

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

**Untersuchung der intestinalen mitochondrialen
Funktion im hämorrhagischen Schock nach
ischämischer Fernpräkonditionierung in der
Ratte**

Dissertation

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

vorgelegt von

Anne Sabine Hübner

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Günter Niegisch

Für meine Familie

Zusammenfassung (deutsch)

Durch den Blutverlust im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks (HS) bildet sich ein Missverhältnis zwischen O_2 -Angebot und -Bedarf mit Umverteilung des Blutvolumens zu Gunsten von Herz und Gehirn aus. Die Durchblutung des Splanchnikusgebietes ist jedoch für den Erhalt der mukosalen Barrierefunktion essentiell, da sie den Übertritt von Bakterien in die Blutbahn verhindert. Unter pathologischen Kreislaufverhältnissen kann zusätzlich eine mitochondriale Dysfunktion die Bildung von ATP und folgend die Funktionalität der Zelle reduzieren. Die ischämische Fernpräkonditionierung (RIPC) ist ein Phänomen, bei dem durch Induktion kurzer repetitiver Phasen aus Ischämie und Reperfusion in weiter entfernten Versorgungsgebieten körpereigene protektive Mechanismen in Gang gesetzt werden. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein hämorrhagischer Schock zu einer Dysfunktion intestinaler Mitochondrien führt und ob dies durch eine vorangehende RIPC moduliert werden kann.

48 männliche Wistar-Ratten wurden in vier Versuchsgruppen aufgeteilt (*Sham*, HS, RIPC und RIPC + HS). Die RIPC-Anwendung erfolgte durch induzierte Ischämie mittels Blutdruckmanschetten. Die Schockinduktion wurde durch eine Blutentnahme herbeigeführt (arterieller Zieldruck 35-40 mmHg). Die mitochondriale Funktion im Colon und Ileum wurde mittels Respirometrie bestimmt. Durch Zugabe von Glutamat/Malat und Succinat (Substrate für Komplex I/II) wurde die basale Geschwindigkeit der Atmungskette (*State 2*) und durch Zugabe von ADP die Geschwindigkeit des maximalen Sauerstoffverbrauchs (*State 3*) gemessen. Der *respiratory control index* ($RCI = State3/State2$) als Parameter für die Kopplung zwischen der Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung und die ADP/ O_2 -Ratio (zugegebenes ADP/ O_2 -Verbrauch in *State 3*) als Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung wurden berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Tests und Dunns Korrektur (* $p < 0,05$).

Die ADP/ O_2 -Ratio ist nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I im Colongewebe in der RIPC-Gruppe gegenüber der Schock-Gruppe signifikant erhöht. Im Übrigen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Weder der HS alleine hat zu einer Dysfunktion intestinaler Mitochondrien geführt, noch hat RIPC modulierende Effekte im Rahmen eines HS auf die mitochondriale Funktion in Ileum und Colon gezeigt.

Abstract (englisch)

Blood loss during hemorrhagic shock (HS) creates a mismatch between O₂-supply and -demand with redistribution of blood volume in favor of heart and brain. However, blood flow to the splanchnic area is essential for maintaining mucosal barrier function and thus preventing the passage of bacteria into the bloodstream. Under pathological circulatory conditions, mitochondrial dysfunction can reduce the formation of ATP and consequently the functionality of the cell. Remote ischemic preconditioning (RIPC) is a phenomenon in which endogenous protective mechanisms are initiated by inducing short repetitive phases of ischemia and reperfusion in more distant supply areas. The purpose of this work was to investigate whether hemorrhagic shock leads to dysfunction of intestinal mitochondria and whether this can be modulated by preceding RIPC. 48 male Wistar rats are divided into four experimental groups (*sham*, HS, RIPC, RIPC + HS). RIPC application was induced by ischemia using blood pressure cuffs. The HS was induced by blood sampling (target arterial blood pressure 35-40 mmHg). Mitochondrial function was determined by respirometry. The basal rate of the respiratory chain (state 2) was measured by addition of glutamate/malate and succinate (substrates for complex I/II) and the rate of maximal oxygen consumption (state 3) was measured by addition of ADP. The respiratory control index ($RCI = \text{state3}/\text{state2}$) as a parameter for the coupling between the respiratory chain and oxidative phosphorylation as well as ADP/O ratio (added ADP/O₂-consumption in state 3) as a measure of the efficiency of oxidative phosphorylation were calculated. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis tests and Dunn's correction (* $p < 0.05$).

The ADP/O ratio was significantly increased after stimulation of the respiratory chain via complex I in colon tissue in the RIPC group compared with the shock group. In all other respects, no significant differences are shown. Neither HS alone leads to dysfunction of intestinal mitochondria, nor did RIPC show modulatory effects in the setting of HS on mitochondrial function in ileum and colon.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ADP/O-Ratio	Adenosindiphosphat -Sauerstoff-Ratio
Ag	Argentum (Silber)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrom</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
Cu	Kupfer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
e⁻	Elektron
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
FAD/FADH₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm
G/M	Glutamat/Malat
h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
H₃PO₄	Phosphorsäure
IL	Interleukin
IMR	Intermembranraum
i.p.	Intraperitoneal
IPC	<i>Ischemic Preconditioning</i>
I/R	Ischämie/Reperfusion
JAK-STAT	Januskinase – <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid

kg	Kilogramm
Max	Maximum
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
Min	Minimum
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
M	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mol/Liter
mM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mmol/Liter
µM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht µmol/Liter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
n	Anzahl
NAD⁺/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
nM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht nmol/Liter
nmol	Nanomol (10 ⁻⁹ mol)
O₂	Sauerstoff
OH	Hydroxid-Ion
pA	Pikoamper
Pi	Phosphat
rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
RCI	<i>Respiratory Control Index</i>
RIPC	<i>Remote Ischemic Preconditioning</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>

Sham	Schein, Kontrollgruppe
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
S/R	Succinat/Rotenon
TBA	Thiobarbitursäure
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hämorrhagischer Schock	1
1.2	Mitochondrien – Aufbau, Funktion und Bedeutung	3
1.3	Ischämische Präkonditionierung (<i>ischemic preconditioning</i> , IPC).....	6
1.4	Ischämische Fernpräkonditionierung (<i>remote ischemic preconditioning</i> , RIPC).....	7
1.5	Fragestellung und Ziel dieser Arbeit.....	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Tierexperimenteller Teil	11
2.1.1	Versuchstiere	11
2.1.2	Versuchsablauf.....	12
2.2	Laborexperimenteller Teil	14
2.2.1	Herstellung der Gewebehomogenate (Colon und Ileum)	14
2.2.2	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Lowry-Methode	15
2.2.3	Respiratorische Messung zur Bestimmung der mitochondrialen Funktion	17
2.2.4	Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) in Colon und Ileum	22
2.3	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	25
3.1	Ergebnisse der respiratorischen Messungen im Colon	25
3.2	Ergebnisse der respiratorischen Messungen im Ileum.....	28
3.3	MDA-Assay in Colon und Ileum.....	30
4	Diskussion	31
4.1	Ergebnisdiskussion.....	31
4.1.1	Diskussion der mitochondrialen Funktion in Colon und Ileum.....	31
4.1.2	Diskussion der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Colon und Ileum	36
4.2	Methodendiskussion	38
4.2.1	Anwendung der ischämischen Fernpräkonditionierung (RIPC) in einer tiermedizinischen Versuchsreihe	38
4.2.2	Experimentelle Induktion eines hämorrhagischen Schocks	40
4.2.3	Respirometrie zur Ermittlung der mitochondrialen Funktion	41
5	Ausblick	43

6	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	44
7	Anhang	49
7.1	Verwendete Reagenzien und Chemikalien des laborexperimentellen Versuchteils.....	49
7.2	Verwendete Lösungen und Puffer des laborexperimentellen Versuchteils.....	50
7.3	Verwendete Geräte und Materialien des laborexperimentellen Versuchteils.....	50

1 Einleitung

1.1 Hämorrhagischer Schock

Der hämorrhagische Schock ist im klinischen Alltag extrem bedeutsam, da es sowohl im Rahmen von Operationen als auch durch Traumata häufig zu starken Blutverlusten kommt, die nicht selten eine hämodynamische Instabilität zur Folge haben [1, 2].

Es ist bekannt, dass die unzureichende Stillung einer Blutung ein wesentlicher und vermeidbarer Faktor für das Versterben von Traumatopatienten ist [3]. Schätzungsweise 1,9 Millionen Menschen sterben weltweit pro Jahr aufgrund einer Hämorrhagie [4]. Wird der Blutverlust initial überlebt, zeigen sich bei den Überlebenden jedoch neben einer erhöhten Langzeit-Mortalitätsrate auch häufig bleibende Funktionseinschränkungen [4].

Vor allem in den ersten Tagen nach einem Trauma sind die Haupttodesursachen der hämorrhagische Schock (Tag 0-1) sowie Verletzungen des zentralen Nervensystems (ZNS) im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas (Tag 2-6). Im weiteren Verlauf ist für die Sterblichkeit der Patienten zunehmend das Multiorganversagen von Bedeutung (Tag 3-30) [5].

Moore et al. haben zur Klärung der Frage nach der Ursache des Multiorganversagens bei Traumatopatienten zwei mögliche Modelle erarbeitet:

Im *one-hit*-Modell führt die starke traumatische Verletzung direkt zur Auslösung eines sogenannten „*Systemic Inflammatory Response Syndrome*“ (SIRS) mit nachfolgender Organdysfunktion. Im *two-hit*-Modell ist die anfängliche Schädigung durch das Trauma nicht so massiv, sondern viel mehr führen nachfolgende Komplikationen wie Infektionen und Sepsis, Embolien oder auch notwendige Sekundäroperationen zum Multiorganversagen [6, 7].

Beim hämorrhagischen Schock handelt es sich um eine Unterform des hypovolämischen Schocks. Durch den Blutverlust bildet sich ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf auf zellulärer Ebene aus [8]. Um dem Blutverlust

und dem damit einhergehenden Sauerstoffmangel in dieser lebensbedrohlichen Kreislaufsituation entgegenzuwirken, besitzt der menschliche Körper einige Kompensationsmechanismen. Dazu gehören neben einer initialen Tachykardie [9] und einer Tachypnoe, eine sympathikusvermittelte Vasokonstriktion. Schließlich kommt es im hämorrhagischen Schock zu einer Umverteilung des zirkulierenden Blutvolumens zu Gunsten von lebenswichtigen Organen wie Herz und Gehirn, während vor allem das Splanchnikus-Gebiet weniger durchblutet wird [10].

Unsere körpereigenen Kompensationsmechanismen können im Zusammenhang eines hämorrhagischen Schocks initial das Überleben sichern. Wird jedoch die nur wenige Stunden betragende kritische Ischämiezeit des Darmes überschritten, kann dies drastische Folgen für den Organismus haben. Eine ausreichende Durchblutung und Sauerstoffversorgung der gastrointestinalen Schleimhaut ist für den Erhalt der mukosalen Barrierefunktion essentiell, die unter anderem einen Übertritt von Bakterien und Toxinen in die Blutbahn verhindert [11]. Gelangen schließlich Bakterien und Toxine, die im Magen-Darm-Trakt physiologischerweise zu finden sind, im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks mit einhergehendem Verlust der mukosalen Barrierefunktion [12] in die Blutbahn, kann es zur Sepsis mit nachfolgendem Multiorganversagen kommen [13-15].

Neuere klinische Studien zeigen, dass nicht nur der direkte Übertritt von Bakterien und Toxinen in die Blutbahn für die Entstehung eines Multiorganversagens bei kritisch kranken Patienten relevant ist. Vielmehr ist die lokale Entzündungsreaktion und das Überschreiten der bakteriellen Erreger und ihrer Produkte in die mesenterialen Lymphgefäße, welche über die Cisterna chyli zum Ductus thoracicus und schließlich in die linke Vena subclavia drainieren, bedeutsam. Über diesen Weg kommt es bei kritisch erkrankten Patienten häufig zum auftretenden „*Acute Respiratory Distress Syndrom*“ (ARDS), welches schließlich im Multiorganversagen enden kann [16].

Zudem ist bekannt, dass auch die Therapie des hämorrhagischen Schocks und die folgende Reperfusion bereits ischämischer Zellen dem Organismus Schaden zufügen kann. Durch die anhaltende Ischämie sammeln sich anfallende Stoffwechselprodukte wie Laktat an, welche zu einer metabolischen Azidose führen.

Die Mitochondrien reagieren auf die nachfolgende Reperfusion mit einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und es kommt zur Aktivierung apoptotischer und nekrotischer Wege mit folgendem Untergang der Zellen [17, 18].

Diese Ausführungen machen deutlich, welche enorme Bedeutung einer ausreichenden Durchblutung und Sauerstoffversorgung des Gastrointestinaltraktes zukommt.

1.2 Mitochondrien – Aufbau, Funktion und Bedeutung

Bei der genaueren Betrachtung der Pathophysiologie der gestörten mukosalen Barrierefunktion ist ein Blick auf die Funktionsweise der Mitochondrien unerlässlich. Mitochondrien sind Zellorganellen, die man mit Ausnahme der Erythrozyten, in allen eukaryotischen Zelltypen findet. Neben der Produktion von Adenosintriphosphat (ATP), dem universellen Energielieferanten unseres Organismus, sind die Mitochondrien an zahlreichen weiteren essentiellen, physiologischen Stoffwechselfunktionen beteiligt. Dazu gehören, neben der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), unter anderem auch die intrazelluläre Calcium-Regulation, das Auslösen von Apoptose und Nekrose [19], sowie die Thermoregulation [20].

Umgeben sind die Mitochondrien von einer Doppelmembran, bestehend aus einer äußeren und einer inneren Membran, sowie dem Intermembranraum (IMR) und der Matrix. Die innere Mitochondrienmembran ist zur Vergrößerung der Oberfläche stark aufgefaltet und umfasst die fünf Komplexe der sogenannten Elektronentransportkette, über die die Erzeugung von Energie in Form von ATP erfolgt [21].

Dabei werden die Elektronen der Reduktionsäquivalente NADH/H^+ und FADH_2 , die im Rahmen von Redoxreaktionen frei werden, von Komplex I bis Komplex IV transportiert und die dabei freiwerdende Energie zum Aufbau eines Protonengradienten im Intermembranraum genutzt. Die Protonen werden schließlich über einen Protonenkanal, der F_0 - Untereinheit des Komplexes V, durch ihren Gradienten zurück in den inneren Matrixraum getrieben. Durch diesen Protonenfluss angetrieben, findet an Komplex V, der ATP-Synthase, die sogenannte

oxidative Phosphorylierung statt. Unter Reduktion von molekularem Sauerstoff wird aus Adenosindiphosphat und Phosphat (P_i) das energiereiche ATP gebildet [22]. Der schematische Aufbau und Ablauf sind in Abb. 1 dargestellt.

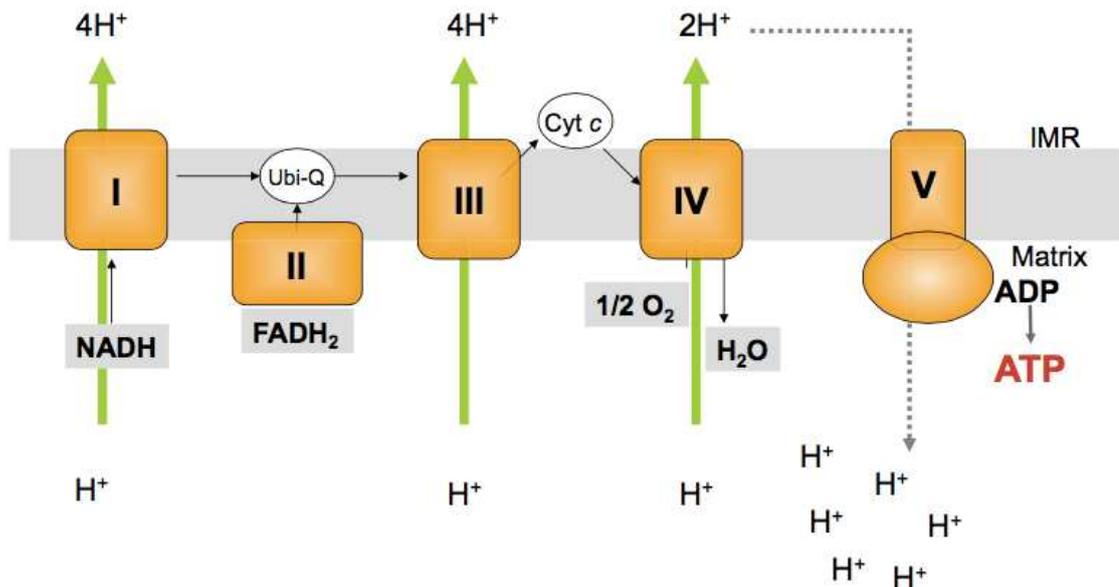


Abb. 1: Schematische Darstellung der Mitochondrienfunktion

Die Elektronen der Reduktionsäquivalente $NADH/H^+$ und $FADH_2$ werden im Rahmen von Redoxreaktionen frei und von Komplex I zu Komplex V transportiert. Die dabei frei werdende Energie wird zum Aufbau eines Protonengradienten aus dem Matrixraum in den Intermembranraum (IMR) genutzt. An Komplex V, der ATP-Synthase, findet schließlich die ATP-Produktion statt (modifiziert nach: Ernährung, Verdauung und Bioenergetik, Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Reichert, Andreas et al., 2016) [23].

