

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

**Auswirkungen von RIPC im späten Fenster der Protektion
auf die intestinale mitochondriale Funktion nach
hämorrhagischem Schock und unter physiologischen
Kreislaufbedingungen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Maresa Düber

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Olaf Picker

Zweitgutachter: Prof. Philipp Jörg Slotty

Für meine Familie

Zusammenfassung (deutsch)

Während eines hämorrhagischen Schocks ist die intestinale Barrierefunktion entscheidend für die Entstehung möglicher Komplikationen wie einer Sepsis oder eines Multiorganversagens. Hier ist vor allem die mitochondriale Funktion und die regionale Mikrozirkulation im Gastrointestinaltrakt von Bedeutung. Remote ischemic preconditioning (RIPC) ist ein gewebeprotectives Verfahren, welches aus nicht letalen, kurzen Episoden aus Ischämie und Reperfusion an weiter entfernt liegenden Versorgungsgebieten besteht. Die Fragestellung dieser Arbeit ist die Beurteilung des Effektes von RIPC nach 24 h auf die intestinale mitochondriale Funktion unter physiologischen Kreislaufbedingungen und nach einem hämorrhagischen Schock mit anschließender Reperfusion. Zur Durchführung dieser Studie wurden 39 Wistar Ratten in 4 Versuchsgruppen unterteilt (Normovolämie (NV), Hypovolämie (HV), RIPC + NV, RIPC + HV). Zunächst wurden die Hinterläufe der Tiere mittels einer Blutdruckmanschette komprimiert (RIPC). 24 h später wurden die Tiere teils für 1 h einer Hämorrhagie mit anschließender Retransfusion ausgesetzt (HV). Die mitochondriale Funktion wurde mittels des Sauerstoffverbrauches *in vitro* anhand von Gewebehomogenaten des Dünndarms und des Colons gemessen. Glutamat/Malat und Succinat wurden hier als Substrate verwendet, um die basale Geschwindigkeit der Atmungskette (State 2) zu messen, während durch die Zugabe von ADP die Geschwindigkeit des maximalen Sauerstoffverbrauches (State 3) gemessen wurde. Als Maß für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung wurde die ADP/O-Ratio (zugegebenes ADP/O₂ – Verbrauch) berechnet. Als Parameter für die Kopplung zwischen der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung diente der respiratory control index (RCI = State 3/ State 2). Die Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns Korrektur ($p \leq 0,05$). RCI und die ADP/O – Ratio blieben nach Stimulation über beide Komplexe des Colons und des Ileums unverändert, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch nach RIPC. Für beide Komplexe zeigte sich hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied sowohl im ADP/O - Ratio als auch im RCI nach Schockinduktion oder RIPC. Demzufolge konnte im späten Fenster der Protektion kein Einfluss von RIPC auf die mitochondriale Funktion in Dünndarm und Colon sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch nach hämorrhagischem Schock mit anschließender Reperfusion nachgewiesen werden.

Abstract (english)

During a hemorrhagic shock, the intestinal barrier function is crucial for the development of possible complications such as sepsis or multiple organ failure. Mitochondrial function and regional microcirculation in the gastrointestinal tract are of particular importance here.

Remote ischemic preconditioning (RIPC) is a tissue-protective procedure that consists of non-lethal, short episodes of ischemia and reperfusion in distant supply areas and has tissue-protective effects on organs. The purpose of this study is to evaluate the effect of RIPC after 24 h on intestinal mitochondrial function under physiological circulatory conditions and after hemorrhagic shock with subsequent reperfusion.

To conduct this study, 39 Wistar rats were divided into 4 experimental groups (normovolemia (NV), hypovolemia (HV), RIPC + NV, RIPC + HV). First, the hind legs of the animals were compressed using a blood pressure cuff (RIPC). 24 h later, some of the animals were exposed to hemorrhage for 1 h (HV) with following reperfusion. Mitochondrial function was measured by oxygen consumption *in vitro* using tissue homogenates of the small intestine and colon. Glutamate/malate and succinate were used as substrates to measure the basal rate of the respiratory chain (state 2), while the rate of maximal oxygen consumption (state 3) was measured by the addition of ADP. The ADP/O-ratio (added ADP/ O₂-consumption) was calculated as a measure of the efficiency of oxidative phosphorylation. The respiratory control index (RCI = state 3/state 2) served as a parameter for the coupling between the respiratory chain and oxidative phosphorylation. The evaluation was carried out using the Kruskal-Wallis test and Dunn's correction ($p \leq 0.05$). RCI and the ADP/O-ratio remained unchanged after stimulation across both complexes of the colon and ileum, both in comparison to the control group and after RIPC. For both complexes, there was also no significant difference in the ADP/O-ratio or in the RCI after shock induction or RIPC. Consequently, no influence of RIPC on mitochondrial function could be detected in the late window of protection, either under physiological conditions or after hemorrhagic shock followed by reperfusion.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADAMTS1	Disintegrin- und Metalloproteinase mit Thrombospondin-Motiven 1
ADP	Adenosindiphosphat
ADP/O-Ratio	Adenosindiphosphat -Sauerstoff-Ratio
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
Ca²⁺	Calium
Cited2	Protein-Kodierungsgen
Cl	Chlor
Cu	Kupfer
ΔO₂	Sauerstoffverbrauch
DAO	D-amino acid oxidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRP1	<i>dynamin-related protein 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
et al.	<i>et alii</i>
FAD/FADH₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
g	Gramm
GIT	Gastrointestinaltrakt
G/M	Glutamat/Malat
h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
HCl	Chlorwasserstoff
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1, alpha-Untereinheit

HO-1	Hämoxygenase 1
HV	Hypovolämie
I-FABP	<i>intestinal fatty acid-binding protein</i>
IMR	Intermembranraum
i.p.	Intraperitoneal
IPC	<i>Ischemic Preconditioning</i>
IRI	Ischämie-/Reperfusionsschaden
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
Lux	Beleuchtungsstärke
MAD	mittlerer arterieller Druck
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
M	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mol/Liter
mm	Millimeter
mM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht mmol/Liter
μM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht μmol/Liter
MMDS	Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrom
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MODS	Multiorganversagen
n	Anzahl
Na⁺/K⁺-Pumpe	Natrium-Kalium-Pumpe
NAD⁺/NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NF-κB	<i>nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>

nm	Nanometer
nM	Einheit der Stoffmengenkonzentration, entspricht nmol/Liter
nmol	Nanomol (10^{-9} mol)
NO	Stickstoffmonoxid
NV	Normovolämie
O₂	Sauerstoff
OH	Hydroxid-Ion
OPA1	Mitochondrial Dynamin like GTPase
p	Signifikanzwert
pH-Wert	Potenzial des Wasserstoffs, Maß für den sauren/basischen Charakter
Pi	Phosphat
RCI	<i>Respiratory Control Index</i>
RIPC	<i>Remote Ischemic Preconditioning</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
Sham	Schein, Kontrollgruppe
Suc	Succinat
TNF	Tumornekrosefaktor
usw.	und so weiter

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Der hämorrhagische Schock	1
1.2 Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks	2
1.2.1 Mitochondriale Dysfunktion	2
1.2.2 Schädigung der intestinalen Barrierefunktion	4
1.2.3 Ischämie-/Reperfusionsschaden	4
1.3 Therapieansätze	6
1.4 Ischämische Präkonditionierung und ischämische Fernpräkonditionierung	7
1.4.1 Frühe und späte Phase der ischämischen Präkonditionierung	9
1.4.2 Auswirkungen von IPC und RIPC auf den Gastrointestinaltrakt	10
1.5 Ziele der Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Tierexperimenteller Versuchsteil	13
2.1.1 Versuchstiere	13
2.1.2 Versuchsablauf	14
2.2 Laborexperimenteller Versuchsteil	16
2.2.1 Materialien und Geräte	16
2.2.2 Chemikalien	17
2.2.3 Herstellung des Gewebehomogenates aus Colon und Dünndarm	17
2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	17
2.2.5 Bestimmung der mitochondrialen Funktion mittels Respirometrie	18
2.3 Statistische Auswertung	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Effekt der Schockinduktion auf die oxidative Phosphorylierung in Colon und Ileum	24
3.2 Effekt der RIPC-Intervention auf die oxidative Phosphorylierung im normovolämen Versuchsaufbau im Colon	24
3.3 Effekt der RIPC-Intervention auf die oxidative Phosphorylierung im hypovolämen Versuchsaufbau im Colon	24
3.4 Effekt der RIPC-Intervention auf die oxidative Phosphorylierung im normovolämen Versuchsaufbau im Ileum	26

3.5 Effekt der RIPC-Intervention auf die oxidative Phosphorylierung im hypovolämen Versuchsaufbau im Ileum.....	27
4 Diskussion	30
4.1 Ergebnisdiskussion:	30
4.1.1 Effekt von RIPC nach hämorrhagischen Schock mit anschließender Reperfusion auf die intestinale oxidative Phosphorylierung im späten Fenster der Protektion.....	30
4.1.2 Auswirkungen des hämorrhagischen Schocks mit anschließender Reperfusion auf die intestinale oxidative Phosphorylierung im späten Fenster	32
4.1.3 Auswirkung von RIPC unter physiologischen Kreislaufbedingungen auf die intestinale oxidative Phosphorylierung im späten Fenster der Protektion	33
4.1.4 RIPC in klinischer Anwendung	34
4.2 Methodendiskussion	36
5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	39
6 Literatur- und Quellenverzeichnis	40
7 Anhang	46
7.1 Materialien und Geräte des laborexperimentellen Versuchsteils	46
7.2 Reagenzien und Chemikalien des laborexperimentellen Versuchsteils	49
7.3 Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils	51

1 Einleitung

1.1 Der hämorrhagische Schock

Grundlegend unterscheidet man vier verschiedene Schockformen. Diese sind der distributive, der kardiogene, der obstruktive und der hypovolämische Schock. Allen Schockformen gemeinsam ist das Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf, welches bei allen Arten zu einem Multiorganversagen (MODS) führen kann [1]. Der hämorrhagische Schock stellt die häufigste der verschiedenen Schockarten dar [2, 3]. Ursächlich sind beispielsweise Traumata, maternale, gastrointestinale, peri- und postoperative Blutungen sowie Aneurysmarupturen [4]. Primär Überlebende eines hämorrhagischen Schocks haben im weiteren Verlauf ein schlechtes Outcome und eine stark erhöhte Langzeit-Mortalität [4, 5] beispielsweise aufgrund der Entstehung eines Multiorganversagens. Aufgrund der hohen Inzidenz sowie seiner Letalität ist der hämorrhagische Schock sowohl für die Klinik als auch für die Forschung von besonderer Bedeutung und soll somit im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen.

Er ist definiert als eine Unterform des hypovolämischen Schocks, welcher gekennzeichnet ist durch einen meist sehr akuten Verlust von intravaskulärem Volumen [6]. Der hypovolämische Schock kann dabei als isolierte Abnahme des Blutplasmavolumens auftreten, bei welchem kein begleitender Verlust korpuskulärer Bestandteile besteht. Dies resultiert in einer Abnahme von Vorlast und Schlagvolumen und tritt etwa bei Verbrennungen, renalen Ursachen wie zum Beispiel osmotischer Diurese oder Durchfall und Erbrechen auf [6]. Der hämorrhagische Schock hingegen zeichnet sich durch eine akute Blutung, also dem Verlust korpuskulärer Anteile, aus. Die häufigsten Ursachen dieses sind, wie bereits oben erwähnt, beispielsweise eine akute gastrointestinale, posttraumatische oder perinatale Blutung [4, 7]. Die Abgrenzung zu einem hypovolämischen Schock ist aufgrund der therapeutischen Konsequenz sinnvoll. Während die aktuelle Therapie der Wahl des hypovolämischen Schocks zunächst eine kristalloide Flüssigkeitssubstitution darstellt, kann es beim hämorrhagischen Schock sinnvoll sein eine Bluttransfusion durchzuführen.

1.2 Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks

Um die Auswirkung des hämorrhagischen Schocks auf den Körper und insbesondere auf den, in dieser Arbeit im Fokus stehenden, Gastrointestinaltrakt zu verstehen, ist ein grundlegendes Verständnis der Pathophysiologie hilfreich. Aufgrund dessen wird diese im Folgenden erläutert.

Der hämorrhagische Schock führt zunächst durch einen großen Blutverlust zu einer Einschränkung der Mikrozirkulation mit folgender unzureichender Blutversorgung von Zellen und Gewebe, welche in einen Sauerstoffmangel resultiert. Kompensatorisch greifen zunächst Mechanismen, um die Blutversorgung in lebenswichtigen Organen wie Herz und Gehirn durch arterielle Vasokonstriktion und Steigerung der Herzrate zu gewährleisten. So werden Neurotransmitter wie zum Beispiel Katecholamine, antidiuretische Hormone und ANP (atrial natriuretic peptide) produziert [8]. Diese Kompensationsmechanismen sind allerdings limitiert, sodass es ohne eine frühe und effektive Therapie zu zellulärer Hypoxämie und Organdysfunktion kommen kann [8]. Die Priorisierung der Perfusion in lebenswichtigen Organen führt zunächst vor allem zu einer Minderperfusion der Nieren, der Leber, des Gastrointestinaltraktes und der Skelettmuskeln. Wenn die genannten Kompensationsmechanismen ausgeschöpft sind, kann eine starke Hämorrhagie anschließend ebenfalls zu einer Minderperfusion von Hirn und Myokard führen. [8].

In den folgenden Abschnitten wird zur besseren Übersicht auf die einzelnen, insbesondere für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, relevanten Aspekte der Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks eingegangen.

1.2.1 Mitochondriale Dysfunktion

Neben der Minderversorgung der Zellen und des Gewebes, welche beim hämorrhagischen Schock durch den Sauerstoffmangel vorliegt, können nach aktuellen Forschungsergebnissen auch die Mitochondrien in ihrer Funktionsfähigkeit beeinträchtigt sein [9, 10].

Alle Zelltypen außer Erythrozyten besitzen Mitochondrien. Die Mitochondrien verwenden bis zu 98% des gesamten Sauerstoffbedarfs des Organismus. Sie

werden allgemein als Kraftwerk der Zelle bezeichnet und dienen der Energieproduktion in Form von ATP. Die Energie wird vorrangig zum Aufrechterhalten der normalen zellulären Funktion genutzt. Neben ihrer Funktion anhand der Atmungskette ATP zu synthetisieren, weisen die Mitochondrien noch viele weitere lebenswichtige Funktionen und Fähigkeiten auf. So regulieren sie den programmierten Zelltod, produzieren *Reactive oxygene species* (ROS) und sind an den Reaktionen des Citratzyklus und der Beta-Oxidation beteiligt [11].

Ein durch eine Hypoperfusion ausgelöstes Sauerstoffdefizit in den Mitochondrien, wie es beim hämorrhagischen Schock ausgelöst wird, verursacht eine Inhibition der Elektronentransportkette. Somit ist die ATP-Produktion vermindert. Dies führt weiterhin zu einer Einschränkung der Na⁺/K⁺-Pumpe und der Membran-Depolarisierung, sodass es intrazellulär zu einer Akkumulation von Ca²⁺ kommt. Der daraus resultierende anaerobe Metabolismus führt zu einer Lactatazidose und kann in einen Zelluntergang resultieren [12].

Entgegen dieser Annahme deuten aktuelle Studien allerdings darauf hin, dass auch eine vermehrte Sauerstoffzufuhr während eines hämorrhagischen Schocks die Morbidität und Mortalität nicht verringert [13].

Dies führt zu der Hypothese, dass der zur Verfügung stehende Sauerstoff von den Zellen nicht verwertet werden kann. Die Mitochondrien rücken hier in den Fokus, da sie den größten Sauerstoffbedarf des Organismus aufweisen. Demzufolge liegt die Vermutung nahe, dass es durch einen hämorrhagischen Schock zu einer mitochondrialen Dysfunktion mit folgender Beeinträchtigung der Sauerstoffverwertung kommt [9, 10].

Demzufolge ist nicht nur das verminderte Sauerstoffangebot eine Ursache für Folgeschäden wie das Organversagen. Durch die entstehende mitochondriale Dysfunktion können die Zellen den angebotenen Sauerstoff zusätzlich zu dem verringertem Sauerstoffangebot nicht verwerten und zur Energiegewinnung nutzen. Dies führt zu einer vermehrten Apoptose der Zellen, welche im weiteren Verlauf in einen Verlust der Barrierefunktion und der Entstehung einer Sepsis oder eines Multiorganversagens resultiert [14]. Die Kombination aus eingeschränkter Mikrozirkulation und mitochondrialer Dysfunktion wird auch *als Microcirculatory and Mitochondrial Distress Syndrom* (MMDS) bezeichnet [15]. Durch diese Bezeichnung wird die Pathogenese eines möglichen Organversagens deutlicher und rückt die

besondere Bedeutung der ebenfalls zugrundeliegenden mitochondrialen Dysfunktion in den Mittelpunkt [16].

Während in einigen Organen bereits eine mitochondriale Dysfunktion folgend auf einen hämorrhagischen Schock nachgewiesen werden konnte [9, 17], liegt noch keine eindeutige Datenlage zu den Auswirkungen eines hämorrhagischen Schocks auf die intestinale mitochondriale Funktion vor. Grund hierfür sind widersprüchliche Ergebnisse und Unterschiede in den Studiendesigns [18, 19]. Um die Effekte des hämorrhagischen Schocks auf die intestinale oxidative Phosphorylierung konkreter zu erforschen, bedarf es also weiterer Daten.

1.2.2 Schädigung der intestinalen Barrierefunktion

Wie bereits oben erwähnt ist der Gastrointestinaltrakt ein wesentlicher Bestandteil der Pathogenese eines Multiorganversagens bei einem hämorrhagischen Schock. In den folgenden Abschnitten werden aufgrund dessen die intestinalen Auswirkungen des hämorrhagischen Schocks und deren Konsequenzen näher erläutert. Eine weit verbreitete Hypothese geht davon aus, dass es bei Erreichen der kritischen Ischämiezeit des Gastrointestinaltraktes zu einem Übertritt von Bakterien und Toxinen in den Blutkreislauf kommt. Die intestinale Barrierefunktion dient dem Verhindern des Übertretens von Bakterien und Toxinen, welche sich physiologisch im Magen-Darm-Trakt (GIT) befinden, in das Blut- und Lymphsystem. Bei Schädigung dieser Barrierefunktion zum Beispiel durch kompromittierte mukosale Perfusion und die Folgen des MMDS, würde es durch übertretende Bakterien und Toxine zu einer Bakteriämie und dem Entstehen einer Sepsis oder eines Multiorganversagens kommen.

1.2.3 Ischämie-/Reperfusionsschaden

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden stellt einen weiteren Erklärungsansatz zur Pathogenese des Multiorganversagens nach hämorrhagischem Schock dar. Er beschreibt die Entstehung eines Gewebeschadens nach einer Phase der Minderperfusion durch die sich anschließende Reperfusion.

Somit trägt nicht nur die Ischämie allein zum Gewebeschaden bei, sondern auch die Reperfusion kann ursächlich für den beschriebenen Zelluntergang sein. Da die aktuell häufigste Therapie des hämorrhagischen Schocks die Flüssigkeitssubstitution zur Aufrechterhaltung der Kreislaufhomöostase ist, rückt der Ischämie-/Reperfusionsschaden auch als Konsequenz der Therapie des hämorrhagischen Schocks in den Fokus.

Hieraus folgend bestehen die pathophysiologischen Vorgänge aus zwei Stufen. Zunächst kommt es durch die Ischämie wie anfangs beschrieben zu einer Verminderung der Mikrozirkulation, einer Sauerstoffunterversorgung, einer mitochondrialen Dysfunktion und durch einen Gewebeschaden zu einer möglichen Schädigung der intestinalen Barrierefunktion. Anschließend zeigt sich, initiiert durch die iatrogene oder physiologische Reperfusion, ein Anstieg von Neutrophilen, sowie eine Produktion von ROS und proinflammatorischer Zytokine [20].

Das folgende Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS in den Mitochondrien und den antioxidativen Mechanismen führt zu oxidativem Stress. ROS entstehen als Nebenprodukt der Atmungskette und beinhalten ein freies Elektron. Sie sind essenziell für bestimmte Zellsignalwege. Ihre Aktivität ist durch Antioxidantien streng reguliert. Durch eine ischämische Periode kann es dazu kommen, dass antioxidative Schutzmechanismen nicht mehr ausreichend greifen können. Die Elektronentransportkette der Mitochondrien ist die Hauptquelle der Entstehung von ROS, aber auch der Ort, welcher als erstes durch ROS geschädigt werden kann [21, 22]. Der so entstehende oxidative Stress führt dazu, dass Lipide, Proteine und Nukleinsäuren geschädigt werden und resultiert letztendlich wiederum in einer mitochondrialen Dysfunktion [21, 22]. So führt also nicht nur die Minderperfusion sondern auch die sich anschließende Reperfusion zu einer mitochondrialen Dysfunktion. Dabei ist noch unklar, ob der sich selbst verstärkende Mechanismus aus übermäßiger ROS-Produktion und daraus resultierenden mitochondrialem Schaden zu oxidativem Stress führt oder, ob oxidativer Stress selbst zu mitochondrialer Dysfunktion und darauffolgender vermehrter ROS-Produktion führt. Die mitochondriale Dysfunktion ihrerseits führt schließlich wie bereits oben erwähnt zu einer insuffizienten Sauerstoffverwertung.

Zusätzlich zu der Entstehung des oxidativen Stresses, der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und dem Anstieg der Neutrophilen sinkt durch eine

Reperfusion der Stickstoffmonoxid-Gehalt (NO-Gehalt), sodass es zu einer verstärkten Vasokonstriktion kommt. Die dadurch entstehende mikrozirkulatorische Insuffizienz führt zu verlängerter Ischämie, verstärkter Nekrose, wiederum vermehrter ROS-Produktion und gesteigerter Ausschüttung von inflammatorischen Faktoren [12, 20].

Die Theorie des Ischämie-/Reperfusionsschadens bestärkt, dass eine Sepsis und ein Multiorganversagen, welche durch eine Minderperfusion des Gastrointestinaltrakts hervorgerufen wurden, nicht zwangsläufig durch eine bakterielle Translokation entstanden sind, auch wenn diese zusätzlich dazu beitragen kann [23].

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Entstehung von Komplikationen nach einem hämorrhagischen Schock multifaktorielle Ursachen hat. Nicht nur eine Schädigung der intestinalen Barrierefunktion trägt wie lange angenommen dazu bei, sondern auch die mitochondriale Dysfunktion sowie der Ischämie-/Reperfusionsschaden sind wichtige Bestandteile der Pathogenese.

1.3 Therapieansätze

Aus den bisher beschriebenen Mechanismen lassen sich einige Therapieansätze ableiten, die zur Behandlung des hämorrhagischen Schocks eingesetzt werden können. Einige, die in der bestehenden Forschung viel Beachtung finden, sollen im Folgenden erläutert werden.

Um den Körper vor den lebensbedrohlichen Folgen zu schützen sind der Erhalt der intestinalen Mikrozirkulation und mitochondrialen Funktion von besonderer Bedeutung [24].

Gegenwärtige Bemühungen der gastrointestinalen Dysfunktion und somit der Entstehung eines Multiorganversagens präventiv entgegenzuwirken, fokussieren sich hauptsächlich auf eine frühe enterale Ernährung. Diese verbessert die intestinale Barrierefunktion und die Immunität sowie die Resorption und trägt zum Erhalt der gastrointestinalen Schleimhaut bei [25]. Ein Ansatz zur Verbesserung der intestinalen Mikrozirkulation ist eine Hyperkapnie. So ist davon auszugehen, dass

ein erhöhter Kohlendioxidgehalt im Blut eine weitere Therapiemöglichkeit darstellen könnte [26].

Auch den pharmakologischen Therapiemöglichkeiten wird immer mehr Aufmerksamkeit beigemessen. So zeigt eine Studie von Herminghaus et al., dass eine lokale Gabe von Nitroglycerin und Iloprost die Effektivität der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien des Colons verbessert. Ein negativer Einfluss auf die Barrierefunktion im Colon durch Nitroglycerin und Iloprost konnte in der Studie nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Studie zeigen allerdings nur die Effekte der Medikamente im in-vitro-Versuchsaufbau bei physiologischem Sauerstoffangebot. Dadurch bietet sie nur einen geringen Anhalt für eine eventuelle in-vivo-Wirkung bei hämorrhagischem Schock [27]. Auch eine lokale Gabe von Melatonin und Losartan zeigte eine Verbesserung der Mikrozirkulation der gastraln Schleimhaut während eines hämorrhagischen Schocks in einer Versuchsreihe, welche an Hunden durchgeführt wurde. Während Losartan auch unter physiologischen Bedingungen eine Verbesserung der Mikrozirkulation hervorrief, war dies bei lokaler Applikation von Melatonin nicht der Fall [28, 29].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es bereits einige Therapieansätze zur Behandlung des hämorrhagischen Schocks gibt, welche sich auf eine intestinale Wirkung fokussieren. Eine eindeutige Studienlage liegt allerdings nicht vor. Es bedarf somit sowohl im Bereich der Pathophysiologie als auch darauf aufbauend in Bezug auf daraus resultierenden therapeutischen Ansätzen noch weiterer Forschung, um langfristig das Outcome des hämorrhagischen Schocks für den Patienten zu verbessern.

Im Folgenden wird der vielversprechende Therapieansatz der ischämischen Fernpräkonditionierung zur Prävention von Zellschäden während einer Ischämie besprochen. Dieser Ansatz ist ein wichtiger Bestandteil der hier behandelten Fragestellung.

1.4 Ischämische Präkonditionierung und ischämische Fernpräkonditionierung

Im Abschnitt 1.3 wurden bereits einige Therapieansätze wie beispielsweise die frühe parenterale Ernährung erläutert. Neben diesen Methoden stellt die ischämische

Präkonditionierung (IPC) einen weiteren vielversprechenden Ansatz dar, der vor den entstehenden Zellschäden insbesondere der mitochondrialen Dysfunktion im Rahmen eines Ischämie-/Reperfusionsschadens während einer ischämischen Periode schützen kann. Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung wurde im Jahre 1986 zunächst von Murry et al. beschrieben. Die IPC besteht aus nicht letalen kurzen repetitiven Episoden aus Ischämie und Reperfusion. Durch eine Aktivierung von endogenen Schutzmechanismen des Körpers werden so Organe vor späteren Schäden durch Ischämie und der anschließenden Reperfusion geschützt. So beschreibt die Studie von Murry et al., dass IPC die Infarktgröße am Myokard zu 25% im Vergleich zur Kontrollgruppe senkte [30, 31]. 1993 bewies Przyklenk et al., dass Phasen aus Ischämie und Reperfusion am Versorgungsgebiet der Arteria circumflexa ebenfalls protektiv auf das Versorgungsgebiet des Ramus interventricularis anterior wirkt. Hier zeigte sich zum ersten Mal das Phänomen, dass eine Anwendung von IPC auch an weiter entfernten Versorgungsgebieten möglich ist. Diese Methode wird als ischämischen Fernpräkonditionierung (RIPC, remote ischemic preconditioning) bezeichnet [32].

Im Jahre 1997 verwendeten Birnbaum et al. die gleiche Technik und bestätigten mit ihrer Studie, dass eine ischämische Periode am Skelettmuskel des Hinterbeins eines Kaninchens die Myokardinfarktgröße reduziert. So wurde gezeigt, dass RIPC auch an weiter entfernt liegenden Organen einen Effekt hat. Mithilfe dieser Erkenntnis wurde die einfachere klinische Anwendbarkeit der RIPC zum Beispiel bei herzchirurgischen Operationen ermöglicht [33].

Anfangs wurden insbesondere die Effekte von IPC auf das Myokard untersucht. Später wurden auch gewebeprotective Effekte auf Leber [34], Lunge [35], Nieren [36], Hirn [37] und Darm [38] nachgewiesen. Anhand einiger experimenteller Studien konnte gezeigt werden, dass IPC nicht nur einen protektiven Effekt auf den zellulären Schaden nach einer längeren Ischämie hat, sondern, dass IPC und RIPC auch einen positiven Einfluss auf die Folgen nach einem hämorrhagischen Schock zum Beispiel an der Lunge [39], am Myokard, am Hirn [40] und an der Leber [41] haben.

Cheung et al. beschäftigten sich zum ersten Mal mit der klinischen Anwendbarkeit von RIPC am Menschen. Dafür untersuchten sie pädiatrische Patient/-innen mit kongenitalen Herzfehlern. RIPC wurde an den unteren Gliedmaßen vor der

jeweiligen Intervention durchgeführt. Es zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Reduktion der myokardialen Schädigung nach RIPC [42]. In späteren Jahren wurden immer mehr klinische Studien zur Wirkung von RIPC auf verschiedene Organe durchgeführt. Eine Studie von Zhou et al. beispielsweise zeigt ebenfalls einen positiven Effekt von RIPC im klinischen Setting. Hier wurde eine nephroprotektive Wirkung von RIPC bei Patienten nach offenem Aortenbogensersatz nachgewiesen [43]. Eine Metaanalyse von Moscarelli et al. befasst sich mit der Wirkung von RIPC im Zusammenhang mit isolierten Klappenverfahren am Herzen. Die Studie zeigt, dass RIPC keinen Vorteil für das postoperative Ergebnis brachte. Gleichzeitig wurden keine unerwünschten Ereignisse im Zusammenhang mit RIPC innerhalb dieser Metaanalyse gefunden [44]. Es wurden ebenfalls mehrere Studien im Hinblick auf eine Auswirkung von RIPC bei Hepatektomien durchgeführt. Eine Metaanalyse von Tian et al. vergleicht diese Studien und kommt zu dem Schluss, dass RIPC zwar eine kurzfristige hepatoprotektive Wirkung aufweist, die Daten der Studien allerdings nicht ausreichen, um einen routinemäßigen Einsatz von RIPC bei Hepatektomien zu unterstützen [45].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Datenlage zur klinischen Anwendbarkeit von RIPC noch deutliche Lücken aufzeigt. Die meisten klinischen Studien können einen Vorteil von RIPC nicht darlegen. Obwohl RIPC in experimentellen Modellen oft erfolgreich war, zeigt das Verfahren in der klinischen Praxis demnach oftmals keine Wirkung [46].

1.4.1 Frühe und späte Phase der ischämischen Präkonditionierung

Im Folgenden sollen die Auswirkungen der ischämischen Präkonditionierung betrachtet werden. Diese werden in zwei Phasen unterteilt: die frühe und die späte Phase. Der frühen Phase werden die protektiven Effekte zugeordnet, welche bereits wenige Minuten nach der initialen Ischämie auftreten und bis zu zwei bis drei Stunden anhalten. Effekte, welche hingegen erneut 12 bis 24 Stunden nach der initialen Ischämie auftreten und bis zu drei bis vier Tage anhalten, werden der späten verzögerten Phase zugeordnet [47]. Bisher haben sich erst wenige Studien mit den kardioprotektiven und intestinalen Wirkungen von RIPC in der späten Phase der Protektion beschäftigt [48, 49]. Hou et al. untersuchten 2017 die Unterschiede der nephroprotektiven Wirkung von RIPC auf die frühe und die späte Phase bei

Patient/-innen, welche eine laparoskopische Partialnephrektomie erhielten. Hier wurde eine Wirkung von RIPC auf beide Phasen festgestellt, wobei die protektive Wirkung in der späten Phase stärker ausgeprägt war [50]. Eine weitere Studie untersuchte, ob RIPC einen kardioprotektiven Effekt auf die Infarktgröße sowohl in der frühen als auch in der späten Phase der Protektion hat. Es war eine Verringerung der Infarktgröße durch RIPC in beiden Phasen zu erkennen. Im Gegensatz zu der Studie von Hou et al. zeigte sich hier allerdings eine stärkere Reduktion der Infarktgröße im frühen Fenster der Protektion [51]. Um die intestinale Wirkung von RIPC in beiden Phasen zu untersuchen, führten Yang et al. eine Studie an Ratten durch und stellten fest, dass sowohl IPC als auch RIPC in beiden Phasen einen protektiven Effekt auf die gastrointestinale Schleimhaut aufweisen. Durch eine Kombination der beiden Verfahren zeigte sich in der späten Phase der protektivste Effekt [48].

Um die Unterschiede der Effekte von RIPC in beiden Phasen zu konkretisieren sind weitere Untersuchungen notwendig. Insbesondere protektive Effekte der späten Phase, würden eine gute Möglichkeit zur klinischen Anwendung von RIPC bieten. Diese Arbeit befasst sich daher konkret mit den Auswirkungen von RIPC im späten Fenster der Protektion.

1.4.2 Auswirkungen von IPC und RIPC auf den Gastrointestinaltrakt

Aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung des Gastrointestinaltrakts bei der Entstehung eines Multiorganversagens (MODS) nach hämorrhagischem Schock liegt der Fokus dieser Arbeit auf den Auswirkungen von RIPC auf den Gastrointestinaltrakt. Im Folgenden werden bisherige experimentelle und klinische Studienergebnisse zu den intestinalen Einflüssen von IPC und RIPC beschrieben.

Untersuchungen zu den Auswirkungen der IPC auf den Darm zeigen, dass IPC die Mortalität, die Inflammation und den oxidativen Stress bei Ratten, welche intestinaler Ischämie und Reperfusion ausgesetzt wurden, mindert, die mikrovaskuläre Perfusion positiv beeinflusst und somit die Ischämie-/Reperfusionsschäden und die Mortalität senkt [52-55].

Dickson et al. bewiesen als erstes anhand eines Rattenmodells, dass auch RIPC die hypoxische Toleranz innerhalb des Interstitiums nach einem Ischämie-/Reperfusionsschaden steigert [56, 57].

Während einige Studien keine protektiven Effekte von RIPC auf einen intestinalen Ischämie-/Reperfusionsschaden nach einer einmaligen Ischämiephase zeigten [58, 59], stellten Saeki et al. dar, dass RIPC die intestinale Schädigung nach dreimaliger Durchführung einer 15-minütigen Ischämiephase senken konnte [60]. Dementsprechend haben möglicherweise wiederholte und längere Zyklen einer Ischämiephase einen stärkeren positiven Einfluss auf einen intestinalen Ischämie-/Reperfusionsschaden [56, 60].

Eine Verminderung des oxidativen Stresses während der Ischämie und der folgenden Reperfusion scheint ein protektiver Effekt von IPC und RIPC zu sein. Diese Protektion findet zum Beispiel über eine Erhöhung des antioxidativen Potentials im Endorgan statt [61, 62]. Es gibt ebenfalls Hinweise darauf, dass verschiedene Signalkaskaden wie beispielsweise die mitochondrialen ATP-sensitiven Kaliumkanäle [18] mit der protektiven Wirkung von IPC in Verbindung gebracht werden können. Ob und wie diese Signalkaskaden auch bei RIPC wirken, ist noch nicht eindeutig. So beschäftigen sich bisher nur wenige Studien mit den Auswirkungen von RIPC auf die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien [63]. Die genaue Wirkung von RIPC auf die zelluläre Ebene wie zum Beispiel die mitochondriale Dysfunktion in den Zellen der Darmschleimhaut ist also noch nicht genau beschrieben und bedarf weiteren Untersuchungen.

Gomes et al. untersuchten die Auswirkungen von RIPC und IPC unter physiologischen Bedingungen, bei heranwachsenden Mäusen mit Blick auf eine Gewebeschädigung von Herz, Lungen, Nieren und dem Gastrointestinaltrakt. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die oben genannten Organsysteme nach alleiniger IPC und RIPC keine histologischen Schäden aufwiesen [64]. Eine Studie von Kraemer et al. zeigt positive Effekte von RIPC auf die Sauerstoffsättigung des Hautgewebes und den Kapillardruck an einer entfernten kutanen Stelle. Auch diese wurde unter physiologischen Bedingungen ohne das Hervorrufen eines hämorrhagischen Schocks durchgeführt [65]. Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass die Durchführung von IPC und RIPC keinen negativen Einfluss auf die Funktion der Organsysteme hat. Die Studienlage und Durchführung der Studien

ist allerdings sehr inhomogen, dadurch ist die Datenlage zu den Auswirkungen von RIPC unter physiologischen Bedingungen nicht eindeutig [44]. Weitere Studien sollten durchgeführt werden, um den Effekt von RIPC unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

1.5 Ziele der Arbeit

Abschließend lässt sich festhalten, dass der hämorrhagische Schock mit anschließendem intestinalem Ischämie-/Reperfusionsschaden mit hohen Mortalitätsraten einhergeht und RIPC eine vielversprechende Intervention zum Schutz darstellen könnte. Dennoch konnten bisher nur wenig Erkenntnisse über die Wirkung von RIPC auf das intestinale Gewebe und dessen Mikrozirkulation erlangt werden. Zudem zeigt die aktuelle Studienlage teils widersprüchliche Ergebnisse. Auch die zugrunde liegenden Prozesse der Auswirkungen von IPC und RIPC insbesondere der möglichen Effekte auf die Mitochondrien sind wie oben beschrieben noch nicht ausreichend untersucht. Folglich bedarf es aufgrund der unklaren sich teils widersprechenden Datenlage bezüglich der protektiven Effekte von RIPC auf den Gastrointestinaltrakt und der zugrunde liegenden Signalkaskaden mit eventueller Beteiligung der Mitochondrien noch weiterer Forschung.

Basierend auf der beschriebenen Datenlage ergeben sich demnach folgende Fragestellungen für die vorliegende Studie:

1. Welche Wirkung hat ein hämorrhagischer Schock mit anschließender Reperfusion auf die intestinale mitochondriale Funktion im späten Fenster?
2. Welchen Effekt hat RIPC im späten Fenster der Protektion auf die intestinale mitochondriale Funktion unter physiologischen Kreislaufbedingungen?
3. Welche Auswirkung hat RIPC im späten Fenster der Protektion auf die intestinale mitochondriale Funktion nach einem hämorrhagischen Schock mit anschließender Reperfusion?

2 Material und Methoden

Nähere Angaben zu Materialien und Geräten befinden sich im Anhang (siehe Seite 46-48).

2.1 Tierexperimenteller Versuchsteil

Der tierexperimentelle Teil wurde von Frau Krüll durchgeführt, sodass kein Fachkundennachweis gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes vorzulegen war. Die NIH-Richtlinien für die Tiersorgfaltspflicht wurden bei allen Experimenten eingehalten. Eine Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz in Recklinghausen, Deutschland (Aktenzeichen: 81-02.04.2018.A308) liegt vor.

2.1.1 Versuchstiere

Durchgeführt wurden die Versuchsreihen an circa drei Monate alten, gesunden Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 350 +/- 35g aus der Zucht Janvier (Frankreich) aus der „Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftlichen Tierschutzaufgaben“ Düsseldorf. In den Experimenten werden ausschließlich männliche Ratten verwendet, sowohl um zyklus- und hormonell- bedingte Schleimhautveränderungen als auch hormonell- bedingte Diskrepanzen der Immunantwort auf den hämorrhagischen Schock auszuschließen. Es wurden ausschließlich Tiere für die Versuche verwendet, welche keine Krankheitsanzeichen aufwiesen. Die Adaptationszeit vor Beginn der Versuche betrug sieben Tage. Die Hygieneüberwachung wurde anhand der FELASA-Richtlinien durchgeführt.

Sowohl Modelle eines hämorrhagischen Schocks als auch Effekte der ischämischen Fernpräkonditionierung sind an Ratten in der Fachliteratur gut beschrieben, sodass ausreichende Vergleichsarbeiten vorliegen. Die auf einen hämorrhagischen Schock folgende Immunantwort ist bei Ratten ähnlich zu jener Immunantwort beim Menschen [66].

Die Haltung der Tiere erfolgte unter klimatisierten Bedingungen (Raumtemperatur 22 +/- 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 50 +/- 5%, Luftumwälzrate 16 - 20mal pro Stunde) in Makrolon®- Einzelkäfigen vom Typ 3. Die Käfige waren mit entkeimten

Weichholzgranulat (Familie Rettenmaier & Söhne GmbH und Co KG, Rosenberg) als Einstreu ausgestattet. Ein 12-Stunden Tag-Nacht-Wechsel wurde mithilfe von weißem Kunstlicht in einer Intensität von 300 - 320 Lux durchgeführt. Die Ernährung der Ratten erfolgte mit einem Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und entkeimten Trinkwasser mit einem pH-Wert von 2,6 - 3,0 (ozonisiert und mit HCl angesäuert). Beides wurde ad libitum angeboten.

2.1.2 Versuchsablauf

Die Aufteilung der Tiere erfolgte vor Versuchsbeginn randomisiert in 4 verschiedene Gruppen:

Gruppe	Tag 1	Tag 2
Gruppe 1 (n=10)	Sham	Normovoläme Kontrolle
Gruppe 2 (n=10)	RIPC	Normovoläme Kontrolle
Gruppe 3 (n=10)	Sham	Ischämie-Reperfusion
Gruppe 4 (n=10)	RIPC	Ischämie-Reperfusion

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Für die Untersuchung der späten Effekte von RIPC auf den Darm erfolgte der protektive Stimulus 24 Stunden vor dem hämorrhagischen Schock.

Tag 1:

Nachdem die Tiere gewogen wurden, wurden sie mit Pentobarbital (40mg/kg i.p., 0,25ml/kg) bei erhaltener Spontanatmung narkotisiert.

Anschließend wurde an den Tieren der Gruppen 2 und 4 RIPC durchgeführt. Dies bedeutet, dass in tiefer Narkose um beide Hinterläufe Blutdruckmanschetten gelegt und diese viermal für jeweils 5 Minuten auf 200mmHg aufgeblasen wurden. Darauf folgte jeweils eine 5-minütige Reperusionszeit. In den anderen Gruppen wurde eine

Sham-Intervention durchgeführt. Hier wurden die Blutdruckmanschetten für insgesamt 40 Minuten um die Hinterläufe gelegt, jedoch nicht aufgeblasen.

Nach diesen Interventionen wurden die Tiere zurück in ihre Käfige gelegt und das Abklingen der Narkose wurde überwacht.

Tag 2:

Am zweiten Tag des Versuches wurden die Tiere wieder zunächst gewogen und anschließend mit Pentobarbital (100mg/kg i.p., 0,625ml/kg) narkotisiert. Neben einer Temperaturmessung, einer kontrollierten Wärmezufuhr über eine Wärmematte und einer Sicherung der Atemwege durch eine Tracheostomie und maschineller Beatmung, wurden die Vena jugularis externa zur Aufrechterhaltung der Narkose (Pentobarbital 10mg/kg/h, Pancuronium 3mg/kg, Flüssigkeitssubstitution mittels Vollelektrolytlösung 4ml/kg/h) und die Arteria carotis zur kontinuierlichen Blutdruckmessung kanüliert. Der Zugang in der Arteria carotis externa diente zusätzlich dem regelmäßigen Abnehmen von Blutgasanalysen (BGAs), sodass die maschinelle Beatmung kontrolliert und gegebenenfalls angepasst werden konnte. Zudem konnte hierüber Blut entnommen werden, um einen hämorrhagischen Schock zu induzieren.

Im Anschluss wurde eine mediane Laparotomie von circa 2 Zentimeter durchgeführt und die O₂C -Messsonde zur spektrometrischen Messung der Gewebeoxygenierung sowie Messung der mikrozirkulatorischen Perfusion mittels Laserdoppler an einer ausgelagerten Darmschlinge (Colon und distales Ileum) angebracht.

Nachdem eine Blutgasanalyse mit einer Blutprobe aus der Arteria carotis externa durchgeführt wurde, erfolgte die Messung der Mikrozirkulation (O₂C, CytoCam) und eine erneute Blutgasanalyse nach einer 15-minütigen Stabilisierungsphase, auch Baseline genannt. Während des gesamten Versuchsablaufes wurden neben den bereits genannten Herzkreislaufparametern wie der Körpertemperatur über eine rektale Sonde und der regelmäßigen Blutdruckmessung über den Zugang in der Arteria carotis, die Schleimhautoxygenierung und -perfusion kontinuierlich ermittelt. In den Gruppen, in denen eine Ischämie und eine Reperfusion durchgeführt wurden, wurde Blut aus der Arteria carotis bis zum Erreichen eines mittleren arteriellen

Drucks von 35 - 40mmHg (Ziel-MAP) über 5 Minuten abgenommen. Dieser Ziel-MAP wurde weitere 60 Minuten durch intermittierende Blutentnahmen oder auch Injektion einer Vollelektrolytlösung aufrechterhalten. Daraufhin wurde durch eine Retransfusion des entnommenen Blutes nach insgesamt 120 Minuten die Reperfusionphase untersucht.

Die Tiere wurden anschließend noch unter Narkose fachgerecht und schmerzfrei durch Exsanguination getötet. Das so entnommene Blut wurde zur Analyse der intestinalen Funktion, zur Analyse der systemischen Entzündungsparameter und zur Erstellung eines Differenzialblutbildes verwendet.

Daraufhin wurde Gewebe aus dem Gastrointestinaltrakt gewonnen. Dieses wurde zur Messung der mitochondrialen Funktion verwendet.

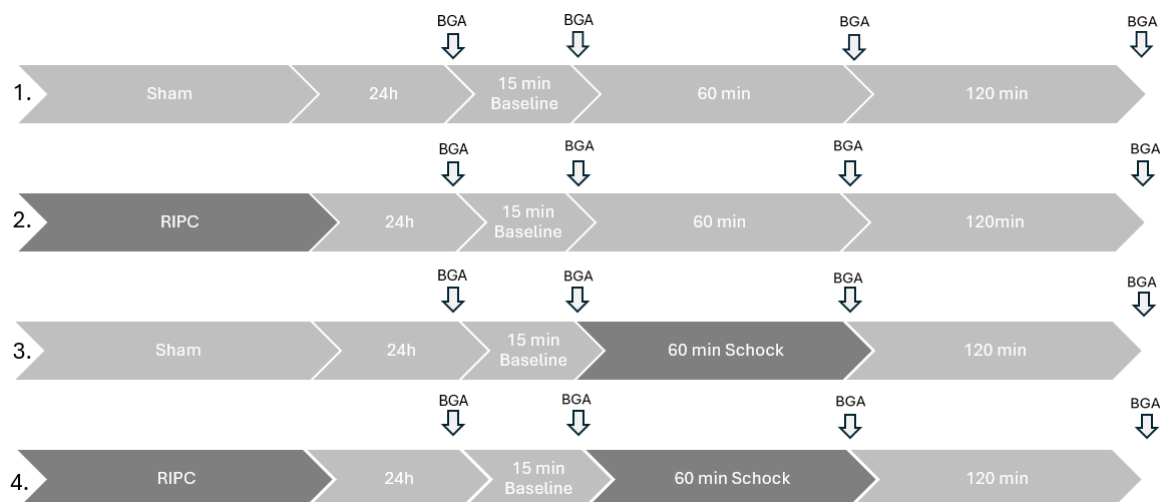


Abb. 1: schematischer Versuchsablauf des tierexperimentellen Teils der Gruppen 1-4; zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgt eine Blutgasanalyse (BGA)

2.2 Laborexperimenteller Versuchsteil

2.2.1 Materialien und Geräte

Im Anhang befinden sich genauere Angaben hinsichtlich verwendeter Materialien und Geräte (siehe Seite 46-48).

2.2.2 Chemikalien

Im Anhang befinden sich genauere Angaben hinsichtlich verwendeter Chemikalien, Reagenzien, Puffern und Lösungen (siehe Seite 49-51).

2.2.3 Herstellung des Gewebehomogenates aus Colon und Dünndarm

Die entnommenen Gewebeproben aus Colon und Dünndarm wurden direkt nach der Entnahme in einem Isolationspuffer (siehe Anhang) gelagert und während der gesamten Aufbereitung und den Messvorgängen gekühlt. Nachdem sie mit einer Präzisionswaage einzeln gewogen wurden, wurden die in der Längsachse aufgeschnittenen Gewebeproben durch vorsichtiges Tupfen von Kot, Fettgewebe und Schleim befreit. Die im Anschluss durchgeführte 5-minütige Inkubation mit Trypsin dient der Lockerung der Zellverbände. Danach wurden die Gewebeproben in einen Isolationspuffer, welcher zusätzlich 20mg/ml bovines Serumalbumin und Proteaseinhibitoren (cOmplete™) enthielt, gegeben. Eine manuelle Zerkleinerung der Proben auf 2- 3mm große Stücke mittels einer Schere folgte. Anschließend wurde das Gemisch in einen S-Behälter gefüllt und mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisierungsstab bei 2000rpm homogenisiert. Um große Gewebestücke herauszufiltern, wurde das Gemisch durch eine Kompressen in ein 50ml Falcon gegeben und somit gefiltert und anschließend auf Eis gestellt.

2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Lowry-Methode wurde zur Proteinbestimmung angewendet [67]. Grundlegend für die Lowry-Methode sind zwei Reaktionen. Der erste Schritt dieser Methode ist die Bildung eines blauvioletten, quadratisch-planaren Farbstoffkomplexes zwischen den in einer alkalischen Lösung vorhandenen Peptidbindungen und Kupfer (II)-Ionen. Dieser Schritt beruht auf der Biuretreaktion. Eine Reduktion von Cu(II) durch die Peptidbindung zu Cu(I) findet im zweiten Schritt statt. Das so entstandene Cu(I) reduziert das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Heteropolymolybdenblau. So entsteht eine Blaufärbung, deren Intensität anhand einer Photometrie mit einer Wellenlänge von 750nm quantifiziert wird. Mit Hilfe der Messung der Intensität einer Standardverdünnungsreihe mit definierten Proteinkonzentrationen lassen sich so die Proteinkonzentrationen der Gewebeproben bestimmen. Zur Herstellung der

Standardverdünnungsreihe wurden bovines Serumalbumin und *Aqua dest.* verwendet. Die Standardverdünnungsreihe wurde nach der Herstellung auf Eis gelegt.

Zur Herstellung der Proben aus Colon- und Dünndarmhomogenat wurden die Homogenate im Verhältnis 1:100 mit *Aqua dest.* verdünnt. Im Anschluss wurden jeweils 100µl des Proteinstandards und der verdünnten Homogenate in 500µl der Lösung 1 (15 ml Reagenz A: 10g Natriumkarbonat in 500ml 0,1M Natriumhydroxid-Lösung; 150µl Reagenz B: 2g Kaliumnatriumtetrat in 100ml *Aqua dest.*; 150µl Reagenz C: 1g Kupfersulfat-Pentahydrat in 100ml *Aqua dest.*) pipettiert und im Anschluss gevortext. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 50µl von Lösung 2 (2 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz, 2 ml *Aqua dest.*) in die Falcons pipettiert. Nach einem erneuten Vortexen des Gemisches folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Zur photometrischen Messung in Doppelbestimmung wurden jeweils 200µl der Standardreihe und der Proben in eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt. Die Extinktion wurde abschließend bei einer Wellenlänge von 750nm gemessen. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurden diese Daten an die Software Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader mit dem Programm Gen51.11 weitergeleitet.

Aus den drei technischen Replikaten konnte ein Mittelwert errechnet werden.

2.2.5 Bestimmung der mitochondrialen Funktion mittels Respirometrie

Zur Messung der Mitochondrien-Funktion in den Gewebeproben aus Dünndarm und Colon wurde der Sauerstoffverbrauch beziehungsweise die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches mittels Respirometrie untersucht. Die Messung erfolgte am Respirometriesystem der Firma *Strathkelvin Instruments* mit einer Clark-Elektrode. Diese misst die Sauerstoffkonzentration bei 30°C. Zunächst wurde eine Zwei-Punkt-Kalibrierung mithilfe von Wasser als Positivkontrolle und einer Natriumsulfatlösung als Negativkontrolle durchgeführt. Die Angabe der respiratorischen Werte erfolgte in nmol/min/mg Protein.

Die Elektrode erfasste die Sauerstoffkonzentrationswerte und leitete diese an das Computerprogramm *Strathkelvin 782 System* weiter. Die Atmungsgeschwindigkeit ergibt sich aus der Ableitung der Sauerstoffkonzentration nach Zeit pro mg Protein.

Eine Übersicht des gesamten Versuchsablaufes mit den applizierten Substraten zeigt Abbildung 2.

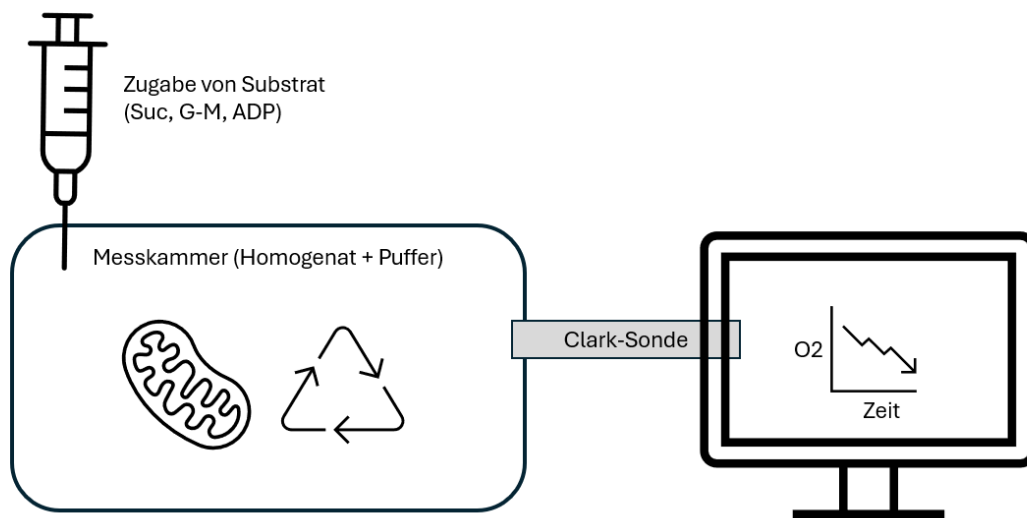


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Respirometrie

Suc – