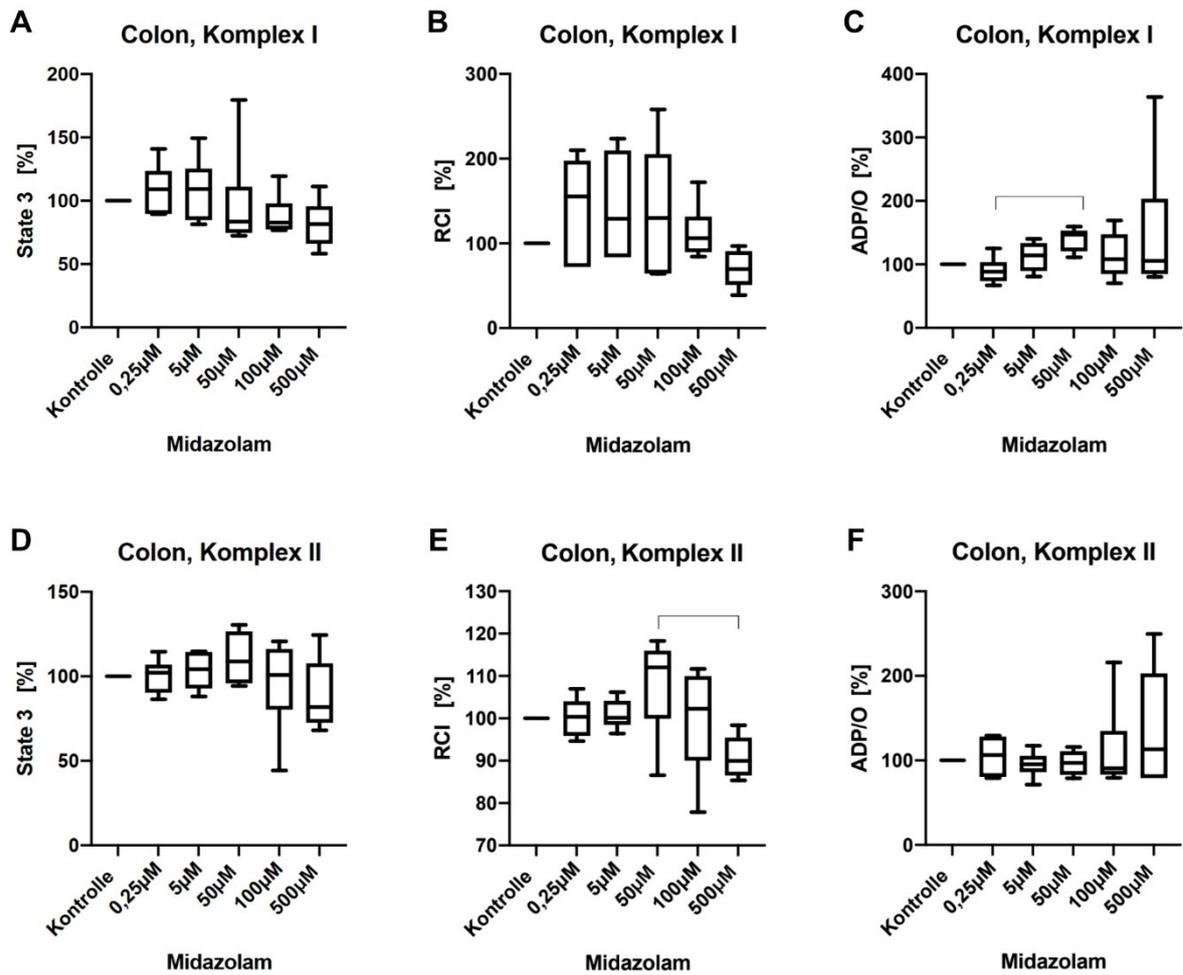


Abb. 2: Effekte von Midazolam *in vitro* auf die mitochondriale Funktion in Colonzellen

State 3 für Komplex I (A) und II (D), RCI für Komplex I (B) und II (E) und ADP/O-Ratio für Komplex I (C) und II (F). Die Daten sind als Prozentsatz der Kontrollen (Median; IQR) nach dreiminütiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Midazolam angezeigt, *p < 0,05 vs. Kontrolle, \square p < 0,05 zwischen den Gruppen, n = 6, µM = Mikromol.

4.2 Effekte von Midazolam auf die mitochondriale Funktion in der Leber

Die Leberzellhomogenate wurden ebenfalls für drei Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen Midazolam (0,25 μM ; 5 μM ; 50 μM ; 100 μM ; 500 μM) bei Raumtemperatur inkubiert, um zu erfassen, ob das Medikament die mitochondriale Funktion in der Leber beeinflusst. Zur Kontrolle wurde bei gleichen Bedingungen NaCl anstatt Midazolam eingesetzt.

In Komplex I-stimulierten Leberzellhomogenaten konnte im Vergleich zu den Kontrollgruppen für alle Konzentrationen sowohl für die State 3 Respiration als auch für den RCI und die ADP/O-Ratio kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (siehe Abb. 3 (A – C)).

Parallel zu den Ergebnissen im Colon konnte aber auch hier ein Unterschied zwischen den verschiedenen Midazolamkonzentrationen nachgewiesen werden. So fiel der RCI für Komplex I bei 500 μM im Vergleich zu 5 μM ab (siehe Abb. 3 (B): 5 μM : Median 104,4 %, ICR 91,1 % bis 114,1 %; 500 μM : Median 55,04 %, ICR 44,99 % bis 91,96 %).

In Komplex II-stimulierten Leberzellhomogenaten konnte nachgewiesen werden, dass Midazolam die mitochondriale Respiration *in vitro* beeinflusst (siehe Abb. 3 (D – G)).

Die State 3 Respiration wurde bei einer Konzentration von 500 μM Midazolam statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert (siehe Abb. 3 (E): Kontrolle 100%; 500 μM : Median 60,53 %, IQR 54,66 % bis 63,15 %). Auch zwischen den einzelnen Medikamentenkonzentrationen konnten Unterschiede festgemacht werden. Es kam sowohl zwischen den Konzentrationen 0,25 μM und 500 μM (siehe Abb. 3 (E): 0,25 μM : Median 101,8 %, IQR 91,21 % bis 123,3 %; 500 μM : Median 60,53 %, IQR 54,66 % bis 63,15 %), als auch für 5 μM und 500 μM Midazolam zur Verminderung der State 3 Respiration (siehe Abb. 3 (E): 5 μM : Median 97,56 %, IQR 93,69 % bis 101,1 %; 500 μM : Median 60,53 %, IQR 54,66 % bis 63,15 %).

