

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

**Der Einfluss von Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion im
Colon im septischen Rattenmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von
Max Sonnenschein
2024

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

gezeichnet:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zweitgutachter/in: PD Dr. rer. nat. Carsten Berndt

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Gemfibrozil improves microcirculatory oxygenation of colon and liver without affecting mitochondrial function in a model of abdominal sepsis in rats. Kuebart A., Gross K., Maicher C., Sonnenschein M., Raupach A., Schulz J., Truse R., Hof S., Marcus C., Vollmer C., Bauer I., Picker O., Relja B., Herminghaus A. *Int J Mol Sci* 2023; Dec 23;25(1):262. doi: 10.3390/ijms25010262.

Zusammenfassung

Die Sepsis ist aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität weiterhin eine der gefürchtetsten Krankheitsbilder der Medizin. Ursächlich für die Pathogenese der Sepsis werden eine Veränderung der Mikrozirkulation in den verschiedenen Organsystemen, eine Dysbalance der pro- und antiinflammatorischen Zytokine und eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion angesehen. Fibrate scheinen in experimentellen Studien die mitochondriale Funktion verschiedener Zellen zu beeinflussen. Welchen Einfluss Fibrate auf die mitochondriale Funktion gastrointestinaler Zellen während einer Sepsis haben, wurde bislang nicht erforscht. Aufgrund dessen wurde in dieser Studie die Auswirkung des Fibrats „Gemfibrozil“ auf die mitochondriale Funktion im Colon im septischen Rattenmodell getestet.

Hierzu wurden nach Genehmigung der Tierschutzbehörde 144 Wistar-Ratten in 12 Versuchsgruppe á 12 Versuchstiere randomisiert. Die Versuchstiere erhielten entweder eine sterile Laparotomie (Sham) oder eine „colon ascendens stent peritonis“ (CASP)-Operation in An- und Abwesenheit von Gemfibrozil (2x intraperitoneal) in zwei Dosierungen (30 mg/kg KG oder 100 mg/kg KG) oder des PPAR α Antagonisten GW6471. Alle Versuchstiere wurden 24h nach der initialen Operation euthanasiert und das Colon operativ entfernt, gereinigt und homogenisiert. Mittels Respirometer wurde die Sauerstoffkonzentration innerhalb des Colonomogenats nach Stimulation der Komplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette gemessen. Zur Beurteilung der mitochondrialen Funktion wurden aus den gemessenen Daten die zwei Quotienten „respiratory control ratio“ (RCR) (state 3/state 2) und ADP/O-Ratio (hinzugefügte Menge ADP/verbrauchter Sauerstoff) berechnet. Die Quotienten wurden innerhalb der nicht-septischen und der septischen Versuchsgruppe statistisch verglichen. Ferner wurde mittels des Thiobarbitursäure-Tests die Menge an Malondialdehyd gemessen, um den oxidativen Stress innerhalb der Colonzellen zu bestimmen.

Zusammenfassend ließen sich sowohl in der nicht-septischen als auch in der septischen Versuchsgruppe keine Unterschiede bezüglich der mitochondrialen Funktion und des oxidativen Stresses nach Vorbehandlung mit Gemfibrozil nachweisen. Potenzielle Erklärungsansätze hierfür könnten im Vergleich zu den Ergebnissen anderer Studien der gewählte Zeitpunkt der Medikamentenapplikation, eine unterschiedliche Medikamentenkonzentration am Zielorgan oder eine möglicherweise schwache Expression an PPAR α innerhalb der Colonzellen der Ratte darstellen. Besonders letztere These wirft neue Fragestellungen auf und könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Abstract

Sepsis remains one of the most dreaded diseases due to its high morbidity and mortality rates. Changes in microcirculation in various organ systems, an imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines and an impairment of mitochondrial function are considered causative factors in the pathogenesis of sepsis. Former studies suggest that fibrates may influence the mitochondrial function of various cells. The impact of fibrates on the mitochondrial function of gastrointestinal cells during sepsis has not been explored yet. Therefore, this study aimed to investigate the effect of the fibrate 'gemfibrozil' on the mitochondrial function in the colon using a septic rat model.

After the approval from the animal ethics committee, 144 Wistar rats were randomized into 12 groups, each consisting of 12 animals. The animals underwent either a sterile laparotomy (sham) or a colon ascendens stent peritonitis (CASP) operation in the presence or absence of gemfibrozil (applied twice intraperitoneally) at two different doses (30 mg/kg body weight or 100 mg/kg body weight) or the PPAR α antagonist GW6471. Twenty-four hours after the initial operation all animals were euthanized. The colon was surgically removed, cleaned and homogenized. The oxygen concentration within the colon homogenate was measured using a respirometer after the stimulation of complexes I and II of the mitochondrial respiratory chain. From the measured data the respiratory control ratio (RCR) (state 3/state 2) and ADP/O ratio (added amount of ADP/consumed oxygen) were calculated to evaluate the mitochondrial function. These ratios were statistically compared within the non-septic and septic groups. Additionally, the amount of malondialdehyde was measured using the thiobarbituric acid assay to determine oxidative stress within the colonic cells.

In summary, no differences in mitochondrial function or oxidative stress were observed after pretreatment with gemfibrozil in both the non-septic and septic groups. Compared to the results of other studies potential explanations for our results could be the timing of medication administration, a different concentration of the medication at the target organ, or a possibly weak expression of PPAR α within colon cells of rats. The latter theory in particular raises new questions and could be the subject of future studies.

Abkürzungsverzeichnis:

ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
CASP	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EGTA	<i>Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure</i>
FAD	<i>Flavin-Adenin-Dinukleotid</i>
FADH ₂	<i>hydriertes Flavin-Adenin-Dinukleotid</i>
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
H	<i>Wasserstoff</i>
HO·	<i>Hydroxyl-Radikal</i>
H ₂ O ₂	<i>Wasserstoffperoxid</i>
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
IL-6	<i>Interleukin 6</i>
IL-12	<i>Interleukin 12</i>
L·	<i>Fettsäure-Radikal</i>
LOO·	<i>Lipid-Peroxidradikal</i>
LOOH	<i>Lipidperoxid</i>
LPL	<i>Lipoproteinlipase</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MAP	<i>Mittlerer arterieller Druck</i>
MDA	<i>Malondialdehyd</i>
MOF	<i>Multipler Organversagen</i>
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)propansulfonsäure</i>
NAD	<i>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid</i>
NADH	<i>hydriertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid</i>
O	<i>Sauerstoff</i>
O ₂ ⁻	<i>Superoxid</i>
PGC-1α	<i>Peroxisome-Proliferator-aktivierender Rezeptor gamma Koaktivator 1-alpha</i>

PPAR α	<i>Peroxisomen-Proliferator-aktivierender Rezeptor alpha</i>
PUFA	<i>mehrfach ungesättigte Fettsäuren</i>
qSOFA	<i>quick Sequential Organ Failure Assessment</i>
RCR	<i>Respiratory control ratio</i>
ROS	<i>Reaktive Sauerstoffspezies</i>
rpm	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
TNF α	<i>Tumor Nekrose Faktor alpha</i>
TRIS	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>
USA	<i>United States of America</i>
US-Dollar	<i>United States Dollar</i>
WHO	<i>Weltgesundheitsorganisation</i>
ZETT	<i>Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Definition der Sepsis.....	1
1.2	Bedeutung der Sepsis.....	2
1.3	Pathogenese der Sepsis	2
1.4	Mikrozirkulation während einer Sepsis	3
1.5	Die Rolle des Mitochondriums während einer Sepsis	4
1.6	Das Colon – die intestinale Barriere	6
1.7	Die Effekte der Fibrat	6
1.8	Fragestellungen.....	9
2	Material und Methoden.....	9
2.1	Chemikalien, Geräte und verwendete Instrumente	9
2.2	Versuchstiere	9
2.3	Vorbehandlung	10
2.3.1	Gemfibrozil.....	10
2.3.2	PPAR α Antagonist.....	10
2.3.3	Trägersubstanz DMSO	10
2.3.4	Operation	11
2.4	Gruppeneinteilung	11
2.5	Organentnahme.....	12
2.6	Messung der mitochondrialen Funktion	13
2.6.1	Präparation des Colongewebes	13
2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	13
2.6.3	Respirometrie.....	14
2.7	Messung der ROS	18
2.7.1	Lipidperoxidation	18
2.7.2	Thiobarbitursäure-Test.....	19
2.8	Statistische Auswertung.....	20
3	Ergebnisse.....	20
3.1	Ergebnisse der Respirometrie	20
3.1.1	Ergebnisse der nicht-septischen Versuchsgruppen	21
3.1.2	Ergebnisse der septischen Versuchsgruppen	23
3.2	Ergebnisse der MDA-Messungen	26
4	Diskussion	27
4.1	Methodendiskussion	27
4.2	Ergebnisdiskussion	28
4.2.1	Diskussion der mitochondrialen Funktion im Colon	29
4.2.2	Diskussion des oxidativen Stresses.....	31
5	Zusammenfassung und Ausblick	33
6	Literaturverzeichnis	35
7	Anhang	44
8	Danksagung	50

1 Einleitung

1.1 Definition der Sepsis

Die Sepsis wird definiert als lebensbedrohliches Organversagen, verursacht durch eine dysregulierte Immunantwort des Wirts auf eine Infektion¹. Um die Sepsis klinisch zu erkennen, wird hierfür aktuell der *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*-Score (s. *Tabelle 1*) verwendet, um verschiedene Organsysteme auf ihre Funktion zu bewerten. Wird im zeitlichen Verlauf der Hospitalisation eines Patienten ein Anstieg von über zwei Punkten im SOFA-Score festgestellt, ist eine Sepsis sehr wahrscheinlich¹.

Tabelle 1: SOFA-Score

Parameter	1	2	3	4
PaO ₂ /FiO ₂ , mmHg	<400	<300	<200	<100
Thrombozyten, 10 ³ /μL	<150	<100	<50	<20
Billirubin, mg/dL	1.2–1.9	2.0–5.9	6.0-11.9	>12
Mittlerer arterieller Druck (MAP), mmHg bzw. Katecholaminbedarf	<70	Wenig Bedarf	Mittlerer Bedarf	Hoher Bedarf
Glasgow Coma Scale	13-14	10-12	6-9	<6
Kreatinin, mg/dL	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	>5.0
Urinausscheidung, mL/d			<500	<200

Der SOFA-Score kann auch verwendet werden, um die Prognose eines septischen Patienten einzuschätzen. So korreliert eine höhere Punktzahl im SOFA-Score mit einer erhöhten 28-Tage Mortalität².

Um eine Sepsis akut und nicht im Verlauf zu identifizieren, kann der *quickSOFA (qSOFA)*-Score verwendet werden, der nur drei Kriterien beinhaltet: Eine erhöhte Atemfrequenz (≥ 22 /min), ein verändertes Bewusstsein (GCS<15) und ein erniedrigter systolischer Blutdruck (≤ 100 mmHg). Sind zwei dieser drei Kriterien erfüllt, ist mit einer schlechteren Prognose zu rechnen¹.

Eine gesonderte Untergruppe der Sepsis stellt der septische Schock dar. Dieser wird definiert als Status des akuten Kreislaufzusammenbruchs. Patienten mit septischen Schock können klinisch durch zwei Kriterien identifiziert werden: Durch einen Bedarf an Vasopressoren, um einen mittleren arteriellen Druck (MAP) von über 65 mmHg aufrechtzuerhalten, und einen Laktatspiegel von über 2 mmol/l trotz adäquater Volumensubstitution. Diese Kombination ist mit einer sehr hohen Mortalität verbunden¹.

1.2 Bedeutung der Sepsis

Die Sepsis ist einer der gefürchtetsten Erkrankungen und stellt die Medizin weltweit aufgrund der hohen Mortalitätsrate vor große Herausforderungen. Trotz intensiver Forschung und guter medizinischer Versorgung liegt die Mortalität einer Sepsis in Deutschland zwischen 24-44%³. So sind in Deutschland im Jahr 2015 etwa 150.000 Menschen an einer Sepsis verstorben⁴. Weltweit wird die Todeszahl einer Sepsis auf etwa 5,3 Millionen Menschen pro Jahr geschätzt⁵. Zudem steigt die Inzidenz jährlich weiterhin an. So wurde in Deutschland ein Anstieg der Inzidenz von 5,7% zwischen 2007 und 2013 festgestellt³.

Neben diesen dramatischen medizinischen Zahlen ist die Sepsis auch eine ökonomische Belastung. So wurden die Kosten für die Versorgung der Patienten mit einer Sepsis im Jahr 2013 in Deutschland auf 7,7 Milliarden Euro geschätzt³. In den USA verursachte die Sepsis im Jahr 2013 mit 23,7 Milliarden US-Dollar die höchsten Behandlungskosten aller Krankenhausbehandlungen⁶. Auch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) deklariert die Sepsis als globales Gesundheitsproblem⁷.

1.3 Pathogenese der Sepsis

Bei einer Sepsis verändern sich die Funktionen verschiedener Organsysteme des Körpers⁸. Die Ursachen dieser Veränderung sind sehr komplex. Eine zentrale Rolle in der Pathogenese einer Sepsis spielt die dysregulierte Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion, verursacht durch verschiedene Pathogene wie Bakterien, Pilze, Viren oder Parasiten⁸. Bei einer Infektion wird zunächst das infizierte Gewebe von Makrophagen durchsetzt, die proinflammatorische Zytokine produzieren, um das angeborene Immunsystem zu aktivieren. Durch das angeborene Immunsystem wird die Expression weiterer zur Inflammation

zugehöriger Gene verstärkt. Dadurch werden über komplexe Signalwege unter anderem weitere pro-/ als auch antiinflammatorische Zytokine ausgeschüttet⁸.

Während einer Sepsis ist die Ausschüttung dieser Zytokine erhöht^{8,9}. In der Literatur wird dies als *cytokine storm* („Zytokinsturm“) bezeichnet⁸⁻¹⁰, wobei sich dieser Begriff einer genauen Definition entzieht¹⁰. Dieser Zytokinsturm kann Signalwege beeinflussen^{8,9} und verschiedene Organe schädigen, was unter anderem zu einem akuten Leber-, Lungen- und Nierenversagen führen kann⁸. Auch die Mortalität einer Sepsis könnte mit diesem Zytokinsturm in Zusammenhang stehen. So korrelierte eine erhöhte Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 beta (IL-1 β) während einer Sepsis mit einem schlechteren Outcome der Patienten¹⁰. Zusätzlich wird vermutet, dass auch überlebende Patienten nach einer Sepsis beeinträchtigt sind. So mutmaßt man, dass sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem der Überlebenden nach der überstandenen Infektion heruntergefahren wird^{8,11}, um wieder eine Homöostase zu erreichen¹¹. Dies könnte sie anfälliger für sekundäre Infektion machen^{8,11}.

Der genaue Pathomechanismus einer Sepsis ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Es könnten auch andere Ursachen, die im Folgenden erläutert werden, eine Rolle spielen.

1.4 Mikrozirkulation während einer Sepsis

Während einer Sepsis herrscht eine Störung in der Mikrozirkulation. So werden manche Kapillaren minderdurchblutet, während andere einen erhöhten Blutfluss aufweisen¹². Kommt es z.B. zum septischen Schock, wird der Blutfluss so umverteilt, dass lebenswichtige Organe wie Gehirn und Herz mehr durchblutet werden als andere Organe wie z.B. der Intestinaltrakt, die Niere oder die Leber¹³. Diese Umverteilung kann minderdurchblutete Organe erheblich schaden und scheint dramatische Auswirkungen für den Patienten zu haben. So wird vermutet, dass starke und persistierende Veränderungen in der Mikrozirkulation mit der Entwicklung eines multiplen Organversagens und mit niedrigeren Überlebensraten assoziiert sind¹⁴⁻¹⁶.

