

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Der Einfluss von Vasopressin und positiven  
Inotropika auf die mitochondriale Funktion im Colon  
von septischen Ratten**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sarah Orzol

2026

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. med. Anna Herminghaus

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

**Für meinen Papa**

30.11.1961 – 29.12.2020

In ewiger Liebe und Dankbarkeit

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Marcus, C., Hof, S., Thelen, P., Gesing, A., Vocke, A., Orzol, S., Schulz, J., Truse, R., Vollmer, C., Bauer, I., Picker, O., Herminghaus, A., 2026, Effects of Dobutamine and Vasopressin on Microcirculation and Mitochondrial function in the Liver and Colon of septic Rats – A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Shock*. 65(3), 505–516

Marcus, C., Hof, S., Thelen, P., Gesing, A., Vocke, A., Orzol, S., Schulz, J., Truse, R., Kuebart, A., Vollmer, C., Bauer, I., Picker, O., Herminghaus, A., 2026, Milrinone and levosimendan improve microvascular perfusion in septic rats: a randomized, placebo-controlled trial. *Intensive Care Med Exp*. 14 (1), 30

## Zusammenfassung

Trotz der Fortschritte in Diagnostik und Therapie stellt die Sepsis auch heute noch eine große Herausforderung in der Intensivmedizin dar und ist weltweit die führende infektionsbedingte Todesursache.

Die Pathophysiologie der Sepsis ist äußerst komplex und umfasst mehrere Störungen in verschiedenen Organsystemen. Im Colon wird eine gestörte Barrierefunktion als wesentlicher Faktor für das Fortschreiten der Erkrankung angesehen. Die gestörte Barrierefunktion wird auf eine dysfunktionale Mikrozirkulation im Bereich des Colons zurückgeführt, die sich ebenfalls negativ auf die Mitochondrienfunktion auswirken kann. Es gibt Hinweise darauf, dass Vasopressin sowie die positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon die Mikrozirkulation im Colon verbessern können. Jedoch ist bisher wenig über ihre Wirkung auf die Mitochondrien im Colon bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob diese Medikamente einzeln oder in Kombination (Vasopressin + Inotropikum) die Mitochondrienfunktion im Colon von septischen Ratten beeinflussen. Hierzu wurden acht Versuchsgruppen gebildet und die Mitochondrienfunktion anhand zweier Untersuchungsmethoden beurteilt. Erstens wurde die mitochondriale Atmung in Colon-Homogenaten mittels Respirometrie analysiert, wobei die States 2–4 der mitochondrialen Atmung gemessen und der *Respiratory Control Index (RCI, State 3/State 2)* sowie die *ADP/O-Ratio* berechnet wurden. Zweitens wurde der oxidative Stress im Gewebe quantifiziert, indem die Malondialdehyd-Konzentration in Colon-Homogenaten bestimmt wurde.

In Monotherapie zeigten die untersuchten Medikamente keine signifikanten Veränderungen der mitochondrialen Funktion. Unter den Kombinationstherapien führte nur Vasopressin + Dobutamin an Komplex I zu einer signifikanten Reduktion der State-2-Atmung bei entsprechend erhöhtem RCI, während sich für die übrigen Kombinationen keine signifikanten Effekte zeigten. Diese Ergebnisse deuten zwar auf eine Beeinflussung einzelner respiratorischer Parameter hin, erlauben jedoch keine Schlussfolgerung auf eine Verbesserung der mitochondrialen Gesamtfunktion. Insgesamt konnte somit weder ein therapeutischer Nutzen noch eine schädliche Wirkung der untersuchten Medikamente auf die mitochondriale Funktion im Colon bei Sepsis abgeleitet werden.

## Summary

Despite advances in diagnosis and treatment, sepsis remains a major challenge in intensive care medicine and is the leading cause of infection-related death worldwide.

The pathophysiology of sepsis is highly complex and involves multiple disorders in different organ systems. In the colon, impaired barrier function is considered a key factor in disease progression. This barrier dysfunction is attributed to a dysfunctional microcirculation in the colon, which may also negatively affect mitochondrial function. There is evidence that vasopressin and the positive inotropic agents dobutamine, levosimendan and milrinone can improve colonic microcirculation. However, little is known about their effect on colonic mitochondria.

The aim of the present study was therefore to investigate whether these drugs, administered alone or in combination (vasopressin + positive inotropic agent), affect mitochondrial function in the colon of septic rats. Eight experimental groups were established, and mitochondrial function was assessed using two approaches. First, mitochondrial respiration in colon homogenates was analysed by respirometry, measuring states 2–4 of mitochondrial respiration and calculating the respiratory control index (RCI, State 3/State 2) as well as the ADP/O ratio. Second, oxidative stress in the tissue was quantified by determining malondialdehyde concentration in colon homogenates.

In monotherapy, the investigated drugs did not produce significant changes in mitochondrial function. Among the combination therapies, only vasopressin + dobutamine at complex I led to a significant reduction in state-2 respiration with a corresponding increase in RCI, whereas no significant effects were observed for the other combinations. These results suggest an influence on individual respiratory parameters but are insufficient to conclude an improvement of global mitochondrial function. Overall, neither a therapeutic benefit nor a detrimental effect of the tested drugs on colonic mitochondrial function in sepsis could be demonstrated.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>3-MOPS</b>	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>Ag</b>	Silber
<b>AP-1</b>	<i>Activator protein 1</i>
<b>Az.</b>	Aktenzeichen
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>CASP</b>	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>
<b>CLP</b>	<i>Cecal ligation and puncture</i>
<b>cmH<sub>2</sub>O</b>	Zentimeter Wassersäule
<b>Cu</b>	Kupfer
<b>DAMP</b>	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
<b>dest.</b>	destilliert
<b>dl</b>	Deziliter
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>e<sup>-</sup></b>	Elektron
<b>EGTA</b>	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<b>et al.</b>	<i>et alii</i>
<b>FAD<sup>+</sup>/FADH<sub>2</sub></b>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
<b>FELASA</b>	<i>Federation for Laboratory Animal Science Associations</i>
<b>FiO<sub>2</sub></b>	<i>Fraction of inspired oxygen</i>
<b>G</b>	Gauge
<b>GOT</b>	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
<b>h</b>	Stunde(n)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>IHME</b>	<i>Institute for Health Metrics and Evaluation</i>
<b>i.v.</b>	intravenös
<b>K<sub>ATP</sub></b>	ATP-abhängiger Kaliumkanal
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid

## IV

<b>M</b>	Molar (Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mol/Liter)
<b>MAD</b>	Mittlerer arterieller Druck
<b>MDA</b>	Malondialdehyd
<b>MDH</b>	Malat-Dehydrogenase
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MG</b>	Molekulargewicht
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar (Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mmol/Liter)
<b>MMDS</b>	<i>Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome</i>
<b>mmHg</b>	Millimeter-Quecksilbersäule
<b>mU</b>	Milli-Unit
<b>n</b>	Anzahl
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Natriumcarbonat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NAD<sup>+</sup>/NADH/H<sup>+</sup></b>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<b>nl</b>	Nanoliter
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Hyperoxidanion
<b>OH<sup>-</sup></b>	Hydroxidion
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrit
<b>OP</b>	Operation
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
<b>P<sub>a</sub>O<sub>2</sub></b>	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
<b>PDE-3</b>	Phosphodiesterase 3
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptor</i>
<b>RCI</b>	<i>Respiratory Control Index</i>
<b>RCR</b>	<i>Respiratory Control Ratio</i>
<b>RNS</b>	<i>Reactive nitrogen species</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>

<b>rpm</b>	<i>Revolutions per minute</i>
<b>s.c.</b>	subkutan
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SOFA-Score</b>	<i>Sepsis-related organ failure assessment score</i>
<b>SRSS</b>	<i>Septic Rat Severity Scores</i>
<b>t</b>	Zeit
<b>vs.</b>	versus
<b>Vol.-%</b>	Volumenprozent
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem
<b><math>\Delta O_2</math></b>	Sauerstoffverbrauch
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	Mikrogramm
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	Mikroliter
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	Mikromolar (Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht $\mu\text{mol/Liter}$ )

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Sepsis: Definition und Epidemiologie	1
1.2	Pathophysiologie der Sepsis	2
1.2.1	Immunologische Pathogenese	2
1.2.2	Mikrozirkulatorische Dysfunktion	4
1.2.3	Die Rolle der Mitochondrien	6
1.3	Neue Therapieansätze	10
1.3.1	Vasopressin	10
1.3.2	Positive Inotropika	11
1.4	Ziele der Arbeit	14
<b>2</b>	<b>Methodik</b>	<b>16</b>
2.1	Versuchstiere	16
2.2	Versuchsablauf	16
2.3	CASP-Operation	17
2.4	Untersuchung der Mikrozirkulation	19
2.5	Organentnahme	20
2.6	Gewebehomogenisierung	20
2.7	Proteinbestimmung nach Lowry	21
2.7.1	Prinzip	21
2.7.2	Praktisches Vorgehen	21
2.8	Respirometrie	23
2.8.1	Prinzip	23
2.8.2	Praktisches Vorgehen	27
2.8.3	Qualitätskontrolle	28
2.9	MDA-Assay	30
2.9.1	Prinzip	30
2.9.2	Praktisches Vorgehen	30
2.10	Statistik	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1	Respirometrie	32
3.1.1	Dobutamin	32
3.1.2	Levosimendan	34
3.1.3	Milrinon	36
3.2	MDA-Assay	38

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>39</b>
4.1	Hauptergebnisse .....	39
4.2	Methodendiskussion .....	40
4.2.1	Tierexperimentelle Sepsis-Modelle.....	40
4.2.2	Medikation .....	41
4.2.3	Messung der mitochondrialen Funktion .....	42
4.3	Ergebnisdiskussion .....	43
4.3.1	Dobutamin.....	43
4.3.2	Levosimendan .....	46
4.3.3	Milrinon .....	47
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	49
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>57</b>
6.1	Materialien und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils.....	57
6.2	Materialien und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils .....	58
6.3	Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils.....	59
6.4	Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils .....	60

# 1 Einleitung

## 1.1 Sepsis: Definition und Epidemiologie

Sepsis bezeichnet eine akut lebensbedrohliche Organdysfunktion infolge einer fehlregulierten Immunantwort auf eine Infektion [1]. Das Ausmaß der Organdysfunktion kann anhand eines Anstiegs des intensivmedizinischen Sequential Organ Failure Assessment Scores (SOFA-Score) um  $\geq 2$  Punkte erfasst werden [2]. Der SOFA-Score basiert auf der Beurteilung von sechs Organsystemen anhand spezifischer Parameter. Jedes Organsystem wird auf einer Skala von 0 Punkten (= normale Funktion) bis 4 Punkten (= massiv gestörte Funktion) bewertet. Die Summe der Punkte der jeweiligen Organsysteme ergibt den SOFA-Score. Ein hoher Score geht mit einer erhöhten Sterblichkeitswahrscheinlichkeit einher und wird daher in der Klinik auch als Prädiktor der Mortalität herangezogen [1].

Organ	Parameter	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte
Lunge	Oxygenierungsindex $P_aO_2/FiO_2$	< 400 mmHg	< 300 mmHg	< 200 mmHg (Beatmung)	< 100 mmHg (Beatmung)
Niere	Kreatinin (mg/dl)	1,2–1,9	2,0–3,4	3,5–4,9 bzw. Oligurie	$\geq 5$ bzw. Anurie
Leber	Bilirubin (mg/dl)	1,2–1,9	2,0–5,9	6–11,9	$\geq 12$
Kreislauf	MAD ( $\pm$ Katecholamine)	< 70	Niedrige Katecholamindosis	Mittlere Katecholamindosis	Hohe Katecholamindosis
Blutbild	Thrombozytenanzahl	< 150/nl	< 100/nl	< 50/nl	< 20/nl
ZNS	Glasgow Coma Scale	13–14	10–12	6–9	< 6

**Tabelle 1: SOFA-Score [1]**

dl = Deziliter,  $FiO_2$  = *Fraction of inspired oxygen*, MAD = mittlerer arterieller Druck, mg = Milligramm, mmHg = Millimeter-Quecksilbersäule, nl = Nanoliter,  $P_aO_2$  = arterieller Sauerstoffpartialdruck, ZNS = zentrales Nervensystem

Eine Sepsis kann sich aus jedem Infektionsfokus entwickeln. Am häufigsten sind Infektionen der Atemwege, des Bauchraums und der Harnwege verantwortlich. Zu den häufigsten Erregern gehören Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*, gefolgt von Pilzen und Viren [3].

Die schwerste Form der Sepsis wird als septischer Schock bezeichnet. Ein septischer Schock liegt vor, wenn eine arterielle Hypotonie trotz adäquater Volumensubstitution persistiert und nur durch den Einsatz von Vasopressoren ein mittlerer arterieller Druck von  $\geq 65$  mmHg aufrechterhalten werden kann. Zusätzlich muss der Laktatspiegel im Blut bei  $> 2$  mmol/l liegen [1].

Die Sepsis stellt ein häufiges Krankheitsbild dar, welchem weltweit eine hohe medizinische Bedeutung zukommt. Laut einer Studie des Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) kann für das Jahr 2017 weltweit von rund 49 Millionen Sepsisfällen und 11 Millionen sepsisassoziierten Todesfällen ausgegangen werden, was einer Bevölkerungsinzidenz von 677,5 pro 100.000 Personenjahre entspricht [4]. In Deutschland wird die Inzidenz auf 158 pro 100.000 Einwohner geschätzt und ist damit drei- bis fünfmal niedriger als in anderen Ländern [5]. Dennoch stellt die Sepsis auch in Deutschland eine medizinische Herausforderung dar und zählt zu den häufigsten Behandlungsanlässen auf Intensivstationen. So lag die Punktprävalenz der Sepsis in Deutschland bei 17,9 % unter Intensivpatienten [6].

## 1.2 Pathophysiologie der Sepsis

### 1.2.1 Immunologische Pathogenese

Sepsis entsteht infolge einer überschießenden Entzündungsreaktion. Neben proinflammatorischen Reaktionen spielen auch antiinflammatorische Komponenten eine Rolle. Proinflammatorische Immunantworten sind maßgeblich an der Entstehung von Gewebeschäden beteiligt, wohingegen antiinflammatorische Immunantworten mit der erhöhten Anfälligkeit für Sekundärinfektionen in Verbindung gebracht werden [7].

Das auslösende Ereignis für eine proinflammatorische Immunantwort stellt die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*Pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) durch eine Reihe von *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRR) dar. Die PRRs können sich sowohl an der Zellmembran als auch im intrazellulären Raum befinden. Die Erkennung der PAMPs durch PRRs führt zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen [8].

Die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) und *Activator protein 1* (AP-1) sind maßgeblich an der Koordination der Immunantwort beteiligt. Im Rahmen der proinflammatorischen Reaktion werden proinflammatorische Mediatoren freigesetzt; dazu gehören Zytokine, Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies. Außerdem werden verschiedene Immunzellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen) rekrutiert und es erfolgt eine Aktivierung des Komplementsystems, des Gerinnungssystems und des Gefäßendothels [9].

Die übermäßige Aktivierung des Immunsystems bei Sepsis wird auch als Hyperinflammation bezeichnet. Im Rahmen dieser Hyperinflammation entwickeln Abwehrmechanismen des Immunsystems, die normalerweise protektive Funktionen haben, organschädigende Wirkungen. Die Hyperinflammation entsteht durch das Zusammenspiel zweier Mechanismen. Zum einen kann es Erregern gelingen, sich bestimmten Abwehrmechanismen des Immunsystems zu entziehen, wodurch sie weiter proliferieren können. Zum anderen setzen infizierte Zellen *Damage-associated molecular patterns* (DAMP) frei, die das Immunsystem kontinuierlich stimulieren [10].

Gleichzeitig scheinen antiinflammatorische Reaktionen zur immunologischen Pathogenese der Sepsis beizutragen. Es wird angenommen, dass antiinflammatorische Mediatoren eine Immunsuppression hervorrufen, welche das Auftreten von Sekundärinfektionen begünstigt [7]. Die Zusammenhänge zwischen zeitgleich bestehender Hyperinflammation auf der einen Seite und Immunsuppression auf der anderen Seite sind noch nicht vollständig verstanden. Die antiinflammatorische Reaktion wird u. a. auf eine beeinträchtigte Funktionsweise von Immunzellen zurückgeführt. Die Funktionsstörungen der Immunzellen sind durch zwei wesentliche Aspekte gekennzeichnet. Erstens wird eine verstärkte Apoptose von Immunzellen beobachtet. Zweitens wird eine reduzierte Produktionsfähigkeit von proinflammatorischen Zytokinen in bestimmten Geweben beschrieben [11, 12].

Die Pathogenese der Sepsis ist jedoch hochkomplex und neben einer inadäquaten Immunantwort spielen weitere Faktoren wie Störungen der Mikrozirkulation, Anomalien des neuroendokrinen Systems und mitochondriale Schädigung eine Rolle [13].

### 1.2.2 Mikrozirkulatorische Dysfunktion

Eine angemessene Sauerstoffversorgung des Gewebes zählt zu den wichtigsten Voraussetzungen für den Erhalt der Organfunktionen und wird durch eine intakte Mikrozirkulation gewährleistet. Daher ist es nicht überraschend, dass bei Sepsis auftretende Mikrozirkulationsstörungen als „Motor“ des septischen Organversagens betrachtet werden [14].

Die Sauerstoffversorgung des Gewebes ist von zwei wesentlichen Faktoren abhängig: (1) Diffusion und (2) Konvektion. Die Diffusion hängt u. a. von der Gefäßdicke ab, sodass mit abnehmender Gefäßdicke sich einerseits die Gasaustauschfläche verkleinert und sich andererseits die Strecke für die Sauerstoffdiffusion ins Gewebe vergrößert. Dagegen hängt die Konvektion vom Blutfluss ab; eine Verminderung des Blutflusses reduziert daher den konvektiven Sauerstofftransport [15].

Im Rahmen einer Sepsis treten in multiplen Organen Fehlfunktionen der Mikrozirkulation auf, die zu einer unzureichenden Sauerstoffversorgung des Gewebes führen können. Diese Fehlfunktionen sind sowohl durch quantitative Veränderungen, z. B. eine reduzierte Gefäßdicke, als auch durch qualitative Veränderungen, z. B. einen verringerten Blutfluss, gekennzeichnet. Folglich kann eine Gewebehypoxie sowohl über einen diffusionsbedingten als auch über einen konvektionsbedingten Mechanismus entstehen [16, 17].

An der Entstehung einer dysfunktionalen Mikrozirkulation sind mehrere Pathomechanismen beteiligt. Sowohl Veränderungen auf zellulärer Ebene als auch Veränderungen der systemischen Hämodynamik scheinen eine Rolle zu spielen. Auf zellulärer Ebene stellt insbesondere die endotheliale Dysfunktion einen wichtigen Pathomechanismus dar [18, 19]. Die endotheliale Dysfunktion setzt sich aus zwei Komponenten zusammen. Erstens wird durch inflammatorische Stimuli das endotheliale Stickstoffmonoxid-(NO)-System verändert. Die Veränderungen des endothelialen NO-Systems beeinträchtigen die Autoregulation der Gefäßweite in den Arteriolen. Infolge der gestörten Tonusregulation kommt es zu einer ausgeprägten Heterogenität des kapillären Blutflusses [20]. Zweitens wird ein Abbau der Glykokalyx beobachtet. Die Glykokalyx ist eine Schicht aus Glykosaminoglykanen, die die luminalen Oberfläche des Endothels bedeckt und wichtige biomechanische Funktionen erfüllt. Ein Abbau der Glykokalyx führt zu einer Permeabilitätszunahme des Endothels. Durch die

Zunahme der endothelialen Permeabilität wird die Entstehung von Gewebeödemen bei gleichzeitigem intravasalem Volumenverlust begünstigt [21].

Darüber hinaus gerät bei der Sepsis die Aktivierung des Gerinnungssystems aus dem Gleichgewicht. Durch die Thromboseneigung wird das Auftreten von Gefäßverschlüssen begünstigt und der Stoffaustausch in der Kapillare beeinträchtigt [22]. Auch Erythrozyten wirken sich durch ihre verminderte Verformbarkeit bei Sepsis negativ auf den kapillären Blutfluss aus [23].

Ebenso wichtig wie die Veränderungen auf zellulärer Ebene sind die Veränderungen der Hämodynamik. Im Rahmen einer Sepsis kommt es zu einem Abfall des mittleren arteriellen Drucks (MAD). Für den MAD-Abfall bei Sepsis sind drei zentrale Mechanismen verantwortlich. Erstens nimmt der periphere Gefäßwiderstand ab. Zweitens kommt es zu Volumenverlusten aus dem Intravasalraum in das Interstitium. Drittens beeinträchtigt eine verminderte Kontraktionskraft des Herzens im Sinne einer sog. septischen Kardiomyopathie die kardiale Auswurfleistung [24-26].

Um dennoch die Perfusion von Organen mit einem hohen Sauerstoffbedarf aufrechtzuerhalten, kommt es zu einer kompensatorischen Umverteilung der Blutversorgung. So werden Organe wie Herz und Gehirn verstärkt durchblutet, indem die kapilläre Durchblutung von Haut und Gastrointestinaltrakt reduziert und in die entsprechenden Körperregionen umgeleitet wird. Die systemische Hämodynamik wird folglich auf Kosten einer beeinträchtigten Mikrozirkulation bestimmter Regionen aufrechterhalten [27]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass bei Sepsis insbesondere im Gastrointestinaltrakt mikrozirkulatorische Störungen beschrieben werden [28-30]. Da jedoch dem Gastrointestinaltrakt eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis zukommt, stellen Mikrozirkulationsstörungen in diesem Bereich ein erhebliches Problem dar und beeinflussen maßgeblich den Krankheitsverlauf. Es wird angenommen, dass eine gestörte intestinale Mikrozirkulation zu einem Verlust der Schleimhautbarriere im Colon führt. Folglich können luminale Bakterien sowie Toxine die Barriere überwinden, in die Blutbahn und das Lymphsystem gelangen und die systemische Entzündungsreaktion weiter verstärken [31, 32].

### 1.2.3 Die Rolle der Mitochondrien

#### Mitochondrien allgemein

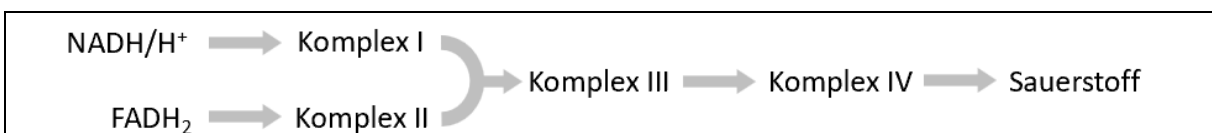
Mitochondrien sind Zellorganellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommen. Sie besitzen eine eigene Erbinformation und sind von einer Doppelmembran umgeben. Die innere und die äußere Mitochondrienmembran sind durch einen Intermembranraum getrennt. In der Außenmembran befinden sich unspezifische Transmembranproteine, sog. Porine, die einen Stoffaustausch über die Membran ermöglichen und für Moleküle bis zu einer bestimmten Größe durchlässig sind. Die Innenmembran hingegen enthält keine Porine und ist für Ionen und Moleküle hochgradig impermeabel. Die cardiolipinreiche Innenmembran verankert die Komplexe der Atmungskette und ist durch zahlreiche Einstülpungen gekennzeichnet, die einer Oberflächenvergrößerung dienen [33-35].

Im gesunden Organismus übernehmen Mitochondrien zahlreiche Funktionen. Zu den Hauptfunktionen gehört der Prozess der oxidativen Phosphorylierung, welcher der Generierung von Adenosintriphosphat (ATP), einem ubiquitären Energieträgermolekül, dient. Auf diese Weise liefern Mitochondrien einen Großteil der Energie, die für eine normale Zellfunktion erforderlich ist, und verbrauchen dafür rund 90 % des Gesamtsauerstoffes im Körper [36]. Neben der ATP-Produktion sind Mitochondrien u. a. an der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, der intrazellulären Regulierung der Calciumhomöostase sowie der Apoptoseaktivierung beteiligt [37-40].

#### Atmungskette und oxidative Phosphorylierung

Im Citratzyklus sowie in Abbauwegen von Makronährstoffen entstehen die Reduktionsäquivalente Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH/H<sup>+</sup>) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH<sub>2</sub>). Diese Reduktionsäquivalente geben ihre Elektronen an die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran ab. Dort werden die Elektronen über eine Abfolge von Redox-Komplexen schrittweise weitergeleitet, bis sie schließlich in der Mitochondrienmatrix auf molekularen Sauerstoff übertragen werden.

Der Fluss der Elektronen erfolgt folgendermaßen:



Bei jedem Elektronentransfer zwischen den Komplexen wird Energie frei. Diese Energie treibt den Transport von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum an, wodurch ein elektrochemischer Protonengradient entsteht. Beim Rückfluss der Protonen entlang dieses Gradienten entsteht erneut Energie, die von der ATP-Synthase genutzt wird, um Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriophosphat (ATP) zu phosphorylieren [35, 41-43].

### **Pathophysiologie der Mitochondrien bei Sepsis**

Die Rolle der Mitochondrien bei Sepsis ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist umstritten, ob Mitochondrien Organdysfunktionen auslösen, deren Verlauf verschärfen oder lediglich als geschädigte Zielstrukturen in Erscheinung treten [44].

Es gibt Daten, die darauf hindeuten, dass eine übermäßige Entzündungsreaktion das mitochondriale Atmungssystem beeinträchtigen kann. Jedoch sind die Daten zu Veränderungen der mitochondrialen Atmung bei Sepsis nicht einheitlich. Jeger et al. [45] fassten in einem Review zusammen, dass einerseits in einer Reihe von Untersuchungen eine Abnahme des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs unter septischen Bedingungen erfasst wurde und dass andererseits in ähnlich vielen Studien ein unveränderter oder in einigen Fällen sogar erhöhter Sauerstoffverbrauch erfasst wurde. Die Daten scheinen von mehreren Faktoren abzuhängen, z. B. vom untersuchten Organ, dem gewählten Sepsismodell sowie dem Schweregrad und dem Stadium der Erkrankung [46]. Die meisten Studien wurden an Nagetiermodellen durchgeführt und untersuchten die Mitochondrien in Skelettmuskeln, Herz und Leber [45]. Obwohl das Colon einen erheblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Sepsis zu haben scheint, liegen bisher kaum Studien zu sepsisbedingten Veränderungen der mitochondrialen Atmung im Colon vor. Herminghaus et al. [47] untersuchten, ob sich die mitochondriale Atmung im Colon und in der Leber von septischen Ratten im zeitlichen Verlauf verändert. Interessanterweise veränderte sich im Zeitverlauf von 96 Stunden nur die mitochondriale Atmung in der Leber, nicht aber die mitochondriale Atmung im Colon.

Im Gegensatz zu den eher inhomogenen Daten zu Veränderungen der mitochondrialen Atmung sind Daten zu Veränderungen des ATP-Spiegels recht einheitlich und zeigen eine Abnahme des ATP-Spiegels in verschiedenen Geweben [48]. Brealey et al. [49] zeigten beispielsweise, dass die ATP-Konzentration in der Skelettmuskulatur bei Patienten, die an einer Sepsis verstarben, circa zweimal niedriger war als bei der Kontrollgruppe und bei Sepsis-Patienten, die überlebten. Lawrence et al. [50] untersuchten den ATP-Spiegel in

Lymphozyten septischer Patienten und stellten bei Überlebenden im Vergleich zu Nicht-Überlebenden einen etwa doppelt so hohen ATP-Spiegel fest.

Es gibt zwei Ansätze, die versuchen, die Dysfunktion des mitochondrialen Atmungssystems bei Sepsis zu erklären. Im ersten Erklärungsansatz werden die Mitochondrien als Opfer einer dysfunktionalen Mikrozirkulation betrachtet. Spronk et al. [51] bezeichnen dieses Konzept als Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome (MMDS). In diesem Konzept wird angenommen, dass gestörte Diffusionsprozesse in der Mikrozirkulation zu einer unzureichenden Sauerstoffversorgung des Gewebes führen. Infolgedessen nimmt auch das Sauerstoffangebot auf mitochondrialer Ebene ab, wodurch der Prozess der oxidativen Phosphorylierung limitiert wird und keine adäquaten Mengen an ATP generiert werden können [46, 52].

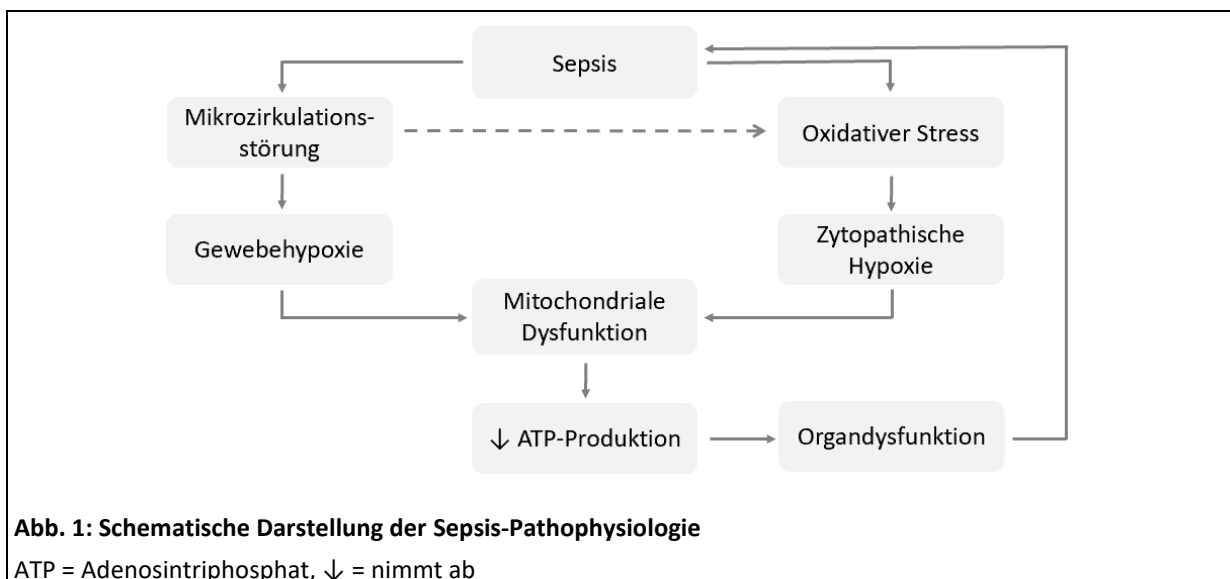
Einen zweiten Erklärungsansatz lieferten Fink et al. mit dem Konzept der zytopathischen Hypoxie [53]. Im Gegensatz zur Gewebhypoxie besteht bei der zytopathischen Hypoxie ein ausreichendes Sauerstoffangebot, jedoch sind die Mitochondrien nicht in der Lage, den Sauerstoff zur Energiegewinnung zu verwerten. Als eine mögliche Ursache für die erworbene Störung der Sauerstoffverwertung wird eine Schädigung des mitochondrialen Atmungssystems durch oxidativen Stress diskutiert.

### **Oxidativer Stress**

Oxidativer Stress wurde erstmals durch Helmut Sies et al. [54] definiert und entsteht, wenn die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und die antioxidativen Schutzmechanismen im Ungleichgewicht sind. Unter physiologischen Bedingungen fallen ROS in geringen Mengen als Nebenprodukt der Zellatmung in Form von Hyperoxidanionen ( $O_2^-$ ) an. Hyperoxidanionen fungieren u. a. als Signalmoleküle [55], wirken jedoch in höheren Konzentrationen zytotoxisch und werden daher durch antioxidative Enzyme unschädlich gemacht [56].

Bei Sepsis geraten die ROS-Produktion und die antioxidative Kapazität aus dem Gleichgewicht. Die ROS-Produktion nimmt zu, während die antioxidative Kapazität abnimmt. Für den Anstieg der ROS-Produktion sind mehrere Mechanismen verantwortlich. Es ist u. a. bekannt, dass bei Sepsis vermehrt NO produziert wird [57]. NO inhibiert den Komplex IV der Atmungskette, indem es kompetitiv zu Sauerstoff an Komplex IV bindet. Die Hemmung des Komplexes geht

mit einer vermehrten Produktion von  $O_2^-$  einher [58, 59].  $O_2^-$  kann wiederum mit NO zu Peroxinitrit ( $ONOO^-$ ) reagieren.  $ONOO^-$  gehört zu der Gruppe der reaktiven Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS). Zwei Mechanismen erklären, wie eine erhöhte ROS- bzw. RNS-Konzentration am Fortschreiten der Erkrankung beteiligt sein könnte. Einerseits wird vermutet, dass ROS bestimmte Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B über Redox-Signalwege verstärkt aktivieren [60]. Eine verstärkte Aktivierung von NF- $\kappa$ B geht mit einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Mediatoren einher, was zu einer starken Entzündungsreaktion führt [9]. Andererseits ist bekannt, dass hohe ROS- und RNS-Konzentrationen zu erheblichen Schäden an Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren sowohl in den Mitochondrien als auch in den Zellen führen können [61, 62]. Entstehen durch ROS und RNS Schäden an Strukturen der Atmungskette, wird die Funktion des mitochondrialen Atmungssystems beeinträchtigt und es entsteht eine zytopathische Hypoxie. ROS können zum Beispiel Cardiolipin oxidieren, welches sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet. Durch die Peroxidation verliert Cardiolipin seine stabilisierende Funktion, sodass sich Cytochrom c aus der Innenmembran lösen kann. Die Dissoziation von Cytochrom c führt zu einer Unterbrechung der Elektronentransportkette und somit zu einer verringerten ATP-Produktion [63, 64]. Ebenso können RNS ( $ONOO^-$ ) durch Oxidation von Komplexen der Atmungskette zu einer mitochondrialen Dysfunktion beitragen [65]. Zusammengefasst kann oxidativer Stress Gewebeschäden sowohl durch direkte Schädigung zellulärer Makromoleküle hervorrufen als auch durch eine unzureichende ATP-Produktion im Rahmen einer mitochondrialen Schädigung. Darüber hinaus scheint oxidativer Stress die systemische Entzündungsreaktion zu verstärken.



## 1.3 Neue Therapieansätze

### 1.3.1 Vasopressin

Vasopressin ist ein körpereigenes Peptid und vor allem an der Blutdruckregulierung und Osmoregulation beteiligt [66]. Bei Sepsis tritt ein endogener Vasopressin-Mangel auf. Da Vasopressin am Gefäßsystem über V1-Rezeptoren vasokonstriktiv wirkt, führt ein Mangel zu einer Abnahme des Gefäßtonus [67]. Daher wurden Vasopressin und synthetische Vasopressin-Rezeptor-Agonisten in der klinischen Praxis zur Behandlung der Hypotension bei septischem Schock eingeführt [2]. Vasopressin hat bei Sepsis scheinbar nicht nur eine blutdrucksteigernde Wirkung, sondern auch einen Effekt auf die Mikrozirkulation. Die Effekte von Vasopressin auf die Mikrozirkulation im Gastrointestinaltrakt scheinen dosisabhängig zu sein [68]. Hochdosiertes Vasopressin verschlechterte beispielsweise die Mikrozirkulation im Ileum durch eine ausgeprägte Vasokonstriktion [69]. Ebenso verschlechterte moderat dosiertes (= den Sepsis-Leitlinien entsprechend) Vasopressin die Mikrozirkulation im Magen [70]. Niedrig dosiertes Vasopressin hingegen verbesserte die Mikrozirkulation im Colon [71]. Es wäre denkbar, dass sich niedrig dosiertes Vasopressin durch die Verbesserung der Mikrozirkulation auch positiv auf die mitochondriale Funktion im Colon auswirkt. Bisher liegen allerdings kaum Daten zum Einfluss von Vasopressin auf die mitochondriale Funktion bei Sepsis vor. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Vasopressin einen positiven Einfluss auf die Mitochondrienfunktion haben kann. Sims et al. [72] konnten in einem Rattenmodell nachweisen, dass die Gabe von hochdosiertem Vasopressin bei hämorrhagischem Schock die mitochondriale Atmung in den Nieren verbessert und die mitochondriale ROS-Produktion reduziert. Vor diesem Hintergrund wäre es interessant, zu prüfen, ob ähnliche Effekte auch bei septischen Ratten nachweisbar sind und ob diese auch für andere Organe zu beobachten sind.

Interessant sind auch die Ergebnisse zweier Studien, in denen die Wirkung von Noradrenalin auf die mitochondriale Atmung in der Leber untersucht wurde [73, 74]. Noradrenalin ist ein Katecholamin, das ebenfalls als Vasopressor in der Therapie des septischen Schocks eingesetzt wird [2]. In der ersten Studie [73] wurde septischen Schweinen Noradrenalin per Infusion verabreicht und anschließend die mitochondriale Atmung der isolierten Lebermitochondrien analysiert. Es zeigte sich eine gesteigerte *Respiratory Control Ratio (RCR)* für Komplex I und II. In der zweiten Studie [74] erhielten die Versuchstiere keine Noradrenalin-Infusion.

Stattdessen wurden die isolierten Mitochondrien mit Noradrenalin inkubiert. Anschließend wurde parallel zur ersten Studie die mitochondriale Atmung der isolierten Lebermitochondrien analysiert. Es zeigten sich keine Veränderungen der mitochondrialen Aktivität. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Noradrenalin bei Sepsis keinen direkten Effekt auf die mitochondriale Atmung in der Leber hat. Stattdessen scheint Noradrenalin die mitochondriale Atmung indirekt zu beeinflussen. Über mögliche Mechanismen für den indirekten Effekt kann derzeit nur spekuliert werden. Aufgrund der vergleichbaren systemischen Wirkungen von Vasopressin und Noradrenalin wäre es jedoch interessant, zu untersuchen, ob für Vasopressin ähnliche Effekte auf die mitochondriale Atmung beobachtet werden können.

### **1.3.2 Positive Inotropika**

Neben dem reduzierten Gefäßtonus trägt auch die septische Kardiomyopathie zu einer hämodynamischen Instabilität bei und ist an der Verschlechterung der Mikrozirkulation beteiligt. Die septische Kardiomyopathie ist meist durch eine verminderte linksventrikuläre Pumpkraft gekennzeichnet [26]. Positive Inotropika zielen auf die Steigerung der Herzkraft ab und können bei nachgewiesener Myokarddepression und persistierender Hypoperfusion trotz adäquater Volumen- und Vasopressortherapie im Rahmen einer Sepsis erwogen werden [2]. Führt die gesteigerte Herzkraft zu einer Stabilisierung der hämodynamischen Situation, könnte sich dadurch auch die gastrointestinale Mikrozirkulation verbessern. Eine verbesserte Mikrozirkulation könnte wiederum einen positiven Einfluss auf die Mitochondrienfunktion im Gastrointestinaltrakt haben. In dieser Arbeit soll daher geprüft werden, ob positive Inotropika einen Einfluss auf die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten haben. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den drei Substanzen: (1) Dobutamin, (2) Levosimendan und (3) Milrinon.

#### **(1) Dobutamin**

Dobutamin zählt zu den Katecholaminen und wirkt über einen Agonismus am  $\beta_1$ -Rezeptor positiv inotrop. Darüber hinaus hat Dobutamin einen geringen vasodilatativen Effekt [75]. Frühe tierexperimentelle Studien konnten bereits einen positiven Effekt auf die gastrointestinale Mikrozirkulation durch Dobutamin nachweisen [76, 77]. In einer klinischen Studie beobachteten De Backer et al. [78] eine verbesserte sublinguale Mikrozirkulation bei septischen Patienten nach Gabe von Dobutamin. Zum Einfluss von Dobutamin auf die

mitochondriale Funktion bei Sepsis ist bisher wenig bekannt. Porta et al. [79, 80] untersuchten in zwei Studien die Wirkung von Dobutamin auf die mitochondriale Atmung in isolierten Mitochondrien von Schweinen. In beiden Studien wurden die Mitochondrien mit Endotoxin behandelt und später mit Dobutamin inkubiert. Die mitochondriale Atmung wurde per Respirometrie bestimmt. In der ersten Studie [79] wurden Skelettmuskel-Homogenate untersucht. Im Skelettmuskel-Homogenat wirkte sich die Endotoxin-Behandlung negativ auf die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung aus. Durch die anschließende Inkubation der Homogenate mit Dobutamin konnte der negative Effekt von Endotoxin teilweise aufgehoben werden. In der zweiten Studie [80] wurden Leber-Homogenate untersucht. Im Leberhomogenat wirkte sich die Endotoxin-Behandlung ebenfalls negativ auf die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung aus. Im Gegensatz zu den Beobachtungen aus der ersten Studie konnte der negative Effekt von Endotoxin jedoch durch die Inkubation der Homogenate mit Dobutamin nicht aufgehoben werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Effekt von Dobutamin organspezifisch ist. Zu der Wirkung von Dobutamin auf die Mitochondrien im Colon liegen bisher keine Daten vor.

## **(2) Levosimendan**

Levosimendan bindet an ein Regulatorprotein des kardialen Troponin C und erhöht auf diese Weise die Calcium-Sensitivität von Troponin C. Levosimendan wird daher auch als Calcium-Sensitizer bezeichnet und wirkt über diesen Mechanismus positiv inotrop [81]. Zusätzlich hat Levosimendan einen vasodilatativen Effekt über die Aktivierung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen ( $K_{ATP}$ ), die sich in der Plasmamembran glatter Muskelzellen befinden [82]. Interessanterweise sind  $K_{ATP}$ -Kanäle jedoch nicht nur in der Plasmamembran glatter Muskelzellen zu finden, sondern existieren auch auf mitochondrialer Ebene [83]. Daher wird vermutet, dass Levosimendan auch die mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanäle aktiviert [84]. Der Kaliumstrom durch die mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanäle scheint zum Erhalt der zellulären Energiehomöostase beizutragen und die Mitochondrien vor oxidativem Stress zu schützen [85]. Da oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion eine Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis spielen, ergibt sich die Frage, ob Levosimendan einen positiven Einfluss auf die Mitochondrienfunktion bei Sepsis hat. Eine der ersten prospektiven Studien, die den Einfluss von Levosimendan auf die mitochondriale Funktion bei Patienten mit septischem Schock untersuchte, wurde von Torracco et al. [86] im Jahr 2014 veröffentlicht. In der Studie konnte gezeigt werden, dass Levosimendan die Mitochondrien vor oxidativem

Stress schützt. Torraco et al. [86] äußern die Vermutung, dass diese Eigenschaft von Levosimendan möglicherweise dem bioenergetischen Versagen entgegensteuert. In der Studie von Torraco et al. [86] wurden Skelettmuskelbiopsien septischer Patienten untersucht. Es stellt sich die Frage, ob sich die positiven Effekte von Levosimendan auf die Mitochondrienfunktion auch in anderen Geweben beobachten lassen. Zu der Wirkung von Levosimendan auf die Mitochondrien im Colon liegen bisher keine Daten vor. Jedoch scheint Levosimendan positive Effekte auf die gastrointestinale Mikrozirkulation zu haben. Eine frühe Studie an gesunden Hunden zeigte, dass Levosimendan den intestinalen Blutfluss verbessert und den intestinalen Gefäßtonus verringert [87]. In einer anderen tierexperimentellen Studie wurde eine gesteigerte mikrozirkulatorische Oxygenierung der Magenschleimhaut beobachtet [88]. Darüber hinaus konnten Jia et al. [89] kürzlich in einem Tiermodell nachweisen, dass Levosimendan die intestinale Durchblutung nach Herzstillstand und anschließender Wiederbelebung verbessert. Die Frage, ob Levosimendan auch bei Sepsis die gastrointestinale Mikrozirkulation verbessert, konnte noch nicht vollständig geklärt werden. Eine tierexperimentelle [90] und eine klinische Studie [91] deuten jedoch darauf hin, dass Levosimendan die sublinguale Mikrozirkulation bei septischem Schock positiv beeinflusst.

### **(3) Milrinon**

Milrinon inhibiert die kardiale Phosphodiesterase 3 (PDE-3). Über die Hemmung von PDE-3 bewirkt Milrinon am Herzen einen positiv inotropen Effekt und an den Gefäßen einen vasodilatativen Effekt. Eine frühe Studie von Schmidt et al. [92] gab erste Hinweise darauf, dass sich Milrinon bei Sepsis positiv auf die intestinale Mikrozirkulation auswirken könnte. In dem Endotoxämie-Modell von Schmidt et al. [92] verminderte Milrinon die Hypoperfusion der intestinalen Schleimhaut. Ähnliche Beobachtungen wurden in einer späteren tierexperimentellen Studie gemacht, in der Milrinon die Endotoxämie-induzierte Vasokonstriktion der Haut reduzierte und kapilläre Perfusionsdefizite verbesserte [93]. Lin et al. [94] untersuchten kürzlich die Wirkung von Milrinon auf die kardiale Mitochondrienfunktion bei Katecholamin-induziertem Herzversagen. Die Forscher beobachteten, dass Milrinon in einem Tiermodell die Aktivität von Komplex I und III der Atmungskette in Kardiomyozyten steigerte [94]. Die Wirkung von Milrinon auf die mitochondriale Atmung bei Sepsis wurde bisher kaum erforscht. Ebenso wenig ist über den Einfluss von Milrinon auf die Mitochondrienfunktion des Colons bekannt.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Die mitochondriale Dysfunktion scheint in der Sepsis-Pathophysiologie eine entscheidende Rolle zu spielen und zur Entstehung von Organversagen beizutragen [49]. Bisher sind jedoch kaum Therapien bekannt, die auf die Verbesserung der mitochondrialen Funktion bei Sepsis abzielen. Daher sollten neue Therapiekonzepte entwickelt werden, die die mitochondriale Funktion und das Outcome von Patienten mit Sepsis verbessern. Mögliche Therapieansätze ergeben sich aus der Pathophysiologie.

Als eine mögliche Ursache für die mitochondriale Dysfunktion bei Sepsis werden Mikrozirkulationsstörungen diskutiert (= MMDS [51]). Es liegt daher nahe, dass sich eine Verbesserung der Mikrozirkulation positiv auf die Mitochondrienfunktion auswirken könnte. Besonders häufig werden mikrozirkulatorische Dysfunktionen im Gastrointestinaltrakt beschrieben [28-30]. Im Colon scheinen Mikrozirkulationsstörungen prognoserelevant zu sein, da sie zu einem Verlust der intestinalen Schleimhautbarriere führen [31, 32]. Dies macht das Colon zu einem interessanten Therapieziel.

Zur Optimierung der Mikrozirkulation bieten sich aufgrund der komplexen Pathophysiologie zahlreiche Angriffspunkte für eine Therapie an. Unter anderem sind Veränderungen der Hämodynamik für die gastrointestinale Hypoperfusion verantwortlich. Die hämodynamischen Veränderungen sind sowohl durch die Abnahme des Gefäßtonus als auch durch die Abnahme der Herzkraft (= septische Kardiomyopathie) bedingt [24-26]. Daher werden zur Verbesserung der hämodynamischen Situation bei septischem Schock Vasopressoren zur Steigerung des Gefäßtonus und positive Inotropika zur Steigerung der Herzkraft eingesetzt [2]. Einige Studien deuten darauf hin, dass sowohl der Einsatz von niedrig dosiertem Vasopressin [71] als auch der Einsatz von positiven Inotropika [76, 77, 87-89, 92, 93] die Perfusion des Gastrointestinaltrakts verbessert. Es wäre denkbar, dass auf diesem Wege ebenfalls die mitochondriale Funktion positiv beeinflusst wird. Verschiedene Studien lieferten bereits Hinweise darauf, dass Vasopressin [72] und die positiven Inotropika Dobutamin [79, 80], Levosimendan [86] und Milrinon [94] die Mitochondrienfunktion in verschiedenen Organsystemen verbessern können. Jedoch liegen bisher keine Studien vor, die sich mit dem Einfluss dieser Medikamente auf die Mitochondrienfunktion im Colon bei Sepsis befassen. Daher soll in dieser Arbeit der Effekt von niedrig dosiertem Vasopressin und den positiven

Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon auf die Mitochondrienfunktion im Colon von septischen Ratten untersucht werden.

Diesbezüglich sollen in dieser Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

1. Beeinflusst eine Monotherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **oder** einem der drei positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten?
2. Beeinflusst eine Kombinationstherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **plus** einem der drei positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten?
3. Hat eine Monotherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **oder** mit einem der drei positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon einen Einfluss auf die ROS-Produktion im Colon von septischen Ratten?
4. Hat eine Kombinationstherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **plus** einem der drei positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon einen Einfluss auf die ROS-Produktion im Colon von septischen Ratten?

## 2 Methodik

### 2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden randomisiert an 80 jungen, männlichen Wistar-Ratten aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (Az. G313/20) Düsseldorf durchgeführt. Eine Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen lag vor (Az. 81-02.04.2020.A313).

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte konventionell in Makrolon®-Einzelkäfigen unter klimatisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von  $24 \pm 2$  °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 5$  % und einer Luftumwälzrate von 16–20 Mal pro Stunde. Die künstliche Beleuchtung (300–320 Lux) zur Imitation eines Tag-Nacht-Rhythmus erfolgte in 12-stündigen Abständen. Das entkeimte Weichholzgranulat, welches als Einstreu im Käfig diente, wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse sowie entkeimtes Trinkwasser mit einem pH-Wert von 2,6–3,0 standen den Versuchstieren ad libitum zur Verfügung. Die Hygieneüberwachung erfolgte gemäß den FELASA-Richtlinien.

### 2.2 Versuchsablauf

Vor Beginn der Versuche wurden folgende Untersuchungsgruppen festgelegt:

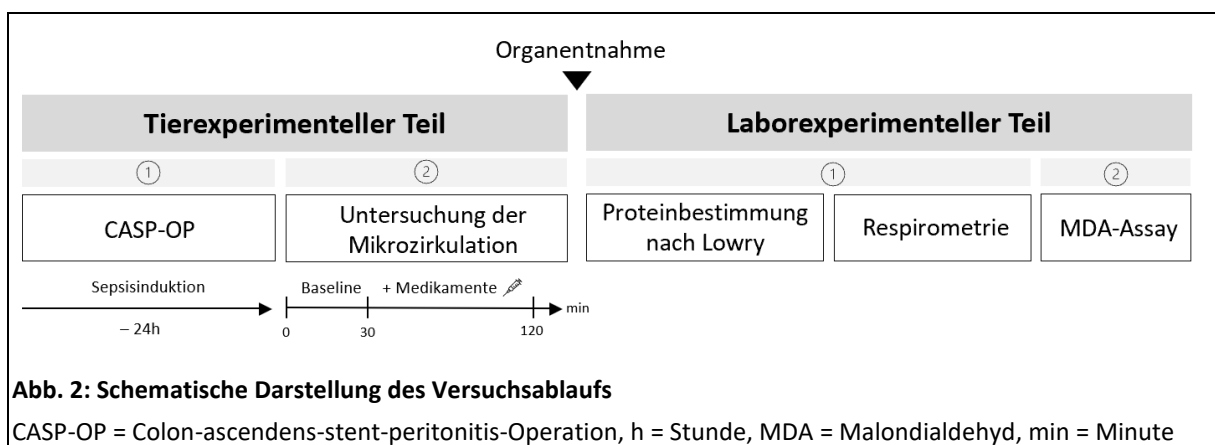
Gruppe	Applizierte Medikamente	Dosierung
1	Jonosteril (= Kontrolle)	2 ml/h
2	Vasopressin	13,5 mU/kg/h
3	Dobutamin	480 µg/kg/h
4	Vasopressin Dobutamin ] +	13,5 mU/kg/h 480 µg/kg/h
5	Levosimendan	12 µg/kg/10 min + 12 µg/kg/h
6	Vasopressin Levosimendan ] +	13,5 mU/kg/h 12 µg/kg/10 min + 12 µg/kg/h
7	Milrinon	50 µg/kg/10 min + 45 µg/kg/h
8	Vasopressin Milrinon ] +	13,5 mU/kg/h 50 µg/kg/10 min + 45 µg/kg/h

**Tabelle 2: Versuchsgruppen**

h = Stunde, kg = Kilogramm, min = Minute, ml = Milliliter, mU = Milli-Unit, µg = Mikrogramm

Die Einteilung der Versuchstiere in die Untersuchungsgruppe erfolgte randomisiert.

Im tierexperimentellen Teil führte eine approbierte Veterinärmedizinerin zunächst die Colon-ascendens-stent-peritonitis-Operation (CASP-OP) zur Sepsisinduktion durch. Nach 24 Stunden untersuchte die Veterinärmedizinerin die intestinale Mikrozirkulation. Im Rahmen dieser Untersuchung erhielten die Versuchstiere die zu untersuchenden Medikamente für 90 Minuten nach einer 30-minütigen Baseline-Messung; die Applikation der Medikamente erfolgte verblindet. Nach Euthanasie des Versuchstieres wurde das Colon entnommen und mir übergeben. Nach Aufbereitung des Colons und Herstellung eines Homogenats wurde im ersten laborexperimentellen Teil eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt, die als Grundlage für die anschließende Respirometrie zur Erfassung der mitochondrialen Aktivität im Colon diente. Im zweiten laborexperimentellen Teil wurde der Malondialdehyd-Assay (MDA-Assay) durchgeführt.

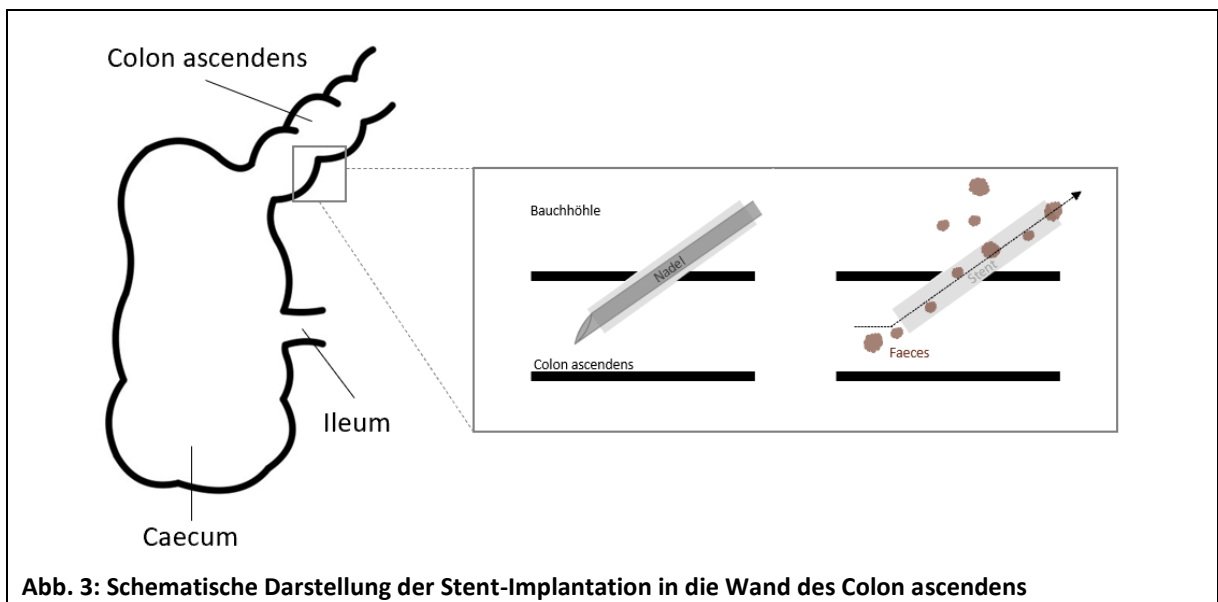


## 2.3 CASP-Operation

Beim gut evaluierten CASP-Verfahren wurde durch Induktion einer abdominalen Infektion (Peritonitis) der klinische Verlauf einer Sepsis imitiert. Die Narkose wurde mit dem volatilen Anästhetikum Sevofluran (3,0–3,2 Vol.-%, FiO<sub>2</sub> 0,5) eingeleitet. Zur Analgesie wurde den Versuchstieren das hochpotente Opioid Buprenorphin s.c. (0,1 mg/kg) injiziert. Vor Beginn des Eingriffs wurde die Narkosetiefe durch Setzen eines Schmerzreizes überprüft. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur wurde das Versuchstier in Rückenlage auf einer Wärmematte gelagert. Nach Desinfektion des Abdomens und steriler Abdeckung mit einem Lochtuch erfolgte eine etwa 2 cm lange mediane Laparotomie. Zur anatomischen Orientierung im Abdomen wurde zunächst das Caecum aufgesucht und anschließend das Colon ascendens freigelegt. Anschließend wurden zwei ca. 10 mm lange Stents 1 cm distal des ileozökalen

Übergangs implantiert. Zur Stentimplantation wurde eine Venenverweilkanüle (14 G) durch die Darmwand gestochen. Nach Rückzug der Nadel und Kürzung der verbleibenden Plastikummhüllung auf 10 mm wurde der Katheter mit einem nicht resorbierbaren Faden fixiert. Die Stents stellten eine Verbindung zwischen Darmlumen und Bauchhöhle her und ermöglichten dadurch einen kontinuierlichen Austritt von Fäkalien in den Bauchraum. Infolgedessen entwickelte sich eine diffuse Peritonitis, die in eine polymikrobielle Sepsis überging. Um die Durchgängigkeit der implantierten Stents zu überprüfen, wurde durch Palpation des Colons etwas Darminhalt in die Stents gedrückt. Nach Rückverlagerung des Darms und Befeuchtung der Bauchhöhle mit etwa 5 ml Natriumchlorid-Lösung erfolgte der Verschluss der Bauchdecke mit einem resorbierbaren Faden (4.0-Naht) für Muskel- und Hautschicht. Zuletzt wurden Gewicht und Körpertemperatur des Versuchstieres erfasst, bevor es zum Aufwachen zurück in den Käfig gelegt wurde.

Nach der CASP-OP hatten die Versuchstiere freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Da die enterale Flüssigkeitsresorption aufgrund der Sepsis eingeschränkt war und eine Dehydratation nur durch invasive Maßnahmen hätte erkannt werden können, erfolgte eine regelmäßige subkutane Flüssigkeitssubstitution. Die postoperative analgetische Versorgung erfolgte mit Buprenorphin (0,1 mg/kg) alle acht Stunden.



Zudem wurden die Tiere von der Veterinärmedizinerin alle sechs Stunden untersucht und der Schweregrad der Sepsis anhand des standardisierten *Septic Rat Severity Scores* (SRSS) [95] erhoben. Keines der Tiere überschritt die definierte Obergrenze von zehn Punkten im SRSS.

## 2.4 Untersuchung der Mikrozirkulation

24 Stunden nach dem operativen Eingriff wurden die Versuchstiere erneut gewogen. Es erfolgte eine Narkoseeinleitung mit dem Barbiturat Pentobarbital i.p. (60 mg/kg) und dem hochpotenten Opioid Buprenorphin s.c. (0,1 mg/kg). Das Tier wurde auf einer Wärmematte gelagert und die Narkosetiefe wurde durch Setzen eines Schmerzreizes überprüft. Anschließend wurden die Versuchstiere tracheotomiert. Als Standardbeatmungsparameter wurden eine Atemfrequenz von 70/min, ein Tidalvolumen von 1,8–2,5 ml, ein Atemwegsdruck < 17 cmH<sub>2</sub>O und eine FiO<sub>2</sub> von 0,3 eingestellt. Anhand von Blutgasanalysen, die alle 30 Minuten durchgeführt wurden, konnten die Beatmungsparameter individuell angepasst werden. Die Versuchstiere erhielten sowohl einen venösen Zugang über die Vena jugularis communis als auch einen arteriellen Zugang über die Arteria carotis communis. Über den venösen Zugang wurde zur Aufrechterhaltung der Narkose Pentobarbital (10 mg/kg/h) mittels Perfusor appliziert. Zur möglichst realistischen Nachstellung der klinischen Situation, in der bei Sepsis eine antibiotische Therapie eingeleitet werden würde, wurde den Tieren außerdem Piperacillin/Tazobactam verabreicht. Über den arteriellen Zugang erfolgte während des gesamten Versuchszeitraums ein kontinuierliches Monitoring der Vitalparameter (Blutdruck und Herzfrequenz) sowie eine Volumensubstitution über einen Perfusor. Nach Anlage der Gefäßkatheter wurde die Bauchnaht der CASP-OP des Vortags aufgetrennt. Das Caecum wurde nach extrakorporal verlagert und auf einer feuchten Kompresse platziert.

Anschließend erfolgten die Untersuchungen der intestinalen Mikrozirkulation, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind. Das Protokoll umfasste zunächst eine 30-minütige Baseline-Messung, nach deren Ablauf die Gabe der zu untersuchenden Medikamente über einen Perfusor gestartet wurde. Die Messungen wurden für weitere 90 Minuten fortgeführt, sodass der gesamte Untersuchungszeitraum 120 Minuten betrug (siehe Abb. 2).

Zur Untersuchung der intestinalen Mikrozirkulation kamen zwei Verfahren zum Einsatz. Zum einen wurden mittels Gewebephotospektrometrie verschiedene mikrozirkulatorische Parameter erfasst, die Rückschlüsse auf die Durchblutung und Sauerstoffversorgung des Gewebes erlaubten. Hierzu wurde eine Messsonde auf dem Caecum platziert und die Messwerte durch das O2C-Gerät visualisiert. Zum anderen erfolgte eine Bestimmung der Gefäßdichte mittels Dunkelfeldmikroskopie (Cytocam), die eine Unterscheidung zwischen perfundierten und nicht-perfundierten Gefäßen ermöglichte.

## 2.5 Organentnahme

Unter tiefer Narkose erfolgte eine fachgerechte und schmerzfreie Exsanguination über den arteriellen Zugang. Anschließend wurde das Colon entnommen und mit einer Pinzette durch Ausstreichen grob von Kot und Fettanhängseln befreit. Ein 1–2 cm langes Gewebestück wurde für spätere Untersuchungen, u. a. den MDA-Assay, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das verbleibende Colon wurde in einen  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kalten Isolationspuffer (pH 7,15) gelegt und umgehend für die folgenden Untersuchungen unter dauerhafter Kühlung weiterverarbeitet.

## 2.6 Gewebehomogenisierung

Zunächst wurde das Gewicht des Gewebes mithilfe einer Präzisionswaage ermittelt. Dann wurde das Colon zusammen mit dem Isolationspuffer auf eine Petrischale gegeben. Nach gründlicher Entfernung von Fettresten an der Organaußenseite wurde das Colon mit einer Schere längs aufgeschnitten und die Innenseite mit einer Baumwollkompressen von Schleim- und Fäkalienresten befreit.

Zur Auflösung der Zellverbände wurde das Präparat für 5 Minuten mit Trypsin behandelt. Die Trypsin-Menge ergab sich aus dem ermittelten Gewicht des Gewebes (2 ml Trypsin/1 g Gewebe). Anschließend wurde das Colon in ein Becherglas mit eiskaltem Isolationspuffer gegeben. Der Isolationspuffer enthielt zusätzlich 20 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) und den Proteaseinhibitor cOmplete™. Auch hier ergaben sich die Mengen aus dem ermittelten Colon-Gewicht (4 ml Isolationspuffer + BSA/1 g Gewebe sowie 40  $\mu\text{l}$  cOMplete/1 g Gewebe).

Danach wurde das Colon mit einer Schere in 2–3 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert. Im Anschluss wurde das Gemisch in einen eisgekühlten S-Behälter umgefüllt. Mittels Potter-Elvehjem-Homogenisierungsstab wurde das Gewebe bei 2000 rpm sechsmal homogenisiert. Bei diesem mechanischen Aufschlussverfahren werden die Zellmembranen durch Scherkräfte aufgebrochen und die Zellorganellen freigesetzt. Das hergestellte Homogenat wurde anschließend durch eine Kompressen in ein 50-ml-Falcon gefiltert und auf Eis gestellt.

## 2.7 Proteinbestimmung nach Lowry

### 2.7.1 Prinzip

Beim Lowry-Test [96] handelt es sich um eine Methode zur quantitativen Proteinbestimmung.

Die Methodik basiert auf zwei wichtigen Reaktionen:

1. Im ersten Reaktionsschritt findet die sog. Biuretreaktion statt, bei der sich unter alkalischen Bedingungen ein blauvioletter Farbstoffkomplex zwischen den Peptidbindungen und Cu(II)-Ionen ausbildet.
2. Im zweiten Reaktionsschritt wird Cu(II) durch die Peptidbindung zu Cu(I) reduziert. Cu(I) dient wiederum als Reduktionsmittel für das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz, das zu Molybdänblau reduziert wird, wodurch ein intensiver Farbumschlag nach blau erfolgt. Dieser Schritt ermöglicht eine deutlich niedrigere Nachweisgrenze im Vergleich zur einfachen Biuretreaktion.

Bei hoher Proteinkonzentration bilden sich in der Biuretreaktion mehr Farbkomplexe, wodurch die Farbintensität der Probe zunimmt. Die Extinktion ist proportional zur Farbintensität und somit ebenfalls proportional zur Proteinkonzentration. Aus der mittels Photometrie bei 750 nm unter Verwendung von BSA als Standard gemessenen Extinktion lässt sich daher die Proteinmenge der Probe ableiten.

In diesem Versuch wurde diese Methode zur quantitativen Bestimmung der Mitochondrienmenge genutzt. Hintergrund ist der Zusammenhang zwischen der Menge an mitochondrialem Protein und dem Gesamtprotein.

### 2.7.2 Praktisches Vorgehen

Zunächst wurde Lösung 1 aus drei Reagenzien hergestellt.

- Lösung 1
- Reagenz A: 10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  wurden in 500 ml 0,1 M NaOH gelöst.
  - Reagenz B: 2 g Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst.
  - Reagenz C: 1 g Kupfersulfatpentahydrat wurde in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Dazu wurden die Reagenzien A, B und C in einem Verhältnis von 10:1:1 hergestellt, d. h. 10 ml von Reagenz A wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Reagenz B und 100  $\mu\text{l}$  Reagenz C vermischt.

Zur Herstellung von Lösung 2 wurden Folin und destilliertes Wasser in einem Verhältnis von 1:1 gemischt.

Anschließend wurde die Standardreihe nach folgendem Schema in Mikroreaktionsgefäßen vorbereitet:

Standard	H <sub>2</sub> O destilliert in µl	Bovine Serum Albumin (1000 µg/ml) in µl	Proteinkonzentration in µg/ml
K0	500	0	0
K1	468,7	31,2	62,5
K2	437,5	62,5	125
K3	375	125	250
K4	250	250	500
K5	125	375	750
K6	0	500	1000

**Tabelle 3: Standardreihe Proteinbestimmung nach Lowry**

H<sub>2</sub>O = Wasser, ml = Milliliter, µg = Mikrogramm, µl = Mikroliter

In drei weiteren Mikroreaktionsgefäßen wurde das Colon-Homogenat mit destilliertem Wasser in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt. Danach wurden jeweils 100 µl vom Proteinstandard K0–K6 sowie 100 µl von den verdünnten Colon-Proben in neue Mikroreaktionsgefäße pipettiert und mit 500 µl von Lösung 1 versetzt. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach der Inkubationszeit wurden 50 µl von Lösung 2 hinzugefügt. Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Standards und Proben zur Doppelbestimmung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Bei einer Wellenlänge von 750 nm wurde zur Bestimmung der Proteinmenge die Extinktion gemessen.

## 2.8 Respirometrie

### 2.8.1 Prinzip

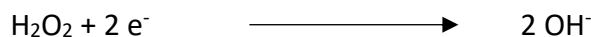
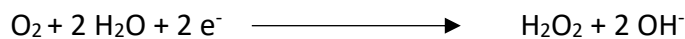
#### Clark-Elektrode

Die mitochondriale Erzeugung des universellen Energieträgers ATP ist sauerstoffabhängig. Daher eignet sich die Erfassung der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs in dem Gemisch aus Homogenat und Respirationspuffer zur Bestimmung der mitochondrialen Atmungsketten-Aktivität.

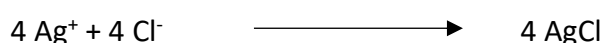
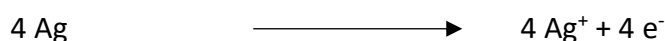
Die Clark-Elektrode des Strathkelvin-Systems fungiert als elektrochemischer Sensor und ermittelt in einer 6-minütigen Messung kontinuierlich den Sauerstoffpartialdruck in der Messkammer. Die Elektrode setzt sich aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode zusammen, die über eine KCl-Elektrolytlösung verbunden sind. Durch eine sauerstoffdurchlässige Membran sind Kathode und Anode von der Probe in der Messkammer getrennt. Mithilfe einer Spannungseinheit wird das System mit Elektronen versorgt.

Wird die Messung gestartet, diffundiert der Sauerstoff in der Probe entlang seines Gradienten durch die sauerstoffdurchlässige Membran zur Platinelektrode. Da die Sauerstofflöslichkeit und die Durchlässigkeit der Membran temperaturabhängig sind, erfolgt die Messung bei einer konstanten Temperatur von 30 °C.

Der Sauerstoff (O<sub>2</sub>) wird an der Kathode reduziert, wobei Hydroxid-Ionen (OH<sup>-</sup>) entstehen:

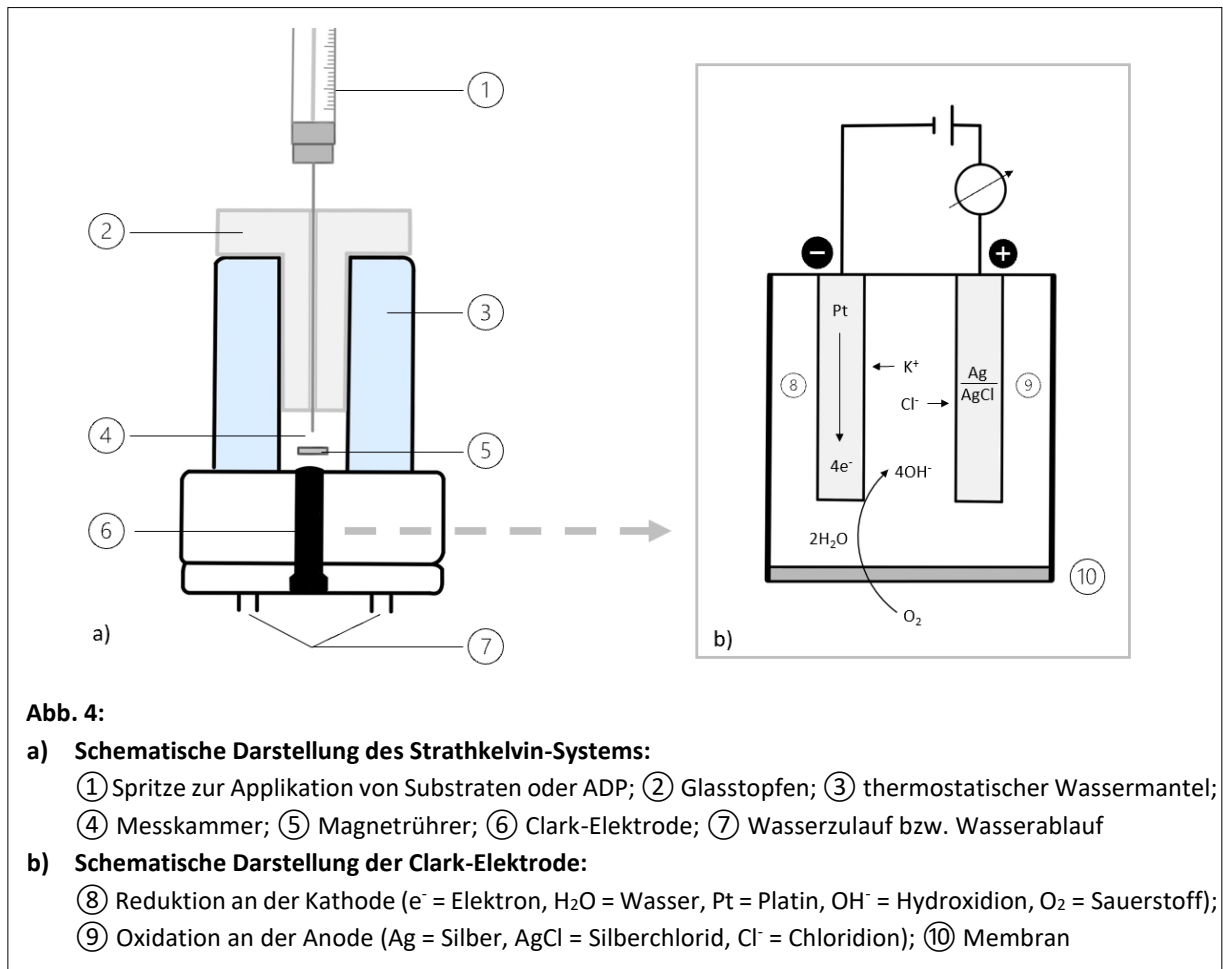


An der Bezugselektrode findet eine Oxidation statt, bei der sich die Silberionen (Ag) mit Chloridionen (Cl<sup>-</sup>) aus der Lösung verbinden.



Es entsteht ein Stromfluss, der dem Sauerstoffpartialdruck direkt proportional ist und durch das Strathkelvin-Respirometer-System in digitale Werte umgewandelt wird, welche an einen Computer übermittelt werden.

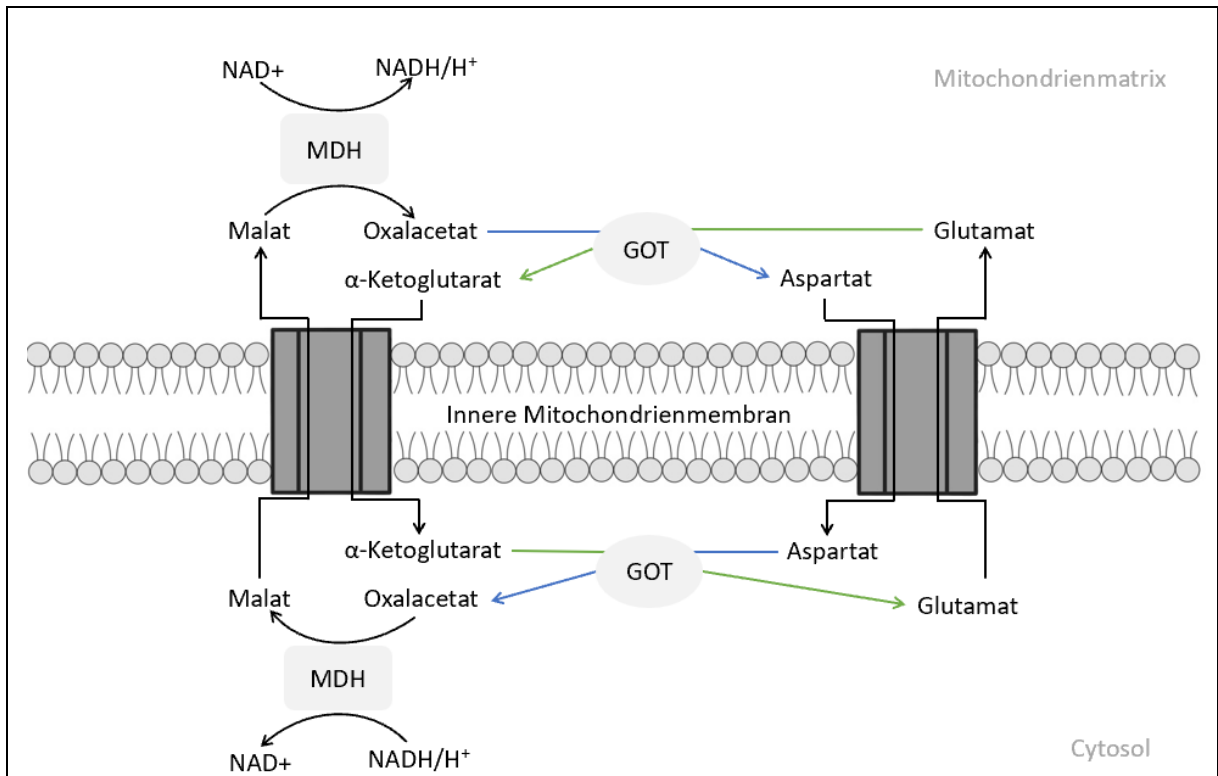
Zur Bestimmung der Atmungskettengeschwindigkeit wird die Abnahme der Sauerstoffkonzentration über die Zeit auf mg Protein normiert.



## Substrate

Um in der Respirometrie die Aktivität der einzelnen Atmungskettenkomplexe messen zu können, müssen Komplex I und Komplex II in separaten Messungen durch ein Substrat stimuliert werden.

Als Substrat für Komplex I eignet sich die Kombination aus Glutamat und Malat. Hintergrund hierfür ist der Malat-Aspartat-Shuttle (siehe Abb. 5), bei dem Glutamat und Malat benötigt werden, um NADH-Moleküle in den Matrixraum der Mitochondrien zu befördern. NADH/ $H^+$  ist der Elektronendonator für Komplex I. Die Elektronentransportkette wird gestartet, indem Komplex I zwei Protonen und zwei Elektronen von NADH/ $H^+$  auf Ubichinon überträgt.



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Malat-Aspartat-Shuffles [97]**

Im Cytosol wird  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert. Dabei werden mithilfe der cytosolischen Malat-Dehydrogenase (MDH) zwei Elektronen auf Oxalacetat übertragen, welches zu Malat reduziert wird. Malat wird im Antiport mit  $\alpha$ -Ketoglutarat durch die innere Mitochondrienmembran in die Mitochondrienmatrix befördert. Mithilfe der mitochondrialen Malat-Dehydrogenase wird Malat wieder zu Oxalacetat oxidiert und zwei Elektronen werden auf  $\text{NAD}^+$  übertragen. Es erfolgt eine Aminierung des entstandenen Oxalacetats zu Aspartat (siehe blauer Pfeil) durch die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT). In dieser Reaktion erhält Oxalacetat die Aminogruppe von Glutamat, welches desaminiert wird, wodurch  $\alpha$ -Ketoglutarat entsteht (siehe grüner Pfeil). Dieses gelangt im Antiport mit Malat ins Cytosol und kann in einer weiteren Transaminasenreaktion wieder zu Glutamat aminiert werden, indem die Aminogruppe von Aspartat zurückübertragen wird und auf diesem Wege wieder Oxalacetat als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht.

Als Substrat für Komplex II eignet sich Succinat. Hintergrund ist die Katalyse von Succinat zu Fumarat durch das Enzym Succinatdehydrogenase. Die Succinatdehydrogenase ist Bestandteil von Komplex II und ist gleichzeitig ein Enzym des Citratzyklus. Bei der Umwandlung von Succinat in Fumarat wird zeitgleich  $\text{FAD}$  zu  $\text{FADH}_2$  reduziert, welches direkt in die Atmungskette eingeschleust werden kann. Um eine selektive Beurteilung von Komplex II sicherzustellen, wird Succinat mit Rotenon kombiniert, einem Hemmstoff von Komplex I. Zur Beurteilung der oxidativen Phosphorylierung wird in beiden Messungen ADP im Überschuss appliziert.

## Untersuchungsparameter

Verschiedene *States* der mitochondrialen Atmung wurden durch Chance und Williams [98] definiert.

<i>States</i>	Substrat-Konzentration	ADP-Konzentration	Mitochondriale Atmungsrate	Limitierender Faktor
<i>State 1</i>	↓	↓	↓	ADP
<i>State 2</i>	↑	↓	↓	ADP
<i>State 3</i>	↑	↑	↑↑	Atmungskette
<i>State 4</i>	↘	↘	↘	ADP
<i>State 5</i>	↓	↓	↓↓	Sauerstoff

**Tabelle 4: States der mitochondrialen Atmung** [98]

↑↑ = sehr hoch, ↑ = hoch, ↘ = abnehmend, ↓ = niedrig, ↓↓ = sehr niedrig, ADP = Adenosindiphosphat

In *State 1* ist die mitochondriale Atmungsaktivität gering, da kaum ADP und Substrat zur Verfügung stehen. Nach Zugabe der Substrate beginnt die Phase der Ruheatmung, die als *State 2* bezeichnet wird. In dieser Phase sind die Substrate der jeweiligen Komplexe der Atmungskette im Überschuss vorhanden, die ADP-Konzentration ist jedoch weiterhin gering. Die mitochondriale Atmung in *State 2* dient hauptsächlich der Erhaltung des Membranpotenzials. Nach Zugabe von ADP, welches als stärkster physiologischer Stimulator der Atmungskette gilt, erfolgt der Übergang in *State 3*. In dieser Phase erreicht die oxidative Phosphorylierung ihre maximale Geschwindigkeit. Wenn der Großteil von ADP in ATP umgewandelt wurde, folgt *State 4* und die mitochondriale Atmung nimmt wieder ab. Sobald der gesamte Sauerstoff in der Messkammer verbraucht worden ist, wird *State 5* erreicht. In diesem *State* zeigen die Mitochondrien keine Aktivität mehr.

Zwei weitere Parameter werden ermittelt:

1. <i>Respiratory Control Index (RCI)</i>	=	$\frac{\text{State 3}}{\text{State 2}}$	→	Maß für die Kopplung zwischen Elektronentransportkette und oxidativer Phosphorylierung
2. ADP-Sauerstoff-Ratio	=	$\frac{\text{zugegebenes ADP}}{\Delta\text{O}_2}$	→	Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung

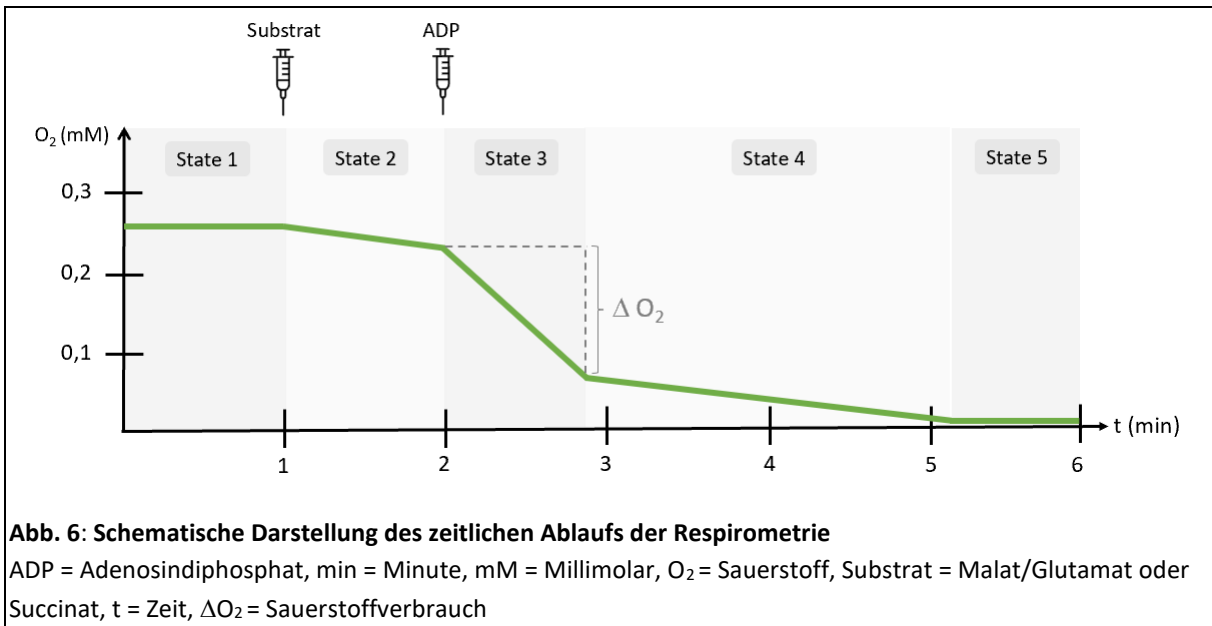
## 2.8.2 Praktisches Vorgehen

Zunächst wurde das Respirometer durch Anschalten des verbundenen Wasserbads erwärmt. Vor Start der Messung erfolgte eine Zwei-Punkt-Kalibrierung der Clark-Elektrode. Dazu wurde nach Angaben des Herstellers eine Positivkontrolle mit Aqua dest. mit Werten zwischen 300 und 350 pA durchgeführt sowie eine Negativkontrolle mit Natriumsulfit-Lösung mit Werten  $< 20$  pA.

Das Colon-Homogenat wurde mit einem 30 °C warmen Respirationspuffer vermischt, der zusätzlich 20 mg/ml BSA enthält, um eine Proteinkonzentration von 6 mg/ml in der Messkammer zu erreichen. Das Mischverhältnis ergab sich aus der zuvor durchgeführten Proteinbestimmung nach Lowry. Das Gemisch wurde mit einer Pipette in die Messkammer überführt. Anschließend wurde die Messkammer mit einem Stopfen luftdicht verschlossen und ein elektromagnetischer Rührer aktiviert. Durch eine feine Kapillare im Glasstopfen konnten unter Sicht die verschiedenen Substanzen mit einer Spritze in die Messkammer appliziert werden (siehe Abb. 4).

Die 6-minütige Messung wurde gestartet. In der ersten Minute wurde *State 1* erfasst. Nach 60 Sekunden wurde das Substrat für den zu untersuchenden Atmungsketten-Komplex appliziert. Ein Gemisch aus Glutamat und Malat diene dabei als Substrat für Komplex I, Succinat als Substrat für Komplex II. Um eine alleinige Beurteilung von Komplex II ohne Mitwirken von Komplex I zu gewährleisten, wurde Rotenon, ein Hemmstoff von Komplex I, dem Gemisch aus Homogenat und Respirationspuffer bereits vor Start der Messung hinzugefügt. Nach Zugabe des Substrats erfolgte ein Übergang in *State 2*. Nach weiteren 60 Sekunden wurde ADP in die Messkammer verabreicht. Die oxidative Phosphorylierung erreichte in diesem Stadium ihre maximale physiologische Geschwindigkeit. Die Messung wurde bis zum Ablauf der Zeit ohne weitere Zugabe von Substanzen fortgeführt. Sobald der Großteil von ADP in ATP umgewandelt war, nahm die mitochondriale Atmung wieder ab und ging in *State 4* über. Sobald der gesamte Sauerstoff in der Messkammer verbraucht worden war, wurde *State 5* erreicht, in dem die Mitochondrien keine Aktivität mehr zeigten.

Für beide Substrate wurden die Messungen jeweils dreimal durchgeführt und die Mittelwerte der erfassten Parameter berechnet.



Substanz	Konzentration der Stocklösung	Applizierte Menge pro Versuch	Endkonzentration in der Messkammer
Malat	0,25 M	5 µl/500 µl	2,5 mM
Glutamat	0,25 M	5 µl/500 µl	2,5 mM
Succinat	1 M	2,5 µl/500 µl	5 mM
Rotenon	100 µM	2,5 µl/500 µl	0,5 µM
ADP	25 mM	1 µl/500 µl	50 µM

**Tabelle 5: Substanzen Respirometrie**

ADP = Adenosindiphosphat, M = Molar, mM = Millimolar, µl = Mikroliter, µM = Mikromolar

### 2.8.3 Qualitätskontrolle

Zum Ausschluss einer Schädigung der Mitochondrien durch das Präparationsverfahren wurde eine Kontrollmessung durchgeführt. Dazu erfolgte nach der gewöhnlichen Applikation der Substrate sowie ADP die Zugabe von Cytochrom c, Oligomycin und Antimycin A in einminütigen Abständen.

Substanz	Konzentration der Stocklösung	Applizierte Menge pro Versuch	Endkonzentration in der Messkammer
Cytochrom c	250 µM	5 µl/500 µl	2,5 µM
Oligomycin	6 µM	5 µl/500 µl	0,05 µM
Antimycin A	0,5 mM	2,5 µl/500 µl	2,5 µM

**Tabelle 6: Substanzen Respirometrie Qualitätskontrolle**

M = Molar, mM = Millimolar, µl = Mikroliter, µM = Mikromolar

Cytochrom c fungiert als Elektronenüberträger zwischen Komplex III und IV der Atmungskette. Wird bei der Herstellung des Homogenats die äußere Mitochondrienmembran beschädigt, kann sich Cytochrom c von der inneren Mitochondrienmembran lösen. Die Elektronentransportkette wird unterbrochen und die Atmungskettengeschwindigkeit nimmt deutlich ab. Wird in diesem Fall Cytochrom c im Rahmen der Kontrollmessung von extern hinzugefügt, würde sich ein Anstieg der Atmungskettengeschwindigkeit zeigen. Die Zugabe von Cytochrom c eignete sich daher zur Überprüfung der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran.

Oligomycin gehört zur Gruppe der Makrolid-Antibiotika und dient bei der Kontrollmessung der Überprüfung des Membranpotenzials. Oligomycin bindet an die  $F_0$ -Untereinheit der ATP-Synthase und verhindert dadurch den Rückstrom der Protonen aus dem Intramembranraum in die Matrix, der die Energie für die ATP-Synthese liefert. Bei Unversehrtheit der Mitochondrien fällt nach Zugabe von Oligomycin die Atmungskettengeschwindigkeit stark ab. Aufgrund des verlangsamten Abbaus des Protonengradienten dient die Elektronentransportkette nur noch der Aufrechterhaltung des Membranpotenzials. Die Komplexe der Atmungskette pumpen keine Protonen mehr in den Intramembranraum, sodass die Atmungskettenaktivität auf den Ruhezustand (*State 2*) zurückgeht. Bei einem gestörten Membranpotenzial, verursacht durch einen unkontrollierten Protonenfluss in den Intramembranraum, würde der Sauerstoffverbrauch trotz Zugabe von Oligomycin nicht sinken. Stattdessen würde die Atmungskette versuchen, dem Protonenleck entgegenzuwirken.

Antimycin A ist ein Antibiotikum aus Streptomyceten und wirkt hemmend auf den Komplex III der Atmungskette. Die Elektronentransportkette wird unterbrochen und die Atmungskettenaktivität wird eingestellt. Wird in der Messkammer kein Sauerstoffverbrauch mehr erfasst, kann ein nicht-mitochondrialer Sauerstoffverbrauch ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der Qualitätskontrolle wurden lediglich qualitativ beurteilt und nicht quantitativ ausgewertet.

## 2.9 MDA-Assay

### 2.9.1 Prinzip

Ziel des Malondialdehyd-Assays (MDA-Assay) ist die Quantifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies in Colon-Proben über die Bestimmung der MDA-Konzentration in Colon-Homogenaten mittels Spektrophotometrie.

Oxidativer Stress in Zellen führt zur Lipidperoxidation, einem chemischen Prozess, der zur Bildung hochreaktiver und instabiler Lipidhydroperoxide führt. Die Spaltung der instabilen Peroxide führt zur Bildung von MDA [99]. MDA reagiert mit Thiobarbitursäure zu einem chromogenen Substrat, das spektrophotometrisch bei 532 nm nachgewiesen werden kann und somit eine Bestimmung der MDA-Konzentration ermöglicht. Die Höhe der MDA-Konzentration erlaubt daher einen Rückschluss auf die Menge von reaktiven Sauerstoffspezies in den untersuchten Colon-Proben.

### 2.9.2 Praktisches Vorgehen

Zunächst wurde ein Homogenat aus tiefgefrorenem Colon-Gewebe (ca. 50 mg) und einer 1,5-%igen Kaliumchlorid (KCl)-Lösung (500 µl) hergestellt. Zudem erfolgte die Anfertigung einer Standardreihe. Dazu wurde eine MDA-Lösung (20 mM) hergestellt, die anschließend mit der 1,5-%igen KCl-Lösung zu folgenden Standards verdünnt wurde: (1) 20 µM, (2) 10 µM, (3) 5 µM, (4) 2,5 µM, (5) 0 µM.

Anschließend wurden 250 µl Homogenat bzw. Standardprobe in Zentrifugenröhrchen überführt und jeweils 1500 µl Phosphorsäure (1-%ig) und 500 µl Thiobarbitursäure (0,6-%ig) hinzugegeben. Es erfolgte eine 45-minütige Inkubation bei 90 °C. Sobald die Messproben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden 2000 µl Butanol hinzugefügt. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C mit 3500 rpm. Anschließend wurde die zweite Schicht des Zentrates zur Doppelbestimmung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktion bei 535 nm und 520 nm als Referenzwellenlänge gemessen. Um die Malondialdehydkonzentration in nmol/mg in nmol MDA/mg Protein standardisieren zu können, wurde zusätzlich eine Proteinbestimmung nach Lowry des Homogenats durchgeführt (siehe Abschnitt 2.7).

## 2.10 Statistik

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mithilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism® 8.0. Als Test auf Normalverteilung diente der Kolmogorov-Smirnov-Test. Anschließend wurde bei nicht normalverteilten Daten ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt und ein Post-hoc-Test nach Dunn angeschlossen, um die Unterschiede der einzelnen Gruppen untereinander zu ermitteln. Ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurde festgelegt und die Ergebnisse als Minimum/Median/Maximum beschrieben. Die grafische Darstellung der Daten erfolgte ebenfalls mittels GraphPad Prism® 8.0. Es wurde eine Abbildung durch Boxplots mit Whiskers gewählt.

## 3 Ergebnisse

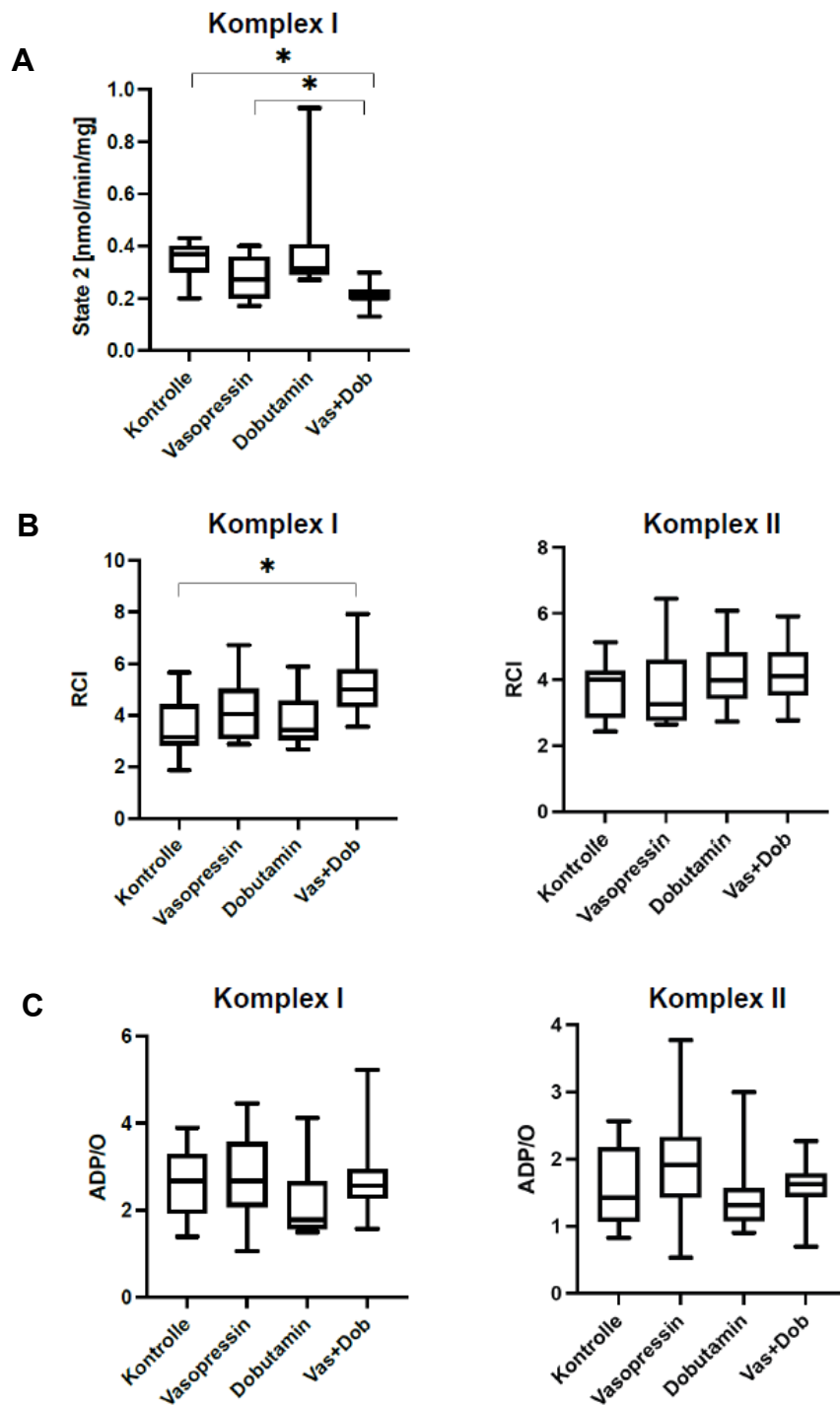
### 3.1 Respirometrie

#### 3.1.1 Dobutamin

Um zu untersuchen, ob Dobutamin die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten beeinflusst, wurde eine Gruppe septischer Ratten mit Dobutamin (480 µg/kg/h) behandelt. Eine weitere Gruppe septischer Ratten wurde mit Vasopressin (13,5 mU/kg/h) und Dobutamin (480 µg/kg/h) behandelt, um außerdem zu untersuchen, ob die Kombination von Vasopressin und Dobutamin die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten beeinflusst. In beiden Versuchsgruppen wurde anschließend die mitochondriale Atmungsaktivität in Colon-Homogenaten mittels Respirometrie analysiert. In der Respirometrie wurden für Komplex I und II die *States* 2–4 der mitochondrialen Atmung gemessen und die *ADP/O-Ratio* sowie der *RCI* berechnet. Die Ergebnisse beider Gruppen wurden zum einen miteinander und zum anderen jeweils mit der Kontrollgruppe sowie mit der Vasopressin-Gruppe verglichen.

Für die Dobutamin-Gruppe zeigten sich im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen keine signifikanten Veränderungen für Komplex I und II (siehe Abb. 7).

Für die Gruppe Vasopressin + Dobutamin zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion von *State 2* der mitochondrialen Atmung für Komplex I (Median 0,37 nmol/min/mg vs. 0,2 nmol/min/mg) (siehe Abb. 7A). Die signifikante Reduktion von *State 2* führte zu einer signifikanten Steigerung des *RCI* (Median 3,14 vs. 5,0) (siehe Abb. 7B). Um zu prüfen, ob die Kombinationstherapie (Vasopressin + Dobutamin) einen additiven Effekt im Vergleich zur Monotherapie mit Vasopressin hat, wurden die Ergebnisse mit der Vasopressin-Gruppe verglichen. Im Vergleich zur Vasopressin-Gruppe zeigte sich eine signifikant reduzierte *State-2*-Atmung für Komplex I (siehe Abb. 7A) bei nicht signifikant erhöhtem *RCI* (siehe Abb. 7B). Darüber hinaus wurden die Ergebnisse mit der Dobutamin-Gruppe verglichen, um zu prüfen, ob die Kombinationstherapie (Vasopressin + Dobutamin) einen additiven Effekt im Vergleich zur Monotherapie mit Dobutamin hat. Im Vergleich zur Dobutamin-Gruppe zeigten sich jedoch keine signifikanten Veränderungen für Komplex I und II (siehe Abb. 7).



**Abb. 7: State 2, Respiratory Control Index (RCI) und ADP/O-Ratio in Colon-Homogenaten in der Kontrollgruppe und nach Behandlung mit Vasopressin, Dobutamin und Vasopressin + Dobutamin (Vas + Dob)**

(A) State 2 für Komplex I

(B) RCI (State 3 / State 2) für Komplex I und Komplex II

(C) ADP/O-Ratio für Komplex I und Komplex II

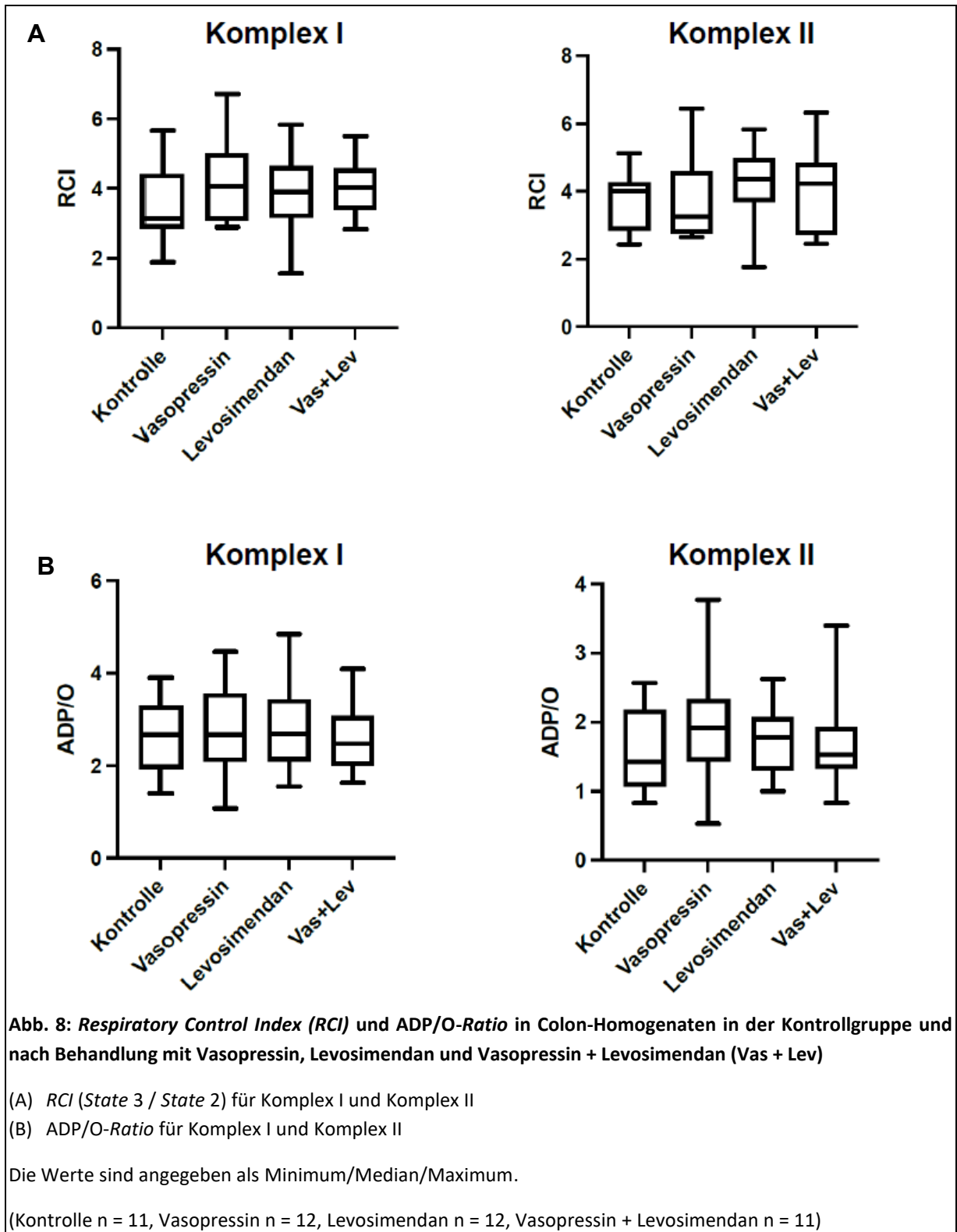
Die Werte sind angegeben als Minimum/Median/Maximum. \* =  $p < 0,05$ ,  $\Pi$  = zwischen den Gruppen

(Kontrolle n = 11, Vasopressin n = 12, Dobutamin n = 10, Vasopressin + Dobutamin n = 12)

### 3.1.2 Levosimendan

Um zu untersuchen, ob Levosimendan die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten beeinflusst, wurde eine Gruppe septischer Ratten mit Levosimendan (12 µg/kg/10 min + 12 µg/kg/h) behandelt. Eine weitere Gruppe septischer Ratten wurde mit Vasopressin (13,5 mU/kg/h) und Levosimendan (12 µg/kg/10 min + 12 µg/kg/h) behandelt, um außerdem zu untersuchen, ob die Kombination von Vasopressin und Levosimendan die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten beeinflusst. In beiden Versuchsgruppen wurde anschließend die mitochondriale Atmungsaktivität in Colon-Homogenaten mittels Respirometrie analysiert. In der Respirometrie wurden für Komplex I und II die *States 2–4* der mitochondrialen Atmung gemessen und die *ADP/O-Ratio* sowie der *RCI* berechnet. Die Ergebnisse beider Gruppen wurden zum einen miteinander und zum anderen jeweils mit der Kontrollgruppe sowie mit der Vasopressin-Gruppe verglichen.

Zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen für Komplex I und II (siehe Abb. 8). Auch im Vergleich zur Kontroll- bzw. Vasopressin-Gruppe zeigten sich weder in der Levosimendan-Gruppe noch in der Gruppe Vasopressin + Levosimendan signifikante Veränderungen für Komplex I und II (siehe Abb. 8).



**Abb. 8:** Respiratory Control Index (RCI) und ADP/O-Ratio in Colon-Homogenaten in der Kontrollgruppe und nach Behandlung mit Vasopressin, Levosimendan und Vasopressin + Levosimendan (Vas + Lev)

(A) RCI (State 3 / State 2) für Komplex I und Komplex II

(B) ADP/O-Ratio für Komplex I und Komplex II

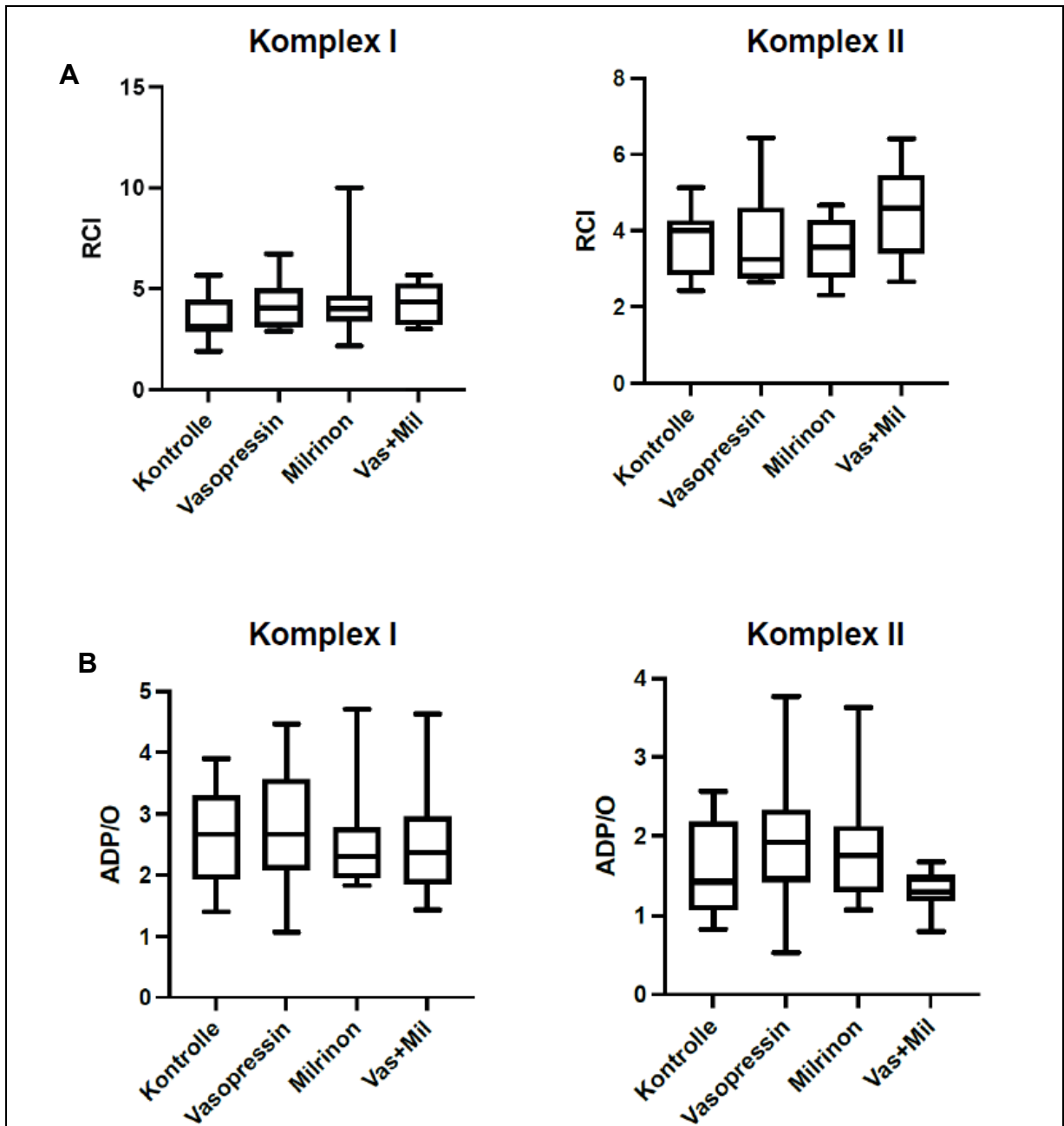
Die Werte sind angegeben als Minimum/Median/Maximum.

(Kontrolle n = 11, Vasopressin n = 12, Levosimendan n = 12, Vasopressin + Levosimendan n = 11)

### 3.1.3 Milrinon

Um zu untersuchen, ob Milrinon die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten beeinflusst, wurde eine Gruppe septischer Ratten mit Milrinon (50 µg/kg/10 min + 45 µg/kg/h) behandelt. Eine weitere Gruppe septischer Ratten wurde mit Vasopressin (13,5 mU/kg/h) und Milrinon (50 µg/kg/10 min + 45 µg/kg/h) behandelt, um außerdem zu untersuchen, ob die Kombination von Vasopressin und Milrinon die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten beeinflusst. In beiden Versuchsgruppen wurde anschließend die mitochondriale Atmungsaktivität in Colon-Homogenaten mittels Respirometrie analysiert. In der Respirometrie wurden für Komplex I und II die *States 2–4* der mitochondrialen Atmung gemessen und die *ADP/O-Ratio* sowie der *RCI* berechnet. Die Ergebnisse beider Gruppen wurden zum einen miteinander und zum anderen jeweils mit der Kontrollgruppe sowie mit der Vasopressin-Gruppe verglichen.

Zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen für Komplex I und II (siehe Abb. 9). Auch im Vergleich zur Kontroll- bzw. Vasopressin-Gruppe zeigten sich weder in der Milrinon-Gruppe noch in der Gruppe Vasopressin + Milrinon signifikante Veränderungen für Komplex I und II (siehe Abb. 9).



**Abb. 9: Respiratory Control Index (RCI) und ADP/O-Ratio in Colon-Homogenaten in der Kontrollgruppe und nach Behandlung mit Vasopressin, Milrinon und Vasopressin + Milrinon (Vas + Mil)**

(A) RCI (State 3 / State 2) für Komplex I und Komplex II

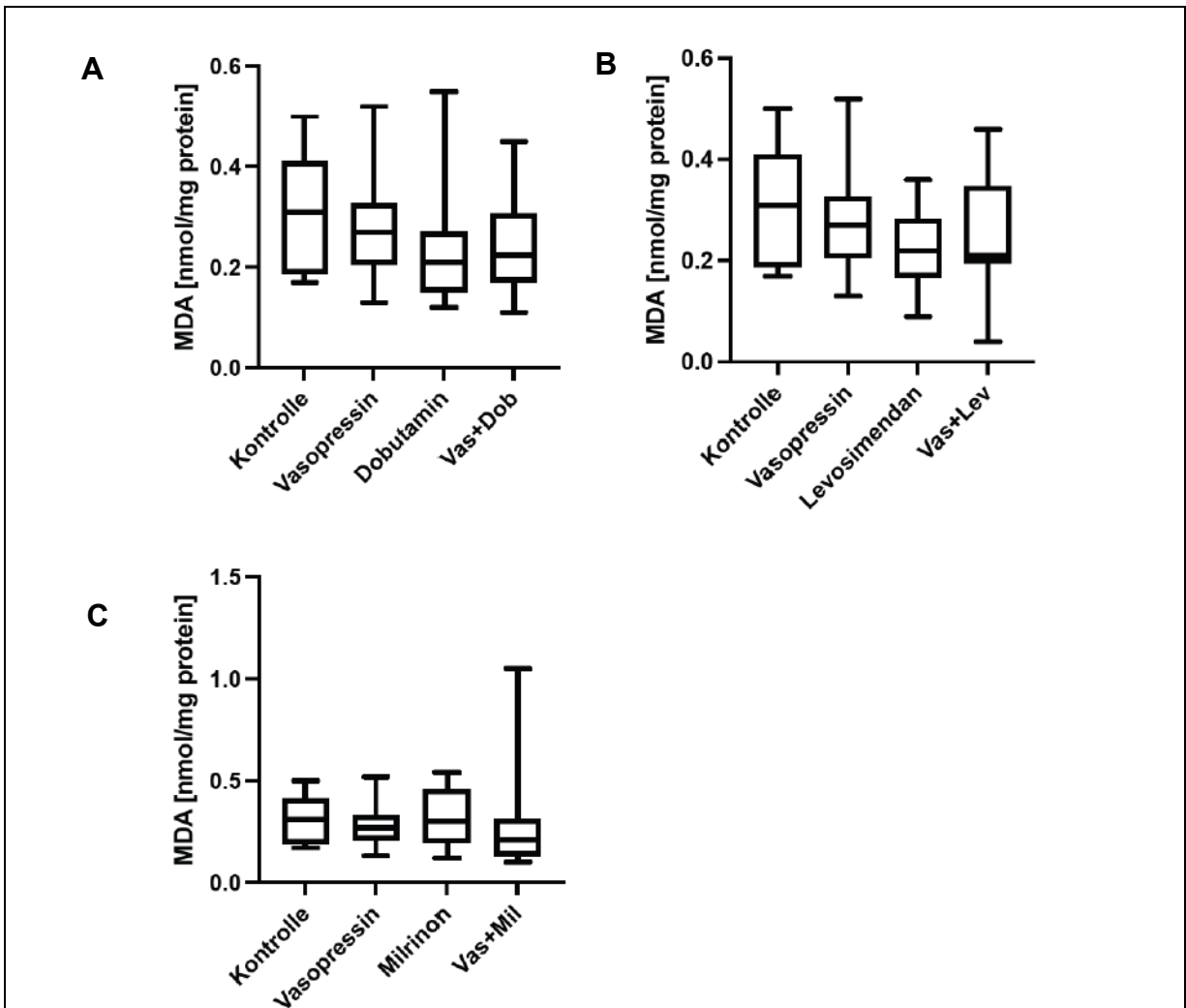
(B) ADP/O-Ratio für Komplex I und Komplex II

Die Werte sind angegeben als Minimum/Median/Maximum.

(Kontrolle n = 11, Vasopressin n = 12, Milrinon n = 10, Vasopressin + Milrinon n = 9)

### 3.2 MDA-Assay

Um den durch ROS erzeugten oxidativen Stress im Gewebe zu quantifizieren, wurde die MDA-Konzentration in Colon-Homogenaten bestimmt. Die MDA-Konzentration war in keiner Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verändert (siehe Abb. 10). Darüber hinaus waren keine signifikanten Ergebnisse zwischen den Versuchsgruppen feststellbar (siehe Abb. 10).



**Abb. 10: MDA-Konzentration in nmol/mg Protein in Colon-Homogenaten**

- (A) Kontrollgruppe und nach Behandlung mit Vasopressin, Dobutamin und Vasopressin + Dobutamin (Vas + Dob)  
 (B) Kontrollgruppe und nach Behandlung mit Vasopressin, Levosimendan und Vasopressin + Levosimendan (Vas + Lev)  
 (C) Kontrollgruppe und nach Behandlung mit Vasopressin, Milrinon und Vasopressin + Milrinon (Vas + Mil)

Die Werte sind angegeben als Minimum/Median/Maximum.

(Kontrolle n = 12, Vasopressin n = 12, Dobutamin n = 11, Vasopressin + Dobutamin n = 12, Levosimendan n = 12, Vasopressin + Levosimendan n = 12, Milrinon n = 12, Vasopressin + Milrinon n = 12)

## 4 Diskussion

### 4.1 Hauptergebnisse

In dieser Arbeit sollten zwei Therapiestrategien bezüglich ihrer Wirkung auf die Mitochondrienfunktion im Colon von septischen Ratten untersucht werden. Einerseits sollte geprüft werden, ob die Monotherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **oder** einem der drei positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon die mitochondriale Funktion im Colon von septischen Ratten beeinflusst. Andererseits sollte geprüft werden, ob die Kombinationstherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **plus** einem der drei positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon die mitochondriale Funktion im Colon von septischen Ratten beeinflusst. Zur Beurteilung der mitochondrialen Funktion in Colon-Homogenaten wurde zum einen die mitochondriale Atmung mittels Respirometrie analysiert und zum anderen der oxidative Stress mittels MDA-Assay quantifiziert. Anhand der Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich die Fragestellungen dieser Arbeit folgendermaßen beantworten:

1. Die Monotherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **oder** einem der drei positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon beeinflusst nicht die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten.
2. Die Kombinationstherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **plus** Dobutamin reduziert die mitochondriale Ruheatmung (*State 2*), ohne die ADP-abhängige Atmung (*State 3*) zu beeinträchtigen, und verbessert folglich die Kopplung zwischen der Elektronentransportkette und der oxidativen Phosphorylierung (*RCI*). Die Kombinationstherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **plus** Levosimendan bzw. Milrinon beeinflusst hingegen nicht die mitochondriale Atmung im Colon von septischen Ratten.
3. Die Monotherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **oder** mit einem der drei positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon hat keinen Einfluss auf die ROS-Produktion im Colon von septischen Ratten.
4. Die Kombinationstherapie mit niedrig dosiertem Vasopressin **plus** einem der drei positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon hat ebenso keinen Einfluss auf die ROS-Produktion im Colon von septischen Ratten.

## 4.2 Methodendiskussion

### 4.2.1 Tierexperimentelle Sepsis-Modelle

In der tierexperimentellen Sepsisforschung kommen verschiedene Sepsis-Modelle zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurde das CASP-Modell gewählt, um eine Sepsis bei den Versuchstieren zu induzieren. Beim CASP-Modell wird die Pathophysiologie einer Anastomoseninsuffizienz nachgebildet, indem ein Stent in das Colon ascendens implantiert wird [100]. Der Stent stellt eine Verbindung zwischen dem Darmlumen des Colon ascendens und der Bauchhöhle her, sodass Faeces kontinuierlich in die Bauchhöhle austreten. Durch den Austritt von Faeces in die Bauchhöhle entsteht eine diffuse Peritonitis, die schließlich zu einer Sepsis führt. Die Ausprägung der Sepsis kann durch die Wahl des Stent-Durchmessers beeinflusst werden und ist somit gut steuerbar [101]. Da Infektionen des Bauchraums zu den häufigsten Auslösern einer Sepsis gehören [3] und das CASP-Modell einen abdominalen Sepsisfokus herstellt, eignet sich das Modell gut, um das klinische Bild einer Sepsis im Tiermodell nachzubilden.

Ein ähnliches, weit verbreitetes OP-Verfahren ist das Cecal-Ligation-and-Puncture-Modell (CLP-Modell). Bei diesem Modell wird ein Caecumabschnitt zunächst abgeschnürt und anschließend mehrfach punktiert. Im CLP-Modell gibt es somit zwei Auslöser für die systemische Entzündungsreaktion. Erstens führt die Caecum-Ligatur zu einer Gewebeischämie und folglich zu einer kontinuierlichen Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Zweitens kommt es infolge der Caecum-Punktionen zu einem Austritt von Faeces in die Bauchhöhle, wodurch, ähnlich wie beim CASP-Modell, eine polymikrobielle Sepsis mit abdominalem Fokus hervorgerufen wird [102-104]. Die Ausprägung der Sepsis ist im Gegensatz zum CASP-Modell weniger gut steuerbar und von mehreren Faktoren abhängig. Einerseits beeinflusst die Höhe der Ligatur das Ausmaß der Gewebeischämie und andererseits beeinflussen die Anzahl und der Durchmesser der Punktionen die Faecesmenge, die in die Bauchhöhle austreten kann. Die Ausprägung der Sepsis kann daher zwischen verschiedenen Laboren variieren und die Vergleichbarkeit von Ergebnissen beeinträchtigen [105]. Außerdem wird beim CLP-Modell eine rasche Abszessbildung beobachtet, wohingegen beim CASP-Modell eine diffuse Peritonitis durch den Stent aufrechterhalten wird [104].

Ein weiteres einfach anzuwendendes Modell ist das Lipopolysaccharid-Modell (LPS-Modell). Beim LPS-Modell wird die Pathophysiologie einer Endotoxämie nachgebildet, indem den Versuchstieren LPS injiziert wird [102, 103]. LPS ist ein Bestandteil der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien und wird als PAMP von PRR des Immunsystems erkannt, wodurch eine Entzündungsreaktion in Gang gesetzt wird [9]. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Modellen stellt das LPS-Modell keinen Sepsisfokus her und vernachlässigt die Pathophysiologie einer polymikrobiellen Sepsis. Daher wird das LPS-Injektionsmodell aktuell nicht mehr als präklinisches Sepsis-Modell empfohlen [106].

#### 4.2.2 Medikation

Es gibt zwei Möglichkeiten, zu untersuchende Medikamente in den Versuchsablauf einzubinden, um die Wirkung eines Medikamentes auf die Mitochondrien eines Organs zu untersuchen. Erstens kann das zu untersuchende Medikament, wie in der vorliegenden Arbeit, *in vivo* verabreicht werden. Dazu erhielten die Versuchstiere 24 Stunden nach der CASP-OP die zu untersuchenden Medikamente über eine intravenöse Infusion mittels Spritzenpumpe. Anschließend wurden die Colon-Homogenate der behandelten Versuchstiere untersucht. Diese Methode entspricht am ehesten dem klinischen Vorgehen und erlaubt eine allgemeine Aussage über die Effekte der untersuchten Medikamente auf die Mitochondrien des entsprechenden Organs. Allerdings ist eine Unterscheidung zwischen direkten und indirekten Effekten der Medikamente auf die Mitochondrien nicht möglich. Direkte Effekte bezeichnen Wirkungen eines Medikaments, die die Funktion der Mitochondrien unmittelbar und unabhängig von anderen Faktoren beeinflussen. Dies könnte beispielsweise durch die Aktivierung oder Blockade bestimmter Rezeptoren, die Modulation von Enzymen oder die Stimulation bestimmter Signalwege geschehen. Im Gegensatz dazu bezeichnen indirekte Effekte Wirkungen eines Medikaments, die nicht unmittelbar die Mitochondrien betreffen, sondern andere Faktoren beeinflussen, die wiederum Auswirkungen auf die Mitochondrienfunktion haben. Indirekte Effekte auf die Mitochondrien können durch zahlreiche Mechanismen entstehen. Beispielsweise wäre eine Beeinflussung der Mitochondrienfunktion durch die Modulation von Hämodynamik und Mikrozirkulation denkbar, was als Hintergrund für die Fragestellung dieser Arbeit diente. Zweitens kann das zu untersuchende Medikament *in vitro* verabreicht werden. Bei dieser Methode bleiben die Versuchstiere unbehandelt und es erfolgt lediglich eine Inkubation der Gewebekomponenten

mit dem zu untersuchenden Medikament. Bei diesem Verfahren werden systemische Medikamentenwirkungen ausgeschlossen. Folglich ist diese Methode insbesondere zum Nachweis direkter Effekte geeignet und bietet sich zur Differenzierung zwischen direkten und indirekten Effekten an, wenn beim *In-vivo*-Verfahren Veränderungen der Mitochondrienfunktion festgestellt wurden.

Die Dosierung von Vasopressin orientierte sich an den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Schulz et al. [71], die einen positiven Effekt von subtherapeutisch (= niedrig) dosiertem Vasopressin auf die Mikrozirkulation des Colons nachweisen konnten. Es wird jedoch vermutet, dass der Effekt von niedrig dosiertem Vasopressin allein nicht ausreicht, um die Barrierefunktion des Colons bei Sepsis aufrechtzuerhalten. Da ein Zusammenhang zwischen Mikrozirkulation und mitochondrialer Dysfunktion angenommen wird, sollte in dieser Arbeit niedrig dosiertes Vasopressin mit den positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon kombiniert werden. Diese Kombination ist auch aus klinischer Sicht interessant, da bei Patienten mit septischem Schock ebenfalls Vasopressoren und positive Inotropika kombiniert werden. Die Dosierung der positiven Inotropika orientierte sich an den klinischen Dosierungen nach Fachinformation.

### **4.2.3 Messung der mitochondrialen Funktion**

Zur Untersuchung der mitochondrialen Atmung wurde analog zu bereits erfolgten Studien dieser Arbeitsgruppe [47, 107-110] eine Respirometrie durchgeführt. In der Respirometrie werden wesentliche mitochondriale Funktionsparameter wie der *RCI* und die *ADP/O-Ratio* erfasst, wodurch sie eine Beurteilung der mitochondrialen Atmung ermöglicht [111]. Die Messung wurde standardisiert bei einer Temperatur von 30 °C in der Messkammer durchgeführt und entsprach somit nicht der physiologischen Körpertemperatur. Dadurch ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus eingeschränkt.

Zur Durchführung einer Respirometrie eignen sich sowohl Gewebehomogenate als auch isolierte Mitochondrien. Gängige Verfahren zur Isolation von Mitochondrien sind jedoch zeitintensiv und gehen mit einem hohen Mitochondrienverlust einher. Dahingegen gestaltet sich die Herstellung von Gewebehomogenaten bei unbeeinträchtigter Qualität der Messergebnisse erheblich einfacher und die Problematik des hohen Mitochondrienverlustes kann deutlich reduziert werden [112].

Bei der Verwendung von Gewebehomogenaten müssen dennoch zwei Aspekte berücksichtigt werden. Erstens können im Rahmen des Homogenisierungsvorgangs mechanische Schäden an den Mitochondrien entstehen. Daher wurden zur Detektion eventueller mitochondrialer Schäden und zum Ausschluss einer konsekutiven Verfälschung der Messwerte in jeder Versuchsreihe Qualitätskontrollen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.8.2). Darüber hinaus wurde jede Messung dreimal durchgeführt und ein Mittelwert für die Datenauswertung berechnet. Zweitens bewahren Gewebehomogenate den Gewebekontext und enthalten verschiedene Zelltypen. Dadurch ist es möglich, Aussagen über die Gesamtfunktion der Mitochondrien eines Gewebes zu treffen. Allerdings können spezifische Veränderungen der Mitochondrienfunktion nicht bestimmten Zellgruppen zugeordnet werden und Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen oder Gewebebereichen können verschleiert werden.

## 4.3 Ergebnisdiskussion

### 4.3.1 Dobutamin

In dieser Arbeit konnte für die Monotherapie mit Dobutamin kein signifikanter Effekt auf die Mitochondrienfunktion im Colon von septischen Ratten festgestellt werden. Die mitochondriale Atmung, die mittels Respirometrie untersucht wurde, veränderte sich im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen nicht signifikant. Die ebenfalls unveränderte ROS-Produktion, die mittels MDA-Assay ermittelt wurde, passt zu der unveränderten mitochondrialen Atmung.

Interessanterweise führte jedoch die Kombination von Dobutamin mit niedrig dosiertem Vasopressin zu einem signifikant gesteigerten *RCI*, welcher als Parameter für die Kopplung zwischen der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung diene. Die Steigerung des *RCI* erfolgte durch eine Reduktion der *State-2*-Atmung, die der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotenzials dient. Die nach Zugabe von ADP gemessene *State-3*-Atmung blieb im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen hingegen unverändert. Ebenso wenig zeigte sich eine Zunahme der *ADP/O-Ratio* als Parameter für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung. Die ROS-Produktion blieb ebenfalls unverändert. Es ist daher davon auszugehen, dass auch die Kombinationstherapie von Dobutamin mit niedrig dosiertem Vasopressin nicht die Gesamtfunktion der Mitochondrien im Colon von septischen Ratten verbessert.

Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen ist wie bei allen tierexperimentellen Studien nur eingeschränkt möglich. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich die Mitochondrienfunktion zwar zwischen verschiedenen Organen unterscheidet, sich aber zwischen verschiedenen Spezies für ein Organ ähnelt [45].

Bisher liegen neben der vorliegenden Studie keine weiteren Studien zum Effekt von Dobutamin auf die Mitochondrienfunktion im Colon vor. Die Wirkung von Dobutamin auf die Mitochondrienfunktion in Leber und Skelettmuskel wurde hingegen schon von zwei Forschungsgruppen unter septischen Bedingungen untersucht.

Die erste Forschungsgruppe untersuchte *in vitro* die Wirkung von Dobutamin auf die mitochondriale Atmung im Skelettmuskel [79] und in der Leber [80] von Schweinen. Porta et al. entnahmen dazu Gewebeproben von gesunden Tieren und isolierten anschließend die Mitochondrien. Die Mitochondrien wurden zunächst mit LPS behandelt und später mit Dobutamin inkubiert. In beiden Geweben reduzierte die Behandlung mit LPS die Effizienz der mitochondrialen Atmung für Komplex I. Dies zeigte sich in einer erhöhten *State-4*-Atmung und einer daraus resultierenden Abnahme der *RCR (State 3/State 4)* sowie in einer erniedrigten *ADP/O-Ratio*. Die anschließende Inkubation mit Dobutamin beeinflusste jedoch interessanterweise nur die Mitochondrienfunktion des Skelettmuskels, nicht aber die Mitochondrienfunktion der Leber. In den Mitochondrien des Skelettmuskels konnte die LPS-induzierte Reduktion der Effizienz der mitochondrialen Atmung für Komplex I teilweise aufgehoben werden. Denn nach Inkubation der Skelettmuskel-Mitochondrien mit Dobutamin beobachteten die Forscher die Verbesserung zweier Parameter. Zum einen nahm die *State-4*-Atmung für Komplex I ab und somit die *RCR* zu, was für eine verbesserte Kopplung zwischen der Elektronentransportkette und der oxidativen Phosphorylierung spricht. Zum anderen nahm die *ADP/O-Ratio* zu, was für eine gesteigerte Effizienz der oxidativen Phosphorylierung spricht. Dahingegen konnte die LPS-induzierte Reduktion der Effizienz der mitochondrialen Atmung für Komplex I in den Lebermitochondrien nicht aufgehoben werden. Denn nach Inkubation der Lebermitochondrien mit Dobutamin veränderten sich die erhobenen Parameter zur Beurteilung der mitochondrialen Atmung nur unwesentlich. Als Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse diskutieren die Autoren organspezifische Effekte. Ein Vergleich der Ergebnisse von Porta et al. mit unseren Ergebnissen ist nur eingeschränkt möglich, da sich die Methodik erheblich unterscheidet und verschiedene

Organe untersucht wurden. Interessant ist jedoch, dass sich sowohl in der Studie von Porta et al. als auch in der vorliegenden Arbeit Veränderungen der Komplex-I-abhängigen Atmung feststellen ließen. Porta et al. zeigten sowohl eine verbesserte Kopplung der Elektronentransportkette und der oxidativen Phosphorylierung als auch eine gesteigerte Effizienz der oxidativen Phosphorylierung für Komplex I durch Dobutamin. Dahingegen zeigte unsere Studie lediglich eine verbesserte Kopplung zwischen der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung für Komplex I durch die Kombination von Vasopressin + Dobutamin.

Die zweite Forschungsgruppe [74] untersuchte die Wirkung verschiedener Herz-Kreislauf-wirksamer Medikamente auf isolierte Mitochondrien im Skelettmuskel von gesunden und septischen Schweinen. Die gesunden Tiere dienten als Kontrollgruppe. Bei den Versuchstieren, die zur septischen Gruppe gehörten, induzierten Vuda et al. eine Sepsis, indem sie Faeces in die Bauchhöhle applizierten. Durch die Applikation von Faeces in die Bauchhöhle wurde ähnlich wie beim CASP-Modell eine Peritonitis hervorgerufen, die anschließend zu einer Sepsis führte. Anschließend isolierten die Untersucher Mitochondrien aus einer Skelettmuskelbiopsie und inkubierten die isolierten Mitochondrien mit verschiedenen Herz-Kreislauf-wirksamen Medikamenten (u. a. Noradrenalin und Dobutamin). In dieser Studie zeigten weder die Inkubation mit Noradrenalin noch die Inkubation mit Dobutamin signifikante Effekte auf die mitochondriale Atmung in der Kontroll- bzw. septischen Gruppe. Auch bei dieser Studie ist ein Vergleich aufgrund der abweichenden Methodik nur bedingt möglich. Da es sich bei der Studie von Vuda et al. um eine *Ex-vivo*-Studie handelt, muss beachtet werden, dass lediglich direkte Effekte der Medikamente auf die Mitochondrien erfasst werden konnten. In unserer Studie hingegen wurden die Medikamente *in vivo* verabreicht. Daher konnten sowohl direkte als auch indirekte Effekte auf die Mitochondrien erfasst, allerdings nicht voneinander differenziert werden.

Zwei Aspekte können beim Vergleich der Studie von Vuda et al. mit unserer Studie diskutiert werden. Erstens kann spekuliert werden, ob möglicherweise indirekte Effekte zu unseren Ergebnissen für die Versuchsgruppe Vasopressin + Dobutamin beigetragen haben. Jedoch muss hierbei beachtet werden, dass zum einen unterschiedliche Organe zweier verschiedener Spezies verglichen werden und es sich zum anderen nicht um die identische Medikation handelt. Um eine konkretere Aussage über die Art der Wirkung treffen zu können, wäre

folglich eine Studie notwendig, die die Wirkung von Dobutamin  $\pm$  Vasopressin *in vitro* auf Colon-Homogenate von CASP-Ratten untersucht. Zweitens stützt der Vergleich beider Studien die Beobachtung, dass die Kombination von Dobutamin mit Vasopressin für die Steigerung des *RCI* in unseren Versuchen verantwortlich ist, während eine Monotherapie mit Dobutamin keine signifikante Beeinflussung der mitochondrialen Atmung bewirkt. Denn in der Studie von Vuda et al. wurden die Homogenate ausschließlich mit Dobutamin behandelt, wohingegen in dieser Arbeit eine Versuchsgruppe ausschließlich mit Dobutamin und eine andere Versuchsgruppe mit der Kombination aus Dobutamin + Vasopressin behandelt wurden. Für die alleinige Therapie mit Dobutamin wurden in beiden Studien keine Veränderungen der mitochondrialen Atmung beobachtet. Die Ergebnisse beider Studien stimmen somit miteinander überein. Die Kombination von Dobutamin mit Vasopressin, die in unseren Versuchen zusätzlich untersucht wurde, reduzierte hingegen die *State-2*-Atmung und beeinflusste somit die Kopplung zwischen Atmungskette und oxidativer Phosphorylierung. Auch hierbei muss berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Organe zweier verschiedener Spezies verglichen werden. Außerdem ist zu beachten, dass in der Arbeit von Vuda et al. die Medikamentengabe *in vitro* erfolgte, wohingegen in unserer Studie die Medikamentengabe *in vivo* erfolgte.

### 4.3.2 Levosimendan

In dieser Arbeit konnte weder für die Monotherapie mit Levosimendan noch für die Kombinationstherapie mit Levosimendan + niedrig dosiertem Vasopressin ein Effekt auf die Mitochondrienfunktion im Colon von septischen Ratten festgestellt werden. Die mitochondriale Atmung, die mittels Respirometrie untersucht wurde, veränderte sich im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen nicht signifikant. Die ebenfalls unveränderte ROS-Produktion, die mittels MDA-Assay ermittelt wurde, passt zu der unveränderten mitochondrialen Atmung.

Es ist überraschend, dass sich in unseren Levosimendan-Versuchsgruppen keine signifikanten Veränderungen zeigten. Denn es wird schon länger vermutet, dass Levosimendan die Mitochondrienfunktion beeinflusst, indem es nicht nur die  $K_{ATP}$ -Kanäle in Gefäßmuskelzellen öffnet, sondern auch eine Öffnung der mitochondrialen  $K_{ATP}$ -Kanäle bewirkt. Bisher liegen u. a. Untersuchungen an Leber- [84] und Herzmitochondrien [113] vor, die diese Vermutung bestärken.

Der Einfluss von Levosimendan auf die mitochondriale Funktion bei Sepsis wurde bisher nur von wenigen Forschungsgruppen untersucht. Torracco et al. [86] bestimmten zur Beurteilung des Redox-Status die Menge der glutathionylierten Proteine sowie die Expression der mitochondrialen Superoxiddismutase in Muskelbiopsien von septischen Patienten, die zuvor mit Levosimendan behandelt worden waren. Als Hinweis auf eine verbesserte antioxidative Abwehr stellten die Forscher eine Reduktion der glutathionylierten Proteine fest und erfassten eine gesteigerte Expression der mitochondrialen Superoxiddismutase mittels Western Blot. Torracco et al. schlussfolgerten aus diesen Ergebnissen, dass Levosimendan die Mitochondrien in Skelettmuskelbiopsien vor oxidativem Stress schützt, indem es die antioxidative Abwehr erhöht.

Im Gegensatz dazu deuten unsere Versuche darauf hin, dass Levosimendan den oxidativen Stress im Colon bei Sepsis weder reduziert noch steigert. Die Ergebnisse unserer Studie könnten daher ein Hinweis darauf sein, dass die protektive Wirkung von Levosimendan gewebespezifisch ist. Bislang wurde die Wirkung von Levosimendan auf die Mitochondrien im Colon von keiner weiteren Forschungsgruppe erforscht.

### **4.3.3 Milrinon**

In dieser Arbeit konnte weder für die Monotherapie mit Milrinon noch für die Kombinationstherapie mit Milrinon + niedrig dosiertem Vasopressin ein Effekt auf die Mitochondrienfunktion im Colon von septischen Ratten festgestellt werden. Die mitochondriale Atmung, die mittels Respirometrie untersucht wurde, veränderte sich im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen nicht signifikant. Die ebenfalls unveränderte ROS-Produktion, die mittels MDA-Assay ermittelt wurde, passt zu der unveränderten mitochondrialen Atmung.

Bisher ist wenig über die mitochondriale Wirkung von Milrinon bekannt und wurde bislang auch in keinem Sepsis-Modell untersucht. Lin et al. [94] untersuchten jedoch kürzlich die Wirkung von Milrinon auf die kardiale Mitochondrienfunktion bei Katecholamin-induziertem Herzversagen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Milrinon im Tiermodell die Aktivität von Komplex I und III der Atmungskette in Kardiomyozyten steigert [94].

Eine andere Forschungsgruppe untersuchte mit Cilostazol die Wirkung eines weiteren Wirkstoffs aus der Gruppe der PDE3-Inhibitoren auf die Mitochondrienfunktion in

Kardiomyozyten. Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass der PDE3-Inhibitor Cilostazol einen protektiven Effekt auf die Mitochondrien in Kardiomyozyten hat. Denn Cilostazol scheint das Anschwellen der Mitochondrien zu verhindern, die mitochondriale ROS-Produktion zu reduzieren und das mitochondriale Membranpotenzial zu stabilisieren [114].

Die positiven Effekte der PDE3-Inhibitoren Milrinon und Cilostazol auf die mitochondriale Funktion in Kardiomyozyten scheinen sich jedoch nicht auf andere Zelltypen und Gewebe übertragen zu lassen. Denn unsere Versuche ergeben keinen Hinweis darauf, dass Milrinon die Mitochondrienfunktion im Colon beeinflusst.

Eine Studie von Abdollahi et al. [115] legt sogar nahe, dass PDE3-Inhibitoren, darunter Milrinon, die Membranintegrität von Hepatozyten herabsetzen und somit die Anfälligkeit für Mitochondriengifte wie Cyanid erhöhen.

Folglich lässt sich vermuten, dass die Wirkung von Milrinon organabhängig ist. Aus diesem Grund wären zusätzliche Studien zu möglichen Effekten von Milrinon auf die mitochondriale Funktion weiterer Organe interessant und könnten ebenfalls Informationen über potenzielle therapeutische Vorteile sowie Risiken von Milrinon in der klinischen Verwendung liefern.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von niedrig dosiertem Vasopressin sowie der drei positiven Inotropika Dobutamin, Levosimendan und Milrinon auf die Mitochondrienfunktion im Colon septischer Ratten zu untersuchen. In der Versuchsgruppe Vasopressin + Dobutamin zeigte sich ein signifikanter Anstieg des *RCI*, der auf eine signifikant reduzierte Basalatmung (*State 2*) zurückzuführen war. Da jedoch keine weiteren signifikanten Veränderungen der mitochondrialen Atmung oder der ROS-Produktion nachgewiesen werden konnten, ist eine entscheidende Beeinflussung der untersuchten Mitochondrienfunktionen durch diese Medikamente im Colon-Gewebe nicht anzunehmen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich zwei Schlussfolgerungen ziehen.

- (1) Keines der getesteten Medikamente scheint die Gesamtfunktion der Mitochondrien im Colon zu verbessern. Daher lässt sich für keines der Medikamente ein therapeutischer Nutzen in Hinblick auf die mitochondriale Funktion im Colon bei Sepsis ableiten.
- (2) Andersherum scheint jedoch auch keines der getesteten Medikamente die Gesamtfunktion der Mitochondrien im Colon zu verschlechtern. Daher ist davon auszugehen, dass die Medikamente im klinischen Alltag zur Kreislaufstabilisierung von septischen Patienten weiterhin eingesetzt werden können, ohne eine Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion im Colon befürchten zu müssen.

Da in dieser Arbeit keine entscheidenden Effekte der untersuchten Medikamente auf die Gesamtfunktion der Mitochondrien im Colon gezeigt werden konnten, andere Studien jedoch Effekte auf die Mitochondrien anderer Organe (z. B. Herz und Leber) nachwiesen, wären weitere *in vivo*-Versuche für andere Organe umso interessanter. Denn sowohl Vasopressin als auch positive Inotropika finden bei septischem Schock im klinischen Alltag Anwendung. Somit ist es von hoher klinischer Bedeutung, ein umfassendes Verständnis sowohl für den möglichen therapeutischen Nutzen als auch für potenzielle Risiken dieser Medikamente zu erlangen. Vor diesem Hintergrund haben ebenfalls klinische Studien einen hohen Stellenwert, um die Sicherheit und Wirksamkeit dieser Medikamente im Kontext der Sepsisbehandlung evaluieren zu können.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Singer, M., et al., The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016. 315(8): p. 801-10.
2. DSG (Deutsche Sepsis-Gesellschaft), DGAI (Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin), DIVI (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin) et al. (2025): S3-Leitlinie: Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge – Update 2025. Langfassung. Version 4.0. 2025.
3. RKI, Sepsis – neue Definition, neue Kontroversen *Epidemiologisches Bulletin*, 2017/Nr. 37.
4. Rudd, K.E., et al., Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 2020. 395(10219): p. 200-211.
5. Fleischmann-Struzek, C., et al., Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany. *Intensive Care Med*, 2018. 44(11): p. 1826-1835.
6. SepNet Critical Care Trials Group, Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med*, 2016. 42(12): p. 1980-1989.
7. Angus, D.C. and T. van der Poll, Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2013. 369(21): p. 2063.
8. Zhang, Y.Y. and B.T. Ning, Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. *Signal Transduct Target Ther*, 2021. 6(1): p. 407.
9. Murphy, K.M., *Janeway's Immunobiology*. 2017: Taylor & Francis Group.
10. van der Poll, T., et al., The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*, 2017. 17(7): p. 407-420.
11. Hotchkiss, R.S., G. Monneret and D. Payen, Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2013. 13(12): p. 862-74.
12. Boomer, J.S., et al., Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*, 2011. 306(23): p. 2594-605.
13. Huang, M., S. Cai and J. Su, The Pathogenesis of Sepsis and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(21): p. 5376.
14. Ince, C., The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*, 2005. (Suppl 4): p. S13-9.
15. Pool, R., H. Gomez and J.A. Kellum, Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. *Crit Care Clin*, 2018. 34(1): p. 63-80.
16. De Backer, D., et al., Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. 166(1): p. 98-104.

17. Donati, A., et al., From macrohemodynamic to the microcirculation. *Crit Care Res Pract*, 2013. p. 892710.
18. Lipinska-Gediga, M., Sepsis and septic shock-is a microcirculation a main player? *Anaesthesiol Intensive Ther*, 2016. 48(4): p. 261-265.
19. Tang, A.L., M.J. Shen and G.Q. Zhang, Intestinal microcirculation dysfunction in sepsis: pathophysiology, clinical monitoring, and therapeutic interventions. *World J Emerg Med*, 2022. 13(5): p. 343-348.
20. Ince, C., et al., The Endothelium in Sepsis. *Shock*, 2016. 45(3): p. 259-70.
21. Rubio-Gayosso, I., S.H. Platts and B.R. Duling, Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 290(6): p. H2247-56.
22. Levi, M. and T. van der Poll, Coagulation and sepsis. *Thromb Res*, 2017. 149: p. 38-44.
23. Bateman, R.M., et al., The Effect of Sepsis on the Erythrocyte. *Int J Mol Sci*, 2017. 18(9).
24. Greer, J., Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in sepsis. *BJA Education* 15, 2015: p. 316–321.
25. Hotchkiss, R.S., et al., Sepsis and septic shock. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. 2: p. 16045.
26. Wendel, M., Heller, A. & Koch, T, Pathomechanismen des Organversagens. *Anaesthesist* 58, 2009: p. 343–35.
27. Spronk, P.E., D.F. Zandstra and C. Ince, Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of the microcirculation. *Crit Care*, 2004. 8(6): p. 462-8.
28. Verdant, C.L., et al., Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis. *Crit Care Med*, 2009. 37(11): p. 2875-81.
29. Hildebrand, L.B., et al., Redistribution of microcirculatory blood flow within the intestinal wall during sepsis and general anesthesia. *Anesthesiology*, 2003. 98(3): p. 658-69.
30. Whitworth, P.W., et al., Hypoperfusion of the intestinal microcirculation without decreased cardiac output during live *Escherichia coli* sepsis in rats. *Circ Shock*, 1989. 27(2): p. 111-22.
31. De Backer, D., et al., Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence*, 2014. 5(1): p. 73-9.
32. Assimakopoulos, S.F., et al., Gut-origin sepsis in the critically ill patient: pathophysiology and treatment. *Infection*, 2018. 46(6): p. 751-760.
33. Graeve, L., Müller, M., Zellorganellen und Vesikeltransport, in Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. 2014, Springer.
34. Welsch, U.K., W.; T. Deller, Die Zelle, in *Lehrbuch Histologie*. 2014, Urban & Fischer in Elsevier p. 54-56.

35. Berg, J.M., et al., Die oxidative Phosphorylierung, in Stryer Biochemie. 2018, Springer Spektrum.
36. Mitchell, P., Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 1961. 191: p. 144-8.
37. Finkel, T., Signal transduction by mitochondrial oxidants. *J Biol Chem*, 2012. 287(7): p. 4434-40.
38. Nicholls, D.G., Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium*, 2005. 38(3-4): p. 311-7.
39. Rizzuto, R., et al., Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13(9): p. 566-78.
40. Tait, S.W. and D.R. Green, Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. 11(9): p. 621-32.
41. Brandt, U., Mitochondrien – Organellen der ATP-Gewinnung, in Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 2014, Springer.
42. Christen, P., R. Jaussi and R. Benoit, ATP-Synthese in Mitochondrien, in Biochemie und Molekularbiologie. 2024, Springer Spektrum.
43. Sousa, J.S., E. D'Imprima and J. Vonck, Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Subcell Biochem*, 2018. 87: p. 167-227.
44. Arulkumaran, N., et al., Mitochondrial Function in Sepsis. *Shock*, 2016. 45(3): p. 271-81.
45. Jeger, V., et al., Mitochondrial function in sepsis. *Eur J Clin Invest*, 2013. 43(5): p. 532-42.
46. Singer, M., The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. *Virulence*, 2014. 5(1): p. 66-72.
47. Herminghaus, A., et al., Time-related changes in hepatic and colonic mitochondrial oxygen consumption after abdominal infection in rats. *Intensive Care Med Exp*, 2019. 7(1): p. 4.
48. Kozlov, A.V., et al., Mitochondria-mediated pathways of organ failure upon inflammation. *Redox Biol*, 2017. 13: p. 170-181.
49. Brealey, D., et al., Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet*, 2002. 360(9328): p. 219-23.
50. Lawrence, K.L., et al., CD4+ lymphocyte adenosine triphosphate determination in sepsis: a cohort study. *Crit Care*, 2010. 14(3): p. R110.
51. Spronk, P.E.K.-E., E.S.; Ince, C., Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrome (MMDS): A New Look at Sepsis. *Functional Hemodynamic Monitoring*, 2005: p. 47-67.
52. Kohoutova, M., et al., Variability of mitochondrial respiration in relation to sepsis-induced multiple organ dysfunction. *Physiol Res*, 2018. 67(Suppl 4): p. S577-S592.

53. Fink, M., Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*, 1997. 110: p. 87-95.
54. Sies, H. and E. Cadenas, Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1985. 311(1152): p. 617-31.
55. Brand, M.D., Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radic Biol Med*, 2016. 100: p. 14-31.
56. Kakkar, P. and B.K. Singh, Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Mol Cell Biochem*, 2007. 305(1-2): p. 235-53.
57. Mantzaris, K., V. Tsolaki and E. Zakynthinos, Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. p. 5985209.
58. Poderoso, J.J., et al., Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*, 1996. 328(1): p. 85-92.
59. Brown, G.C., Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1504(1): p. 46-57.
60. Galley, H.F., Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*, 2011. 107(1): p. 57-64.
61. Bauer, I. and B.H. Pannen, Bench-to-bedside review: Carbon monoxide--from mitochondrial poisoning to therapeutic use. *Crit Care*, 2009. 13(4): p. 220.
62. Larsen, F.J., et al., Regulation of mitochondrial function and energetics by reactive nitrogen oxides. *Free Radic Biol Med*, 2012. 53(10): p. 1919-28.
63. Petrosillo, G., et al., Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Lett*, 2001. 509(3): p. 435-8.
64. Ott, M., et al., Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002. 99(3): p. 1259-63.
65. Radi, R., et al., Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*, 1994. 308(1): p. 89-95.
66. Treschan, T.A. and J. Peters, The vasopressin system: physiology and clinical strategies. *Anesthesiology*, 2006. 105(3): p. 599-612.
67. Landry, D.W., et al., Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation*, 1997. 95(5): p. 1122-5.
68. Truse, R., et al., Exogenous vasopressin dose-dependently modulates gastric microcirculatory oxygenation in dogs via V1A receptor. *Crit Care*, 2019. 23(1): p. 353.
69. Westphal, M., et al., Arginine vasopressin compromises gut mucosal microcirculation in septic rats. *Crit Care Med*, 2004. 32(1): p. 194-200.

70. Klinzing, S., et al., Moderate-dose vasopressin therapy may impair gastric mucosal perfusion in severe sepsis: a pilot study. *Anesthesiology*, 2011. 114(6): p. 1396-402.
71. Schulz, J., et al., Sub-therapeutic vasopressin but not therapeutic vasopressin improves gastrointestinal microcirculation in septic rats: A randomized, placebo-controlled, blinded trial. *PLoS One*, 2021. 16(9): p. e0257034.
72. Sims, C.A., et al., Supplemental arginine vasopressin during the resuscitation of severe hemorrhagic shock preserves renal mitochondrial function. *PLoS One*, 2017. 12(10): p. e0186339.
73. Regueira, T., et al., Norepinephrine to increase blood pressure in endotoxaemic pigs is associated with improved hepatic mitochondrial respiration. *Crit Care*, 2008. 12(4): p. R88.
74. Vuda, M., et al., Effects of catecholamines on hepatic and skeletal muscle mitochondrial respiration after prolonged exposure to faecal peritonitis in pigs. *Innate Immun*, 2012. 18(2): p. 217-30.
75. Ruffolo, R.R., Jr., The pharmacology of dobutamine. *Am J Med Sci*, 1987. 294(4): p. 244-8.
76. Secchi, A., et al., Dobutamine maintains intestinal villus blood flow during normotensive endotoxemia: an intravital microscopic study in the rat. *J Crit Care*, 1997. 12(3): p. 137-41.
77. Neviere, R., et al., Dobutamine improves gastrointestinal mucosal blood flow in a porcine model of endotoxic shock. *Crit Care Med*, 1997. 25(8): p. 1371-7.
78. De Backer, D., et al., The effects of dobutamine on microcirculatory alterations in patients with septic shock are independent of its systemic effects. *Crit Care Med*, 2006. 34(2): p. 403-8.
79. Porta, F., et al., Effect of endotoxin, dobutamine and dopamine on muscle mitochondrial respiration in vitro. *J Endotoxin Res*, 2006. 12(6): p. 358-66.
80. Porta, F., et al., Effects of endotoxin and catecholamines on hepatic mitochondrial respiration. *Inflammation*, 2009. 32(5): p. 315-21.
81. Haikala, H., J. Levijoki and I.B. Linden, Troponin C-mediated calcium sensitization by levosimendan accelerates the proportional development of isometric tension. *J Mol Cell Cardiol*, 1995. 27(10): p. 2155-65.
82. Yokoshiki, H., et al., Levosimendan, a novel Ca<sup>2+</sup> sensitizer, activates the glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channel in rat arterial myocytes. *Eur J Pharmacol*, 1997. 333(2-3): p. 249-59.
83. Inoue, I., et al., ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*, 1991. 352(6332): p. 244-7.
84. Kopustinskiene, D.M., P. Pollesello and N.E. Saris, Levosimendan is a mitochondrial K(ATP) channel opener. *Eur J Pharmacol*, 2001. 428(3): p. 311-4.
85. Facundo, H.T., M. Fornazari, and A.J. Kowaltowski, Tissue protection mediated by mitochondrial K<sup>+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1762(2): p. 202-12.

86. Torraco, A., et al., Effects of levosimendan on mitochondrial function in patients with septic shock: a randomized trial. *Biochimie*, 2014. 102: p. 166-73.
87. Pagel, P.S., D.A. Hettrick and D.C. Warltier, Influence of levosimendan, pimobendan, and milrinone on the regional distribution of cardiac output in anaesthetized dogs. *Br J Pharmacol*, 1996. 119(3): p. 609-15.
88. Schwarte, L.A., et al., Levosimendan is superior to milrinone and dobutamine in selectively increasing microvascular gastric mucosal oxygenation in dogs. *Crit Care Med*, 2005. 33(1): p. 135-42; discussion 246-7.
89. Jia, T., et al., Levosimendan Ameliorates Post-resuscitation Acute Intestinal Microcirculation Dysfunction Partly Independent of its Effects on Systemic Circulation: A Pilot Study on Cardiac Arrest in a Rat Model. *Shock*, 2021. 56(4): p. 639-646.
90. Fries, M., et al., Levosimendan but not norepinephrine improves microvascular oxygenation during experimental septic shock. *Crit Care Med*, 2008. 36(6): p. 1886-91.
91. Morelli, A., et al., Levosimendan for resuscitating the microcirculation in patients with septic shock: a randomized controlled study. *Crit Care*, 2010. 14(6): p. R232.
92. Schmidt, W., et al., Milrinone improves intestinal villus blood flow during endotoxemia. *Can J Anaesth*, 2000. 47(7): p. 673-9.
93. de Miranda, M.L., et al., Milrinone attenuates arteriolar vasoconstriction and capillary perfusion deficits on endotoxemic hamsters. *PLoS One*, 2015. 10(2): p. e0117004.
94. Lin, I.C., et al., Milrinone effects on cardiac mitochondria, hemodynamics, and death in catecholamine-infused rats. *Pediatr Res*, 2022. 92(5): p. 1309-1315.
95. Herminghaus, A., et al., Severity of polymicrobial sepsis modulates mitochondrial function in rat liver. *Mitochondrion*, 2015. 24: p. 122-8.
96. Lowry, O.H., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. 193(1): p. 265-75.
97. Brandt, U., *Der Citratzyklus – Abbau von Acetyl-CoA zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O*, in Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. 2014, Springer.
98. Chance, B. and G.R. Williams, The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*, 1956. 17: p. 65-134.
99. Ayala, A., M.F. Munoz and S. Arguelles, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. p. 360438.
100. Lustig, M.K., et al., Colon ascendens stent peritonitis--a model of sepsis adopted to the rat: physiological, microcirculatory and laboratory changes. *Shock*, 2007. 28(1): p. 59-64.
101. Traeger, T., et al., Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp*, 2010(46).

102. Buras, J.A., B. Holzmann and M. Sitkovsky, Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. 4(10): p. 854-65.
103. Lewis, A.J., C.W. Seymour and M.R. Rosengart, Current Murine Models of Sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*, 2016. 17(4): p. 385-93.
104. Maier, S., et al., Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock*, 2004. 21(6): p. 505-11.
105. Ebong, S., et al., Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun*, 1999. 67(12): p. 6603-10.
106. Libert, C., et al., Part II: Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies (MQTiPSS) for Types of Infections and Organ Dysfunction Endpoints. *Shock*, 2019. 51(1): p. 23-32.
107. Herminghaus, A., et al., Indomethacin Increases the Efficacy of Oxygen Utilization of Colonic Mitochondria and Uncouples Hepatic Mitochondria in Tissue Homogenates From Healthy Rats. *Front Med (Lausanne)*, 2020. 7: p. 463.
108. Herminghaus, A., et al., Propofol improves colonic but impairs hepatic mitochondrial function in tissue homogenates from healthy rats. *Eur J Pharmacol*, 2019. 853: p. 364-370.
109. Herminghaus, A., et al., Nitroglycerin and Iloprost Improve Mitochondrial Function in Colon Homogenate Without Altering the Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers. *Front Med (Lausanne)*, 2018. 5: p. 291.
110. Herminghaus, A., et al., Pravastatin and Gemfibrozil Modulate Differently Hepatic and Colonic Mitochondrial Respiration in Tissue Homogenates from Healthy Rats. *Cells*, 2019. 8(9).
111. Brand, M.D. and D.G. Nicholls, Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*, 2011. 435(2): p. 297-312.
112. Pecinova, A., et al., Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion*, 2011. 11(5): p. 722-8.
113. Kopustinskiene, D.M., P. Pollesello and N.E. Saris, Potassium-specific effects of levosimendan on heart mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 2004. 68(5): p. 807-12.
114. Chattipakorn, S.C., et al., Phosphodiesterase-3 inhibitor (cilostazol) attenuates oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in the heart. *J Geriatr Cardiol*, 2014. 11(2): p. 151-7.
115. Abdollahi, M., et al., Effects of phosphodiesterase 3,4,5 inhibitors on hepatocyte cAMP levels, glycogenolysis, gluconeogenesis and susceptibility to a mitochondrial toxin. *Mol Cell Biochem*, 2003. 252(1-2): p. 205-11.

## 6 Anhang

### 6.1 Materialien und Geräte des tierexperimentellen Versuchsteils

<b>Beatmungsgerät</b>	VentElite Small Animal Ventilator, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA
<b>Blutgasanalysegerät</b>	ABL 715, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
<b>Buprenorphin s.c.</b>	Temgesic®, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland
<b>Darmnaht</b>	monofil, nicht resorbierbarer Faden 6-0 Ethikon Prolene®, Ethikon Inc., Somerville, USA
<b>Desinfektionsmittel</b>	Kodan® Tinktur forte, farblos, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
<b>Dobutamin</b>	Dobutamin Liquid Fresenius, Fresenius Kabi GmbH, Homburg, Deutschland
<b>Dreiwegehahn</b>	Discofix® C, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
<b>Haut- und Muskelnah</b>	polyfil, resorbierbarer Faden, 4-0 Ethicon Vicryl Plus®, Johnson-Johnson, Neuss, Deutschland
<b>Jonosteril</b>	Jonosteril®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
<b>Levosimendan</b>	Levosimendan Carinopharm, CARINOPHARM GmbH, Eime, Deutschland
<b>Lochtuch</b>	Foliodrape®, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
<b>Milrinon</b>	Milrinon Hikma, Hikma Pharma GmbH, Martinsried, Deutschland
<b>Pentobarbital</b>	Narcoren® Injektionslösung für Tiere, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland
<b>Perfusor</b>	Perfusor® fm, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
<b>Peripherer venöser Katheter</b>	Vasofix® Braunüle®, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
<b>Sevofluran</b>	Sevorane®, AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
<b>Skalpellklinge</b>	B. Braun Aesculap AG; Tuttlingen, Deutschland
<b>Spritzen</b>	Omnifix-F®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
<b>Temperatur-Monitoring</b>	Homeothermic Monitoring System, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA
<b>Vasopressin</b>	Empressin, AOP Orphan Pharmaceuticals, Österreich
<b>Waage</b>	MT1831, Microlife AG, Widnau, Schweiz

## 6.2 Materialien und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils

<b>Akku-betriebene Pipettierhilfe</b>	pipetus®, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
<b>Analysewaage</b>	LA230S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
<b>Anatomische Pinzette</b>	B. Braun SE, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
<b>Eismaschine</b>	AF80, Scotsman, Mailand, Italien
<b>Homogenisator Potter-Elvehjem</b>	Eurostar 20 digital, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
<b>Homogenisatorgefäß</b>	60 ml, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
<b>Homogenisierstation</b>	Dispergierstation T 8.10, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
<b>Kompressen</b>	ES-Kompressen, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
<b>Magnetrührer</b>	Variomag MONO DIRECT, H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland
<b>Microplate-Reader</b>	BioTek Synergy 2 mit Software Gen5™ Version 1.11, BioTek, Winooski, USA
<b>Mikroliterspritze</b>	Exmire Microsyringe MS*R25, Ito Corporation, Fuji, Japan
<b>Mikroreaktionsgefäß</b>	Reagiergefäß 1,5 ml EASY CAP, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
<b>Mikrotiterplatte</b>	Mikrotestplatte 96 Well F, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
<b>pH-Meter</b>	SevenCompact S220-Basic, METTLER TOLEDO, Ohio, USA
<b>Pipetten</b>	Mikropipette Eppendorf Research®, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
<b>Präzisionswaage</b>	BP1200, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
<b>Respirometer-Software</b>	782 System Version 4.4 HID, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland
<b>Respirometersystem</b>	Mitocell MT200 und SI782, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland
<b>Schere</b>	B. Braun SE, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland

<b>Schraubröhre 15 ml</b>	Falcon™ 15 ml, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
<b>Schraubröhre 50 ml</b>	Falcon™ 50 ml SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
<b>Serologische Pipette</b>	10 ml Stripette™, Corning Incorporated, New York, USA
<b>Statistik-Software</b>	GraphPad Prism Version 6.0, GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA
<b>Tiefkühlschrank</b>	Forma 900 Ultratiefkühlschrank, Thermo Fisher, Scientific, Waltham MA, USA
<b>Vakuum-Trockenschrank</b>	Vacuotherm VT 6060 M, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
<b>Vortexgerät</b>	Vortex Genie Touch Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
<b>Wasserbad</b>	ED-Wasserbad, JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland
<b>Zentrifuge</b>	Rotina 420R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

### 6.3 Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils

<b>Isolationspuffer (pH 7,15)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 200 mM Mannitol</li> <li>• 50 mM D(+)-Saccharose</li> <li>• 5 mM Kaliumdihydrogenphosphat</li> <li>• 5 mM 3-MOPS</li> <li>• 0,1-%ig BSA fatty acid free</li> <li>• 1 mM EGTA</li> </ul> <p>Mannitol in Aqua dest. geben und das Gemisch bei &gt; 90 °C für 30 Minuten erhitzen. Wenn die Mannitol-Lösung abgekühlt ist, die weiteren Substanzen hinzugeben und anschließend den pH-Wert mit Kaliumhydroxid auf 7,15 titrieren.</p> <p>Vor Gebrauch zusätzlich 20 mg BSA/ml hinzufügen.</p>
-----------------------------------	---

<b>Respirationspuffer (pH 7,4)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 130 mM KCl</li> <li>• 5 mM Kaliumdihydrogenphosphat</li> <li>• 20 mM 3-MOPS</li> <li>• 2,5 mM EGTA</li> <li>• 1 <math>\mu</math>M Natriumdiphosphat</li> <li>• 0,1-%ig BSA fatty acid free</li> </ul> <p>Alle Substanzen in Aqua dest. geben und anschließend den pH-Wert mit Kaliumhydroxid auf 7,4 titrieren.</p> <p>Vor Gebrauch zusätzlich 20 mg BSA/ml hinzufügen.</p>
------------------------------------	--

## 6.4 Chemikalien und Reagenzien des laborexperimentellen Versuchsteils

<b>1,1,3,3-Tetramethoxypropan, 99%</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>1-Butanol</b>	EMPLURA®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>2-Thiobarbitursäure</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>3-MOPS</b>	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Adenosindiphosphat</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Antimycin</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Bovine Serum Albumin</b>	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
<b>cCOMPLETE</b>	Roche Diagnostics GmbH, Heiligenhaus, Deutschland
<b>Cytochrom c</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>D(+)-Saccharose</b>	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Dimethylsulfoxid</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>EGTA</b>	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Flüssiger Stickstoff</b>	Linde, Duisburg, Deutschland

<b>Folin-Ciocalteu-Reagenz</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Glutamat</b>	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
<b>Kaliumchlorid</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumhydroxid</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Kalium-Natrium-Tartrat</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kupfersulfat</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Malat</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Mannitol</b>	Carl Roth & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumcarbonat</b>	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
<b>Natriumchlorid</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumhydroxid</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumsulfid</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Oligomycin</b>	Calbiochem by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Phosphorsäure 85 %</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Rotenon</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Sodiumsulfid</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Succinat</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
<b>Trypsin EDTA</b>	Gibco®, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

## Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Olaf Picker für die Möglichkeit danken, diese Promotion unter seiner Leitung durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Anna Herminghaus, die mich mit wertvollem Feedback und stetiger Unterstützung durch alle Phasen dieser Promotion begleitet hat. Ihre fachliche Expertise und ihr persönliches Engagement haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich dem gesamten Team des Instituts für Experimentelle Anästhesiologie für die Unterstützung im Labor und Hilfe bei organisatorischen Fragen sowie meinen Mitdoktoranden für die gute Zusammenarbeit.

Meiner „Rasselbande“ danke ich von Herzen für den Zusammenhalt während unserer gemeinsamen Promotionszeit. Den Weg parallel zu gehen und dabei füreinander da zu sein, hat uns noch enger zusammengeschweißt.

Mein tiefster Dank gilt meiner Mama, die mich nicht nur während der Promotion, sondern mein ganzes Leben lang bedingungslos unterstützt, mir stets den Rücken freigehalten und immer an mich geglaubt hat. Ohne sie wäre dieser Weg undenkbar gewesen.

In besonderer Dankbarkeit denke ich an meinen Papa, der meine Promotion leider nicht mehr miterleben konnte. Von ihm habe ich gelernt, was Disziplin, Ehrgeiz und Durchhaltevermögen bedeuten. In Gedanken ist er immer an meiner Seite, und ich weiß, er wäre stolz.

Zum Schluss danke ich von ganzem Herzen Thibaut, der mich durch Studium und Promotion begleitet hat. Er stand mir immer zur Seite – mit ermutigenden Worten, mit tröstenden Umarmungen und mit der Gewissheit, dass wir gemeinsam alles schaffen können.

Diese Arbeit wäre ohne euch alle nicht möglich gewesen – DANKE!