Die State 2 Respiration erhöhte sich zwischen den Konzentrationen 0,25 μM und 500 μM (siehe Abb. 3 (D): 0,25 μM : Median 97,42 %, IQR 93,08 % bis 102,2 %; 500 μM : Median 120,8 %, IQR 110,7 % bis 132%), sowie zwischen 5 μM und 500 μM des verwendeten Anästhetikums (siehe Abb. 3 (D): 5 μM : Median 99,01 %, IQR 95,67 % bis 101,2 %; 500 μM : Median 120,8 %, IQR 110,7 % bis 132%).

Durch die Zugabe von Midazolam kam es ebenfalls zu einer statistisch signifikanten Abnahme des RCI im Vergleich zur Kontrollgruppe für eine Konzentration von 500 μM (siehe Abb. 3 (F): Kontrolle: 100%; 500 μM : Median 50,16 %, IQR 41,9 % bis 54,75 %). Ebenfalls zeigte sich eine Verminderung des RCI zwischen den Medikamentenkonzentrationen von 0,25 μM und 500 μM (siehe Abb. 3 (F): 0,25 μM : Median 107,9 %, IQR 93,26 % bis 120,4 %; 500 μM : Median 50,16 %, IQR 41,9 % bis 54,75 %),

sowie von 5 μM und 500 μM (siehe Abb. 3 (F): 5 μM : Median 100,2 %, IQR 97,19 % bis 100,6 %; 500 μM : Median 50,16 %, IQR 41,9 % bis 54,75 %).

Die Effizienz der OXPHOS (ADP/O-Ratio) wurde unter keiner der verwendeten Medikamentenkonzentrationen signifikant beeinflusst (siehe Abb. 3 (G)).

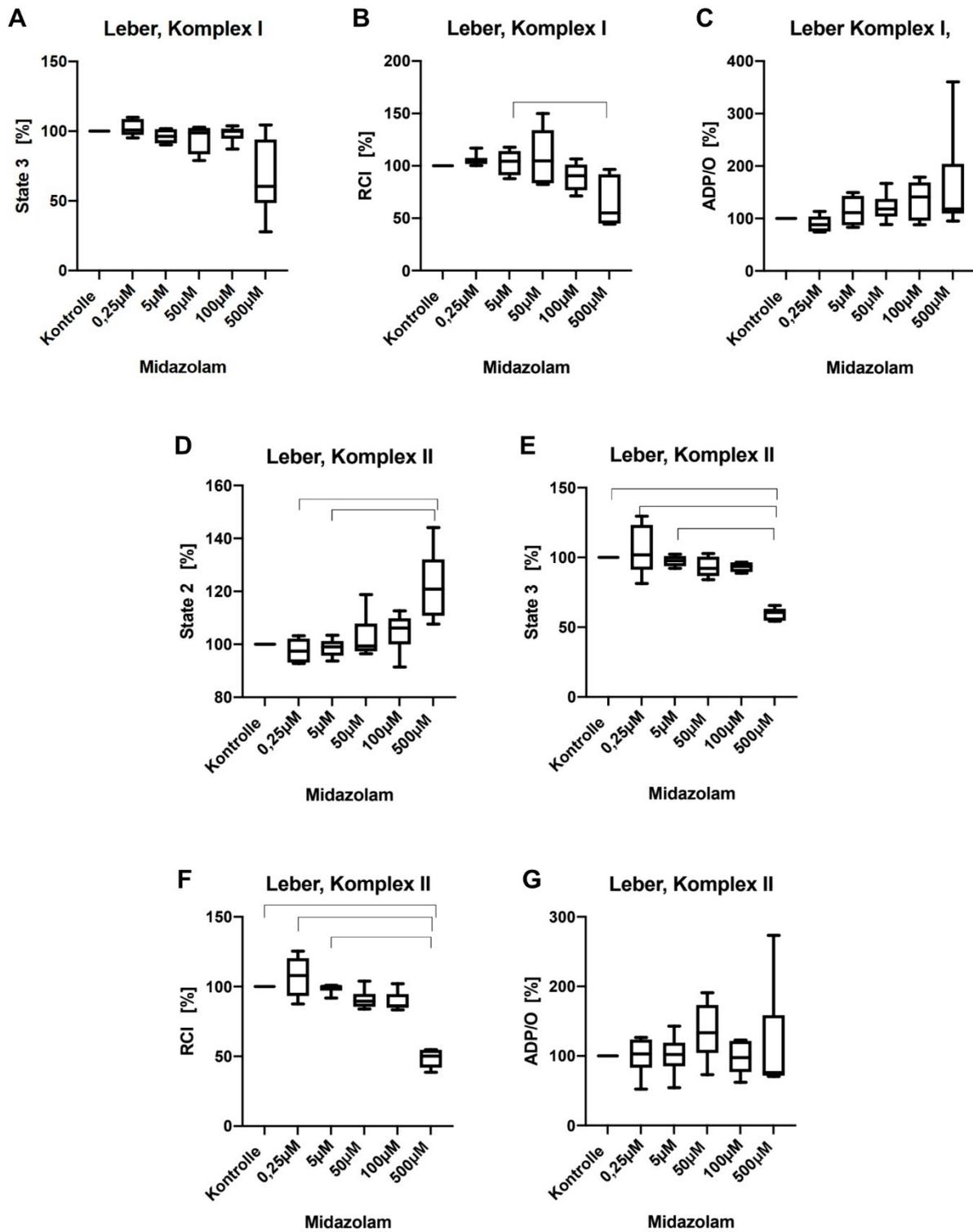


Abb. 3: Effekte von Midazolam *in vitro* auf die mitochondriale Funktion in Leberzellen

State 3 für Komplex I (A) und II (E), State 2 für Komplex II (D), RCI für Komplex I (B) und II (F) und ADP/O-Ratio für Komplex I (C) und II (G). Die Daten sind als Prozentsatz der Kontrollen (Median; ICR) nach dreiminütiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Midazolam angezeigt, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, \square $p < 0,05$ zwischen den Gruppen, $n = 6$, $\mu\text{M} = \text{Mikromol}$.

5 Diskussion

5.1 Ergebnisdiskussion

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde das Ziel gesetzt den konzentrationsabhängigen Einfluss von Midazolam auf die mitochondriale Funktion in Colon- und Leberzellhomogenaten von gesunden Ratten zu erfassen.

Aus den eingangs gestellten Fragen ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

1. Der Einfluss von Midazolam auf die mitochondriale Funktion in Colon- und Leberzellhomogenaten *in vitro* ist organspezifisch. In den Colonzellhomogenaten konnte durch die Zugabe von Midazolam im Vergleich zu den Kontrollgruppen kein Effekt auf die mitochondriale Respiration und dementsprechend auf die mitochondriale Funktion gezeigt werden. In der Leber führte Midazolam, verglichen mit den Kontrollen, zu einer Reduktion der State 3 Respiration und des RCI bei unveränderter State 2 Respiration. Die Abnahme des RCI wird nicht als entkoppelnder Effekt bewertet. Die ADP/O-Ratio blieb unter den verwendeten Medikamentenkonzentrationen unverändert.
2. Die Wirkung von Midazolam auf Leberzellhomogenate ist konzentrations- und komplexabhängig.

Die Ergebnisse für das Colon zeigten für beide Komplexe und jede Medikamentenkonzentration keine Veränderungen des RCI und der ADP/O-Ratio im Vergleich zu den Kontrollgruppen (siehe Abb. 2: Komplex I (A – C), Komplex II (D – F)). Es konnten lediglich statistisch signifikante Veränderungen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen von Midazolam für beide Komplexe festgestellt werden (siehe Abb. 2: Komplex I (C), Komplex II (E)), welche biologisch als nicht relevant gewertet werden, da diese signifikanten Unterschiede ausschließlich zwischen den einzelnen Midazolamkonzentrationen und nicht im Vergleich zu den Kontrollen mit NaCl festgemacht werden konnten. Es lässt sich vermuten, dass die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den einzelnen Medikamentenkonzentrationen von pharmakokinetischer Relevanz sein könnten, indem niedrigere Midazolamkonzentrationen eine andere Wirkung aufweisen als die Höheren. Am Beispiel des RCI für Komplex II zeigte sich eine Reduktion zwischen den Konzentrationen von 50 μM auf 500 μM (siehe Abb. 2 (E)). Es ist spekulativ, ob die unterschiedlichen Wirkungen je nach Konzentration nicht groß genug waren, sodass lediglich Veränderungen zwischen den einzelnen Medikamentenkonzentrationen festgemacht werden konnten, nicht jedoch im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Um dies herauszufinden, müssten weitere Versuche erfolgen. Aus unseren Ergebnissen ergibt sich,

dass die mitochondriale Funktion in Colonzellhomogenaten von gesunden Ratten durch die Zugabe von Midazolam allem Anschein nach nicht beeinflusst werden kann. Nach unserem aktuellen Wissensstand liegen bisher keine vergleichbaren Studien vor, die den Einfluss von Midazolam auf die mitochondriale Funktion in Colonzellen untersucht haben.

In einer ähnlichen Versuchsreihe konnten Herminghaus et al. einen positiven Effekt des Anästhetikums Propofol auf die mitochondriale Funktion in Colonzellhomogenaten von gesunden Ratten nachweisen. Der Einfluss von Propofol, gelöst in einer Lipidlösung (*medium chain triglycerides* – MCT) oder in Dimethylsulfoxid (DMSO), führte zu einer Steigerung des RCI (Propofol/MCT) und zu einer erhöhten Effektivität der OXPHOS (Propofol/DMSO) (Herminghaus et al., 2019a). Auch unter dem Einfluss von Indomethacin, einer lipophilen schwachen Säure, konnte die Effektivität der ATP-Synthese durch die Steigerung der ADP/O-Ratio in intestinalen Mitochondrien erhöht werden (Herminghaus et al., 2020). In den eigenen Experimenten induzierte Midazolam keine verbesserte Kopplung der Atmungskette an die OXPHOS, aber auch keinen entkoppelnden Effekt mit Verlust der Integrität der Darmbarriere. Eine funktionierende mukosale Barriere bietet Schutz vor der Translokation von Bakterien und der Entstehung einer Sepsis. Jedoch kann es neben der Entkopplung auch durch Hypoperfusion, Infektionen und Toxine zu einer Zerstörung der intestinalen Darmbarriere mit Gefahr der Translokation von Bakterien und der Entstehung einer Sepsis kommen (Herminghaus et al., 2019a; Bischoff et al., 2014; Saxena et al., 2017).

Die Anzahl an Mitochondrien differiert zwischen Organen und deren Funktion. Somit weisen die Organe mit einer höheren metabolischen Aktivität, wie Herz, Gehirn, Leber, und Skelettmuskulatur mehr Mitochondrien auf (La Monaca & Fodale, 2012). Die metabolische Aktivität des Colons ist im Verhältnis geringer und dementsprechend auch die Mitochondrienzahl. Dies könnte erklären, warum in dieser Arbeit kein Effekt des Medikaments Midazolam auf die Mitochondrienfunktion im Colon nachgewiesen werden konnte.

Im Hinblick auf die Entstehung von CED durch dysfunktionale Mitochondrien lässt sich durch den fehlenden Einfluss von Midazolam auf die mitochondriale Funktion in unserer Versuchsreihe keine Aussage zum Einfluss von Midazolam auf die intestinale Mitochondrienfunktion treffen (Jackson & Theiss, 2020; Próchnicki & Latz, 2017). Allerdings werden GABAergen Medikamenten, wie Propofol und Midazolam, immunmodulierende Effekte, unter anderem durch Suppression der T-Zell Proliferation, zugeschrieben (Park et al., 2020; Prud'homme et al., 2015; Yuki et al., 2011). Ziel der zukünftigen Forschung könnte es sein den genauen Effekt von GABAergen Medikamenten auf die Immunbiologie zu erfassen und ggf. neue Therapieansätze in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen, wie des Diabetes mellitus Typ 1, zu finden (Prud'homme et al.,

2015). Es lässt sich mutmaßen, ob dies auch ein Ansatz in der Behandlung von CED darstellen könnte.

Die Ergebnisse für die Leber ergaben in der vorliegenden Arbeit in Komplex I-stimulierten Leberzellhomogenaten im Vergleich zu den Kontrollgruppen ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede für alle Medikamentenkonzentrationen (siehe Abb. 3 (A – C)). Es zeigten sich lediglich Veränderungen zwischen den Medikamentengruppen für den RCI (siehe Abb. 3 (B)). In Komplex II-stimulierten Leberzellhomogenaten und bei einer Konzentration von 500 μM Midazolam ließen sich eine Reduktion der State 3 Respiration (siehe Abb. 3 (E)) und des RCI (siehe Abb. 3 (F)) nachweisen. Auch hier konnten zusätzlich Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Medikamentenkonzentrationen für die State 2 (siehe Abb. 3 (D)) und State 3 Respiration (siehe Abb. 3 (E)), sowie für den RCI (siehe Abb. 3 (F)) festgehalten werden. Die Effizienz der OXPHOS blieb jedoch unberührt (siehe Abb. 3 (G)). Der Abfall des RCI unter Einfluss von 500 μM Midazolam wird bei unveränderter State 2 Respiration und statistisch signifikanter Senkung der State 3 Respiration, beides im Vergleich zur Kontrolle von 100%, nicht als Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette von der ATP-Synthese gewertet, da es im Rahmen einer Entkopplung zudem zu einem Anstieg der State 4 Respiration und des Sauerstoffverbrauchs kommen würde, was hier nicht der Fall war.

Diese Ergebnisse stimmen teilweise überein mit den Erkenntnissen aus der Versuchsreihe von Colleoni et al, in welcher *in vitro* der konzentrationsabhängige Einfluss von Midazolam (100-750 μM) auf die mitochondriale Elektronentransportkette in Leber- und Skelettmuskelzellen von gesunden Ratten untersucht wurde. Als Substrate für die Atmungskette wurden ebenfalls Glutamat (10 mM) und Succinat (10 mM), sowie zusätzlich Durohydrochinon (5 mM) und Ascorbat plus Tetramethyl-p-Phenylendiamin (5 mM + 0,5 mM) verwendet. Colleoni et al. beschreiben zugleich eine konzentrationsabhängige Verminderung der State 3 Respiration. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stehen in seiner Studie die Reduktion der ADP/O-Ratio, sowie eine Stimulation der State 4 Respiration. Der Effekt von Midazolam auf die mitochondriale Elektronentransportkette in Leber- und Skelettmuskelzellen wird dadurch von Colleoni et al. als inhibierend und entkoppelnd bewertet (Colleoni et al., 1996). Die unterschiedlichen Ergebnisse, im Vergleich unserer Arbeit mit der Studie von Colleoni et al., könnten erklärt werden durch Abweichungen in den Medikamenten- und Substratkonzentrationen und den Inkubationszeiten. In der Versuchsreihe von Colleoni et al. wurden höhere Konzentrationen des Medikaments Midazolam (100-750 μM) und des Substrats Glutamat (10 mM) verwendet; die Konzentration von Succinat (10 mM) stimmt mit unserer verwendeten Konzentration überein. Die Ergebnisse zeigen in beiden Versuchsreihen unter Verwendung

des Substrats Succinat (10 mM) eine Verminderung in der State 3 Respiration. Zudem betrug die Zeitspanne bis zur Injektion von ADP in die Messkammer bei Colleoni et al. 2 min statt 1 min in unserer Arbeit. Die inhibierenden Effekte von Midazolam auf die mitochondriale Funktion betreffen bei Colleoni et al. vor allem die Komplexe I und III, weniger den Komplex II, was gegebenenfalls für Komplex I durch die höher verwendete Substratkonzentration (Glutamat 10 mM) im Vergleich zu unserer Arbeit (Glutamat 2,5 mM) gedeutet werden kann.

Es ist bekannt, dass viele Medikamente einen inhibierenden Einfluss auf die hepatische Mitochondrienfunktion haben. Ähnlich aufgebaute Versuchsreihen unter dem Einfluss von Propofol (Herminghaus et al., 2019a), Pravastatin und Gemfibrozil (Herminghaus et al., 2019b) oder Indomethacin (Herminghaus et al., 2020) weisen ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die mitochondriale Funktion in Leberzellhomogenaten nach. Indomethacin, als lipidlösliche, leichte Säure, wirkt entkoppelnd auf die mitochondriale Atmungskette in hepatischen Zellen. Wie bereits oben beschrieben, induziert das nichtsteroidale Antiphlogistikum (NSAID) den Rücktransport von Protonen aus dem Intermembranraum zurück in die Mitochondrienmatrix, schwächt den Protonengradienten für die mitochondriale Atmungskette ab und führt letztendlich zu einer Entkopplung der Atmungskette von der OXPHOS (Herminghaus et al., 2020). Ergänzend weist Propofol stark lipophile Eigenschaften auf und wirkt ebenfalls entkoppelnd auf die hepatische Mitochondrienfunktion durch eine Reduktion des RCI (Herminghaus et al., 2019a). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Midazolam mit seinen lipophilen Eigenschaften weder eine Entkopplung noch eine Reduktion in der Effizienz der ATP-Synthase bewirkt. Dies könnte anhand der sich verändernden chemischen Struktur von Midazolam in Abhängigkeit vom pH-Wert erklärt werden. Im Gegensatz zu Indomethacin und Propofol ist Midazolam hydrophil und wird bei steigendem pH-Wert (größer vier) durch Schluss des Imidazolrings des Benzodiazepins lipophil (Kanto, 1985; Wang et al., 2020). Obwohl der pH-Wert für den Isolationspuffer (siehe Anhang S.37) auf 7,15, der für den Respirationspuffer (siehe Anhang S. 38) auf 7,5 titriert wurde, kann gemutmaßt werden, dass die lipophilen Eigenschaften von Midazolam in unserer Versuchsreihe weniger ausgeprägt waren als diese von Indomethacin und Propofol. Midazolam könnte deshalb nicht entkoppelnd auf die mitochondriale Atmungskette gewirkt haben.

Die Anwendung von Midazolam betrifft neben dem Operationsbereich auch häufig die Intensivstation, wo Midazolam überwiegend zusammen mit anderen Medikamenten eingesetzt wird. Da das Benzodiazepin über das CYP3A4-Enzymsystem metabolisiert wird und dessen Clearance über weitere Pharmaka beeinflusst werden kann, ist es wichtig auch die Pharmakokinetik von Midazolam zu betrachten. Ob eine mögliche Akkumulation oder die beschleunigte Metabolisierung von Midazolam Einfluss auf die Mitochondrienfunktion

haben könnte, bedarf weiterer Forschung. In einer *in vivo* und *in vitro* Studie wurde herausgestellt, dass Propofol die Clearance von Midazolam, bedingt durch eine Inhibition des hepatischen CYP3A4-Systems, vermindert (Hamaoka et al., 1999). Gegensätzlich führen CYP3A4-Enzyminduktoren zu einer vermehrten Metabolisierung und folglich zu einer Verminderung der Plasmakonzentration von Midazolam (Prommer, 2020). Neben Arzneimitteln können auch Darmmikrobiota die metabolische Aktivität von hepatischen CYP3A4 *in vitro* und *in vivo* verändern (Togao et al., 2020; Collins & Patterson, 2020). Togao et al. zeigten eine reduzierte hepatische CYP3A4-Aktivität und eine Verminderung der Hydroxylase-Aktivität in *germ-free* (GF) Mäusen verglichen mit *specific pathogen-free* (SPF) Mäusen. Darüber hinaus konnte bei GF Mäusen eine vermehrte Akkumulation von Midazolam in Geweben, vor allem dem Gehirn, aber auch der Leber und Niere, nachgewiesen werden (Togao et al., 2020). In unserer Studie kann ausgeschlossen werden, dass die Metabolisierung von Midazolam durch andere interagierende Medikamente im Rahmen einer Enzyminduktion oder -inhibition verändert war. Inwieweit die Darmmikrobiota der Ratten Einfluss auf die Pharmakokinetik von Midazolam in unserer Versuchsreihe genommen haben, lässt sich nicht abschließend klären. Zudem ist unklar, ob eine mögliche Interaktion mit Midazolam dessen Wirkung auf die mitochondriale Funktion beeinflusst haben könnte.