Im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung werden in den Mitochondrien rund 90% des zellulären Sauerstoffs verbraucht [24].

Kommt es nun im Rahmen eines hämorrhagischen Schockes zur Zentralisierung des Blutvolumens und damit zu einer Minderdurchblutung des Gastrointestinaltraktes mit einer damit verbundenen, nicht ausreichenden Sauerstoffversorgung, rücken die Mitochondrien in den Fokus der Betrachtungen. Durch den hämorrhagischen Schock induziert, kommt es zur mitochondrialen Dysfunktion mit Verlust des elektrischen Potentials unter anderem über Bildung von mPTP (*mitochondrial permeability transition pore*) und vermehrter Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sowie von apoptoseauslösenden Proteinkomplexen,

sodass die Bildung von ATP unterbunden und damit die Funktionalität der Zelle reduziert wird [25-27].

Es ist bereits bekannt, dass die mitochondriale Dysfunktion mit dem Verlust der Barrierefunktion und der Entstehung einer Sepsis in Verbindung steht [19]. Des Weiteren wird die mitochondriale Dysfunktion auch mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen, wie zum Beispiel der Rechts- und Linksherzinsuffizienz oder der koronaren Herzkrankheit in Verbindung gebracht [28]. Auch bei der Pathogenese des akuten Nierenversagens, das auch im Rahmen eines hämorrhagischen Schockes auftreten kann, ist ein Defizit in der mitochondrialen Funktion erkennbar [29]. Cairns et al. sind in einer prospektiven Studie im Jahr 1997 zum Ergebnis gekommen, dass das Auftreten von Multiorganversagen bei Traumapatienten im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks trotz erhaltener Sauerstoffversorgung mit Anzeichen einer mitochondrialen Dysfunktion assoziiert ist [30].

Untersuchungen haben gezeigt, dass die mitochondriale Funktion während Ischämie und Reperfusion jedoch besonders effektiv durch die ischämische Präkonditionierung gesteigert werden kann [31].

Im Rahmen der ATP-Produktion entstehen in den Mitochondrien, unter anderem an Komplex I und III [32], reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie das Superoxid-Anion. Reaktive Sauerstoffspezies besitzen ungepaarte Elektronen und sind daher freie Radikale. Erste Untersuchungen zu diesem Thema wurden bereits im Jahr 1966 von Jensen et al. angestellt [33] und stellen seither einen wichtigen Gegenstand aktueller Forschungen dar. Durch eine Überproduktion an ROS entsteht im Körper oxidativer Stress, welcher über die Oxidation von beispielsweise Desoxyribonukleinsäure (DNA), Proteinen oder Lipiden an verschiedenen Krankheits- und Alterungsprozessen beteiligt ist [34-36].

Malondialdehyd (MDA) entsteht, wenn freie Radikale mit ungesättigten Fettsäuren reagieren und stellt somit einen wichtigen Marker für die Lipidperoxidation dar [37]. Es gilt als indirektes Maß zur Bestimmung des oxidativen Stresses bzw. der Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies.

Um sich vor einer Schädigung durch ROS zu schützen, besitzt der Organismus verschiedene Schutzmechanismen. Bereits im Jahr 1969 wurde erstmals die

Superoxid-Dismutase beschrieben, welche eine enzymatische Reaktion von Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid katalysiert [38].

1.3 Ischämische Präkonditionierung (*ischemic preconditioning, IPC*)

Die ischämische Präkonditionierung (*ischemic preconditioning, IPC*) beschreibt ein Phänomen, bei dem durch kurze repetitive Phasen aus Ischämie und Reperfusion körpereigene protektive Mechanismen in Gang gesetzt werden. Die kurzen Perioden aus Ischämie und Reperfusion können vor Ischämie-/Reperfusion-(I/R)-induzierten Schäden auf das jeweilige Organ protektiv wirken.

Bereits im Jahr 1986 konnten Murry et al. am Herzen von Hunden zeigen, dass mit Hilfe von ischämischer Präkonditionierung der Coronararterien die Größe des geschädigten Areals vor einer folgenden längeren Ischämieperiode im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert werden kann [39].

Schließlich konnten auch positive Effekte von IPC am Menschen in Form kurzer Ischämien im Rahmen einer neu aufgetretenen Angina pectoris vor einem akuten Myokardinfarkt nachgewiesen werden. In der klinischen Studie von Napoli et al. ergaben sich Hinweise darauf, dass eine unmittelbar vor einem Myokardinfarkt neu aufgetretene Angina pectoris, welche als kurze Periode aus Ischämie und Reperfusion wirkt, mit einer reduzierten Infarktgröße sowie mit einer gesteigerten Regeneration der Funktion nach einer Thrombolyse assoziiert ist [40].

Im Laufe der Zeit wurden zudem protektive Effekte auch auf andere Organe beschrieben. So konnten Cinel et al. im Jahr 2002 nachweisen, dass die Anzahl apoptotischer Zellen im Ileum männlicher Wistar Ratten bei zeitlich begrenzter Okklusion der Arteria mesenterica superior unter ischämischer Präkonditionierung signifikant geringer war [41]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die ischämische Präkonditionierung durch reversiblen Verschluss der Arteria mesenterica superior einen Schaden am intestinalen Gewebe verringern kann und protektiv auf die intestinale Mikrozirkulation wirkt [42]. Auch an der Leber [43] und den Nieren [44] hat die ischämische Präkonditionierung protektive Effekte auf das jeweilige Gewebe.

Im Hinblick auf den möglichen Mechanismus der protektiven Effekte durch die ischämische Präkonditionierung diskutieren Hausenloy et al. zahlreiche unterschiedliche Signalkaskaden wie unter anderem die der Proteinkinase C, der ATP-sensitive Kaliumkanäle und den JAK-STAT-Signalweg [45].

1.4 Ischämische Fernpräkonditionierung (*remote ischemic preconditioning, RIPC*)

Die ischämische Fernpräkonditionierung (*remote ischemic preconditioning, RIPC*) stellt eine Begriffserweiterung dar und beschreibt, dass IPC nicht nur am primär betrachteten Organ, sondern auch in weiter entfernten Versorgungsgebieten protektiv wirkt. Erstmals protektive Effekte durch RIPC wurden durch Przyklenk et al. im Jahr 1993 anhand der nach RIPC-Induktion reduzierten Infarktgröße an Hundeherzen nachgewiesen [46]. Induziert werden können diese protektiven Effekte zum Beispiel nicht invasiv durch Erzeugung kurzer repetitiver Phasen aus Ischämie und Reperfusion durch eine wechselnd aufgepumpte Blutdruckmanschette an oberer oder unterer Extremität [47].

Bereits nachgewiesen ist, dass sowohl die ischämische Präkonditionierung als auch die ischämische Fernpräkonditionierung vor einem folgenden hämorrhagischen Schock protektiv wirken. Schon im Jahr 2011 haben Untersuchungen von Woan-Ching et al. ergeben, dass RIPC bei Ratten eine Reduktion der durch einen hämorrhagischen Schock induzierten Lungenschädigung bewirkt [48].

Außerdem konnten Leung et al. nachweisen, dass die ischämische Fernkonditionierung im Mausmodell vor und auch während der Phase aus Ischämie und Reperfusion eine Reduktion des Leberschadens bewirken kann und die Entzündungsreaktion sowie einen Schaden der Lunge mildern kann [49]. Ebenso führt die ischämische Fernpräkonditionierung bei Ratten mit schwerem hämorrhagischem Schock zu einer Verbesserung der myokardialen und neurologischen Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe [50].

Nachdem bereits einige Studien mit Fokus auf die protektiven Effekte von IPC/RIPC auf Ischämie/Reperfusionsschäden an Herz, Gehirn und Nieren veröffentlicht wurden, weisen neuere Ergebnisse aus einer laborexperimentellen

Studie an männlichen Wistar-Ratten von Hummitzsch et al. aus dem Jahr 2019 darauf hin, dass RIPC auch einen intestinalen I/R-Schaden verbessern kann [51]. Schließlich konnten Dai et al. zeigen, dass die ischämische Fernpräkonditionierung im Rahmen eines induzierten hämorrhagischen Schocks in einem Ratten-Modell das Kurzzeitüberleben über sechs Wochen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhen kann [52].

Eine neue tierexperimentelle Versuchsreihe aus dem Jahr 2021 von Zhao et al. deutet darauf hin, dass die RIPC-Induktion im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks die Größe eines sekundären Leberschadens vermindern kann [53].

Lange Zeit war die Studienlage bezüglich der klinischen Wirksamkeit der ischämischen Fernpräkonditionierung unklar. In einer prospektiven Studie von Meybohm et al. im Jahr 2015 konnten keine protektiven Effekte von der ischämischen Fernpräkonditionierung bei elektiven herzchirurgischen Eingriffen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Als primäre Endpunkte wurden dabei das Auftreten von Todesfällen, Myokardinfarkten, Schlaganfällen und akutem Nierenversagen im Rahmen des Krankenhausaufenthaltes betrachtet [54]. Drei Jahre später ergaben sich in einer klinischen Studie von Kleinbongard et al. jedoch Hinweise darauf, dass RIPC bei elektiven herzchirurgischen Eingriffen protektiv auf die mitochondriale und kontraktile Funktion am Gewebe des rechten Vorhofs wirkt [55].

Bei der Suche nach dem möglichen Wirkmechanismus hinter der ischämischen Fernpräkonditionierung werden, ähnlich wie bei IPC, verschiedene Mechanismen beschrieben: Donato et al. diskutieren in einem *Review* aus dem Jahr 2021 die möglichen Signalkaskaden. Neben neuronalen, werden auch humorale und systemische Mechanismen untersucht (Abb. 2) [56].

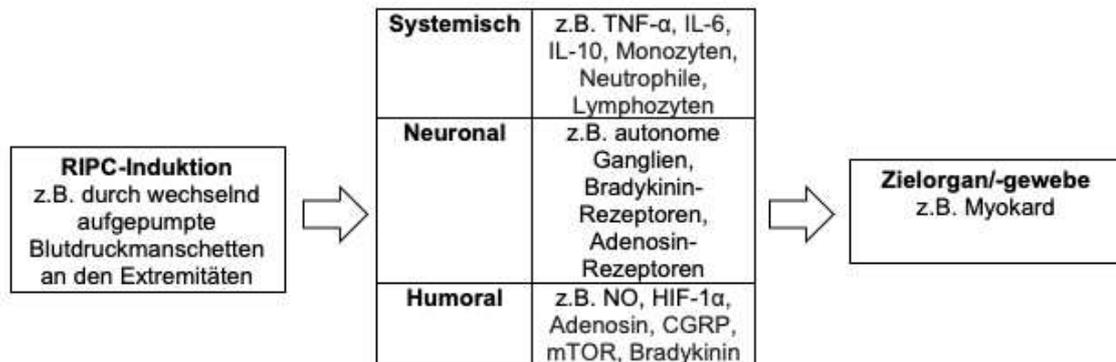


Abb. 2: Schematische Darstellung der möglichen Wirkmechanismen der ischämischen Fernpräkonditionierung (RIPC)

Neben neuronalen, werden auch systemische und humorale Wirkmechanismen durch RIPC-Induktion diskutiert (modifiziert nach: *Myocardial remote ischemic preconditioning: from cell biology to clinical application*, Donato M et al., 2021) [56].

In Zusammenschau der hier betrachteten Studien lässt sich also festhalten, dass bislang noch unklar ist, welcher konkrete Mechanismus hinter den protektiven Effekten von IPC und RIPC steckt. Jedoch rückt die mitochondriale Funktion dabei immer mehr in den Fokus der Betrachtung. Eine Reduktion der mitochondrialen Funktion zeigt sich nicht nur bei reiner Ischämie durch Verschluss eines versorgenden Gefäßes, sondern auch im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks und der folgenden Reperfusion [26, 57]. Das Auftreten von Multiorganversagen ist bei Patienten nach hämorrhagisch-traumatischem Schock mit einer erhöhten Inzidenz an mitochondrialer Dysfunktion assoziiert [30].

Es ist fraglich, ob die ischämische Fernpräkonditionierung schließlich eine verbesserte Mikrozirkulation im Splanchnikusgebiet während eines hämorrhagischen Schocks erzielen kann. Zudem ist ungeklärt, ob durch die verbesserte intestinale Mikrozirkulation auch die Schock-induzierte mitochondriale Funktion verbessert und ob damit gegebenenfalls die Funktionalität der Mukosazellen gesteigert werden könnte.

1.5 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

1. Führt die Induktion eines hämorrhagischen Schocks im Allgemeinen zu einer mitochondrialen Dysfunktion in Ileum und Colon?
2. Kann eine durch einen hämorrhagischen Schock induzierte mitochondriale Dysfunktion in Ileum und Colon durch eine vorangehende ischämische Fernpräkonditionierung moduliert werden?
3. Kommt es im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks zu einer vermehrten Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies und damit zu einem Anstieg des oxidativen Stresslevels in Ileum und Colon und kann diese gegebenenfalls durch die ischämische Präkonditionierung moduliert werden?

Falls die ischämische Fernpräkonditionierung zu einer verbesserten mitochondrialen Funktion während eines hämorrhagischen Schocks führt und damit die Funktionalität der Mukosazellen verbessert, könnte dies im klinischen Alltag, beispielsweise bei chirurgischen Eingriffen mit erwartet großem Blutverlust oder bei der Behandlung von Traumapatienten, Anwendung finden.

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimenteller Teil

Detaillierte Angaben zu den verwendeten Materialien und Geräten sind im Anhang zu finden. Der tierexperimentelle Teil der Versuchsreihe wurde von Herrn Untiedt durchgeführt. Eine Teilnahme der Autorin an einem Tierversuchskurs im Rahmen dieser Arbeit war somit nicht erforderlich. Die Durchführung der Versuche wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen: 81-02.04.2018.A308) zuvor genehmigt.

2.1.1 Versuchstiere

Bei der Versuchsreihe, die vor der Organentnahme zur Messung der Mitochondrienfunktion durchgeführt wurde, handelt es sich um eine experimentelle in vivo Studie. Die Versuche wurden an 48 gesunden, juvenilen, drei Monate alten männlichen Wistar-Ratten (Gewicht $350 \text{ g} \pm 50 \text{ g}$) aus Janvier (Frankreich) durchgeführt. In der „Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben“ (ZETT) an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf wurden die Versuchstiere untergebracht. Gehalten wurden sie konventionell in Makrolon®-Einzelkäfigen vom Typ 3 unter klimatisierten Bedingungen (Raumtemperatur $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $50 \% \pm 5 \%$, Luftumwälzrate 16-20mal pro Stunde). Mittels weißem Kunstlicht (300-320 Lux) wurde ein 12-Stunden-Tag-Nacht-Wechsel simuliert. Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest), sowie Trinkwasser (ozonisiert, mit Salzsäure angesäuert, pH 2,6-3,0) stand den Tieren jederzeit ad libitum zur Verfügung.

Gruppe	Versuch	Anzahl (n)
1	<i>Sham</i> (= Kontrollgruppe, kein hämorrhagischer Schock, keine RIPC)	12
2	Hämorrhagischer Schock	12
3	RIPC	12
4	Hämorrhagischer Schock + RIPC	12

Tabelle 1: Versuchsgruppen 1-4 des tierexperimentellen Versuchsteils

2.1.2 Versuchsablauf

Mittels Randomisierung wurde vor dem Beginn des Versuches eine der vier Versuchsgruppen festgelegt (Tabelle 1) und im Weiteren nach einem bestimmten Schema entsprechend der jeweiligen Gruppe fortgefahren.

