

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

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

Dissertation

zum Erlangen des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Charlotte Marie Maicher

2023

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: Priv. Doz. Dr. med. Kathrin Scheckenbach

Für meine Familie

## Zusammenfassung

Die Sepsis stellt weiterhin ein relevantes Krankheitsbild mit hoher Sterblichkeit und steigenden Fallzahlen dar. Neben einer Beeinträchtigung auf Ebene der Mikrozirkulation ist auch eine mitochondriale Dysfunktion pathophysiologisch von Bedeutung. In Anbetracht dessen sind adjuvante Therapiemöglichkeiten in den Fokus der Forschung geraten, um an diesen Mechanismen anzugreifen und den Verlauf einer Sepsis günstig zu beeinflussen. Das Fibrat Gemfibrozil ist ein Ligand am Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) und konnte in bisherigen Studien neben seinen lipidsenkenden Eigenschaften auch Wirkungen auf die Inflammation und das *Outcome* unter septischen Bedingungen zeigen. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion durch das Fibrat. Die Leber kann im Zuge einer Sepsis aufgrund ihrer hohen Durchblutung und ausgeprägten Stoffwechselaktivität rasch in ihrer Funktion beeinträchtigt werden und so eine mitochondriale Dysfunktion begünstigen. Vor diesem Hintergrund könnten unterstützende Effekte auf die Mitochondrienfunktion in einer Sepsis von besonderer Relevanz sein. Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob Gemfibrozil die mitochondriale Funktion in der Leber unter septischen Bedingungen und nach Durchführung einer sterilen Laparotomie beeinflusst. Zudem sollte ausgemacht werden, ob diese Wirkung konzentrationsabhängig ist und potenzielle Effekte über den PPAR $\alpha$  vermittelt werden. Da in der Sepsis ein enges Zusammenspiel von mitochondrialer Funktion und dem Aufkommen von oxidativem Stress im Gewebe zu vermuten ist, sollte außerdem die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in der Leber ermittelt werden.

Hierzu wurden nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen (AZ: 84-02.04.2016.A398) 120 männliche Wistar-Ratten in 12 Gruppen (n=10) randomisiert und entweder eine Sepsis mittels Colon ascendens Stent Peritonitis (CASP) induziert oder eine sterile Laparotomie (Sham) durchgeführt. 24 Stunden und unmittelbar vor der Operation erfolgte die medikamentöse Vorbehandlung je nach Kohorte (Kontrolle (K), Gemfibrozil (30 mg/kg), Gemfibrozil (100 mg/kg), PPAR $\alpha$ -Blocker GW6471 (1 mg/kg), Gemfibrozil (30 mg/kg) + GW6471, Gemfibrozil (100 mg/kg) + GW6471). 24 Stunden nach dem Eingriff wurde im Zuge einer erneuten Operation Lebergewebe entnommen, homogenisiert und die Mitochondrienfunktion im Respirometer ermittelt. Unter Zugabe von Glutamat und Malat als Substrate für Komplex I und Rotenon und Succinat zur Messung von Komplex II der Atmungskette wurde die basale (*State 2*) und nach Hinzufügen von Adenosindiphosphat (ADP) die maximale (*State 3*) Geschwindigkeit der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) berechnet. Die *Respiratory Control Ratio* (RCR) und ADP/O Ratio wurden als Parameter der mitochondrialen Funktion ermittelt. Hierbei veranschaulicht die RCR die Kopplung des Elektronentransportes der Atmungskette an die Synthese von Adenosintriphosphat, während die ADP/O Ratio die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung beschreibt. Um zudem das Ausmaß an oxidativem Stress im Gewebe zu evaluieren, wurde die Malondialdehyd-Konzentration (MDA) als Abbauprodukt der Lipidperoxidation im Lebergewebe gemessen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte anhand der Statistiksoftware GraphPad Prism. Ein Kruskal-Wallis-Test sowie Dunns Post-hoc-Test wurden durchgeführt und das Signifikanzniveau mit  $p < 0,05$  festgelegt.

Mit Blick auf die Studienergebnisse ließen sich weder in den Sham-operierten Tieren noch in den CASP-Versuchsgruppen signifikante Unterschiede in der ADP/O Ratio und der RCR für Komplex I und Komplex II der Atmungskette feststellen. Ferner blieb auch die hepatische MDA-Konzentration in den einzelnen Interventionsgruppen unverändert.

Insgesamt zeigte die Vorbehandlung mit Gemfibrozil in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die mitochondriale Funktion in der septischen Leber. Da auch unter nicht-septischen Bedingungen keine Veränderung der Mitochondrienfunktion zu beobachten war, kann folglich keine Aussage über eine konzentrationsabhängige Wirkung von Gemfibrozil oder PPAR $\alpha$ -vermittelte Effekte des Fibrats getroffen werden.

## Summary

Sepsis continues to be a challenging disease with high mortality rates and increasing case numbers. Under pathophysiological conditions, an impairment on microcirculatory level and the development of mitochondrial dysfunction are particularly relevant. Therefore, adjuvant therapies that target these mechanisms to improve the course of sepsis have become the focus of recent research. The fibrate gemfibrozil functions as a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) and, in addition to its lipid-lowering properties, was able to show an effect on inflammation and outcome under septic conditions in several studies. Moreover, there is evidence that the fibrate affects mitochondrial function.

Due to its high blood flow and pronounced metabolic activity, the function of the liver can rapidly be impaired during sepsis, thus promoting mitochondrial dysfunction. In this context, supportive effects on mitochondrial function in sepsis could be of distinct importance. Hence, the aim of this work was to investigate whether gemfibrozil affects mitochondrial function in the liver under septic conditions and after performing a sterile laparotomy. Additionally, it was to be determined whether potential effects occur in a concentration-dependent manner and are possibly mediated via the PPAR $\alpha$ . Since a close interplay between mitochondrial function and the extent of oxidative stress in the tissue can be assumed in sepsis, a further approach of this study was to assess the production of reactive oxygen species in the liver.

For this purpose, after approval by the *Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen* (AZ: 84-02.04.2016.A398), 120 male Wistar rats were randomised into 12 groups (n=10) and either an abdominal sepsis was induced using a colon ascendens stent peritonitis (CASP) or a sterile laparotomy (Sham) was performed. 24 hours and immediately before surgery, drug pretreatment was given according to the cohort (control (K), gemfibrozil (30 mg/kg), gemfibrozil (100 mg/kg), PPAR $\alpha$ -blocker GW6471 (1 mg/kg), gemfibrozil (30 mg/kg) + GW6471, gemfibrozil (100 mg/kg) + GW6471). 24 hours after surgery a second operation was performed, and liver tissue was extracted and homogenised. Afterwards, mitochondrial function was determined respirometrically. With the addition of glutamate and malate as substrates for complex I and rotenone and succinate to measure complex II of the respiratory chain, the basal (state 2) and, after application of adenosine diphosphate (ADP), the maximal (state 3) rate of oxidative phosphorylation (OXPHOS) was calculated. The respiratory control ratio (RCR) and ADP/O ratio were determined as parameters of mitochondrial function. Thereby, the RCR illustrates the coupling of respiratory chain electron transport and ATP-synthesis, whereas the ADP/O ratio describes the efficiency of oxidative phosphorylation. To evaluate the extent of oxidative stress in the hepatic tissue, the malondialdehyde concentration (MDA) was measured as a degradation product of lipid peroxidation. Statistical analysis of the data was carried out using GraphPad Prism statistical software. A Kruskal-Wallis test along with a Dunn's post-hoc test were performed and the significance level was set at  $p < 0.05$ .

Regarding the study results, no significant differences in ADP/O ratio and RCR for complex I and complex II of the respiratory chain could be detected in either the Sham-operated animals or the CASP experimental group. Furthermore, hepatic MDA levels also remained unchanged in each intervention group.

In conclusion, a pretreatment with gemfibrozil showed no effect on mitochondrial function in the present study of sepsis. Since no gemfibrozil-mediated effects were shown under non-septic conditions either, consequently no statement can be made about a concentration-dependent impact of gemfibrozil or PPAR $\alpha$ -mediated effects of the fibrate.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	<b>g</b>	Gramm
<b>µg</b>	Mikrogramm	<b>Gemfi</b>	Gemfibrozil
<b>µl</b>	Mikroliter	<b>GM</b>	Glutamat + Malat
<b>µM</b>	Mikromolar	<b>h</b>	Stunde
<b>µmol</b>	Mikromol	<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat	<b>i.p.</b>	<i>Intraperitoneal</i>
<b>ADP/O</b>	Adenosindiphosphat/	<b>iNOS</b>	Induzierbare Stickstoff- monoxid-Synthase
<b>Quotient</b>	Sauerstoff Quotient	<b>Insg.</b>	Insgesamt
<b>Aqua</b>	<i>Aqua destillata</i>	<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>dest.</b>		<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>AZ</b>	Aktenzeichen	<b>Kg</b>	Kilogramm
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin	<b>KNa</b>	Kalium-Natrium Tartrat
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid	<b>Tartrat</b>	
<b>CASP</b>	<i>Colon Ascendens Stent Peritonitis</i>	<b>KOH</b>	Kaliumhydroxid
<b>CCCP</b>	Carbonylcyanid-m- chlorphenylhydrazon	<b>l</b>	Liter
<b>CLI</b>	<i>Cecal Ligation and Incision</i>	<b>LANUV</b>	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
<b>CLP</b>	<i>Cecal Ligation and Puncture</i>	<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>Cu</b>	Kupfer	<b>M</b>	Molar
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>Max.</b>	Maximum
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>MDA</b>	Malondialdehyd
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	<b>mg</b>	Milligramm
<b>EGTA</b>	Ethylenglykoltetraacetat	<b>min</b>	Minute
<b>eNOS</b>	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	<b>Min.</b>	Minimum
<b>ESICM</b>	<i>European society of intensive care medicine</i>	<b>ml</b>	Milliliter
<b>et al.</b>	<i>Et alii</i>	<b>mM</b>	Millimolar
<b>FAD/</b>	Flavinadenindinucleotid	<b>mm</b>	Millimeter
<b>FADH<sub>2</sub></b>		<b>MMDS</b>	<i>Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome</i>

<b>mmHg</b>	Millimeter Quecksilbersäule	<b>PPAR</b>	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
<b>mmol</b>	Millimol		
<b>MOPS</b>	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	<b>Präop.</b>	präoperativ
<b>MOV</b>	Multiorganversagen	<b>qSOFA</b>	<i>Quick Sequential Organ Failure Assessment</i>
<b>MPT</b>	Mitochondriale Permeabilitäts-Transition	<b>rcf</b>	<i>Relative centrifugal force</i>
<b>mPTP</b>	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore	<b>RCR</b>	<i>Respiratory control ratio</i>
<b>mtROS</b>	Mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies	<b>RNS</b>	Reaktive Stickstoffspezies
<b>n</b>	Anzahl	<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Natriumcarbonat	<b>rpm</b>	<i>Revolutions per minute</i>
<b>Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	Tetrasodiumpyrophosphat	<b>s.</b>	siehe
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid	<b>s.c.</b>	<i>Subcutan</i>
<b>NAD/</b>	Nicotinamidadenindinucleotid	<b>SCCM</b>	<i>Society of Critical Care Medicine</i>
<b>NADH</b>		<b>Sham</b>	Kontrollkohorte
<b>NADP/</b>	Nicotinamidadenindinucleotid-phosphat	<b>SIRS</b>	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
<b>NADPH</b>		<b>SOFA</b>	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid		
<b>nm</b>	Nanometer	<b>SRSS</b>	<i>Septic Rat Severity Score</i>
<b>nmol</b>	Nanomol	<b>t</b>	Zeit
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid	<b>TBA</b>	Thiobarbitursäure
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff	<b>TierSchG</b>	Tierschutzgesetz
<b>OP</b>	Operation	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor-alpha
<b>OXPHOS</b>	Oxidative Phosphorylierung	<b>USA</b>	<i>United States of America</i>
<b>P</b>	Punkte	<b>Vs.</b>	versus
<b>p</b>	Signifikanzwert	<b>ZETT</b>	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
<b>PAMP</b>	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>		
<b>PGC</b>	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma Koaktivator		

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>I</b>
<b>Summary.....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Bedeutung der Sepsis und Relevanz in der Klinik .....	1
1.2 Definition der Sepsis.....	1
1.3 Pathophysiologie der Sepsis.....	2
1.3.1 Mikrozirkulationsstörung und Multiorganversagen .....	2
1.3.2 Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan in der Sepsis .....	3
1.4 Mitochondriale Funktion in der Sepsis.....	4
1.5 Reaktive Sauerstoffspezies in der Sepsis .....	5
1.6 Therapiemöglichkeiten der Sepsis.....	6
1.7 Ziele der Arbeit .....	7
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>8</b>
2.1 Tierexperimenteller Versuchsteil .....	8
2.1.1 Anmerkung zu den verwendeten Materialien und Geräten .....	8
2.1.2 Versuchstiere .....	8
2.1.3 Gruppeneinteilung.....	8
2.1.4 CASP-Operation .....	10
2.1.5 Versuchsablauf.....	11
2.2 Laborexperimenteller Versuchsteil .....	11
2.2.1 Anmerkung zu den verwendeten Materialien, Geräten und Chemikalien .....	11
2.2.2 Organentnahme und Homogenatherstellung .....	12
2.2.3 Proteinbestimmung in der Leber .....	12
2.2.4 Respirimetrische Messung .....	13
2.2.5 Malondialdehydbestimmung in der Leber.....	16
2.3 Statistische Auswertung.....	17
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>18</b>
3.1 Effekt von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion in der Leber im Sham- und CASP-Modell .....	18
3.1.1 Effekt von Gemfibrozil auf die RCR in der Leber im Sham- und CASP-Modell... 18	
3.1.2 Effekt von Gemfibrozil auf den ADP/O-Quotienten in der Leber im Sham- und CASP-Modell .....	20
3.2 Effekt von Gemfibrozil auf die MDA-Konzentration in der Leber im Sham- und CASP-Modell .....	22



---

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>24</b>
4.1	Methodendiskussion .....	24
4.1.1	Tiermodell und Laborbedingungen .....	24
4.1.2	Operationsverfahren.....	25
4.1.3	Messung der mitochondrialen Funktion.....	26
4.1.4	Gemfibrozil im Vergleich mit weiteren PPAR-Agonisten .....	27
4.2	Ergebnisdiskussion .....	27
4.2.1	Die Wirkung von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion in der Sepsis.....	27
4.2.2	Die Wirkung von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion unter nicht-septischen Bedingungen.....	29
4.2.3	Der Einfluss von Gemfibrozil auf die Produktion von ROS in der Leber .....	32
4.2.4	Die Bedeutung PPAR $\alpha$ -vermittelter Effekte von Gemfibrozil .....	33
4.3	Schlussfolgerung.....	35
<b>5.</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b> .....	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>48</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>49</b>
8.1	Material, Geräte, Chemikalien des tierexperimentellen Versuchsteils .....	49
8.2	Material, Geräte, Chemikalien des laborexperimentellen Versuchsteils .....	51
8.3	SRSS – Septic Rat Severity Score.....	57

# 1. Einleitung

## 1.1 Bedeutung der Sepsis und Relevanz in der Klinik

Das Krankheitsbild der Sepsis stellt fortwährend eine große Herausforderung in der Medizin dar, wobei trotz intensiver Forschung und medizinischen Fortschrittes steigende Fallzahlen und hohe Komplikationsraten zu verzeichnen sind<sup>1 2 3-5</sup>. Neben einem kontinuierlichen Zuwachs der Sepsis-Fallzahlen in Deutschland um jährlich 5,7 % nahm auch der Anteil an schweren Verläufen der Sepsis in den letzten Jahren stetig zu<sup>1</sup>. Auch wenn eine Abnahme der Letalitätsrate im selben Zeitraum zu beobachten ist, verstarben immer noch 24,3 % der Patienten mit oder an einer Sepsis<sup>1</sup>. Die Krankenhausletalität des septischen Schocks liegt mit mehr als 50 % noch weitaus höher<sup>1 3</sup>. In Anbetracht des demographischen Wandels in der Gesellschaft und der nahezu linear ansteigenden Krankenhausletalität im höheren Alter, wird umso deutlicher, dass es sich bei der Sepsis um ein relevantes Krankheitsbild der heutigen Medizin handelt<sup>1</sup>. Auch im internationalen Vergleich sind steigende Fallzahlen und eine hohe Krankenhaussterblichkeit zu verzeichnen<sup>6</sup>. Somit stellt die Sepsis in den USA eine der führenden Todesursachen dar<sup>4</sup>. In der aktuellen Sepsis-3 Definition der European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) wird die Sepsis trotz des medizinischen Fortschrittes als die Haupttodesursache bei Infektionen genannt<sup>7</sup>.

Neben der epidemiologischen Relevanz der Sepsis sind auch gesundheitsökonomische Aspekte des Krankheitsbildes von Bedeutung. Somit verbleiben Patienten mit Sepsis oder septischem Schock im Schnitt länger im Krankenhaus oder in intensivmedizinischer Behandlung<sup>3</sup>. Auch die mit der Behandlung der Sepsis verbundenen Kosten für das Gesundheitssystem sind hoch und belaufen sich in Deutschland auf bis zu 7,7 Mrd. Euro jährlich<sup>1</sup>.

## 1.2 Definition der Sepsis

Zentraler Aspekt der Sepsis ist die vom eigenen Körper ausgehende dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion, die zu einer lebensbedrohlichen Organdysfunktion mit multiplem Organversagen führen kann<sup>7</sup>. Die ursprüngliche Klassifizierung orientierend an den *SIRS*-Kriterien in Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock wurde im Zuge neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse im Jahre 2016 aufgearbeitet und legt den Fokus nun mehr auf die resultierende Organdysfunktion. Diese kann anhand des *Sequential Organ Failure Assessment*-Scores (SOFA-Score) ermittelt werden<sup>7</sup>. Der SOFA-Score ordnet die Funktionalität der einzelnen Organsysteme anhand klinischer und laborchemischer Parameter einem Punktesystem zu<sup>8</sup>. Das Vorliegen einer Organdysfunktion kann angenommen werden, wenn bei bestehender Infektion

ein Anstieg des SOFA-Scores auf  $\geq 2$  Punkte zu beobachten ist<sup>7</sup>. Gleichzeitig korreliert ein Anstieg im SOFA-Score mit einem höheren Mortalitätsrisiko sowie einem prognostisch schlechteren *Outcome* der Patienten<sup>8,9</sup>. Besonders im präklinischen Bereich ergeben sich jedoch Einschränkungen bei der Ermittlung des SOFA-Scores. Zur frühzeitigen Identifizierung und Einschätzung von Patienten mit Verdacht auf eine Infektion eignet sich daher der *quick* SOFA-Score (qSOFA-Score)<sup>10</sup>, welcher sich allein klinischer Parameter bedient, ohne aufwendige Labordiagnostik nötig zu machen. Bei einer Veränderung des Bewusstseins (*Glasgow Coma Scale*  $< 15$ ), einer erhöhten Atemfrequenz von  $\geq 22$  /min oder einem systolischen Blutdruck  $\leq 100$  mmHg lässt sich bei  $\geq 2$  Punkten eine Infektion vermuten und weitere Maßnahmen zur Ermittlung einer Organdysfunktion sollten eingeleitet werden<sup>7</sup>.

Der septische Schock wird in der aktuellen *Sepsis-3* Definition der ESICM und der SCCM als Verlaufsform mit zunehmend beeinträchtigter Kreislauf- und Stoffwechselfunktion sowie daraus resultierend erhöhter Sterblichkeit beschrieben<sup>7</sup>. Klinisch manifestiert sich der septische Schock durch eine persistierende Hypotension im Rahmen einer Sepsis, welche trotz Flüssigkeitstherapie die Gabe von Vasopressoren notwendig macht, um einen mittleren arteriellen Druck von  $\geq 65$  mmHg aufrechtzuerhalten. Als zusätzliches Kriterium dient ein Anstieg des Serum-Laktat Wertes auf  $> 2$  mmol/L. Bei Vorliegen eines septischen Schocks im Sinne dieser Parameter steigt die Krankenhaussterblichkeit auf mehr als 40 %<sup>7,11</sup>.

### 1.3 Pathophysiologie der Sepsis

Die Pathophysiologie der Sepsis umfasst im Zuge der weitreichenden Immunreaktion Veränderungen auf zellulärer Ebene und auf Ebene der Mikrozirkulation, welche entscheidend zur Entstehung möglicher Organschäden beitragen<sup>12-14</sup>. Grundlegend für die komplexe Entzündungsreaktion in einer Sepsis sind das Erkennen und die Bekämpfung von Pathogenen durch eine kaskadenartige Aktivierung sowohl zellvermittelter Prozesse und Mediatoren der Immunabwehr, als auch humoraler Faktoren wie dem Komplementsystem<sup>15,16</sup>.

#### 1.3.1 Mikrozirkulationsstörung und Multiorganversagen

Des Weiteren kommt es zu hämodynamischen Veränderungen, welche vor allem auf Ebene der Mikrozirkulation mit der Entwicklung eines Multiorganversagens assoziiert sind<sup>14</sup>. Der Blutfluss wird so modifiziert, dass vor allem lebenswichtige Organe wie das Herz und das Gehirn durchblutet werden, während die Durchblutung in peripheren Organen abnimmt. Diese Heterogenität des Blutflusses zeigt sich dabei nicht nur auf Ebene der Makrozirkulation, sondern auch in der Durchblutung der kleinsten Blutgefäße. Das Endothel ist das Hauptstellglied der Mikrozirkulation, wobei die Regulation insbesondere über Stickstoffmonoxid (NO) und die

endotheliale NO-Synthase (eNOS) vermittelt wird<sup>13 17</sup>. In einer Sepsis wird das Endothel direkt durch die systemische Entzündung und die Immunreaktion des Wirtes moduliert und folglich die Versorgung im Bereich der Endstrombahn beeinflusst<sup>17 18</sup>. Durch ein Zusammenwirken von Hypovolämie, Endothelzellschaden und dem Verlust der Autoregulation im Kapillarnetz entstehen Leckagen, welche Gewebeödeme verursachen und die Oxygenierung des Gewebes weiter erschweren können<sup>19 20</sup>. Diese Veränderungen der Durchblutung und Minderversorgung mit Sauerstoff begünstigen schließlich Zellschäden und die Entstehung einer Organdysfunktion<sup>13 14</sup>. Sakr et al. konnten nachweisen, dass andauernde Mikrozirkulationsstörungen in einer Sepsis mit einer erhöhten Mortalität und einem schlechteren *Outcome* der Patienten assoziiert waren<sup>14</sup>. Dieser Zusammenhang zeigte sich dabei unabhängig von der Hämodynamik der Makrozirkulation<sup>14</sup>.

Es wird deutlich, dass in der Pathophysiologie der Sepsis sowohl eine Störung der Mikrozirkulation als auch eine Beeinträchtigung auf zellulärer Ebene relevant sind. Der Zellschaden lässt sich durch die *zytopathische Hypoxie* beschreiben, wobei trotz ausreichendem Sauerstoffangebot vermindert ATP produziert wird<sup>21</sup>. Dieses Missverhältnis von Sauerstoffangebot und -verbrauch deutet auf ein Unvermögen der Mitochondrien hin, den Sauerstoff effizient zu gebrauchen und lässt vermuten, dass ein Zellschaden in einer Sepsis maßgeblich die Mitochondrienfunktion beeinträchtigt<sup>19 21</sup>. Die Verknüpfung von Mikrozirkulationsstörung und mitochondrialer Dysfunktion in einer Sepsis wird in der Literatur daher als *Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome* (MMDS) beschrieben<sup>19</sup>. Dennoch bleibt zu klären, ob ein eingeschränktes Sauerstoffangebot im septischen Gewebe primär durch eine Minderperfusion verursacht wird oder ob eine Dysfunktion der Mitochondrien den Auslöser hierfür darstellt<sup>13 19</sup>.

### 1.3.2 Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan in der Sepsis

Die Leber stellt mit ihrer hohen metabolischen Aktivität ein zentrales Stoffwechselorgan dar, welches bei einer abdominellen Sepsis aufgrund seiner anatomischen Lage besonders schnell beeinträchtigt wird<sup>22</sup>. Im Laufe einer Infektion kommt es zum Verlust der Barrierefunktion im Darm und so zur kontinuierlichen Translokation von Bakterien in den Blutstrom. Über das Pfortadersystem gelangen Pathogene rasch in die Leber, sodass diese das erste nachgeschaltete Organ in der Sepsis darstellt<sup>23-25</sup>. Durch ihre systemische und portalvenöse Durchblutung ist die Leber umso mehr von zirkulierenden Pathogenen betroffen<sup>26</sup>. Es resultieren Sepsis-assoziierte Leberschäden bis hin zum Leberversagen<sup>27</sup>, welche sich zudem kritisch auf das *Outcome* und die Mortalität der Patienten auswirken können<sup>22 28</sup>.

Darüber hinaus hat die Leber in der Sepsis die Funktion eines Immunorgans, welches sowohl die Beseitigung von Erregern als auch die Regulation der Immunantwort vermittelt<sup>25</sup>. Nach der

intestinalen Barriere nimmt die Leber eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen ein, die vor allem die systemische Verbreitung verhindern soll. Dennoch ist die Rolle der Leber in der Sepsis ambivalent, denn die Immunreaktion kann in eine übermäßige systemische Entzündungsreaktion übergehen und so Organschäden verursachen<sup>22-29</sup>. Ein Gleichgewicht dieser immunregulatorischen Funktionen ist daher essentiell für das Behandlungsergebnis einer Sepsis<sup>22-25</sup>. Folglich rücken die Modulation der Leberfunktion, Stärkung ihrer Immunkompetenz und die Prävention eines Organschadens stärker in den Fokus moderner Therapieansätze<sup>22-25</sup>.

#### 1.4 Mitochondriale Funktion in der Sepsis

Auch wenn die Bedeutung der Mitochondrien in der Sepsis noch nicht eindeutig geklärt ist, lässt sich eine Beeinträchtigung auf zellulärer Ebene und damit eine Veränderung der mitochondrialen Funktion zeigen, die in Zusammenhang mit der Entwicklung einer Organdysfunktion steht<sup>30</sup>. Anhand von Übersichtsarbeiten wird deutlich, dass die Mitochondrienfunktion in der Sepsis sehr unterschiedlich ausfällt und unter Berücksichtigung diverser Einflussfaktoren betrachtet werden muss<sup>19-31-32</sup>. Es ließ sich zeigen, dass die Mitochondrienfunktion in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebe, der Schwere der Sepsis, sowie dem Zeitpunkt zu welchem die Funktionsfähigkeit ermittelt wird, stark variiert<sup>19-32-34</sup>. Auch bezüglich einer potenziellen mitochondrialen Dysfunktion divergiert die Studienlage<sup>35</sup>. Manche Quellen berichten von einer gesteigerten<sup>36-38</sup>, andere von einer verminderten Mitochondrienfunktion<sup>33-39</sup> und weitere Studien weisen unveränderte Effekte auf<sup>40-41</sup>.

Geschädigte Lebermitochondrien und deren verminderte Reparaturkapazität standen in Zusammenhang mit Organschaden und einem schlechteren *Outcome* bei Verbrennungstraumata<sup>42</sup>. Auch im septischen Schock konnte eine Beziehung zwischen der Schwere der Sepsis und einer verminderten Aktivität der Mitochondrien und damit verbundenen ATP-Produktion gezeigt werden<sup>30</sup>. Ergebnisse mehrerer Studien weisen hier auf eine Korrelation zwischen NO-Produktion und mitochondrialer Dysfunktion hin<sup>21-30-33-43</sup>. Auf der anderen Seite waren Regenerationsprozesse und verbesserte Reparaturmechanismen der Mitochondrien mit dem Überleben schwer erkrankter Personen auf Intensivstation assoziiert<sup>44</sup>. In weiteren Studien im Entzündungsmodell konnte eine Aktivierung der mitochondrialen Biogenese sowohl die Mitochondrien- als auch die Organfunktion erhalten<sup>45</sup> und eine gesteigerte Aktivität der oxidativen Phosphorylierung in Lebermitochondrien gezeigt werden<sup>32</sup>.

Die Mitochondrien verbrauchen im Zuge der oxidativen Phosphorylierung und der Generierung von ATP mehr als 90 Prozent des gesamten Sauerstoffangebotes. Die Atmungskette kann dabei sowohl durch reaktive Sauerstoff-, als auch Stickstoffspezies (ROS, RNS) gehemmt werden<sup>19</sup>. In einer Sepsis korreliert die Überproduktion dieser Moleküle mit einer mitochondrialen

Dysfunktion, der Reduktion an erzeugtem ATP und der Entstehung eines Organschadens<sup>30</sup>. Es wird deutlich, dass die Mitochondrien als zentrale Energieproduzenten des Körpers bei Beeinträchtigung ihrer Funktionalität eine tragende Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis und des Multiorganversagens haben<sup>30 46</sup>. Ob die Mitochondrien durch eine Sepsis primär in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, selber andere Zellstrukturen schädigen oder eine mitochondriale Dysfunktion eher als Begleiterscheinung in der Sepsis auftritt, ist bisher ungeklärt<sup>30 40 47</sup>.

## 1.5 Reaktive Sauerstoffspezies in der Sepsis

Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Zuge der Sepsis und ein Mangel an antioxidativer Mechanismen setzen einen Kreislauf in Gang, in dem die Bildung oxidativen Stresses mit Zellschäden und daraus resultierender mitochondrialer Dysfunktion eng zusammenhängen<sup>30 48</sup>. Dennoch bleibt unklar, ob oxidativer Stress primär für den in Sepsis entstehenden mitochondrialen Schaden verantwortlich ist oder erst durch die mitochondriale Dysfunktion eine übermäßige Produktion an ROS bewirkt wird<sup>30 48 49</sup>. Reaktive Sauerstoffspezies umfassen eine heterogene Gruppe hochaktiver Sauerstoffformen, welche sich durch eine hohes Oxidationsvermögen auszeichnen<sup>50</sup>. Im Körper entstehen sie unter anderem während der Zellatmung in den Mitochondrien oder werden im Zuge der Entzündungsantwort von Immunzellen durch die NADPH-Oxidase generiert<sup>51</sup>. Neben ihrer Funktion als Mediatoren der Signalvermittlung spielen sie daher eine entscheidende Rolle im Entzündungsprozess und sind in die Bekämpfung von Pathogenen involviert<sup>50-52</sup>. Bei einem Mangel an antioxidativen Mechanismen kann ein Überschuss an ROS allerdings zu Gewebs- und Zellschaden führen<sup>53 54</sup>. Die unter einer Sepsis entstehenden zellulären und organischen Schäden lassen sich daher möglicherweise auf das Ungleichgewicht zwischen ROS-vermittelter Pathogenbekämpfung der Immunzellen und deren antioxidativer Elimination zurückführen<sup>19 55 56</sup>.

Die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf das Endothel stellt im Zusammenhang mit der Sepsis einen wichtigen Pathomechanismus dar. Unter entzündlichen Bedingungen ist das Endothel sowohl Wirkungsort<sup>57</sup>, als auch Entstehungsquelle von Radikalen und oxidativem Stress<sup>58</sup>. ROS schädigen die endotheliale Barriere und fördern die vermehrte Translokation von Entzündungszellen ins Gewebe<sup>17 50</sup>. Huet et al. schlussfolgern, dass die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion somit entscheidend zur Störung der Mikrozirkulation in einer Sepsis beiträgt<sup>17</sup>.

Auch Mitochondrien sind relevante Produzenten reaktiver Sauerstoffspezies (mtROS), gleichzeitig stellen sie eine Zielstruktur für den durch oxidativen Stress bedingten Zellschaden dar<sup>49</sup>. Es liegt die Vermutung nahe, dass eine Unterstützung mitochondrialer Regenerationsprozesse und antioxidativer Mechanismen Zellschaden vermeiden und den Verlauf

einer Sepsis günstig beeinflussen kann<sup>44 59</sup>. Vor diesem Hintergrund zeigten Korshunov et al., dass eine moderate Entkopplung der Atmungskette die mitochondriale ROS-Generierung vermindern konnte, wodurch sich ein potentieller Angriffspunkt in der Therapie der Sepsis bieten würde<sup>59 60</sup>. Weitere Überlegungen zur Beeinflussung von ROS und oxidativem Stress in der Sepsis sind Gegenstand aktueller Forschung. Das Fibrat Gemfibrozil zeigte in Studien bereits, dass es neben entzündungshemmender Eigenschaften<sup>61</sup> auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies senken konnte und die Aktivität bestimmter Antioxidantien stimulierte<sup>62 63</sup>.

## 1.6 Therapiemöglichkeiten der Sepsis

Betrachtet man die Pathogenese der Sepsis genauer, wird deutlich, dass vor allem eine Störung der Mikrozirkulation und der mitochondrialen Funktion entscheidend zur Entwicklung der Sepsis beitragen. Dennoch existieren bisher keine erprobten Begleittherapeutika, welche vor allem an diesen Kernpunkten der Sepsis angreifen. Die aktuellen Leitlinien zur initialen Therapie der Sepsis belaufen sich primär auf die hämodynamische Stabilisierung und antimikrobielle Therapie<sup>64 65</sup>. Maßnahmen, die vor allem auf Ebene der Immunmodulation greifen oder die Mikrozirkulation in einer Sepsis unterstützen, sind bisher nicht etabliert<sup>1</sup>. Es besteht die Problematik, dass eine Flüssigkeitstherapie im Sinne der Verbesserung der Makrozirkulation nicht zwingend auch die Mikrozirkulationsstörungen behebt<sup>19 66</sup>. Ein ausreichendes Angebot an Sauerstoff kann somit nicht adäquat von den Zellen genutzt werden und die Entstehung einer mitochondrialen Dysfunktion wird begünstigt. Eine gezielte Therapie auf Ebene der Mikrozirkulation könnte somit auch die Mitochondrienfunktion unter septischen Bedingungen verbessern<sup>19 49</sup>.

Durch die zunehmenden Kenntnisse über die Pathogenese der Sepsis wurde die Mitochondrienfunktion vermehrt Gegenstand aktueller Forschung. Die Optimierung der mitochondrialen Funktion in einer Sepsis zeigte in experimentellen Studien sowohl eine Verbesserung der Organfunktion als auch ein erhöhtes Überleben<sup>44 49 67</sup>. Hierbei wird deutlich, dass die Mitochondrienfunktion im Organismus auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden kann und sich daraus eine Vielzahl möglicher Angriffspunkte in der Sepsistherapie ergeben<sup>32 44 49 59</sup>.

Vor diesem Hintergrund sind einige Lipidsenker in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung geraten. Fibrate, Statine und einige Antidiabetika konnten in Studien sowohl den Sepsis-induzierten Organschaden, als auch das *Outcome* der Erkrankten verbessern<sup>68 61 69 70-72</sup>. Das Fibrat Gemfibrozil ist ein Ligand der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) und wirkt über dessen Untergruppe PPAR $\alpha$ . Der PPAR $\alpha$  ist ein vornehmlich in der Leber exprimierter nukleärer Rezeptor, der überwiegend im Fettsäuremetabolismus eine Rolle spielt<sup>73 74</sup>. Durch seine

genregulatorischen Eigenschaften trägt PPAR $\alpha$  darüber hinaus zur Modulation der Inflammation bei. Fibrate konnten in diesem Sinne PPAR $\alpha$ -vermittelte Effekte auf die Entzündungsantwort nachweisen<sup>75-76</sup>. Anhand dieser immunmodulatorischen Kompetenzen stellt Gemfibrozil eine mögliche neue Therapieoption in der Sepsis dar. Neben der Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokinantwort in mehreren Entzündungsmodellen wirkte sich Gemfibrozil auch günstig auf das Überleben im Mausmodell aus<sup>61-77</sup>.

Während die Resultate aktueller Forschung bezüglich antiinflammatorischer und antioxidativer Wirkung der Lipidsenker ziemlich einheitlich sind, variiert die Studienlage bezüglich ihrer Modulation der mitochondrialen Funktion<sup>68-81</sup>. Sowohl Beeinträchtigung<sup>80-82-84</sup>, als auch Steigerung der Mitochondrienfunktion über unterschiedliche Mechanismen werden berichtet<sup>85-86</sup>. Da die Gruppe der Peroxisomen-Proliferatoren sehr heterogen ist, können diese die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien über verschiedene Mechanismen verändern<sup>80</sup>. Es wird vermutet, dass die Mitochondrienfunktion organspezifisch ist und sich außerdem in Abhängigkeit von der Dosierung des jeweiligen Therapeutikums unterscheiden kann<sup>79-87</sup>. Die Wirkung von Gemfibrozil unter septischen Bedingungen soll hier unter besonderer Betrachtung der Mitochondrienfunktion in der Leber näher untersucht werden.

## 1.7 Ziele der Arbeit

Es ergeben sich die folgenden Fragestellungen für die Arbeit:

1. Welchen Einfluss hat die Applikation von Gemfibrozil im septischen und Sham-operierten Tiermodell auf die mitochondriale Funktion in der Leber?
2. Ist die Wirkung von Gemfibrozil konzentrationsabhängig?
3. Wie wird die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in der Leber im Sham- und CASP-Modell durch Gemfibrozil beeinflusst?
4. Wird der Effekt von Gemfibrozil über den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor alpha (PPAR $\alpha$ ) vermittelt?



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tierexperimenteller Versuchsteil

#### 2.1.1 Anmerkung zu den verwendeten Materialien und Geräten

Eine detaillierte Auflistung der im Versuchsablauf verwendeten Materialien, Geräte und Chemikalien befindet sich im Anhang.

#### 2.1.2 Versuchstiere

Die operativen Eingriffe, Substanzapplikationen und die Betreuung der Versuchstiere wurden durch Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus und Veterinärmedizinerin Frau Katharina Gross durchgeführt, sodass die Notwendigkeit eines Fachkundenachweises gemäß des geltenden Tierschutzgesetzes (TierSchG) für mich nicht bestand. Das tierexperimentelle Forschungsprojekt wurde durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt (AZ: 84-02.04.2016.A398).

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 120 drei Monate alte Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von  $350\text{g} \pm 35\text{g}$ . Es wurden ausschließlich gesunde, männliche Ratten in das Forschungsprojekt eingeschlossen. Die Versuchstiere stammten von *Janvier Labs* und wurden über die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (ZETT) bezogen. Um die Akklimatisierung der Versuchstiere zu gewährleisten, wurde ein zeitlicher Abstand von sieben Tagen bis zum Versuchsbeginn eingehalten. Den Tieren stand Rattenstandardnahrung und Trinkwasser (ozonisiertes Trinkwasser, mit Salzsäure angesäuert, pH 2,6-3,0) aus einer Nippeltränke *ad libitum* zur Verfügung. Die Unterbringung erfolgte in handelsüblichen Käfigen (Makrolon® Einzelkäfige Typ 3) bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2 \text{ °C}$  (relative Luftfeuchtigkeit  $50 \pm 5 \%$ , Luftumwälzrate 16-20/h). Zudem wurde ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden bei weißem Kunstlicht (300-320 Lux) eingehalten.

#### 2.1.3 Gruppeneinteilung

Es handelt sich um eine verblindete *in vivo* Studie, bei der 120 gesunde, männliche Wistar Ratten je nach Gruppeneinteilung gemäß Schema vorbehandelt und operiert wurden (s. Tabelle 1). Jede Gruppe entsprach  $n=10$  Versuchstieren. Die Versuchstiere erhielten je nach Zuordnung entweder eine *Colon ascendens Stent Peritonitis*-Operation (CASP-Operation) oder eine Sham-Operation. Des Weiteren erfolgte je nach Einteilung eine Vorbehandlung mit Gemfibrozil  $30 \text{ mg/kg KG i.p.}$ ,

100 mg/kg KG i.p. oder der Trägersubstanz Dimethylsulfoxid (50% DMSO). Die zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Gemfibrozil basieren auf der Annahme, dass die Wirkung von Gemfibrozil dosisabhängig ist und sollte in dieser Versuchsreihe daher näher untersucht werden. Die Richtwerte entsprechen zum einen der üblichen Dosierung in der Therapie von Fettstoffwechselstörungen beim Menschen (30 mg/kg KG), zum anderen orientieren sie sich an bereits durchgeführten Studien am NagermodeLL (100 mg/kg KG)<sup>77</sup>. Um sicherzustellen, dass die gezeigten Resultate tatsächlich durch die Applikation des PPAR $\alpha$ -Agonisten Gemfibrozil erzielt wurden, wurden weitere Versuche mit einem selektiven PPAR $\alpha$ -Antagonisten GW6471 (1 mg/kg KG) oder dem Lösungsvermittler DMSO (5%) durchgeführt. Alle Substanzen wurden *intraperitoneal* appliziert. Der Zeitpunkt der Medikamentengabe lag 24 Stunden und unmittelbar vor der CASP- oder Sham-Operation. Die Applikation des PPAR $\alpha$ -Antagonisten oder der Trägersubstanz DMSO erfolgte je 0,5 Stunden vor der Gabe von Gemfibrozil.