Zur Klärung der Frage, inwieweit die Bindung von Midazolam an peripheren Benzodiazepinrezeptoren die mitochondriale Funktion in der Leber beeinflusst, bedarf es weiterer Untersuchungen unter dem Einsatz eines Inhibitors gegen den TSPO-Rezeptor. In unserer Studie vermindert Midazolam lediglich komplex- und konzentrationsabhängig die Geschwindigkeit des maximalen Sauerstoffverbrauchs (State 3 Respiration), ohne die Effizienz der OXPHOS zu verändern. In Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von Midazolam an peripheren Benzodiazepinrezeptoren eine überschießende Immunantwort im Rahmen eines akuten Leberzellschadens unterdrückt (Li et al., 2019). Der Leberzellschaden wurde durch eine intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden und Galactosaminen induziert. In den mit Midazolam vorbehandelten Tieren konnte eine Reduktion in der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, in der Antigenpräsentation und in der Migration von Makrophagen beobachtet werden. Li et al. schlussfolgern einen protektiven Effekt von Midazolam auf die Leberzellfunktion durch den Eingriff in die Regulation von induzierten Lebermakrophagen (Li et al., 2019). Neben der Beteiligung an einer Immunantwort werden TSPO, als periphere Benzodiazepinrezeptoren, eine zentrale Rolle in zellulären mitochondrialen Prozessen und in der Bioenergetik zugeschrieben (Betlazar et al., 2020). Es erfordert weitere Forschung über die Bedeutung von TSPO in peripheren Geweben, auch im Hinblick auf den Einfluss

auf die mitochondriale Funktion. Inwieweit die Bindung von Midazolam an TSPO die mitochondriale Funktion verändern könnte, ist bisher noch nicht ausreichend erforscht.

5.2 Methodendiskussion

Der hier durchgeführte Versuchsaufbau und -ablauf basierte auf zuvor durchgeführten Studien, welche den Einfluss verschiedener Medikamente auf die mitochondriale Funktion in Leber- und Colonzellhomogenaten untersucht haben (Herminghaus et al., 2019a, 2019b, 2020).

Bei den verwendeten Medikamentenkonzentrationen orientierten wir uns an klinisch relevanten Plasmakonzentrationen, welche je nach Sedierungstiefe zwischen 0,08 (0,25 µM) und 1,2 µg/ml (4 µM) variieren (Colleoni et al., 1996; Bremer et al., 2004; Steiner et al., 2016; Crevat-Pisano et al., 1986), sowie an ähnlich aufgebauten *in vitro* Studien unter Verwendung supraklinischer Konzentrationen von Midazolam (Colleoni et al., 1996; Wang et al., 2018).

Im Gegensatz zur Isolation von Mitochondrien, liefert die in dieser Arbeit verwendete Homogenisierung der Organe zur Untersuchung der Mitochondrienfunktion Vorteile. Die für den Isolationsprozess benötigte Menge an Gewebe reduziert sich im Rahmen der Homogenisierung auf ein Fünftel. Zusätzlich kann der mechanische Isolationsprozess, bedingt durch mehrfache Zentrifugation, im Vorhinein zur Beschädigung der Mitochondrien führen. Dies und die Tatsache, dass bei der Isolation nicht die gesamte Population an Gewebemitochondrien erfasst werden kann, würde eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse nicht ausschließen. Ein Beispiel hierfür wäre, wenn entweder nur zerstörte oder auf der anderen Seite nur intakte Mitochondrien im Isolationsprozess gewonnen werden würden (Pecinová et al., 2011). Aus diesen Gründen haben wir uns für die Homogenisierung der Organe zur Überprüfung der mitochondrialen Funktion entschieden. Alle damit verbundenen Messungen wurden entsprechend bei 30° Celsius durchgeführt, was nicht den physiologischen Bedingungen entspricht. Es handelte sich um *in vitro* Versuche bei gesunden Ratten, weshalb sich unsere Ergebnisse nicht *in vivo* und nicht auf andere Lebewesen übertragen lassen.

5.3 Fazit

Schlussfolgernd lässt sich zusammenfassen, dass das Anästhetikum Midazolam in dieser Arbeit eine organspezifische, konzentrations- und komplexspezifische Wirkung zeigte. Es konnte keine Wirkung von diesem Medikament auf die mitochondriale Respiration in Colonzellhomogenaten von gesunden Ratten nachgewiesen werden. In den Leberzellhomogenaten konnte dagegen eine konzentrations- und komplexabhängige Reduktion der ADP-abhängigen Atmung (State 3), sowie der Kopplung zwischen der Atmungskette und der OXPHOS (RCI) gezeigt werden, ohne die Effizienz der OXPHOS (ADP/O-Ratio) zu beeinflussen. Dass der Effekt von Midazolam auf die mitochondriale Funktion in der Leber beschränkt war, lässt sich vermutlich anhand der hohen Mitochondrienzahl in diesem metabolisch aktivem Organ, verglichen mit dem metabolisch weniger aktivem Colon, erklären (La Monaca & Fodale, 2012). Somit scheint Midazolam weder toxische noch protektive Wirkungen auf die mitochondriale Funktion des Colons und der Leber unter den verwendeten Medikamentenkonzentrationen zu haben.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Arulkumaran, N., Deutschman, C.S., Pinsky, M.R., Zuckerbraun, B., Schumacker, P.T., Gomez, H., Gomez, A., Murray, P. & Kellum, J.A. (2016). Mitochondrial Function in Sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*. 45 (3). p.pp. 271–281.
2. Bader, S., Wolf, L., Milenkovic, V.M., Gruber, M., Nothdurfter, C., Rupprecht, R. & Wetzel, C.H. (2019). Differential effects of TSPO ligands on mitochondrial function in mouse microglia cells. *Psychoneuroendocrinology*. 106. p.pp. 65–76.
3. Bauer, C., Duewell, P., Mayer, C., Lehr, H.A., Fitzgerald, K.A., Dauer, M., Tschopp, J., Endres, S., Latz, E. & Schnurr, M. (2010). Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Gut*. 59 (9). p.pp. 1192–1199.
4. Betlazar, C., Middleton, R.J., Banati, R. & Liu, G.-J. (2020). The Translocator Protein (TSPO) in Mitochondrial Bioenergetics and Immune Processes. *Cells*. 9 (2). p.p. 512.
5. Bischoff, S.C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A. & Wells, J.M. (2014). Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*. 14 (1). p.p. 189.
6. Bonsack, F. & Sukumari-Ramesh, S. (2018). TSPO: An Evolutionarily Conserved Protein with Elusive Functions. *International Journal of Molecular Sciences*. 19 (6).
7. Brealey, D., Brand, M., Hargreaves, I., Heales, S., Land, J., Smolenski, R., Davies, N.A., Cooper, C.E. & Singer, M. (2002). Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet*. 360 (9328). p.pp. 219–223.
8. Bremer, F., Reulbach, U., Schwilden, H. & Sch??ttler, J. (2004). Midazolam Therapeutic Drug Monitoring in Intensive Care Sedation: A 5-Year Survey. *Therapeutic Drug Monitoring*. 26 (6). p.pp. 643–649.
9. Colleoni, M., Costa, B., Gori, E. & Santagostino, A. (1996). Biochemical Characterization of the Effects of the Benzodiazepine, Midazolam, on Mitochondrial Electron Transfer. *Pharmacology & Toxicology*. 78 (2). p.pp. 69–76.
10. Collins, S.L. & Patterson, A.D. (2020). The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 10 (1). p.pp. 19–32.
11. Crevat-Pisano, P., Dragna, S., Granthil, C., Coassolo, P., Cano, J.P. & Francois, G. (1986). Plasma concentrations and pharmacokinetics of midazolam during anaesthesia. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 38 (8). p.pp. 578–582.
12. Eccleston, H.B., Andringa, K.K., Betancourt, A.M., King, A.L., Mantena, S.K., Swain, T.M., Tinsley, H.N., Nolte, R.N., Nagy, T.R., Abrams, G.A. & Bailey, S.M. (2010).

- Chronic Exposure to a High-Fat Diet Induces Hepatic Steatosis, Impairs Nitric Oxide Bioavailability, and Modifies the Mitochondrial Proteome in Mice. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15 (2). p.pp. 447–459.
13. Einer, C., Hohenester, S., Wimmer, R., Wottke, L., Artmann, R., Schulz, S., Gosmann, C., Simmons, A., Leitzinger, C., Eberhagen, C., Borchard, S., Schmitt, S., Hauck, S.M., von Toerne, C., Jastroch, M., Walheim, E., Rust, C., Gerbes, A.L., Popper, B., Mayr, D., Schnurr, M., Vollmar, A.M., Denk, G. & Zischka, H. (2018). Mitochondrial adaptation in steatotic mice. *Mitochondrion*. 40. p.pp. 1–12.
 14. Fu, Y., Wang, D., Wang, H., Cai, M., Li, C., Zhang, X., Chen, H., Hu, Y., Zhang, X., Ying, M., He, W. & Zhang, J. (2020). TSPO deficiency induces mitochondrial dysfunction, leading to hypoxia, angiogenesis, and a growth-promoting metabolic shift toward glycolysis in glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 22 (2). p.pp. 240–252.
 15. García-Ruiz, C., Kaplowitz, N. & Fernandez-Checa, J.C. (2013). Role of Mitochondria in Alcoholic Liver Disease. *Current Pathobiology Reports*. 1 (3). p.pp. 159–168.
 16. Guo, R., Gu, J., Zong, S., Wu, M. & Yang, M. (2018). Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomedical Journal*. 41 (1). p.pp. 9–20.
 17. Hamaoka, N., Oda, Y., Hase, I., Mizutani, K., Nakamoto, T., Ishizaki, T. & Asada, A. (1999). Propofol decreases the clearance of midazolam by inhibiting CYP3A4: an in vivo and in vitro study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 66 (2). p.pp. 110–117.
 18. Herminghaus, A., Buitenhuis, A.J., Schulz, J., Truse, R., Vollmer, C., Relja, B., Bauer, I. & Picker, O. (2020). Indomethacin Increases the Efficacy of Oxygen Utilization of Colonic Mitochondria and Uncouples Hepatic Mitochondria in Tissue Homogenates From Healthy Rats. *Frontiers in Medicine*. 7. p.p. 463.
 19. Herminghaus, A., Buitenhuis, A.J., Schulz, J., Vollmer, C., Scheeren, T.W.L., Bauer, I., Picker, O. & Truse, R. (2019a). Propofol improves colonic but impairs hepatic mitochondrial function in tissue homogenates from healthy rats. *European Journal of Pharmacology*. 853. p.pp. 364–370.
 20. Herminghaus, A., Laser, E., Schulz, J., Truse, R., Vollmer, C., Bauer, I. & Picker, O. (2019b). Pravastatin and Gemfibrozil Modulate Differently Hepatic and Colonic Mitochondrial Respiration in Tissue Homogenates from Healthy Rats. *Cells*. 8 (9).
 21. Herminghaus, A., Papenbrock, H., Eberhardt, R., Vollmer, C., Truse, R., Schulz, J., Bauer, I., Weidinger, A., Kozlov, A.V., Stiban, J. & Picker, O. (2019c). Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Medicine Experimental*. 7 (1). p.p. 4.

22. Hirsch, D., Beyer, F. & Blume, J. (1989). *Mitochondrial Benzodiazepine Receptors Mediate Inhibition of Mitochondrial Respiratory Control*. p.p. 7.
23. Ip, W.K.E., Hoshi, N., Shouval, D.S., Snapper, S. & Medzhitov, R. (2017). Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*. 356 (6337). p.pp. 513–519.
24. Jackson, D.N. & Theiss, A.L. (2020). Gut bacteria signaling to mitochondria in intestinal inflammation and cancer. *Gut Microbes*. 11 (3). p.pp. 285–304.
25. Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., Ouari, O., Lopez, M., Joseph, J., Zielonka, J. & Dwinell, M.B. (2018). A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds. *Redox Biology*. 14. p.pp. 316–327.
26. Kanto, J.H. (1985). Midazolam: the first water-soluble benzodiazepine. Pharmacology, pharmacokinetics and efficacy in insomnia and anesthesia. *Pharmacotherapy*. 5 (3). p.pp. 138–155.
27. La Monaca, E. & Fodale, V. (2012). Effects of Anesthetics on Mitochondrial Signaling and Function. *Current Drug Safety*. 7 (2). p.pp. 126–139.
28. Lee, Y., Park, Y., Nam, H., Lee, J.-W. & Yu, S.-W. (2020). Translocator protein (TSPO): the new story of the old protein in neuroinflammation. *BMB reports*. 53 (1). p.pp. 20–27.
29. Lemasters, J.J., Nieminen, A.-L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A. & Herman, B. (1998). The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1366 (1). p.pp. 177–196.
30. Li, J., Tan, H., Zhou, X., Zhang, C., Jin, H., Tian, Y., Zhao, X., Li, X., Sun, X., Duan, M. & Zhang, D. (2019). The Protection of Midazolam Against Immune Mediated Liver Injury Induced by Lipopolysaccharide and Galactosamine in Mice. *Frontiers in Pharmacology*. [Online]. 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6331471/>. [Accessed: 16 June 2021].
31. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193 (1). p.pp. 265–275.
32. Ma, X., McKeen, T., Zhang, J. & Ding, W.-X. (2020). Role and Mechanisms of Mitophagy in Liver Diseases. *Cells*. 9 (4).

33. Mantena, S.K., King, A.L., Andringa, K.K., Eccleston, H.B. & Bailey, S.M. (2008). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 44 (7). p.pp. 1259–1272.
34. Milenkovic, V.M., Slim, D., Bader, S., Koch, V., Heintz, E.-S., Alvarez-Carbonell, D., Nothdurfter, C., Rupprecht, R. & Wetzel, C.H. (2019). CRISPR-Cas9 Mediated TSPO Gene Knockout alters Respiration and Cellular Metabolism in Human Primary Microglia Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (13). p.p. E3359.
35. Nolfi-Donagan, D., Braganza, A. & Shiva, S. (2020). Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*. 37. p.p. 101674.
36. Ostuni, M.A., Marazova, K., Peranzi, G., Vidic, B., Papadopoulos, V., Ducroc, R. & Lacapere, J.-J. (2004). Functional characterization and expression of PBR in rat gastric mucosa: stimulation of chloride secretion by PBR ligands. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 286 (6). p.pp. G1069-1080.
37. Papenbrock, H.H. (2019). *Veränderungen der mitochondrialen Funktion in der Leber im Verlauf einer Sepsis von 96 Stunden*. Dissertation. [Online]. Heinrich-Heine-Universität, Klinik für Anästhesiologie. Available from: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=49857>. [Accessed: 8 November 2022].
38. Park, H.J., Piao, L., Seo, E.-H., Lee, S.H. & Kim, S.-H. (2020). The effect of repetitive exposure to intravenous anesthetic agents on the immunity in mice. *International Journal of Medical Sciences*. 17 (4). p.pp. 428–436.
39. Pecinová, A., Drahoř, Z., Nůsková, H., Pecina, P. & Houšťek, J. (2011). Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion*. 11 (5). p.pp. 722–728.
40. Próchnicki, T. & Latz, E. (2017). Inflammasomes on the Crossroads of Innate Immune Recognition and Metabolic Control. *Cell Metabolism*. 26 (1). p.pp. 71–93.
41. Prommer, E. (2020). Midazolam: an essential palliative care drug. *Palliative Care and Social Practice*. 14. p.p. 2632352419895527.
42. Protasoni, M. & Zeviani, M. (2021). Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (2).
43. Prud'homme, G.J., Glinka, Y. & Wang, Q. (2015). Immunological GABAergic interactions and therapeutic applications in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 14 (11). p.pp. 1048–1056.
44. Ramakrishnan, S.K. & Shah, Y.M. (2016). Role of Intestinal HIF-2 α in Health and Disease. *Annual Review of Physiology*. 78 (1). p.pp. 301–325.

45. Saxena, A., Lopes, F., Poon, K.K.H. & McKay, D.M. (2017). Absence of the NOD2 protein renders epithelia more susceptible to barrier dysfunction due to mitochondrial dysfunction. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 313 (1). p.pp. G26–G38.
46. Siekevitz, P. (1957). Powerhouse of the Cell. *Scientific American*. 197 (1). p.pp. 131–144.
47. Simões, I.C.M., Fontes, A., Pinton, P., Zischka, H. & Wieckowski, M.R. (2018). Mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 95. p.pp. 93–99.
48. Söderholm, J.D., Olaison, G., Peterson, K.H., Franzén, L.E., Lindmark, T., Wirén, M., Tagesson, C. & Sjö Dahl, R. (2002). Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut*. 50 (3). p.pp. 307–313.
49. Steiner, C., Steurer, M.P., Mueller, D., Zueger, M. & Dullenkopf, A. (2016). Midazolam plasma concentration after anesthesia premedication in clinical routine - an observational study. *BMC Anesthesiology*. 16. p.p. 105.
50. Sunny, N.E., Parks, E.J., Browning, J.D. & Burgess, S.C. (2011). Excessive Hepatic Mitochondrial TCA Cycle and Gluconeogenesis in Humans with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metabolism*. 14 (6). p.pp. 804–810.
51. Togao, M., Kawakami, K., Otsuka, J., Wagai, G., Ohta-Takada, Y. & Kado, S. (2020). Effects of gut microbiota on in vivo metabolism and tissue accumulation of cytochrome P450 3A metabolized drug: Midazolam. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 41 (7). p.pp. 275–282.
52. Truse, R., Hinterberg, J., Schulz, J., Herminghaus, A., Weber, A., Mettler-Altman, T., Bauer, I., Picker, O. & Vollmer, C. (2017). Effect of Topical Iloprost and Nitroglycerin on Gastric Microcirculation and Barrier Function during Hemorrhagic Shock in Dogs. *Journal of Vascular Research*. 54 (2). p.pp. 109–121.
53. Vollmer, C., Weber, A.P.M., Wallenfang, M., Hoffmann, T., Mettler-Altman, T., Truse, R., Bauer, I., Picker, O. & Mathes, A.M. (2017). Melatonin pretreatment improves gastric mucosal blood flow and maintains intestinal barrier function during hemorrhagic shock in dogs. *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*. 24 (4).
54. Wang, C., Dato, T., Zhao, H., Wu, L., Date, A., Jiang, C., Sanders, R.D., Wang, G., Bevan, C. & Ma, D. (2018). Midazolam and Dexmedetomidine Affect Neuroglioma and Lung Carcinoma Cell Biology In Vitro and In Vivo. *Anesthesiology*. 129 (5). p.pp. 1000–1014.
55. Wang, J., Sun, P. & Liang, P. (2020). Neuropsychopharmacological effects of midazolam on the human brain. *Brain Informatics*. 7 (1). p.p. 15.

56. Ward, P.S. & Thompson, C.B. (2012). Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 4 (7). p.p. a006783.
57. Yu, L., Lu, M., Jia, D., Ma, J., Ben-Jacob, E., Levine, H., Kaipparettu, B.A. & Onuchic, J.N. (2017). Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. *Cancer Research*. 77 (7). p.pp. 1564–1574.
58. Yuki, K., Soriano, S.G. & Shimaoka, M. (2011). Sedative Drug Modulates T-Cell and Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 Function. *Anesthesia and analgesia*. 112 (4). p.pp. 830–838.

7 Anhang

7.1 Materialien und Geräte

Borosilikatglas	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Badthermostat	Julabo ED, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Badthermostat	Thermomix 1420, B.BRAUN Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland
Eismaschine	Manitowoc Flockeneisbereiter, Manitowoc Ice, Manitowoc, USA
Falcon	Falcon™ 15 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Falcon	Falcon™ 50 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Laborrührwerk	IKA® EUROSTAR 20 digital 2000 rpm, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Injekt Spritze	Exmire Microsyringe MS-R25, Ito Corporation, Fuji, Japan
Mikrotiterplatten	Mikrotestplatte 96-Well F, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	BioTek Synergy 2 mit Software Gen5™ Version 1.11., BioTek, Winooski, USA (Protein- sowie MDA-Konzentrationsbestimmung)
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Einmal-Pipette	Pipette Pasteur 7 ml, VWR International, Darmstadt, Deutschland
Pipette	Pipettensatz Eppendorf Research® 100 µl bis 5000 µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus	Pipetus, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitze	10 µl Tips, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze	200 µl Tips, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze	1000 µl Graduated Tip, Starlabgroup, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitze	0,1-5 ml Eppendorf Tips, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze	10 ml Costar Stripette, Corning Incorporated, New York, USA
Reaktionsgefäß	Micro-Tubes, 1,5 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß	Micro-Tubes 2,0 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Respirometer	MT200 und SI782, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland
Respirometer Software	782 System Version 4.4 HID, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland
Statistiksoftware und graphische Darstellung	GraphPad Prism Version 6.0, GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA
Tiefkühlschrank	Liebherr Comfort, Liebherr, Bulle, Schweiz
Tiefkühlschrank	Sanyo Medicoool, PHC Corporation, Tokyo, Japan
Vortexgerät	Vortex Genie Touch Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland

7.2 Chemikalien und Reagenzien

Adenosindiphosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Antimycin A	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Aqua dest.</i>	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin (<i>fatty acid free</i>)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CCCP (Carbonylcyanide 3-chloro-phenylhydrazone)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

cOplete™ (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Cytochrom C	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EGTA (Ethylenglykoltetraacetat)	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Glutamat	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Malat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
D(-)-Mannitol	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MOPS (3-(N-Morpholino)-propan-sulfonsäure)	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat, wasserfrei	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oligomycin	EMD Chemicals, San Diego, USA
Rotenon	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

D(+)-Saccharose	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodium sulfite	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Succinat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tetrasodiumpyrophosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin-EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

7.3 Puffer und Lösungen

7.3.1 Isolationspuffer

Isolationspuffer

200 mM D(-)-Mannitol
50 mM D(+)-Saccharose
5 mM Kaliumdihydrogenphosphat
5 mM MOPS
0,1 %iges BSA *fatty acid free*
1 mM EGTA
4 M Kaliumhydroxid
Mannitol und 1 l *Aqua dest.*
zusammengeben und bei > 90°C etwa 20-30 min erhitzen. Anschließend nach Abkühlung der Reihe die weiteren Substanzen hinzugeben. Den pH-Wert mit Kaliumhydroxid auf 7,15 titrieren.
Für das Colon vor Gebrauch zusätzlich 20 mg BSA/ml hinzufügen.

7.3.2 Respirationspuffer

Respirationspuffer

130 mM Kaliumchlorid
5 mM di-Kaliumhydrogenphosphat
20 mM MOPS
2,5 mM EGTA
1 μ M Tetrasodiumpyrophosphat
0,1 %iges BSA *fatty acid free*
4 M Kaliumhydroxid

Die Substanzen zusammengeben und mit *Aqua dest.* auf 1 l auffüllen. Den pH-Wert mit Kaliumhydroxid auf 7,4 titrieren.

Für das Colon vor Gebrauch zusätzlich 20 mg BSA/ml hinzufügen.

7.3.3 Lösungen für die Proteinkonzentrationsbestimmung

Lowry Lösung 1

Reagenz A: 10 g Natriumcarbonat in 500 ml 1 M Natriumhydroxid-Lösung lösen.

Reagenz B: 2 g Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat in 100 ml *Aqua dest.* lösen.

Reagenz C: 1 g Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat in 100 ml *Aqua dest.* lösen.

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

Lowry Lösung 2

400 μ l Folin-Ciocalteu-Reagenz
400 μ l *Aqua dest.*

7.3.4 Substanzen für die respirometrischen Messungen

Substanz	Endkonzentration
Adenosindiphosphat (Sigma A5285)	105 μ M (Colon) 210 μ M (Leber)
Antimycin A (Sigma A8674)	2,5 μ M
CCCP (Sigma C 2759)	0,5 μ M Schritte
Cytochrom C (Sigma C2037)	2,5 μ M
Glutamat (Flucka 49621)	2,5 mM
Malat (Serva 11050)	2,5 mM
Oligomycin (Sigma 04876)	0,05 μ g/ml
Rotenon (Sigma R8875)	0,5 μ M
Succinat (Sigma S2378)	5 mM (Colon) 10 mM (Leber)

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Respirometrie - Sauerverbrauch während der OXPHOS	14
Abb. 2: Effekte von Midazolam <i>in vitro</i> auf die mitochondriale Funktion in Colonzellen....	17
Abb. 3: Effekte von Midazolam <i>in vitro</i> auf die mitochondriale Funktion in Leberzellen	20

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standardverdünnungsreihe für die Proteinkonzentrationsbestimmung	11
Tabelle 2: Konzentrationsreihen für die Versuchsreihen Leber und Colon.....	12

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei all denjenigen, die mich auf meinem Weg begleitet und bei meinem Promotionsvorhaben unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Olaf Picker für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sowie seine Unterstützung und Beratung. Frau Prof. Dr. med. Marion Rapp danke ich für die Übernahme meiner Co-Betreuung.

Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus danke ich für ihre herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und ihre geduldige Einarbeitung in den experimentellen Teil meiner Arbeit. Seit Beginn meiner Laborversuche bis zur Fertigstellung meiner Dissertationsschrift begleitete mich Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus kontinuierlich. Für ihr großes Engagement und ihre Unterstützung bei meinem Promotionsvorhaben danke ich sehr.

Für das Schaffen der Rahmenbedingungen meiner Labortätigkeit bedanke ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer. Auch gilt mein Dank Frau Birgitt Berke (Chemielaborantin Experimentelle Anästhesiologie) und Frau Claudia Dohle (MTA Experimentelle Anästhesiologie), die mir während meiner laborexperimentellen Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben. Ich danke meinen Eltern, dass sie mir ermöglicht haben meinen Weg zu gehen.