Zunächst wurden die Versuchstiere gewogen und gewichtsadaptiert durch Pentobarbital (100 mg/kg i.p. = 0,625 ml/kg) die Narkose eingeleitet. Während des gesamten Versuchs wurde rektal die Temperatur der Tiere erfasst und mittels Wärmezufuhr über eine Wärmematte reguliert. Nach der Durchführung einer Tracheotomie wurden die Versuchstiere konstant maschinell beatmet. Es folgte, zum einen eine Kanülierung der Vena jugularis externa zur Aufrechterhaltung der Narkose und zur Flüssigkeitstherapie, zum anderen eine Kanülierung der Arteria femoralis zur kontinuierlichen Blutdruckmessung. Zusätzlich wurde ein Zugang in die Arteria carotis externa gelegt, um einen Zugang zu regelmäßigen Blutgasanalysen (BGA) sicherzustellen und gegebenenfalls den hämorrhagischen Schock zu induzieren.

Nach der Rasur der Operationsoberfläche am Bauch des Tiers, wurde eine mediane Laparotomie von etwa 2 cm durchgeführt und zwei O₂-C Messsonden zur Messung der Gewebeoxygenierung und der mikrozirkulatorischen Perfusion an jeweils ausgelagerten proximalen Colon- und distalen Ileum-Darmschlingen angelegt. Zudem erfolgte die Messung der oralen Mikrozirkulation sublingual mittels Videomikroskopie (Cytocam). Zu jeweils definierten Zeitpunkten wurden Blutproben (circa 90 µl) aus der Arteria carotis externa für die Blutgasanalysen entnommen. Über die Werte der Blutgasanalyse war es möglich, die maschinelle Beatmung zu kontrollieren und gegebenenfalls anzupassen. In Abb. 3 sind die

Versuchsprotokolle der einzelnen Gruppen schematisch dargestellt, die im Folgenden erläutert werden.

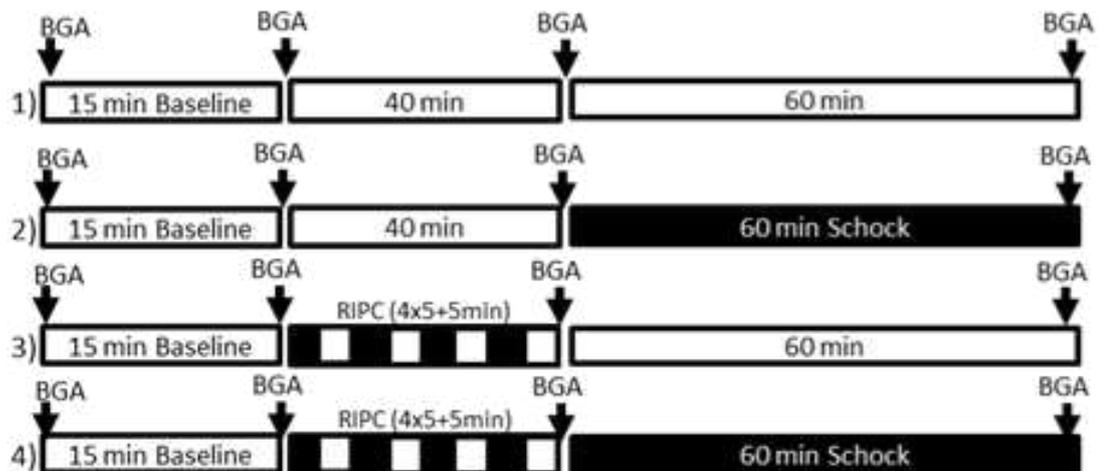


Abb. 3: Schematische Darstellung der Versuchsprotokolle der Versuchsgruppen 1-4

Im jeweiligen Versuchsprotokoll der einzelnen Versuchsgruppen (1 Sham; 2 hämorrhagischer Schock; 3 RIPC; 4 RIPC + hämorrhagischer Schock) erfolgt zu jeweils definierten Zeitpunkten die Abnahme einer arteriellen Blutgasanalyse (BGA).

Nach einer 15-minütigen Stabilisierungsphase (*Baseline*), wurden in allen Gruppen zunächst eine BGA entnommen und die Messung der Mikrozirkulation mittels O2-C und CytoCam durchgeführt. In den Versuchsgruppen, in denen die ischämische Fernpräkonditionierung durchgeführt wurde (Gruppe 3 und 4), wurden Blutdruckmanschetten um die beiden Hinterläufe angelegt und insgesamt viermal für jeweils 5 Minuten auf 200 mmHg aufgepumpt. Anschließend wurde der Druck abgelassen und es folgte eine 5-minütige Reperfusionphase. Bei den Versuchsgruppen, in denen die ischämische Fernpräkonditionierung nicht durchgeführt wurde (Gruppe 1 und 2), wurden die Blutdruckmanschetten für 40 Minuten um die Hinterläufe gelegt, jedoch nicht aufgepumpt.

Im Anschluss wurden wiederum eine BGA entnommen und die Messung der Mikrozirkulation mittels O2-C und CytoCam durchgeführt.

Bei den Versuchsgruppen, in denen ein hämorrhagischer Schock induziert wurde (Gruppe 2 und 4), wurde über den Zugang in der Arteria carotis externa Blut entnommen, bis ein mittlerer arterieller Zieldruck von 35-40 mmHg erreicht wurde.

In den darauffolgenden 60 Minuten wurde dieser mittlere arterielle Zieldruck durch intermittierende Blutabnahme bzw. durch die Zufuhr von Vollelektrolytlösung aufrechterhalten. In den Versuchsgruppen, in denen kein hämorrhagischer Schock induziert wurde (Gruppe 1 und 3), wurde der Versuch ohne schockinduzierende Maßnahmen für 60 Minuten weitergeführt.

Zum Abschluss erfolgte erneut die Entnahme einer BGA, sowie die Messung der Mikrozirkulation mittels O2-C und CytoCam.

Durch Exsanguination (Blutabnahme über arterielle Zugänge) wurden die Tiere am Ende des Versuchs schmerzfrei und fachgerecht unter Narkose euthanasiert. Daraufhin erfolgte die Organentnahme von jeweils etwa 10 cm distalem Ileum und proximalem Colon.

2.2 Laborexperimenteller Teil

Detaillierte Angaben zu den verwendeten Reagenzien, Lösungen und Geräten sind im Anhang zu finden.

2.2.1 Herstellung der Gewebehomogenate (Colon und Ileum)

Nach Organentnahme am tiermedizinischen Arbeitsplatz wurden Ileum und Colon sofort in zwei separate, mit Isolationspuffer gefüllte Bechergläser gegeben, auf Eis gelagert und ab diesem Zeitpunkt ohne Unterbrechung gekühlt. Mit einer Präzisionswaage wurde das Gewicht der beiden Gewebestücke ermittelt und im Dokumentationsbogen notiert.

Im Anschluss wurden Ileum und Colon mit Hilfe von zwei Pinzetten von dem restlichen Fettgewebe und Kot befreit, in der Längsachse aufgeschnitten und vorsichtig mit einer Kompresse abgetupft. Dieser Schritt diente der Entfernung der Mukosa von den Gewebestücken. Im nächsten Schritt wurde zur Auflösung der Zellverbände jeweils gewichtsadaptiert Trypsin-EDTA (2000 µl Trypsin-EDTA/1g Ileum bzw. Colon) auf die präparierten Organe gegeben und jeweils fünf Minuten inkubiert. In einem neuen mit Isolationspuffer, 20 mg/ml Albumin und dem Proteaseinhibitor cOmplete™ gefüllten Becherglas wurden Ileum und Colon zunächst mit einer Schere klein gehexelt und anschließend sechsmal mit dem

Potter-Elvehjem-Homogenisierstab bei 2000 rpm homogenisiert. Über eine Kom-
presse wurden die fertigen Gewebehomogenate in separate 50 ml Falcons
gefiltriert.

2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Lowry-Methode

Die Ermittlung der Proteinkonzentration in den Gewebehomogenaten erfolgte
nach der Lowry-Methode [58]. Zur Durchführung wurden zunächst zwei
Lösungen und eine Standardreihe hergestellt. Lösung 1 setzte sich zusammen
aus den Lowry-Reagenzien A, B und C (im Verhältnis 10 000 : 1 : 1), Lösung 2
aus Aqua dest. und Folin-Ciocalteau-Reagenz (im Verhältnis 1 : 1). Zur
Herstellung der Standardreihe wurde BSA (1mg /ml) mit Aqua dest. verdünnt,
sodass je Reaktionsgefäß (K0-K6) eine definierte Proteinkonzentration vorlag
(Tabelle 2). Die Standardverdünnungsreihe wurde ohne Unterbrechung auf Eis
gekühlt.

	BSA1000 (µl)	Aqua dest. (µl)	Proteinkonzentration (µg/ml)
K0	0	500	0
K1	31,2	468,7	62,5
K2	62,5	437,5	125
K3	125	375	250
K4	250	250	500
K5	375	125	750
K6	500	0	1000

Tabelle 2: Standardverdünnungsreihe zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Messung der Proben erfolgte als Dreifachbestimmung. Zunächst wurden je-
weils 10 µl der aufbereiteten Colon- und Ileum-Homogenate mit 990 µl Aqua dest.
verdünnt (Verhältnis 1 : 100). Im Anschluss wurden jeweils 100 µl der verdünnten
Homogenate bzw. der Standardreihe zu 500 µl der Lösung 1 hinzugegeben. In
einem ersten Reaktionsschritt, der sogenannten Biuret-Reaktion, kommt es zu-
nächst zur Ausbildung von Komplexen zwischen den Peptidbindungen des
Proteins der Gewebehomogenaten bzw. der Standardreihe und Kupfer Cu²⁺-
Ionen aus Lösung 1. Die Cu²⁺-Ionen werden so zu Cu⁺-Ionen reduziert. Nach 10

Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden jeweils 50 µl der Lösung 2 hinzugegeben. In diesem zweiten Reaktionsschritt wurde das hinzugegebene Folin-Ciocalteu-Reagenz durch das Cu⁺ zu dem intensiv gefärbten Molybdänblau reduziert.

Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde mittels photometrischer Messung die Extinktion im Rahmen einer Doppelbestimmung bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt. Dazu wurden jeweils 200 µl von Standard und Probe in die dafür vorgesehenen *Wells* der 96-Well Mikrotitrierplatte pipettiert (Abb. 4).

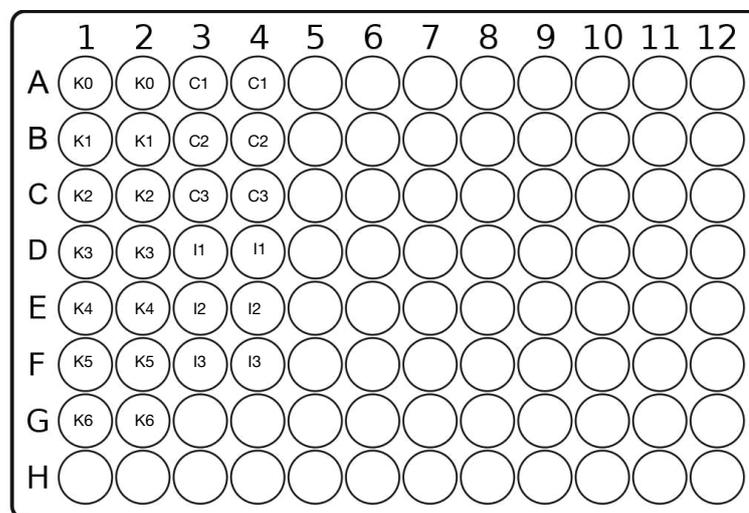


Abb. 4: Schematische Darstellung 96-Well Mikrotitrierplatte zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Standardverdünnungsreihe K0-K6, Colon-Proben C1-C3, Ileumproben I1-I3 (modifiziert nach: *96-Well plate*, N. Carson, 2020) [59].

Die Messung der Extinktion der Standardreihe lieferte eine Standardkurve (Eichkurve) aus Extinktion und Proteinkonzentration, mit Hilfe derer dann die Proteinkonzentration in den Gewebehomogenaten von Colon und Ileum bestimmt werden konnte. Über die Software *Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader* mit dem Programm *Gen5* erfolgte die Auswertung der Proteinbestimmung.

2.2.3 Respiratorische Messung zur Bestimmung der mitochondrialen Funktion

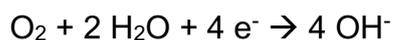
Mittels Respirometrie kann die Sauerstoffkonzentration der Probe beziehungsweise die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs als Maß für die mitochondriale Funktion ermittelt werden. Als Messinstrument diente eine Clark-Elektrode (*Strathklevin Instruments Model 782*, Glasgow, Schottland), welche mit einem Wasserbad in Verbindung steht. Sobald dieses Wasserbad eine Temperatur von 30°C erreichte, wurde vor der eigentlichen Messung eine Zwei-Punkt-Kalibrierung der Elektrode vorgenommen. Als Positivkontrolle diente dabei Aqua dest., welches durch mehrfaches vortexen mit Sauerstoff angereichert wurde und eine Natriumsulfid-Lösung als Negativkontrolle. Die Werte lagen für die Negativkontrolle zwischen 5 – 25 pA und für die Positivkontrolle zwischen 420 – 1500 pA.

Die Clark Elektrode besteht aus einer Platin-Kathode und aus einer Silber/Silber-Chlorid-Anode, die über eine gepufferte KCl-Elektrolytlösung in Verbindung stehen. Über eine sauerstoffdurchlässige Polypropylen-Membran sind die Elektroden von der Messprobe getrennt. Kommt es zur Polarisierung herrschen gegenüber der Anode an der Kathode Polarisierungsspannungen von -0,6 bis -0,8 V. Diffundiert nun Sauerstoff aus unserer Messprobe durch die Membran und erreicht die Kathode, laufen folgende Reaktionen ab:

Anode



Kathode



Bei der Reduktion von Sauerstoff an der Kathode entstehen Hydroxid-Ionen (OH). Gleichzeitig wird das Silber an der Anode zu Silberchlorid oxidiert.

Der Sauerstoffdurchfluss ist dabei direkt proportional zur Größe des Signals, das von der Elektrode generiert wird.

Die Sauerstoffkonzentration der Probe wurde von der Elektrode erfasst und mit Hilfe des Computerprogramms *Strathkelvin 782 System* graphisch dargestellt. Dabei ist auf der X-Achse die Zeit in Minuten und auf der Y-Achse die Sauerstoffkonzentration in nmol/ml abgebildet. Die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs (Respirationsrate) wurde in nmol/min/mg angegeben.

Um sicherzustellen, dass sich pro Messung jeweils 6 mg Protein/ml in der Messkammer befinden, wurden die Colon- und Ileumhomogenate mit Respirationspuffer mit Albumin verdünnt. Die Menge des Respirationspuffers mit Albumin richtete sich dabei nach der zuvor bestimmten Proteinkonzentration in den jeweiligen Gewebeproben.

Der Respirationspuffer wurde während der gesamten Messung im Wasserbad bei 30°C gewärmt.

Das anschließend befolgte Protokoll umfasst für jedes der beiden Organe insgesamt 8 Messungen. Jede Messprobe aus Colon- bzw. Ileumhomogenat und Respirationspuffer wurde unter Einhaltung einer einminütigen Inkubationszeit jeweils frisch angesetzt. Pro Messvorgang wurden 550 µl der Mischung aus Homogenat und Respirationspuffer in die Messkammer pipettiert, mit einem Stopfen verschlossen und mit einem Rührfisch kontinuierlich durchmischt. Die Ausbildung von kleinen Blasen in der Messkammer sollte dabei unbedingt vermieden werden, um die Messwerte nicht zu verfälschen.

Im Folgenden wurde die Messung gestartet. Mithilfe von verschiedenen Spritzen konnten der Probe in der Messkammer über eine dünne Kapillare im Stopfen Substrate und Hemmstoffe der Komplexe der Atmungskette hinzugegeben werden. Während des gesamten Messvorgangs wird die Sauerstoffkonzentration aufgezeichnet. In Abb. 5 ist eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs der respirometrischen Messungen zu finden.

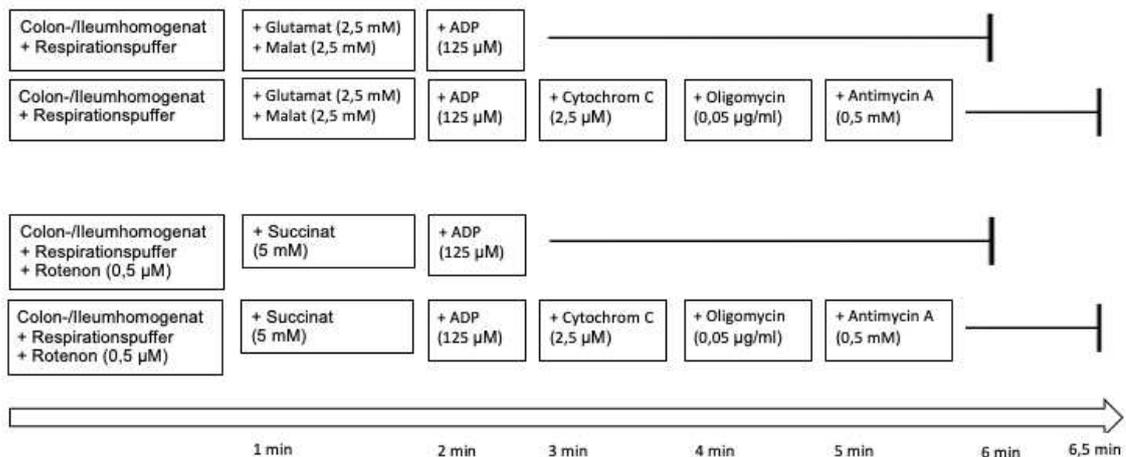


Abb. 5: schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Respirometrie

Zunächst wurde eine Mischung aus Colon- oder Ileumhomogenat mit Respirationspuffer von insgesamt 550 µl in die Messkammer pipettiert und die Messung gestartet. Zur Überprüfung von Komplex II wurde zusätzlich Rotenon als Hemmstoff von Komplex I hinzugegeben. Nach einer Minute erfolgte die Zugabe der Substrate Glutamat/Malat (Komplex I) oder Succinat (Komplex II). Nach einer weiteren Minute wurde ADP als Stimulator der Atmungskette hinzugegeben. Nach 6 Minuten wurde die Messung beendet. Dieser Vorgang wurde für Colon- und Ileumgewebshomogenate jeweils drei Mal wiederholt.

Bei der Kontrollmessung wurden zudem die Kontrollsubstanzen Cytochrom C, Oligomycin und Antimycin A hinzugefügt und nach 6,5 Minuten der Messvorgang beendet. µl = Mikroliter, µM = Mikromolar, mM = Millimolar, µg/ml = Mikrogramm/Milliliter.

Erstmals wurden im Jahr 1961 von Mitchell vier physiologische Zustände (*States*) der mitochondrialen Atmung beschrieben, die mit Hilfe von verschiedenen Stimulatoren und Inhibitoren simuliert werden können [60].

In der ersten Minute wurde der Sauerstoffverbrauch ohne Zugabe von Substraten oder ADP (*State 1*, niedriges Substrat- und ADP-Level) ermittelt.

Nach einer Minute wurden jeweils entweder 2,5 mM Glutamat/ 2,5 mM Malat oder 5 mM Succinat/ 0,5 µM Rotenon hinzugegeben. Die Glutamatdehydrogenase, ein mitochondriales Enzym, katalysiert die Redoxreaktion mit Oxidation von Glutamat zu α-Ketoglutarat und Reduktion von NAD⁺ zu NADH. Die Malatdehydrogenase katalysiert die Redoxreaktion mit Oxidation von Malat zu Oxalacetat und Reduktion von NAD⁺ zu NADH + H⁺. NADH fungiert als Substrat für Komplex I der Atmungskette. Die Succinatdehydrogenase katalysiert die Redoxreaktion mit Oxidation von Succinat zu Fumarat und Reduktion von FAD zu FADH₂. FADH₂ fungiert als Substrat für Komplex II der Atmungskette. Rotenon, ein Furocumarin-Derivat, wird dabei direkt in die Probe aus Homogenat

und Respirationspuffer noch vor Beginn der eigentlichen Messung hinzugeben und damit Komplex I der Atmungskette gehemmt. Damit stellt sich die basale Geschwindigkeit der Atmungskette ein (*State 2*, hohes Substrat- und niedriges ADP-Level).

Nach einer weiteren Minute wurden 125 μM ADP in die Messkammer appliziert. ADP ist der stärkste Regulator der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung. Eine hohe Konzentration an ADP täuscht als Vorstufe von ATP den Zellen einen Mangel des energiereichen ATP vor, sodass die mitochondriale Atmungskapazität zur Synthese von ATP unter Zunahme der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs maximal stimuliert wird (*State 3*, maximale mitochondriale Respirationsrate). Durch Zunahme der oxidativen Phosphorylierung nimmt die ADP-Konzentration in der Probe wieder ab und auch die mitochondriale Respirationsrate sinkt (*State 4*, Abnahme der mitochondrialen Atmung).

Die Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Probe über die Zeit limitiert die Möglichkeit der mitochondrialen Atmung (*State 5*), sodass nach 6 Minuten die Messung beim Erreichen eines *Steady States* beendet wurde.

Mit den ermittelten Werten konnte zum einen die Berechnung des *respiratory control index* ($\text{RCI} = \text{State 3}/\text{State 2}$) als Parameter für die Kopplung zwischen Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung ermittelt werden. Zum anderen konnte die ADP/O-Ratio (Quotient aus zugegebener ADP-Menge und Sauerstoffverbrauch) als Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung bestimmt werden.

Dieses Protokoll wurde jeweils dreimal mit Glutamat/Malat und dreimal mit Succinat als Substrat wiederholt, um einen repräsentativen Mittelwert bestimmen zu können.

Eine schematische Darstellung der Messkurven der Sauerstoffkonzentration [in nmol/ml] und der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs, hier als Respirationsrate [in nmol/min/mg] bezeichnet, ist in Abb. 6 zu finden.

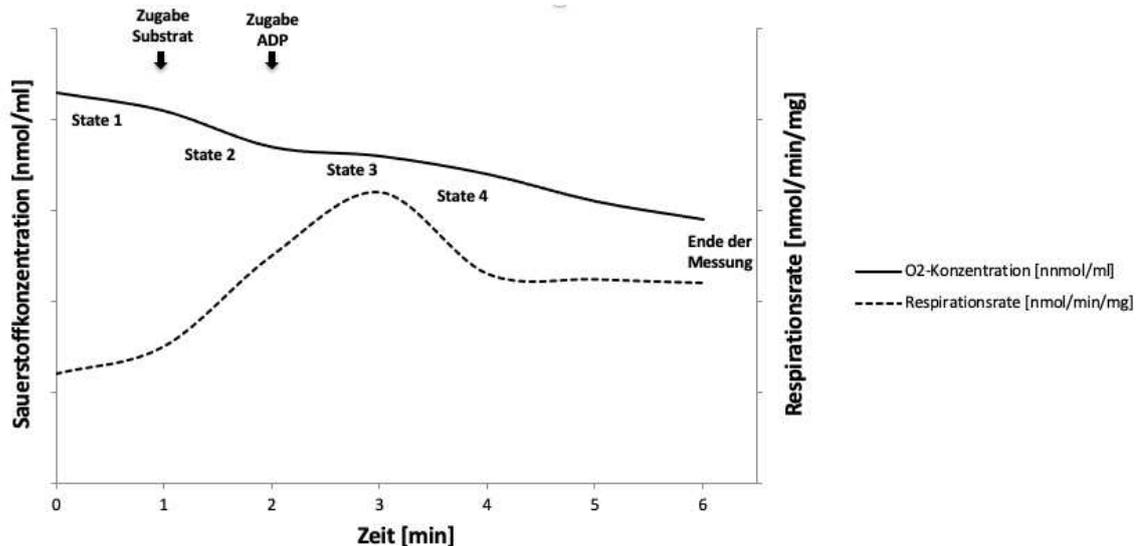


Abb. 6: schematische Darstellung der Messkurven im Rahmen der Respirometrie (Sauerstoffkonzentration [nmol/ml], Respirationsrate [nmol/min/mg])

State 1: Sauerstoffkonzentration und Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs ohne Zugabe von Substrat oder ADP; *State 2*: Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von Substrat (Glutamat/Malat; Succinat/Rotenon); *State 3*: Sauerstoffkonzentration und Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach Zugabe von ADP; *State 4*: Sauerstoffkonzentration und Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs nach ADP-Verbrauch; nach 6 Minuten Beendigung der Messung. nmol/ml = Nanomolar/Milliliter, nmol/min/mg = Nanomolar/Minute/Milligramm.

Zudem wurden jeweils eine Glutamat/Malat- und eine Succinat/Rotenon-Kontrollmessung durchgeführt (vgl. Abb. 5). Dabei wurden, wie auch im bereits beschriebenen Protokoll nach einer Minute die Substrate Glutamat/Malat bzw. Succinat und der Hemmstoff Rotenon und nach zwei Minuten ADP hinzugegeben.

Zusätzlich erfolgte jeweils nach drei Minuten die Zugabe von Cytochrom C, um die Intaktheit der Mitochondrien in der Messprobe zu prüfen. Cytochrom C ist Substrat für die Cytochrom-c-Reduktase an Komplex III der Atmungskette. Da sich Cytochrom C im Regelfall im Intermembranraum der Mitochondrien befindet, dürfte die mitochondriale Respirationsrate durch die Zugabe von Cytochrom C nicht stimuliert werden. Würde die mitochondriale Respirationsrate durch Zugabe von Cytochrom C ansteigen, könnte man davon ausgehen, dass das Cytochrom C während der Messung in den Intermembranraum gelangen konnte, weil die äußere Membran der Mitochondrien beschädigt ist.

Nach vier Minuten wurde mit der Zugabe von Oligomycin zur Überprüfung der Intaktheit der inneren Mitochondrienmembran fortgefahren. Oligomycin ist ein

Hemmstoff der oxidativen Phosphorylierung durch Blockade der Fo-Untereinheit der ATP-Synthase. Durch die Hemmung der ATP-Synthase wird der Protonenfluss vom Intermembranraum in den Matrixraum unterbunden. Dabei zeigt sich ein vorübergehender Abfall der mitochondrialen Respirationsrate, da durch die Verminderung des Elektronenflusses die ATP-Produktion deutlich reduziert wird und die Protonen im Intermembranraum zusätzlich die Atmungskette hemmen. Wäre die innere Mitochondrienmembran beschädigt, würden wir einen Anstieg der mitochondrialen Respirationsrate erwarten, da der Protonenfluss über das Leck gesteigert wäre.

Zuletzt wurde nach Minute fünf Antimycin A als Hemmstoff der Ubichinol-Cytochrom c- Oxidoreduktase (Komplexes III der Atmungskette) appliziert. Hier zeigt sich im Regelfall ein kontinuierlicher Abfall der mitochondrialen Respirationsrate, da durch die Blockade der Elektronenfluss zwischen Ubichinol und Cytochrom C unterbunden wird und damit schließlich die ATP-Synthase in Komplex V gehemmt wird. Auf diesem Weg konnten wir schließlich einen nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch, zum Beispiel durch in der Messkammer befindliche Bakterien, ausschließen.

Nach 6,5 Minuten wurde die Kontroll-Messung beendet und die Messkammer mit Ethanol gereinigt, um Rückstände der verwendeten Substanzen zu beseitigen.

2.2.4 Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) in Colon und Ileum

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) besitzen ungepaarte Elektronen und sind daher freie Radikale. Durch eine Überproduktion an ROS entsteht im Körper oxidativer Stress, welcher über die Oxidation von beispielsweise Desoxyribonukleinsäure (DNA), Proteinen oder Lipiden an verschiedenen Krankheits- und Alterungsprozessen beteiligt ist [34-36].

Malondialdehyd (MDA) entsteht schließlich, wenn freie Radikale mit ungesättigten Fettsäuren reagieren und stellt somit einen wichtigen Marker für die Lipidperoxidation dar [37]. Es gilt als indirektes Maß zur Bestimmung des oxidativen Stresses bzw. der Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies.

Als Grundlage zur Messung der MDA-Konzentration dient der MDA-Assay mittels Thiobarbitursäure (TBA). Im Rahmen einer Derivatisierungsreaktion erfolgt die

Umsetzung von zwei Molekülen TBA mit MDA in ein fluoreszierendes Produkt, dessen Extinktion wiederum photometrisch bei einer Wellenlänge von 535 nm gemessen werden kann.

Zur Durchführung wurden zunächst die 0,6 %ige-Thiobarbitursäure, sowie eine MDA-Standardreihe mittels 1,15 %iger Kaliumchlorid (KCL)- Lösung hergestellt. Zur Herstellung der Standardverdünnungsreihe wurde eine Stocklösung aus 302,5 µl KCL-Lösung mit 1 µl MDA (Verdünnung 1 : 302,5) vermischt und ausreichend gevortext. Anschließend wurde diese Stocklösung weiter verdünnt, so dass jeweils definierte MDA-Konzentrationen in den jeweiligen Reagenzgefäßen vorliegen (St.20 - St.0, Tabelle 3). Die Standardverdünnungsreihe wurde ohne Unterbrechung auf Eis gekühlt.

		Kaliumchlorid (µl)	MDA-Konzentration (nM)
St. 20	1 µl Stocklösung	990	20
St. 10	500 µl St.20	500	10
St. 5	500 µl St.10	500	5
St. 2,5	500 µl St.5	500	2,5
St. 0		500	0

Tabelle 3: Standardverdünnungsreihe zur MDA-Konzentrationsbestimmung

Die zu bearbeitenden Colon- und Ileum-Proben wurden im -80°Celsius-Tiefkühlschrank zwischengelagert und zur Aufbereitung in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Metalleimer überführt. Zur Probenherstellung wurden die einzelnen Gewebestücke gewogen und gewichtsadaptiert mit 1,15 %iger KCl-Lösung homogenisiert. Im Durchschnitt wurden für die weitere Verarbeitung 50 mg Gewebe benötigt, welches mit 500 µl 1,15 %iger KCl-Lösung homogenisiert wurde. Die einzelnen Daten sind in zugehörigen Tabellen dokumentiert worden. Die homogenisierten Proben wurden ununterbrochen gekühlt auf Eis gelagert.

Im Folgenden wurden 250 µl der jeweiligen Gewebeproben bzw. der Standardverdünnungsreihe mit 1500 µl 1 %iger Phosphorsäure (H₃PO₄) und 500 µl 0,6 %iger TBA in 15 ml Falcons vermischt und gevortext. Die fertigen Proben wurden im Trockenschrank bei 95°Celsius 45 Minuten inkubiert und schließlich auf

Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden jeweils 2000 µl Butanol hinzugegeben und die Falcons mit den Proben für 15 Minuten bei 4°C und 2645 Umdrehungen (rcf) zentrifugiert, sodass sich zwei Phasen bildeten. Jeweils 200 µl des Überstandes der Colon- und Ileumproben, sowie der MDA-Standardverdünnungsreihe wurden aufgefangen und als Doppelbestimmung in die 96-Well-Platte pipettiert (Abb. 7).

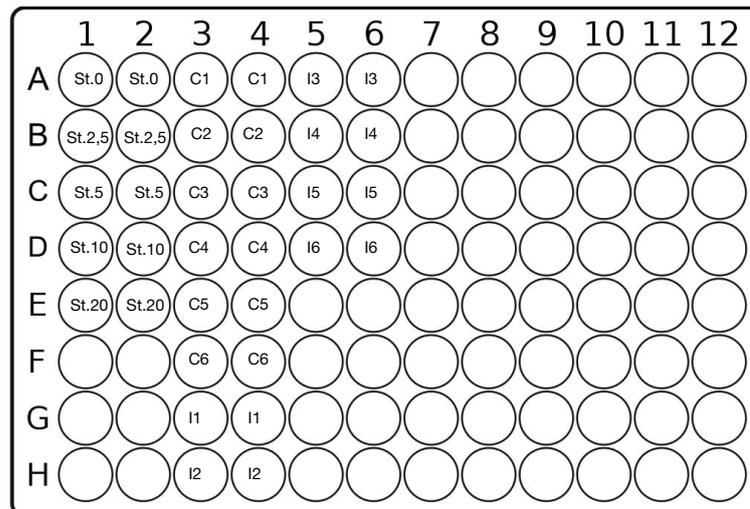


Abb. 7: Schematische Darstellung 96-Well Mikrotiterplatte zur MDA-Konzentrationsbestimmung

MDA-Standardverdünnungsreihe St.0-St.20, Colon-Proben C1-C6, Ileumproben I1-I6 (modifiziert nach: *96-Well plate*, N. Carson, 2020) [59].

Bei einer Wellenlänge von 535 nm und einer Referenzwellenlänge von 520 nm wurde die Lichtabsorption gemessen und schließlich die MDA-Konzentration aus der Differenz der Absorption beider Wellenlängen berechnet.