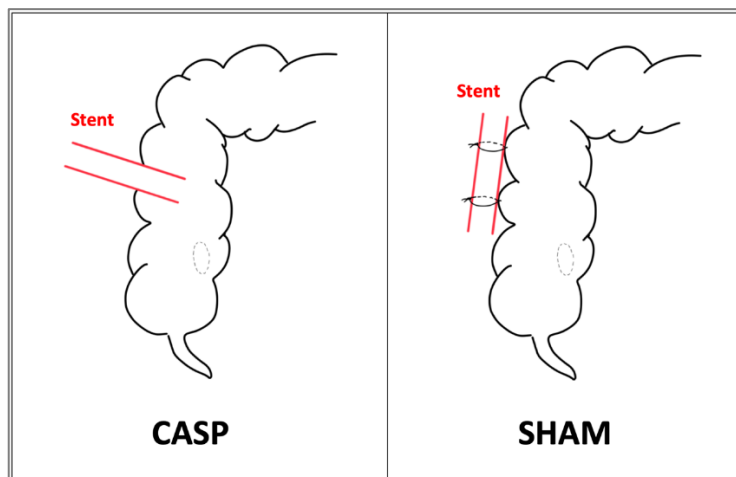
Gruppe	Voroperation und medikamentöse Vorbehandlung	Anzahl
Gruppe 1	Sham + DMSO 50% + DMSO 5% i.p.	n = 10
Gruppe 2	Sham + Gemfibrozil 100 mg/kg KG i.p. + DMSO 5% i.p.	n = 10
Gruppe 3	Sham + Gemfibrozil 30 mg/kg KG i.p. + DMSO 5% i.p.	n = 10
Gruppe 4	Sham + Gemfibrozil 100 mg/kg KG i.p. + GW6471 1 mg/kg KG i.p.	n = 10
Gruppe 5	Sham + Gemfibrozil 30 mg/kg KG i.p. + GW6471 1 mg/kg KG i.p.	n = 10
Gruppe 6	Sham + DMSO 50% i.p. + GW6471 1 mg/kg KG i.p.	n = 10
Gruppe 7	CASP + DMSO 50% i.p. + DMSO 5% i.p.	n = 10
Gruppe 8	CASP + Gemfibrozil 100 mg/kg KG i.p. + DMSO 5% i.p.	n = 10
Gruppe 9	CASP + Gemfibrozil 30 mg/kg KG i.p. + DMSO 5% i.p.	n = 10
Gruppe 10	CASP + Gemfibrozil 100 mg/kg KG i.p. + GW6471 1 mg/kg KG i.p.	n = 10
Gruppe 11	CASP + Gemfibrozil 30 mg/kg KG i.p. + GW6471 1 mg/kg KG i.p.	n = 10
Gruppe 12	CASP + DMSO 50% i.p. + GW6471 1 mg/kg KG i.p.	n = 10

**Tabelle 1: Gruppeneuteilung der Versuchstiere**

Zuordnung der Versuchstieren zu den 12 Versuchsgruppen mit entsprechender Voroperation (CASP- oder Sham-OP) und Vorbehandlung mit Gemfibrozil (30 mg/kg KG i.p., 100 mg/kg KG i.p.); DMSO (50 % i.p., 5 % i.p.); GW6471 (1 mg/kg KG i.p). DMSO als Trägersubstanz für Gemfibrozil und GW6471. Anzahl Versuchstiere pro Gruppe n = 10; Anzahl Versuchstiere insgesamt n = 120; mg = Milligramm; kg = Kilogramm; KG = Körpergewicht; i.p. = intraperitoneal.

### 2.1.4 CASP-Operation

Zur Induktion einer abdominellen Sepsis wurde das bereits etablierte Modell der *Colon ascendens Stent Peritonitis* (CASP-Modell) nach Traeger et al. verwendet<sup>88</sup>. Die Operation wurde 24 Stunden nach Applikation der Medikamente durchgeführt. Zur Analgesie wurde sowohl prä- als auch postoperativ Buprenorphin 0,05 mg/kg KG aufgelöst in einer 0,6 ml Natriumchlorid-Lösung *subcutan* verabreicht. Vor Beginn der Operation wurde das Gewicht des Versuchstieres ermittelt. Zur Einleitung der Kurznarkose wurde mittels Glasglocke das volatile Anästhetikum Sevofluran verabreicht und im Folgenden die Narkose unter Sevofluran aufrechterhalten. Das Versuchstier wurde auf einer Wärmematte gelagert und unter sterilen Bedingungen die Desinfektion des Operationsgebietes durchgeführt. Zunächst erfolgte eine 2 cm lange mediane Laparotomie zur Eröffnung der Bauchhöhle, darauffolgend wurde das *Caecum* für die weitere Operation vorverlagert. Mittels zweier Venenverweilkanülen (16G) wurde das Colon punktiert und anschließend die verbleibenden Stents fixiert. Durch leichten Druck auf das Colon wurde *Faeces* durch die Stents in die freie Bauchhöhle bewegt und so eine kontinuierliche Bakterientranslokation gewährleistet. Nach Reposition des *Caecums* wurden 5 ml Natriumchloridlösung zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes appliziert und die Bauchdecke wieder verschlossen.



**Abb. 1: CASP-Operation und Sham-Operation**

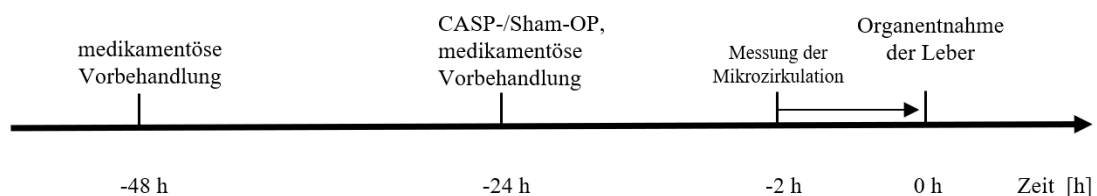
Die Abbildung zeigt den Unterschied zwischen der CASP-Operation und der Sham-Operation. Bei Ersterer penetriert der Stent das *Colon ascendens*, während er bei der Sham-Operation nur an die Darmwand angenäht wird. CASP = *Colon ascendens stent peritonitis*; Sham = sterile Laparotomie. Schematische Darstellung orientierend an Zantl, et al.<sup>89</sup>

Das Durchführen einer Sham-Operation ermöglichte es, vergleichbare Bedingungen zwischen den Kohorten zu schaffen. Die Bauchhöhle wurde auch hier eröffnet, der Stent allerdings nur auf die Darmwand aufgenäht, ohne das Colon zu penetrieren (siehe Abb. 1). Die mechanische

Beanspruchung durch eine sterile Laparotomie war somit in beiden Gruppen gegeben und der Unterschied belief sich allein auf die Induktion der Sepsis.

### 2.1.5 Versuchsablauf

Postoperativ wurden die Versuchstiere in regelmäßigen Abständen analgesiert und mit Flüssigkeit versorgt. Alle 6-8 Stunden erfolgte die klinische Beurteilung der Tiere anhand des *Septic Rat Severity Scores* (s. Anhang). Der *Score* dient der objektiven Einschätzung der Ausprägung der Sepsis und ordnet die klinischen Symptome einem Punktesystem zu. Bei einem *Score*  $\geq 10$  Punkten wurde das Versuchstier mittels Pentobarbital euthanasiert. 24 Stunden nach der CASP- bzw. Sham-Operation erfolgte die Re-Laparotomie zwecks Organentnahme. Zuvor wurde in einer zweistündigen Messung unter Narkose die Mikrozirkulation in der Leber gemessen (siehe Abb. 2). Die Messung erfolgte mithilfe der Reflektionsspektroskopie und ist Gegenstand eines weiteren Promotionsprojektes. Die Versuchstiere wurden vor der Narkose zunächst erneut gewogen und analgesiert (Buprenorphin 0,05 mg/kg KG *subcutan*) und nach Abschluss der zweistündigen Mikrozirkulationsmessung standardgemäß und schmerzfrei über die *Arteria carotis externa* exsanguiniert. Im Folgenden wurde der rechte Leberlappen zur weiteren Bearbeitung entnommen.



**Abb. 2: schematische Darstellung des Versuchsablaufs**

Die medikamentöse Vorbehandlung erfolgte 48 und 24 Stunden vor Organentnahme. Die CASP- bzw. Sham-Operation wurde 24 Stunden vor Organentnahme durchgeführt. Messung der Mikrozirkulation unter Narkose 2 Stunden vor Organentnahme bis zum Zeitpunkt 0. Organentnahme zum Zeitpunkt 0. Zeit in Stunden [h].

## 2.2 Laborexperimenteller Versuchsteil

### 2.2.1 Anmerkung zu den verwendeten Materialien, Geräten und Chemikalien

Eine detaillierte Auflistung der im Versuchsablauf verwendeten Materialien, Geräte und Chemikalien befindet sich im Anhang.

### 2.2.2 Organentnahme und Homogenatherstellung

Für weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel die Bestimmung der Malondialdehydkonzentration in der Leber, wurde ein Teil des Gewebes separat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die verbleibende Gewebeprobe wurde sofort in ein mit Isolationspuffer gefülltes Becherglas gegeben und auf Eis gekühlt, um die Funktionsfähigkeit der Zellorganellen zu konservieren. Zur weiteren Verarbeitung des Gewebes wurde ein Verdünnungsverhältnis von 1:10 angestrebt. Hierfür wurde das Gewebe zunächst auf 1 g abgewogen und mit einer Schere in circa 2 mm große Stücke zerkleinert. Um das Lebergewebe von Blutbestandteilen zu trennen wurde es zweimal mit Isolationspuffer gespült und der Überstand abgegossen. Abschließend wurde das Verhältnis von 1:10 durch erneute Zugabe von Pufferlösung erreicht. Zur Herstellung des Homogenates diente ein elektrisches Rührwerk (Typ IKA Eurostar 20 digital), welches das zerkleinerte Gewebe in einem Glasbehälter bei 2000 rpm homogenisierte. Anschließend wurde das Homogenat durch eine keimarme Kompresse gesiebt und die Zellsuspension in einem 50 ml Falcon aufgefangen. Während des gesamten Prozesses wurde das Lebergewebe kontinuierlich auf Eis gekühlt.

### 2.2.3 Proteinbestimmung in der Leber

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in dem zu untersuchenden Leberhomogenat wurde die Methode nach Lowry verwendet<sup>90</sup>. Die dabei ermittelte Proteinkonzentration diente als Grundlage für die darauffolgende respirometrische Messung der mitochondrialen Funktion. Die Proteinbestimmung nach Lowry besteht aus einer Biuretreaktion und einer Reduktion von Kupferionen, die in einem weiteren Schritt einen Farbumschlag bewirkt. Im Zuge der Biuretreaktion bilden Peptidbindungen mit Kupferionen Farbkomplexe in alkalischen Lösungen. Cu(I), welches durch die Reduktion zweiwertiger Kupferionen (Cu II) entsteht, kann darauffolgend das gelbe Folin-Ciocalteu reduzieren und es entsteht Molybdänblau. Die Extinktion der Lösung lässt sich photometrisch bestimmen. Die Proteinkonzentration wird dann in Relation zu einer Standardverdünnungsreihe mit definierter Proteinkonzentration von bovinem Serumalbumin bestimmt.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Dreifachbestimmung der Leberproben durchgeführt. Das Homogenat wurde zunächst im Verhältnis 1:100 mit *Aqua dest.* verdünnt. Als Standardreihe wurde bovines Serumalbumin mit *Aqua dest.* in definiertem Konzentrationsverhältnis verwendet (s. Anhang). Sowohl den Proben als auch der Standardreihe wurden je 100 µl entnommen und mit 500 µl Lösung 1 gemischt (Zusammensetzung s. Anhang). Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur konnten je 50 µl Lösung 2 (Zusammensetzung s. Anhang) hinzugegeben werden und eine weitere Inkubationszeit von 30 Minuten erfolgte. Danach wurden sowohl die Standardreihe als auch die drei Proben in einer

Doppelbestimmung mit jeweils 200 µl pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte am *Multi-Detection Microplate Reader Synergy™2* mit der Software Gen5 Version 1.11.5 bei einer Wellenlänge von 750 nm.

#### 2.2.4 Respirometrische Messung

Das Verfahren der Respirometrie ermöglicht die Ermittlung der mitochondrialen Aktivität anhand der Sauerstoffkonzentration und der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches während der oxidativen Phosphorylierung. Im Zuge der respirometrischen Messung können so die basale (*State 2*) und die maximale (*State 3*) Geschwindigkeit des O<sub>2</sub>-Verbrauches gemessen, sowie die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung (ADP/O Ratio) berechnet werden.

Zur polarographischen Messung wurde ein System der Firma *Strathkelvin Instruments* verwendet. Es besteht aus einer hermetisch verschlossenen Kammer, welche mit konstant 30 °C warmem Wasser umspült wird (Mitocell MT200A) und einer *Clark-Type* Elektrode (Typ 1302). Die Elektrode dient als elektrochemischer Sensor und erfasst die Sauerstoffkonzentration in einer Lösung. Durch Zugabe von verschiedenen Substanzen über eine kleine Öffnung im Verschlussstopfen lassen sich so die einzelnen Stadien der Atmungskette imitieren. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufes ist in Tabelle 2 und 3 zu sehen. Vor Versuchsbeginn wurde zunächst eine Kalibrierung der Elektrode mit *Aqua dest.* und einer Natriumsulfit-Lösung durchgeführt, um Richtwerte für die maximale und minimale Sauerstoffkonzentration zu ermitteln. Die bestmögliche Sauerstofflöslichkeit wurde basierend auf den Herstellerangaben bei 223 µmol O<sub>2</sub>·l<sup>-1</sup> bei 30 °C angenommen. Die Respirationsraten wurden kontinuierlich mittels Strathkelvin Oxygen System 787 Version 4.4 aufgezeichnet und in nmol/min/mg Protein angegeben. Um eine konstante Proteinmenge von 4 mg/ml in der Messkammer zu erzielen, wurde das Leberhomogenat in einem zuvor ermittelten Mischverhältnis mit Respirationspuffer gebracht (Zusammensetzung s. Anhang) und 550 µl in die hermetisch verschlossene Messkammer gegeben. Unter kontinuierlichem Durchmischen mit einem Magnetrührer wurden nun die Sauerstoffkonzentration und der Sauerstoffverbrauch aufgezeichnet. Nach einer Minute wurden mithilfe einer Spritze je 2,5 mM Malat und 2,5 mM Glutamat unter Sicht in die Kammer gegeben, welche als Substrate für den Komplex I der Atmungskette dienen. Malat dient dem Transport der Elektronen des Reduktionsäquivalenten NADH über die innere Mitochondrienmembran und Glutamat dient zur Aufrechterhaltung des Transportes über die Membran. Zur Messung des Komplex II wurde zunächst der Komplex I der Atmungskette durch 0,5 µM Rotenon gehemmt und dann 10 mM Succinat hinzugegeben. Succinat bildet hier die Schnittstelle zum Citratzyklus und liefert über die gekoppelte Oxidation von Succinat zu Fumarat und Reduktion von Flavinadenindinukleotid (FAD) zu FADH<sub>2</sub> die Reduktionsäquivalente für den Komplex II. Zur Bestimmung der maximalen Geschwindigkeit

der Atmungskette wurde nach 2 Minuten 250  $\mu\text{M}$  ADP hinzugegeben und so die Umwandlung in ATP und die oxidative Phosphorylierung stimuliert. Bei gleichzeitig fallender Sauerstoffkonzentration wurde die Messung nach Abflachen der Sauerstoffverbrauchskurve beendet.

Zeitverlauf (min.)	Substrat
0:00	Leberhomogenat + Respirationspuffer
1:00	Glutamat + Malat
2:00	ADP
3:30	Messung beenden

**Tabelle 2: Versuchsablauf der respiratorischen Messung für Komplex I**

Es wird der beispielhafte Messdurchlauf einer Messung für den Komplex I der Atmungskette dargestellt. Im zeitlichen Abstand von einer Minute wurden Glutamat und Malat als Substrate für Komplex I und ADP zur Messung der maximalen Geschwindigkeit der Atmungskette in *State 3* hinzugegeben. Zeit in Minuten [min.].

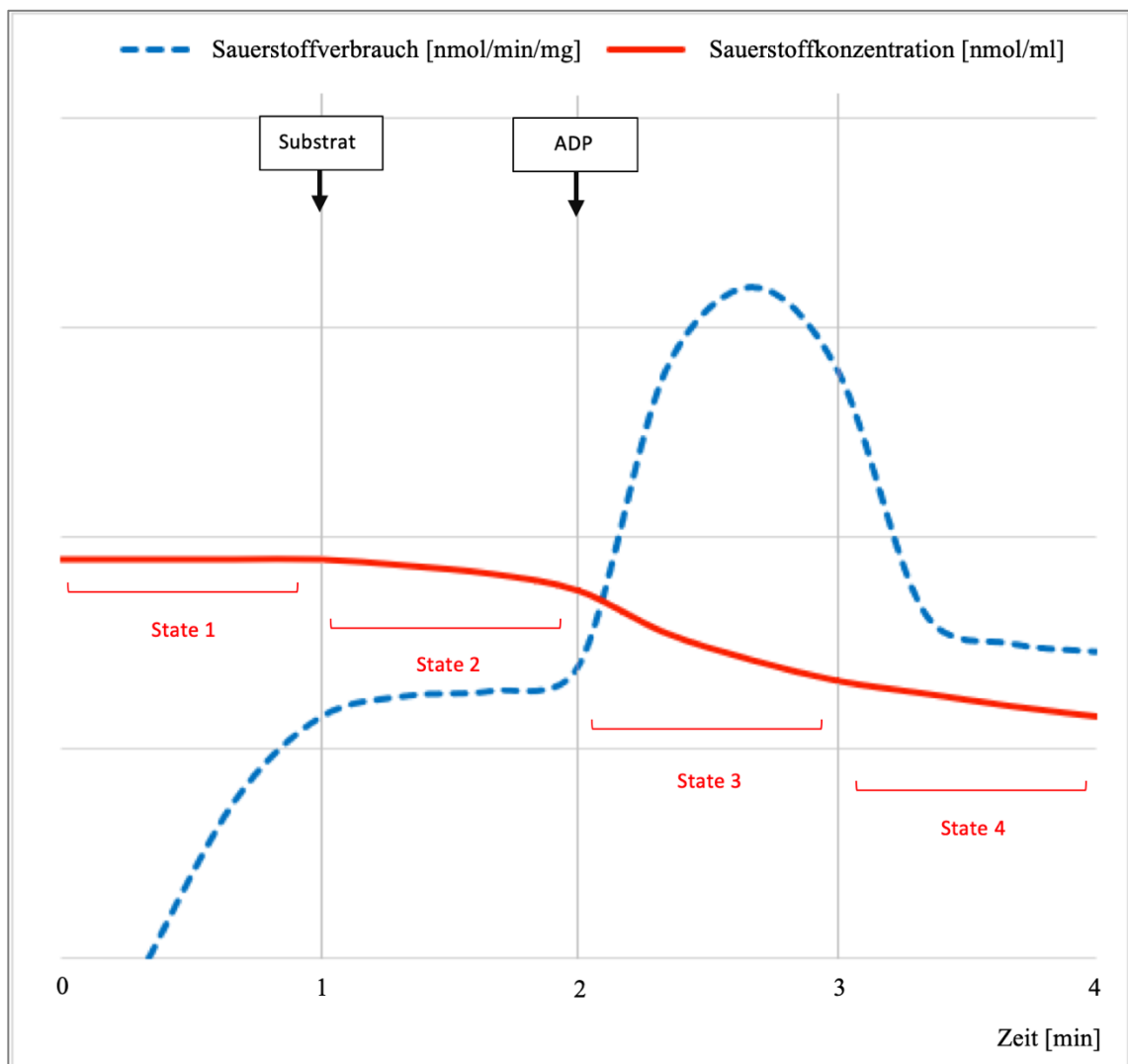
Zeitverlauf (min.)	Substrat
0:00	Leberhomogenat + Respirationspuffer + Rotenon
1:00	Succinat
2:00	ADP
3:30	Messung beenden

**Tabelle 3: Versuchsablauf der respiratorischen Messung für Komplex II**

Die Messung für den Komplex II der Atmungskette erfolgte analog zu dem in Tabelle 2 dargestellten Messdurchlauf für Komplex I. Abweichend wurde zu Beginn der Messung Rotenon hinzugegeben, um den Komplex I der Atmungskette zu hemmen. Succinat wurde an dieser Stelle als Substrat für Komplex II verabreicht. Zeit in Minuten [min.].

Die in der respirometrischen Messung gewonnenen Daten konnten in Stadien unterteilt werden. Hierbei dienten die 1956 erstmalig nach Chance und Williams beschriebenen Respirationsstadien und die später durch Ferguson und Nicholls überarbeiteten mitochondrialen Stadien der Respirometrie als Orientierung<sup>91,92</sup>. Die alleinige Messung der Zellsuspension ohne Angebot von Substrat oder ADP wurde durch *State 1* beschrieben. Die Zugabe von Substraten (Glutamat + Malat oder Succinat) in die Messkammer und die Messung der basalen Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches in Abwesenheit von ADP entsprach dem *State 2* nach Ferguson und Nicholls. In *State 3* wurde nach Zugabe von ADP die maximale Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches erzielt. Mit abfallender ADP-Konzentration kam es zur Verlangsamung der mitochondrialen Atmung (*State 4*) und zu einer Reduktion des Sauerstoffangebotes, was im

Endeffekt die mitochondriale Funktion limitierte (*State 5*). Aus dem Verhältnis von hinzugefügtem ADP zu verbrauchtem Sauerstoff ließ sich die ADP/O Ratio als Maß für die ATP-Synthese und damit die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung ermitteln. Die RCR (*Respiratory Control Ratio*), welche sich aus dem Quotienten von *State 3* / *State 2* ergibt, gab Aufschluss über die Kopplung des Elektronentransportes im Zuge der Atmungskette an die oxidative Phosphorylierung. Zur Verdeutlichung der respiratorischen Stadien in Bezug auf den Versuchsablauf und der daraus erhobenen mitochondrialen Funktionsparameter dient Abbildung 3.



**Abb. 3: Stadien der Respirometrie**

Substrat für Komplex I: Glutamat + Malat; Substrat für Komplex II: Succinat; *State 1*: Geschwindigkeit des  $O_2$  – Verbrauches ohne Zugabe von Substrat oder ADP; *State 2*: basale Geschwindigkeit des  $O_2$  – Verbrauches; *State 3*: maximale Geschwindigkeit des  $O_2$  – Verbrauches; *State 4*: Geschwindigkeit des  $O_2$  – Verbrauches mit zunehmendem ADP – Verbrauch; Zeit in Minuten [min];  $O_2$  – Verbrauch in nmol/min/mg;  $O_2$  – Konzentration in nmol/ml. Schematische Darstellung orientierend an Nicholls und Ferguson<sup>92</sup>.



Zum Ausschluss aufbereitungsbedingter Beschädigungen der Mitochondrien wurden zusätzlich Kontrollmessungen für Komplex I und II durchgeführt. Die Zugabe von 2,5  $\mu\text{M}$  Cytochrom C ermöglichte Aufschluss über die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran. Wurde nach Applikation von Cytochrom C kein zusätzlicher entkoppelter Fluss über die Membran beobachtet, ließ sich dadurch ein Defekt in der äußeren Mitochondrienmembran ausschließen. Oligomycin, als Hemmstoff des Komplex V, lieferte in einer Dosis von 0,05  $\mu\text{g/ml}$  Informationen über die Integrität der inneren Mitochondrienmembran. Durch Hemmung der ATP-Synthase konnte ein mögliches Protonen-Leck über die Membran detektiert werden und im Umkehrschluss auf intakte Mitochondrien geschlossen werden. Des Weiteren konnte durch die Gabe von 0,5  $\mu\text{M}$  CCCP und somit Entkopplung der Atmungskette der maximale Sauerstoffverbrauch ohne ATP-Erzeugung gemessen werden. 2,5  $\mu\text{M}$  Antimycin A hemmte den Komplex III und diente der Messung des nicht-respirationsbedingten Sauerstoffverbrauches. Hier wurde der  $\text{O}_2$ -Verbrauch von Enzymen außerhalb der Atmungskette bestimmt<sup>93</sup>.

### 2.2.5 Malondialdehydbestimmung in der Leber

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können im Zuge oxidativen Stresses unter anderem Fettsäuren angreifen und so Strukturen schädigen<sup>94</sup>. Als Biomarker für oxidativen Stress eignet sich Malondialdehyd (MDA), welches als Abbauprodukt bei der Lipidperoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren entsteht. In der Reaktion von einem Molekül MDA mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure (TBA) bildet sich ein rosafarbener Farbstoff, dessen Extinktion in Photometer gemessen werden kann. Als Bezug werden die Extinktionswerte einer MDA-Standardreihe (Standardreihe s. Anhang) gemessen. Die Menge an MDA wird in Anlehnung an die Proteinkonzentration bestimmt und dann in nmol MDA / mg Protein angegeben<sup>95</sup>.

Zur Messung der Leberproben wurden 50  $\mu\text{g}$  Gewebe, welches bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren war, mit 500  $\mu\text{l}$  1,15 %iger Kaliumchlorid Lösung (KCl) homogenisiert und auf Eis gestellt. 250  $\mu\text{l}$  der Probe wurden mit 1,5 ml 1 %iger Phosphorsäure und 500  $\mu\text{l}$  0,6 %iger Thiobarbitursäure vermischt und anschließend für 45 Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden je 2 ml 1-Butanol zu der Probe hinzugegeben und das Gemisch bei 2465  $\text{cm}^{-1}$  15 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der dabei entstandene rosafarbene Überstand wurde im Verhältnis 1:1 mit Kaliumchlorid Lösung verdünnt und dann als Doppelbestimmung von je 200  $\mu\text{l}$  in eine 96-Well Platte pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 535 und 520 nm Wellenlänge und wurde anschließend in Verhältnis zu der nach Lowry bestimmten Proteinmenge der Probe gesetzt. Sowohl die Proteinbestimmung nach Lowry<sup>90</sup> als auch der TBA-Assay wurden photometrisch am *Multi-Detection Microplate Reader Synergy*<sup>TM</sup>2 mit der Software Gen5 Version 1.11.5 ausgewertet.

### **2.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mithilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism® 8.0. Als Test auf Normalverteilung diente der Kolmogorov-Smirnov Test. Anschließend wurde ein Kruskal-Wallis Test auf Unterschiedlichkeit der Gruppen durchgeführt und ein Post-hoc Test nach Dunn angeschlossen, um die Unterschiede der einzelnen Gruppen untereinander zu ermitteln. Es wurden Unterschiede innerhalb der Sham- und CASP-Gruppen ermittelt und ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte ebenfalls mittels GraphPad Prism® 8.0. Eine Illustration durch Box-Whisker-Plots wurde gewählt und die Ergebnisse als Minimum/ Median/ Maximum beschrieben.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Effekt von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion in der Leber im Sham- und CASP-Modell**

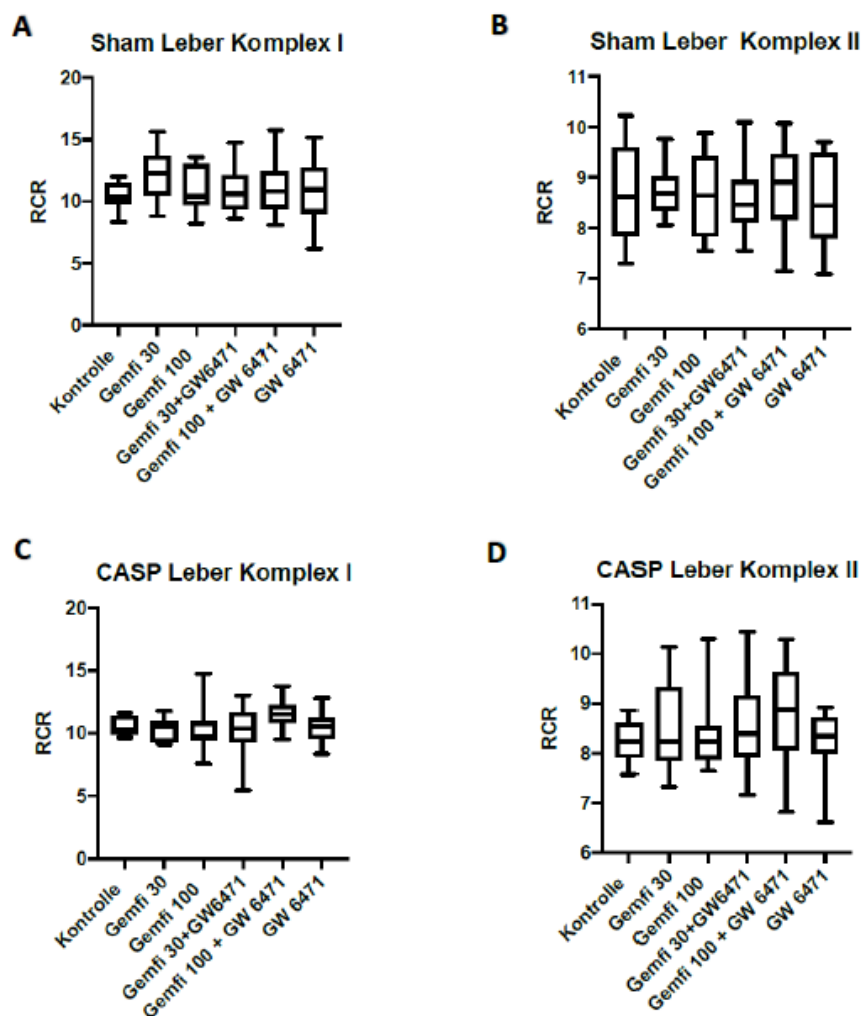
##### **3.1.1 Effekt von Gemfibrozil auf die RCR in der Leber im Sham- und CASP-Modell**

Die *Respiratory Control Ratio* (RCR) wurde als Parameter für die mitochondriale Funktion bestimmt und beschreibt die Kopplung des Elektronentransportes im Zuge der Atmungskette an die oxidative Phosphorylierung. Die Abbildung 4 A-D stellt die Messergebnisse dar.

Sowohl für Komplex I (siehe Abb. 4 A), als auch für Komplex II (siehe Abb. 4 B) der Sham-operierten Tiere zeigte die RCR keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Kontrollgruppe; Gemfibrozil 30 mg/kg; Gemfibrozil 100 mg/kg; Gemfibrozil 30 mg/kg + GW6471 1 mg/kg; Gemfibrozil 100 mg/kg + GW6471 1 mg/kg; GW6471 1 mg/kg).

Bei den septischen Versuchstieren zeigte sich ebenfalls keine signifikante Veränderung der RCR für Komplex I (siehe Abb. 4 C) und II (siehe Abb. 4 D) zwischen den einzelnen Gruppen.

Insgesamt lagen die Werte der RCR sowohl für Komplex I als auch für Komplex II der Sham- und CASP-Kohorten in einem ähnlichen Spektrum. Eine detaillierte Darstellung der RCR-Werte für beide Komplexe im Sham- und CASP-Modell findet sich in Tabellen 4 und 5.



**Abb. 4: RCR im Sham- und CASP-Modell der Leber**

*Respiratory Control Ratio* (RCR) der Sham-operierten Tiere für Komplex I (A) und Komplex II (B), sowie der CASP-operierten Tiere für Komplex I (C) und Komplex II (D). Darstellung der Werte als Box-Whisker-Plots mit Minimum, Median, Maximum und Interquartilsabstand (25. bis 75. Perzentile); Kohorten mit Vorbehandlung gemäß Schema, n = 10.

RCR Komplex I	Kontrolle		Gemfibrozil 30		Gemfibrozil 100		Gemfibrozil 30+GW6471		Gemfibrozil 100+GW6471		GW6471	
	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP
Minimum	8,33	9,65	8,8	9,14	8,23	7,57	8,59	5,44	8,12	9,53	6,17	8,34
Median	10,35	10,26	12,26	10,52	10,43	9,8	10,61	10,39	10,81	11,52	10,95	10,53
Maximum	12,01	11,61	15,61	11,76	13,58	14,76	14,76	13,02	15,74	13,72	15,18	12,8

**Tabelle 4: Vergleich der RCR des Komplex I im Sham- und CASP-Modell**

Tabellarische Gegenüberstellung der *Respiratory Control Ratio* (RCR) für Komplex I der Sham-operierten Tiere und der CASP-operierten Tiere in den einzelnen Kohorten. Angaben der Werte als Minimum, Median und Maximum. Dosierung von Gemfibrozil und GW6471 in mg/kg Körpergewicht.

RCR Komplex II	Kontrolle		Gemfibrozil 30		Gemfibrozil 100		Gemfibrozil 30+GW6471		Gemfibrozil 100+GW6471		GW6471	
	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP
Minimum	7,3	7,57	8,05	7,32	7,54	7,64	7,54	7,17	7,14	6,81	7,09	6,61
Median	8,62	8,24	8,68	8,25	8,64	8,24	8,46	8,39	8,9	8,87	8,44	8,35
Maximum	10,22	8,86	9,76	10,14	9,88	10,3	10,09	10,45	10,07	10,29	9,7	8,92

**Tabelle 5: Vergleich der RCR des Komplex II im Sham- und CASP-Modell**

Tabellarische Gegenüberstellung der *Respiratory Control Ratio* (RCR) für Komplex II der Sham-operierten Tiere und der CASP-operierten Tiere in den einzelnen Kohorten. Angaben der Werte als Minimum, Median und Maximum. Dosierung von Gemfibrozil und GW6471 in mg/kg Körpergewicht.

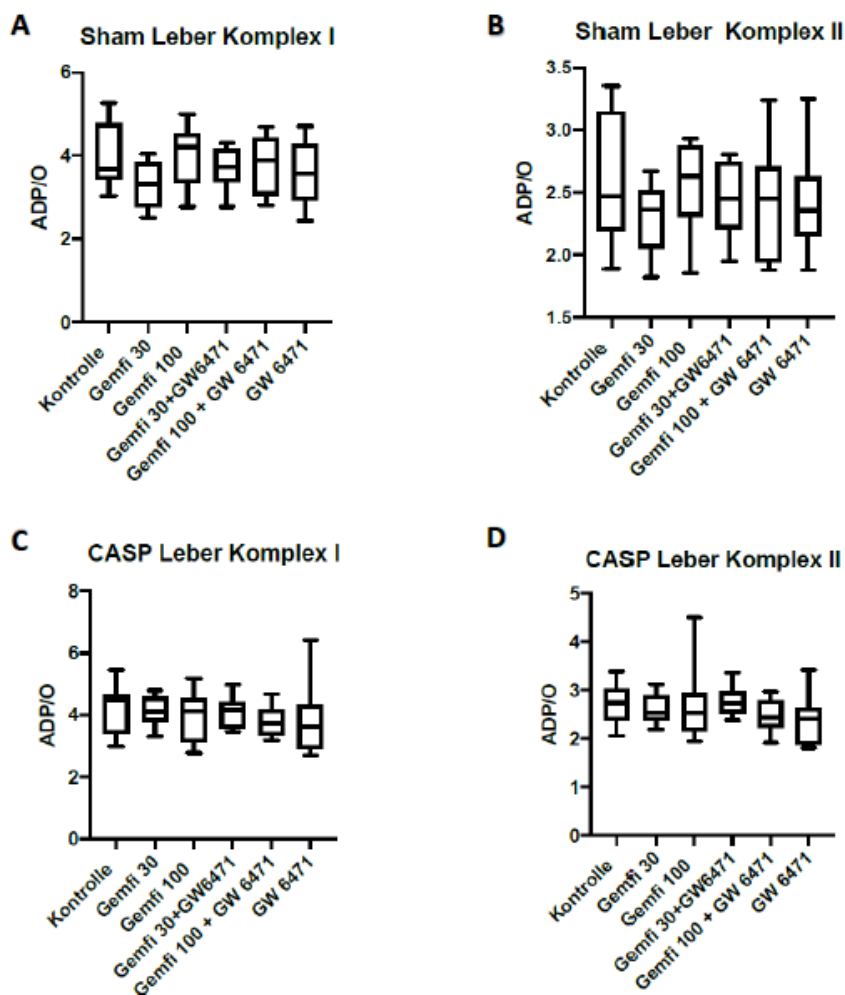
### 3.1.2 Effekt von Gemfibrozil auf den ADP/O-Quotienten in der Leber im Sham- und CASP-Modell

Als Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung wurde der ADP/O-Quotient bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 A-D dargestellt.

Der ADP/O-Quotient der Sham-operierten Tiere wies keine signifikante Veränderung zwischen den einzelnen Gruppen (Kontrollgruppe; Gemfibrozil 30 mg/kg; Gemfibrozil 100 mg/kg; Gemfibrozil 30 mg/kg + GW6471 1 mg/kg; Gemfibrozil 100 mg/kg + GW6471 1 mg/kg; GW6471 1 mg/kg) für Komplex I auf (siehe Abb. 5 A). Auch für Komplex II ergaben sich keine signifikanten Unterschiede des ADP/O-Quotienten der einzelnen Gruppen (siehe Abb. 5 B).

Im CASP-Modell wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied des ADP/O-Quotienten zwischen den einzelnen Gruppen gezeigt. Sowohl für Komplex I (siehe Abb. 5 C) als auch für Komplex II (siehe Abb. 5 D) blieb der ADP/O-Quotient unverändert.

Insgesamt lagen die Werte des ADP/O-Quotienten der Sham- und der CASP-Kohorten sowohl für Komplex I als auch für Komplex II in einem ähnlichen Spektrum. In den Tabellen 6 und 7 werden die Werte des ADP/O-Quotienten beider Komplexe im Sham- und CASP-Modell detailliert dargestellt.



**Abb. 5: ADP/O-Quotient im Sham- und CASP-Modell der Leber**

ADP/O-Quotient der Sham-operierten Tiere für Komplex I (A) und Komplex II (B), sowie der CASP-operierten Tiere für Komplex I (C) und Komplex II (D). Darstellung der Werte als Box-Whisker-Plots mit Minimum, Median, Maximum und Interquartilsabstand (25. bis 75. Perzentile); Kohorten mit Vorbehandlung gemäß Schema, n = 10.

ADP/O Komplex I	Kontrolle		Gemfibrozil 30		Gemfibrozil 100		Gemfibrozil 30+GW6471		Gemfibrozil 100+GW6471		GW6471	
	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP
Minimum	3,03	3	2,51	3,31	2,78	2,77	2,78	3,46	2,82	3,18	2,44	2,68
Median	3,68	4,48	3,33	4,1	4,23	4,13	3,73	4,17	3,88	3,74	3,57	3,62
Maximum	5,26	5,46	4,04	4,8	4,99	5,17	4,3	4,99	4,7	4,68	4,72	6,43

**Tabelle 6: Vergleich der ADP/O-Werte für Komplex I im Sham- und CASP-Modell**

Tabellarische Gegenüberstellung der ADP/O-Quotienten für Komplex I der Sham-operierten Tiere und der CASP-operierten Tiere in den einzelnen Kohorten. Angaben der Werte als Minimum, Median und Maximum. Dosierung von Gemfibrozil und GW6471 in mg/kg Körpergewicht.

ADP/O Komplex II	Kontrolle		Gemfibrozil 30		Gemfibrozil 100		Gemfibrozil 30+GW6471		Gemfibrozil 100+GW6471		GW6471	
	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP
Minimum	1,89	2,06	1,82	2,19	1,85	1,95	1,95	2,38	1,88	1,92	1,88	1,81
Median	2,47	2,75	2,36	2,54	2,63	2,55	2,45	2,73	2,45	2,45	2,36	2,41
Maximum	3,35	3,39	2,67	3,13	2,93	4,5	2,8	3,37	3,24	2,97	3,25	3,42

**Tabelle 7: Vergleich der ADP/O-Werte für Komplex II im Sham- und CASP-Modell**

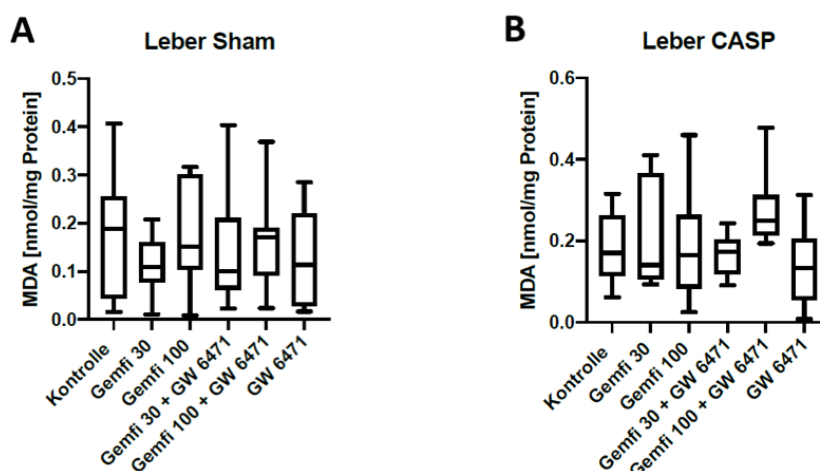
Tabellarische Gegenüberstellung der ADP/O-Quotienten für Komplex II der Sham-operierten Tiere und der CASP-operierten Tiere in den einzelnen Kohorten. Angaben der Werte als Minimum, Median und Maximum. Dosierung von Gemfibrozil und GW6471 in mg/kg Körpergewicht.

### 3.2 Effekt von Gemfibrozil auf die MDA-Konzentration in der Leber im Sham- und CASP-Modell

Zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies in der Leber im Sham- und CASP-Modell wurde die MDA-Konzentration als Marker für den oxidativen Stress im Lebergewebe bestimmt. Die MDA-Menge wurde in nmol/ mg Protein angegeben. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der MDA-Konzentration zwischen der Kontrollgruppe und den mit Gemfibrozil 30 mg/kg und 100 mg/kg behandelten Sham-Tieren. Auch die Kohorten mit gleichzeitiger oder alleiniger Applikation des selektiven PPAR $\alpha$ -Antagonisten GW6471 (1 mg/kg) zeigten keine signifikante Veränderung in der MDA-Konzentration (siehe Abb. 6 A).

Im CASP-Modell der Leber zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Menge an MDA zwischen der Kontrollgruppe und den mit Gemfibrozil (30 mg/kg; 100 mg/kg) bzw. Gemfibrozil (30 mg/kg; 100 mg/kg) und GW6471 (1 mg/kg) behandelten Tieren. Auch die Kohorte der alleinigen Applikation von GW6471 (1 mg/kg) zeigte keine signifikante Veränderung der MDA-Konzentration im Vergleich (siehe Abb. 6 B).

Sowohl in den Kohorten der Sham-operierten Tiere, als auch in den septischen Versuchsgruppen lagen die Werte für MDA in einem ähnlichen Spektrum und wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Die MDA-Konzentrationen der einzelnen Sham- und CASP-Kohorten sind in Tabelle 8 als Minimum, Median und Maximum in nmol/mg Protein aufgeführt.



**Abb. 6: MDA-Konzentration im Sham- und CASP-Modell der Leber**

MDA-Konzentration der Sham-operierten Tiere (A) und der CASP-operierten Tiere (B) in nmol/mg Protein. Darstellung der Werte als Box-Whisker-Plots mit Minimum, Median, Maximum und Interquartilsabstand (25. bis 75. Perzentile). (**6 A** Sham: Kontrolle n = 9; Gemfibrozil 30 mg/kg n = 10; Gemfibrozil 100 mg/kg n = 9; Gemfibrozil 30 mg/kg + GW6471 1 mg/kg n = 10; Gemfibrozil 100 mg/kg + GW6471 1 mg/kg n = 10; GW6471 1 mg/kg n = 10. **6 B** CASP: Kontrolle n = 10; Gemfibrozil 30 mg/kg n = 9; Gemfibrozil 100 mg/kg n = 10; Gemfibrozil 30 mg/kg + GW6471 1 mg/kg n = 10; Gemfibrozil 100 mg/kg + GW6471 1 mg/kg n = 10; GW6471 1 mg/kg n = 9).

MDA [nmol/mg Protein]	Kontrolle		Gemfibrozil 30		Gemfibrozil 100		Gemfibrozil 30+GW6471		Gemfibrozil 100+GW6471		GW6471	
	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP	Sham	CASP
Minimum	0,016	0,062	0,011	0,093	0,009	0,025	0,023	0,091	0,024	0,194	0,017	0,008
Median	0,189	0,171	0,110	0,141	0,151	0,166	0,100	0,173	0,171	0,250	0,114	0,134
Maximum	0,407	0,316	0,208	0,411	0,317	0,460	0,404	0,243	0,369	0,478	0,285	0,313

**Tabelle 8: Vergleich der MDA-Konzentrationen in den Sham- und CASP-Kohorten**

Tabellarische Gegenüberstellung der MDA-Konzentrationen der Sham-operierten Tiere und der CASP-operierten Tiere in den einzelnen Kohorten. MDA-Konzentration in nmol/mg Protein. Angaben der Werte als Minimum, Median und Maximum. Dosierung von Gemfibrozil und GW6471 in mg/kg Körpergewicht.



## 4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Wirkung des Fibrats Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion in der Leber unter septischen und nicht-septischen Bedingungen untersucht werden. Hierzu wurde entweder mittels *Colon Ascendens Stent Peritonitis* (CASP) eine Sepsis induziert oder mithilfe einer sterilen Laparotomie (Sham) nicht-septische Kontroll-Bedingungen geschaffen. Im weiteren Verlauf wurde das Lebergewebe hinsichtlich der mitochondrialen Funktion betrachtet. Ferner galt es zu untersuchen, ob die Wirkung von Gemfibrozil über den PPAR $\alpha$  vermittelt wird. Da die Pathophysiologie der Sepsis ein enges Zusammenspiel von oxidativem Stress und mitochondrialer Funktion aufweist<sup>30 48</sup>, wurde in weiterführenden Experimenten die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies im septischen und Sham-operierten Modell ermittelt.

Folgende Aussagen können im Hinblick auf die Fragestellungen dieser Arbeit getroffen werden:

1. In diesem experimentellen Modell einer Sepsis zeigte die Vorbehandlung mit Gemfibrozil keine signifikanten Effekte auf die Parameter der Mitochondrienfunktion in der Leber. Auch nach einer sterilen Laparotomie blieb die hepatische Mitochondrienfunktion durch die Gabe von Gemfibrozil unbeeinträchtigt.
2. Nach Applikation verschiedener Dosierungen von Gemfibrozil konnten keine signifikanten Unterschiede der Mitochondrienfunktion und oxidativem Stress beobachtet werden, sodass aus den Ergebnissen dieser Arbeit keine konzentrationsabhängige Wirkung von Gemfibrozil hervorgeht.
3. Hinsichtlich der Entstehung von oxidativem Stress beeinflusste Gemfibrozil weder unter septischen Bedingungen noch unter nicht-septischen Bedingungen die Produktion von MDA in der Leber und zeigt somit auch keinen Effekt auf die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies.
4. Durch die zusätzliche Gabe eines selektiven PPAR $\alpha$ -Blockers im Vergleich zur alleinigen Darreichung von Gemfibrozil konnten keine Veränderungen der mitochondrialen Funktion festgestellt werden. Es lassen sich daraus keine Aussagen über PPAR $\alpha$ -vermittelte Effekte von Gemfibrozil ableiten.

### 4.1 Methodendiskussion

#### 4.1.1 Tiermodell und Laborbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die mitochondriale Funktion anhand eines *in vivo* Tiermodells der Ratte untersucht. Hierbei wurde der Einfluss von zuvor *intraperitoneal* appliziertem Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion im septischen Tier sowie unter nicht septischen

Bedingungen untersucht. Studien am Tiermodell lassen sich nicht vollständig auf den menschlichen Organismus übertragen. Da die Sepsisforschung am Menschen jedoch stark limitiert ist und sich auf wenige Gewebe beschränkt, sind alternative Versuchsmodelle notwendig, um die Auswirkungen auf septisch beeinträchtigte Organe zu verstehen<sup>31</sup>. Eine Übersichtsarbeit von Jeger et al. macht deutlich, dass dem Sepsismodell bei Nagern in der Mitochondrienforschung eine hohe Bedeutung zukommt<sup>31</sup>. Einschränkungen hinsichtlich der Übertragbarkeit PPAR $\alpha$ -vermittelter Effekte von Nagern auf den Menschen sind bekannt und betreffen neben der unterschiedlichen Expression von PPAR $\alpha$  in der Leber<sup>96</sup> auch die Regulierung der Peroxisomenproliferation<sup>97</sup>. Cunningham et al. konnten zeigen, dass gerade im Rattenmodell mit einem hohen Ansprechen von Gemfibrozil in der Leber zu rechnen ist<sup>98</sup>. Pharmakologische Unterschiede in der Wirkung von Gemfibrozil zwischen Tier und Mensch könnten auch die Ergebnisse in dieser Studie beeinflusst haben. In einer direkten Gegenüberstellung zeigte der Wirkstoff Clofibrat bei Ratten eine geringere Halbwertszeit und ein schnelleres Anfluten als beim Menschen<sup>99</sup>. Vergleichbare Studien mit Gemfibrozil fehlen bislang. Wenn man jedoch von einem ähnlichen Wirkungsprofil beider Fibrate ausgeht<sup>100</sup>, könnten Unterschiede in der Pharmakokinetik zwischen den Spezies eine mögliche Erklärung für den ausbleibenden Effekt von Gemfibrozil in dieser Arbeit sein.

#### 4.1.2 Operationsverfahren

Zur Nachbildung einer abdominellen Sepsis im Tiermodell wurde in der vorliegenden Arbeit eine CASP-Operation durchgeführt, welche ein etabliertes Verfahren zur Herleitung eines diffusen Entzündungsprozesses darstellt<sup>101 102</sup>. Es existieren eine Vielzahl an experimenteller Methoden, um die menschliche Sepsis im Tiermodell nachzubilden<sup>103</sup>. Die Injektion von Bakterientoxinen (LPS) stellt eine Möglichkeit dar, um einen endotoxischen Schock experimentell herbeizuführen. Dieses Sepsismodell gilt jedoch als ungeeignet, um den natürlichen Verlauf einer generalisierten Infektion zu imitieren<sup>102</sup>. Als alternatives Operationsverfahren zur CASP bietet sich die *Cecal Ligation and Puncture* (CLP) an, wobei sich hier im Vergleich ein eher umschriebener Entzündungsherd bildet und die CASP daher hinsichtlich der Entwicklung einer systemischen Reaktion überlegen ist<sup>102</sup>. Darüber hinaus kann die CASP-induzierte Sepsis mithilfe von Stents verschiedener Durchmesser in ihrer Ausprägung moduliert werden<sup>34 88</sup>. Nicht zuletzt aufgrund dieser guten Steuerbarkeit gilt die CASP als geeignetes Verfahren zur Induktion einer experimentellen Sepsis und Sepsis assoziierten Leberschadens<sup>101 104</sup>.

In den vorliegenden Versuchsreihen wurde neben der CASP zur Sepsisinduktion bei weiteren Kohorten eine Sham-Operation durchgeführt, um den Effekt einer sterilen Laparotomie nachzustellen, ohne dabei eine Sepsis auszulösen. Die Sham-OP ist ein etabliertes Modell, um CASP- mit Kontrollkohorten hinsichtlich der abdominellen Manipulation durch einen operativen

Eingriff vergleichbar zu machen. Wenngleich auch die sterile Laparotomie einen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen hat, sind die Effekte einer CASP-OP vergleichsweise ausgeprägter und lassen so eine Abstufung im Entzündungsgeschehen zwischen beiden Methoden zu<sup>34 101 105</sup>. Der Effekt einer sterilen Laparotomie im Vergleich zu einer CASP-induzierten Sepsis auf die mitochondriale Funktion wurde bereits in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch ein operativ-induziertes Bauchtrauma allein Auswirkungen auf die Mitochondrienfunktion hat, jedoch in geringerem Ausmaß als eine moderate abdominale Sepsis<sup>34</sup>.

#### 4.1.3 Messung der mitochondrialen Funktion

Ziel dieser Arbeit war es, die mitochondriale Funktion im Lebergewebe zu ermitteln und folglich Aussagen über eine mögliche Beeinflussung der Mitochondrien zu treffen. Hierbei lässt sich die Mitochondrienfunktion anhand verschiedenster Parameter und Messmethoden beurteilen, wodurch die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen eingeschränkt wird<sup>31 106</sup>. Darüber hinaus ist auch der Begriff der *mitochondrialen Dysfunktion* nicht eindeutig definiert und beschreibt vielmehr die Gesamtheit an pathophysiologischen Prozessen in Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung der Mitochondrien<sup>31 93</sup>. Um die mitochondriale Funktion zu messen, wurde die polarographische Messung mittels *Clark-Type* Elektrode genutzt. Obwohl mittels Respirometrie nicht alle mitochondrialen Funktionsparameter erhoben werden können, gelten die RCR und die ADP/O Ratio als aussagekräftiges Maß, um die mitochondriale Funktion für Komplex I und II der Atmungskette getrennt abzubilden<sup>34 93</sup>.

Zur respirometrischen Messung der Lebermitochondrien wurde ein Gewebehomogenat erstellt. In vorangegangenen Studien dieser Arbeitsgruppe konnte die Mitochondrienfunktion unter Verwendung von Homogenaten verschiedener Gewebe bereits im gesunden<sup>79</sup> und septischen<sup>34 105</sup> Tiermodell betrachtet werden. Während der Gebrauch von isolierten Mitochondrien sehr Material- und zeitaufwendig ist, kann bei der Verwendung von Homogenaten das Risiko größerer Mitochondrienverluste vermindert werden<sup>106</sup>. Untersuchungen von Pecinová et al. zeigten zudem, dass die Ergebnisse aus Arbeiten mit Gewebehomogenaten in Bezug auf die mitochondrialen Funktionsparameter vergleichbar mit denen isolierter Mitochondrien sind<sup>106</sup>. Im Zuge der Homogenisierung ist es dennoch möglich, dass einzelne Mitochondrien beschädigt werden und somit die respirometrischen Messungen beeinflussen. Um eine potentielle Verfälschung der Ergebnisse durch mechanisch geschädigte Mitochondrien auszuschließen, wurden daher in jeder Versuchsreihe die in Abschnitt 2.2.4 erläuterten Kontrollversuche durchgeführt. Übersichtsarbeiten, wie die von Jeger et al. weisen auf eine gewisse Anfälligkeit der Mitochondrien auf externe Einflussfaktoren hin, die es bei der Betrachtung der respirometrischen Ergebnisse zu berücksichtigen gilt<sup>31</sup>. Es ergeben sich unter anderem Einschränkungen in der

Übertragbarkeit der erhobenen Daten auf den Menschen, da die mitochondriale Funktion nicht unter körperphysiologischen Temperaturen durchgeführt wurde, sondern nach standardisierter Messmethodik unter 30° Celsius ermittelt wurde.

#### 4.1.4 Gemfibrozil im Vergleich mit weiteren PPAR-Agonisten

Wie zuvor in Abschnitt 1.6 erwähnt, sind pleiotrope Effekte von PPAR $\alpha$ -Agonisten wie Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion bekannt, wobei deutlich wird, dass sich die Vertreter dieser Wirkstoffklasse hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Mitochondrienfunktion unterscheiden<sup>80</sup>. Im direkten Vergleich der Medikamente untereinander, beeinträchtigten Fibrate die Mitochondrienfunktion in geringerem Ausmaß als Statine oder Thiazolidindione<sup>107</sup>. Auch innerhalb der Wirkstoffklasse der Fibrate lassen sich Unterschiede feststellen, sodass Gemfibrozil ein vergleichsweise schwächeres hemmendes Potential aufweist<sup>84,87</sup>. Ebenfalls zeigte Gemfibrozil eine geringere Bindungsaffinität am PPAR $\alpha$  als andere Lipidsenker<sup>108</sup>. Daher vermuten manche Autoren eine stärkere Ausprägung pleiotroper Effekte, die Gemfibrozil unabhängig vom PPAR $\alpha$  vermittelt<sup>62</sup>.

Im klinischen Gebrauch wird Gemfibrozil *per os* verabreicht, wodurch Abweichungen in der Medikamentenwirkung zur hier vorliegenden *intraperitonealen* Applikation bedingt sein können. Trotz unterschiedlicher Absorptionsorte ist die Verteilung über die Blutbahn (z.B. *First-pass* Effekt in der Leber) bei beiden Applikationswegen jedoch ähnlich<sup>109</sup>. Insgesamt wurden die pharmakologischen Effekte unterschiedlicher Applikationsarten in Nagern noch nicht ausreichend erforscht. Die *intraperitoneale* Gabe von Gemfibrozil im Tiermodell wurde bereits beschrieben, dennoch bleibt eine Einschränkung bei der Übertragbarkeit auf den klinischen Nutzen beim Menschen<sup>61</sup>.

Der experimentelle Versuchsaufbau machte außerdem die Darreichung weiterer Arzneimittel wie Buprenorphin, Sevofluran oder dem Lösungsvermittler DMSO notwendig, sodass sich ein potentieller Einfluss durch diese Substanzen auf die mitochondriale Funktion nicht sicher ausschließen lässt. Der Versuchsaufbau wurde dahingehend bereits in Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe etabliert und eine potentielle Beeinflussung wäre in allen Versuchsgruppen gleichermaßen gegeben.

## 4.2 Ergebnisdiskussion

### 4.2.1 Die Wirkung von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion in der Sepsis

Unter dem Einfluss einer Sepsis zeigte Gemfibrozil in der vorliegenden Studie keine Wirkung auf die untersuchten Parameter der mitochondrialen Funktion in der Leber. Bisher gibt es keine

vergleichbaren Arbeiten mit Fibraten wie Gemfibrozil, entsprechende Studien sind jedoch mit anderen Lipidsenkern und PPAR-Agonisten durchgeführt worden: Ähnlich den Ergebnissen aus dieser Studie zeigte der Cholesterinsenker Simvastatin keine Auswirkung auf die hepatische Mitochondrienfunktion bei LPS-induzierter Sepsis in Ratten<sup>110</sup>. Andererseits werden in der Literatur auch vorteilhafte Effekte einer Statinbehandlung auf die Mitochondrienfunktion beschrieben<sup>111 112</sup>. So konnten Statine in verschiedenen Sepsismodellen die Funktionsfähigkeit der Mitochondrien aufrechterhalten<sup>111</sup> oder eine beeinträchtigte Funktion wiederherstellen<sup>112</sup>. Die Gabe des PPAR $\gamma$ -Agonist Rosiglitazon wirkte sich günstig auf das Überleben und den Erhalt kardialer Mitochondrien im septischen Mausmodell aus<sup>113</sup>. Auch von weiteren PPAR $\gamma$ -Agonisten werden in diesem Kontext ein verbessertes *Outcome* bei einer Sepsis und entzündungshemmende Effekte beschrieben<sup>71 114</sup>. Dennoch bleibt die Übertragbarkeit der Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen Wirkstoffgruppen und der abweichenden Studiendesigns eingeschränkt. Fibrate und deren Wirkstoffvertreter Gemfibrozil konnten in verschiedenen Modellen experimentell-induzierter Sepsis ebenfalls das Überleben verbessern und die Entzündungsantwort regulieren<sup>115 61 77</sup>. In Anbetracht der Mitochondrienfunktion wirkte sich eine unterstützende Therapie mit Fenofibrat günstig auf die Enzymaktivität und den Stoffwechsel der Mitochondrien bei kritisch kranken Patienten mit Verbrennungstraumata aus<sup>81</sup>. Insgesamt fehlt es bisher jedoch an Studien, die die Wirkung von Fibraten wie Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion explizit unter septischen Bedingungen oder im generalisierten Entzündungsmodell untersuchen.

Es wird vermutet, dass Gemfibrozil die Öffnung der *mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP)* bewirkt und infolgedessen das Transmembranpotential aufgelöst und die mitochondriale Atmungskette in ihrer Funktion beeinträchtigt wird<sup>80</sup>. Die Modulation der *mPTP* könnte somit möglicherweise eine tragende Rolle in der Gemfibrozil-vermittelten Wirkung auf die Mitochondrienfunktion in einer Sepsis haben. Larche et al. stellten im septischen Mausmodell eine reduzierte RCR und beeinträchtigte kardiale Mitochondrienfunktion fest und folgerten einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der *mitochondrialen Permeabilitäts-Transition (MPT)* und Sepsis-assoziiertem Organversagen<sup>116</sup>. Analog dazu konnte die Blockierung der *mPTP*-Öffnung durch den *mPTP*-Inhibitor Cyclosporin A in einer weiteren Studie die RCR und somit die Funktion von Lebermitochondrien nach LPS-induzierter Endotoxämie verbessern<sup>117</sup>. Demgegenüber mutmaßen Morel et al. in ihrer Übersichtsarbeit, ob eine Hemmung der Mitochondrienfunktion durch Lipidsenker eine Reduktion der mitochondrialen ROS-Produktion bedingen würde und folglich das Krankheitsgeschehen einer Sepsis günstig beeinflusst werden könnte<sup>68</sup>. Auch in einer *in vitro* Vorarbeit dieser Arbeitsgruppe wirkte sich Gemfibrozil hemmend auf die RCR und ADP/O Ratio aus und beeinträchtigte so die oxidative Phosphorylierung in gesunden Lebermitochondrien<sup>79</sup>. Ferner konnte in experimentellen Vorarbeiten zum Thema Sepsis gezeigt werden, dass eine CASP-Operation im Zeitverlauf von 24 Stunden zu einem

Anstieg der RCR und ADP/O Ratio in Lebermitochondrien führt<sup>34 105</sup>. Gemfibrozil-vermittelt wäre daher auch in dieser Arbeit eine Reduktion der mitochondrialen Funktionsparameter zu den Ausgangswerten möglich, welche im Zuge der Sepsis anfangs erhöht waren. Bei dieser möglichen Erklärung für die ausbleibende Gemfibrozilwirkung in dieser Versuchsreihe muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen nicht uneingeschränkt auf *in vivo* Bedingungen übertragen werden können. Auch Abweichungen hinsichtlich der verwendeten Konzentrationen von Gemfibrozil und der Einwirkzeit müssen berücksichtigt werden.

Die zuvor beschriebene hemmende Wirkung auf die Mitochondrienfunktion durch Gemfibrozil wurde in gesunden Leberzellen beobachtet<sup>79</sup>. In Anbetracht der hier vorliegenden ausbleibenden Effekte nach einer CASP-Operation ist auch eine veränderte Medikamentenwirkung im septischen Milieu denkbar. Gerade unter entzündlichen Bedingungen können Mikrozirkulationsstörungen dazu führen, dass die Aufnahme und Verteilung von Gemfibrozil in die Zielorgane stark eingeschränkt ist, sodass folglich eine geringere Arzneimittelwirkung in der Leber zu erwarten wäre<sup>118</sup>. Neben potentiellen pharmakologischen Veränderungen in der Sepsis müssen auch weitere Einflussfaktoren auf die Mitochondrienfunktion in Betracht gezogen werden, die das Ausbleiben einer Gemfibrozil-vermittelten Wirkung erklären könnten. Wie bereits in Kapitel 1.4 erwähnt, weisen Studien eine variable Mitochondrienfunktion je nach Schweregrad der Sepsis, untersuchtem Organ und Messzeitpunkt nach<sup>19 32-34</sup>. Daher ist nicht auszuschließen, dass weitere Faktoren die Mitochondrienfunktion unabhängig von der medikamentösen Vorbehandlung beeinflusst haben. Ergänzende Studien sind notwendig, um die Mitochondrienfunktion in Anbetracht der zahlreichen Einflussfaktoren besser zu verstehen und folglich auch Schlüsse daraus für die Gemfibrozil-vermittelten Effekten zu ziehen.

#### **4.2.2 Die Wirkung von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion unter nicht-septischen Bedingungen**

In der vorliegenden *in vivo* Studie ließ sich auch nach einer Sham-Operation und damit unter nicht-septischen Bedingungen kein Effekt von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion im Lebergewebe feststellen. Ein potentieller Einfluss einer sterilen Laparotomie auf die mitochondrialen Funktionsparameter wurde bereits in Vorarbeiten von Herminghaus et al. untersucht. Hier konnte bei ähnlichem Versuchsaufbau eine gesteigerte RCR im Vergleich zu gesunden Kontrollkohorten und somit der Effekt einer operativen Manipulation durch eine sterile Laparotomie auf die Mitochondrienfunktion dargestellt werden<sup>34 105</sup>. Demnach könnte auch in der vorliegenden Arbeit die sterile Laparotomie einen Anstieg der mitochondrialen Funktionsparameter bedingt haben. Ähnlich den Überlegungen aus Kapitel 4.2.1 zum Einfluss von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion unter septischen Bedingungen könnte

Gemfibrozil auch in den Sham-Kohorten die Mitochondrienfunktion gehemmt und erhöhte RCR-Werte so ausgeglichen haben<sup>79</sup>. Insgesamt ist jedoch noch unklar, wie genau Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion im Sham-Modell wirkt, da dieser Aspekt in Studien noch nicht ausreichend untersucht worden ist.

Aus den Ergebnissen einer Vielzahl von *in vitro* Studien wird deutlich, dass den Effekten von Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion eine gewisse Gewebs- und Konzentrationsabhängigkeit zugrunde liegt<sup>79 84 87 107</sup>. Im Vergleich mehrerer PPAR-Liganden und deren Wirkung auf die Mitochondrienfunktion konnten Zhou et al. einen hemmenden Einfluss vieler Fibrate über verschiedene Mechanismen feststellen<sup>80</sup>. In diesem Kontext zeigte Gemfibrozil konzentrationsabhängige Effekte und bewirkte eine Hemmung der RCR und Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS)<sup>80</sup>. Auch in Versuchen von Brunmair et al. beeinträchtigte Gemfibrozil die Mitochondrienfunktion im Skelettmuskel<sup>84</sup>. Die Autoren führten diese Effekte ähnlich wie Zhou et al. auf die Öffnung der *mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP)* zurück, wodurch sich eine Komplex I-unabhängige Beeinträchtigung der OXPHOS erklären ließe<sup>84</sup>. Ein hemmender Einfluss von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion konnte auch in Vorarbeiten von Herminghaus et al. dargestellt werden. Hier reduzierte Gemfibrozil die ADP/O Ratio (für Komplex I) und RCR (für beide Komplexe) und beeinflusste somit sowohl die Effizienz-, als auch die Kopplung des Elektronentransportes an die oxidative Phosphorylierung<sup>79</sup>. Des Weiteren konnte Gemfibrozil in höheren Konzentrationen von 300  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  ähnliche entkoppelnde Effekte wie bei Zhou et al. nachweisen<sup>79 80</sup>. Andererseits sind in manchen Studien auch Angaben zu ausbleibenden Effekten von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion zu finden, die sich mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit decken: Wie bereits zuvor erläutert, konnten Brunmair et al. eine Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion isolierter Skelettmuskelzellen präsentieren. In derselben Studie hatte Gemfibrozil jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität von Komplex I der OXPHOS in Lebermitochondrien<sup>84</sup>. In Studien von Nadanaciva et al. ließ sich zwar eine geringfügige Hemmung von Komplex I demonstrieren, die Aktivität der anderen Komplexe der OXPHOS blieb durch die Gabe von Gemfibrozil in dieser Studie jedoch unbeeinflusst<sup>107</sup>. Auch in der beschriebenen Vorarbeit dieser Arbeitsgruppe führten niedrigere Konzentrationen (100 $\mu\text{M}$ ) von Gemfibrozil nicht zu der genannten Beeinträchtigung der Lebermitochondrien<sup>79</sup>.

Wie bereits erwähnt basieren diese Ergebnisse auf *in vitro* Studien. Eine mögliche Abweichung der Gemfibrozilwirkung *in vivo* ist nicht auszuschließen. Davey und Clark et al. erklärten in ihrer Arbeit an Nervenzellen, dass die Komplexe der Atmungskette erst in bestimmtem Ausmaß gehemmt werden müssen, bevor sich dies in einer mitochondrialen Dysfunktion widerspiegelt<sup>119</sup>. Dieser Schwellenwert ist für die einzelnen Komplexe unterschiedlich hoch<sup>119</sup>. In Zusammenschau mit der beschriebenen konzentrationsabhängigen Wirkung von Gemfibrozil lässt sich vermuten,

dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Dosierungen nicht ausreichend waren, um einen Effekt auf die Mitochondrienfunktion zu bewirken. Um eine konzentrationsabhängige Wirkung von Gemfibrozil auf die Mitochondrienfunktion *in vivo* zu untersuchen, wurden in dieser Versuchsreihe 30 und 100 mg/kg KG Gemfibrozil *i.p.* verabreicht. Dabei entsprechen 30 mg/kg KG Gemfibrozil annähernd der klinisch üblichen Administration von 1200 mg/Tag beim Menschen, während sich die Applikation von 100 mg/kg KG Gemfibrozil an zuvor etablierten Studiendesigns im Nagermodell orientierte<sup>77</sup>. Ein möglicher Erklärungsansatz für die ausbleibenden Effekte *in vivo* könnte somit die höhere Dosierung von Gemfibrozil in den *in vitro* Versuchen sein. Herminghaus et al. verabreichten zwischen 100  $\mu$ M und 1000  $\mu$ M Gemfibrozil und somit eine höhere Dosis als therapeutisch üblich<sup>79</sup>. Auch Nadanaciva et al. konnten bei geringeren Dosierungen von 62,5 nmol/mg mitochondrialer Proteinmenge keine Wirkung von Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion nachweisen, jedoch ließ sich die hemmende Wirkung auf die OXPHOS durch die kombinierte Gabe mit einem Statin verstärken<sup>107</sup>. Da in dieser *in vivo* Versuchsreihe keine Bestimmung der Endkonzentration im Lebergewebe erfolgte, bleibt unklar, mit welcher Gemfibrozilmenge die Mitochondrien hier tatsächlich konfrontiert wurden.

Auch der Zeitpunkt der Medikamentengabe könnte einen Einfluss auf die Mitochondrienfunktion und somit auf die Ergebnisse der einzelnen Studien haben. Gemfibrozil ist bei den *in vitro* Versuchen unmittelbar vor Versuchsbeginn hinzugefügt worden<sup>79 84 107</sup>, während die *intraperitoneale* Gabe in dieser *in vivo* Arbeit bereits 48 Stunden und 24 Stunden vor der respirometrischen Messung erfolgte. Bei entsprechenden Zeitpunkten konnten Cámara-Lemarrooy et al. bereits einen günstigen Einfluss von Gemfibrozil auf die Inflammation im Sepsismodell nachweisen<sup>77</sup>. Eine Auswirkung auf die mitochondriale Funktion durch die Verabreichung von Gemfibrozil zu diesen Zeitpunkten konnte hier nicht demonstriert werden. Auch die postinfektiöse Gabe von Gemfibrozil wies günstige Effekte auf, welche mit einem gesteigerten Überleben Influenza-infizierter Mäuse assoziiert war<sup>61</sup>. Es bleibt zu untersuchen, wie Gemfibrozil die mitochondriale Funktion beeinflusst, wenn die Darreichung als Begleittherapie in Sepsis oder zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt.

Zusammenfassend präsentiert sich die Studienlage zu Gemfibrozil-vermittelten Effekten auf die Mitochondrienfunktion sowohl unter septischen, als auch unter nicht-septischen Bedingungen sehr heterogen. Es ist anzunehmen, dass die Mitochondrienfunktion hoch variabel ist und daher von Gemfibrozil in konzentrations- und gewebspezifischer Weise beeinflusst wird<sup>32 79</sup>. In einer Sepsis sind vermutlich weitere Einflussfaktoren in Betracht zu ziehen, welche die Interaktion zwischen Gemfibrozil und Mitochondrium modulieren. Daher ist es sinnvoll, die Effekte von Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion in weiteren Studienmodellen zur Sepsis zu untersuchen.



### 4.2.3 Der Einfluss von Gemfibrozil auf die Produktion von ROS in der Leber

In der vorliegenden Studie zeigte Gemfibrozil keinen Effekt auf die Entstehung von Malondialdehyd (MDA) in der Leber im septischen Rattenmodell. Auch unter nicht-septischen Bedingungen konnte Gemfibrozil die MDA-Produktion als Parameter für den oxidativen Stress im Lebergewebe nicht beeinflussen. Die Zusammenhänge zwischen der Entstehung von oxidativem Stress unter septischem Einfluss und daraus resultierender Mikrozirkulationsstörung und Organversagen wurden bereits in Übersichtsarbeiten von Mittal et al. und Huet et al. verdeutlicht<sup>17 50</sup>. Da die Mitochondrien als Hauptproduzenten von reaktiven Sauerstoffspezies im Organismus gelten<sup>120</sup> wird unter septischen Bedingungen ein Zusammenhang zwischen der Mitochondrienfunktion und oxidativem Stress diskutiert<sup>48 49</sup>. Vermutlich werden die Mitochondrien in einer Sepsis einerseits durch ROS beeinträchtigt, tragen aber auch zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies bei<sup>49 121</sup>. Auch im septischen Lebergewebe konnten Studien eine gesteigerte mitochondriale ROS-Produktion nachweisen, deren Ausprägung je nach Organ und Messzeitpunkt variierte<sup>122 123</sup>. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe wurde die Entstehung von oxidativem Stress in der Leber anhand der Produktion von MDA gemessen<sup>34 105</sup>. Im zeitlichen Verlauf einer Sepsis oder nach steriler Laparotomie konnte eine gesteigerte ROS-Produktion festgestellt werden, die ähnlich wie bei Llesuy et al. organspezifisch ausfiel<sup>105 123</sup>. Während sich in der Leber sowohl im CASP-, als auch im Sham-Modell erhöhte MDA-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe darstellten, konnten im Colon keine signifikanten Unterschiede der MDA-Konzentration nachgewiesen werden<sup>105</sup>. Auch in der vorliegenden Arbeit wäre folglich ein Anstieg der hepatischen MDA-Werte durch CASP- und Sham-Operation denkbar. Dass sich in dieser Arbeit unveränderte MDA-Konzentrationen zeigen, könnte somit auf einen modulierenden Effekt von Gemfibrozil hindeuten, der die initial erhöhten MDA-Werte normalisiert haben könnte. In einer weiteren Studie von Herminghaus et al. ließ sich hingegen keine Veränderung der hepatischen MDA-Konzentration nach Sham- und CASP-Operation verzeichnen, sodass sich neben der Organspezifität weitere Einflussfaktoren vermuten lassen, die die ROS-Produktion beeinflussen<sup>34</sup>. Auch in diesem Versuchsmodell von Sepsis und steriler Laparotomie wäre es daher möglich, dass ähnlich den Resultaten von Herminghaus et al. die ROS-Produktion unverändert blieb<sup>34</sup>. Ob und inwiefern Gemfibrozil einen Einfluss auf die MDA-Konstellationen hat, kann somit nicht abschließend beurteilt werden.

In Anbetracht der Modulation von oxidativem Stress in der Sepsis ist Gemfibrozil in den Fokus geraten, da es verschiedene antioxidative Effekte aufzuweisen scheint. In einer systematischen Übersichtsarbeit von Roy et al. wurde der Stellenwert von Gemfibrozil diesbezüglich aufgearbeitet: Somit dient Gemfibrozil als Radikalfänger und kann durch Hemmung der Lipidperoxidation die Entstehung von MDA günstig beeinflussen<sup>62</sup>. Des Weiteren wirkt Gemfibrozil über verschiedene Mechanismen regulierend auf die Aktivität pro- und

antioxidativer Enzyme<sup>62 124</sup>. Entsprechende antioxidative Mechanismen und die Reduktion von MDA in der Leber durch Gemfibrozil konnten auch im Rahmen von experimentellen Studien demonstriert werden<sup>125 126</sup>. Demgegenüber ließ sich in einer Arbeit von Macan et al. ein Gemfibrozil-assoziiertes Anstieg von MDA in Ratten verzeichnen, welcher sich nach Absetzen des Medikamentes wieder reduzierte<sup>127</sup>. Macan et al. führten dies auf eine durch Gemfibrozil stimulierte Peroxisomenproliferation und daraus resultierendem Lipidperoxidation-assoziierten Leberzellschaden zurück. In der Studie wurde Gemfibrozil jedoch über einen Zeitraum von drei Wochen und in gesunden Ratten untersucht. Wie sich Gemfibrozil bei einem kürzeren Applikationszeitraum und unter septischen Bedingungen verhält, geht aus dieser Studie nicht hervor<sup>127</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Gemfibrozil unter septischen und nicht-septischen Bedingungen ermittelt, wobei sich kein Unterschied in der MDA-Produktion der einzelnen Kohorten nachweisen ließ. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie von Cámara-Lemarroy et al. überein, in welcher Gemfibrozil keinen Effekt auf die MDA-Werte bei CLP-induzierter Sepsis hatte<sup>77</sup>. Bei anderen Vertretern der Wirkstoffklasse können ähnlich heterogene Effekte auf die MDA-Produktion festgestellt werden. Fenofibrat konnte in Erythrozyten diabetischer Ratten eine Reduktion von MDA bewirken, diese Fibrat-assoziierten Effekte blieben im Lebergewebe jedoch aus<sup>128</sup>. Auch Škrha et al. untersuchten die Wirkung von Fenofibrat auf oxidativen Stress. Während eine Behandlung mit Fenofibrat zwar zu einer Reduktion des MDA-Plasmalevels führte, konnten keine direkten antioxidativen Effekte des Fibrats festgestellt werden<sup>129</sup>. Es wird deutlich, dass die Studienmodelle zur Wirkung von Gemfibrozil auf die MDA-Produktion und die Entstehung von oxidativem Stress in der Leber stark variieren und sich diesbezüglich kein einheitliches Bild darstellen lässt. Gerade unter septischen Bedingungen sind weitere Studien notwendig, um zu verstehen, ob Gemfibrozil prooxidative, antioxidative oder keine Effekte in der Leber vermittelt.

#### **4.2.4 Die Bedeutung PPAR $\alpha$ -vermittelter Effekte von Gemfibrozil**

Das Fibrat Gemfibrozil wirkt als Ligand am Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor alpha. Die vorliegende Versuchsreihe untersuchte daher, ob die Wirkung von Gemfibrozil über den PPAR $\alpha$  vermittelt wird, indem ergänzend die Gabe des selektiven PPAR $\alpha$ -Blockers GW6471 erfolgte. Da sich insgesamt keine Unterschiede der Mitochondrienfunktion und der ROS-Produktion zwischen den einzelnen Kohorten feststellen ließen, ist auch die abschließende Bewertung PPAR $\alpha$ -vermittelter Effekte von Gemfibrozil in diesem Studienmodell eingeschränkt. Die genaue Interaktion zwischen dem PPAR $\alpha$  und Gemfibrozil ist bisher nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass das Fibrat sowohl über den PPAR $\alpha$  Effekte vermittelt, als auch Wirkungen unabhängig von dem Rezeptor entfalten kann<sup>62</sup>. Auch das Meinungsbild zu PPAR $\alpha$ -vermittelten Effekten von Gemfibrozil in der Sepsis divergiert. Anti-inflammatorische

Wirkungen von PPAR werden beschrieben und umfassen überwiegend die Modulation der Entzündungsantwort auf Ebene der Transkriptionsfaktoren und Zytokinproduktion<sup>130 131</sup>. Gemfibrozil konnte bereits eine günstige Beeinflussung der Inflammation im experimentellen Modell einer Autoimmun-Enzephalomyelitis aufweisen, welche sich PPAR $\alpha$ -vermittelt darstellte<sup>59</sup>. Rezeptor-unabhängig hingegen bewirkte Gemfibrozil eine Reduktion der Entzündungsantwort von Gliazellen des Zentralnervensystems<sup>132 133</sup>. Unter septischen Bedingungen beobachteten van Wyngene et al. eine reduzierte PPAR $\alpha$ -Aktivität in der Leber. Unter Einsatz des PPAR $\alpha$ -Agonist Pemafibrat zeigten sich neben einer gesteigerten PPAR $\alpha$ -Genexpression reduzierte Entzündungsparameter und eine verbesserte Organfunktion, sodass ein positiver Einfluss des Fibrats auf den Krankheitsverlauf einer Sepsis vermutet wurde<sup>134</sup>.

Überlegungen zu PPAR $\alpha$ -vermittelten Effekten von Fibraten auf die Mitochondrienfunktion sind schon lange Gegenstand der Forschung, jedoch variiert die Studienlage auch hier. Zhou et al. zeigten bereits im Jahr 1998, dass Fibrate und andere PPAR-Liganden die Mitochondrienfunktion über verschiedene Mechanismen beeinflussen, welche unabhängig vom PPAR $\alpha$  zu sein scheinen. Dennoch schlossen sie eine PPAR $\alpha$ -Aktivierung nicht aus, sondern ordneten diese eher als Konsequenz auf eine mitochondriale Beeinträchtigung ein, die folglich die Peroxisomenproliferation stimuliert<sup>80</sup>. Die Vermutung von Zhou et al., dass PPAR-Agonisten die Mitochondrienfunktion ohne Einfluss auf den PPAR $\alpha$  modulieren, wurde auch in weiteren *in vitro* Arbeiten thematisiert. Der PPAR $\alpha$ -Ligand Bezafibrat zeigte eine Rezeptor-unabhängige Beeinflussung der Mitochondrienfunktion<sup>78</sup>. Brunmair et al. argumentierten, dass eine Hemmung der Atmungskette durch Fenofibrat schon innerhalb kurzer Zeit nach Wirkstoffgabe auftrat, was gegen die Genregulierung durch PPAR $\alpha$  und damit für einen Rezeptor-unabhängigen Effekt spreche<sup>84</sup>. Andererseits konnten in Studien auch Effekte dargestellt werden, die über PPAR vermittelt wurden: Im Lebergewebe wiesen Nagai et al. eine gesteigerte Expression mitochondrialer Transkriptionsfaktoren durch Fenofibrat nach und führten dies auf eine Stimulation des Rezeptors zurück, da Fenofibrat ebenfalls eine Zunahme der PPAR $\alpha$ -Proteinkonzentration bewirkte<sup>85</sup>. Bastin et al. zeigten, dass Bezafibrat die mitochondriale Genexpression günstig beeinflussen konnte, indem es die Aktivität des PPAR $\gamma$ -Koaktivators PGC-1 $\alpha$  stimulierte<sup>135</sup>. Auch Interaktion zwischen dem Koaktivator PGC-1 und PPAR $\alpha$  werden beschrieben<sup>136</sup>. Folglich wäre auch eine PPAR $\alpha$ -vermittelte Modulation der mitochondrialen Funktion durch Gemfibrozil als PPAR $\alpha$ -Ligand möglich. Die Studienlage liefert diesbezüglich bisher jedoch keine eindeutigen Anhaltspunkte<sup>85 137</sup>. Ferner gibt es Hinweise darauf, dass Gemfibrozil auch an weiteren PPAR (PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$ ) binden kann, sodass möglicherweise auch über diese Rezeptoren pleiotrope Effekte hervorgerufen werden<sup>62 138</sup>. Ob eine Gemfibrozilwirkung auf die Mitochondrienfunktion in der Sepsis über diese oder sogar mehrere Rezeptoren möglich ist, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Im Allgemeinen sollten auch Unterschiede in der Expression und Regulierung vom PPAR $\alpha$  zwischen Mensch und Nager in Betracht gezogen werden, welche abweichende Rezeptor-vermittelte Effekte von Fibraten zwischen den Spezies erklären könnten<sup>97 98 139</sup>. In dieser tierexperimentellen Studie konnte Gemfibrozil keinen Effekt auf die Mitochondrienfunktion nachweisen. Analog dazu zeigte sich auch keine Modulation der Gemfibrozilwirkung durch die zusätzliche Gabe des PPAR $\alpha$ -Blockers GW6471. Da Veränderungen in allen Versuchsgruppen ausblieben, können dementsprechend keine richtungsweisenden Aussagen zu PPAR $\alpha$ -vermittelten Effekten von Gemfibrozil gemacht werden. Palmer et al. vermuten, dass Unterschiede in der Expression von PPAR $\alpha$  zwischen Tier und Mensch neben der geringeren Ausprägung unerwünschter Nebenwirkungen von Fibraten auch maßgeblich für deren therapeutische Effekte beim Menschen sind<sup>96</sup>. Die Fragestellung, wie genau sich die Modulation des PPAR $\alpha$  durch Gemfibrozil beim Menschen auswirkt, kann daher auch als Anhaltspunkt für zukünftige klinische Arbeiten zum Thema Sepsis dienen.

### 4.3 Schlussfolgerung

Die Sepsis stellt weltweit ein relevantes Krankheitsbild dar und der Forschung hinsichtlich unterstützender Therapieansätze kommt eine hohe Bedeutung zu<sup>6 49 67 68</sup>. In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob das Fibrat Gemfibrozil die medikamentöse Therapie einer Sepsis sinnvoll ergänzen kann, indem es die Mitochondrienfunktion und den oxidativen Stress im Lebergewebe moduliert. Die Ergebnisse dieser experimentellen Studie zeigen, dass die *intraperitoneale* Verabreichung von Gemfibrozil keinen Effekt auf die hepatische Mitochondrienfunktion in einer Sepsis hatte. Auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, als Zeichen für das Aufkommen von oxidativem Stress im Lebergewebe, wurde durch die Gabe von Gemfibrozil unter septischen Bedingungen nicht beeinflusst. Ergänzend dazu ließ sich auch nach Durchführung einer sterilen Laparotomie keine Modulation der mitochondrialen Funktion und der ROS-Produktion im Lebergewebe durch Gemfibrozil feststellen.

Wenngleich in dieser Arbeit keine günstigen Effekte von Gemfibrozil auf den Verlauf einer Sepsis gezeigt werden konnten, sind weitere Studien notwendig, um das komplexe Krankheitsbild der Sepsis und deren Pathophysiologie besser zu verstehen. Im Hinblick auf den Stellenwert von Gemfibrozil als Begleittherapie in einer Sepsis sind insbesondere klinische Studien von Interesse, um auch patientenindividuelle Faktoren wie Multimorbidität und deren Effekten auf die Mitochondrienfunktion berücksichtigen zu können.

## 5. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M *et al.* Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int* 2016; **113**: 159–66
2. Engel C, Brunkhorst FM, Bone H-G *et al.* Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; **33**: 606–18
3. Marx G, 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* 2016; **42**: 1980–9
4. Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med* 2013; **41**: 1167–74
5. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA* 2010; **304**: 1787–94
6. Fleischmann-Struzek C, Mellhammar L, Rose N *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* 2020; **46**: 1552–62
7. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; **315**: 801–10
8. Vincent JL, Moreno R, Takala J *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996; **22**: 707–10
9. Vincent J-L, Mendonca A de, Cantraine F *et al.* Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: Results of a multicenter, prospective study. *Crit Care Med* 1998; **26**: 1793–800
10. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; **315**: 762–74
11. Shankar-Hari M, Phillips GS, Levy ML *et al.* Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; **315**: 775–87
12. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clin Microbiol Rev* 2012; **25**: 609–34

13. Ince C. the microcirculation is the motor of sepsis. Review. *Crit Care* 2005; **9**: 13–9
14. Sakr Y, Dubois M-J, Backer D de, Creteur J, Vincent J-L. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004; **32**: 1825–31
15. Straub RH. *Spezielle Pathophysiologie: Mit 20 Tabellen*. 1st ed. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht, 2007
16. Schuster H-P, Werdan K, eds. *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen: Mit 105 Abbildungen*. 3rd ed. Berlin: Springer, 2000
17. Huet O, Harrois A, Duranteau J. Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction during Sepsis. In: Vincent J-L, ed. *Yearbook of intensive care and emergency medicine*, 1st ed. s.l.: Springer-Verlag, 2009; 59–64
18. Shapiro et al. The association of endothelial cell signaling, severity of illness and in organ dysfunction in sepsis. *Crit Care* 2010; **14**: R182
19. Spronk PE, Kanoore-Edul VS, Ince C. Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome (MMDS): A New Look at Sepsis. In: Pinsky MR, ed. *Functional hemodynamic monitoring*. Berlin: Springer, 2006; 47–67
20. Eva Klijn, Corstiaan A. den Uil, Jan Bakker, Can Ince. The Heterogeneity of the Microcirculation in Critical Illness. *Clin Chest Med* 2008; **29**: 643–54
21. Fink M. Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1997; **110**: 87–95
22. Yan J, Li S, Li S. The role of the liver in sepsis. *Int Rev Immunol* 2014; **33**: 498–510
23. Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. *Gastroenterology* 2014; **146**: 1513–24
24. Protzer U, Maini MK, Knolle PA. Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol* 2012; **12**: 201–13
25. Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; **14**: 55–66
26. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 2013; **14**: 996–1006
27. Muftuoglu MAT, Aktekin A, Ozdemir NC, Saglam A. Liver injury in sepsis and abdominal compartment syndrome in rats. *Surg Today* 2006; **36**: 519–24
28. Nessler N, Launey Y, Aninat C, White J, Seguin P, Mallédant Y. Liver dysfunction is associated with long-term mortality in septic shock. *Crit Care* 2015; **19**: P536

29. Gustot T, Durand F, Lebrec D, Vincent J-L, Moreau R. Severe sepsis in cirrhosis. *Hepatology* 2009; **50**: 2022–33
30. Brealey D, Brand M, Hargreaves I *et al.* Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet* 2002; **360**: 219–23
31. Jeger V, Djafarzadeh S, Jakob SM, Takala J. Mitochondrial function in sepsis. *Eur J Clin Invest* 2013; **43**: 532–42
32. Karlsson M, Hara N, Morata S *et al.* Diverse and tissue-specific mitochondrial respiratory response in a mouse model of sepsis-induced multiple organ failure. *Shock* 2016; **45**: 404–10
33. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS *et al.* Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; **286**: R491-7
34. Herminghaus A, Barthel F, Heinen A *et al.* Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver. *Mitochondrion* 2015; **24**: 122–8
35. Singer M, Brealey D. Mitochondrial dysfunction in sepsis. *Biochemical Society Symposia* 1999; **66**: 149-166
36. Kozlov AV, Staniek K, Haindl S *et al.* Different effects of endotoxic shock on the respiratory function of liver and heart mitochondria in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**: G543-9
37. Taylor DE, Kantrow SP, Piantadosi CA. Mitochondrial respiration after sepsis and prolonged hypoxia. *Am J Physiol* 1998; **275**: L139-44
38. Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA. Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys* 1997; **345**: 278–88
39. Lowes DA, Webster NR, Murphy MP, Galley HF. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br J Anaesth* 2013; **110**: 472–80
40. Trumbeckaite S, Kuliaviene I, Deduchovas O *et al.* Experimental acute pancreatitis induces mitochondrial dysfunction in rat pancreas, kidney and lungs but not in liver. *Pancreatology* 2013; **13**: 216–24
41. Mittal A, Hickey AJR, Chai CC *et al.* Early organ-specific mitochondrial dysfunction of jejunum and lung found in rats with experimental acute pancreatitis. *HPB (Oxford)* 2011; **13**: 332–41

42. Auger C, Sivayoganathan T, Abdullahi A, Parousis A, Jeschke MG. Hepatic mitochondrial bioenergetics in aged C57BL/6 mice exhibit delayed recovery from severe burn injury. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; **1863**: 2705–14
43. Frost MT, Wang Q, Moncada S, Singer M. Hypoxia accelerates nitric oxide-dependent inhibition of mitochondrial complex I in activated macrophages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; **288**: R394-400
44. Carré JE, Orban J-C, Re L *et al.* Survival in Critical Illness Is Associated with Early Activation of Mitochondrial Biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; **182**: 745–51
45. Haden DW, Suliman HB, Carraway MS *et al.* Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during Staphylococcus aureus sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **176**: 768–77
46. Singer M. Cellular dysfunction in sepsis. *Clin Chest Med* 2008; **29**: 655-60, viii-ix
47. Arulkumaran N, Deutschman CS, Pinsky MR *et al.* Mitochondrial Function in Sepsis. *Shock* 2016; **45**: 271–81
48. Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British Journal of Anaesthesia* 2011; **107**: 57–64
49. Dare AJ, Phillips ARJ, Hickey AJR *et al.* A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radic Biol Med* 2009; **47**: 1517–25
50. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 2014; **20**: 1126–67
51. Manea A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell Tissue Res* 2010; **342**: 325–39
52. Rada B, Leto TL. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol* 2008; **15**: 164–87
53. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; **279**: L1005-28
54. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1982; **47**: 412–26
55. Albuszies G, Brückner UB. Antioxidant therapy in sepsis. *Intensive Care Med* 2003; **29**: 1632–6



56. Rojkind M, Domínguez-Rosales JA, Nieto N, Greenwel P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *Cell Mol Life Sci* 2002; **59**: 1872–91
57. Chung HY, Yokozawa T, Kim MS *et al*. The mechanism of nitric oxide and/or superoxide cytotoxicity in endothelial cells. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2000; **52**: 227–33
58. Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK *et al*. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res* 2004; **64**: 172–8
59. Zakharova VV, Pletjushkina OY, Zinovkin RA, Popova EN, Chernyak BV. Mitochondria-Targeted Antioxidants and Uncouplers of Oxidative Phosphorylation in Treatment of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *J Cell Physiol* 2017; **232**: 904–12
60. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* 1997; **416**: 15–8
61. Budd A, Alleva L, Alsharifi M *et al*. Increased survival after gemfibrozil treatment of severe mouse influenza. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 2965–8
62. Roy A, Pahan K. Gemfibrozil, stretching arms beyond lipid lowering. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2009; **31**: 339–51
63. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 1998; **138**: 271–80
64. Brunkhorst FM, Weigand M, Pletz M, Gastmeier P, Lemmen SW, Meier-Hellmann A, Ragaller M. S3 Leitlinie - Sepsis-Prävention-Diagnose-Therapie-Nachsorge\_2020-03\_01 2018
65. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W *et al*. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med* 2017; **45**: 486–552
66. Spronk PE, Ince C, Gardien MJ, Mathura KR, Straaten HMO, Zandstra DF. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *The Lancet* 2002; **360**: 1395–6
67. Lowes DA, Thottakam BMV, Webster NR, Murphy MP, Galley HF. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against organ damage in a lipopolysaccharide-peptidoglycan model of sepsis. *Free Radical Biology and Medicine* 2008; **45**: 1559–65

68. Morel J, Singer M. Statins, fibrates, thiazolidinediones and resveratrol as adjunctive therapies in sepsis: could mitochondria be a common target? *Intensive Care Med Exp* 2014; **2**: 9
69. Merx MW, Liehn EA, Janssens U *et al.* HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis. *Circulation* 2004; **109**: 2560–5
70. Wiel E, Lebuffe G, Robin E *et al.* Pretreatment with peroxysome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate protects endothelium in rabbit *Escherichia coli* endotoxin-induced shock. *Intensive Care Med* 2005; **31**: 1269–79
71. Tsujimura Y, Matsutani T, Matsuda A *et al.* Effects of pioglitazone on survival and omental adipocyte function in mice with sepsis induced by cecal ligation and puncture. *J Surg Res* 2011; **171**: e215-21
72. Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L *et al.* Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces the development of nonseptic shock induced by zymosan in mice. *Crit Care Med* 2004; **32**: 457–66
73. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2015; **62**: 720–33
74. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart J-C, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006; **116**: 571–80
75. Kleemann R, Gervois PP, Verschuren L, Staels B, Princen HMG, Kooistra T. Fibrates down-regulate IL-1-stimulated C-reactive protein gene expression in hepatocytes by reducing nuclear p50-NFkappa B-C/EBP-beta complex formation. *Blood* 2003; **101**: 545–51
76. Mansouri RM, Baugé E, Staels B, Gervois P. Systemic and distal repercussions of liver-specific peroxisome proliferator-activated receptor-alpha control of the acute-phase response. *Endocrinology* 2008; **149**: 3215–23
77. Cámara-Lemarroy CR, La Guzman-DE Garza FJ, Cordero-Perez P, Ibarra-Hernandez JM, Muñoz-Espinosa LE, Fernandez-Garza NE. Gemfibrozil attenuates the inflammatory response and protects rats from abdominal sepsis. *Exp Ther Med* 2015; **9**: 1018–22
78. Scatena R, Bottoni P, Vincenzoni F *et al.* Bezafibrate induces a mitochondrial derangement in human cell lines: a PPAR-independent mechanism for a peroxisome proliferator. *Chem Res Toxicol* 2003; **16**: 1440–7

79. Herminghaus A, Laser E, Schulz J *et al.* Pravastatin and Gemfibrozil Modulate Differently Hepatic and Colonic Mitochondrial Respiration in Tissue Homogenates from Healthy Rats. *Cells* 2019; **8**: 983
80. Zhou S, Wallace KB. The Effect of Peroxisome Proliferators on Mitochondrial Bioenergetics. *Toxicol Sci* 1999; **48**: 82–9
81. Cree MG, Zwetsloot JJ, Herndon DN *et al.* Insulin sensitivity and mitochondrial function are improved in children with burn injury during a randomized controlled trial of fenofibrate. *Ann Surg* 2007; **245**: 214–21
82. Zungu M, Felix R, Essop MF. Wy-14,643 and fenofibrate inhibit mitochondrial respiration in isolated rat cardiac mitochondria. *Mitochondrion* 2006; **6**: 315–22
83. Zungu M, Young ME, Stanley WC, Essop MF. Chronic treatment with the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist Wy-14,643 attenuates myocardial respiratory capacity and contractile function. *Mol Cell Biochem* 2009; **330**: 55–62
84. Brunmair B, Lest A, Staniek K *et al.* Fenofibrate impairs rat mitochondrial function by inhibition of respiratory complex I. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **311**: 109–14
85. Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; **282**: E1180-90
86. Augustyniak J, Lenart J, Gaj P *et al.* Bezafibrate Upregulates Mitochondrial Biogenesis and Influence Neural Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol Neurobiol* 2019; **56**: 4346–63
87. Scatena R, Bottoni P, Martorana GE *et al.* Mitochondrial respiratory chain dysfunction, a non-receptor-mediated effect of synthetic PPAR-ligands: biochemical and pharmacological implications. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **319**: 967–73
88. Traeger T, Koerner P, Kessler W *et al.* Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) - a Standardized Model for Polymicrobial Abdominal Sepsis. *J Vis Exp* 2010; **46**: e2299
89. Zantl N, Uebe A, Neumann B *et al.* Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* 1998; **66**: 2300–9
90. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; **193**: 265–75

91. CHANCE B, WILLIAMS GR. Respiratory Enzymes in oxidative Phosphorylation: VI. The effect of adenosine diphosphate in azide-treated mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 1956; **221**: 477–89
92. Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics*. 3rd ed.: Elsevier Science, 2002
93. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 2011; **435**: 297–312
94. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry* 2017; **524**: 13–30
95. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 1978; **86**: 271–8
96. Palmer CNA, Hsu M-H, Griffin KJ, Raucy JL, Johnson EF. Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\alpha$  Expression in Human Liver. *Mol Pharmacol* 1998; **53**: 14–22
97. Yang Q, Nagano T, Shah Y, Cheung C, Ito S, Gonzalez FJ. The PPAR alpha-humanized mouse: a model to investigate species differences in liver toxicity mediated by PPAR alpha. *Toxicol Sci* 2008; **101**: 132–9
98. Cunningham ML, Collins BJ, Hejtmancik MR *et al*. Effects of the PPAR $\alpha$  Agonist and Widely Used Antihyperlipidemic Drug Gemfibrozil on Hepatic Toxicity and Lipid Metabolism. *PPAR Research* 2010; **2010**: 681963
99. Cayen MN. Disposition, metabolism and pharmacokinetics of antihyperlipidemic agents in laboratory animals and man. *Pharmacology & Therapeutics* 1985; **29**: 157–204
100. Sallustio BC, Foster DJ. Reactivity of gemfibrozil 1-o-beta-acyl glucuronide. Pharmacokinetics of covalently bound gemfibrozil-protein adducts in rats. *Drug Metab Dispos* 1995; **23**: 892–9
101. Lustig MK, Bac VH, Pavlovic D *et al*. Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock* 2007; **28**: 59–64
102. Maier S, Traeger T, Entleutner M *et al*. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 2004; **21**: 505–11
103. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *Journal of Surgical Research* 1990; **49**: 186–96

104. Zhang L, Tian Y, Yang J, Li J, Tang H, Wang Y. Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) Induces Excessive Inflammation and Systemic Metabolic Dysfunction in a Septic Rat Model. *J Proteome Res* 2018; **17**: 680–8
105. Herminghaus A, Papenbrock H, Eberhardt R *et al.* Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Med Exp* 2019; **7**: 4
106. Pecinová A, Drahota Z, Nůsková H, Pecina P, Houštěk J. Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion* 2011; **11**: 722–8
107. Nadanaciva S, Dykens JA, Bernal A, Capaldi RA, Will Y. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007; **223**: 277–87
108. Kamata S, Oyama T, Saito K *et al.* PPAR $\alpha$  Ligand-Binding Domain Structures with Endogenous Fatty Acids and Fibrates. *iScience* 2020; **23**: 101727
109. Claassen V. Neglected Factors in Pharmacology and Neuroscience Research: Intraperitoneal Drug Administration. In: Huston JP, ed. *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*, 12th ed. Düsseldorf: Elsevier, 1994; 46–58
110. Yorulmaz H, Ozkok E, Erguven M, Ates G, Aydın I, Tamer S. Effect of simvastatin on mitochondrial enzyme activities, ghrelin, hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in hepatic tissue during early phase of sepsis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015; **8**: 3640–50
111. Morel J, Hargreaves I, Brealey D *et al.* Simvastatin pre-treatment improves survival and mitochondrial function in a 3-day fluid-resuscitated rat model of sepsis. *Clin Sci (Lond)* 2017; **131**: 747–58
112. Stolf AM, Livero FdR, Dreifuss AA *et al.* Effects of statins on liver cell function and inflammation in septic rats. *J Surg Res* 2012; **178**: 888–97
113. Drosatos K, Khan RS, Trent CM *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation prevents sepsis-related cardiac dysfunction and mortality in mice. *Circulation. Heart failure* 2013; **6**: 550–62
114. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- $\gamma$  agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; **391**: 82–6
115. Tancevski I, Nairz M, Duwensee K *et al.* Fibrates ameliorate the course of bacterial sepsis by promoting neutrophil recruitment via CXCR2. *EMBO Mol Med* 2014; **6**: 810–20

116. Larche J, Lancel S, Hassoun SM *et al.* Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality. *J Am Coll Cardiol* 2006; **48**: 377–85
117. Crouser ED, Julian MW, Huff JE *et al.* Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. *Crit Care Med* 2004; **32**: 478–88
118. Charlton M, Thompson JP. Pharmacokinetics in sepsis. *BJA Education* 2019; **19**: 7–13
119. Davey GP, Clark JB. Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J Neurochem* 1996; **66**: 1617–24
120. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 2003; **552**: 335–44
121. Quoilin C, Mouithys-Mickalad A, Lécart S, Fontaine-Aupart M-P, Hoebeke M. Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1837**: 1790–800
122. Taylor DE, Ghio AJ, Piantadosi CA. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch Biochem Biophys* 1995; **316**: 70–6
123. Llesuy S, Evelson P, González-Flecha B *et al.* Oxidative stress in muscle and liver of rats with septic syndrome. *Free Radical Biology and Medicine* 1994; **16**: 445–51
124. Calkin AC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ. Gemfibrozil decreases atherosclerosis in experimental diabetes in association with a reduction in oxidative stress and inflammation. *Diabetologia* 2006; **49**: 766–74
125. Nikravesh H, Khodayar MJ, Mahdavinia M, Mansouri E, Zeidooni L, Dehbashi F. Protective Effect of Gemfibrozil on Hepatotoxicity Induced by Acetaminophen in Mice: the Importance of Oxidative Stress Suppression. *Adv Pharm Bull* 2018; **8**: 331–9
126. Hassan, A, El-Menshawly, Sohair, Sekina A, Kabil S, Rashed H. Protective effects of Gemfibrozil, Silymarin, and their combination on liver ischemic/reperfusion insult in rats. *Zagazig University Medical Journal* 2021; **27**: 865–79
127. Macan M, Marija M, Konjevoda P *et al.* The influence of gemfibrozil on malondialdehyde level and paraoxonase 1 activity in wistar and fisher rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2011; **108**: 428–35
128. Olukman M, Sezer ED, Ulker S, Sözmen EY, Cinar GM. Fenofibrate treatment enhances antioxidant status and attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental Diabetes Research* 2010; **2010**: 828531

129. Skrha J, Stulc T, Hilgertová J, Weiserová H, Kvasnicka J, Ceska R. Effect of simvastatin and fenofibrate on endothelium in Type 2 diabetes. *Eur J Pharmacol* 2004; **493**: 183–9
130. Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Cook JA. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol* 2003; **171**: 6827–37
131. Chung SW, Kang BY, Kim SH *et al.* Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 2000; **275**: 32681–7
132. Jana M, Jana A, Liu X, Ghosh S, Pahan K. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated up-regulation of I kappa B alpha in anti-inflammatory effect of gemfibrozil in microglia. *J Immunol* 2007; **179**: 4142–52
133. Pahan K, Jana M, Liu X, Taylor BS, Wood C, Fischer SM. Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, inhibits the induction of nitric-oxide synthase in human astrocytes. *J Biol Chem* 2002; **277**: 45984–91
134. van Wyngene L, Vanderhaeghen T, Timmermans S *et al.* Hepatic PPAR $\alpha$  function and lipid metabolic pathways are dysregulated in polymicrobial sepsis. *EMBO Mol Med* 2020; **12**: e11319
135. Bastin J, Aubey F, Rötig A, Munnich A, Djouadi F. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor pathway stimulates the mitochondrial respiratory chain and can correct deficiencies in patients' cells lacking its components. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**: 1433–41
136. Vega RB, Huss JM, Kelly DP. The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1868–76
137. Hondares E, Pineda-Torra I, Iglesias R, Staels B, Villarroya F, Giralt M. PPARdelta, but not PPARalpha, activates PGC-1alpha gene transcription in muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **354**: 1021–7
138. Hossain MA, Tsujita M, Gonzalez FJ, Yokoyama S. Effects of fibrate drugs on expression of ABCA1 and HDL biogenesis in hepatocytes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2008; **51**: 258–66
139. Gonzalez FJ, Shah YM. PPARalpha: mechanism of species differences and hepatocarcinogenesis of peroxisome proliferators. *Toxicology* 2008; **246**: 2–8

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: CASP-Operation und Sham-Operation.....	10
Abb. 2: schematische Darstellung des Versuchsablaufs .....	11
Abb. 3: Stadien der Respirometrie .....	15
Abb. 4: RCR im Sham- und CASP-Modell der Leber.....	19
Abb. 5: ADP/O-Quotient im Sham- und CASP-Modell der Leber.....	21
Abb. 6: MDA-Konzentration im Sham- und CASP-Modell der Leber.....	23



## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppenzuteilung der Versuchstiere .....	9
Tabelle 2: Versuchsablauf der respiratorischen Messung für Komplex I .....	14
Tabelle 3: Versuchsablauf der respiratorischen Messung für Komplex II .....	14
Tabelle 4: Vergleich der RCR des Komplex I im Sham- und CASP-Modell .....	19
Tabelle 5: Vergleich der RCR des Komplex II im Sham- und CASP-Modell .....	20
Tabelle 6: Vergleich der ADP/O-Werte für Komplex I im Sham- und CASP-Modell .....	21
Tabelle 7: Vergleich der ADP/O-Werte für Komplex II im Sham- und CASP-Modell .....	22
Tabelle 8: Vergleich der MDA-Konzentrationen in den Sham- und CASP-Kohorten .....	23

## 8. Anhang

### 8.1 Material, Geräte, Chemikalien des tierexperimentellen Versuchsteils

#### Material und Geräte

<b>4-0 Faden resorbierbar, geflochten</b>	VCP304 Ethicon Vicryl Plus, Johnson & Johnson, Neuss, Deutschland
<b>6-0 Faden nicht resorbierbar</b>	EH7403, Ethicon Prolene, Ethicon Inc, Somerville, USA
<b>Aufzeichnung hämodynamischer und respiratorische Parameter</b>	PowerLab, AD Instruments, Castle Hill, Australien
<b>Beatmungsgerät</b>	Inspira asv, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
<b>Blutdruckmessgerät</b>	Gould Statham Druckwandler P23ID, GOULD, Elk Grove, USA
<b>Blutgasanalyse</b>	ABL 800 Flex, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
<b>Inhalationsgerät</b>	Sulla 808, Dräger Medica, Lübeck, Deutschland
<b>Kapnograph</b>	Capnograph Typ 340, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
<b>Kompressen</b>	4078217, ES-Kompressen, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
<b>Lochtuch</b>	Raucodrape, 45x75 cm, 2-lagig, Lohmann & Rauscher International GmbH & Co KG, Rengsdorf, Deutschland
<b>Perfusor securia</b>	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen Deutschland

<b>Spritzen</b>	Omnifix-F, latex free, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Venenverweilkanüle 16 G + 14 G</b>	VasofixSafety, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Venenverweilkanüle 24 G</b>	IntrocanSafety-Winged, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Wärmematte</b>	Julabo 6, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland

### Chemikalien und Medikamente

<b>Atemgas</b>	Linde AG, Dublin, Irland
<b>Bepanthen Augensalbe</b>	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
<b>Buprenorphin</b>	Temgesic, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland
<b>CO<sub>2</sub> – Gasgemisch</b>	Linde Gruppe, Leuna, Deutschland
<b>Desinfektionsmittel</b>	Kodan, Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
<b>Gemfibrozil</b>	G9518 Sigma, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
<b>GW6471</b>	4618, Tocris Bioscience, Bristol, UK
<b>Isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)</b>	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
<b>Pancuroniumbromid</b>	Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk, Trittau, Deutschland
<b>Pentobarbital-Natrium</b>	Narcoren, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland
<b>Ringerlösung</b>	6737462.00.01, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

<b>Sevofluran</b>	SEVOrane, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
-------------------	---

## 8.2 Material, Geräte, Chemikalien des laborexperimentellen Versuchsteils

### Material und Geräte

<b>Becherglas Borosilikat 25 ml</b>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Becherglas Borosilikat 600 ml</b>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Behälter zum Homogenisieren</b>	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
<b>Brutschrank</b>	UT 6060, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
<b>Clark-Elektrode</b>	SI130 Microcathode Oxygen Electrode, Strathkelvin Instruments Ltd., North Lanarkshire, Schottland
<b>Elektrisches Rührwerk</b>	EUROSTAR 20 digital, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
<b>Falcon 15 ml</b>	Tube 15ml, 120x17mm, PP, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
<b>Falcon 50 ml</b>	Tube 50ml, 144x28mm, PP, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
<b>Flockeneisbereiter</b>	AF 80, Scotman, Venon Hills, USA
<b>Gefrierschrank -80 °C</b>	Forma 900 Ultratiefkühlschrank, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA
<b>Keimarme Kompressen</b>	ES-Kompressen, Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
<b>Magnetrührer</b>	Variomag Mono Direct, Variomag-USA, USA
<b>Messzylinder</b>	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

<b>Mikrotestplatte</b>	Mikrotestplatte 96-Well, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>pH-Meter</b>	Digital-pH-Meter 646, Laborausüstung Klees, Düsseldorf, Deutschland
<b>Pipetten</b>	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
<b>Pipettenspitzen</b>	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland
<b>Pipetus</b>	Pipetus, Hirschmann, Ebeerstadt, Deutschland
<b>Plattenlesegerät</b>	Multi-Detection Microplate Reader Synergy™2, Software Gen5 Version 1.11.5, BioTek, Winooski, Vermont, USA
<b>Reaktionsgefäß 1,5 ml</b>	Micro Tube 1,5ml, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
<b>Reaktionsgefäß 2 ml</b>	SafeSeal Micro Tube 2ml, PP, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
<b>Respirometer</b>	Mitocell MT200/200A, Strathkelvin Instruments Ltd., North Lanarkshire, Schottland
<b>Software Plattenlesegerät</b>	Gen5 Version 1.11.5, BioTek, Winooski, Vermont, USA
<b>Software Respirometer</b>	Strathkelvin Oxygen 782 System, Version 4.4, Strathkelvin Instruments Ltd., North Lanarkshire, Schottland
<b>Spritzen</b>	Exmire Microsyringe MS*R25, Ito Corporation, Fuji, Shizuoka, Japan
<b>Statistiksoftware</b>	GraphPad Software 8.0, La Jolla, USA
<b>Trockenschrank</b>	UT 6060, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
<b>Vortexgerät</b>	Vortex-Genie 1 Touch Mixer, Scientific Industries, New York, USA

<b>Waage</b>	Sartorius LA230 S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
<b>Wasserbad</b>	Julabo ED, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
<b>Zentrifuge</b>	Rotina 420R, Hettich Lab Technology, Mühlheim an der Ruhr, Deutschland

### Chemikalien

<b>1, 1, 3, 3,-Tetramethoxypropane (Malonaldehydbis(dimethylacetal))</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA
<b>1-Butanol</b>	EMPLURA®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>2-Thiobarbitursäure (TBA)</b>	Merck KGaA , Darmstadt, Deutschland
<b>3-MOPS</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>85 % Ortho-Phosphorsäure (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Adenosin 5'-diphosphat (ADP)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA
<b>Antimycin A</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA
<b>Aqua destillata</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Bovines Serum Albumin</b>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<b>Bovines Serum Albumin (fatty acid free)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA
<b>Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA
<b>Cytochrom C</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA

<b>Ethylenglykol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure, EGTA</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Flüssiger Stickstoff</b>	Linde AG, Dublin, Irland
<b>Glutamat</b>	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
<b>Kaliumchlorid (KCl)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumhydroxid (KOH)</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Kalium-Natrium-Tartrat (KNa-Tartrat)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kupfersulfatpentahydrat (CuSO<sub>4</sub> 5 H<sub>2</sub>O)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Malat</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Mannitol</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA
<b>Natriumcarbonat, wasserfrei (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)</b>	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
<b>Natriumhydroxid (NaOH)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumsulfid</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA
<b>Oligomycin</b>	Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Rotenon</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA
<b>Saccharose</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Succinat</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA
<b>Tetranatriumpyrophosphat ( Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA

**Lösungen und Puffer**

<b>0,6 % 2-Thiobarbitursäure (TBA)</b>	150 mg 2-Thiobarbitursäure 25 ml Aqua dest.
<b>1 % Phosphorsäure (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	85 % Ortho-Phosphorsäure 1:85 verdünnen z.B. 0,5 ml 85 % Ortho-Phosphorsäure 42 ml Aqua dest.
<b>1,15 % Kaliumchloridlösung</b>	0,575 g Kaliumchlorid 50 ml Aqua dest.
<b>Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA
<b>Isolationspuffer (pH 7,15)</b>	Mannitol 200 mM Saccharose 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5mM MOPS 5mM BSA 0,1 % EGTA 1 mM
<b>Lowry - Lösung 1</b>	10 ml Reagenz A (s. u.) 100 µl Reagenz B (s. u.) 100 µl Reagenz C (s. u.)
<b>Lowry- Lösung 2</b>	1 ml Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz 1 ml Aqua dest.
<b>Reagenz A</b>	10 g Natriumcarbonat in 500 ml 0,1 M Natriumhydroxidlösung gelöst
<b>Reagenz B</b>	2 g Natrium-Kalium-Tartrat in 100 ml Aqua dest. gelöst
<b>Reagenz C</b>	1 g Kupfersulfatpentahydrat in 100 ml Aqua dest. gelöst



<b>Respirationspuffer (pH 7,4)</b>	KCl 130 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM MOPS 20 mM EGTA 2,5 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 1 µM BSA 0,1%																						
<b>Standardreihe BSA</b>	<table border="1" data-bbox="651 636 1380 741"> <thead> <tr> <th></th> <th>K0</th> <th>K1</th> <th>K2</th> <th>K3</th> <th>K4</th> <th>K5</th> <th>K6</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Konzentration (in µg/ml) *</td> <td>0</td> <td>62,5</td> <td>125</td> <td>250</td> <td>500</td> <td>750</td> <td>1000</td> </tr> </tbody> </table> <p>* BSA (1 mg/ml) in Aqua dest.</p>								K0	K1	K2	K3	K4	K5	K6	Konzentration (in µg/ml) *	0	62,5	125	250	500	750	1000
	K0	K1	K2	K3	K4	K5	K6																
Konzentration (in µg/ml) *	0	62,5	125	250	500	750	1000																
<b>Standardreihe MDA</b>	<table border="1" data-bbox="644 822 1380 927"> <thead> <tr> <th></th> <th>Stock</th> <th>St.20</th> <th>St.10</th> <th>St.5</th> <th>St.2,5</th> <th>St.0</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Konzentration (in nM)*</td> <td>20.000</td> <td>20</td> <td>10</td> <td>5</td> <td>2,5</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table> <p>* MDA-Verdünnung mit KCl</p>								Stock	St.20	St.10	St.5	St.2,5	St.0	Konzentration (in nM)*	20.000	20	10	5	2,5	0		
	Stock	St.20	St.10	St.5	St.2,5	St.0																	
Konzentration (in nM)*	20.000	20	10	5	2,5	0																	

### 8.3 SRSS – Septic Rat Severity Score

#### Untersuchungsbogen

Experiment: \_\_\_\_\_ OP-Datum: \_\_\_\_\_

Stentdurchmesser: \_\_\_\_\_ Ratte Nr.: \_\_\_\_\_

Uhrzeit: \_\_\_\_\_

Klinische Untersuchung:

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

Auswertung:

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

Insgesamt erreichte Punktzahl (Addition der einzelnen Kategorien): \_\_\_\_\_

<b>Opferung des Tieres notwendig bei 10 oder mehr Punkten</b>	<b>Nein</b> <input type="checkbox"/> <b>Ja</b> <input type="checkbox"/>
---	--

Unterschrift des Untersuchers: \_\_\_\_\_

---

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Dissertationsarbeit begleitet haben.

Ein großer Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Olaf Picker für das Angebot der Dissertation zu diesem Thema, das Vertrauen und die Unterstützung bei meiner Arbeit von Beginn an. Außerdem möchte ich mich bei meiner Ko-Betreuerin Frau Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Scheckenbach für die Mitbetreuung der Dissertation bedanken.

Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus danke ich an dieser Stelle besonders für die zuverlässige, außerordentlich engagierte Betreuung und Hilfestellung in Rat und Tat in der gesamten Zeit meines Promotionsvorhabens. Vielen Dank für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die konstruktiven Ratschläge in jeder Phase meines Projekts.

Bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer möchte ich mich für die Betreuung im Labor und darüber hinaus für die Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen im Rahmen von Vorträgen und Symposien bedanken. Des Weiteren danke ich der medizinisch-technischen Assistentin Frau Claudia Dohle für die Hilfestellungen, Anleitungen und Projektunterstützung während meiner Zeit im Labor. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Mit-Doktoranden Max Sonnenschein und Tiermedizinerin Katharina Gross für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung im Rahmen des Forschungsprojekts bedanken. Insgesamt war die Arbeit an der Dissertation für mich einer sehr lehrreichen und prägenden Zeit. In diesem Sinne möchte ich auch allen weiteren Personen im Labor danken, die eine freundliche und hilfsbereite Atmosphäre geschaffen haben.

Meiner Familie und meinen Freunden bin ich dankbar für den bedingungslosen Beistand und die Motivation in allen Phasen meiner Dissertationsarbeit. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mir jederzeit unterstützend zur Seite steht.