1.5 Die Rolle des Mitochondriums während einer Sepsis

Mitochondrien sind die wichtigsten Mikroorganellen in Bezug auf Energieproduktion, Proteinsynthese und Katabolismus in einer Zelle⁸. Sie verbrauchen mehr als 90% des vorhandenen Sauerstoffs, um mittels der oxidativen Phosphorylierung Adenosintriphosphat (ATP) zu produzieren. Bei diesem Prozess entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikal ($HO\cdot$)¹⁷. Diese werden für verschiedene Signalwege und der Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus benötigt¹⁸. Unter physiologischen Bedingungen können sowohl antioxidierende Enzyme wie z.B. Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase und Katalase als auch antioxidierende Substanzen wie z.B. Ascorbinsäure, Glutathion und α -Tocopherol die ROS beseitigen. So entsteht ein Gleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien¹⁷. Während einer Sepsis wird das Gleichgewicht zugunsten der ROS verschoben und es entsteht oxidativer Stress für die Zelle^{8,18,19}. Diese erhöhte Anzahl an ROS können mit Proteinen, Lipiden und DNA reagieren¹⁹, die Komponenten der Zelle schädigen und zum Zelltod führen²⁰. Das könnte einen Einfluss auf das Überleben des Patienten haben. *Santos et al.*²¹ zeigten, dass bei einer Sepsis überlebende Patienten im Vergleich zu verstorbenen Patienten nach sieben Tagen einen niedrigeren ROS-Spiegel aufweisen.

Zusätzlich zur erhöhten ROS-Produktion wird während einer Sepsis die oxidative Phosphorylierung des Mitochondriums beeinträchtigt. So wurden erniedrigte Werte von ATP – dem Endprodukt der oxidativen Phosphorylierung – sowohl in Muskelzellen^{22,23} als auch in Lymphozyten²⁴ septischer Patienten nachgewiesen. Auch verschiedenste septische Tiermodelle zeigten erniedrigte ATP-Spiegel bei septischen Tieren^{25–27}. Es ist allerdings nicht klar, ob die reduzierte ATP-Produktion nur negative Effekte für die Zelle hat. *Latta et al.*²⁸ konnten zeigen, dass Hepatozyten bei einer deutlichen Reduktion des ATP-Gehalts (auf 20%) im Vergleich zu Hepatozyten mit normalem ATP-Gehalt eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion sowie weniger DNA-Fragmentierungen und Apoptosemarker nach Gabe von $TNF\alpha$ aufwiesen. Deshalb könnten niedrigere Mengen an ATP einen eher protektiven als schädlichen Charakter haben²⁹. Die Rolle des ATP während einer Sepsis wird weiterhin kontrovers diskutiert.

Neben diesen Studien, die eine verringerte mitochondriale Funktion während einer Sepsis zeigten^{22,23,30–32}, zeigten wiederum andere Berichte sowohl eine gesteigerte^{33–36} als auch eine

unveränderte mitochondriale Funktion³⁷⁻³⁹. Die Ursachen für die hohe Variabilität bezüglich der Ergebnisse könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein, wie die Herkunft der entnommenen Mitochondrien, der gewählte Messzeitpunkt nach Sepsiseintritt und der unterschiedliche Schweregrad der induzierten Sepsis⁴⁰. So zeigten *Mittal et al.*³⁸, dass nach einem septischen Schock – ausgelöst durch eine akute Pankreatitis – Gewebeproben aus Pankreas, Lunge und Jejunum nach 6 h eine mitochondriale Dysfunktion aufwiesen, wohingegen die mitochondriale Funktion in Herz-/ Nieren-/ Leber-/ und Duodenumproben unverändert blieb. In einer weiteren Studie von *Trumbeckaite et al.*⁴¹ wurde gezeigt, dass nach einem septischen Schock die mitochondriale Funktion des Pankreas nach 6 h, der Niere nach 24 h und der Lunge nach 48 h verringert war, wobei auch hier die mitochondriale Funktion der Leber nicht beeinflusst war. Unsere Arbeitsgruppe hat sich in einer vergangenen Studie mit den Veränderungen der mitochondrialen Funktion in Leber- und Colonzellen im Verlauf einer Sepsis innerhalb von 96 h beschäftigt. Hepatozyten wiesen in der Initialphase (bis 48 h) eine gesteigerte mitochondriale Funktion auf und normalisierten sich im weiteren Zeitverlauf (bis 96 h). Colonzellen wiesen keine Veränderung im zeitlichen Verlauf auf⁴². Unsere Arbeitsgruppe zeigte weiterhin, dass der Schweregrad einer Sepsis die mitochondriale Funktion in der Leber unterschiedlich beeinflusst. Gemessen an der *respiratory control ratio* (RCR) – ein Marker, um die Kopplung zwischen Atmungskette und ATPase zu beurteilen – konnte bei Leberzellen von Ratten mit einer moderaten Sepsis eine bessere mitochondriale Funktion nachgewiesen werden als die der Kontrollgruppe. Hingegen zeigten Leberzellen von schwer septischen Ratten keine signifikanten Unterschiede in der mitochondrialen Funktion hinsichtlich der RCR im Vergleich zur Kontrollgruppe⁴³. Nach einer Metaanalyse von 73 Studien bezüglich der mitochondrialen Funktion während einer Sepsis kommen auch *Jeger et al.*⁴⁰ zu dem Entschluss, dass die mitochondriale Funktion während einer Sepsis sehr variabel und organspezifisch ist und sich im Verlauf einer Sepsis verändert. Die Frage, wie sich die mitochondriale Funktion während einer Sepsis verändert, ist somit noch nicht abschließend geklärt und wird derzeit kontrovers diskutiert.

Einen weiteren wichtigen Faktor neben der mitochondrialen Funktion könnte die mitochondriale Biogenese während einer Sepsis darstellen. Unter mitochondrialer Biogenese versteht man die Neubildung von Mitochondrien innerhalb der Zellen. Dies ist ein essenzieller Prozess, um geschädigte Mitochondrien auszutauschen und sich an einen steigenden Energiebedarf anzupassen. Die Schlüsselrolle für die Steigerung der mitochondrialen Biogenese scheint das Protein *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α) zu spielen⁴⁴⁻⁴⁶, das über Transkriptionsfaktoren unter anderem die

mitochondriale Biogenese steigert. *Carré et al.*²² haben gezeigt, dass Patienten, die eine Sepsis überlebten, im Vergleich zu Verstorbenen eine erhöhte mRNA-Expression für PGC-1 α in Muskelzellen aufwiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Therapie, die die mitochondriale Biogenese steigert, z.B. durch die Gabe von Kohlenmonoxid (CO), das Überleben von septischen Ratten verbessert. So hatten Ratten, die CO inhalierten, eine niedrigere Mortalität als unbehandelte Ratten nach Induktion einer Sepsis⁴⁷. Somit könnte eine verbesserte mitochondriale Biogenese einen entscheidenden Bestandteil für das Überleben einer Sepsis darstellen.

1.6 Das Colon – die intestinale Barriere

Die Rolle des Colons während einer Sepsis wird meist unterschätzt. Auch wenn das Colon nicht die Ursache der Infektion bzw. der Sepsis ist, kann eine Sepsis eine Beschädigung der intestinalen Barriere und eine damit verbundene bakterielle Translokation über das Epithel verursachen^{48,49}. So hatten Ratten, die eine pulmonale Sepsis durch eine tracheale *Pseudomonas aeruginosa*-Injektion erlitten, eine erhöhte intestinale Permeabilität und in mesenterialen Lymphknoten dieser septischen Ratten wurden vermehrt Bakterien nachgewiesen, was für eine bakterielle Translokation über das intestinale Epithel spricht⁴⁸. Auch bei Mäusen, die eine pulmonale Sepsis erlitten, wurde eine gesteigerte intestinale Permeabilität, eine vermehrte Expression von IL-6 und IL-1 β und ein erhöhter mRNA-Spiegel des *Tight junction*-Proteins Claudin-2 im Colon festgestellt. Dieses Protein wird als „leaky protein“ bezeichnet: Je höher die Expression dieses Proteins, desto höher auch die intestinale Permeabilität⁴⁹. Die durch die erhöhte Permeabilität verursachte bakterielle Translokation kann zu einem septischen Schock führen⁵⁰, der mit einer erhöhten Mortalität verknüpft ist^{3,4}. Somit könnte die gestörte Barrierefunktion und die damit resultierende Translokation von Bakterien über das intestinale Epithel den Verlauf einer Sepsis verschlimmern bzw. eine Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion möglicherweise den Verlauf einer Sepsis positiv beeinflussen.

1.7 Die Effekte der Fibrate

Gemfibrozil gehört zu der Klasse der Fibrate und ist derzeit in Deutschland zur Therapie einer Hypertriglyceridämie bei nicht ausreichender Wirksamkeit von Statinen zugelassen.

Gemfibrozil wirkt agonistisch am intrazellulären Peroxisomen-Proliferator-aktivierenden Rezeptor alpha (PPAR α). Bei einer Aktivierung dieses Rezeptors dringt er in den Nukleus der Zelle ein und bildet Heterodimere mit dem *retinoid X receptor* (RXR). Dieses Heterodimer kann in Verbindung mit weiteren Rezeptoren als Transkriptionsfaktor die Transkription von Proteinen beeinflussen⁵¹. So wird unter anderem die β -Oxidation⁵² und die Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL)^{52,53} gesteigert, was den lipidsenkenden Effekt des Medikaments zur Folge hat.

Zusätzlich zur lipidsenkenden Wirkung hat der PPAR α noch weitere Effekte. Eine Rolle spielt der PPAR α im Glukosemetabolismus. So erlitten PPAR α -Null Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen nach einer Phase des Fastens schwere Hypoglykämien⁵⁴. Studien zeigten außerdem, dass durch den PPAR α sowohl Gene, die in der Glukoneogenese involviert sind, exprimiert⁵⁵ als auch die Expression von Enzymen, die die Glukoneogenese fördern, gesteigert werden⁵⁶. Neben dem Glukose- wird auch der Aminosäuremetabolismus durch den PPAR α beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass in Hepatozyten die mRNA-Expression von Enzymen, die im Aminosäuremetabolismus involviert sind, und die Expression von Genen, die an der Trans- und Deamination von Aminosäuren und dem Harnstoffzyklus beteiligt sind, durch den PPAR α verringert werden⁵⁷.

Durch die Aktivierung des PPAR α durch Fibrate konnte zusätzlich eine Wirkung auf die Koagulation beobachtet werden. Nach einer Therapie mit Ciprofibrat wurde in Leberzellen von Affen die Expression von Genen, die an der Koagulation beteiligt sind, herunterreguliert, darunter Gene für die Regulation von Fibrinogen, Plasma Kallikerein B und den Koagulationsfaktoren VII, XI, XII und XIII⁵⁸. Auch andere Arbeitsgruppen beobachteten eine Reduktion von prothrombotischen Proteinen in menschlichen Hepatozyten nach einer Therapie mit Fibraten^{59,60}.

Fibrate scheinen auch einen Einfluss auf das Endothel zu haben. In atheromatösen Kaninchen wurde nach einer Plaqueruptur durch eine Ballondilatation eine gesteigerte endotheliale Regeneration durch die Gabe von Fenofibrat festgestellt⁶¹. Auch die endotheliale Funktion wurde in unterschiedlichen Tiermodellen mit Mäusen⁶² und Kaninchen⁶³ durch die Gabe von Fibraten verbessert.

Durch die Sepsis werden verschiedene Prozesse beeinflusst. Diese Prozesse sind unter anderem die Ausschüttung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, die Menge an oxidativen Stress innerhalb einer Zelle sowie die mitochondriale Biogenese und Funktion.

Auch auf diese Prozesse haben Fibrate spezielle Effekte. In einem Sepsismodell produzierten Splenozyten von PPAR α -null Mäusen 2-3 Mal mehr der proinflammatorische Zytokine IL-6 und IL-12 als die der Wildtyp-Mäuse⁶⁴. Außerdem wurde nach Gabe von Gemfibrozil an septischen Ratten niedrigere Werte von IL-1 und TNF α im Serum gemessen⁶⁵. Auch nach Gabe von Fenofibrat wurden niedrigere IL-6-Spiegel in glatten Muskelzellen der Aorta septischer Mäuse gemessen, wohingegen PPAR α -null Mäuse nach Gabe von Fenofibrat keine Veränderung aufwiesen⁶⁶. Dies deutet auf eine durch den PPAR α vermittelte antiinflammatorische Wirkung von Fibraten hin. Dieser Effekt könnte die Sepsis-bedingte Dysregulation von pro-/ und antiinflammatorischen Zytokine modulieren und möglicherweise das Outcome bei einer Sepsis verbessern.

Die Gabe von Fibraten scheint auch eine Reduktion des oxidativen Stresses zu verursachen. Nach einer 14-tägigen Therapie mit Fenofibrat wiesen Mäuse niedrigere Marker für oxidativen Stress im Cortex als die Vergleichsgruppe auf⁶⁷. Auch der oxidative Stress im Lungengewebe von Ratten, bei denen eine pulmonale Hypertension indiziert wurde, wurde durch die Gabe von Fenofibrat gesenkt⁶⁸. Fenofibrat konnte auch sowohl den mitochondrialen als auch den zellulären oxidativen Stress in hypertrophen Myokardzellen von Ratten senken⁶⁹. Es wäre möglich, dass Fibrate den oxidativen Stress auch während einer Sepsis reduzieren.

Ob Fibrate auch die mitochondriale Biogenese beeinflussen können, ist nicht eindeutig belegt. *Komen und Thorburn*⁷⁰ haben im Jahr 2014 die Ergebnisse von verschiedenen Studien, die die mitochondriale Biogenese nach Gabe von Bezafibrat in unterschiedlichen Mausmodellen analysiert haben, gegenübergestellt. Während einige Studien nach Gabe von Bezafibrat eine gesteigerte mitochondriale Biogenese feststellten, konnten andere Studien dies nicht bestätigen. Unterschiedlichen Versuchsmodelle späterer Studien deuten hingegen auf eine gesteigerte mitochondriale Biogenese durch die Fibrate Bezafibrat^{71,72} und Gemfibrozil⁷³ hin. All diese Studien wurden unter nicht-septischen Bedingungen durchgeführt. Ob Fibrate die mitochondriale Biogenese während einer Sepsis steigern und ob sie das Outcome einer Sepsis verbessern können, wurde bislang nicht erforscht.

Fibrate nehmen auch Einfluss auf die Funktion des Mitochondriums. *Scatena et al.*⁷⁴⁻⁷⁶ zeigten, dass Bezafibrat, Clofibrat und Gemfibrozil sowohl in menschlichen Leukämie-/Hepatoblastom-/ wie auch Rhabdomyosarkomzellen eine Reduktion der Aktivität des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette verursacht. Auch andere Studien konnten nach Gabe von Fibraten eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion in Leberzellen^{77,78} und Muskelzellen⁷⁹ von Ratten nachweisen. Unsere Arbeitsgruppe hat in einer vorherigen

Studie die Auswirkung von Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion in Leber und Colon von gesunden Ratten untersucht. Hierbei stellte unsere Arbeitsgruppe fest, dass Gemfibrozil die mitochondriale Funktion in der Leber verschlechterte und die des Colons eher verbesserte⁸⁰. Wie sich die mitochondriale Funktion des Colons in septischen Ratten nach der Gabe von Gemfibrozil verändert, wird in dieser Studie analysiert.

1.8 Fragestellungen

Unter diesen Aspekten wurden folgende Fragestellungen formuliert:

- 1.) Welche Wirkung hat Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion des Colons nach steriler Laparotomie und im septischen Rattenmodell?
- 2.) Beeinflusst Gemfibrozil die Bildung von ROS im Colon unter nicht-septischen und septischer Bedingungen bei Ratten?
- 3.) Wird die Wirkung von Gemfibrozil über den PPAR α erzielt?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Geräte und verwendete Instrumente

Eine Liste mit allen verwendeten Chemikalien, Geräten und Instrumenten kann im Anhang gefunden werden. Die Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen sind dort auch aufgelistet.

2.2 Versuchstiere

Eine Genehmigung für diese tierexperimentelle Versuchsreihe liegt dem Institut für Anästhesiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor (AZ: 84-02.04.2015.A398). Hierfür wurden 144 männliche Wistar-Ratten in einem Alter von ca. drei Monaten und einem Gewicht von 350 g +/- 35 g verwendet.

Die Betreuung und Operationen der Versuchstiere wurden von der Veterinärmedizinerin Fr. Katharina Gross und der Anästhesistin Fr. Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus geleitet. Die Versuchstiere wurden über die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und

wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bestellt und eine Woche vor Versuchsbeginn angeliefert. In dieser Woche hatten die Versuchstiere freien Zugang zu Wasser und artgerechter Nahrung.

2.3 Vorbehandlung

2.3.1 Gemfibrozil

Die Vorbehandlung mit Gemfibrozil wurde in zwei verschiedenen Dosierungen durchgeführt. Die Dosierung 30 mg/kg KG entspricht hierbei der üblichen therapeutischen Dosierung zur Behandlung einer Fettstoffwechselstörung beim Menschen. Die zweite Dosis 100 mg/kg KG basiert auf bereits durchgeführten Tierversuchen mit Ratten⁶⁶. Die Applikation des Medikaments erfolgte intraperitoneal 24 Stunden und unmittelbar vor der Colon ascendens stent peritonitis (CASP)-/Sham Operation.

2.3.2 PPAR α Antagonist

Zusätzlich zum Gemfibrozil wurden den Ratten entweder Dimethylsulfoxid (DMSO) 5% oder der PPAR α Antagonist GW6471 in einer Dosierung von 1 mg/kg KG intraperitoneal 30 Minuten vor der Gabe des Gemfibrozils gespritzt. Der PPAR α Antagonist wurde verwendet, um festzustellen, ob die Wirkung des Gemfibrozils über den PPAR α vermittelt wird.

2.3.3 Trägersubstanz DMSO

Um das Medikament Gemfibrozil und den PPAR α Antagonisten GW6471 löslich und applizierbar zu machen, wurde die Trägersubstanz DMSO gewählt. Gemfibrozil wurde in DMSO 50% und GW6471 in DMSO 5% gelöst. Aus diesem Grund wurden zu allen Behandlungen entsprechende Kontrollen mit Lösungsmittel durchgeführt.

2.3.4 Operation

24 Stunden vor Organentnahme wurde an den Versuchstieren entweder eine Colon ascendens stent peritonitis (CASP)-Operation oder eine Sham-Operation durchgeführt.

Die CASP-Operation ist eine standardisierte Operation, um eine abdominelle Sepsis zu induzieren⁸¹. Unter einer kombinierten (Buprenorhin/Sevofluran)-Narkose wurde unter sterilen Bedingungen eine Laparotomie durchgeführt. Es wurden zwei herkömmliche periphere Venenverweilkanülen (16G) am ileocaecalen Übergang und 2 cm cranial davon in die große Krümmung des Caecums implantiert. Um die Durchlässigkeit der Katheter zu prüfen, wurde ein leichter Druck auf das Caecum ausgeübt, worauf sich die Katheter mit Faeces füllten. Anschließend wurde der Darm wieder reponiert und zum Flüssigkeitsausgleich 5 ml warme Natriumchloridlösung intraperitoneal gegeben. Zum Schluss wurde die geöffnete Bauchdecke wieder vernäht.

Die Sham-Operation wurde analog zur CASP-Operation durchgeführt, nur hier wurde ein Stent auf die äußere Darmwand des Caecums aufgenäht, ohne eine Perforation zu provozieren.

In den nächsten 24 Stunden erhielten die Ratten alle 8 Stunden subcutan eine Flüssigkeits- und Analgesiesubstitution mit 0,6 ml Natriumchloridlösung und 0,05 mg/kg KG Buprenorphin. Hierbei wurde durch ein definiertes Bewertungssystem (*Septic Rat Severity Score*) das Allgemeinbefinden der Ratten anhand von bestimmten Parametern bewertet (s. *Tabelle 2 im Anhang*). Beim Erreichen einer Punktzahl von 10 wurde das Tier mit 120 mg/kg KG Phenobarbital euthanasiert.

2.4 Gruppeneinteilung

Die 144 Versuchstiere wurden in zwölf Gruppen á zwölf Tiere eingeteilt. Alle in der Tabelle aufgelisteten Medikamente wurden intraperitoneal appliziert. (s. *Tabelle 3*)

Tabelle 3 Einteilung der Versuchs- und Kontrollgruppen

Gruppe 1	Sham + DMSO (5%) i.p. + DMSO (50%) i.p.	n=12
Gruppe 2	Sham + Gemfibrozil 100 mg/kg i.p. + DMSO (5%) i.p.	n=12
Gruppe 3	Sham + Gemfibrozil 30 mg/kg i.p. + DMSO (5%) i.p.	n=12

Gruppe 4	Sham + Gemfibrozil 100 mg/kg i.p. + GW6471 1 mg/kg i.p.	n=12
Gruppe 5	Sham + Gemfibrozil 30 mg/kg i.p. + GW6471 1 mg/kg i.p.	n=12
Gruppe 6	Sham + GW6471 1 mg/kg i.p. + DMSO (50%) i.p.	n=12
Gruppe 7	CASP + DMSO (5%) i.p. + DMSO (50%) i.p.	n=12
Gruppe 8	CASP + Gemfibrozil 100 mg/kg i.p. + DMSO (5%) i.p.	n=12
Gruppe 9	CASP + Gemfibrozil 30 mg/kg i.p. + DMSO (5%) i.p.	n=12
Gruppe 10	CASP + Gemfibrozil 100 mg/kg i.p + GW6471 1 mg/kg i.p.	n=12
Gruppe 11	CASP + Gemfibrozil 30 mg/kg i.p. + GW6471 1 mg/kg i.p.	n=12
Gruppe 12	CASP + GW6471 1 mg/kg i.p. + DMSO (50%) i.p.	n=12

2.5 Organentnahme

Vor der Organentnahme wurde im Rahmen einer anderen Dissertation die Mikrozirkulation der Leber und des Colons mittels Reflektionsspektroskopie (O2C, Lea Medizintechnik Gießen) gemessen. Unter Narkose und nach einer Relaparotomie wurde jeweils eine Sonde auf die beiden Organe platziert und die Mikrozirkulation gemessen. Nach den Messungen wurde die Ratte noch während der Narkose fachgerecht durch Exsanguination getötet. Das entnommene Blut wurde zur Bestimmung weiterer Parameter verwendet.

Den Versuchstieren wurde nach den Messungen der Mikrozirkulation distal des Caecums ein etwa 6-7 cm langes Stück Colons abgetrennt. Das abgetrennte Stück wurde auf einer sterilen Unterlage grob von Faeces befreit und in drei Teile geschnitten. Der proximale Teil wog etwa 0,1 g, wurde in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dewargefäß zwischengelagert und im Anschluss für die ATP-Messung verwendet. Der distale Teil betrug auch in etwa 0,1 g, wurde in einer Natriumchloridlösung gespült und bei -80°C gelagert. Dieser Teil wurde im Folgenden zur Messung der ROS genutzt. Der mediane Anteil wog in etwa 1,4 g +/- 0,3 g, wurde in 10 ml eiskaltem Isolationspuffer A (s. *Tabelle 14 im Anhang*) asserviert und im Anschluss für die Messung der mitochondrialen Funktion verwendet.

2.6 Messung der mitochondrialen Funktion

2.6.1 Präparation des Colongewebes

Das im Isolationspuffer A asservierte Colongewebe wurde samt Isolationspuffer in eine Petrischale gegeben, mittels Pinzetten von Fettanhängseln und Kot befreit und anschließend abgewogen. Das Colon wurde längs aufgeschnitten, sodass die Mukosa des Colons aufgedeckt liegt. Die Mukosa des Colons wurde vorsichtig mit einer Kompresse abgerieben. Das Colon wurde mit einer Trypsinlösung (0,05% Trypsin-EDTA, gibco® by Life Technologies) abhängig vom abgewogenen Colongewicht ($V = \text{Colongewicht (g)} \times 2 \text{ ml}$) fünf Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Colon in eine Lösung aus eiskaltem Isolationspuffer B (*S. Tabelle 15 im Anhang*) ($V = \text{Colongewicht (g)} \times 4 \text{ ml}$) und einem Proteaseinhibitor (Complete®, Roche Life Science) ($V = \text{Colongewicht (g)} \times 40 \mu\text{l}$) gelegt. Das Colongewebe wurde mit einer Schere in etwa 1-2 mm² große Stücke zerkleinert. Das Gemisch wurde in einem von außen mit Eis gekühlten Zylinder gefüllt und bei 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) durch einen Homogenisator (Potter-Elvehjem) homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch eine Kompresse in ein konisches Zentrifugenröhrchen gefiltert und eisgekühlt.

2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zunächst wurde eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt. Hierzu wurde BSA mit destilliertem Wasser verdünnt, um sieben unterschiedliche Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) herzustellen: 0, 62,5, 125, 250, 500, 750, 1000. Diese wurden in jeweils einem Reaktionsgefäß vorbereitet und eisgekühlt.

Nun wurde für die Proteinbestimmung die anerkannte Methode nach Lowry angewandt⁸². Hierzu wurden sowohl 100 μl von der Standardreihe als auch 100 μl von dem 1:100 verdünntem Homogenat (3 technische Replikate) mit jeweils 500 μl der Lowry-Lösung 1 (*s. Tabelle 16 im Anhang*) vermennt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dieser Reaktion bilden die in der alkalischen Lowry-Lösung 1 befindlichen Kupfer(II)-Ionen Komplexe mit den Peptidbindungen der Proteine des Homogenats und werden zu Kupfer(I)-Ionen reduziert. Die Anzahl der gebildeten Komplexe ist proportional zu der Menge der Peptidbindungen des Homogenats. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 50 μl Lowry-Lösung 2 (*s. Tabelle 16 im Anhang*) hinzugefügt und für weitere 30 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Bei dieser zweiten Reaktion reagieren die durch die erste Reaktion reduzierten Kupfer(II)-Ionen mit dem in der Lowry-Lösung 2 befindlichen Reagenz Folin Ciocalteu zu Molybdänblau, was zu einer intensiven Blaufärbung führt. Nach der zweiten Inkubationszeit werden jeweils 200 µl von allen Proben per Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte (Mikrotestplatte 96-Well, SARSTED, Deutschland) pipettiert und die Extinktionen mittels eines Photometers (BioTek Synergy 2, Winooski, USA) bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Dadurch, dass die Proteinkonzentrationen der Standardreihe und die dazugehörigen Extinktionen bekannt sind, werden die Extinktionen der Homogenate mit denen der Standardreihe verglichen und die Proteinkonzentrationen per Lambert'schen Gesetz ermittelt. Für die Berechnung der Proteinkonzentrationen wurde das Programm „Synergy™2 Multi-Mode Microplate Reader, software version: Gen5.1“ verwendet.

2.6.3 Respirometrie

2.6.3.1 Atmungskette des Mitochondriums

Die Atmungskette des Mitochondriums besteht aus fünf membranständigen Proteinen der inneren Mitochondrienmembran und ist essenziell für die Synthetisierung von Adenosintriphosphat (ATP). Über den Energiemetabolismus (Glykolyse, Citratzyklus, β -Oxidation) der Zelle entstehen die Reduktionsäquivalente NADH/H^+ und FADH_2 . Komplex I der Atmungskette oxidiert NADH zu NAD^+ und Komplex II reduziert FADH_2 zu FAD . Dadurch werden Elektronen über die Komplexe der Atmungskette bis hin zu Komplex IV weitertransportiert, an dem Sauerstoff zu Wasser oxidiert wird. Der Elektronentransport findet über zwei Koenzyme statt, Ubiquinon und Cytochrom C. Ubiquinon ermöglicht den Transport zwischen Komplex II und III, Cytochrom C zwischen Komplex III und IV. Entlang dieser Kette werden durch den Elektronentransport Protonen über die Komplexe I, III und IV von der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum gepumpt, um zwischen diesen einen Protonengradienten aufzubauen. Durch diesen Gradienten strömen die Protonen wieder über den Komplex V – auch ATP-Synthase genannt – in die Matrix ein. Dabei wird Adenosindiphosphat (ADP) in der Matrix zu ATP phosphoryliert. Diese Reaktion wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet.

2.6.3.2 Respirometer

Die Sauerstoffkonzentration in einer Messkammer eines Respirometers wird durch die Clark-Elektrode gemessen. Die Kammer des Respirometers wird dauerhaft mit Wasser umspült und über ein Wasserbad bei konstanten 30°C thermoreguliert. Die Kammer besitzt ein Fassungsvermögen von 0,5 ml und wird mit einem Plastikstopfen luftdicht verschlossen. Inmitten des Stopfens ist eine kapillargroße Öffnung, durch die man mittels Mikrospritzen Substrate in die Kammer injizieren kann. Der Inhalt der Kammer wird dauerhaft durch einen Magnetrührer durchmischt. Die Kalibrierung der Clark-Elektrode wurde täglich durchgeführt. Der maximale Wert wurde im destillierten Wasser und der minimale Wert im Natriumsulfid ermittelt. Das Respirometer ist mit einem Computer verbunden, mithilfe dessen man über ein Respirometrieprogramm (782 System Version 5.1, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland) die Sauerstoffkonzentration über die Zeit grafisch darstellen kann.

2.6.3.3 Vorbereitung der Respirometrie

Für die Messung wurde das Colonhomogenat mithilfe eines Respirationspuffers (*s. Tabelle 17 im Anhang*) auf 6 mg/ml verdünnt. Der Respirationspuffer wurde mittels eines Wasserbades konstant auf einer Temperatur von 30°C gehalten. Erst eine Minute vor dem Befüllen der Respirometerkammer wurde der Respirationspuffer mit dem noch eisgekühlten Homogenat in einem Reaktionsgefäß vermengt. Nach dieser Minute wurde die Kammer mit dem Gemisch befüllt und die Messung der Sauerstoffkonzentration begann.

2.6.3.4 Integrität der Mitochondriummembranen

Um festzustellen, ob die Mitochondrien durch den Verarbeitungsprozess beschädigt wurden, wurden die beiden Membranen des Mitochondriums auf ihre Integrität getestet.

Für die Integrität der äußeren Membran wurden 2,5 µM Cytochrom C verwendet. Cytochrom C dient als Elektronentransporter zwischen Komplex III und IV. Bei einer geschädigten äußeren Membran würde der Sauerstoffverbrauch unmittelbar nach der Injektion von Cytochrom C ansteigen, da Cytochrom C als Koenzym zwischen Komplex III und IV wirkt und die Atmungskette beschleunigt.

Für die Integrität der inneren Membran wurden 0,05 µg/ml Oligomycin verwendet. Oligomycin ist ein Inhibitor der in der Matrix des Mitochondriums liegenden ATP-Synthase. Bei einer intakten inneren Membran inhibiert Oligomycin die ATP-Synthase und es kommt zu einem Rückstau der Protonen innerhalb des Intermembranraums. Dieser Rückstau hemmt die Atmungskette, sodass der Sauerstoffverbrauch verlangsamt wird. Ist hingegen die innere Membran des Mitochondriums geschädigt, kommt es zu einem Protonenleck in die Matrix. Um das Leck auszugleichen und den Protonengradienten wieder aufzubauen, kommt es zu einem Anstieg der Atmungskette, was einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs zur Folge hat.

Ist der Sauerstoffverbrauch nach Injektion Cytochrom C stabil und nach Injektion von Oligomycin verlangsamt, kann man davon ausgehen, dass die Integrität der Mitochondrienmembranen erhalten ist. Falls dies nicht der Fall war, wurde der Versuch umgehend abgebrochen und floss nicht in die Statistik ein. Die Messvorgänge nach Zugabe von Cytochrom C und Oligomycin wurden lediglich quantitativ beurteilt und nicht ausgewertet.

2.6.3.5 Ablauf der Respirometrie

Um die Qualität der mitochondrialen Funktion beurteilen zu können, wurde die Atmungskette über die Komplexe I und II stimuliert. Der Ablauf ist in der Abbildung 1 veranschaulicht.

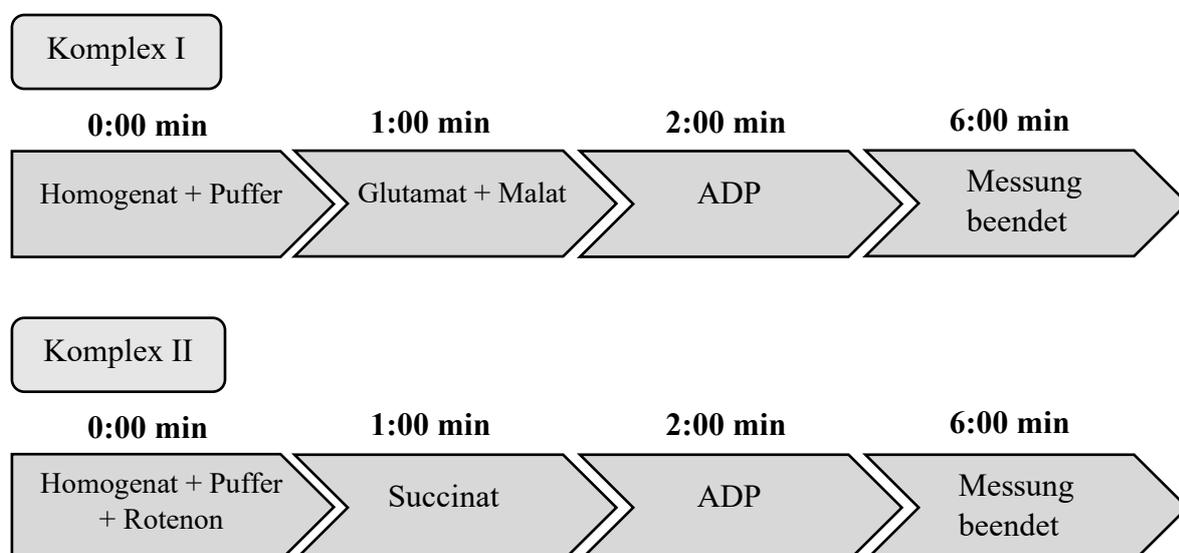


Abb. 1 Ablauf der Respirometrie

Zur Stimulation der Atmungskette über den Komplex I wurde nach einer Minute jeweils 2,5 mM Glutamat und Malat zur Stimulation der Atmungskette über den Komplex II 5 mM Succinat in die Kammer injiziert. Zusätzlich wurde bei der Stimulation der Atmungskette über den Komplex II 0,5 μ M Rotenon hinzugefügt, was den Elektronenfluss zwischen Komplex I und II blockiert. Hierdurch wird eine isolierte Messung der Atmungskette über den Komplex II ohne Beteiligung des Komplex I gewährleistet. Nach zwei Minuten wurde 50 μ M ADP hinzugefügt. Nach dem Erreichen des „state 4“ oder nach sechs Minuten wurde die Messung beendet.

2.6.3.6 Respirationsraten

Während der Messungen wurden die Sauerstoffkonzentrationen vom Respirometrieprogramm (782 System Version 5.1, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland) graphisch in der Einheit nmol/min/(mg Protein) dargestellt. Hieraus ergaben sich verschiedene Respirationsraten, die das Programm errechnete.

Bei der Respirationsrate 2 (state 2) wurde der Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von den Substraten Glutamat/Malat für Komplex I und Succinat für Komplex II berechnet. Glutamat und Malat dienen über den Malat-Shuttle-Mechanismus des Mitochondriums als Spender für NADH/H⁺, das durch die Reaktion mit Komplex I für einen Elektronentransport über die Komplexe sorgt. Succinat wird über Komplex II zu Fumarat oxidiert, was mit der Reaktion von FADH₂ zu FAD gekoppelt ist. Dies führt auch zu einem Elektronentransport.

Bei der Respirationsrate 3 (state 3) wurde der Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von ADP berechnet. ADP gilt als stärkster Aktivator der Atmungskette im Mitochondrium und führt zu einem schnellen Abfall der Sauerstoffkonzentration.

Ist das hinzugefügte ADP aufgebraucht, stellt sich ein stabiler Zustand ein, der als Respirationsrate 4 (state 4) bezeichnet wird.

Außerdem wurden zwei Quotienten berechnet, die Respiratory control ratio (RCR) (state 3/state 2) und die ADP/O-Ratio. Die RCR wird als Maß zur Kopplung des Elektronentransports über die Komplexe der inneren Mitochondrienmembran und der oxidativen Phosphorylierung berechnet. Die ADP/O-Ratio wird aus der verbrauchten Menge an Sauerstoff und der hinzugefügten Menge an ADP berechnet. Diese wird bestimmt, um die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung zu beurteilen.

Die verschiedenen Respirationsraten und Quotienten sind in der Abbildung 3 veranschaulicht.

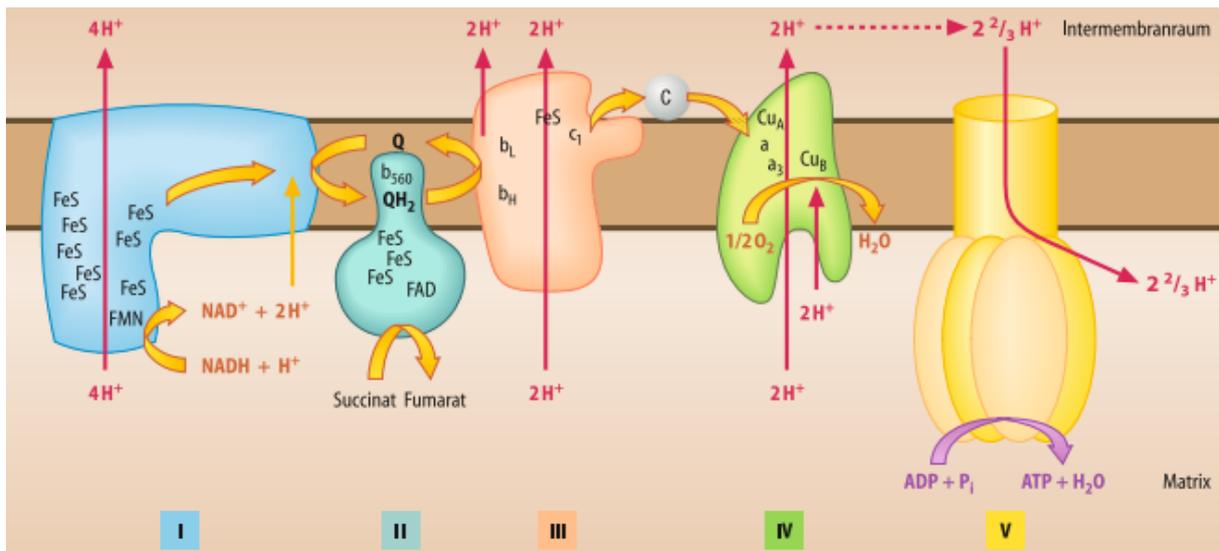
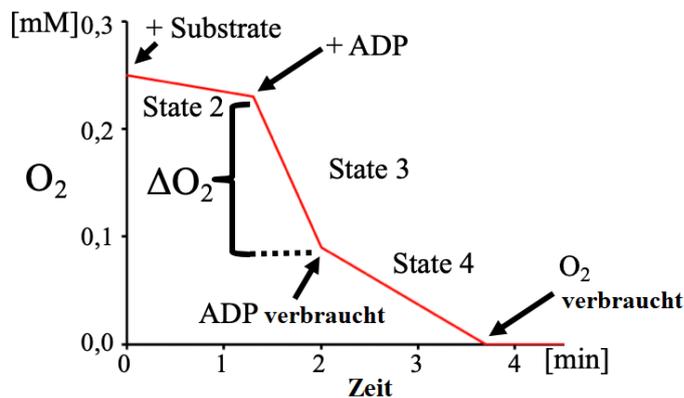


Abb. 2 Atmungskette des Mitochondriums



Berechnung der RCR:

$$RCR = \frac{\text{State 3}}{\text{State 2}}$$

Berechnung der ADP/O-Ratio:

$$ADP/O = \frac{\text{hinzugefügtes ADP}}{\Delta O_2}$$

Abb. 3 Respirationsraten und Berechnungen der RCR und der ADP/O-Ratio

2.7 Messung der ROS

2.7.1 Lipidperoxidation

Bei der Lipidperoxidation reagieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mit membranständigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) zu Lipidperoxiden. Die Reaktion findet in drei Stadien statt.

In der Initiationsreaktion reagieren endogen entstandene Radikale mit den PUFA zu Fettsäure-Radikalen ($L\cdot$). Diese reagieren mit molekularem Sauerstoff zu einem Lipid-Peroxidradikal ($LOO\cdot$).

Bei der Prolongationsreaktion reagieren die Lipid-Peroxidradikale unter Wasserstoffabstraktion einer weiteren PUFA zu einem Lipidperoxid ($LOOH$). Die in dieser Reaktion genutzte PUFA wird wiederum durch die Wasserstoffabstraktion zu einem Fettsäure-Radikal ($L\cdot$), was zu einer Kettenreaktion führt.

Während der Terminationsphase wird diese Kettenreaktion unterbrochen. Hierzu reagieren Fettsäure-Radikale und Lipid-Peroxidradikale entweder miteinander oder untereinander zu stabilen Nicht-Radikalen und stoppen die Prolongation⁸³.

2.7.2 Thiobarbitursäure-Test

Bei der Lipidperoxidation entstehen verschiedene Endprodukte. Malondialdehyd (MDA) ist eines dieser Endprodukte und kann photometrisch durch den Thiobarbitursäure-Test nachgewiesen werden⁸⁴. Durch den Nachweis von MDA wird somit indirekt der oxidative Stress innerhalb der jeweiligen Gewebeprobe bestimmt.

Hierfür wurde zunächst eine Standardreihe mit fünf verschiedenen Konzentrationen an MDA hergestellt. Zur Verdünnung wurde eine Kaliumchlorid-Lösung (1,15%) verwendet. Die Konzentrationen (nmol/ml) der Standardreihe betragen: 0, 2,5, 5, 10, 20.

Im Anschluss wurden die bei -80°C asservierten Gewebeproben in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dewargefäß zum Arbeitsplatz transportiert. Am Arbeitsplatz wurde ein etwa 50 mg schweres Gewebestück abgetrennt und abgewogen. Das abgetrennte Stück wurde in einem Reaktionsgefäß mit einer Kaliumchlorid-Lösung (1,15%) verdünnt ($V = \text{Gewebestück (mg)} \times 10 \mu\text{l}$) und eisgekühlt. Das restliche Colongewebe wurde wieder bei -80°C asserviert. Das Gemisch wurde mit einem Homogenisierstab (IKA[®]-Werke GmbH & CO. KG, Ultra-Turrax T8, Staufen, Deutschland) homogenisiert und eisgekühlt.

Anschließend wurden 250 μl des Homogenisats und der Standardreihe in jeweils ein konisches Zentrifugenröhrchen pipettiert. Es wurden jeweils 1,5 ml einer Phosphorsäure-Lösung (1%) und 500 μl einer Thiobarbitursäure-Lösung (0,6%) in jedes der Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden durchgemischt und 45 min bei

95°C inkubiert. Bei diesen Temperaturen und dem sauren Milieu bildet die Thiobarbitursäure Komplexe mit dem in der Probe enthaltenem MDA, die sowohl pigmentiert als auch fluoreszierend sind^{83,84}.

Nach der Inkubation wurden die Proben auf Raumtemperatur heruntergekühlt. In jede Probe wurden jeweils 2 ml Butanol pipettiert und 15 min lang bei 4°C und 2645 rpm zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation bilden sich in jeder Probe jeweils zwei Phasen. Die untere, rötlich gefärbte Phase wurden auf eine 96-Well-Platte pipettiert und mittels Doppelbestimmung photometrisch analysiert. Als Maß wurde die Differenz zwischen den gemessenen Extinktionen bei den zwei Wellenlängen 532 nm und 520 nm berechnet, da dieser Wellenlängenbereich repräsentativer für die Thiobarbitursäure-Reaktion ist als eine einzeln gemessene Extinktion⁸⁵. Die Differenz der Gewebeprobe wurde anschließend mit den Differenzen der Standardreihe verglichen, um die Konzentration an MDA zu bestimmen.

Um die Gewebeproben untereinander zu eichen, wurde parallel zum Thiobarbitursäure-Test die Proteinkonzentration des Homogenisats per Methode nach Lowry (s. 2.6.2) bestimmt.

2.8 Statistische Auswertung

Die Daten der einzelnen Versuchsgruppen wurden zunächst statistisch per Kolmogorov-Smirnov-Test auf eine Normalverteilung getestet. Bei nicht bestehender Normalverteilung wurden die Daten aller Versuchsgruppen mittels Kruskal-Wallis-Tests und Dunn's Test gegeneinander verglichen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt. Die folgende grafische Darstellung der Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism v6.01 angefertigt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Respirometrie

Nach einer Vorbehandlung mit dem Medikament Gemfibrozil wurde die mitochondriale Funktion des Colons unter septischen (CASP) und nicht-septischen Bedingungen (Sham) nach Stimulation der Komplexe I und II der Atmungskette respirometrisch analysiert. Hierzu wurden zwei verschiedene Dosierungen (30 mg/kg KG oder 100 mg/kg KG) an Gemfibrozil verwendet. Zusätzlich wurde der PPAR α Antagonist GW6471 entweder in Kombination oder

allein appliziert. Als Kontrolllösung dient die Trägersubstanz DMSO. Angesichts der Kombinationsmöglichkeiten der applizierbaren Substanzen ergaben sich folgende Versuchsgruppen innerhalb der CASP-/ und Sham-Gruppen: Kontrolle, Gemfi30, Gemfi100, Gemfi30 + GW6471, Gemfi100 + GW6471 und GW6471. Als Maß zur Beurteilung der mitochondrialen Funktion wurde die beiden Quotienten ADP/O-Ratio und RCR angegeben.

3.1.1 Ergebnisse der nicht-septischen Versuchsgruppen

Die beiden Quotienten ADP/O-Ratio und RCR der Sham-Versuchsgruppe sind in Abb. 4 grafisch durch einen Boxplot dargestellt. In den Tabellen 4-7 sind zusätzlich das 1. Quartil, der Median, das 3. Quartil und die Anzahl (n) der Versuchstiere der einzelnen Boxplots angegeben.

Die beiden Quotienten ADP/O-Ratio und RCR wiesen in der Sham-Versuchsgruppe keine signifikanten Unterschiede nach Vorbehandlung durch zwei unterschiedliche Dosierungen Gemfibrozils im Vergleich zur Kontrollgruppe und zwischen den Behandlungsgruppen auf (siehe *Abb. 4*). Auch die Gabe von Gemfibrozil in Kombination mit dem PPAR α Antagonisten GW6471 zeigte im Vergleich zur alleinigen Gabe des Gemfibrozils keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Quotienten ADP/O-Ratio und RCR innerhalb der Sham-Versuchsgruppe.

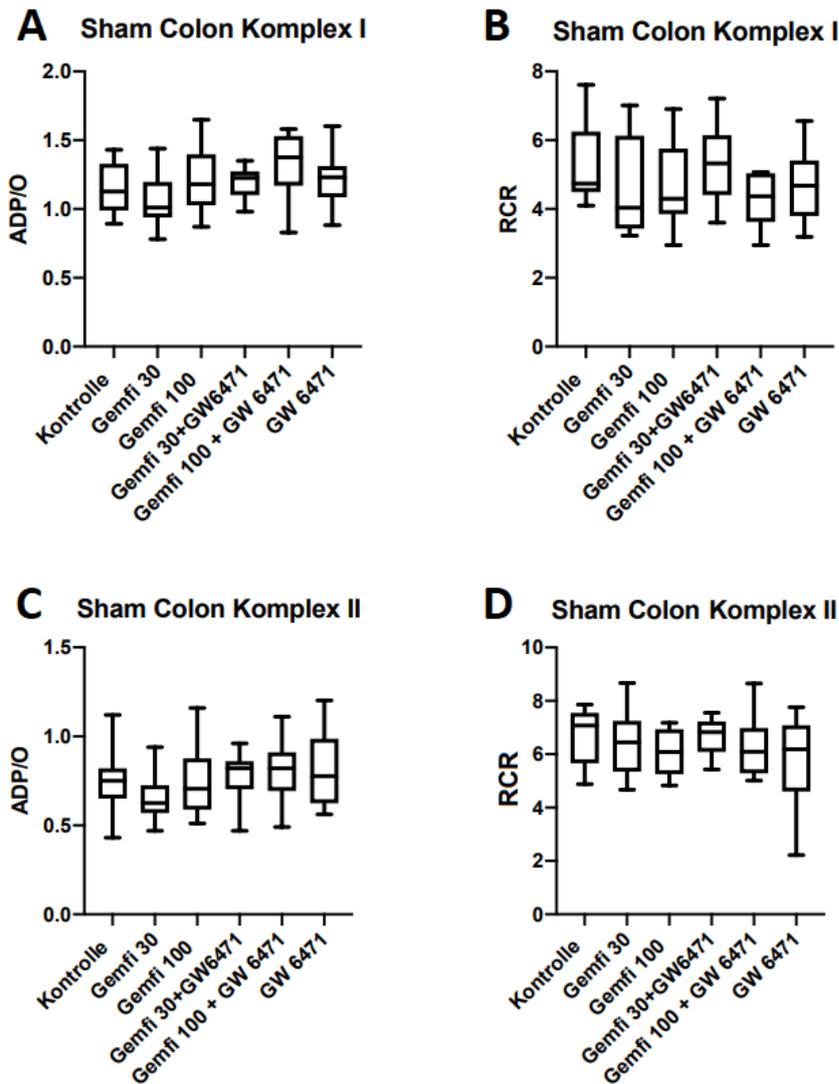


Abb. 4 Die mitochondriale Funktion – ADP/O-Ratio - und RCR der Sham-Gruppen

Die Effekte von Gemfibrozil (30 mg/kg KG und 100 mg/kg KG) auf die mitochondriale Funktion in Colonzellen nicht-septischer Ratten (Sham), mit und ohne Inhibition des PPAR α durch Gabe des PPAR α Antagonisten GW6471: ADP/O-Ratio für Komplex I (A) und für Komplex II (C), RCR für Komplex I (B) und Komplex II (D). Die Daten werden als median/min/max grafisch dargestellt, n =10.

Tabelle 4 Statistische Daten der ADP/O-Ratio der Sham-Versuchsgruppen nach Stimulation des Komplex I

Sham	1. Quartil	Median	3. Quartil	Anzahl (n)
Kontrolle	1,01	1,12	1,31	10
Gemfi 30	0,95	1,01	1,19	10
Gemfi 100	1,05	1,18	1,39	10
Gemfi 30 + GW 6471	1,11	1,23	1,27	10
Gemfi 100 + GW 6471	1,19	1,38	1,52	10
GW 6471	1,12	1,23	1,29	10

Table 5 Statistische Daten der ADP/O-Ratio der Sham-Versuchsgruppen nach Stimulation des Komplex II

Sham	1. Quartil	Median	3. Quartil	Anzahl (n)
Kontrolle	0,67	0,75	0,82	10
Gemfi 30	0,60	0,63	0,71	10
Gemfi 100	0,60	0,71	0,87	10
Gemfi 30 + GW 6471	0,72	0,82	0,85	10
Gemfi 100 + GW 6471	0,74	0,82	0,89	10
GW 6471	0,63	0,78	0,97	10

Table 6 Statistische Daten der RCR der Sham-Versuchsgruppen nach Stimulation des Komplex I

Sham	1. Quartil	Median	3. Quartil	Anzahl (n)
Kontrolle	4,55	4,74	6,11	10
Gemfi 30	3,44	4,04	5,94	10
Gemfi 100	3,88	4,30	5,67	10
Gemfi 30 + GW 6471	4,43	5,32	6,04	10
Gemfi 100 + GW 6471	3,65	4,37	5,03	10
GW 6471	3,90	4,68	5,40	10

Table 7 Statistische Daten der RCR der Sham-Versuchsgruppen nach Stimulation des Komplex II

Sham	1. Quartil	Median	3. Quartil	Anzahl (n)
Kontrolle	5,68	7,08	7,53	10
Gemfi 30	5,53	6,45	7,21	10
Gemfi 100	5,33	6,85	6,89	10
Gemfi 30 + GW 6471	6,15	6,82	7,18	10
Gemfi 100 + GW 6471	5,36	6,10	6,96	10
GW 6471	4,77	6,19	7,00	10

3.1.2 Ergebnisse der septischen Versuchsgruppen

Die beiden Quotienten ADP/O-Ratio und RCR der CASP-Versuchsgruppe sind in Abb. 5 grafisch durch einen Boxplot dargestellt. In den Tabellen 8-11 sind zusätzlich das 1. Quartil, der Median, das 3. Quartil und die Anzahl (n) der Versuchstiere der einzelnen Boxplots angegeben.

Auch in der CASP-Versuchsgruppe wiesen die beiden Quotienten ADP/O-Ratio und RCR keine signifikanten Unterschiede durch die Gabe von Gemfibrozil im Vergleich zur Kontrollgruppe und zwischen den Behandlungsgruppen auf (siehe Abb. 5). Zusätzlich zeigte auch die Gabe des Gemfibrozils in Kombination mit dem PPAR α Antagonisten GW6471 im

Vergleich zur alleinigen Gabe des Gemfibrozils keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Quotienten ADP/O-Ratio und RCR innerhalb der CASP-Versuchsgruppe.

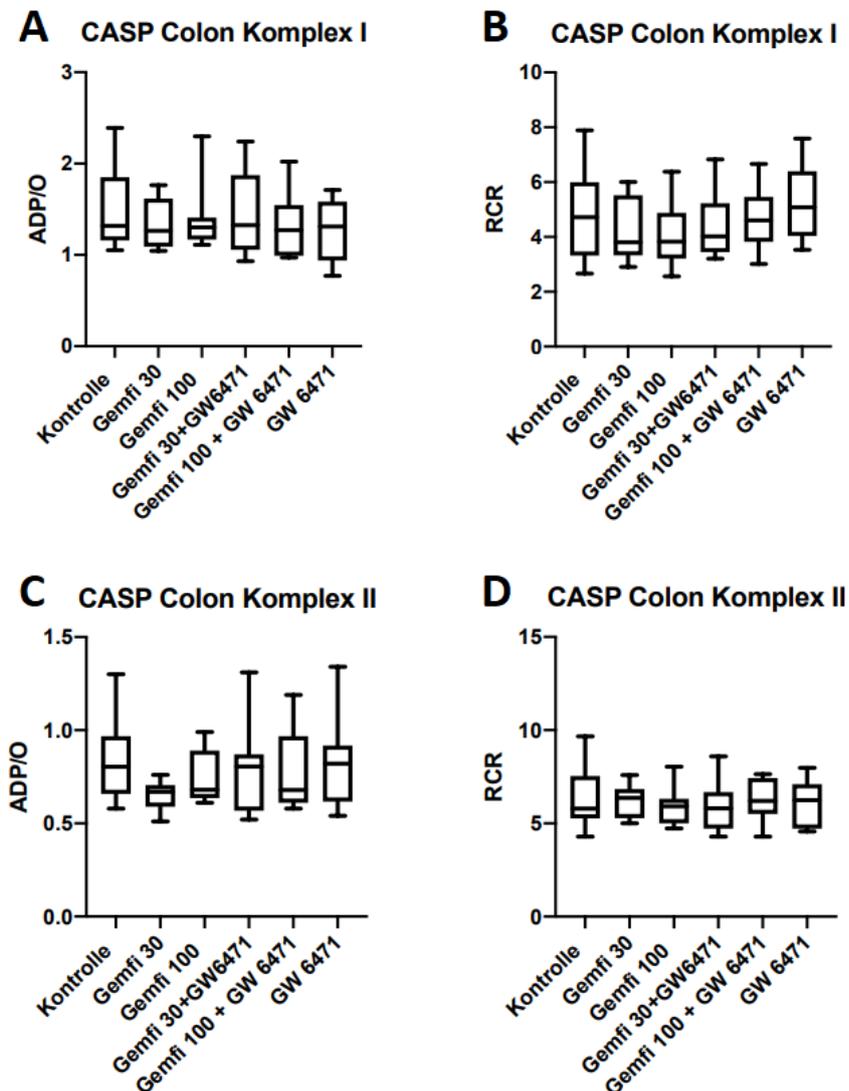


Abb. 5 Die mitochondriale Funktion – ADP/O-Ratio - und RCR der CASP-Gruppen

Die Effekte von Gemfibrozil (30 mg/kg KG und 100 mg/kg KG) auf die mitochondriale Funktion in Colonzellen septischer Ratten (CASP), mit und ohne Inhibition des PPAR α durch Gabe des PPAR α Antagonisten GW6471: ADP/O-Ratio für Komplex I (A) und für Komplex II (C), RCR für Komplex I (B) und Komplex II (D). Die Daten werden als median/min/max grafisch dargestellt, n = 10.

Tabelle 8 Statistische Daten der ADP/O-Ratio der CASP-Versuchsgruppen nach Stimulation des Komplex I

CASP	1. Quartil	Median	3. Quartil	Anzahl (n)
Kontrolle	1,18	1,33	1,82	10
Gemfi 30	1,10	1,26	1,61	10
Gemfi 100	1,19	1,30	1,55	10
Gemfi 30 + GW 6471	1,09	1,33	1,78	10
Gemfi 100 + GW 6471	0,99	1,27	1,51	10
GW 6471	0,95	1,31	1,58	10

Tabelle 9 Statistische Daten der ADP/O-Ratio der CASP-Versuchsgruppen nach Stimulation des Komplex II

CASP	1. Quartil	Median	3. Quartil	Anzahl (n)
Kontrolle	0,66	0,81	0,96	10
Gemfi 30	0,59	0,67	0,70	10
Gemfi 100	0,64	0,73	0,90	10
Gemfi 30 + GW 6471	0,57	0,81	0,87	10
Gemfi 100 + GW 6471	0,61	0,68	0,95	10
GW 6471	0,63	0,82	0,86	10

Tabelle 10 Statistische Daten der RCR der CASP-Versuchsgruppen nach Stimulation des Komplex I

CASP	1. Quartil	Median	3. Quartil	Anzahl (n)
Kontrolle	3,33	4,72	5,91	10
Gemfi 30	3,36	3,81	5,37	10
Gemfi 100	3,25	3,83	4,84	10
Gemfi 30 + GW 6471	3,52	4,02	5,14	10
Gemfi 100 + GW 6471	3,84	4,60	5,39	10
GW 6471	4,12	5,08	6,36	10

Tabelle 11 Statistische Daten der RCR der CASP-Versuchsgruppen nach Stimulation des Komplex II

CASP	1. Quartil	Median	3. Quartil	Anzahl (n)
Kontrolle	5,55	5,8	7,36	10
Gemfi 30	5,38	6,37	6,74	10
Gemfi 100	5,01	5,81	6,31	10
Gemfi 30 + GW 6471	4,79	5,81	6,59	10
Gemfi 100 + GW 6471	5,56	6,21	7,37	10
GW 6471	4,75	6,24	7,05	10

3.2 Ergebnisse der MDA-Messungen

Als Maß für den oxidativen Stress im Colongewebe wurde der MDA-Gehalt der einzelnen Proben indirekt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 grafisch dargestellt. In Tabelle 12 und 13 wurden zusätzlich das 1. Quartil, der Median, das 3. Quartil und die Anzahl (n) der Versuchstiere in den einzelnen Versuchsgruppen angegeben.

Weder in den Sham-/ noch in den CASP-Versuchsgruppen konnten signifikante Unterschiede bezüglich des MDA-Gehalts durch die Gabe von Gemfibrozil im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

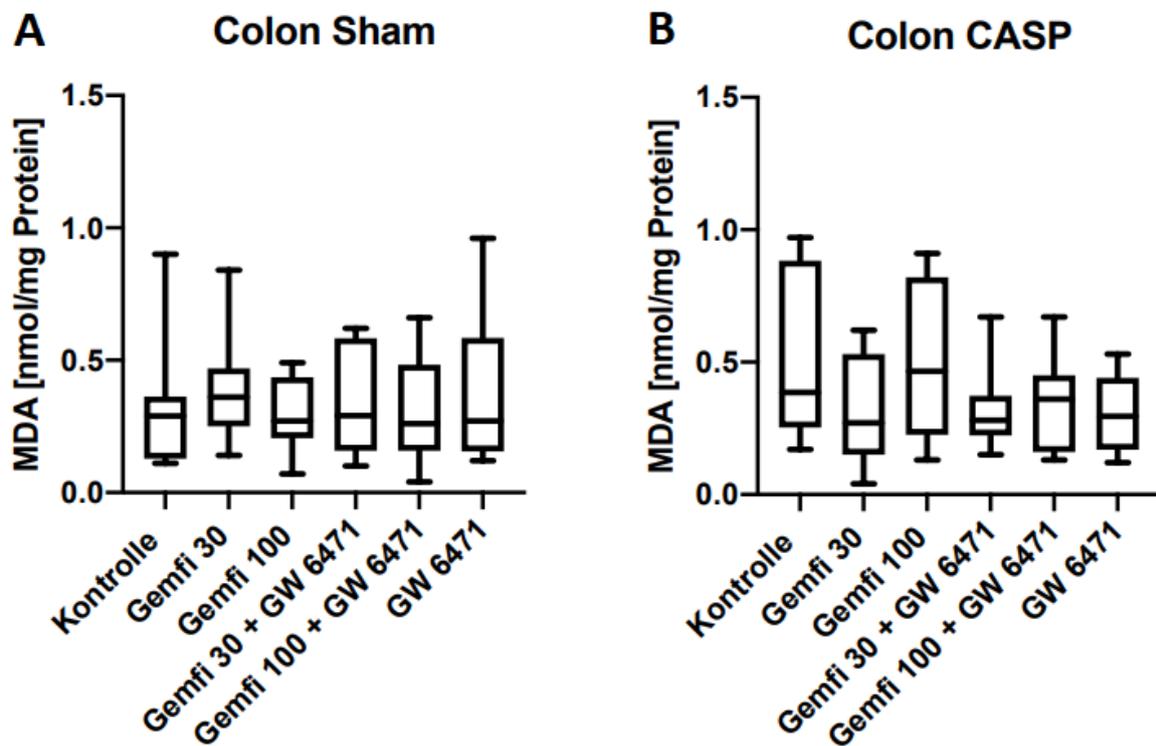


Abb.6 Der oxidative Stress – MDA-Konzentrationen der Sham-/ und CASP-Gruppen

Die MDA-Konzentrationen von Colonzellen septischer (CASP) (B) und nicht-septischer (Sham) (A) Ratten unter verschiedenen Gemfibrozil-Konzentrationen (30 mg/kg KG und 100 mg/kg KG) in Kombination mit dem PPAR α Antagonisten GW6471 zur indirekten Beurteilung des oxidativen Stresses. Die Daten werden als median/min/max grafisch dargestellt, n=9/10.

Table 12 Statistische Daten der MDA-Messungen der Sham-Versuchsgruppen

Sham	1. Quartil (nmol/mg Protein)	Median (nmol/mg Protein)	3. Quartil (nmol/mg Protein)	Anzahl (n)
Kontrolle	0,13	0,29	0,36	10
Gemfi 30	0,25	0,36	0,47	9
Gemfi 100	0,21	0,27	0,44	9
Gemfi 30 + GW 6471	0,17	0,29	0,58	10
Gemfi 100 + GW 6471	0,16	0,26	0,45	10
GW 6471	0,16	0,27	0,55	10

Table 13 Statistische Daten der MDA-Messungen der CASP-Versuchsgruppen

CASP	1. Quartil (nmol/mg Protein)	Median (nmol/mg Protein)	3. Quartil (nmol/mg Protein)	Anzahl (n)
Kontrolle	0,26	0,39	0,86	10
Gemfi 30	0,15	0,27	0,53	9
Gemfi 100	0,25	0,47	0,79	10
Gemfi 30 + GW 6471	0,24	0,28	0,34	10
Gemfi 100 + GW 6471	0,16	0,36	0,45	9
GW 6471	0,18	0,3	0,43	10

4 Diskussion

In dieser Studie wurde die mitochondriale Funktion unter septischen und nicht-septischen Bedingungen nach einer Vorbehandlung mit Gemfibrozil analysiert. Zusätzlich wurde ein möglicher Effekt über den PPAR α und die Menge an oxidativem Stress unter jenen Bedingungen untersucht.

4.1 Methodendiskussion

Um eine abdominelle Sepsis zu induzieren, wurde in dieser Studie die CASP-Methode gewählt. Hierbei wird operativ ein Stent in das *colon ascendens* implantiert, wodurch kontinuierlich Faeces in das Peritoneum austreten kann. Dies führt im Verlauf zu einer Peritonitis, einer systemischen Bakteriämie und einer systemischen Ausschüttung pro- und antiinflammatorischen Zytokine⁸⁶. Dies imitiert klinisch eine insuffiziente Anastomose des Gastrointestinaltraktes mit Austritt von Darminhalt in das Peritoneum⁸⁷. Neben dieser Methode zur Induktion einer Sepsis sind unter anderem das *cecal ligation and puncture* (CLP)-Modell und die Lipopolysaccharid (LPS)-Injektion weitere Verfahren.

Bei der CLP wird das Caecum proximal ligiert, anschließend ein-/ oder zweimalig punktiert und vorsichtig komprimiert, sodass kleine Stuhlreste austreten können⁸⁸. *Maier et al.*⁸⁸ zeigten, dass nach CLP im Vergleich zur CASP sowohl weniger Bakterien in der peritonealen Lavage als auch deutlich niedrigere Spiegel an pro- und antiinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden konnten. Durch CLP wird eher das klinische Bild eines intraabdominellen Abszesses hervorgerufen, wohingegen CASP eine diffuse Peritonitis mit resultierender Sepsis induziert⁸⁸.

Durch die LPS-Methode werden im Regelfall Lipopolysaccharide eines gramnegativen Bakteriums dem Versuchstier intraperitoneal oder intravenös injiziert, was eine systemische Endotoxiämie mit akuter inflammatorischer Reaktion zur Folge hat⁸⁹. Hier kann im zeitlichen Verlauf zunächst eine hohe Konzentration an proinflammatorischen Zytokine gemessen werden, die schnell wieder abfällt⁹⁰, während bei einer Sepsis beim Menschen der Zytokin-Spiegel viel später seinen Höhepunkt einreicht und dieser deutlich niedriger ausfällt⁹¹. Beim CASP-Modell steigt der Zytokin-Spiegel langsamer an hat später seinen Zenit^{86,92}, was der Kinetik einer menschlichen Sepsis eher ähnelt. Außerdem reagieren verschiedene Spezies unterschiedlich auf die Injektion von LPS. So sind z.B. Mäuse um ein Vielfaches resistenter als Menschen gegenüber einer LPS-Injektion⁹³. Dies würde zusätzlich eine Vergleichbarkeit zwischen den Spezies erschweren. Aus diesen Gründen wurde von der Methode der LPS-Injektion abgesehen. Auch internationale Experten kommen nach einer Analyse von 260 wissenschaftlichen Artikeln zu dem Entschluss, dass die LPS-Injektion kein geeignetes Sepsismodell darstellt⁹⁴.

Um die Mitochondrien auf ihre Funktion zu untersuchen, wurden in dieser Studie Homogenisate des Colongewebes synthetisiert. Neben dieser Methode können Mitochondrien auch durch bestimmte Verfahren vom restlichen Gewebe isoliert werden. Durch diesen Isolierungsprozess können Mitochondrien beschädigt werden. Somit können durch den Isolierungsprozess einzelne, weniger beschädigte Subpopulationen der Mitochondrien isoliert werden, welche die Ergebnisse der Mitochondrienfunktion verfälschen könnten⁹⁵. Durch die Verwendung von Colonomogenisaten konnte diese Selektion vermieden werden.

4.2 Ergebnisdiskussion

Nach Beendigung dieser Studie können nun die initial gestellten Fragestellungen wie folgt beantwortet werden:

- 1.) Es wurde keine Auswirkung auf die mitochondriale Funktion des Colons nach einer sterilen Laparotomie und im septischen Rattenmodell nach Gabe von Gemfibrozil festgestellt.
- 2.) Gemfibrozil hatte keine Auswirkung auf die Bildung von ROS und somit auf den oxidativen Stress im Colon unter nicht-septischer und septischer Bedingungen bei Ratten.
- 3.) Eine Wirkung von Gemfibrozil über den PPAR α konnte aufgrund von fehlenden Unterschieden innerhalb der Versuchsgruppen nicht analysiert werden.

4.2.1 Diskussion der mitochondrialen Funktion im Colon

Um die mitochondriale Funktion des Colons zu beurteilen, wurden die zwei Quotienten RCR und ADP/O-Ratio berechnet und als Parameter verwendet. Bezüglich dieser Parameter zeigten sich in dieser Studie zwischen vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Versuchstieren sowohl in der nicht-septischen (SHAM) als auch in der septischen (CASP) Versuchsgruppe keine Unterschiede.

Außerhalb einer Sepsis wurden die Auswirkungen von Fibraten auf die mitochondriale Funktion mehrfach^{77,78,80} untersucht. So zeigten *Zhou et al.*⁷⁸, dass die ADP/O-Ratio in Leberzellen der Ratte nach Gabe von Gemfibrozil und anderen Fibraten beeinträchtigt wird. Auch *Nadanavica et al.*⁷⁷ konnten nach Gabe von Fibraten eine Reduktion der Aktivität der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung von Leberzellen gesunder Ratten nachweisen. Außerdem konnte nach Gabe von Gemfibrozil in hoher Dosierung auch in einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe eine Reduktion der RCR und Verbesserung der ADP/O-Ratio in Leberzellen der Ratte festgestellt werden⁸⁰. In Colonzellen der Ratte wurde hingegen nach Gabe von Gemfibrozil in hoher Dosierung nur eine Verbesserung der ADP/O-Ratio ohne Beeinträchtigung der RCR nachgewiesen⁸⁰. Dies konnte in dieser Studie in der nicht-septischen (Sham) Versuchsgruppe nicht bestätigt werden. Ein Grund hierfür könnte der Zeitpunkt der Medikamenten-Applikation sein. Während in dieser Studie die Versuchstiere mit Gemfibrozil vorbehandelt wurden und die Organentnahme mit anschließender Analyse erst ca. 24 Stunden nach letzter Medikamentengabe stattfand, wurde sowohl bei *Zhou et al.*⁷⁸ als auch bei *Nadanavica et al.*⁷⁷ und *Herminghaus et al.*⁸⁰ die entnommene Leber oder das Colon präpariert, mit dem Medikament beimpft und analysiert. Dies könnte ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Ein weiterer Grund für abweichende Ergebnisse in unserer und den oben genannten Studien könnten unterschiedliche Medikamentenkonzentrationen sein. In dieser Studie wurden zwei verschiedene Dosierungen (30 mg/kg KG und 100 mg/kg KG) an Gemfibrozil zweimalig intraperitoneal in-vivo injiziert. In welcher Konzentration das intraperitoneal injizierte Medikament am Zielorgan akkumuliert, wurde nicht analysiert. *Zhou et al.*⁷⁸, *Nadanavica et al.*⁷⁷ und *Herminghaus et al.*⁸⁰ hingegen beimpften das Leber- oder Colonpräparat in vitro, wodurch eine definierte Medikamentenmenge am zu untersuchenden Zielorgan anfällt. Aus diesem Grund ist es möglich, dass in dieser Studie im Vergleich zu den genannten in-vitro-Studien eventuell eine geringere Menge an Medikament am Zielorgan ankommt und somit kein Effekt messbar ist.

Ein weiterer Grund für verschiedene Ergebnisse könnten die unterschiedlichen zu untersuchenden Zellen sein. Sowohl in Leberzellen⁷⁷⁻⁷⁹, Muskelzellen⁷⁹ von Ratten und anderen diversen menschlichen Tumorzellen^{74-76,96} konnte eine Verschlechterung der mitochondrialen Funktion nach Gabe eines Fibrats beobachtet werden. *Braissant et al.*⁹⁷ konnte nach immunhistochemischer Analyse von Gewebeproben der Ratte zeigen, dass die Expression an PPAR α in den Gewebeproben variiert. So hatten z.B. Zellen aus dem Magen, Duodenum, Jejunum und Ileum von Ratten eine hohe oder sehr hohe Expression an PPAR α , wohingegen bei Colonzellen nur eine schwache Expression jener nachgewiesen wurde. Die Expression an PPAR α in den Leberzellen variierte hingegen stark⁹⁷. Somit könnte auch die Auswirkung der Fibrate auf die mitochondriale Funktion in verschiedenen Zellarten aufgrund der unterschiedlichen Expression an PPAR α nicht gleich sein, wodurch es zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen könnte. So könnte die nur schwache Expression an PPAR α in Colonzellen dazu führen, dass Gemfibrozil an Colonzellen keinen Effekt haben könnte. Das könnte die ausbleibende Wirkung nach Vorbehandlung mit Gemfibrozil in dieser Studie erklären. Weiterhin ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von Leber-/Muskel-/ oder Tumorzellen auf die hier verwendeten Colonzellen in Hinblick auf deren genereller Varianz der mitochondrialen Funktion stark erschwert. Wie *Jeger at al.*⁴⁰ schon schlussfolgerten, ist die mitochondriale Funktion während der Sepsis sehr variabel und organspezifisch.

Andererseits ist es für eine Zelle möglich, die Expression an verschiedenen Rezeptoren je nach Rahmenbedingung zu verändern. Somit könnte sich gegebenenfalls die Expression an PPAR α innerhalb der Zellen je nach Ausgangsbedingung z.B. Sepsis oder Vorbehandlung mit Gemfibrozil verändern. *Lv et al.*⁹⁸ zeigten beispielsweise, dass sich die Expression des PPAR α von Herzgewebe von Mäusen unter verschiedenen Bedingungen verändert. Die Expression an

PPAR α blieb nach 14-tägiger Vorbehandlung mit Fenofibrat im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Weiterhin konnte 48 Stunden nach einer durchgeführten CLP im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erniedrigte Expression an PPAR α festgestellt werden. Eine weitere Versuchsgruppe, die sowohl eine 14-tägige Vorbehandlung mit Fenofibrat als auch eine CLP erhielten, wiesen eine erhöhte Expression an PPAR α im Vergleich zur Versuchsgruppe mit ausschließlicher CLP auf. Die Vergleichbarkeit zwischen Herzgewebe von Mäusen und Colongewebe von Ratten ist stark erschwert. Überträgt man jedoch die Ergebnisse von *Lv et al.*⁹⁸ auf diese Studie, könnte allein die Vorbehandlung mit Gemfibrozil auch auf Colonzellen der Ratte keine Auswirkung auf die Expression des PPAR α haben. Folglich wäre die durch *Braissant et al.*⁹⁷ beschriebene schwache Expression des PPAR α in Colonzellen möglicherweise durch die Vorbehandlung mit Gemfibrozil unverändert und führe zu keiner Steigerung der Expression. Dies bekräftige die These, dass die schwache Expression an PPAR α in Colonzellen eventuell zu den in dieser Studie beobachteten Ergebnissen führte. Wie sich die Expression an PPAR α in Colonzellen unter den hier verwendeten Rahmenbedingungen verhält, ist spekulativ.

4.2.2 Diskussion des oxidativen Stresses

Um den oxidativen Stress des Colons zu beurteilen, wurde der MDA-Gehalt innerhalb der Zellen gemessen. Der gemessene MDA-Gehalt zeigte in dieser Studie zwischen vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Versuchstieren sowohl in der nicht-septischer (SHAM) als auch in der septischen (CASP) Versuchsgruppe keine Unterschiede.

Der Effekt auf den oxidativen Stress in verschiedenen Zellen durch die Gabe von Fibraten wurde in einigen Studien unter nicht-septischen Bedingungen analysiert. *Deplanque et al.*⁶⁷ konnten nach 14-tägiger Vorbehandlung mit Fenofibrat eine Reduktion des oxidativen Stresses in Cortezzellen von Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen nachweisen.

*Galhotra et al.*⁶⁸ induzierten medikamentös eine pulmonale Hypertension in Ratten und maßen unter anderem den oxidativen Stress im Lungengewebe. Unter einer 25-tägigen Vorbehandlung mit Fenofibrat konnte im Lungengewebe auch eine Reduktion des oxidativen Stresses nachgewiesen werden. Dies konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Ein Grund hierfür könnte die Dauer der Vorbehandlung darstellen. Die Versuchstiere in den oben genannten Studien erhielten das Fibrat über mehrere Wochen, hingegen wurde das Fibrat in dieser Studie jeweils nur 48 h und 24 h vor Organanalyse injiziert. Die deutlich längere

Medikamentenvorbehandlung könnte somit zu einem stärkeren und messbaren Effekt in den genannten Studien geführt haben. Zusätzlich könnten auch die zugrunde liegenden Krankheitsbilder einen gewissen Einfluss auf die ROS-Produktion gehabt haben.

Andererseits konnten *Kar et al.*⁶⁹ an kultivierten, hypertrophen Kardiomyozyten der Ratte immunhistologisch eine Reduktion des oxidativen Stresses nach einmaliger in-vitro Vorbehandlung mit Fenofibrat 24 h vor Analyse nachweisen. Diese Vorbehandlungszeit ähnelt eher dem in dieser Studie verwendeten Studiendesign. *Kar et al.*⁶⁹ verabreichten das Medikament jedoch in-vitro, wohingegen wir dies in-vivo verabreichten. *Kar et al.*⁶⁹ konnten somit eine definierte Medikamentenmenge auf das zu untersuchende Zielorgan beimpfen. Wie hoch jedoch die Konzentration an Gemfibrozil im Colon nach intraperitonealer in-vivo Injektion des Medikaments ist, wurde nicht gemessen und ist spekulativ. Schlussfolgernd könnte es zu einer höheren und wirksameren Konzentration des Medikaments in den in-vitro beimpften Kardiomyozyten im Vergleich zu den in dieser Studie verwendeten Colonzellen gekommen sein. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse darstellen.

Wie sich der oxidative Stress während einer Sepsis verändert, konnten verschiedene Tierexperimente zeigen. *Ritter et al.*⁹⁹ konnte im zeitlichen Verlauf von 60 Stunden nach Durchführung einer CLP vermehrten oxidativen Stress in Lungen-, Leber-, Nieren-, Herz- und Zwerchfellgewebe von Ratten nachweisen. Auch Cortex-, Hippocampus- und Kleinhirngewebe von Ratten wies nach 6 h einen erhöhten oxidativen Stress auf¹⁰⁰. In einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte sich nach 24 h und 96 h nach Induktion einer Sepsis signifikant vermehrter oxidativer Stress im Lebergewebe von Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe⁴². Im Colongewebe der Ratte hingegen blieb dies im zeitlichen Verlauf von 96 h nach Induktion einer Sepsis im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert⁴². Fibrate wurden in den oben genannten Studien nicht verwendet.

Es stellt sich die Frage, wie sich der oxidative Stress unter septischen Bedingungen in Kombination mit der Gabe eines Fibrats verhält. *Lv et al.*⁹⁸ konnte einen verringerten ROS-Serumspiegel in Mäusen nach Durchführung einer CLP und 14-tägiger Vorbehandlung mit Fenofibrat im Vergleich zu einer Versuchsgruppe, die ausschließlich eine CLP erhielt, nachweisen. Eine Analyse des oxidativen Stresses innerhalb von Colonzellen oder auch anderen Zellarten unter septischen Bedingungen nach Gabe von Fibraten wurde noch nicht durchgeführt. Vergleichbare Studien sind somit nicht vorhanden und erschweren eine Diskussion.

Eine mögliche Ursache für die fehlenden Unterschiede in den verschiedenen Versuchsgruppen könnte die Tatsache sein, dass auch die in dieser Studie durchgeführten Messung der mitochondrialen Funktion zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede erbrachte. Das Mitochondrium ist der Hauptproduzent von ROS innerhalb der Zelle¹⁰¹. Insbesondere während der im Mitochondrium stattfindenden Atmungskette wird größtenteils ROS produziert¹⁰¹. In dieser Studie konnten wir zeigen, dass die mitochondriale Funktion – gemessen nach Stimulation der Komplexe I und II der Atmungskette – weder in der nicht-septischen als auch septischen Versuchsgruppe nach Vorbehandlung mit Gemfibrozil im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen Unterschied aufwies. Bei gleichbleibender mitochondrialer Funktion ist auch eine gleichbleibende ROS-Produktion innerhalb der Zelle zu erwarten und erkläre die hier gemessenen Ergebnisse.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Es konnten in Colonzellen der Ratte weder unter nicht-septischen noch septischen Bedingungen Unterschiede in der mitochondrialen Funktion oder dem oxidativen Stress nach Vorbehandlung mit Gemfibrozil nachgewiesen werden. Ein möglicher Erklärungsansatz der Ergebnisse könnte die gegebenenfalls schwache Dichte der PPAR α innerhalb des Colongewebes der Ratte darstellen. Um diese These zu untermauern, benötigt es jedoch weitere Untersuchungen. Mögliche Fragestellungen für neue folgende Studien könnten wie folgt lauten:

1. Wie verhält sich die Expression an PPAR α in Colonzellen der Ratte unter Vorbehandlung eines Fibrats?
2. Wie verhält sich die Expression an PPAR α in Colonzellen der Ratte unter septischen Bedingungen?
3. Wie verhält sich die Expression an PPAR α in Colonzellen der Ratte in Kombination aus einer Vorbehandlung eines Fibrats und septischen Rahmenbedingungen?
4. Wie verhält sich die Expression an PPAR α in anderen Zellarten (z.B. Leberzellen) unter den oben genannten Rahmenbedingungen?

Weitere folgende Studien könnten sich auch mit dem Zeitpunkt der Medikamentenapplikation unter septischen Bedingungen befassen. Die Sepsis ist ein akut auftretendes Krankheitsbild, das einen schnell progressiven Krankheitsverlauf aufweist. Unter klinischen Bedingungen ist

eine Vorbehandlung des Patienten bei akut auftretender Sepsis nicht möglich. Eine spannende Fragestellung wäre es somit, welche Auswirkungen Gemfibrozil auf die mitochondriale Funktion und oxidativen Stress hat, nachdem es erst nach Induktion einer Sepsis verabreicht wird.

Generell können tierexperimentelle Studien nur erschwert auf die klinische Situation des Menschen angewendet werden. Überträgt man jedoch die hier tierexperimentell ausgewerteten Ergebnisse auf die klinische Situation, könnte es bedeuten, dass Gemfibrozil auch im Colon des Menschen keinen Effekt erzielen könnte. Ein Vorteil auf die mitochondriale Funktion und den oxidativen Stress im Colon des Menschen während einer Sepsis durch die Gabe eines Fibrats ist schlussfolgernd nicht zu erwarten. Die Sepsis ist jedoch ein komplexes Krankheitsbild, das in seiner Gänze noch nicht verstanden ist. Inwieweit während einer Sepsis eine Veränderung der mitochondrialen Funktion oder des oxidativen Stresses innerhalb der Colonzellen des Menschen Auswirkungen auf das letztendlich entscheidende Outcome des Patienten hat, ist fraglich.

6 Literaturverzeichnis

1. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801 (2016).
2. Innocenti, F. *et al.* SOFA score in septic patients: incremental prognostic value over age, comorbidities, and parameters of sepsis severity. *Intern. Emerg. Med.* (2017) doi:10.1007/s11739-017-1629-5.
3. Fleischmann, C. *et al.* Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis: An Analysis of Hospital Episode (DRG) Statistics in Germany From 2007 to 2013. *Dtsch. Arzteblatt Online* (2016) doi:10.3238/arztebl.2016.0159.
4. Fleischmann-Struzek, C. *et al.* Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive Care Med.* **44**, 1826–1835 (2018).
5. Fleischmann, C. *et al.* Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 259–272 (2016).
6. Torio, C. M. & Moore, B. J. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2013: Statistical Brief #204. in *Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs* (Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville (MD), 2006).
7. Reinhart, K. *et al.* Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. *N. Engl. J. Med.* **377**, 414–417 (2017).
8. Huang, M., Cai, S. & Su, J. The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5376 (2019).
9. Reinhart, K., Bauer, M., Riedemann, N. C. & Hartog, C. S. New Approaches to Sepsis: Molecular Diagnostics and Biomarkers. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 609–634 (2012).
10. Chousterman, B. G., Swirski, F. K. & Weber, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin. Immunopathol.* **39**, 517–528 (2017).

11. Ward, N. S., Casserly, B. & Ayala, A. The Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS) in Critically Ill Patients. *Clin. Chest Med.* **29**, 617–625 (2008).
12. Lipińska-Gediga, M. Sepsis and septic shock — is a microcirculation a main player? **48**, 5 (2016).
13. Spronk, P. E., Zandstra, D. F. & Ince, C. [No title found]. *Crit. Care* **8**, 462 (2004).
14. De Backer, D., Creteur, J., Preiser, J.-C., Dubois, M.-J. & Vincent, J.-L. Microvascular Blood Flow Is Altered in Patients with Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **166**, 98–104 (2002).
15. Sakr, Y., Dubois, M.-J., De Backer, D., Creteur, J. & Vincent, J.-L. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock*: *Crit. Care Med.* **32**, 1825–1831 (2004).
16. De Backer, D. *et al.* Microcirculatory Alterations in Patients With Severe Sepsis: Impact of Time of Assessment and Relationship With Outcome*. *Crit. Care Med.* **41**, 791–799 (2013).
17. Mantzaris, K., Tsolaki, V. & Zakyntinos, E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 1–10 (2017).
18. Singer, M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence* **5**, 66–72 (2014).
19. Ward, P. A. New approaches to the study of sepsis. *EMBO Mol. Med.* **4**, 1234–1243 (2012).
20. Poljsak, B., Šuput, D. & Milisav, I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 1–11 (2013).
21. Santos, S. S. *et al.* Generation of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species by Neutrophils and Monocytes From Septic Patients and Association With Outcomes: *Shock* **38**, 18–23 (2012).
22. Carré, J. E. *et al.* Survival in Critical Illness Is Associated with Early Activation of Mitochondrial Biogenesis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 745–751 (2010).
23. Brealey, D. *et al.* Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet* **360**, 219–223 (2002).
24. Lawrence, K. L. *et al.* CD4+ lymphocyte adenosine triphosphate determination in sepsis: a cohort study. *Crit. Care* **14**, R110 (2010).

25. Zhou, F. *et al.* Ethyl pyruvate protects against sepsis by regulating energy metabolism. *Ther. Clin. Risk Manag.* **287** (2016) doi:10.2147/TCRM.S97989.
26. Carchman, E. H., Rao, J., Loughran, P. A., Rosengart, M. R. & Zuckerbraun, B. S. Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against hepatocyte cell death and hepatic injury from infection/sepsis in mice. *Hepatology* **53**, 2053–2062 (2011).
27. Regueira, T. *et al.* Oxygen transport and mitochondrial function in porcine septic shock, cardiogenic shock, and hypoxaemia: Comparison of septic, cardiogenic, and hypoxic shock. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **56**, 846–859 (2012).
28. Latta, M., Künstle, G., Leist, M. & Wendel, A. Metabolic Depletion of Atp by Fructose Inversely Controls Cd95- and Tumor Necrosis Factor Receptor 1–Mediated Hepatic Apoptosis. *J. Exp. Med.* **191**, 1975–1986 (2000).
29. Kozlov, A. V., Lancaster, J. R., Meszaros, A. T. & Weidinger, A. Mitochondria-mediated pathways of organ failure upon inflammation. *Redox Biol.* **13**, 170–181 (2017).
30. Brealey, D. *et al.* Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**, R491–R497 (2004).
31. Lowes, D. A., Webster, N. R., Murphy, M. P. & Galley, H. F. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br. J. Anaesth.* **110**, 472–480 (2013).
32. Mayorov, V. *et al.* Targeting of reactive isolevuglandins in mitochondrial dysfunction and inflammation. *Redox Biol.* **26**, 101300 (2019).
33. Sjövall, F. *et al.* Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Crit. Care* **14**, R214 (2010).
34. Sjövall, F., Morota, S., Persson, J., Hansson, M. J. & Elmér, E. Patients with sepsis exhibit increased mitochondrial respiratory capacity in peripheral blood immune cells. *Crit. Care* **17**, R152 (2013).

35. Taylor, D. E., Kantrow, S. P. & Piantadosi, C. A. Mitochondrial respiration after sepsis and prolonged hypoxia. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **275**, L139–L144 (1998).
36. Kozlov, A. V. *et al.* Opposite effects of endotoxin on mitochondrial and endoplasmic reticulum functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 91–96 (2007).
37. Geller, E. R., Jankauskas, S. & Kirkpatrick, J. Mitochondrial death in sepsis: A failed concept. *J. Surg. Res.* **40**, 514–517 (1986).
38. Mittal, A. *et al.* Early organ-specific mitochondrial dysfunction of jejunum and lung found in rats with experimental acute pancreatitis. *HPB* **13**, 332–341 (2011).
39. Taylor, D. E., Ghio, A. J. & Piantadosi, C. A. Reactive oxygen species produced by liver mitochondria of rats in sepsis. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 70–76 (1995).
40. Jeger, V., Djafarzadeh, S., Jakob, S. M. & Takala, J. Mitochondrial function in sepsis. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 532–542 (2013).
41. Trumbeckaite, S. *et al.* Experimental acute pancreatitis induces mitochondrial dysfunction in rat pancreas, kidney and lungs but not in liver. *Pancreatology* **13**, 216–224 (2013).
42. Herminghaus, A. *et al.* Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Med. Exp.* **7**, 4 (2019).
43. Herminghaus, A. *et al.* Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver. *Mitochondrion* **24**, 122–128 (2015).
44. Li, P. A., Hou, X. & Hao, S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration: Mitobiogenesis in Neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* **95**, 2025–2029 (2017).
45. Islam, H., Edgett, B. A. & Gurd, B. J. Coordination of mitochondrial biogenesis by PGC-1 α in human skeletal muscle: A re-evaluation. *Metabolism.* **79**, 42–51 (2018).
46. Niu, Z., Tang, J., Ren, Y. & Feng, W. Ropivacaine impairs mitochondrial biogenesis by reducing PGC-1 α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **504**, 513–518 (2018).
47. MacGarvey, N. C. *et al.* Activation of Mitochondrial Biogenesis by Heme Oxygenase-1-mediated NF-E2-related Factor-2 Induction Rescues Mice from Lethal *Staphylococcus aureus* Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 851–861 (2012).

48. Yu, P. & Martin, C. M. Increased gut permeability and bacterial translocation in *Pseudomonas* pneumonia-induced sepsis: *Crit. Care Med.* **28**, 2573–2577 (2000).
49. Khailova, L., Baird, C. H., Rush, A. A., Barnes, C. & Wischmeyer, P. E. Lactobacillus rhamnosus GG treatment improves intestinal permeability and modulates inflammatory response and homeostasis of spleen and colon in experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Clin. Nutr.* **36**, 1549–1557 (2017).
50. Bonanno, F. G. Clinical pathology of the shock syndromes. *J. Emerg. Trauma Shock* **4**, 233–243 (2011).
51. Grygiel-Górniak, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications - a review. *Nutr. J.* **13**, 17 (2014).
52. Staels, B. *et al.* Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation* **98**, 2088–2093 (1998).
53. Heller, F. & Harvengt, C. Effects of clofibrate, bezafibrate, fenofibrate and probucol on plasma lipolytic enzymes in normolipaemic subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **25**, 57–63 (1983).
54. Kersten, S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* **103**, 1489–1498 (1999).
55. Rakhshandehroo, M. *et al.* Comprehensive analysis of PPARalpha-dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling. *PPAR Res.* **2007**, 26839 (2007).
56. Wu, P., Peters, J. M. & Harris, R. A. Adaptive Increase in Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 during Starvation Is Mediated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 391–396 (2001).
57. Kersten, S. *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates amino acid metabolism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **15**, 1971–1978 (2001).
58. Cariello, N. F. *et al.* Gene Expression Profiling of the PPAR-alpha Agonist Ciprofibrate in the *Cynomolgus* Monkey Liver. *Toxicol. Sci.* **88**, 250–264 (2005).

59. Masuda, Y. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonists repress expression of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor by decreasing transcript stability. *Thromb. Haemost.* **108**, 74–85 (2012).
60. Gervois, P. *et al.* Negative regulation of human fibrinogen gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor α agonists via inhibition of CCAAT box/enhancer-binding protein beta. *J. Biol. Chem.* **276**, 33471–33477 (2001).
61. Jeanpierre, E. *et al.* Beneficial effects of fenofibrate on plaque thrombogenicity and plaque stability in atherosclerotic rabbits. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* **18**, 140–147 (2009).
62. Xin, R. *et al.* Fenofibrate improves vascular endothelial function in diabetic mice. *Biomed. Pharmacother.* **112**, 108722 (2019).
63. Wiel, E. *et al.* Pretreatment with peroxysome proliferator-activated receptor α agonist fenofibrate protects endothelium in rabbit Escherichia coli endotoxin-induced shock. *Intensive Care Med.* **31**, 1269–1279 (2005).
64. Poynter, M. E. & Daynes, R. A. Peroxisome proliferator-activated receptor α activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor- κ B signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J. Biol. Chem.* **273**, 32833–32841 (1998).
65. Cámara-Lemarrroy, C. R. *et al.* Gemfibrozil attenuates the inflammatory response and protects rats from abdominal sepsis. *Exp. Ther. Med.* **9**, 1018–1022 (2015).
66. Delerive, P. *et al.* Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Negatively Regulates the Vascular Inflammatory Gene Response by Negative Cross-talk with Transcription Factors NF- κ B and AP-1. **8**.
67. Deplanque, D. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 6264–6271 (2003).
68. Galhotra, P. *et al.* Beneficial effects of fenofibrate in pulmonary hypertension in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **449**, 185–194 (2018).

69. Kar, D. & Bandyopadhyay, A. Targeting Peroxisome Proliferator Activated Receptor α (PPAR α) for the Prevention of Mitochondrial Impairment and Hypertrophy in Cardiomyocytes. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **49**, 245–259 (2018).
70. Komen, J. C. & Thorburn, D. R. Turn up the power - pharmacological activation of mitochondrial biogenesis in mouse models: Boosting mitochondrial biogenesis as therapy. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 1818–1836 (2014).
71. da Rosa-Junior, N. T. *et al.* Bezafibrate In Vivo Administration Prevents 3-Methylglutaric Acid-Induced Impairment of Redox Status, Mitochondrial Biogenesis, and Neural Injury in Brain of Developing Rats. *Neurotox. Res.* **35**, 809–822 (2019).
72. Augustyniak, J. *et al.* Bezafibrate Upregulates Mitochondrial Biogenesis and Influence Neural Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol. Neurobiol.* **56**, 4346–4363 (2019).
73. Miglio, G. *et al.* Protective effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on human podocytes: proposed mechanisms of action: PPAR agonists protect human podocytes. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 641–653 (2012).
74. Scatena, R. *et al.* Mitochondria, ciglitazone and liver: A neglected interaction in biochemical pharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* **567**, 50–58 (2007).
75. Scatena, R. *et al.* Bezafibrate Induces a Mitochondrial Derangement in Human Cell Lines: A PPAR-Independent Mechanism for a Peroxisome Proliferator. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 1440–1447 (2003).
76. Scatena, R. *et al.* Mitochondrial respiratory chain dysfunction, a non-receptor-mediated effect of synthetic PPAR-ligands: biochemical and pharmacological implications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 967–973 (2004).
77. Nadanaciva, S., Dykens, J. A., Bernal, A., Capaldi, R. A. & Will, Y. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **223**, 277–287 (2007).
78. Zhou, S. & Wallace, K. B. The effect of peroxisome proliferators on mitochondrial bioenergetics. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **48**, 82–89 (1999).

79. Brunmair, B. *et al.* Fenofibrate impairs rat mitochondrial function by inhibition of respiratory complex I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 109–114 (2004).
80. Herminghaus, A. *et al.* Pravastatin and Gemfibrozil Modulate Differently Hepatic and Colonic Mitochondrial Respiration in Tissue Homogenates from Healthy Rats. *Cells* **8**, 983 (2019).
81. Zhang, L. *et al.* Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP) Induces Excessive Inflammation and Systemic Metabolic Dysfunction in a Septic Rat Model. *J. Proteome Res.* **17**, 680–688 (2018).
82. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
83. Girotti, A. W. Mechanisms of lipid peroxidation. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**, 87–95 (1985).
84. Janero, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 515–540 (1990).
85. Mihara, M. & Uchiyama, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **86**, 271–278 (1978).
86. Traeger, T. *et al.* Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J. Vis. Exp. JoVE* 2299 (2010) doi:10.3791/2299.
87. Herminghaus, A. & Picker, O. Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP). *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2321**, 9–15 (2021).
88. Maier, S. *et al.* Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock Augusta Ga* **21**, 505–511 (2004).
89. Dickson, K. & Lehmann, C. Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E4341 (2019).
90. Remick, D. G., Newcomb, D. E., Bolgos, G. L. & Call, D. R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock Augusta Ga* **13**, 110–116 (2000).
91. Rittirsch, D., Hoesel, L. M. & Ward, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 137–143 (2007).

92. Sato, Y. *et al.* Functional lateralization of speech processing in adults and children who stutter. *Front. Psychol.* **2**, 70 (2011).
93. Fink, M. P. Animal models of sepsis. *Virulence* **5**, 143–153 (2014).
94. Libert, C. *et al.* Part II: Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies (MQTiPSS) for Types of Infections and Organ Dysfunction Endpoints. *Shock Augusta Ga* **51**, 23–32 (2019).
95. Azevedo, L. C. P. Mitochondrial dysfunction during sepsis. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* **10**, 214–223 (2010).
96. Bottoni, P. *et al.* Mitochondrial Respiratory Complexes as Targets of Drugs: The PPAR Agonist Example. *Cells* **11**, 1169 (2022).
97. Braissant, O., Foufelle, F., Scotto, C., Dauça, M. & Wahli, W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* **137**, 354–366 (1996).
98. Lv, M., Xie, D. & Long, X. The effect of fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor α agonist, on cardiac damage from sepsis in BALB/c mice. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* **67**, 260–266 (2022).
99. Ritter, C. *et al.* Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med.* **29**, 1782–1789 (2003).
100. Barichello, T. *et al.* Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation: *Crit. Care Med.* **34**, 886–889 (2006).
101. Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X. & Soldati, T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol.* **6**, 472–485 (2015).

7 Anhang

Tabelle 3 Sepsis Rat Severity Score

Untersuchungsbogen

Experiment: _____ OP Datum: _____

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

Klinische Untersuchung:

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

Tabelle 14 Zusammensetzung des Isolationspuffers A

Chemikalie	Konzentration
C ₆ H ₁₄ O ₆	200mM
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	50mM
KH ₂ PO ₄	5mM

3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	5mM
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	1mM
BSA	0.1%
KOH	Einstellen des pH auf 7.15
Verdünnungsmittel	Destilliertes Wasser

Table 15 Zusammensetzung des Isolationspuffers B

Chemikalie	Konzentration
C ₆ H ₁₄ O ₆	200mM
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	50mM
KH ₂ PO ₄	5mM
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	5mM
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	1mM
BSA	2%
KOH	Einstellen des pH auf 7.15
Verdünnungsmittel	Destilliertes Wasser

Table 16 Zusammensetzung der Lowry-Lösungen 1&2

Lowry-Lösung 1: Hergestellt durch die folgenden drei Reagenzien A, B, C in einem Verhältnis von A:B:C= 1:1:1000	
Reagenz A	0.1M NaOH, 0.047M Na ₂ CO ₃ In destilliertem Wasser gelöst
Reagenz B	0.095mol/l C ₄ H ₄ KNaOH ₆ In destilliertem Wasser gelöst
Reagenz C	0.08mol/l CuSO ₄ *5H ₂ O In destilliertem Wasser gelöst
Lowry-Lösung 2: Hergestellt durch die folgenden zwei Reagenzien A, B in einem Verhältnis von A:B=1:1	
Reagenz A	Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz, Aldrich Sigma
Reagenz B	Destilliertes Wasser

Table 17 Zusammensetzung des Respirationspuffers

Chemikalie	Konzentration
KCl	130mM
KH ₂ PO ₄	5mM
MOPS	20mM
EGTA	2.5mM
Na ₄ P ₂ O ₇	1µM
BSA	0.1%
KOH	Einstellen des pH auf 7.4
Verdünnungsmittel	Destilliertes Wasser

Verwendete Materialien, Substanzen und Geräte für die Tierbehandlung:

4-0 Faden resorbierbar, geflochten	VCP304 Ethicon Vicryl Plus, Johnson & Johnson, Neuss, Deutschland
6-0 Faden nicht resorbierbar	EH7403, Ethicon Prolene, Ethicon Inc, Somerville, USA
Arterienklemmen	
Aufzeichnung hämodynamischer und respiratorischer Parameter	PowerLab, AD Instruments, Castle Hill, Australien
Beatmungsgerät	Inspira asv, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Bepanthen Augensalbe	Bayer Vital GmbH, 51368 Leverkusen, Deutschland
Blutdruckmessgerät	Gould Statham Druckwandler P23ID, GOULD, Elk Grove, USA
Blutgasanalysegerät	ABL 800 Flex, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark Perfusor segura: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Desinfektionsmittel	Kodan, Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Inhalationsgerät	Sulla 808, Dräger Medica Deutschland, Lübeck
Isotonische Kochsalzlösung	NaCl 0,9 %, Fresenius Kabi Deutschland
Kapnographen	Capnograph Typ 340, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatur GmbH
Kompresse	ESKompressen, 5x5cm, 17 threads, 12 layers, Paul Hartmann AG
Lochtuch	Raucodrape, 45x75 cm, 2-lagig, Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland
Nadelhalter	
Pinzette (anatomisch+ chirurgisch)	
Ringerlösung	6737462.00.01, B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland
Schere	
Venenverweilkanülen (16G + 14G)	Vasofix Safety, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Venenverweilkatheter (24G)	Introcan Safety-Winged, B. Braun Melsungen Ag, Deutschland
Wärmematte	
Wattestäbchen	

Verwendete Medikamente:

Atemgas	Linde Gruppe, Leuna, Deutschland
Buprenorphin	Temgesic, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland
CO ₂ Gasgemisch	Linde Gruppe, Leuna, Deutschland
Gemfibrozil	G9518, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
GW6471	4618, Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom
Pancuroniumbromid 4mg/2ml	Rotexmedica GmbH Arzneimittelwerk, Trittau, Deutschland
Pentobarbital Natrium	Narcoren, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Sevofluran	SEVOrane, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland

Verwendete Geräte für die Arbeit im Labor:

Homogenisierer	IKA [®] EUROSTAR 20 digital, IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Homogenisierstab	Ultra-Turrax T8, IKA [®] -Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Plate Reader	BioTek Synergy 2, Software Gen5 TM Version 1.11, BioTek, Winooski, USA
Reagenzglasschüttler	Vortex Genie Touch Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Respirometer Software	Respirometer software 782 System Version 5.1, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland
Respirometer	MT200 und SI782, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland
Scherbeneismaschine	AF 80, Scotsman, Mailand, Italien

Waage	LA230S, Sartorius, Gottingen, Deutschland
Zentrifuge Rotina	420R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Verwendete Materialien für die Arbeit im Labor:

Konisches Zentrifugenröhrchen	Falcon™ 15ml, SARSTEDT, Numbrecht, Deutschland
Konisches Zentrifugenröhrchen	Falcon™ 50ml, SARSTEDT, Numbrecht, Deutschland
Pipette	Pasteur-Pipetten 7ml, VWR International, Darmstadt, Deutschland
Pipette	Pipettensatz Eppendorf ResearchR 5µl bis 5000µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze	1000µl graduierte Pipettenspitze, Starlabgroup, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze	10µl graduierte Pipettenspitze, Starlabgroup, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze	200µl konische Pipettenspitze, Starlabgroup, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze	10ml Costar Stripette, Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitze	5µl graduierte Pipettenspitze, Starlabgroup, Hamburg, Deutschland
Pipetus®	Pipetus®, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Reaktionsgefäß	Safe-Lock-Tubes 1,5ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß	Safe-Lock-Tubes 2,0ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Verwendete Chemikalien:

1,1,3,3-Tetramethoxypropan (MDA)	108383, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
2-Thiobarbitursäure	108180, Merck, Darmstadt, Deutschland
ADP	A5285, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Antimycin A	A8674, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
BSA	A6003, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	4621, Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

C ₂₃ H ₂₂ O ₆ (Rotenon)	R8875, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
C ₄ H ₁₀ O (2-Butanol)	109630, Merck, Darmstadt, Deutschland
C ₄ H ₄ KNaOH ₆	108087, Merck, Darmstadt, Deutschland
C ₄ H ₄ Na ₂ O ₄ (Sodiumsuccinat)	S2378, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
C ₄ H ₆ O ₅ (L-Malate)	11050, SERVA, Heidelberg, Deutschland
C ₅ H ₈ NO ₄ ⁻ (L-Glutamate)	49621, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
C ₆ H ₁₄ O ₆	M4125, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
C ₉ H ₅ ClN ₄	C2759, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CuSO ₄ *5H ₂ O	102790, Merck, Darmstadt, Deutschland
Cytochrom C	C2037, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMSO	589569 Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EGTA	3054, Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz	F9252, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
H ₃ PO ₄ 85%	141032, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
KCl	4873, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
KH ₂ PO ₄	5104, Merck, Darmstadt, Deutschland
KOH	6751 Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MOPS	3183, Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ CO ₃	S7795, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Na ₄ P ₂ O ₇	1204429, Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	106462, Merck, Darmstadt, Deutschland
Oligomycin	04876, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei den nachstehenden Personen bedanken. Ohne diese Menschen wäre es nie zu einer Fertigstellung dieser Arbeit gekommen.

Ich danke zunächst Herrn Prof. Dr. med. Olaf Picker, der mich als Promovierenden in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mich diese Studie durchführen lassen hat.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank an Priv.-Doz. Dr. med. Anna Herminghaus. Bei jeglicher auch noch so absurden Fragestellung gab sie stets Rat und unterstützte mich von Anfang bis Ende.

Außerdem bedanke ich mich an das komplette Laborteam, insbesondere Frau Prof. Dr. med. Inge Bauer und Frau Claudia Dohle. Bei technischen Problemen im Labor hatten diese immer ein offenes Ohr und halfen mir, diese zu lösen.

Ich bedanke mich auch an alle Mithelfende und Mitarbeiter des Instituts für experimentelle Anästhesiologie. Es hat mir immer Spaß gemacht, hier zu arbeiten. Das liegt zum großen Teil an der guten Arbeitsatmosphäre.

Ich konnte auch innerhalb der Arbeitsgruppe Freundschaften schließen, die ich bis heute sehr schätze. Deswegen danke ich auch Dr. med. Jan-Joschua Ripkens und Dr. med. Johannes Buitenhuis. Die Kaffeepausen mit euch und die damit verbundenen Gespräche haben dem Arbeiten noch mehr Freude verliehen.

Meiner Familie gehört auch ein großer Dank. Ohne ihre Unterstützung hätte ich das Medizinstudium nie beginnen und beenden können.

Schlussendlich danke ich noch meiner wundervollen Frau, die mir immer wieder Mut gemacht hat und mir auch in schwierigen Lagen des Lebens Kraft gegeben hat.