Im nächsten Schritt wurden die Proteinkonzentrationen der Gewebeproben mittels Lowry-Methode (vgl. Kapitel 2.2.2) ermittelt. Dadurch war es möglich, die gemessenen MDA-Konzentrationen auf die in der Probe enthaltene Menge Protein zu standardisieren. Die Angabe der MDA-Konzentrationen erfolgte so schließlich in nmol MDA/mg Protein, sodass ein Vergleich zwischen den Proben möglich war.

Über die Software *Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader* mit dem Programm *Gen5* erfolgte die Auswertung der MDA- sowie der Proteinbestimmung.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte über den Kruskal-Wallis-Test und Dunns Korrektur. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ bestimmt. Die Daten werden als Median (Min-Max) dargestellt.

3 Ergebnisse

Mit Hilfe der Bestimmung des *Respiratory Control Index* (RCI) und des ADP/O-Quotienten wird die mitochondriale Funktion in Ileum und Colon abgebildet.

Der RCI, als Quotient aus *State 3* (Respirationsrate in Anwesenheit von ADP) und *State 2* (Respirationsrate in Abwesenheit von ADP), wird als Parameter für die Kopplung zwischen Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung bestimmt. Die ADP/O-Ratio, als Quotient aus ADP-Menge und Sauerstoffverbrauch, wird als Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung herangezogen.

Die Ergebnisse der respiratorischen Messungen sind in den Abb. 8A – 8D sowie 9A – 9D dargestellt.

3.1 Ergebnisse der respiratorischen Messungen im Colon

Im Folgenden wird zunächst die mitochondriale Funktion im Colon betrachtet.

Nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I mittels Glutamat/Malat zeigen sich die in Abb. 8A und B dargestellten Ergebnisse.

Die ADP/O-Ratio ist nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I in der RIPC-Gruppe signifikant höher als in der Versuchsgruppe mit dem induzierten hämorrhagischen Schock (RIPC = 1,97 (1,22-2,45), hämorrhagischer Schock = 1,59 (1,23-1,76)). Diese statistische Signifikanz konnte in der Versuchsgruppe mit dem induzierten hämorrhagischen Schock und zusätzlicher RIPC-Anwendung nicht nachgewiesen werden. Hier zeigt die ADP/O-Ratio lediglich in der Tendenz höhere Werte als in der Schock-Gruppe (RIPC + hämorrhagischer Schock = 1,75 (1,31-2,41, $p > 0,05$)). In unserer Kontrollgruppe beträgt die ADP/O-

Ratio nach Stimulation der Atmungskette mittels Glutamat/Malat im Median 1,69 (1,42-2,41) (Abb. 8A).

Beim RCI hingegen lässt sich nach Stimulation der Atmungskette mittels Glutamat/Malat zwischen den vier Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied feststellen (Abb. 8B).

Nach Stimulation der Atmungskette über Komplex II mittels Succinat und gleichzeitiger Hemmung des Komplexes I mit Rotenon zeigen sich die in Abb. 8C und D dargestellten Ergebnisse.

Die ADP/O-Ratio präsentiert sich nach Zugabe des Substrates Succinat in keiner der Versuchsgruppen signifikant erhöht (Abb. 8C).

Auch die RCI-Werte zeigen zwischen den Versuchsgruppen nach Stimulation der Atmungskette über Komplex II keinen repräsentativen Unterschied (Abb. 8D).

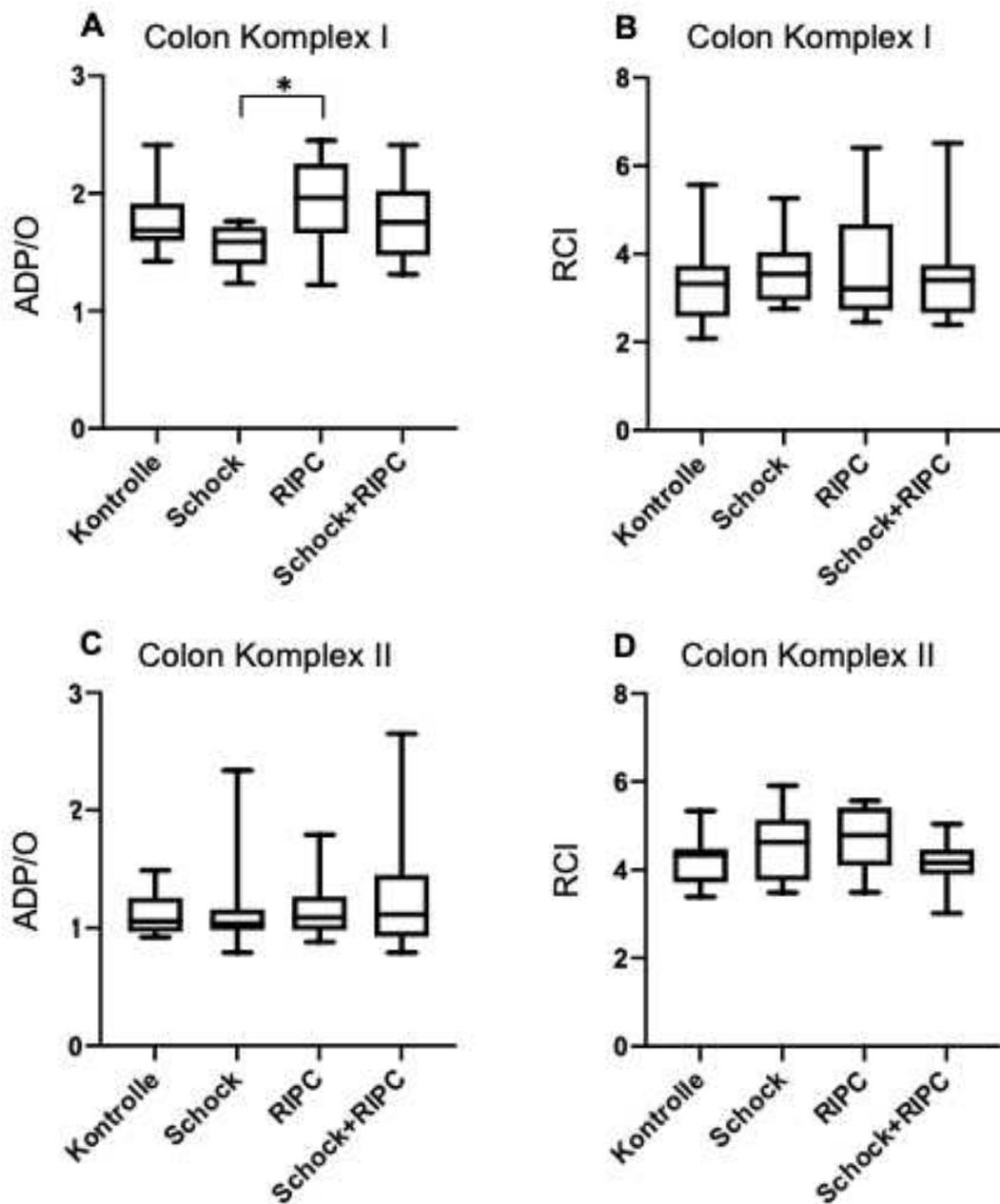


Abb. 8: Ergebnisse der respiratorischen Messungen im Colon

Darstellung der ADP/O-Ratio als Median (Min – Max) nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I mittels Glutamat/Malat (A: Kontrolle = 1,69 (1,42-2,41), Schock = 1,59 (1,23-1,76), RIPC = 1,97 (1,22-2,45), Schock + RIPC = 1,75 (1,31-2,41)) und Komplex II mittels Succinat/Rotenon (C: Kontrolle = 1,06 (0,92-1,49), Schock = 1,04 (0,79-2,34), RIPC = 1,09 (0,88-1,79), Schock + RIPC = 1,12 (0,79-2,65)) sowie des *Respiratory Control Index* als Median (Min – Max) nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I mittels Glutamat/Malat (B: : Kontrolle = 3,32 (2,08-5,57), Schock = 3,55 (2,76-5,27), RIPC = 3,2 (2,45-6,4), Schock + RIPC = 3,41 (2,4-6,52)) und Komplex II mittels Succinat/Rotenon (D: Kontrolle = 4,35 (3,39-5,34), Schock = 4,63 (3,48-5,91), RIPC = 4,79 (3,49-5,57), Schock + RIPC = 4,16 (3,01-5,03)) für die verschiedenen

Versuchsgruppen (Kontrolle (n=12), hämorrhagischer Schock (n=12), RIPC (n=12), RIPC + hämorrhagischer Schock (n=12)) im Colon. * $p < 0,05$

3.2 Ergebnisse der respiratorischen Messungen im Ileum

Schließlich wird im Folgenden die mitochondriale Funktion im Ileum betrachtet. Nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I mittels Glutamat/Malat können keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der ADP/O-Ratio in der Versuchsgruppe mit dem induzierten hämorrhagischen Schock und der Versuchsgruppe mit induziertem Schock und gleichzeitiger RIPC-Anwendung festgestellt werden. In der Versuchsgruppe der Tiere, bei denen der RIPC-Algorithmus alleine angewendet wurde, kann insgesamt eine in der Tendenz im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte ADP/O-Ratio beobachtet werden (RIPC = 3,36 (2,42-6,46), Kontrollgruppe = 2,84 (2,26-5,28)) (Abb. 9A). Eine statistische Signifikanz zwischen den Werten der RIPC-Gruppe und der Kontrollgruppe kann jedoch in diesem Fall nicht gezeigt werden ($p > 0,05$).

Die RCI-Werte weisen innerhalb der vier Versuchsgruppen keinen erheblichen Unterschied auf (Abb. 9B).

Auch im Rahmen der Stimulation der Atmungskette über Komplex II mittels Succinat unter Blockade von Komplex I mittels Rotenon sind keine wegweisenden Unterschiede der ADP/O-Ratio zwischen den Versuchsgruppen aufgefallen (Abb. 9C).

Beim RCI sind ebenfalls nur minimale Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu detektieren (RIPC = 2,31 (1,77-3,29), hämorrhagischer Schock = 2,59 (1,69-3,16), RIPC + hämorrhagischer Schock = 2,55 (1,9-2,84), Kontrollgruppe = 2,55 (1,69-4,12)) (Abb. 9D).

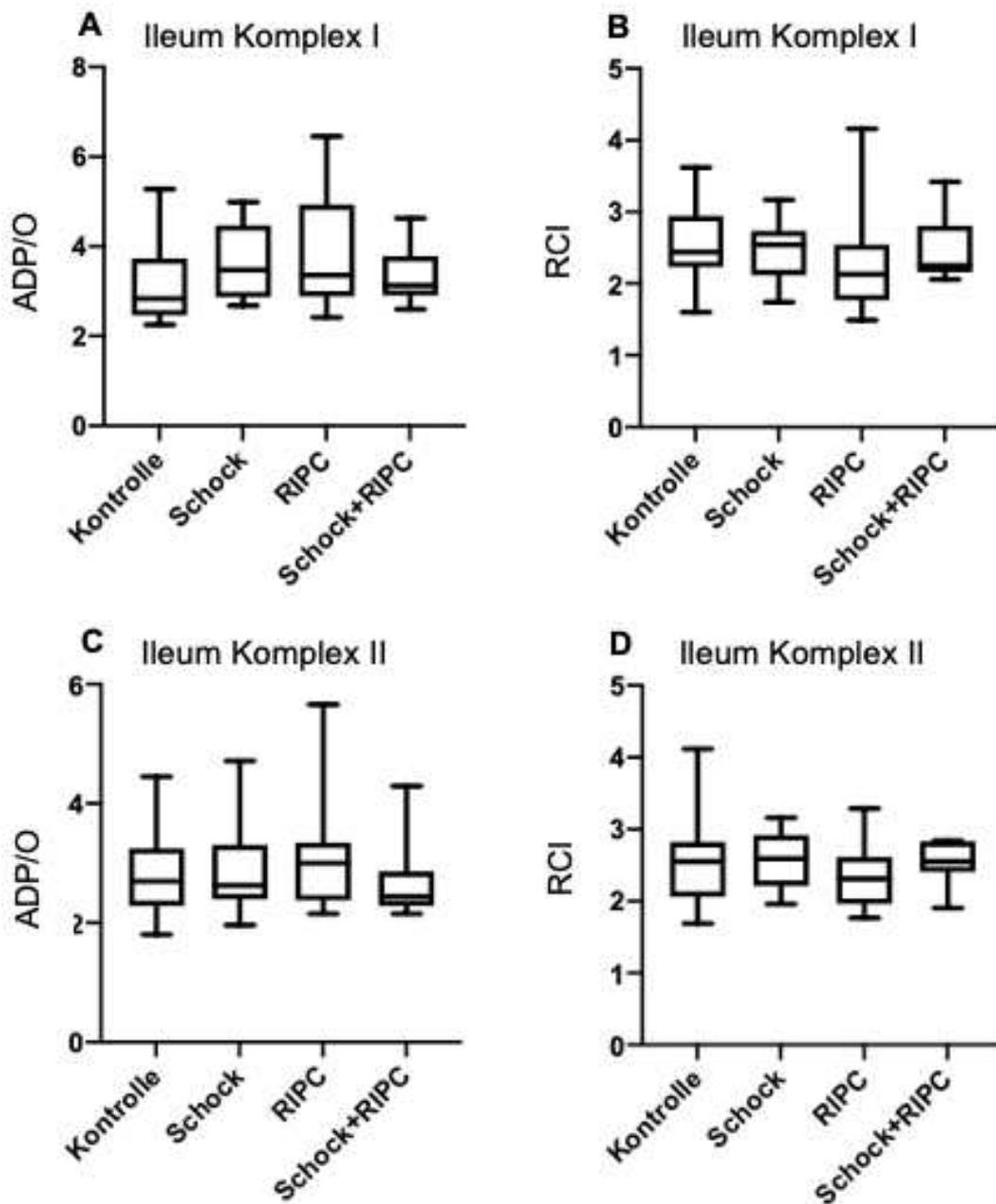


Abb. 9: Ergebnisse der respiratorischen Messungen im Ileum

Darstellung der ADP/O-Ratio als Median (Min – Max) nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I mittels Glutamat/Malat (A: Kontrolle = 2,84 (2,26-5,28), Schock = 3,48 (2,68-4,99), RIPC = 3,36 (2,42-6,46), Schock + RIPC = 3,13 (2,6-4,63)) und Komplex II mittels Succinat/Rotenon (C: Kontrolle = 2,7 (1,8-4,45), Schock = 2,63 (1,96-4,72), RIPC = 3,0 (2,15-5,66), Schock + RIPC = 2,44 (2,15-4,29)) und des *Respiratory Control Index* als Median (Min – Max) nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I mittels Glutamat/Malat (B: Kontrolle = 2,44 (1,6-3,62), Schock = 2,54 (1,74-3,17), RIPC = 2,13 (1,49-4,16), Schock + RIPC = 2,25 (2,06-3,42)) und Komplex II mittels Succinat/Rotenon (D: Kontrolle = 2,55 (1,69-4,12), Schock = 2,59 (1,69-3,16), RIPC = 2,31 (1,77-3,29), Schock + RIPC = 2,55 (1,9-2,84)) für die verschiedenen

Versuchsgruppen (Kontrolle (n=12), hämorrhagischer Schock (n=12), RIPC (n=12), RIPC + hämorrhagischer Schock (n=12)) im Ileum.

3.3 MDA-Assay in Colon und Ileum

Als indirektes Maß zur Bestimmung des oxidativen Stresses bzw. der Konzentration an reaktiven Sauerstoff-Spezies wurde die Malondialdehyd-Konzentration in nmol/mg Protein in Colon und Ileum bestimmt.

Im Colongewebe sind bezüglich der MDA-Konzentrationen innerhalb der vier Versuchsgruppen keine wegweisenden Unterschiede erudierbar (Abb. 10A).

Auch im Ileumgewebe zeigen sich innerhalb der vier Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den MDA-Konzentrationen (Abb. 10B).

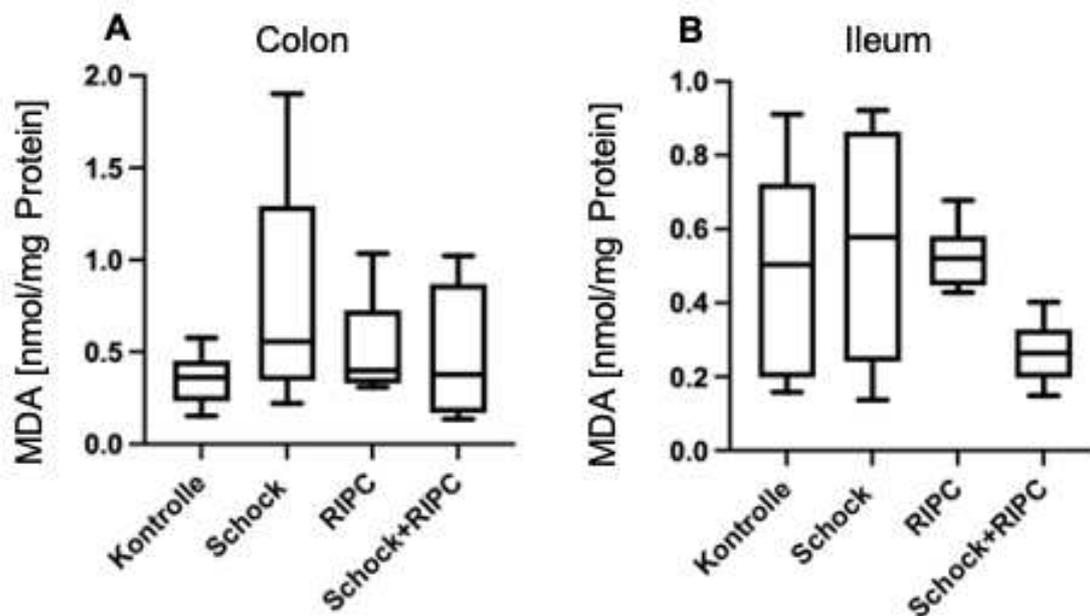


Abb. 10: Ergebnisse der Malondialdehyd (MDA) – Messung in Colon und Ileum

Darstellung der MDA-Konzentration in nmol/mg Protein als Median (Min – Max) für Colon (A: Kontrolle = 0,36 (0,15-0,58), Schock = 0,56 (0,22-1,90), RIPC = 0,40 (0,31-1,04), Schock + RIPC = 0,38 (0,14-1,02)) und Ileum (B: Kontrolle = 0,50 (0,16-0,91), Schock = 0,58 (0,14-0,92), RIPC = 0,52 (0,43-0,68), Schock + RIPC = 0,26 (0,15-0,40)) für die verschiedenen Versuchsgruppen (Kontrolle (n=6), hämorrhagischer Schock (n=5), RIPC (n=6), RIPC + hämorrhagischer Schock (n=7)).

4 Diskussion

Im Mittelpunkt der Untersuchung dieser Versuchsreihe stand die intestinale mitochondriale Funktion im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks nach ischämischer Fernpräkonditionierung in der Ratte.

Bezugnehmend auf die eingangs genannten Fragestellungen, können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Die Induktion eines hämorrhagischen Schocks führte nicht zu einer mitochondrialen Dysfunktion in Ileum und Colon.
2. Die mitochondriale Funktion in den Gewebehomogenaten aus Ileum und Colon konnte nicht durch die Anwendung der ischämischen Fernpräkonditionierung im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks moduliert werden.
3. In den Colon- und Ileumgewebehomogenaten zeigten weder der hämorrhagische Schock noch die Anwendung der ischämischen Fernpräkonditionierung signifikante Auswirkungen auf die MDA-Konzentration.

4.1 Ergebnisdiskussion

4.1.1 Diskussion der mitochondrialen Funktion in Colon und Ileum

Im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks kommt es zu einer Umverteilung des Blutvolumens zu Gunsten lebenswichtiger Organe wie Herz und Gehirn und folglich einer Reduktion des Sauerstoffangebotes in Organen wie zum Beispiel der Leber [61], Colon und Ileum [10]. Als Reaktion auf diesen Sauerstoffmangel wurden bereits erhebliche Dysfunktionen unter anderem in Organen wie der Leber [62] und der Niere [63] beschrieben. Schließlich resultieren enorme Veränderungen im Stoffwechsel, wie die Umstellung des aeroben auf den anaeroben Stoffwechsel [62] und in vielen Organen zudem eine mitochondriale Dysfunktion [64, 65].

Interessanterweise konnten in unserer Versuchsreihe keine schädigenden Einflüsse des hämorrhagischen Schocks auf die intestinale mitochondriale Funktion nachgewiesen werden. Im Jahr 2016 ist es Xiong et al. in einer tierexperimentellen Studie jedoch gelungen zu zeigen, dass die intestinale mitochondriale Funktion bei männlichen acht Wochen alten *Sprague Dawley* Ratten im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks nachweislich geschädigt wird. Zudem haben ihre Untersuchungen ergeben, dass eine milde Hypothermie die mitochondriale Dysfunktion in Enterozyten abmildern kann und durch oxidativen Stress hervorgerufene Schäden reduziert werden können [66]. Die Schockinduktion erfolgte in dieser Versuchsreihe wie bei uns über eine arterielle Blutentnahme bis zu einem mittleren arteriellen Zieldruck von etwa 40 mmHg, welcher über eine intermittierende Blutentnahme bzw. über Infusion von Voll-elektrolytlösung bzw. über gelagerte Blutprodukte aufrechterhalten wurde. Anders als in unserer Versuchsreihe, wurde der hämorrhagische Schock hier allerdings nicht nur über 60 Minuten, sondern über 120 Minuten aufrechterhalten. Möglicherweise hat dieser zeitliche Aspekt Auswirkungen auf die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der mitochondrialen Funktion.

Bei der Recherche nach weiteren möglichen Ursachen für diese widersprüchlichen Ergebnisse, ist neben der Frage nach dem Alter der männlichen Ratten, auch die Thematik möglicher Kompensationsmechanismen in den Fokus der Betrachtung gerückt. Ren et al. haben im Jahr 2014 die Morphologie der Ileumzotten in jungen (3 Monate), ausgewachsenen (12 Monate) und alten *Sprague Dawley* Ratten (24 Monate) untersucht. Dabei haben sie festgestellt, dass die Zotten mit zunehmendem Alter atrophisch und schmaler imponieren und dadurch gegebenenfalls die Barrierefunktion der Dünndarmmucosa beeinträchtigen [67]. Weiterführende Daten zu acht Wochen alten Versuchstieren liegen allerdings nicht vor. Altersspezifische Unterschiede zwischen den Versuchstieren sind somit durchaus möglich und ein Effekt des Altersunterschieds zwischen unseren drei Monate alten Wistar-Ratten und den acht Wochen alten *Sprague Dawley* Ratten muss in Betracht gezogen werden und könnte im Rahmen von nachfolgenden Versuchsreihen untersucht werden. Möglicherweise sind bei acht Wochen alten Versuchstieren eventuell bestehende Kompensationsmechanismen noch nicht vollständig entwickelt und die Induktion eines

hämorrhagischen Schocks hat somit größere Auswirkungen auf die intestinale mitochondriale Funktion der Ratten.

Die Frage nach möglichen Kompensationsmechanismen ist auch unabhängig vom Alter der Versuchstiere ein interessanter Aspekt hinsichtlich möglicher Differenzen in den Ergebnissen. Wie bereits eingangs erwähnt, sind zahlreiche, vor allem sympathoadrenerge Kompensationsmechanismen bekannt, die das initiale Überleben im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks sichern können. Dazu gehören neben einer Tachykardie [9] und einer Tachypnoe, eine sympathikusvermittelte periphere Vasokonstriktion mit Zentralisierung des Blutvolumens. Ohne diese gegenregulatorischen Maßnahmen, könnte ein Blutverlust von 15-20 % durchschnittlich nicht über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten überlebt werden [68]. Ob in unserer tierexperimentellen Versuchsreihe eben solche Kompensationsmechanismen gegriffen haben und eine Reduktion der mitochondrialen Funktion verhindert haben, war kein Teil unserer Untersuchung und wäre ein relevanter Aspekt, der in zukünftigen Versuchsprotokollen berücksichtigt werden sollte.

In anderen Versuchsreihen werden auch vaskuläre, metabolische und kardiopulmonale Kompensationsmechanismen im Rahmen von hämolytischen Anämien mit relevantem Abfall des Hämoglobins unter 8 g/dl in einem Rattenmodell diskutiert [69]. Interessant ist die Frage, ob diese beschriebenen Kompensationsmechanismen oder auch andere Mechanismen, in der frühen Phase eines hämorrhagischen Schocks, protektive Effekte auf die mitochondriale Funktion in Colon und Ileum der männlichen Wistar-Ratten erzielen können. Weiterhin müssen auch andere Faktoren, die einen möglichen Einfluss auf die Bewältigung der Auswirkungen eines hämorrhagischen Schocks haben, berücksichtigt werden. So deuten Ergebnisse von Li et al. darauf hin, dass eine kurzzeitige Hypothermie mit einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs und einer Verminderung des Stoffwechsels einhergehen kann und darüber unter anderem schützende Wirkung auf die mitochondriale Funktion, aber auch auf andere Organfunktionen induziert werden können [70]. Mögliche *Confounder* wie eine Hypothermie wurden in unserem Versuchsprotokoll jedoch durch rektale Temperaturmessung und durch Einsatz einer Wärmematte mit kontinuierlicher Wärmezufuhr zur Aufrechterhaltung einer Normothermie weitestgehend ausgeschaltet. Allerdings kann das Vorliegen weiterer möglicher Störfaktoren, die unter

Umständen auch bisher noch nicht identifiziert wurden und dennoch einen Einfluss auf die mitochondriale Funktion haben könnten, nicht ausgeschlossen werden.

Die Tatsache, dass die Induktion des hämorrhagischen Schocks in unserer Versuchsreihe nicht zu einer mitochondrialen Dysfunktion geführt hat, macht auch einen Blick auf die Mitochondrien an sich notwendig. Mitochondrien sind vor allem im Vergleich zu anderen Zellorganellen sehr anpassungsfähig und adaptieren sich rasch an veränderte Stoffwechselverhältnisse [71], wie sie zum Beispiel im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks entstehen. Kommt es zum Beispiel zur vermehrten Produktion von oxidativem Stress, können dadurch Schäden an der mitochondrialen DNA entstehen. Mithilfe der mitochondrialen DNA-Polymerase gamma können diese Schäden jedoch mit unterschiedlichen Mechanismen repariert und die Mitochondrien so geschützt werden [72]. Ob solche Reparaturmechanismen dafür gesorgt haben, dass die mitochondriale Funktion im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks geschützt und aufrechterhalten werden konnte, können wir für unsere Versuche nicht ausschließen. In unserer Versuchsreihe nutzten wir die MDA-Konzentrationsmessung als indirekte Methode zur Erfassung des oxidativen Stresses. Da wir schließlich keine Unterschiede in den MDA-Konzentrationen zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen detektieren konnten, wäre in der Folge das Vorliegen möglicher Reparaturmechanismen durchaus denkbar. Auch dies wäre somit eine interessante Frage für zukünftige Projekte.

Im Folgenden wird die mitochondriale Funktion unter Anwendung der ischämischen Fernpräkonditionierung alleine und im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks diskutiert. In unserer Versuchsreihe konnten wir eine Wirkung durch RIPC lediglich nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I im Colon zeigen. Die ADP/O-Ratio ist nach Stimulation von Komplex I mittels Glutamat/Malat im Colongewebehomogenat in der RIPC-Gruppe im Vergleich zur Versuchsgruppe mit induziertem hämorrhagischem Schock signifikant erhöht (Abb. 8A). Diese Signifikanz ist darauf zurückzuführen, dass die ADP/O-Ratio in der RIPC-Gruppe insgesamt leicht erhöht und in der Schock-Gruppe hingegen leicht erniedrigt ist. Im Vergleich zur Kontrollgruppe weisen die beiden Gruppen jedoch keinen wesentlichen Unterschied auf. Somit ist auch in diesem Fall eine

eindeutige biologische Relevanz hinsichtlich einer gesteigerten Effizienz der oxidativen Phosphorylierung durch die ischämische Fernpräkonditionierung insgesamt eher unwahrscheinlich. Da wir keinen Einfluss des hämorrhagischen Schocks auf die mitochondriale Funktion detektieren konnten, ist es nicht möglich, in diesem Fall von protektiven Effekten durch RIPC zu sprechen. Auch in den übrigen Versuchsgruppen konnte eine protektive Wirkung von RIPC auf die intestinale mitochondriale Funktion weder in den Colon- noch in den Ileumgewebekomponenten gezeigt werden. Mit dem von uns gewählten Ansatz eines gängigen RIPC-Modells konnte folglich im Ileum- und Colongewebe kein wegweisender Effekt erzielt werden.

Die Datenlage zur Wirkung durch RIPC ist insgesamt sehr heterogen: In zahlreichen Vorgängerarbeiten sind bereits protektive Effekte der ischämischen Präkonditionierung und der ischämischen Fernpräkonditionierung beschrieben worden. Cinel et al. haben bereits im Jahr 2002 gezeigt, dass die Anzahl apoptotischer Zellen im Ileum männlicher Wistar Ratten bei zeitlich begrenzter Okklusion der Arteria mesenterica superior unter ischämischer Präkonditionierung signifikant geringer war [41]. Im Jahr 2019 haben Kleinbongard et al. ferner nachgewiesen, dass die ischämische Fernpräkonditionierung bei elektiven herzchirurgischen Eingriffen protektiv auf die mitochondriale und kontraktile Funktion am Gewebe des rechten Vorhofs wirkt [55].

In der Vergangenheit gab es jedoch auch einige Studien, in denen die protektiven Effekte von RIPC nicht reproduziert werden konnten: Neben der bekannten Studie von Meybohm et al. im Jahr 2015, in der keine protektiven Effekte von RIPC bei elektiven herzchirurgischen Eingriffen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnten [54], ist es auch Rahman et al. nicht gelungen, schützende Effekte von RIPC im Rahmen von kardiochirurgischen Eingriffen in Form von einer Reduktion myokardialer Schädigung oder reduzierter Troponinfreisetzung aufzuzeigen [73].

Bei der Suche nach möglichen Ursachen für die inhomogenen Ergebnisse der Effekte von RIPC in den verschiedenen Versuchsreihen, lohnt sich ein Blick auf die verschiedenen Studiendesigns. Dabei spielen neben der Größe der Stichprobe, unter anderem auch die gewählten klinischen Endpunkte und die Wahl

des Anästhesieverfahrens eine Rolle (vgl. Kapitel 4.2.1). Wie eine Metaanalyse (23 Studien, insgesamt 2200 Patienten) von Healy et al. im Jahr 2014 ergab, konnte die Anwendung von RIPC bei kardiochirurgischen Patienten keine signifikanten Auswirkungen auf klinische Endpunkte wie zum Beispiel den Tod, akutes Nierenversagen, mesenteriale Ischämie oder perioperative Myokardinfarkte belegen. Zudem wird beschrieben, dass vor allem große Stichproben erforderlich sind, um signifikante Effekte durch RIPC nachzuweisen [74]. Kottenberg et al. konnten außerdem zeigen, dass RIPC protektive Effekte auf eine myokardiale Schädigung im Rahmen einer Narkose mit volatilen Anästhetika wie Isofluran, nicht jedoch während einer Anästhesie mit Propofol erzielen konnte [75]. Da in unserer Versuchsreihe die Narkoseeinleitung mittels Pentobarbital vorgenommen wurde, können wir also einen Einfluss von Propofol auf die Ergebnisse ausschließen.

In Zusammenschau der Ergebnisse kann man zu dem Schluss kommen, dass in unserer Versuchsreihe weder die Induktion eines hämorrhagischen Schocks noch die Anwendung der ischämischen Fernpräkonditionierung relevanten Einfluss auf die intestinale mitochondriale Funktion genommen hat. Da wir keinen Einfluss eines hämorrhagischen Schocks auf die mitochondriale Funktion detektieren konnte, können wir keine Aussage hinsichtlich möglicher protektiver Effekte durch RIPC im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks oder auch isoliert treffen. Dies bedeutet, dass die Funktionalität der Mitochondrien in Colon und Ileum bei ausgeprägtem Blutverlust und Zentralisierung des Blutvolumens mit resultierendem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf in unserer Versuchsreihe nicht beeinträchtigt wurde und folglich die mitochondriale Funktion auch durch die Anwendung der ischämischen Fernpräkonditionierung nicht moduliert werden konnte. Der von uns gewählte Ansatz eines gängigen RIPC-Modells hat schließlich keine Effekte auf die mitochondriale Funktion in Ileum- und Colongewebe gezeigt.

