

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

**Der Einfluss von Metformin auf die  
mitochondriale Funktion in *Colon-* und  
Leberhomogenaten gesunder Ratten *in vitro***

Dissertation

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

vorgelegt von

Nicola Volmer

2025

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: PD Dr. med. Anna Herminghaus

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Dr. med. André Heinen

## Zusammenfassung

Metformin ist ein weit verbreitetes Medikament, das seit den 1950er Jahren zur Behandlung von Typ-2-Diabetes eingesetzt wird und als Mittel der ersten Wahl zur medikamentösen Ersttherapie angesehen wird. Eine der Hauptwirkungen stellt dabei die Senkung der Plasmaglukose dar, welche durch die Unterdrückung der Glukoneogenese in der Leber erreicht wird, was unter anderem durch die Hemmung des Komplexes I in der Atmungskette der Mitochondrien geschieht. Diese Hemmung wurde in der Leber bereits häufig gezeigt, weist aber widersprüchliche Daten bezüglich einer direkten oder indirekten Hemmung und bezüglich notwendiger Wirkstoffkonzentrationen auf. In letzter Zeit hat das Interesse am Darm als relevantes Organ für die Metforminwirkung stark zugenommen und es wurden einige Studien durchgeführt, um die Wirkungsmechanismen von Metformin im Darm zu entschlüsseln. Eine Hemmung der Atmungskette konnte bisher im Dünndarm und in *Colonkarzinomzellen* beobachtet werden, aber noch nicht im *Colon*. Also stellte sich die Frage, ob Metformin die mitochondriale Funktion in *Colon*- und Leberhomogenaten von gesunden Ratten dosisabhängig *in vitro* beeinflusst. Mittels Respirometrie wurde die Wirkung von fünf Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10; 20 Millimolar) im Vergleich zur Lösungssubstanz Natriumchlorid auf die mitochondriale Atmung in *Colon*- und Leberhomogenaten von 30 gesunden Ratten überprüft. Unterschieden wurde dabei zwischen der Komplex I- und Komplex II-abhängigen Atmung. In den Versuchen konnte eine organspezifische und dosisabhängige Wirkung gezeigt werden. In der Leber wurde die Komplex I-Atmung durch Metformin mit zunehmenden Konzentrationen gehemmt, wohingegen die Komplex II-Atmung nicht beeinflusst wurde. Der Wirkungsmechanismus von Metformin bezüglich der Komplex I-Hemmung in der Leber kann also bestätigt werden. Dabei ist die Hemmung dosisabhängig und durch einen direkten Mechanismus charakterisiert. Im *Colon* konnte sowohl bei der Komplex I- als auch bei der Komplex II-Atmung keine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion nachgewiesen werden. Daher wäre es möglich, dass im *Colon* ausschließlich andere Wirkungsmechanismen von Metformin auftreten. Andererseits wäre es auch möglich, dass eine Hemmung der Atmungskette im menschlichen *Colon* auftritt, während diese im *Colon* von Ratten ausbleibt. Für eine weitere Charakterisierung der Wirkungsmechanismen wäre es daher sinnvoll, weitere Studien zur Atmungshemmung durch Metformin im menschlichen *Colon* und weitere Studien bezüglich anderer möglicher Wirkungsmechanismen im *Colon* durchzuführen.

## Abstract

Metformin is a widely used drug that has been used for the treatment of type 2 diabetes since the 1950s and is considered to be the first-choice drug for primary therapy. One of the main effects is the reduction of plasma glucose, which is achieved by the suppression of gluconeogenesis in the liver, which occurs, among other things, by the inhibition of complex I in the respiratory chain of the mitochondria. This inhibition has been shown frequently in the liver, but there are conflicting data on direct or indirect inhibition and on necessary drug concentrations. Recently, interest in the intestine as a relevant organ for metformin action has greatly increased and several studies have been carried out to decipher the mechanisms of action of metformin in the intestine. Inhibition of the respiratory chain has so far been observed in the small intestine and *colon* cancer cells, but not yet in *colon*. This raised the question whether metformin dose-dependently affects mitochondrial function in *colon* and liver homogenates from healthy rats *in vitro*. Respirometry examined the effect of five metformin concentrations (1.25; 2.5; 5; 10; 20 mM) on mitochondrial respiration in *colon* and liver homogenates from 30 healthy rats compared to the solution NaCl. Differences were made between complex I- and complex II-dependent respiration.

The experiments showed an organ-specific and dose-dependent effect. In the liver, complex I respiration was inhibited by metformin with increasing concentrations, whereas complex II respiration was unaffected. Thus, the mechanism of action of metformin with respect to complex I inhibition in the liver can be confirmed. Inhibition is dose-dependent and is characterised by a direct mechanism. In the *colon*, neither complex I nor complex II respiration was affected by metformin. Therefore, it is possible that other mechanisms of action of metformin may occur in the *colon*. On the other hand, it is also possible that an inhibition of the respiratory chain occurs in the human *colon* while this is absent in the *colon* of rats. In order to further characterise the mechanisms of action, it would therefore be useful to conduct further studies on the inhibition of respiration by metformin in the human *colon* and further studies on other possible mechanisms of action in the *colon*.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>DHAP</b>	Dihydroxyaceton- phosphat
<b>µl</b>	Mikroliter	<b>FADH2</b>	Flavin-Adenin- Dinukleotid
<b>µM</b>	Mikromolar (Mikromol/l)	<b>FDG</b>	Fluordesoxyglukose
<b>µmol</b>	Mikromol	<b>g</b>	Gramm
<b>ACC</b>	Acetyl-CoA- Carboxylase	<b>G3P</b>	Glycerol-3-Phosphat
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat	<b>GDF-15</b>	<i>Growth differenciation factors 15</i>
<b>AMP</b>	Adenosinmonophosphat	<b>GLP-1</b>	<i>Glucagon-like-Peptid-1</i>
<b>AMPK</b>	AMP-aktivierte Kinase	<b>H<sup>+</sup></b>	Proton
<b>AST</b>	Aspartat- Aminotransferase	<b>IE</b>	Internationale Einheiten
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>l</b>	Liter
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin / Rinderserumalbumin	<b>LKB1</b>	Leberkinase B1
<b>C</b>	Cytochrom c	<b>mg</b>	Milligramm
<b>cAMP</b>	Cyclisches Adenosinmonophosphat	<b>mGPDH</b>	Mitochondriale Glycerophosphat- Dehydrogenase
<b>CCCP</b>	Carbonylcyanid-m- chlorphenylhydrazon	<b>min</b>	Minute
<b>cGPDH</b>	Cytosolische Glycerophosphat- Dehydrogenase	<b>ml</b>	Milliliter
<b>cMDH</b>	Cytosolische Malat- Dehydrogenase	<b>mM</b>	Millimolar (Millimol/l)
		<b>mm<sup>3</sup></b>	Kubikmillimeter
		<b>mMDH</b>	Mitochondriale Malat- Dehydrogenase
		<b>NaCl</b>	Natriumchlorid

<b>NAD<sup>+</sup>,</b>	Nicotinamid-	<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>NADH</b>	adenindinukleotid	<b>PMAT</b>	Plasmamembran-
<b>nm</b>	Nanometer		Monoamin-Transporter
<b>nmol</b>	Nanomol	<b>PYY</b>	Peptid YY
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff	<b>Q</b>	Ubichinon
<b>OCT</b>	Organischer-Kationen-	<b>RCI</b>	<i>Respiratory Control</i>
	Transporter		<i>Index</i>
<b>P</b>	Phosphat	<b>ROS</b>	Reaktive
<b>pA</b>	Pikoampere		Sauerstoffspezies
		<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Indikationen und Wirkungen von Metformin .....	1
1.2	Pharmakokinetik von Metformin .....	1
1.3	Wirkungsmechanismen von Metformin.....	1
1.4	Relevanz des <i>Colons</i> .....	6
1.5	Relevanz der Leber .....	8
1.6	Ziele und Fragestellungen der Arbeit.....	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1	Versuchstiere.....	10
2.2	Organentnahme .....	10
2.3	Herstellung der Gewebshomogenate.....	11
2.3.1	<i>Colon</i> .....	11
2.3.2	Leber .....	11
2.4	Proteinbestimmung nach Lowry .....	13
2.4.1	Die Lowry-Methode .....	13
2.4.2	Praktisches Vorgehen .....	13
2.5	Respirometrie .....	14
2.5.1	Atmungskette und Oxidative Phosphorylierung.....	14
2.5.2	Prinzip der Respirometrie .....	14
2.5.3	Praktisches Vorgehen .....	16
2.5.3.1	Kalibrierung der Respirometrie .....	16
2.5.3.2	Messungen.....	17
2.5.3.3	Interpretation der respirometrischen Messungen .....	18
2.5.3.4	Qualitätskontrollen .....	20
2.6	Statistik.....	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>22</b>
3.1	<i>Colon</i> .....	22
3.1.1	Komplex I - Glutamat-Malat .....	22
3.1.2	Komplex II - Succinat-Rotenon .....	22
3.2	Leber .....	26
3.2.1	Komplex I - Glutamat-Malat .....	26
3.2.2	Komplex II - Succinat-Rotenon .....	26
<b>4</b>	<b>Diskussion und Schlussfolgerungen</b> .....	<b>30</b>
4.1	Methodendiskussion.....	30

4.2	Ergebnisdiskussion.....	31
4.2.1	<i>Colon</i> .....	31
4.2.2	Leber .....	32
4.3	Schlussfolgerungen .....	34
<b>5</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>41</b>
6.1	Chemikalien und Reagenzien.....	41
6.2	Lösungen und Puffer .....	43
6.3	Material und Geräte.....	45

# **1 Einleitung**

## **1.1 Indikationen und Wirkungen von Metformin**

Metformin ist ein weit verbreitetes Medikament, das seit den 1950er Jahren zur Behandlung von Typ-2-Diabetes eingesetzt wird (1) und als Mittel der ersten Wahl zur medikamentösen Ersttherapie angesehen wird (2,3). Die Hauptwirkung beruht dabei auf der Senkung der Plasmaglukose durch Unterdrückung der Glukoneogenese (Neubildung von Glukose) in der Leber, Erhöhung der Glukoseaufnahme in der Peripherie, Erhöhung der Fettsäureoxidation (Abbau von Fetten) und der Verminderung der Insulinresistenz (4). Diese Senkung der Plasmaglukose bei der Behandlung des Diabetes wirkt sich protektiv auf Folgen und Komplikationen des Diabetes aus (5).

Neben dem Einsatz bei Typ-2-Diabetes ist Metformin auch zur Behandlung des polyzystischen Ovarialsyndroms indiziert (6) und es wurden noch einige weitere Wirkungen mit potentiellen Indikationen beobachtet. Eine dieser Wirkungen stellt die kardiovaskuläre Prävention dar: Metformin spielt eine schützende Rolle sowohl bei bereits bestehender Herzinsuffizienz (7) als auch bei neuauftretender Herzinsuffizienz nach stattgehabtem Herzinfarkt (8). Außerdem wurden antineoplastische, also krebspräventive Wirkungen entdeckt (9) sowie die Vermutung einer Verlangsamung der Alterung aufgestellt (10).

## **1.2 Pharmakokinetik von Metformin**

Metformin wird oral bis zu einer Tagesdosis von 3 Gramm (g) verabreicht. Da es bei physiologischem pH-Wert als hydrophiles Kation vorliegt, kann es nicht passiv über die Zellmembranen diffundieren und benötigt Transporter, um in Zellen zu gelangen. Die Resorption findet hauptsächlich im Dünndarm über Plasmamembran-Monoamin-Transporter (PMAT) und über die Organischen-Kationen-Transporter 1 und 3 (OCT1 und OCT3) statt. Die Aufnahme in die Leber geschieht größtenteils über OCT1 und wahrscheinlich auch über OCT3. Ausgeschieden wird Metformin renal, also über die Niere (11).

## **1.3 Wirkungsmechanismen von Metformin**

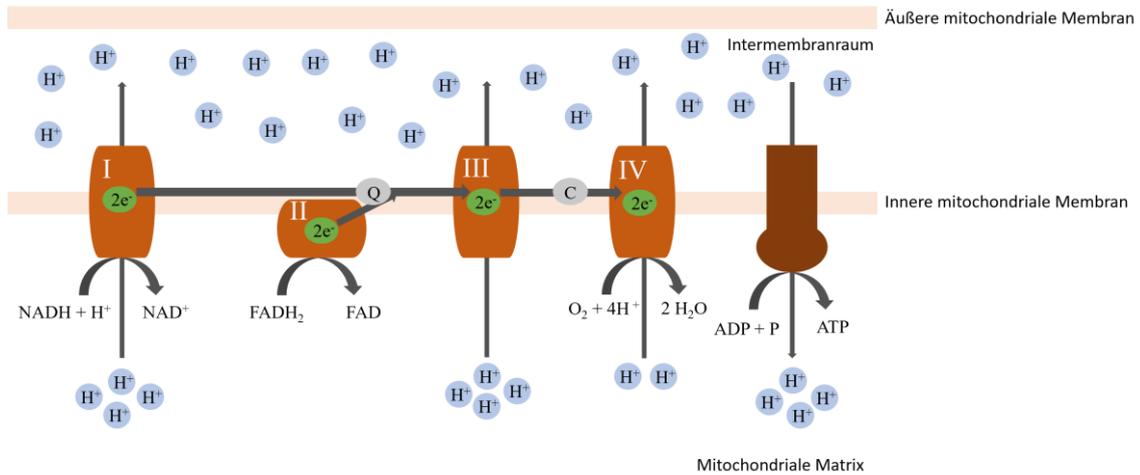
Wie das Medikament Metformin wirkt, ist noch nicht vollständig verstanden und die Mechanismen scheinen sehr komplex zu sein. Am häufigsten werden die Wirkungen durch die Modulation des mitochondrialen Stoffwechsels erklärt.

Als zentraler Mechanismus wird dabei die Hemmung der Atmungskette mit folglich erhöhtem Verhältnis von Adenosinmonophosphat (AMP) bzw. Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) angesehen (12,13).

Mitochondrien sind Zellorganellen und haben als Hauptaufgabe die Synthese des wichtigsten Energieträgers des Körpers: ATP. Sie haben eine äußere Membran, die für alle Stoffe permeabel ist und eine innere Membran, die für die meisten Stoffe undurchlässig ist und den Ort der Atmungskette darstellt. Im Inneren des Mitochondriums, also in der Matrix, finden viele Stoffwechselwege statt (14).

Die Atmungskette mit folgender oxidativer Phosphorylierung (siehe Abb. 1) ist für die Bereitstellung des ATPs verantwortlich und besteht aus vier Proteinkomplexen: Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex II (Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase), Komplex III (Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase) und Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase). An diesen laufen verschiedene Redoxreaktionen ab, die mit den Reduktionsäquivalenten Nicotinamadenindinukleotid ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) und Flavin-Adenin-Dinukleotid ( $\text{FADH}_2$ ) aus dem Abbau der Fette, Kohlenhydrate und Proteine beginnen. Die Elektronen der Reduktionsäquivalente werden über die Enzymkomplexe der Atmungskette transportiert, wobei der Beginn entweder bei Komplex I mit  $\text{NADH} + \text{H}^+$  oder bei Komplex II mit  $\text{FADH}_2$  ist. Zuerst werden durch diese Komplexe die Elektronen von NADH oder  $\text{FADH}_2$  auf Ubichinon übertragen, wodurch Ubichinol entsteht. Der Komplex III überträgt diese Elektronen dann von Ubichinol auf Cytochrom c. Dieses liegt der inneren Membran von außen an und ist dort frei beweglich. Den letzten Schritt katalysiert der Komplex IV, der die Elektronen von Cytochrom c auf Sauerstoff überträgt, aus welchem durch Aufnahme von Protonen zwei Moleküle Wasser entstehen. Durch die Weitergabe der Elektronen wird Energie frei, die genutzt wird, um Protonen aus der Matrix zu pumpen, sodass ein Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran entsteht. Bei der oxidativen Phosphorylierung lässt die ATP-Synthase diese Protonen dann zurück in die Matrix fließen, wodurch wiederum Energie frei wird, die zur Phosphorylierung von ADP genutzt wird, sodass ATP entsteht. Reguliert wird die Atmungskette über die vorhandene ADP-Konzentration. Ist diese hoch, wird der Zelle signalisiert, dass ein Energiemangel herrscht und die Atmungskette

wird angeregt. Ist die ADP-Konzentration hingegen niedrig, wird die Atmungskette gehemmt. (14)



**Abb. 1: Atmungskette und Oxidative Phosphorylierung**

Die Reduktionsäquivalente Nicotinadenindinukleotid (NADH + H<sup>+</sup>) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH<sub>2</sub>) werden an Komplex I bzw. an Komplex II der Atmungskette zu NAD<sup>+</sup> bzw. FAD oxidiert. Die Elektronen (e<sup>-</sup>) werden dabei auf Ubichinon (Q) übertragen, wodurch Ubichinol entsteht. An Komplex III werden die Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom c (C) übertragen und an Komplex IV von Cytochrom c auf Sauerstoff (O<sub>2</sub>), sodass das O<sub>2</sub> mit vier Protonen (H<sup>+</sup>) zu zwei Molekülen Wasser reagiert. Durch die Redoxreaktionen, die an den Komplexen ablaufen, wird Energie frei, die an Komplex I, III und IV zur Erzeugung eines Protonengradienten genutzt wird, indem Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt werden. Durch die ATP-Synthase (Adenosintriphosphat) gelangen diese Protonen wieder in die Matrix. Die dabei freiwerdende Energie wird zur Erzeugung von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P) genutzt (14).

Neben der ATP-Erzeugung stellt die Atmungskette außerdem eine Quelle zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies dar, die in hohen Konzentrationen die Zelle schädigen, in geringeren Konzentrationen aber regulatorische Mediatoren bei Signalwegen der Zelle darstellen (15,16).

El-Mir et al. und Owen et al. zeigten erstmals den hemmenden Effekt von Metformin auf den Komplex I der Atmungskette in der Leber und im Herzen (12,17) und folgten bestätigten viele weitere Studien diese Wirkung (13, 18, 19). Ihre Ergebnisse waren aber teilweise widersprüchlich und der genaue Mechanismus der Komplex I-Hemmung ist noch nicht aufgeklärt. So besteht beispielsweise der Konflikt zwischen dem Konzept einer direkten oder indirekten Hemmung. El-Mir et al. konnten die Hemmung des Komplexes I nur in intakten Zellen nachweisen und postulierten deshalb, dass Metformin einen indirekten Wirkungsmechanismus hat. Owen et al. jedoch fanden den inhibierenden Effekt auch in isolierten Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln. Seitdem wurde in einigen weiteren Studien ein direkter (18, 20), aber auch ein indirekter

Mechanismus (21) vermutet. Hirsch et al. schlugen eine Kombination aus einem direkten und indirekten Mechanismus vor, da eine Hemmung sowohl in isolierten Mitochondrien, als auch in intakten Zellen auftrat, doch diese Hemmung in intakten Zellen war stärker als in isolierten Mitochondrien (22). Auch die Reversibilität der Komplex I-Hemmung ist umstritten: Einerseits wurde eine irreversible Inhibition gezeigt, denn nach der Auswaschung der Zellen von Metformin hielt die Inhibition an (17), andererseits deuteten andere Forschungsgruppen aus ihren Ergebnissen eine reversible Hemmung (19,23). Außerdem unterschieden sich in den meisten Studien die nötigen Wirkstoffkonzentrationen, die zur Komplex I-Hemmung notwendig waren und die Auswirkungen der jeweiligen Konzentrationen auf die mitochondriale Funktion. Auch wenn die genauen Umstände der Inhibition des Komplexes I noch umstritten sind, wird davon ausgegangen, dass es insgesamt zu einem Anstieg des Verhältnisses von AMP bzw. ADP zu ATP kommt (siehe Abb. 2) (12,13).

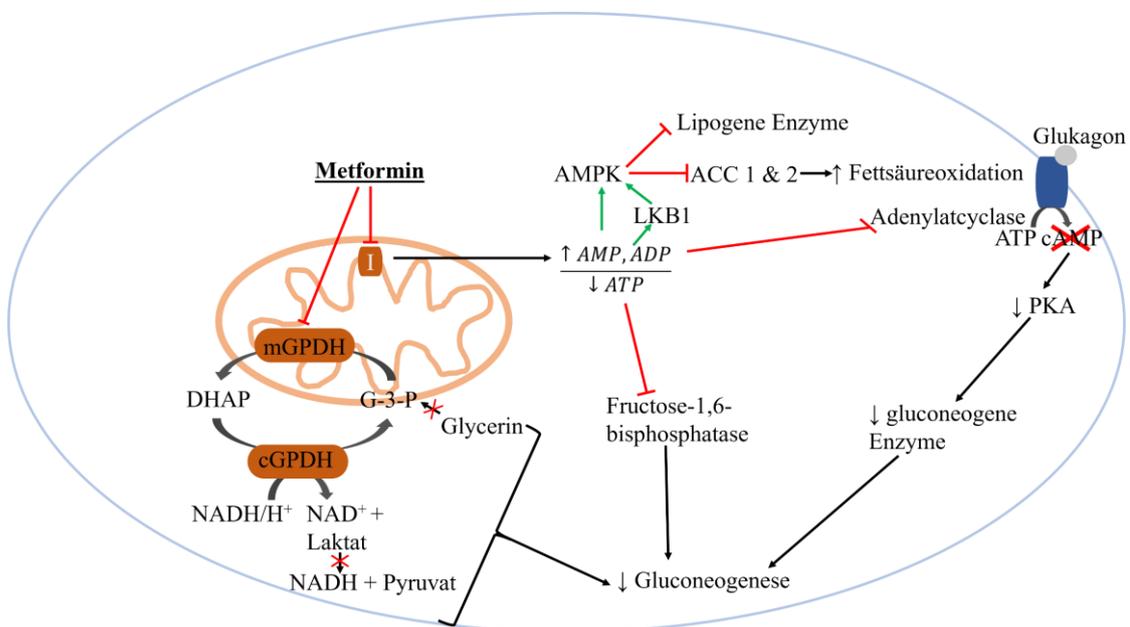
Die Zunahme dieses Verhältnisses führt zu einer Hemmung der Fructose-1,6-bisphosphatase (24) sowie zu einer Hemmung der Adenylatcyclase mit folglich abnehmender Konzentration des cyclischen AMPs (cAMP) und reduzierter Proteinkinase A-Aktivität, wodurch die glukoneogene Genexpression gehemmt und die Glukagonwirkung antagonisiert wird (25). Beide Prozesse führen somit zu einer verminderten Glukoneogenese. Außerdem kann das steigende AMP bzw. ADP zu ATP-Verhältnis die AMP-aktivierte Kinase (AMPK) direkt (26) oder über die Leberkinase B1 (LKB1) aktivieren (27). Die AMPK vermindert einerseits die Expression von lipogenen Enzymen und andererseits hemmt sie die Acetyl-CoA-Carboxylasen (ACC) 1 und 2 und fördert damit die Fettsäureoxidation (28). Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen zeigten Foretz et al. jedoch, dass Metformin die Glukoneogenese unabhängig von LKB1 und AMPK supprimiert. Stattdessen soll die Glukoneogenese durch eine Abnahme des hepatischen Energiezustands unterdrückt werden (29).

Neben der Komplex I-Hemmung ist die Hemmung anderer Komplexe der Atmungskette thematisiert worden. So wurde eine Hemmung des Komplexes II in isolierten Mitochondrien aus braunem Fettgewebe (30) und die gemeinsame Hemmung von Komplex I, III und IV und von Komplex III und IV (31) beobachtet. Auch die isolierte Hemmung von Komplex IV konnten LaMoia et al. zeigen (32). Bridges et al. entdeckten außerdem eine Hemmung der ATP-Hydrolyse durch die ATP-Synthase (19), die nur unter

besonderen physiologischen Bedingungen eine Hydrolyseaktivität aufweist und damit als Protonenpumpe entgegen des Protonengradienten wirken kann (33).

Ein weiterer Ansatz wie Metformin die Glukoneogenese unterdrücken kann, ist die nicht-kompetitive Inhibition der mitochondrialen Glycerophosphat-Dehydrogenase (mGPDH) (34). Dadurch wird der gesamte Glycerophosphatshuttle gehindert, der neben dem Malat-Aspartat-Shuttle einen Mechanismus zur Bereitstellung der Reduktionsäquivalente NADH und FADH<sub>2</sub> für die Atmungskette darstellt (14). Durch die Hemmung der mGPDH entfällt sowohl die Glukoneogenese aus Glycerin als auch aus Laktat. Glycerin wird normalerweise durch die Glycerinkinase zu Glycerol-3-Phosphat phosphoryliert und anschließend durch die mGPDH zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgewandelt, was durch die Hemmung nicht möglich ist. So entfällt also auch die Synthese von NAD<sup>+</sup> aus NADH und DHAP durch die cytosolische Glycerophosphat-Dehydrogenase (cGPDH) und die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat mithilfe von NAD<sup>+</sup> durch die Laktatdehydrogenase, was zur Akkumulation von Laktat führt (34). Diese Hypothese kann demnach auch die typische, wenn auch seltene Komplikation unter Metformineinnahme erklären: die Laktatazidose (35).

Für eine Übersicht über die grundlegenden Wirkungsmechanismen siehe Abb. 2.



**Abb. 2: Wirkungsmechanismen von Metformin (Abbildung in Anlehnung an Pecinová et al. (36) )**

Metformin hemmt den Komplex I der Atmungskette, was zu einer Erhöhung des Adenosinmonophosphat (AMP) bzw. Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) Verhältnisses führt (12). Diese Erhöhung des Verhältnisses führt zur Aktivierung der AMP-aktivierten Kinase (AMPK) (26), welche

ebenfalls indirekt über die Leberkinase B1 (LKB1) (27) aktiviert werden kann. Die AMPK hemmt die Synthese von lipogenen Enzymen und hemmt die Acetyl-CoA-Carboxylasen (ACC) 1 und 2, wodurch die Fettsäureoxidation erhöht wird (28). Das erhöhte AMP bzw. ADP zu ATP Verhältnis hemmt außerdem die Fructose-1,6-bisphosphatase, wodurch die Glukoneogenese gehemmt wird (24) und die Adenylatcyclase, wodurch die Glukagonwirkung antagonisiert wird. Es wird also kein cyclisches AMP (cAMP) synthetisiert und folglich die Proteinkinase A (PKA) nicht aktiviert. Dadurch wird die Synthese von glukoneogenen Enzymen verringert und die Glukoneogenese nimmt ab (25). Metformin hemmt außerdem die mitochondriale Glycerophosphat-Dehydrogenase (mGPDH), wodurch der Glycerophosphatshuttle inhibiert wird. Die Glukoneogenese aus Glycerin ist nicht möglich, da das Glycerol-3-Phosphat (G3P) nicht in Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgewandelt werden kann. Dadurch kann die cytosolische Glycerophosphat-Dehydrogenase (cGPDH) Nicotinadeninindinukleotid ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) nicht zu  $\text{NAD}^+$  oxidieren und das Laktat wird nicht in Pyruvat umgewandelt, welches somit nicht für die Glukoneogenese genutzt werden kann. Folglich wird die Glukoneogenese aus Laktat und aus Glycerin verhindert (34).

Auch die Beeinflussung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wird als Zielpunkt von Metformin angesehen, jedoch ist die Studienlage diesbezüglich heterogen. Einerseits zeigten Studien, dass die ROS-Bildung durch Metformin zunahm (19,30). Andererseits wurden Abnahmen in der ROS-Bildung beobachtet, die auf die Inhibition der Atmungskette oder der NAD(P)H-Oxidase (37) oder auch auf die verstärkte Expression des Antioxidans Thioredoxin zurückgeführt werden (38). Batandier et al. zeigten, dass die ROS-Bildung unter Metformin nur bei einem rückwärts-laufenden Elektronenfluss durch die Atmungskette vermindert war, nicht aber beim vorwärts-laufenden Elektronenfluss (39).

Zusätzlich wurden noch viele weitere Hypothesen zum Wirkungsmechanismus von Metformin aufgestellt. Dazu gehören unter anderem die Aktivierung der Autophagie, welche die Membranumlagerung von Organellen und zytoplasmatischen Bestandteilen darstellt und durch Nährstoffmangel induziert wird (40). Außerdem wird vermutet, dass Metformin direkte Wirkungen auf Entzündungsgeschehen ausübt, indem es zum Beispiel die Monozyten-zu-Makrophagen Differenzierung inhibiert (41) und die Reifung von Interleukin-1 $\beta$  in Makrophagen hemmt (42). Besonders der Darm hat in den letzten Jahren an Interesse in Bezug auf die Wirkung von Metformin gewonnen und es stellten sich einige Wirkungsmechanismen heraus, die im Folgenden erläutert werden.

#### **1.4 Relevanz des *Colons***

Das Mikrobiom des Darms spielt eine wesentliche Rolle im Energiehaushalt. Shin et al. zeigten, dass Metformin dieses Mikrobiom beeinflusst (43). Zudem scheint Metformin die Sekretion des *Glucagon-like-Peptid-1* (GLP-1) (44), des zirkulierenden Peptid YY (PYY) (45) und des *Growth differentiation factor 15* (GDF-15) (46) zu erhöhen. GLP-1 wird im distalen *Ileum* und *Colon* nach Nahrungsaufnahme gebildet, senkt durch mehrere

Schritte den Plasmaglukosespiegel und löst ein Sättigungsgefühl aus (14). PYY wird auch im distalen Dünndarm und *Colon* produziert und wirkt hauptsächlich als Appetitregulator (45). Auch GDF-15 wird hauptsächlich im Dünndarm und *Colon* gebildet und hemmt ebenfalls die Nahrungsaufnahme (46).

Einige Studien zeigten interessante Ergebnisse bezüglich der Konzentrationsanreicherung von Metformin und der Glukoseverwertung im Darm. So fanden Wilcock et al. eine deutlich erhöhte Metforminkonzentration im Gastrointestinaltrakt nach oraler Gabe mit der höchsten Akkumulation in Jejunum und Ileum. Sogar nach intravenöser Verabreichung zeigte der Dünndarm die höchste Wirkstoffkonzentration. Diese erhöhte Akkumulation impliziert, dass der Darm möglicherweise das wichtigste Organ für den Wirkort von Metformin darstellt. Die Konzentration im Dickdarm erreichte zwar im Vergleich zum Dünndarm ein geringeres Niveau, überragte jedoch trotzdem die Plasmakonzentration und zeigte eine deutlich langsamere Konzentrationsabnahme im Zeitverlauf (47). Zudem konnte eine weitere Studie die stärkste Metforminakkumulation im distalen Dickdarm nachweisen (48). Außerdem zeigten Bailey et al. eine starke Abnahme der Plasmaglukosekonzentration in der Portalvene metforminbehandelter Ratten im Vergleich zu Kontrollen, was eine erhöhte Glukoseverwertung im Darm unter Metformingabe vermuten lässt (49). Zusätzlich wurde eine zweifach erhöhte Glukoseaufnahme im Dünndarm und eine dreifach erhöhte Glukoseaufnahme im *Colon* bei Patienten, die 26 Wochen mit Metformin behandelt wurden im Vergleich zur Placebobehandlung beobachtet (50). Ito et al. zeigten zudem eine erhöhte Konzentration von radioaktiv markierter Fluordesoxyglukose (FDG) sowohl in der Wand als auch im Lumen des Dickdarms von Patienten nach intravenöser Verabreichung der FDG, welches nicht nur die Extraktion von Glukose aus dem Blut in den Darm, sondern zusätzlich die Abgabe von Glukose aus der Darmwand in das Darmlumen impliziert (51). Neben dem erhöhten Glukoseumsatz durch den Darm wurde ein erhöhtes Laktatlevel in der Portalvene nachgewiesen (52) und Schommers et al. zeigten, dass Metformin den Glukosestoffwechsel zu Laktat im Darm erhöht, was zu einem energieaufwendigen Zyklus führt, da das Laktat wiederum durch die Leber aufgenommen und zu Glukose umgewandelt wird. Da in vielen anderen Studien jedoch eine verminderte Glukoneogenese unter Metformin beobachtet wurde, schlugen sie vor, dass diese erhöhte Glukoneogenese nur unter Einnahme einer geringen Metformindosis vorkommt. Denn unter dieser Bedingung tritt eine verhältnismäßig hohe

Akkumulation im Darm auf, die zu Laktatproduktion führt. Die verhältnismäßig geringe Akkumulation in der Leber resultiert dann jedoch noch nicht in einer Hemmung der Glukoneogenese (53). Sowohl Schommers et al. als auch Yang et al. sehen als Grund für die erhöhte Laktatproduktion die Inhibition der mitochondrialen Funktion bzw. Respiration (48,53). Bisher wurde diese Inhibition im Dünndarm (48,53) und in *Colonkarzinomzellen* (23) beobachtet, jedoch noch nicht im *Colon*.

## **1.5 Relevanz der Leber**

Die Leber stellt das zentrale Organ im Glukosestoffwechsel dar. In ihr findet die Glukoneogenese statt, wobei Glukose für den Körper bereitgestellt wird und deren Hemmung als zentraler Mechanismus der Metforminwirkung angesehen wird (54). So wurde in einer Studie gezeigt, dass OCT1-Knockout-Mäuse, das heißt Mäuse, denen der Transporter zur Aufnahme von Metformin in die Leber fehlt, nach einer fettreichen Diät und anschließender Metformingabe keine Veränderungen im Plasmaglukosespiegel zeigten. Bei Wildtypmäusen wurde jedoch eine Senkung des Plasmaglukosespiegels um 30 % nach der Metformingabe gemessen (55). Außerdem konnten Wilcock et al. eine deutlich stärkere Akkumulation von Metformin in der Leber, sowohl unter oraler Gabe, als auch unter intravenöser Gabe, im Vergleich zum Plasmalevel nachweisen (47). Die Beeinflussung der mitochondrialen Funktion als zentraler Wirkungsmechanismus in der Leber wurde bereits durch einige Studien nachgewiesen, zeigt aber widersprüchliche Daten bezüglich einer direkten oder indirekten Hemmung und bezüglich notwendiger Wirkstoffkonzentrationen und deren Auswirkungen (12,13,17,56–59).

## 1.6 Ziele und Fragestellungen der Arbeit

Die Aufklärung der Wirkungsmechanismen des Medikaments Metformin ist für das Verständnis der Wirkung bei bereits zugelassenen und auch potenziellen neuen Indikationen sehr relevant. Die mitochondriale Funktion stellt dabei einen zentralen Mechanismus dar, dessen Untersuchung aber noch Widersprüche sowohl im allgemeinen Verständnis als auch in jeweiligen Organen zeigt. Als besonders interessant für die Metforminwirkung scheinen die Leber und der Darm zu sein. Die Datenlage bezüglich der Wirkung auf die mitochondriale Funktion in der Leber zeigt derzeit noch Widersprüche und die Wirkung auf die mitochondriale Funktion im *Colon* beruht bisher auf mangelnden Daten. Daher ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Beeinflusst Metformin die mitochondriale Funktion in *Colon*- und Leberhomogenaten von gesunden Ratten *in vitro*?
2. Ist die Wirkung von Metformin dosisabhängig?

## **2 Material und Methoden**

Die Angaben zu den verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Puffern, Lösungen, Materialien und Geräten befinden sich im Anhang (siehe Seite 41 – 46).

Die angewandte Methodik basiert auf bereits beschriebenen Studien der Arbeitsgruppe (60–62).

### **2.1 Versuchstiere**

Die Organe *Colon* und Leber wurden aus circa 2 Monate alten und 280-300 g schweren, gesunden Wistar-Ratten entnommen. Dafür wurden ausschließlich männliche Ratten genutzt, um Auswirkungen durch hormonelle Schwankungen ausschließen zu können. Die Tiere wurden bei einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus unter kontrollierter Raumtemperatur gehalten. Sie hatten Zugang zu Trinkwasser und Nahrung. Da es sich lediglich um eine Organentnahme handelt ist eine Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz nicht erforderlich. Es liegt eine Anzeigengenehmigung der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) mit interner Nummer O27/12 vor.

### **2.2 Organentnahme**

Bis zu dem Zeitpunkt der Entnahme von Leber und *Colon* erfolgte der Umgang mit den Tieren ausschließlich durch die Mitglieder der Arbeitsgruppe für Kardioprotektion unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Ragnar Huhn.

Die Ratten erhielten eine intraperitoneale Injektion zur Narkotisierung mit 32 Milligramm (mg) Pentobarbital, 1000 Internationale Einheiten (IE) Heparin und 1,8 Milliliter (ml) Natriumchlorid. Konnte bei den Tieren nach fünf Minuten eine Areflexie nachgewiesen werden, wurden diese anschließend mittels Dekapitation getötet. Nachfolgend entnahmen die Mitglieder der Arbeitsgruppe für Kardioprotektion nach erfolgter Thorakotomie das Herz. Nach erfolgter Laparotomie fand die Entnahme eines Stücks des linken Leberlappens und des gesamten *Colons* statt. Die Leber wurde direkt in ein Becherglas mit 4 Grad Celsius (°C) kaltem Isolationspuffer gegeben. Nach Entfernung von anhängendem Fett und grober Ausstreichung des Kots wurde auch das *Colon* in ein Becherglas mit 4 °C kaltem Isolationspuffer gegeben.

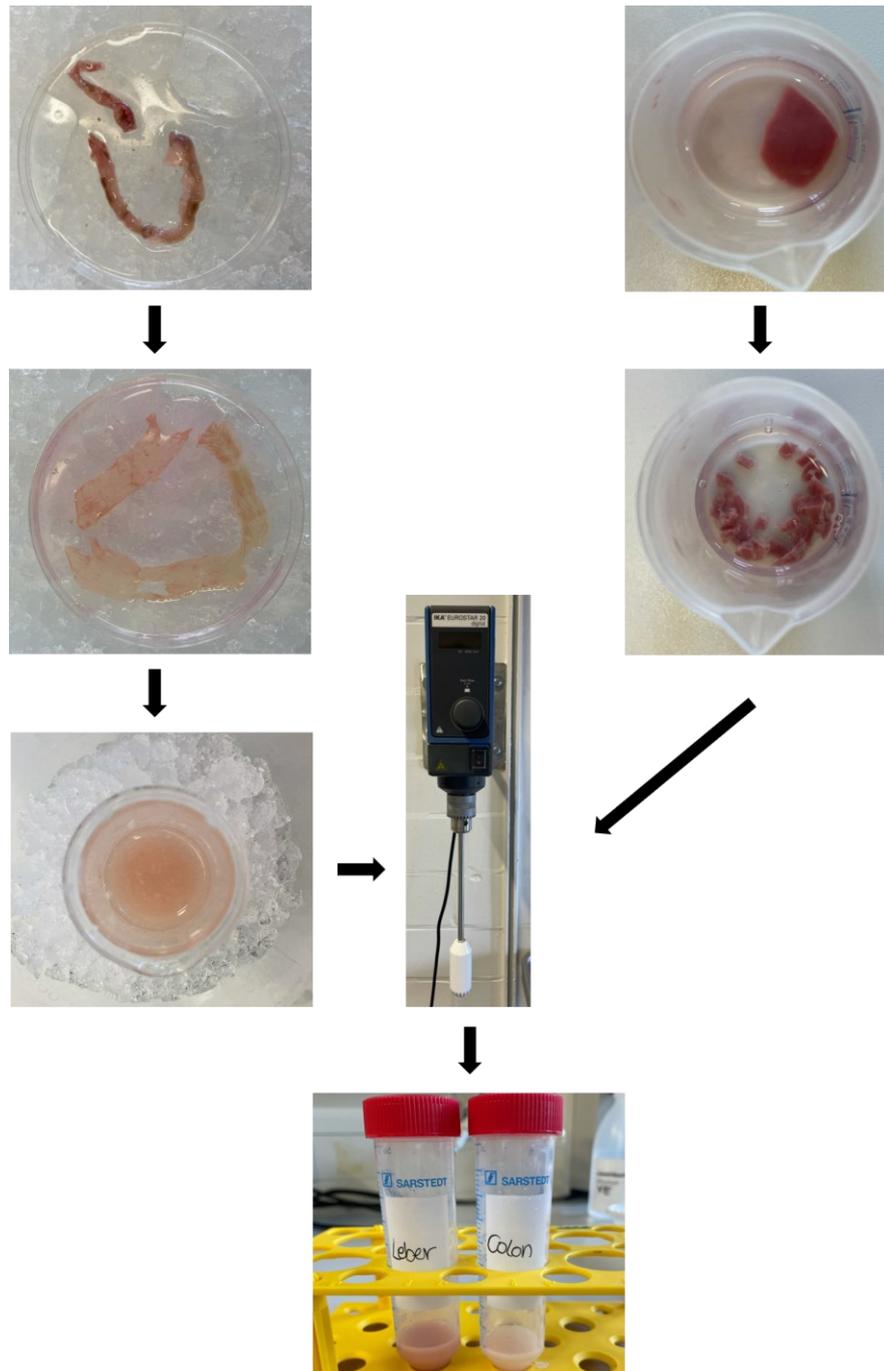
## 2.3 Herstellung der Gewebshomogenate

### 2.3.1 *Colon*

Zuerst wurde das entnommene *Colon* abgewogen und anschließend zusammen mit dem Isolationspuffer in eine durch Eis gekühlte Petrischale gegeben. Das *Colon* wurde erneut von anhängendem Fett und Kot befreit und dann mit einer Schere längs aufgeschnitten. Mit einer in Isolationspuffer getränkten Kompresse wurde die Mukosa abgetupft und dadurch gesäubert. Trypsin-EDTA 0,05 % (*Colongewicht* in Gramm (g) x 2 in ml) wurde nun hinzugegeben, um die Zellen aus den Zellverbänden zu lösen (63). Nach 5 Minuten wurde das *Colon* in ein Becherglas mit Isolationspuffer mit erhöhtem BSA-Gehalt (*Colongewicht* in g x 4 in ml) und dem Proteaseinhibitor *cOMplete* (*Colongewicht* in g x 4 in µl) gegeben. Der Proteaseinhibitor verhindert die Zerstörung der intrazellulären Proteine (64). Der höhere Gehalt an Rinderserumalbumin (BSA) im Isolationspuffer für das *Colonhomogenat* soll eine Entkopplungswirkung durch Fettsäuren, die in der Submukosa des *Colons* vorkommen, verhindern (62). Mit der Schere wurde nun das *Colon* in 2-3 Kubikmillimeter (mm<sup>3</sup>) große Stücke zerkleinert und anschließend unter durchgehender Kühlung mit einem Teflonkolben homogenisiert. Dabei wurde das Gewebe in einen dem Teflonkolben enganliegenden Glaszylinder gefüllt und bei 2000 *rounds per minute* (*rpm*) fünf Mal auf und ab bewegt. Durch die mechanische Scherung werden dabei die Organellen durch Aufschluss der Zellmembran freigelegt (64). Das Gewebshomogenat wurde dann unter Filtration durch eine Kompresse in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben.

### 2.3.2 *Leber*

Von dem entnommenen Stück Leber wurden 1,1 g abgewogen und im Anschluss mit einer Schere in 2-3 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert. Der Isolationspuffer wurde abgegossen und die gleiche Menge erneut hinzugegeben. Diese Schritte wurden so oft wiederholt, bis der Isolationspuffer klar war und die Blutrückstände entfernt waren. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Menge des Isolationspuffers auf 10 ml aufgefüllt. Auch das Lebergewebe wurde unter 2000 rpm am Teflonkolben, aber nur vier Mal, auf und ab bewegt und dann unter Filtration durch eine Kompresse in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben.



**Abb. 3: Herstellung der Gewebshomogenate**

Das *Colon* wurde von anhängendem Fett und Kot befreit und mit einer Schere längs aufgeschnitten. Anschließend fand eine Behandlung mit Trypsin-EDTA statt. Das *Colon* wurde mit Isolationspuffer und einem Proteaseinhibitor zusammengegeben, mit einer Schere zerkleinert und dann mit einem Teflonkolben homogenisiert (linke Bildhälfte). 1,1 Gramm der Leber wurden mit einer Schere zerkleinert. Der Isolationspuffer wurde abgossen und erneut hinzugegeben, bis er frei von Blutspuren war. Anschließend wurde der Isolationspuffer auf 10 Milliliter aufgefüllt und auch mit dem Teflonkolben homogenisiert (rechte Bildhälfte).

## 2.4 Proteinbestimmung nach Lowry

### 2.4.1 Die Lowry-Methode

Um die Sauerstoffverbrauchsrate der Homogenate später auf die Gesamtproteinmenge normieren zu können wurde eine Proteinbestimmung in Anlehnung an Lowry durchgeführt (65). Im Wesentlichen beruht dieser Proteinnachweis auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen. Die erste Reaktion ist die Biuret-Reaktion, bei welcher Kupfer in alkalischer Lösung mit Proteinen interagiert und so eine violette Farbe bildet. Dieser Komplex reagiert anschließend mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz und bildet eine blau-grüne Farbe, die anschließend photometrisch gemessen wird (66,67).

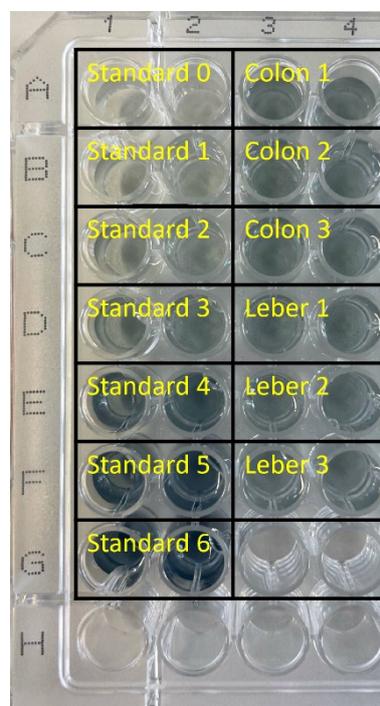


Abb. 4: Wells-Platte mit Standardreihe und Proben von *Colon*- und Leberhomogenaten

### 2.4.2 Praktisches Vorgehen

Als erstes wurde die Lösung 1 aus Reagenz A, B und C und Lösung 2 aus *Folin & Ciocalteu's phenol reagent* und *Aqua destillata* hergestellt. Da die Proteinkonzentrationen gegen eine Standardreihe mit BSA gemessen wurde, war der nächste Schritt die Anfertigung dieser Standardreihe, indem jeweils *Aqua destillata* und BSA (1 mg/ml) in folgenden Konzentrationen zusammengegeben wurde (Tabelle 1):

<b>Standard</b>	0	1	2	3	4	5	6
<b>Konzentration (µg/ml)</b>	0	62,5	125	250	500	750	1000

**Tabelle 1: Standardreihe**

Standardreihe mit Angabe der Konzentration an Rinderserumalbumin (BSA) je Standard in Mikrogramm (µg) pro Milliliter (ml)

Anschließend wurde die Standardreihe vorerst in Eis gekühlt. 10 Mikroliter (µl) der *Colon*- und Leberhomogenate wurden jeweils in drei Reaktionsgefäße gegeben und im Verhältnis 1:100 mit *Aqua destillata* verdünnt. Sowohl von der Standardreihe als auch von den verdünnten Homogenaten, wurden jeweils 100 µl in 500 µl der Lösung 1 gegeben und für 10 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden dann noch jeweils 50 µl Lösung 2 hinzugegeben und es fand erneut eine Inkubationszeit von 30 Minuten statt. Danach wurden jeweils zwei Mal 200 µl in eine *96-Wells-Platte* gegeben und die Gesamtproteinkonzentration wurde als Doppelbestimmung mittels *Microplate-Reader* bei einer Wellenlänge von 750 nm photometrisch bestimmt. Zuletzt wurde der Mittelwert aus den drei technischen Replikaten je Organ ermittelt.

## **2.5 Respirometrie**

### **2.5.1 Atmungskette und Oxidative Phosphorylierung**

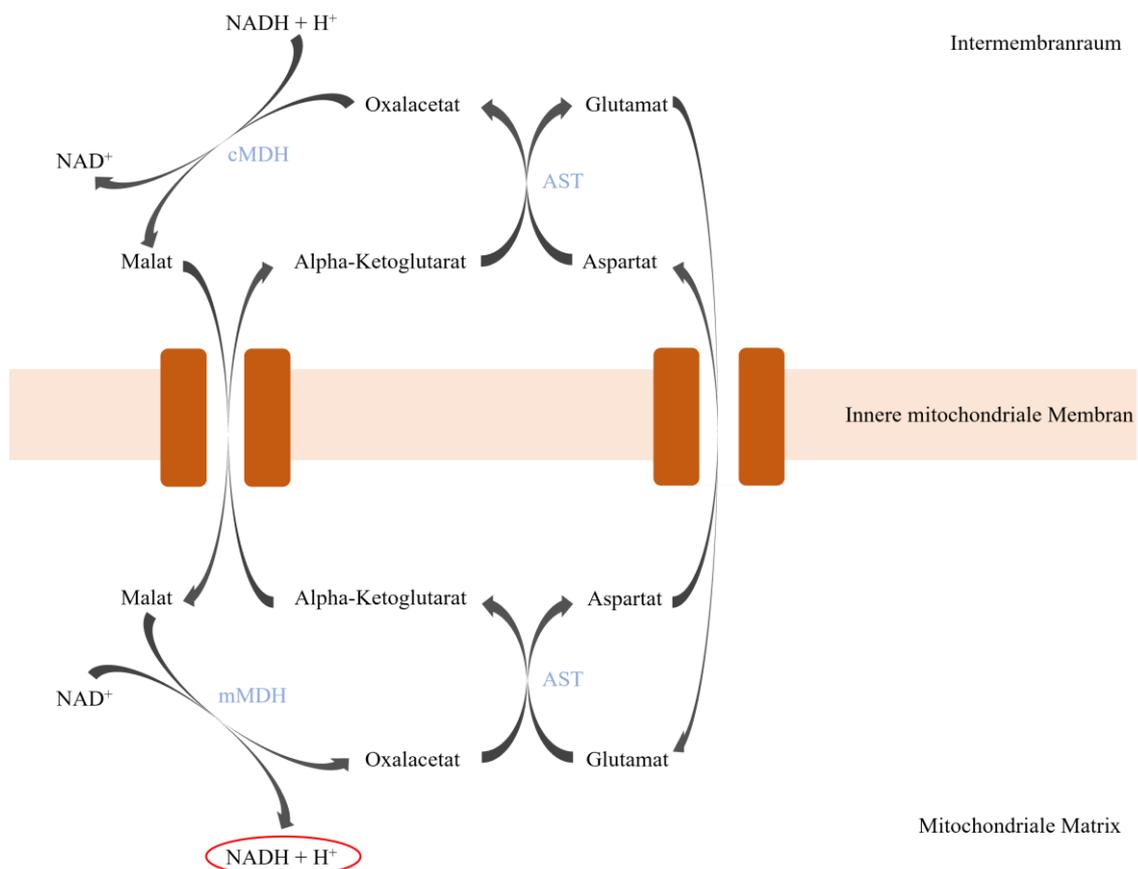
Die Atmungskette und die Oxidative Phosphorylierung wurden bereits in der Einleitung beschrieben (siehe Seite 2).

### **2.5.2 Prinzip der Respirometrie**

Durch die Respirometrie kann man anhand der Messung des Sauerstoffverbrauchs bzw. der Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit die mitochondriale Aktivität bestimmen (68). Als Respirometer diente ein MT200-Respirometer von Strathkelvin. Die Kammer, in welche die Lösung gegeben wird, hat ein Fassungsvermögen von 500 µl und wird luftdicht mit einem Stopfen abgeschlossen, sodass kein Sauerstoff aus der Umgebung in die Lösung gelangen kann. Dadurch wird die Messung des Sauerstoffverbrauchs nicht beeinflusst. Der Sauerstoffverbrauch wird durch eine Clark Elektrode gemessen. Diese ist durch eine Sauerstoff-permeable Membran von der Kammer getrennt, sodass nur der Sauerstoff und keine größeren Moleküle an die Elektrode gelangen können. Die Elektrode misst den Sauerstoffpartialdruck, welcher der Sauerstoffkonzentration entspricht. Damit es lokal an der Elektrode nicht zu einer geringeren Sauerstoffkonzentration als in der

restlichen Lösung kommt und folglich der Sauerstoffverbrauch falsch gemessen wird, wird die Lösung mit einem Magnetrührer kontinuierlich durchmischt (69). Die Kammer wird durchgehend von 30 °C warmem Wasser umspült, welches durch ein Wasserbad aufgewärmt wird.

Werden nun von außen Glutamat und Malat für Komplex I bzw. Succinat und Rotenon für Komplex II den Homogenaten hinzugegeben, wird die Atmungskette angeregt. Die direkten Substrate für Komplex I (NADH) und Komplex II (FADH<sub>2</sub>) können die innere Mitochondrienmembran nicht passieren und sind daher nicht zur Nutzung geeignet. Im Falle der Komplex I-Stimulation wird NADH durch Zugabe von Glutamat und Malat über den Malat-Aspartat-Shuttle in der Matrix bereitgestellt (siehe Abb. 3).



**Abb. 5: Malat Aspartat-Shuttle**

Die Elektronen von Nicotinadeninindinukleotid (NADH) werden durch die cytosolische Malat-Dehydrogenase (cMDH) auf Oxalacetat übertragen, sodass Malat und NAD<sup>+</sup> entsteht. Malat wird anschließend im Austausch zu Alpha-Ketoglutarat in die Matrix transportiert. In der mitochondrialen Matrix wird das Malat durch die mitochondriale Malat-Dehydrogenase (mMDH) wieder zu Oxalacetat oxidiert und NAD<sup>+</sup> zu NADH reduziert, welches somit als Substrat für Komplex I zur Verfügung steht. Das Oxalacetat wird mit Glutamat durch die Aspartat-Aminotransferase (AST) zu Aspartat und Alpha-Ketoglutarat verstoffwechselt und so steht Alpha-Ketoglutarat zum Austausch für Malat bereit. Das Aspartat dient als Austauschpartner für das Glutamat, welches so in die Matrix gelangt (14,70).

Das Alpha-Ketoglutarat, welches beim Malat-Aspartat-Shuttle entsteht, wird zusätzlich teilweise in den Citratzyklus eingeschleust. Das zugegebene Malat verhindert jedoch die Bildung von FADH<sub>2</sub>, welches ansonsten als Substrat für den Komplex II dienen könnte. Dieses wird normalerweise im Citratzyklus durch die Succinat-Dehydrogenase (= Komplex II) gebildet. Aus Malat entsteht jedoch Oxalacetat und Fumarat, welche die Succinat-Dehydrogenase hemmen und somit kann FADH<sub>2</sub> nicht entstehen (70).

Zur Stimulation von Komplex II werden Succinat und Rotenon verwendet. Succinat gelangt über den Austausch mit Hydrogenphosphat in die mitochondriale Matrix. Dort kann es direkt über den Komplex II zu FADH<sub>2</sub> und Fumarat verstoffwechselt werden. FADH<sub>2</sub> steht als Substrat für Komplex II zur Verfügung. Fumarat wird durch die Fumarase zu Malat und dieses wird durch die Malatdehydrogenase zu Oxalacetat umgewandelt. Bei diesem Schritt entsteht NADH, welches Komplex I stimulieren würde. Rotenon hemmt jedoch den Komplex I, wodurch eine alleinige Stimulation des Komplex II erreicht wird (70).

Mittels anschließender ADP-Zugabe wird ein Energiemangel vorgetäuscht, sodass die Atmungskette bzw. oxidative Phosphorylierung maximal stimuliert wird (14). Es kommt zu einem Sauerstoffverbrauch, der durch die Clark Elektrode gemessen wird und durch das Analyseprogramm von Strathkelvin visualisiert wird. In unseren Messungen wurde die Sauerstofflöslichkeit als 223 Mikromol (μmol) O<sub>2</sub>/l angenommen und die Respirationsraten in Nanomol (nmol)/Minute (min)/mg Protein angegeben.

### **2.5.3 Praktisches Vorgehen**

#### **2.5.3.1 Kalibrierung der Respirometrie**

Bevor mit den eigentlichen Messungen begonnen wurde, musste das Respirometer kalibriert werden. Dazu wurde als Positivkontrolle *Aqua destillata*, welches durch starkes Schütteln mit Sauerstoff angereichert wurde, in die Kammer des Respirometers gegeben, mit dem Stopfen dicht abgeschlossen und die Kalibrierung im Analyseprogramm gestartet. Die Positivkontrolle sollte dabei Werte von mindestens 500 Pikoampere (pA) erreichen. Falls das nicht der Fall war, wurde die Kalibrierung wiederholt. Als Negativkontrolle diente eine Lösung aus *Aqua destillata* mit Natriumsulfid, welches eine sauerstofffreie Lösung darstellt (69). Als Negativkontrolle sollten Werte von unter 50 pA erreicht werden.

### 2.5.3.2 Messungen

Es wurden sechs Messungen pro Metforminkonzentration (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 Millimolar (mM)) durchgeführt, das heißt insgesamt 30 Messungen. Der Ablauf der Respirometrie ist in Tabelle 2 dargestellt. Zu Beginn jeder Messung wurde in ein Reaktionsgefäß ein bestimmtes Verhältnis aus Homogenat und Respirationspuffer gegeben, sodass eine Proteinkonzentration von 6 mg/ml (*Colon*) bzw. 4 mg/ml (Leber) vorherrschte und die Menge 600 µl betrug. Da die mitochondriale Funktion unter möglichst physiologischen Bedingungen untersucht werden soll, wird bei *in vitro*-Experimenten ein Respirationspuffer genutzt, der möglichst funktionelle Mitochondrien generiert und mitochondriale Prozesse inhibiert, welche die Datenauswertung stören könnten (71). Bei Durchführung der Komplex II-Atmung wurde außerdem 0,5 Mikromolar (µM) Rotenon hinzugefügt. Zusätzlich wurden dann entweder 6 µl Metformin aus einer der fünf Konzentrationen oder Natriumchloridlösung (NaCl) zugegeben. Anschließend startete die Inkubationszeit von drei Minuten bei Raumtemperatur. Währenddessen wurden 550 µl dieser Mischung in die Kammer des Respirometers pipettiert. Mit dem Ende der Inkubationszeit wurde die Kammer mit dem Stopfen dicht abgeschlossen und die Messung im Analyseprogramm gestartet. Nach einer Minute wurden dann entweder 2,5 mM Glutamat und 2,5 mM Malat oder 10 mM (Leber) bzw. 5 mM (*Colon*) Succinat mit einer Mikroliterspritze hinzugegeben und nach zwei Minuten wurden 250 µM (Leber) bzw. 50 µM (*Colon*) ADP zur maximalen Stimulation der Atmungskette hinzugefügt. Die ADP-Konzentrationen wurden für die unterschiedlichen Gewebshomogenate empirisch angepasst (62). Nach 6 Minuten (*Colon*) bzw. 5 Minuten (Leber) wurde die Messung dann beendet. Je Homogenat wurden jeweils drei (*Colon*) bzw. zwei (Leber) Messungen pro Komplex I-Atmung und pro Komplex II-Atmung mit Zugabe von Metformin durchgeführt und jeweils drei (*Colon*) bzw. zwei (Leber) Messungen pro Komplex I-Atmung und pro Komplex II-Atmung mit Zugabe der Lösungssubstanz NaCl durchgeführt. Aus den Ergebnissen der Messungen wurde jeweils der Mittelwert berechnet.

Zeit	Komplex I-Atmung	Komplex II-Atmung
-3 min	Homogenat + Respirationspuffer + Metformin/NaCl	Homogenat + Respirationspuffer + Metformin/NaCl + Rotenon
0 min	Messung startet	
1 min	Zugabe von Glutamat + Malat	Zugabe von Succinat
2 min	Zugabe von ADP	
5 min (Leber)/ 6 min (Colon)	Messung endet	

**Tabelle 2: Ablauf der Respirometrie**

Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, min – Minute, NaCl – Natriumchlorid

### 2.5.3.3 Interpretation der respirometrischen Messungen

Die Stadien der mitochondrialen Atmung werden nach Chance und Williams (1956) folgendermaßen definiert (70):

*State 2:*

Die *State 2-Atmung* beginnt nach Zugabe der Substrate für die Atmungskette. Die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit ist noch sehr gering, da noch kein ADP vorhanden ist und sich die Atmungskette und Oxidative Phosphorylierung noch im Ruhezustand befindet.

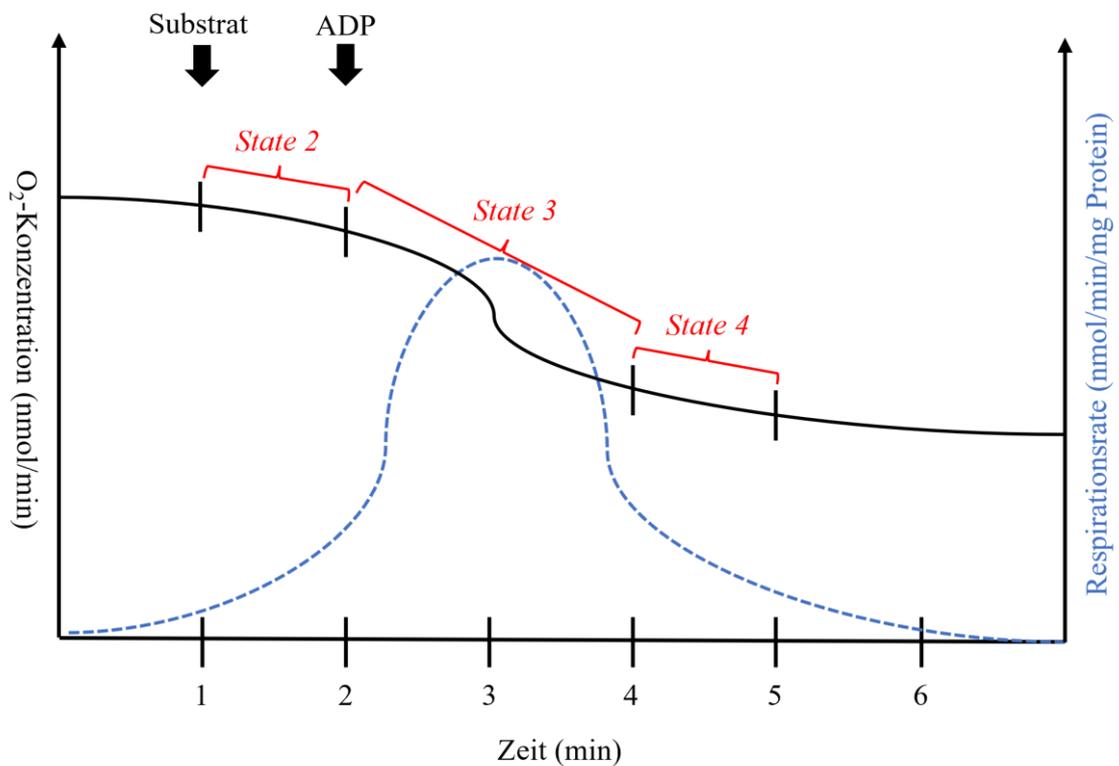
*State 3:*

Die *State 3-Atmung* beginnt nach der Zugabe von ADP. Die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit steigt auf das Maximum an, da das ADP einen Energiemangel anzeigt und die Atmungskette bzw. Oxidative Phosphorylierung somit maximal stimuliert.

*State 4:*

Die *State 4-Atmung* beginnt, sobald das gesamte ADP zu ATP phosphoryliert wurde. Aufgrund des Mangels an ADP nimmt die Atmungskette bzw. Oxidative

Phosphorylierung wieder den Ruhezustand an und die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit nimmt wieder ab.



**Abb. 6: Schematische Darstellungen des Kurvenverlaufs bei der Respirometrie**

Das Substrat für die Atmungskette wird nach der ersten Minute (min) hinzugegeben, das Adenosindiphosphat (ADP) nach der zweiten Minute. In *State 2* wird die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit/Respirationsrate nach Zugabe des Substrats gemessen, in *State 3* nach Zugabe des ADPs und in *State 4* nach Phosphorylierung des ADPs. Die Konzentration des Sauerstoffs ( $O_2$ ) wird in Nanomol (nmol) pro Minute (min) angegeben. Die Respirationsrate wird in nmol pro Minute pro mg (Milligramm) Protein angegeben.

Aus dieser Einteilung der Stadien der mitochondrialen Atmung werden außerdem der *Respiratory Control Index* (RCI) und die *ADP/O-Ratio* bestimmt (62).

*Respiratory Control Index* (RCI):

Der RCI errechnet sich aus dem Verhältnis von *State 3*- zu *State 2*-Atmung:

$$RCI = \frac{State\ 3}{State\ 2}$$

Er zeigt den Kopplungsgrad zwischen der Atmungskette und der ATP-Synthese an. Je kleiner der RCI ist, desto stärker ist die Entkopplung zwischen der Atmungskette und der ATP-Synthese. Denn je näher sich die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeiten der

beiden *States* kommen, desto geringer ist der Mehrantrieb durch ADP. Ist die Sauerstoffverbrauchsgeschwindigkeit bereits in *State 2* sehr hoch, muss die Atmungskette zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials dienen.

*ADP/O-Ratio:*

Die *ADP/O-Ratio* ist das Verhältnis der zugegebenen ADP-Menge zum Sauerstoffverbrauch in der *State 3-Atmung*. Damit stellt sie ein Maß für die Effizienz der Oxidativen Phosphorylierung dar. Bei vollständiger Entkopplung der Atmungskette von der ATP-Synthese beträgt die *ADP/O-Ratio* null.

#### **2.5.3.4 Qualitätskontrollen**

Zusätzlich zu den Messungen wurde jeweils eine Qualitätskontrolle je Homogenat durchgeführt, um die mitochondriale Integrität zu überprüfen. Dazu wurde eine Messung identisch zur Komplex II-Atmung mit der Lösungssubstanz NaCl gestartet. Nach Zugabe von Succinat und ADP wurden anschließend 2,5 µM Cytochrom c hinzugegeben, um die Integrität der äußeren mitochondrialen Membran zu überprüfen. Ein ausbleibender Anstieg der Sauerstoffverbrauchsrate bestätigte diese Integrität. Falls die äußere Membran während des Homogenisierungsprozesses beschädigt worden wäre, hätte sich das Cytochrom c von der inneren Membran entfernt und die Atmungskette hätte ohne Zugabe von Cytochrom c nicht ablaufen können. In dem Fall wäre es nach Zugabe von Cytochrom c zu einem starken Atmungsanstieg gekommen (62). Anschließend wurde 0,05 µg/ml Oligomycin in die Kammer gegeben. Oligomycin inhibiert die ATP-Synthase und überführt dadurch die Atmung von *State 3* in *State 2*. Die Atmungskette wird also nur noch durch das Bestreben der Aufrechterhaltung des Membranpotentials angetrieben. Wäre die innere Membran beschädigt worden und somit ein unkontrollierter Protonenfluss möglich, hätte die Sauerstoffverbrauchsrate nicht abgenommen (62,72). Bei den Leberhomogenaten wurde danach zusätzlich drei Mal 0,5 µM Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP) hinzugegeben. CCCP ist ein Entkoppler, der Protonen unabhängig von der ATP-Synthase über die innere Membran transportieren kann (73). Dadurch sollte der Sauerstoffverbrauch wieder ansteigen und in eine *State 3-Atmung* überführt werden (72). Zuletzt wurde den Homogenaten 2,5 µM Antimycin A zugeführt. Antimycin A blockiert den Komplex III der Atmungskette und hemmt somit den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (14). Demnach war ab diesem Zeitpunkt kein

Sauerstoffverbrauch mehr zu sehen. Wäre dieses trotzdem der Fall gewesen, wäre das ein Hinweis auf einen extramitochondrialen Sauerstoffverbrauch gewesen (74).

## **2.6 Statistik**

Der prozentuale Anteil der Mittelwerte der Messungen mit Metformin von den Kontrollmessungen mit NaCl (definiert als 100 %) wurde mittels Excel berechnet. Die weitere Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism® 8. Zuerst wurden die Daten auf eine Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Da die Daten nicht normalverteilt sind, wurde anschließend ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließender Dunn's-Korrektur durchgeführt. Daten mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Das Minimum, der Median und das Maximum werden als Tabelle und als Box-Plots für die *State 3-Atmung*, den RCI und die *ADP/O-Ratio* dargestellt.

### 3 Ergebnisse

Aufgrund der mangelnden bzw. widersprüchlichen Datenlage zu den Wirkungsmechanismen von Metformin, stellte sich die Frage, ob Metformin die mitochondriale Funktion in *Colon*- und Leberhomogenaten von gesunden Ratten dosisabhängig *in vitro* beeinflusst. Als Versuchstiere dienten dabei 30 Wistar-Ratten, welchen Leber und *Colon* entnommen wurden. Die mitochondriale Aktivität der organspezifischen Mitochondrien wurde dann mittels Respirometrie unter Zugabe unterschiedlicher Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mM) oder der Lösungssubstanz NaCl bestimmt. Unterschieden wurde dabei zwischen der Komplex I-Atmung, die durch die Zugabe von Glutamat und Malat ausgelöst wird und der Komplex II-Atmung, welche durch die Zugabe von Succinat und Rotenon ausgelöst wird.

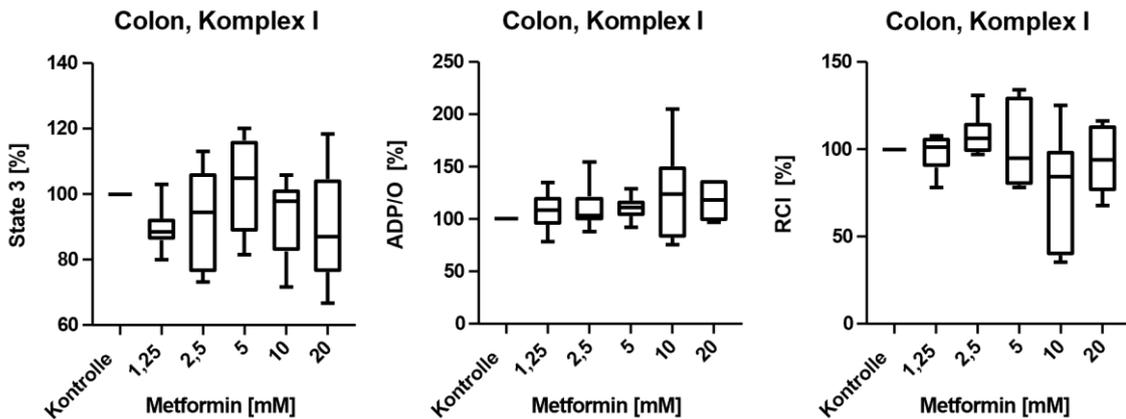
#### 3.1 *Colon*

##### 3.1.1 Komplex I - Glutamat-Malat

Die Zugabe der unterschiedlichen Metforminkonzentrationen beeinflusste die *State 3-Atmung*, den RCI und die *ADP/O-Ratio* bei der Komplex I-Atmung statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 7 und Tabelle 3).

##### 3.1.2 Komplex II - Succinat-Rotenon

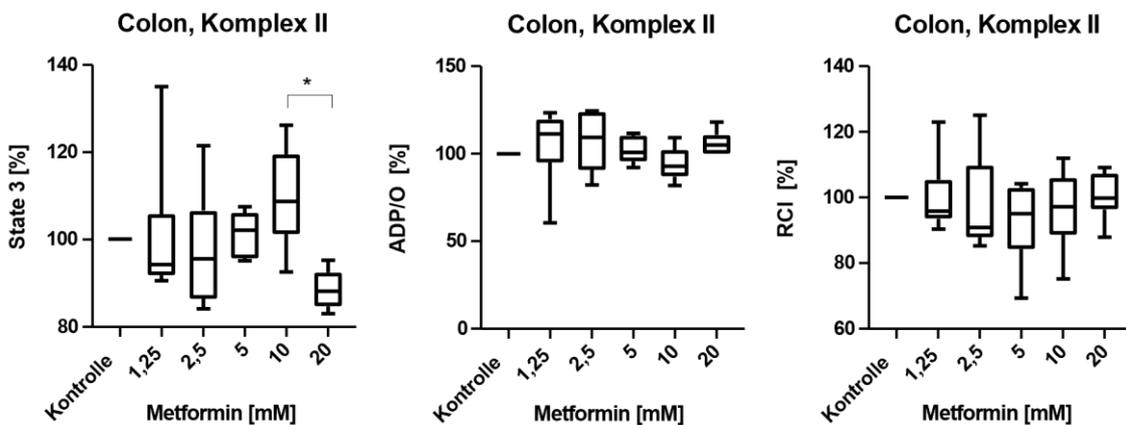
Bei der Komplex II-Atmung zeigte die *State 3-Atmung* nur zwischen der Metforminkonzentration von 10 mM und der Konzentration von 20 mM einen statistisch signifikanten Unterschied. Es wiesen jedoch beide Konzentrationen keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf. Der RCI und die *ADP/O-Ratio* unterschieden sich statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 8 und Tabelle 4).



**Abb. 7: Wirkung unterschiedlicher Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mM) auf die Komplex I-Atmung in Colonhomogenaten**

State 3-Atmung, ADP/O-Ratio und RCI für die Komplex I-Atmung (Glutamat-Malat) in Colonhomogenaten gesunder Wistar-Ratten. Die Daten sind als prozentualer Anteil von der Kontrollmessung mit Minimum, Median und Maximum dargestellt, n = 6, \* p < 0,05 zwischen den Gruppen.

Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, GM – Glutamat-Malat, mM – Millimolar, O – Sauerstoff, RCI – Respiratory Control Index



**Abb. 8: Wirkung unterschiedlicher Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mM) auf die Komplex II-Atmung in Colonhomogenaten**

State 3-Atmung, ADP/O-Ratio und RCI für die Komplex II-Atmung (Succinat-Rotenon) in Colonhomogenaten gesunder Wistar-Ratten. Die Daten sind als prozentualer Anteil von der Kontrollmessung mit Minimum, Median und Maximum dargestellt, n = 6, \* p < 0,05 zwischen den Gruppen.

Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, SR – Succinat-Rotenon, mM – Millimolar, O – Sauerstoff, RCI – Respiratory Control Index

	<u>State 3-Atmung</u>			<u>ADP/O</u>			<u>RCI</u>		
	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)
<b>Kontrolle</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Metformin 1,25 mM</b>	80	88,5	102,9	78,57	108,7	134,9	78,29	101,2	107,5
<b>Metformin 2,5 mM</b>	73,17	94,41	113	87,88	103,2	154,6	97,14	106,4	131,1
<b>Metformin 5 mM</b>	81,48	104,8	120	91,89	110,9	128,9	78,27	95,05	134,2
<b>Metformin 10 mM</b>	71,69	97,92	105,9	75,42	123,8	205,1	35,42	84,38	125,3
<b>Metformin 20 mM</b>	66,67	87	118,4	96,67	118,3	137,3	67,86	93,98	116,2

**Tabelle 3: Wirkung unterschiedlicher Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mM) auf die Komplex I-Atmung in Colonhomogenaten**  
*State 3-Atmung, ADP/O-Ratio* und RCI für die Komplex I-Atmung (Glutamat-Malat) in Colonhomogenaten gesunder Wistar-Ratten. Die Daten sind als prozentualer Anteil von der Kontrollmessung mit Minimum, Median und Maximum dargestellt, n = 6.

Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, mM – Millimolar, O – Sauerstoff, RCI – Respiratory Control Index

	<u>State 3-Atmung</u>			<u>ADP/O</u>			<u>RCI</u>		
	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)
<b>Kontrolle</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Metformin 1,25 mM</b>	90,59	94,28	135	60,47	111,5	123,5	90,46	95,9	123
<b>Metformin 2,5 mM</b>	84,09	95,53	121,4	82,14	109,3	124,4	85,29	90,92	125,1
<b>Metformin 5 mM</b>	95,08	102,1	107,6	92,31	100,9	111,8	69,29	95,02	104,2
<b>Metformin 10 mM</b>	92,5	108,7	126,2	82,05	93,08	109,4	75,22	97,23	112,1
<b>Metformin 20 mM</b>	83,02	88,12	95,16	100	105	118,2	87,87	99,81	109,2

**Tabelle 4: Wirkung unterschiedlicher Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mM) auf die Komplex II-Atmung in Colonhomogenaten**  
*State 3-Atmung, ADP/O-Ratio* und RCI für die Komplex I-Atmung (Succinat-Rotenon) in Colonhomogenaten gesunder Wistar-Ratten. Die Daten sind als prozentualer Anteil von der Kontrollmessung mit Minimum, Median und Maximum dargestellt, n = 6.

Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, mM – Millimolar, O – Sauerstoff, RCI – Respiratory Control Index

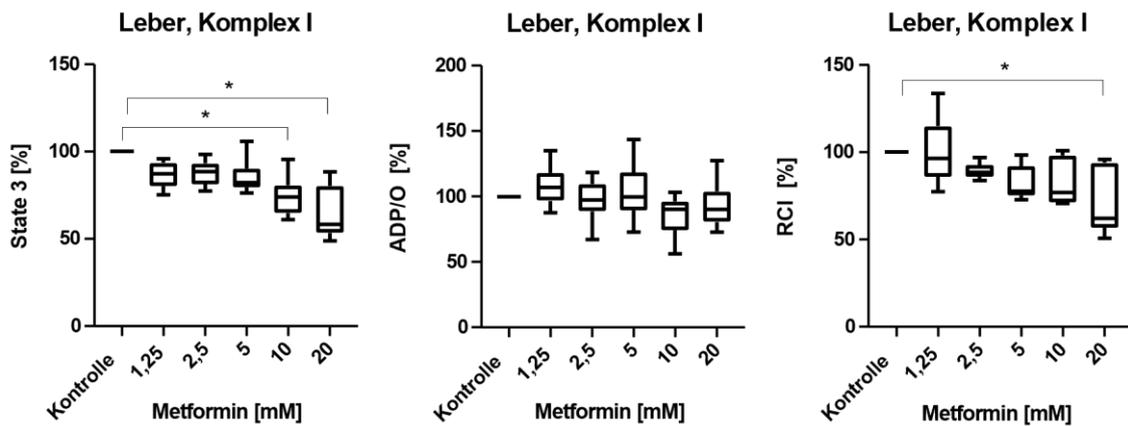
## **3.2 Leber**

### **3.2.1 Komplex I - Glutamat-Malat**

Bei der Komplex I-Atmung zeigte sich eine statistisch signifikante Verringerung des Medians der *State 3-Atmung* bei einer Metforminkonzentration von 10 mM und bei 20 mM gegenüber der Kontrolle. Bei einer Konzentration von 10 mM lag dieser bei 73,97 % und bei 20 mM bei 58,25 %. Die *ADP/O-Ratio* zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede. Der Median des RCI hingegen verringerte sich im Vergleich zur Kontrolle bei einer Konzentration von 20 mM statistisch signifikant mit einem Median von 61,95 % (siehe Abb. 9 und Tabelle 5).

### **3.2.2 Komplex II - Succinat-Rotenon**

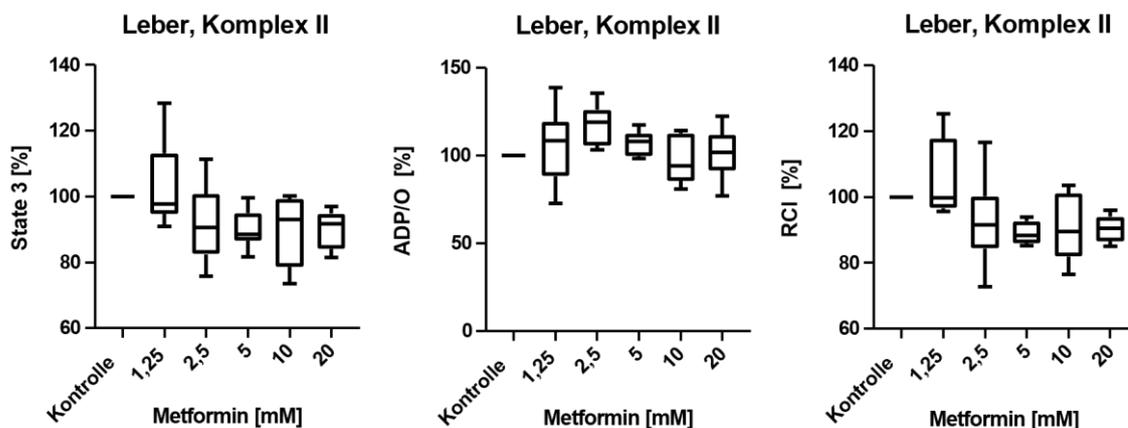
Die Zugabe der unterschiedlichen Metforminkonzentrationen beeinflusste die *State 3-Atmung*, den RCI und die *ADP/O-Ratio* bei der Komplex II-Atmung statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 10 und Tabelle 6).



**Abb. 9: Wirkung unterschiedlicher Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mM) auf die Komplex I-Atmung in Leberhomogenaten**

*State 3-Atmung*, *ADP/O-Ratio* und *RCI* für die Komplex I-Atmung (Glutamat-Malat) in Leberhomogenaten gesunder Wistar-Ratten. Die Daten sind als prozentualer Anteil von der Kontrollmessung mit Minimum, Median und Maximum dargestellt, n = 6, \*  $p < 0,05$  zwischen den Gruppen.

Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, GM – Glutamat-Malat, mM – Millimolar, O – Sauerstoff, RCI – *Respiratory Control Index*



**Abb. 10: Wirkung unterschiedlicher Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mM) auf die Komplex II-Atmung in Leberhomogenaten**

*State 3-Atmung*, *ADP/O-Ratio* und *RCI* für die Komplex II-Atmung (Succinat-Rotenon) in Leberhomogenaten gesunder Wistar-Ratten. Die Daten sind als prozentualer Anteil von der Kontrollmessung mit Minimum, Median und Maximum dargestellt, n = 6, \*  $p < 0,05$  zwischen den Gruppen.

Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, SR – Succinat-Rotenon, mM – Millimolar, O – Sauerstoff, RCI – *Respiratory Control Index*

	<u>State 3-Atmung</u>			<u>ADP/O</u>			<u>RCI</u>		
	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)
<b>Kontrolle</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Metformin 1,25 mM</b>	75,26	87,22	95,69	87,74	107,1	135,1	77,15	96,31	133,7
<b>Metformin 2,5 mM</b>	77,13	88,31	98,15	67,22	97,41	118,4	83,5	88,31	96,92
<b>Metformin 5 mM</b>	76,03	82,07	106	72,9	99,67	143,6	72,82	77,75	98,48
<b>Metformin 10 mM</b>	60,93	73,97 *	95,55	56,02	90,2	103,2	70,64	76,94	100,8
<b>Metformin 20 mM</b>	48,76	58,25 *	88	72,86	90,22	127,4	50,5	61,95*	95,67

**Tabelle 5: Wirkung unterschiedlicher Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mM) auf die Komplex I-Atmung in Leberhomogenaten**  
*State 3-Atmung, ADP/O-Ratio* und RCI für die Komplex I-Atmung (Glutamat-Malat) in Leberhomogenaten gesunder Wistar-Ratten. Die Daten sind als prozentualer Anteil von der Kontrollmessung mit Minimum, Median und Maximum dargestellt, n = 6, \* p < 0,05 gegenüber der Kontrolle.  
 Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, mM – Millimolar, O – Sauerstoff, RCI – Respiratory Control Index

	<u>State 3-Atmung</u>			<u>ADP/O</u>			<u>RCI</u>		
	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)
<b>Kontrolle</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<b>Metformin 1,25 mM</b>	90,97	97,78	128,4	72,64	108,5	138,6	95,71	99,86	125,4
<b>Metformin 2,5 mM</b>	75,88	90,69	111,4	103,2	119	135,5	72,75	91,59	116,6
<b>Metformin 5 mM</b>	81,63	88,53	99,65	98,21	108,1	117,6	85,25	88,34	93,96
<b>Metformin 10 mM</b>	73,65	93,07	100,3	80,77	94,07	114,1	76,5	89,49	103,5
<b>Metformin 20 mM</b>	81,45	91,71	96,94	77	101,8	122,3	84,99	90,41	95,89

**Tabelle 6: Wirkung unterschiedlicher Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mM) auf die Komplex II-Atmung in Leberhomogenaten**  
*State 3-Atmung*, *ADP/O-Ratio* und *RCI* für die Komplex I-Atmung (Succinat-Rotenzon) in Leberhomogenaten gesunder Wistar-Ratten. Die Daten sind als prozentualer Anteil von der Kontrollmessung mit Minimum, Median und Maximum dargestellt, n = 6.

Abkürzungen: ADP – Adenosindiphosphat, mM – Millimolar, O – Sauerstoff, RCI – Respiratory Control Index

## 4 Diskussion und Schlussfolgerungen

Aufgrund der mangelnden bzw. widersprüchlichen Datenlage zu den Wirkungsmechanismen von Metformin, stellte sich die Frage, ob Metformin die mitochondriale Funktion in *Colon*- und Leberhomogenaten von gesunden Ratten dosisabhängig *in vitro* beeinflusst.

Die Fragestellungen dieser Arbeit können wie folgt beantwortet werden:

1. Metformin beeinflusst *in vitro* die mitochondriale Funktion von *Colon*- und Leberhomogenaten organspezifisch. In den Leberhomogenaten konnte die Komplex I-Atmung gehemmt werden, wohingegen die Komplex II-Atmung nicht beeinflusst wurde. In den *Colonomogenaten* konnte sowohl bei der Komplex I- als auch bei der Komplex II-Atmung keine Beeinflussung der mitochondrialen Funktion nachgewiesen werden.
2. Die Wirkung von Metformin zeigte sich bei den Leberhomogenaten dosisabhängig. So wurde die Komplex I-Atmung mit zunehmender Metforminkonzentration gehemmt.

### 4.1 Methodendiskussion

Die angewandte Methodik ist gut etabliert und basiert auf bereits beschriebenen Studien der Arbeitsgruppe (60–62). Als Probenmaterial dienten Homogenate der Organe, wodurch ein Verlust von Mitochondrien bei deren Isolierung vermieden werden kann (75) und deren mögliche Verwendung anstelle von isolierten Mitochondrien gezeigt worden ist (56,75). Da sich die *Colonomogenate* im Gegensatz zu Leberhomogenaten jedoch nicht nur aus einer bestimmten Zelllinie zusammensetzen, sondern unter anderem auch aus Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Adipozyten bestehen, können sich die Ergebnisse der Studie nicht auf eine bestimmte Zelllinie beziehen (61). Um eine Beschädigung der Mitochondrien während des Homogenisierungsprozesses ausschließen zu können, wurden Qualitätskontrollen durchgeführt. Die Messungen wurden bei 30 °C durchgeführt, was zwar ein methodischer Standard jedoch kein physiologischer Zustand (circa 36 °C) ist (61). So konnten El-Mir et. al zeigen, dass die Hemmung der mitochondrialen Atmung durch Metformin temperaturabhängig ist und die Hemmung mit ansteigender Temperatur zunimmt (17). Unter physiologischen Temperaturen könnte demnach eine stärkere Atmungshemmung als die hier gemessene auftreten. Die Inkubationszeit von drei Minuten kann außerdem als zu kurz bewertet werden, jedoch

fanden Owen et. al heraus, dass eine Inkubationszeit von mehr als 10 Minuten bei physiologischen Temperaturen zu einem Verlust der mitochondrialen Integrität führt (12). Eine längere Inkubationszeit wäre demnach unter Einbeziehung der Messung von 5 (Leber) bzw. 6 Minuten (*Colon*) nicht möglich, ohne das Risiko einer Verfälschung der Messergebnisse einzugehen, auch wenn die Messungen nur bei 30 °C und nicht bei physiologischen Temperaturen durchgeführt wurden. Die genutzten Metforminkonzentrationen (1,25; 2,5; 5; 10 und 20 mM) erscheinen im Vergleich zur typischen Plasmakonzentration von Metformin beim Menschen von 8-24 µmol/l sehr hoch (76). Beachtet man jedoch die 30-300 Mal höher gemessenen Konzentrationen in jejunalen Proben und die gemessene hepatische Konzentration von 50-100 µmol/l in Kombination mit der 1000-fachen Akkumulation von Metformin im Mitochondrium aufgrund des positiv geladenen Metformins und der negativ geladenen Mitochondrienmatrix (76), lassen sich wahrscheinlich ähnliche Metforminkonzentrationen in menschlichen Darm- und Lebermitochondrien wiederfinden. So entsprechen die genutzten Konzentrationen denen von ähnlichen *in vitro* Experimenten (56). Da es sich bei dieser Studie um *in vitro* Experimente handelt, ist kein direkter Schluss der Ergebnisse auf die Metforminwirkung *in vivo* möglich. Auch eine direkte Übertragung der Ergebnisse von Ratten auf Menschen sollte nur mit großer Vorsicht geschehen.

## **4.2 Ergebnisdiskussion**

### **4.2.1 *Colon***

Das Interesse am *Colon* als möglichen zentralen Wirkort von Metformin hat in letzter Zeit stark zugenommen. So wurde beobachtet, dass Metformin im gesamten Darm akkumuliert und eine höhere Konzentration als im Plasma aufweist (47). Außerdem scheint neben einer erhöhten Glukoseverwertung ebenfalls die Laktatproduktion im Darm unter Metformingabe erhöht zu sein (49,52). So zeigten Schommers et al., dass Metformin den Glukosestoffwechsel zu Laktat im Darm erhöht und nehmen als Grund dafür, wie Yang et al. auch, die Inhibition der mitochondrialen Funktion bzw. Respiration an (48,53). In Zellen des Dünndarms konnte diese Inhibition, speziell des Komplexes I, gezeigt werden (48,53). Auch in *Colonkarzinomzellen* wurde eine Hemmung des Komplexes I beobachtet (23). Also stellte sich die Frage, ob eine Veränderung der mitochondrialen Funktion auch im *Colon* nachzuweisen ist. Die Messungen der Komplex I- und Komplex II-Atmung stellten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen

den genutzten Metforminkonzentrationen und der Kontrolle heraus. Die einzige statistische Signifikanz zeigte die *State 3-Atmung* zwischen einer Metforminkonzentration von 10 mM und 20 mM. Diese wurde jedoch nur durch die im Vergleich zur Kontrolle nicht statistisch signifikante Erhöhung (10 mM) bzw. Verringerung (20 mM) ausgelöst und ist daher nicht als auffälliges Ergebnis zu bewerten. Von den bereits beobachteten Inhibitionen der mitochondrialen Funktion ausgehend, wäre es zu erwarten gewesen, auch hier eine Hemmung nachweisen zu können. Mit diesen Versuchen konnte jedoch diese Hypothese nicht bestätigt werden. Dies kann auf unterschiedliche Gründe zurückzuführen sein. So könnte es sein, dass eine Wirkung nur bei bestimmten Spezies auftritt. Denn bisher wurde diese bei menschlichen *Colonkarzinomzellen* (23) und im Dünndarm von Mäusen gezeigt (48,53), nicht aber bei Ratten. Daher wäre es sinnvoll, menschliches *Colon* auf diese Wirkung zu untersuchen. Andererseits ist es auch denkbar, dass zwar im Dünndarm, nicht aber im *Colon* eine Komplex I-Inhibition stattfindet und sich die Wirkungsmechanismen zwischen den verschiedenen Darmabschnitten unterscheiden. Eine mitochondriale Beeinflussung durch Metformin könnte im *Colon* beispielsweise durch eine Hemmung der mitochondrialen Glycerophosphat-Dehydrogenase stattfinden, welche als allgemeiner Angriffspunkt bereits entschlüsselt wurde (34). Zusätzlich sollte man auch andere Zielorte als die Mitochondrien in Betracht ziehen. So zeigten Studien, dass Metformin das Mikrobiom (43) sowie die Sekretion von GLP-1, PYY und GDF-15, welche den Plasmaglukosespiegel senken bzw. ein Sättigungsgefühl auslösen, beeinflusst (44–46). Es ist somit davon auszugehen, dass dieses Medikament viele und unterschiedliche Effekte im gesamten Darm auslöst. Um ein genaueres Verständnis zu gewinnen, ist es nötig, weitere Studien zur Metforminwirkung im Darm durchzuführen.

#### **4.2.2 Leber**

Die Leber als zentraler Wirkort von Metformin wird schon lange diskutiert. So wurden einige Studien durchgeführt, die eine Komplex I-Hemmung der Atmungskette durch Metformin nachweisen konnten, jedoch Widersprüche bezüglich einer direkten oder indirekten Hemmung und notwendiger Wirkstoffkonzentrationen zeigten (12,13,17,56–59). Diese Komplex I-Hemmung konnte auch in den durchgeführten Messungen nachgewiesen werden. So ist die *State 3-Atmung* unter einer Metforminkonzentration von 10 mM um circa 26 % (Median: 73,97 %) und unter einer Metforminkonzentration von 20 mM um circa 42 % (Median: 58,25 %) statistisch signifikant geringer als bei der

Kontrolle. Der RCI wurde nur bei einer Metforminkonzentration von 20 mM um circa 48 % (Median: 61,95 %) im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant verringert. Da bei den Messungen ausschließlich Leberhomogenate genutzt wurden, die Zellen also bei den Messungen nicht mehr intakt waren, und eine Komplex I-Hemmung auftrat, kann dieses durch einen direkten Mechanismus erklärt werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einigen anderen Studien, die einen direkten Mechanismus auf die mitochondriale Atmung vermuteten (12,18,20) und im Widerspruch zu den Beobachtungen von El-Mir et. al, die nur eine Komplex I-Hemmung in intakten Zellen nachweisen konnten (17). Ob zusätzlich zu einem direkten Mechanismus auch eine indirekte Wirkung von Metformin besteht, kann jedoch mit diesen Versuchen nicht beurteilt werden. So könnte der Vorschlag von Hirsch et. al einer Kombination aus direkter und indirekter Inhibition möglich sein (22). Der Konflikt bezüglich einer irreversiblen und reversiblen Wirkweise kann in den durchgeführten Messungen auch nicht beurteilt werden. Bezüglich der benötigten Metforminkonzentration für eine Komplex I-Hemmung wurden unterschiedliche Konzentrationen unter jeweils unterschiedlichen Versuchsbedingungen wie zum Beispiel der Inkubationszeit beobachtet. Daher ist ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen Studien nur bedingt möglich. Sowohl El-Mir et. al als auch Owen et. al stellten bei einer Metforminkonzentration von 10 mM und einer kurzen Inkubationszeit (unter 5 Minuten) keine Komplex I-Inhibition bei isolierten Mitochondrien bzw. permeabilisierten Hepatozyten fest (12,17). Im Gegensatz dazu beobachteten Carvalho et. al ab 8 mM eine Komplex I-Hemmung unter einminütiger Inkubationszeit (57). In einer weiteren Studie, von Páleníčková et al., wurde eine Komplex I-Hemmung bereits ab 2,5-5 mM aufgezeigt. Diese Messungen sind vom Versuchsaufbau den hier durchgeführten Versuchen sehr ähnlich: Es wurden auch Leberhomogenate von Ratten genutzt, die Inkubationszeit betrug 3-5 Minuten (hier 3 Minuten) vor der Respirometrie und die genutzten Metforminkonzentrationen sind identisch. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte die Studie bei der *State 3-Atmung* bereits ab einer Metforminkonzentration von 5 mM eine statistisch signifikante Inhibition und erreichte bei 10-20 mM eine Inhibition von circa 80 % (56). Dahingegen konnte bei den hier durchgeführten Versuchen erst eine statistisch signifikante Verringerung der *State 3-Atmung* bei einer Metforminkonzentration von 10 mM erreicht werden und die Hemmung betrug bei 20 mM maximal circa 52 % (Minimum: 48,76 %). Der RCI zeigte bereits bei 2,5 mM eine statistisch signifikante Verringerung (56), hier erst bei 20 mM. Die *ADP/O-Ratio* zeigte,

wie bei den Versuchen der Studie von Carvalho et al., bei keiner der getesteten Metforminkonzentrationen eine statistische Veränderung (57).

Die Komplex II-Atmung zeigte keine Hemmung durch Metformin, wie es in einigen Studien bereits berichtet wurde (12,13,56).

### **4.3 Schlussfolgerungen**

Zusammenfassend kann mit dieser Studie der Wirkungsmechanismus von Metformin bezüglich der Komplex I-Hemmung in der Leber und die fehlende Wirkung auf Komplex II bestätigt werden. Der Komplex I wird dabei durch einen direkten Mechanismus und dosisabhängig gehemmt. Die erforderliche Dosis weicht jedoch teilweise von vergleichbaren Studien ab.

Eine Hemmung des Komplexes I oder II im *Colon* kann nicht nachgewiesen werden. Daher wäre es möglich, dass im *Colon* ausschließlich andere Wirkungsmechanismen von Metformin auftreten. Andererseits wäre es auch möglich, dass eine Hemmung der Atmungskette im menschlichen *Colon* auftritt, während diese im *Colon* von Ratten ausbleibt. Für eine weitere Charakterisierung der Wirkungsmechanismen wäre es daher sinnvoll, weitere Studien zur Atmungshemmung durch Metformin im menschlichen *Colon* und weitere Studien bezüglich anderer möglicher Wirkungsmechanismen im *Colon* durchzuführen.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Witters LA. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest.* Oktober 2001;108(8):1105–7.
2. Nationale VersorgungsLeitlinie Typ-2-Diabetes – Teilpublikation der Langfassung, 2. Auflage, Version 1. März 2021;88.
3. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care.* 16. Dezember 2021;45(Supplement\_1):S125–43.
4. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med.* 29. Februar 1996;334(9):574–9.
5. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, u. a. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 30. September 1993;329(14):977–86.
6. International evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome 2018. 2018 [zitiert 18. Januar 2022]; Verfügbar unter: <https://www.eshre.eu/Guidelines-and-Legal/Guidelines/Polycystic-Ovary-Syndrome>
7. Masoudi FA, Inzucchi SE, Wang Y, Havranek EP, Foody JM, Krumholz HM. Thiazolidinediones, metformin, and outcomes in older patients with diabetes and heart failure: an observational study. *Circulation.* 8. Februar 2005;111(5):583–90.
8. Yin M, van der Horst ICC, van Melle JP, Qian C, van Gilst WH, Silljé HHW, u. a. Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* August 2011;301(2):H459–468.
9. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ.* 4. Juni 2005;330(7503):1304–5.
10. Valencia WM, Palacio A, Tamariz L, Florez H. Metformin and ageing: improving ageing outcomes beyond glycaemic control. *Diabetologia.* September 2017;60(9):1630–8.
11. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, u. a. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* Februar 2011;50(2):81–98.
12. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 15. Juni 2000;348 Pt 3:607–14.
13. Stephenne X, Foretz M, Taleux N, van der Zon GC, Sokal E, Hue L, u. a. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia.* Dezember 2011;54(12):3101–10.
14. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Biochemie.* 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2016. 879 S. (Duale Reihe).

15. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* Januar 2002;82(1):47–95.
16. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 1. Januar 2009;417(1):1–13.
17. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 7. Januar 2000;275(1):223–8.
18. Wessels B, Ciapaite J, van den Broek NMA, Nicolay K, Prompers JJ. Metformin impairs mitochondrial function in skeletal muscle of both lean and diabetic rats in a dose-dependent manner. *PLoS One.* 2014;9(6):e100525.
19. Bridges HR, Jones AJY, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J.* 15. September 2014;462(Pt 3):475–87.
20. Andrzejewski S, Gravel SP, Pollak M, St-Pierre J. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer Metab.* 2014;2:12.
21. Detaille D, Guigas B, Leverve X, Wiernsperger N, Devos P. Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function. *Biochem Pharmacol.* 1. April 2002;63(7):1259–72.
22. Hirsch A, Hahn D, Kempná P, Hofer G, Nuoffer JM, Mullis PE, u. a. Metformin inhibits human androgen production by regulating steroidogenic enzymes HSD3B2 and CYP17A1 and complex I activity of the respiratory chain. *Endocrinology.* September 2012;153(9):4354–66.
23. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, u. a. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife.* 13. Mai 2014;3:e02242.
24. Vincent MF, Marangos PJ, Gruber HE, Van den Berghe G. Inhibition by AICA riboside of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. *Diabetes.* Oktober 1991;40(10):1259–66.
25. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature.* 14. Februar 2013;494(7436):256–60.
26. Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green KA, Evans A, Fogarty S, u. a. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab.* 9. Juni 2010;11(6):554–65.
27. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, DePinho RA, u. a. The Kinase LKB1 Mediates Glucose Homeostasis in Liver and Therapeutic Effects of Metformin. *Science.* 9. Dezember 2005;310(5754):1642–6.

28. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, u. a. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 15. Oktober 2001;108(8):1167–74.
29. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, u. a. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* Juli 2010;120(7):2355–69.
30. Pecinova A, Drahota Z, Kovalcikova J, Kovarova N, Pecina P, Alan L, u. a. Pleiotropic Effects of Biguanides on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:7038603.
31. Matsuzaki S, Humphries KM. Selective inhibition of deactivated mitochondrial complex I by biguanides. *Biochemistry.* 24. März 2015;54(11):2011–21.
32. LaMoia TE, Butrico GM, Kalpage HA, Goedeke L, Hubbard BT, Vatner DF, u. a. Metformin, phenformin, and galegine inhibit complex IV activity and reduce glycerol-derived gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8. März 2022;119(10):e2122287119.
33. Nesci S, Trombetti F, Ventrella V, Pagliarani A. Opposite Rotation Directions in the Synthesis and Hydrolysis of ATP by the ATP Synthase: Hints from a Subunit Asymmetry. *J Membr Biol.* 1. April 2015;248(2):163–9.
34. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, u. a. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature.* 26. Juni 2014;510(7506):542–6.
35. Chan NN, Brain HP, Feher MD. Metformin-associated lactic acidosis: a rare or very rare clinical entity? *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* April 1999;16(4):273–81.
36. Pecinová A, Brázdová A, Drahota Z, Houštek J, Mráček T. Mitochondrial targets of metformin—Are they physiologically relevant? *BioFactors.* 2019;45(5):703–11.
37. Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Legrand A, Beaudoux JL. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism.* 1. Juni 2005;54(6):829–34.
38. Hou X, Song J, Li XN, Zhang L, Wang X, Chen L, u. a. Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 28. Mai 2010;396(2):199–205.
39. Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M, u. a. The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin. *J Bioenerg Biomembr.* Februar 2006;38(1):33–42.
40. Hur KY, Lee MS. New mechanisms of metformin action: Focusing on mitochondria and the gut. *J Diabetes Investig.* November 2015;6(6):600–9.

41. Vasamsetti SB, Karnewar S, Kanugula AK, Thatipalli AR, Kumar JM, Kotamraju S. Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. *Diabetes*. Juni 2015;64(6):2028–41.
42. Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. Januar 2013;62(1):194–204.
43. Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, u. a. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*. Mai 2014;63(5):727–35.
44. Preiss D, Dawed A, Welsh P, Heggie A, Jones AG, Dekker J, u. a. Sustained influence of metformin therapy on circulating glucagon-like peptide-1 levels in individuals with and without type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19(3):356–63.
45. Sun EW, Martin AM, Wattchow DA, de Fontgalland D, Rabbitt P, Hollington P, u. a. Metformin Triggers PYY Secretion in Human Gut Mucosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 1. Juli 2019;104(7):2668–74.
46. Coll AP, Chen M, Taskar P, Rimmington D, Patel S, Tadross JA, u. a. GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance. *Nature*. Februar 2020;578(7795):444–8.
47. Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst*. Januar 1994;24(1):49–57.
48. Yang M, Darwish T, Larraufie P, Rimmington D, Cimino I, Goldspink DA, u. a. Inhibition of mitochondrial function by metformin increases glucose uptake, glycolysis and GDF-15 release from intestinal cells. *Sci Rep*. 28. Januar 2021;11(1):2529.
49. Bailey CJ, Mynett KJ, Page T. Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization. *Br J Pharmacol*. Juni 1994;112(2):671–5.
50. Koffert JP, Mikkola K, Virtanen KA, Andersson AMD, Faxius L, Hällsten K, u. a. Metformin treatment significantly enhances intestinal glucose uptake in patients with type 2 diabetes: Results from a randomized clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract*. September 2017;131:208–16.
51. Ito J, Nogami M, Morita Y, Sakaguchi K, Komada H, Hirota Y, u. a. Dose-dependent accumulation of glucose in the intestinal wall and lumen induced by metformin as revealed by <sup>18</sup>F-labelled fluorodeoxyglucose positron emission tomography-MRI. *Diabetes Obes Metab*. 2021;23(3):692–9.
52. Wilcock C, Bailey CJ. Sites of metformin-stimulated glucose metabolism. *Biochem Pharmacol*. 1. Juni 1990;39(11):1831–4.

53. Schommers P, Thureau A, Bultmann-Mellin I, Guschlbauer M, Klatt AR, Rozman J, u. a. Metformin causes a futile intestinal-hepatic cycle which increases energy expenditure and slows down development of a type 2 diabetes-like state. *Mol Metab.* Juli 2017;6(7):737–47.
54. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, u. a. Mechanism by Which Metformin Reduces Glucose Production in Type 2 Diabetes. *Diabetes.* Dezember 2000;49(12):2063–9.
55. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, u. a. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest.* Mai 2007;117(5):1422–31.
56. Páleníčková E, Cahová M, Drahota Z, Kazdová L, Kalous M. Inhibitory effect of metformin on oxidation of NADH-dependent substrates in rat liver homogenate. *Physiol Res.* 2011;60(5):835–9.
57. Carvalho C, Correia S, Santos MS, Seíça R, Oliveira CR, Moreira PI. Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment. *Mol Cell Biochem.* Januar 2008;308(1–2):75–83.
58. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, u. a. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes.* April 2004;53(4):1052–9.
59. Cameron AR, Logie L, Patel K, Erhardt S, Bacon S, Middleton P, u. a. Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox Biol.* 1. April 2018;14:187–97.
60. Herminghaus A, Buitenhuis AJ, Schulz J, Vollmer C, Scheeren TWL, Bauer I, u. a. Propofol improves colonic but impairs hepatic mitochondrial function in tissue homogenates from healthy rats. *Eur J Pharmacol.* 15. Juni 2019;853:364–70.
61. Herminghaus A, Laser E, Schulz J, Truse R, Vollmer C, Bauer I, u. a. Pravastatin and Gemfibrozil Modulate Differently Hepatic and Colonic Mitochondrial Respiration in Tissue Homogenates from Healthy Rats. *Cells.* 27. August 2019;8(9):E983.
62. Herminghaus A, Buitenhuis AJ, Schulz J, Truse R, Vollmer C, Relja B, u. a. Indomethacin Increases the Efficacy of Oxygen Utilization of Colonic Mitochondria and Uncouples Hepatic Mitochondria in Tissue Homogenates From Healthy Rats. *Front Med.* 2020;7:463.
63. Tokiwa T, Hoshika T, Shiraishi M, Sato J. Mechanism of cell dissociation with trypsin and EDTA. *Acta Med Okayama.* 1979;
64. Simpson RJ. Homogenization of Mammalian Tissue. *Cold Spring Harb Protoc.* 7. Januar 2010;2010(7):pdb.prot5455.
65. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* November 1951;193(1):265–75.

66. Shen CH. Chapter 8 - Quantification and Analysis of Proteins. In: Shen CH, Herausgeber. *Diagnostic Molecular Biology* [Internet]. Academic Press; 2019 [zitiert 25. Januar 2022]. S. 187–214. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128028230000080>
67. Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem*. April 1999;29(2):99–108.
68. Frese JP, Gratl A, Raude B, Speichinger F, Pesta D, Greiner A. Hochauflösende Respirometrie zur Beurteilung der Mitochondrienfunktion bei PAVK. *Gefässchirurgie*. 1. Juli 2020;25(4):226–31.
69. Strathkelvin Instruments Limited. electrode-manual [Internet]. 2015 [zitiert 28. Januar 2022]. Verfügbar unter: <https://www.strathkelvin.com/wp-content/uploads/2015/04/electrode-manual.pdf>
70. Gnaiger E. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*. 2012;65.
71. Wollenman LC, Vander Ploeg MR, Miller ML, Zhang Y, Bazil JN. The effect of respiration buffer composition on mitochondrial metabolism and function. *PloS One*. 2017;12(11):e0187523.
72. Divakaruni AS, Rogers GW, Murphy AN. Measuring Mitochondrial Function in Permeabilized Cells Using the Seahorse XF Analyzer or a Clark-Type Oxygen Electrode. *Curr Protoc Toxicol*. 2014;60(1):25.2.1-25.2.16.
73. Königshoff M, Brandenburger T. *Kurzlehrbuch Biochemie*. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018.
74. Malagrinò F, Zuhra K, Mascolo L, Mastronicola D, Vicente JB, Forte E, u. a. Hydrogen Sulfide Oxidation: Adaptive Changes in Mitochondria of SW480 Colorectal Cancer Cells upon Exposure to Hypoxia. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:8102936.
75. Pecinová A, Drahota Z, Nůsková H, Pecina P, Houšťek J. Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion*. 2. Juni 2011;11:722–8.
76. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. September 2017;60(9):1577–85.

## 6 Anhang

### 6.1 Chemikalien und Reagenzien

<b>ADP (Adenosindiphosphat)</b>	A5285 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>Antimycin A</b>	A8674 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>BSA <i>fatty acid free (bovine serum albumine)</i></b>	A6003 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>BSA</b>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
<b>Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP)</b>	C2759 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b><i>cOmplete™ (Protease Inhibitor Cocktail)</i></b>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
<b>Cytochrom c</b>	C2037 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>di-Kaliumhydrogenphosphat</b>	1.05104.1000 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Dimethylsulfoxid</b>	D-8418 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>EGTA</b>	3054.1 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b><i>Folin &amp; Ciocalteu's phenol reagent</i></b>	F9252 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>Glutamat</b>	49621 Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
<b>Kaliumchlorid</b>	6781.1 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	4873 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kupfersulfat-Pentahydrat</b>	1.02790.0250 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat</b>	1.08087.0500 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Malat</b>	11050 Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Mannitol</b>	4175.1 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland

<b>Metforminhydrochlorid</b>	PHR1084 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>MOPS</b>	6979.4 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>NaCl 0,9 % (Isotonische Kochsalzlösung)</b>	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
<b>Natriumcarbonat</b>	71350 Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
<b>Natriumhydroxid</b>	6751.1 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Oligomycin</b>	495455 EMD Chemicals, San Diego, USA
<b>Rotenon</b>	R8875 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>Succinat</b>	S2378, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>D(+)-Saccharose</b>	4621.2 Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Sodiumsulfid</b>	S4672 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>Tetrasodiumpyrophosphat</b>	P8010 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
<b>Trypsin-EDTA 0,05 %</b>	Life Technologies Limited, Paisley, Vereinigtes Königreich

## 6.2 Lösungen und Puffer

<b>Colon-Isolationspuffer (pH 7,15)</b>	200 mM Mannitol  50 mM D(+)-Saccharose  5 mM Kaliumdihydrogenphosphat  5 mM 3-MOPS  0,1 %iges <i>BSA fatty acid free</i>  1 mM EGTA  Vor Gebrauch wurden zusätzlich 20 mg BSA/ml hinzugefügt.
<b>Colon-Respirationspuffer (pH 7,4)</b>	130 mM Kaliumchlorid  5 mM di-Kaliumhydrogenphosphat  20 mM MOPS  2,5 mM EGTA  1 $\mu$ M Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Tetrasodiumpyrophosphat  0,1 %iges BSA  Vor Gebrauch wurden zusätzlich 20 mg BSA/ml hinzugefügt.
<b>Leber-Isolationspuffer (pH 7,15)</b>	200 mM Mannitol  50 mM D(+)-Saccharose  5 mM Kaliumdihydrogenphosphat  5 mM 3-MOPS  0,1 %iges <i>BSA fatty acid free</i>  1 mM EGTA
<b>Leber-Respirationspuffer (pH 7,4)</b>	130 mM Kaliumchlorid  5 mM di-Kaliumhydrogenphosphat  20 mM MOPS  2,5 mM EGTA

	<p>1 <math>\mu\text{M}</math> <math>\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7</math> Tetrasodiumpyrophosphat</p> <p>0,1 %iges BSA</p>
<p><b>Lowry Lösung 1</b></p> <p><b>8 ml Reagenz A</b></p> <p><b>80 <math>\mu\text{l}</math> Reagenz B</b></p> <p><b>80 <math>\mu\text{l}</math> Reagenz C</b></p>	<p>10 g Natriumcarbonat in 0,5 l 0,1 M Natriumhydroxid lösen</p> <p>2 g Kalium-Natrium-Tartrat in 100 ml <i>Aqua destillata</i> lösen</p> <p>1 g Kupfersulfat-Pentahydrat in 100 ml <i>Aqua destillata</i> lösen</p>
<p><b>Lowry Lösung 2</b></p>	<p>4 ml Folin</p> <p>4 ml <i>Aqua destillata</i></p>

### 6.3 Material und Geräte

<b>96-Well-Platte</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
<b>Analyseprogramm zur Respirometrie</b>	782 System Version 4.4 HID, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland
<b>Wasserbad</b>	JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland
<b>Eismaschine</b>	AF80, Scotsman, Mailand, Italien
<b>Falcon</b>	Falcon™ 15 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
<b>Falcon</b>	Falcon™ 50 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
<b>Homogenisatorgefäß</b>	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
<b>Microplate-Reader</b>	Synergy 2 Plate Reader, Gen5.1.11 Data Analysis Software, BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA
<b>Mikroliterspritze 25 µl</b>	E121.1, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>MT200-Respirometer</b>	Strathkelvin Instruments, Motherwell, Großbritannien
<b>Oximeter</b>	Oxygen Meter Model 782; Strathkelvin Instruments, Motherwell, Großbritannien
<b>pH-Meter</b>	Digital-pH-Meter 646, Laborausrüstung Klees, Düsseldorf, Deutschland
<b>Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml)</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>Pipettenspitzen (1000 µl)</b>	TipOne 1000 µl Graduated Tip, Starlab (UK) LTD, Milton Keynes, Vereinigtes Königreich
<b>Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl)</b>	Tip StackPack, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
<b>Pipettenspitzen (5 ml)</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>Reaktionsgefäße (0,5 ml)</b>	Safe-Lock-Tubes 0,5 ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)</b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

<b>Teflonkolben</b>	IKA Eurostar 20 digital Homogenisator, IKA GmbH + Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
<b>Vortexgerät</b>	Vortex Genie Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
<b>Waage</b>	BP1200, Sartorius, Göttingen, Deutschland
<b>Waage</b>	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Olaf Picker für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anna Herminghaus für ihre enorme Unterstützung in jeder Phase der Fertigstellung dieser Arbeit, für die hervorragende Betreuung und für das mühevollen Korrekturlesen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Inge Bauer für jegliche Unterstützung bedanken.

Auch bei Frau Claudia Dohle und Frau Birgit Berke möchte ich mich bedanken, die durch ihr Wissen im Labor jederzeit eine große Hilfe waren.

Ein besonders großes Dankeschön möchte ich meinen Eltern, meinen beiden Schwestern und meinem Freund aussprechen. Danke, dass ihr immer für mich da seid, mich unterstützt und aufmuntert.

Auch meinen Freunden danke ich für jede Unterstützung und alle lieben Worte.