4.1.2 Diskussion der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Colon und Ileum

In den Mitochondrien entstehen im Rahmen der ATP-Produktion bei der Reduktion von Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies, welche in den Zellen oxidativen

Stress induzieren können. Neueste Erkenntnisse von Zhang et al. im Jahr 2021 deuten schließlich darauf hin, dass Mitochondrien zwar eine große Rolle bei der Produktion von ROS spielen, jedoch jedes Organell der Zelle, das an Redox-Reaktionen beteiligt ist, prinzipiell auch einen nicht unerheblichen Teil der Erzeugung von ROS ausmacht [76]. Dennoch gelten Mitochondrien als Hauptproduzenten reaktiver Sauerstoffspezies.

Zur Bestimmung des oxidativen Stresses in den Ileum- und Colongewebehomogenaten haben wir die Malondialdehyd-Konzentration als Endprodukt der Lipidperoxidation bestimmt.

In unserer Versuchsreihe zeigten sich weder in den Colon- noch in den Ileumgewebehomogenaten signifikante Unterschiede hinsichtlich der MDA-Konzentrationen in den verschiedenen Versuchsgruppen.

Wie bereits zu Beginn erläutert, kommt es durch einen hämorrhagischen Schock zu einer Minderperfusion des Splanchnikus-Gebietes, welches unter anderem die Durchblutung von Colon und Ileum sicherstellt. Kommt es schließlich zur Reperfusion der ischämischen Darmanteile folgt die Freisetzung von Zytokinen und anderer proinflammatorischer Mediatoren und schließlich auch die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies [77]. Diese erhöhte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies spiegeln sich dann schließlich in einer erhöhten Menge an MDA wider. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen haben Yang et al. in einer experimentellen Arbeit in Serum- und Gewebeproben aus der Lunge männlicher Wistar-Ratten nach Induktion eines hämorrhagischen Schocks erhöhte MDA-Werte und erniedrigte Glutathion-Konzentrationen nachgewiesen [27]. Hier erfolgte die Schockinduktion jedoch nicht über das Aufrechterhalten eines bestimmten mittleren arteriellen Drucks, sondern es wurde innerhalb von 30 Minuten 20-25% des Gesamtblutvolumens entnommen und anschließend mit Hydroxyethylstärke das entnommene Blutvolumen ersetzt. Dieses Verfahren überlebten in der Schock-Gruppe ohne zusätzliche Behandlung mittels Crocin nur zwei von zehn Versuchstieren, sodass diese Ergebnisse keinen repräsentativen Vergleich zu unseren Ergebnissen ermöglichen.

Die RIPC-Intervention hat in unserer Versuchsreihe weder in den Colon- noch in den Ileumgewebehomogenaten signifikante Unterschiede der MDA-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt. Die Datenlagen bezüg-

lich der Wirkung von RIPC auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist divers. In einer neuen Versuchsreihe aus dem Jahr 2021 haben Mieszkowski et al. die Auswirkungen von RIPC auf das oxidative Stresslevel bei Marathonläufern untersucht. Dabei waren die MDA-Konzentrationen nach ischämischer Fernpräkonditionierung signifikant geringer als in der Kontrollgruppe [78]. Hummitzsch et al. konnten in ihrer Versuchsreihe zeigen, dass RIPC zwar einen intestinalen I-/R-Schaden verbessern kann, jedoch konnten keine Unterschiede der MDA-Konzentrationen zwischen Kontrollgruppe und RIPC-Interventionsgruppe bei der Serumuntersuchung von männlichen Wistar-Ratten gezeigt werden [51].

Wie bereits geschildert, hat in unserer tierexperimentellen Versuchsreihe die Induktion des hämorrhagischen Schocks im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zu einer mitochondrialen Dysfunktion geführt. Im Einklang dazu steht, dass die Schockinduktion ebenfalls keinen Einfluss auf die MDA-Konzentration in den Gewebehomogenaten gezeigt hat. Vor diesem Hintergrund ist ein Rückschluss auf mögliche Einflüsse der ischämischen Fernpräkonditionierung im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks nicht möglich und bedarf weiteren Nachforschungen.

4.2 Methodendiskussion

Bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser tierexperimentellen Versuchsreihe gilt es, die Stärken und Schwächen der hier angewendeten Methoden kritisch zu hinterfragen.

4.2.1 Anwendung der ischämischen Fernpräkonditionierung (RIPC) in einer tiermedizinischen Versuchsreihe

Erstmalig ist es Przyklenk et al. bereits im Jahr 1993 gelungen, protektive Effekte durch eine RIPC-Induktion in einer experimentellen Untersuchung an der Infarktgröße von Hundeherzen nachzuweisen [46]. Seither ist die weitere Untersuchung der ischämischen Fernpräkonditionierung zentraler Gegenstand vieler experimenteller Versuchsreihen und es konnten zahlreiche protektive Effekte durch eine RIPC-Induktion aufgezeigt werden.

Auch im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks konnten protektive Effekte von RIPC in einer Versuchsreihe bereits nach einer 30-minütigen Aufrechterhaltung eines hämorrhagischen Schocks im Sinne eines in einem Ratten-Modell erhöhten Kurzzeitüberlebens über sechs Wochen gezeigt werden [52]. Außerdem konnten Zhou et al. nach einem über 60 Minuten induzierten hämorrhagischen Schock und RIPC-Induktion Hinweise auf protektive Wirkungen auf einen Leberschaden ausmachen [53].

Nachdem jedoch zwei große klinische Studien (ERICCA [79] und RIPHeart [54]) entgegen der vorherigen Erkenntnisse keine kardioprotektiven Effekte von RIPC im klinischen Kontext nachweisen konnten, wurden mögliche Gründe für den fehlenden protektiven Nutzen evaluiert [80]. Im Laufe der Zeit konnten einige Störfaktoren, die nachgewiesen die Wirksamkeit der RIPC-Induktion einschränken, detektiert werden [81]. Behnenburg et al. haben in einer experimentellen Untersuchung gezeigt, dass die kardioprotektive Wirkung der ischämischen Fernpräkonditionierung in älteren Ratten (22-24 Monate) im Vergleich zu juvenilen Ratten (2-3 Monate) abgeschwächt ist [82]. Neben dem Alter als möglichen *Confounder*, konnten Heinen et al. auch das Geschlecht als Störfaktor von RIPC im Rahmen der kardioprotektiven Wirkung eruieren [83]. Zudem konnte bereits in mehreren experimentellen und klinischen Studien dargestellt werden, dass Komorbiditäten wie zum Beispiel Diabetes mellitus Typ II [84, 85] und auch die Wahl des Anästhetikums [86, 87] die protektiven Effekte der ischämischen Fernpräkonditionierung unterbinden und damit als Störgröße ermittelt werden.

Mit der Wahl gesunder, juveniler, männlicher Wistar-Ratten als Versuchstiere und der Narkoseeinleitung mittels Pentobarbital wurde in unserer experimentellen Versuchsreihe im Vorfeld der Einfluss der möglichen *Confounder* weitestgehend reduziert.

4.2.2 Experimentelle Induktion eines hämorrhagischen Schocks

Kontrollierte Schockmodelle zur Imitation eines hämorrhagischen Schocks lassen sich im Allgemeinen in *fixed-pressure hemorrhage* und *fixed-volume hemorrhage* einteilen. Die Induktion des hämorrhagischen Schocks erfolgte in unserer tierexperimentellen Versuchsreihe durch einen Zugang in der Arteria carotis externa. Über diesen Zugang wurde arterielles Blut entnommen, bis ein mittlerer arterieller Zieldruck von 35-40 mmHg erreicht wurde (*fixed-pressure hemorrhage*). In den darauffolgenden 60 Minuten wurde dieser mittlere arterielle Zieldruck durch intermittierende Blutabnahme bzw. durch die Zufuhr von Voll-elektrolytlösung aufrechterhalten. Die Grundlage des *fixed-pressure* Schockmodells wurde bereits erstmals von Penfield im Jahr 1919 beschrieben [88] und im Verlauf von Wiggers etabliert [89].

Es gibt zahlreiche Übersichtsarbeiten, die die Vor- und Nachteile verschiedener hämorrhagischer Schock-Modelle kritisch diskutieren [90-92]:

Ein Vorteil des von unserer Arbeitsgruppe verwendeten Schockmodells mit einem zuvor festgelegten arteriellen Mitteldruck ist die gute Steuerbarkeit des induzierten hämorrhagischen Schocks. Es handelt sich um ein gut etabliertes, standardisiertes und leicht in der Praxis anzuwendendes Modell [90]. Allerdings ist gleichzeitig die Übertragbarkeit auf eine klinische Situation reduziert. Zudem gilt es zu beachten, dass die Versuchstiere in den meisten Fällen heparinisiert werden, um eine Thrombosierung des liegenden arteriellen Katheters zu verhindern [92]. Die Dauer der Aufrechterhaltung des induzierten hämorrhagischen Schocks beträgt in verschiedenen Studien 15 Minuten bis hin zu mehr als drei Stunden. Im Durchschnitt wird ein arterieller Mitteldruck zwischen 20 mmHg und 55 mmHg angestrebt [91].

Im Schockmodell, in dem eine zuvor festgelegte Menge an Blut abgenommen wird (*fixed-volume hemorrhage*), ist die Steuerbarkeit des dadurch induzierten hämorrhagischen Schocks eingeschränkt. Zudem sind individuelle Kompensationsmechanismen in diesem Schockmodell stärker ausgeprägt, jedoch ist es damit einfacher auf eine klinische Situation übertragbar [92].

In unserer tiermedizinischen Versuchsreihe haben wir uns auf dieser Grundlage für das Schock-Modell mit einem festgelegten arteriellen Mitteldruck von 35-40 mmHg über 60 Minuten entschieden, um damit eine hohe experimentelle Standardisierung sicherzustellen und eine leichtere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen. Bei einer Schockdauer über 60 Minuten hinaus, ist das Risiko, dass die Versuchstiere vorzeitig im Rahmen des hämorrhagischen Schocks versterben, deutlich erhöht. Zudem kann durch eine Schockinduktion mit einem festgelegten arteriellen Mitteldruck von 35-40 mmHg eine stabile Schocktiefe bestmöglich imitiert werden und die Aktivierung individueller Kompensationsmechanismen größtenteils minimiert werden.

Weitere Störvariablen wie das Geschlecht, das Alter und andere Vorerkrankungen [91] wurden in unserer Versuchsreihe durch die Wahl gesunder männlicher Wistar-Ratten reduziert, so jedoch zwangsläufig zumindest teilweise auch die Komplexität der verschiedenen Erscheinungsbilder im klinischen Alltags außer Acht gelassen.

4.2.3 Respirometrie zur Ermittlung der mitochondrialen Funktion

Mitochondrien sind die essentiellen Energielieferanten unseres Organismus, indem sie im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung das energiereiche Adenosintriphosphat (ATP) produzieren [93]. Dabei werden rund 90% des zellulären Sauerstoffs verbraucht [24].

Mittels Respirometrie kann die Sauerstoffkonzentration der Probe beziehungsweise die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs als Maß für die mitochondriale Funktion ermittelt werden. Obwohl somit als primärer Endpunkt lediglich die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches ermittelt wird, können unter Verwendung bestimmter mitochondrialer Substrate schließlich die erzielten Wirkungen spezifischen Teilen der Atmungskette zugeordnet werden.

Die respiratorische Messung kann sowohl an isolierten Mitochondrien als auch an Gewebehomogenaten durchgeführt werden.

Die Ermittlung der mitochondrialen Funktion mittels der Herstellung von Gewebehomogenaten ist im Institut für experimentelle Anästhesie der Heinrich-Heine-

Universität ein gut etabliertes und standardisiertes Verfahren. Auf der einen Seite ergeben sich durch die Herstellung von Gewebehomogenaten neben der Möglichkeit einer hohen Standardisierung auch eine gesteigerte Vergleichbarkeit zwischen den zu untersuchenden Parametern. Neben dem zeitlich geringeren Arbeitsaufwand und der zur Messung benötigten kleineren Menge an Gewebeprobe, stellt auch die Stabilität innerhalb der Gewebeproben einen Vorteil im Vergleich zum aufwendigen Isolationsprozess dar [94].

Auf der anderen Seite kann es beim Homogenisierungsprozess zur Herstellung der Gewebehomogenate ebenfalls zur Schädigung der Mitochondrien kommen. Um auszuschließen, dass die Mitochondrien in der homogenisierten Probe beschädigt wurden, führten wir jeweils eine Kontrollmessung durch (vgl. Kapitel 2.2.3).

Alternativ zur Verwendung von Gewebehomogenaten könnten die Mitochondrien in einem aufwendigen Prozess isoliert und schließlich einzeln zur Messung genutzt werden. Die durch den Isolationsprozess gewonnenen Mitochondrien sind jedoch gegebenenfalls nicht repräsentativ für das ganze Gewebe [95]. Zudem können die Mitochondrien durch den Isolierungsprozess geschädigt werden [94]. Hinzu kommt, dass im Rahmen des Isolationsprozesses häufig Kontaminationen unter anderem durch Mikrosomen entstehen, sodass weitere Aufbereitungs- und Reinigungsprozesse notwendig werden [90].

Zur weiteren Reduktion von Messfehlern und zur Elimination von Extremwerten wurde jede der Messungen dreimal durchgeführt und aus allen erfolgten Messungen ein Mittelwert bestimmt. Die geringen Schwankungen innerhalb der Ergebnisse der respiratorischen Messungen weisen auf die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die hohe Standardisierung dieses Verfahrens hin.

5 Ausblick

Die mitochondriale Funktion in Colon und Ileum wurde bei Induktion eines hämorrhagischen Schocks im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht beeinflusst. Zudem zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die ischämische Fernpräkonditionierung im Rahmen eines perioperativen hämorrhagischen Schocks oder alleine die mitochondriale Funktion im Colon und Ileum der männlichen Wistar-Ratten nicht modulieren kann. Mit dem gängigen RIPC-Modell konnten in unserer Versuchsreihe keine Effekte auf die intestinale mitochondriale Funktion nachgewiesen werden.

Wie sich die mitochondriale Funktion im weiteren zeitlichen Verlauf des hämorrhagischen Schocks unter RIPC entwickelt, ist noch unklar. Dies könnte man in einer weiterführenden laborexperimentellen Arbeit untersuchen.

Zudem ist eine Übertragung unserer Ergebnisse auf die intestinalen Mitochondrien des Menschen nur eingeschränkt möglich, sodass auch hier weitere Studien erforderlich wären.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Marietta, M., et al., *Pathophysiology of bleeding in surgery*. Transplant Proc, 2006. **38**(3): p. 812-4.
2. Gutierrez, G., H.D. Reines, and M.E. Wulf-Gutierrez, *Clinical review: hemorrhagic shock*. Crit Care, 2004. **8**(5): p. 373-81.
3. Rossaint, R., et al., *The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition*. Crit Care, 2016. **20**: p. 100.
4. Cannon, J.W., *Hemorrhagic Shock*. N Engl J Med, 2018. **378**(4): p. 370-379.
5. Van Aken, H., et al., *Intensivmedizin: Polytrauma*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2007: p. 1362-1382.
6. Moore, F.A. and E.E. Moore, *Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure*. Surg Clin North Am, 1995. **75**(2): p. 257-77.
7. Sauaia, A., F.A. Moore, and E.E. Moore, *Postinjury Inflammation and Organ Dysfunction*. Crit Care Clin, 2017. **33**(1): p. 167-191.
8. Lier, H., M. Bernhard, and B. Hossfeld, *[Hypovolemic and hemorrhagic shock]*. Anaesthesist, 2018. **67**(3): p. 225-244.
9. Bell, K., et al., *Paradoxical bradycardia and hemorrhagic shock*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2019. **32**(2): p. 240-241.
10. Jakob, S.M. and J. Takala, *Gut perfusion in the critically ill*. Intensive Care Med, 2000. **26**(6): p. 813-5.
11. Russell, D.H., et al., *Hemorrhagic shock increases gut macromolecular permeability in the rat*. Shock, 1995. **4**(1): p. 50-5.
12. Chang, J.C., L. Jiang, L. , *Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock*. World J Gastroenterol, 2005: p. 5485-5491.
13. Trzeciak, S., et al., *Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis*. Intensive Care Med, 2008. **34**(12): p. 2210-7.
14. Magnotti, L.J. and E.A. Deitch, *Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure*. J Burn Care Rehabil, 2005. **26**(5): p. 383-91.
15. Moore, F.A., et al., *Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma*. J Trauma, 1991. **31**(5): p. 629-36; discussion 636-8.
16. Assimakopoulos, S.F., et al., *Gut-origin sepsis in the critically ill patient: pathophysiology and treatment*. Infection, 2018. **46**(6): p. 751-760.
17. Wu, M.Y., et al., *Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury*. Cell Physiol Biochem, 2018. **46**(4): p. 1650-1667.
18. Gottlieb, R.A., *Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011. **16**(3-4): p. 233-8.
19. Singer, M., *Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure*. Crit Care Med, 2007. **35**(9 Suppl): p. 441-8.
20. Singer, M., *The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure*. Virulence, 2014. **5**(1): p. 66-72.
21. McBride, H.M., M. Neuspiel, and S. Wasiak, *Mitochondria: more than just a powerhouse*. Curr Biol, 2006. **16**(14): p. R551-60.

22. Chan, D.C., *Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1241-52.
23. Reichert, A., *Ernährung, Verdauung und Bioenergetik*, I.f.B.u.M.I.d.H.-H.-U. Düsseldorf, Editor. 2016.
24. Rolfe, D.F. and G.C. Brown, *Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals*. Physiol Rev, 1997. **77**(3): p. 731-58.
25. Zorov, D.B., et al., *Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 213-25.
26. Rhodes, R.S., R.G. Depalma, and A.V. Robinson, *Intestinal barrier function in hemorrhagic shock*. J Surg Res, 1973. **14**(4): p. 305-12.
27. Yang, L. and X. Dong, *Crocic acid attenuates hemorrhagic shock-induced oxidative stress and organ injuries in rats*. Environ Toxicol Pharmacol, 2017. **52**: p. 177-182.
28. Ajith, T.A. and T.G. Jayakumar, *Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases*. World J Cardiol, 2014. **6**(10): p. 1091-9.
29. Zeng, Z., et al., *Polydatin Protecting Kidneys against Hemorrhagic Shock-Induced Mitochondrial Dysfunction via SIRT1 Activation and p53 Deacetylation*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 1737185.
30. Cairns, C.B., et al., *Evidence for early supply independent mitochondrial dysfunction in patients developing multiple organ failure after trauma*. J Trauma, 1997. **42**(3): p. 532-6.
31. Jašová, M., et al., *Mitochondria as a target of cardioprotection in models of preconditioning*. J Bioenerg Biomembr, 2017. **49**(5): p. 357-368.
32. Andreyev, A.Y., Y.E. Kushnareva, and A.A. Starkov, *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*. Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(2): p. 200-14.
33. Jensen, P.K., *Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. I. pH dependency and hydrogen peroxide formation*. Biochim Biophys Acta, 1966. **122**(2): p. 157-66.
34. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 1-13.
35. Ceconi, C., et al., *Oxidative stress in cardiovascular disease: myth or fact?* Arch Biochem Biophys, 2003. **420**(2): p. 217-21.
36. Sohal, R.S., R.J. Mockett, and W.C. Orr, *Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(5): p. 575-86.
37. Del Rio, D., A.J. Stewart, and N. Pellegrini, *A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2005. **15**(4): p. 316-28.
38. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
39. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
40. Napoli, C., et al., *New-onset angina preceding acute myocardial infarction is associated with improved contractile recovery after thrombolysis*. Eur Heart J, 1998. **19**(3): p. 411-9.

41. Cinel, I., et al., *Ischemic preconditioning reduces intestinal epithelial apoptosis in rats*. Shock, 2003. **19**(6): p. 588-92.
42. Mallick, I.H., et al., *Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine*. Br J Surg, 2005. **92**(9): p. 1169-76.
43. Liu, A., et al., *Ischemic preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1-mediated autophagy*. Crit Care Med, 2014. **42**(12): p. e762-71.
44. Toosy, N., et al., *Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury*. BJU Int, 1999. **84**(4): p. 489-94.
45. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 240-53.
46. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
47. Sivaraman, V., J.M. Pickard, and D.J. Hausenloy, *Remote ischaemic conditioning: cardiac protection from afar*. Anaesthesia, 2015. **70**(6): p. 732-48.
48. Whoan-Ching, J., C. Cay-Huyen, and T. Pei-Shan, *Limb ischemic preconditioning mitigates lung injury induced by haemorrhagic shock/resuscitation in rats*. Resuscitation, 2011. **82**(6): p. 760-6.
49. Leung, C.H., et al., *Remote Ischemic Conditioning Prevents Lung and Liver Injury After Hemorrhagic Shock/Resuscitation: Potential Role of a Humoral Plasma Factor*. Ann Surg, 2015. **261**(6): p. 1215-25.
50. Hu, X., et al., *Remote ischemic preconditioning mitigates myocardial and neurological dysfunction via K(ATP) channel activation in a rat model of hemorrhagic shock*. Shock, 2014. **42**(3): p. 228-33.
51. Hummitzsch, L., et al., *Remote ischemic preconditioning attenuates intestinal mucosal damage: insight from a rat model of ischemia-reperfusion injury*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 136.
52. Dai, W., et al., *Improved Long-term Survival with Remote Limb Ischemic Preconditioning in a Rat Fixed-Pressure Hemorrhagic Shock Model*. Cardiovasc Drugs Ther, 2019. **33**(2): p. 139-147.
53. Zhou, H., et al., *Remote Ischemic Preconditioning Attenuates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury after Hemorrhagic Shock by Increasing Autophagy*. Int J Med Sci, 2021. **18**(4): p. 873-882.
54. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery*. N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1397-407.
55. Kleinbongard, P., et al., *Mitochondrial and Contractile Function of Human Right Atrial Tissue in Response to Remote Ischemic Conditioning*. J Am Heart Assoc, 2018. **7**(15): p. e009540.
56. Donato, M., et al., *Myocardial remote ischemic preconditioning: from cell biology to clinical application*. Mol Cell Biochem, 2021. **476**(10): p. 3857-3867.
57. Sims, C.A., et al., *Supplemental arginine vasopressin during the resuscitation of severe hemorrhagic shock preserves renal mitochondrial function*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0186339.
58. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.

59. Carson, N. *96-Well plate*. 2020; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/File:96-Well_plate.svg.
60. Mitchell, P., *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. *Nature*, 1961. **191**: p. 144-8.
61. Karmaniolou, I, et al., *Resuscitation after hemorrhagic shock: the effect on the liver--a review of experimental data*. *J Anesth*, 2013. **27**(3): p. 447-60.
62. Scribner, D.M., et al., *Liver metabolomic changes identify biochemical pathways in hemorrhagic shock*. *J Surg Res*, 2010. **164**(1): p. e131-9.
63. Kholmukhamedov, A., et al., *Minocycline and doxycycline, but not tetracycline, mitigate liver and kidney injury after hemorrhagic shock/resuscitation*. *Shock*, 2014. **42**(3): p. 256-63.
64. Leskova, G.F., *Phospholipids in mitochondrial dysfunction during hemorrhagic shock*. *J Bioenerg Biomembr*, 2017. **49**(2): p. 121-129.
65. Cairns, C.B., *Rude unhinging of the machinery of life: metabolic approaches to hemorrhagic shock*. *Curr Opin Crit Care*, 2001. **7**(6): p. 437-43.
66. Xiong, W., et al., *Moderate hypothermia ameliorates enterocyte mitochondrial dysfunction in severe shock and reperfusion*. *J Surg Res*, 2016. **200**(1): p. 250-9.
67. Ren, W.Y., et al., *Age-related changes in small intestinal mucosa epithelium architecture and epithelial tight junction in rat models*. *Aging Clin Exp Res*, 2014. **26**(2): p. 183-91.
68. Voelckel, W.G., et al., *[Treatment of hemorrhagic shock. New therapy options]*. *Anaesthesist*, 2004. **53**(12): p. 1151-67.
69. Nugent, W.H., et al., *Physiological and microvascular responses to hemoglobin concentration-targeted hemolytic anemia in rats*. *J Appl Physiol* (1985), 2020. **128**(6): p. 1579-1586.
70. Li, T., et al., *Short-term, mild hypothermia can increase the beneficial effect of permissive hypotension on uncontrolled hemorrhagic shock in rats*. *Anesthesiology*, 2012. **116**(6): p. 1288-98.
71. Yoo, S.M. and Y.K. Jung, *A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics*. *Mol Cells*, 2018. **41**(1): p. 18-26.
72. Scheibye-Knudsen, M., et al., *Protecting the mitochondrial powerhouse*. *Trends Cell Biol*, 2015. **25**(3): p. 158-70.
73. Rahman, I.A., et al., *Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: from promise to disappointment?* *Circulation*, 2010. **122**(11 Suppl): p. S53-9.
74. Healy, D.A., et al., *Remote preconditioning and major clinical complications following adult cardiovascular surgery: systematic review and meta-analysis*. *Int J Cardiol*, 2014. **176**(1): p. 20-31.
75. Kottenberg, E., et al., *Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol - a clinical trial*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2012. **56**(1): p. 30-8.
76. Zhang, Y. and H.S. Wong, *Are mitochondria the main contributor of reactive oxygen species in cells?* *J Exp Biol*, 2021. **224**(Pt 5).
77. Dewar, D., et al., *Postinjury multiple organ failure*. *Injury*, 2009. **40**(9): p. 912-8.
78. Mieszkowski, J., et al., *Remote Ischemic Preconditioning Reduces Marathon-Induced Oxidative Stress and Decreases Liver and Heart Injury Markers in the Serum*. *Front Physiol*, 2021. **12**: p. 731889.

79. Hausenloy, D.J., et al., *Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery*. N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1408-17.
80. Garratt, K.N., P. Whittaker, and K. Przyklenk, *Remote Ischemic Conditioning and the Long Road to Clinical Translation: Lessons Learned From ERICCA and RIPHeart*. Circ Res, 2016. **118**(7): p. 1052-4.
81. Anttila, V., et al., *Review of remote ischemic preconditioning: from laboratory studies to clinical trials*. Scand Cardiovasc J, 2016. **50**(5-6): p. 355-361.
82. Behmenburg, F., et al., *Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning is Blocked in the Aged Rat Heart in Vivo*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2017. **31**(4): p. 1223-1226.
83. Heinen, A., et al., *The release of cardioprotective humoral factors after remote ischemic preconditioning in humans is age- and sex-dependent*. J Transl Med, 2018. **16**(1): p. 112.
84. Galagudza, M.M., et al., *Resistance of the myocardium to ischemia and the efficacy of ischemic preconditioning in experimental diabetes mellitus*. Neurosci Behav Physiol, 2007. **37**(5): p. 489-93.
85. Wider, J., et al., *Remote ischemic preconditioning fails to reduce infarct size in the Zucker fatty rat model of type-2 diabetes: role of defective humoral communication*. Basic Res Cardiol, 2018. **113**(3): p. 16.
86. Ney, J., et al., *Remote Ischemic Preconditioning Does Not Affect the Release of Humoral Factors in Propofol-Anesthetized Cardiac Surgery Patients: A Secondary Analysis of the RIPHeart Study*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
87. Chen, K., et al., *The timing of propofol administration affects the effectiveness of remote ischemic preconditioning induced cardioprotection in rats*. J Cell Biochem, 2020. **121**(11): p. 4535-4541.
88. Penfield, W., *The treatment of severe and progressive hemorrhage by intravenous injections*. Am J Physiol, 1919. **48**: p. 121-32.
89. Wiggers, C., *The present status of the shock problem*. Physiol Rev, 1942. **22**: p. 74-123.
90. Hof, S., et al., *A Toolbox to Investigate the Impact of Impaired Oxygen Delivery in Experimental Disease Models*. Front Med (Lausanne), 2022. **9**: p. 869372.
91. Fülöp, A., et al., *Experimental models of hemorrhagic shock: a review*. Eur Surg Res, 2013. **50**(2): p. 57-70.
92. Lomas-Niera, J.L., et al., *Shock and hemorrhage: an overview of animal models*. Shock, 2005. **24 Suppl 1**: p. 33-9.
93. de Goede, P., et al., *Circadian rhythms in mitochondrial respiration*. J Mol Endocrinol, 2018. **60**(3): p. R115-r130.
94. Pecinová, A., et al., *Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates*. Mitochondrion, 2011. **11**(5): p. 722-8.
95. Divakaruni, A.S., G.W. Rogers, and A.N. Murphy, *Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode*. Curr Protoc Toxicol, 2014. **60**: p. 25.2.1-16.

7 Anhang

7.1 Verwendete Reagenzien und Chemikalien des laborexperimentellen Versuchteils

ADP (Adenosintriphosphat)	Sigma A5285, MG 501,31 g/mol
Antimycin A from Streptomyces sp.	Sigma A8674, 50mM
Aqua dest.	Merck, Darmstadt Deutschland
BSA 0,1% fatty acid free (bovine serum albumine)	Sigma A6003
cOmplete™ (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche Life Science, Mannheim, Deutschland
Cytochrom C from bovine heart	Sigma C2037 – 50MG
Ethylenglykoltetraacetat EGTA	Roth 3054, MG 380,35 g/mol
Folin-Ciocalteau-Reagenz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Linda, Duisburg, Deutschland
Glutamat	Fluka, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth 6781, MG 74,56 g/mol
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck 4873, MG 136,09 g/mol
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Malat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mannitol (D(-)-Mannit)	Roth 4175.1, MG 182,18 g/mol
MDA (Tetramethoxypropan)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
3-(N-Morpholino)-1-Propansulfonsäure MOPS	Roth 6979, MG 209,27 g/mol
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Roth 8551.1, MG 84,01 g/mol
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
n-Butanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oligomycin	5mg/ml in DMS, CAIBiochem, Israel
Phosphorsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt Deutschland
Rotenon	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Succinat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Sucrose (D(+)-Saccharose)	Roth 4621, MG 342,3 g/mol
Thiobarbitursäure (TBA)	Merck 1.08180.0025 MG 144,15 g/mol
Tetrasodiumpyrophosphat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat) 0.05%	Gibco 25300-054 100ml

7.2 Verwendete Lösungen und Puffer des laborexperimentellen Versuchteils

Isolationspuffer (pH 7,15)	200mM Mannitol 50mM Sucrose 5mM KH ₂ PO ₄ 5mM MOPS 0,1% BSA 1mM EGTA zusätzlich wurden für Colon und Ileum 20mg BSA/ml hinzugefügt
Respirationspuffer (pH 7,4)	130mM KCL 5mM K ₂ HPO ₄ 20mM MOPS 2,5mM EGTA 1µM Na ₄ P ₂ O ₇ 0,1% BSA zusätzlich wurden für Colon und Ileum 20mg BSA/ml hinzugefügt
Lowry Reagenz A	10g Natriumcarbonat 0,5L Natriumhydroxid
Lowry Reagenz B	2g Kupfersulfat-Pentahydrat
Lowry Reagenz C	1g Kaliumtartrat

7.3 Verwendete Geräte und Materialien des laborexperimentellen Versuchteils

Becherglas Borosilicate	VWR International GmbH. Darmstadt Deutschland, 600ml
Eismaschine	AF 80, Scotsman, Mailand, Italien
Eppendorf Research®Pipette	Pipettensatz Eppendorf Research® 100µl bis 5000µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcons Cellstar Tubes 50ml	Falcon™ 50ml, SARSTEDT AG&Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Falcons Cellstar Tubes 15ml	Falcon™ 15ml, SARSTEDT AG&Co.KG, Nümbrecht, Deutschland
Gewebehomogenisator Potter-Elvehjem	Pro Scientific, Swedesboro, New Jersey, USA
Handschuhe	Abena, gloves nitrile powder-free
Homogenisatorgefäß	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Homogenisierstation	IKA Eurostar 20 digital
Injekt Spritze	Ito Corporation Exmire Microsyringe MS-R25, Fuji, Japan
Kompresse	ES-Kompresse, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

Mikrotitrierplatten	Mikrotestplatte 96-Well F, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	BioTek Synergy 2 mit Software Gen5™ Version 1.11, BioTek, Winooski, USA (Protein- und MDA-Konzentrationsbestimmung)
Petrieschalen	
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Pinzette spitz	
Pinzette gebogen	
Pipetten	Pipettensatz Eppendorf Research ® 100ul bis 5000ul
Reaktionsgefäß 1,5ml	Micro tube 1,5ml, SARSTEDT AG & Ko.KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 2ml	Micro tube 2ml, SARSTEDT AG & Ko.KG, Nümbrecht, Deutschland
Respirometer	MT200 und SI782, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland
Respirometer Software	782 System Version 4.4 HID, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland
Tiefkühlschrank	Forma 900 Ultratiefkühlschrank, Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA
Trockenschrank	UT6060, Hereaus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Vortexgerät	Vortex Genie Touch Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	JULABO GmbH Typ: ED (v.2), Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland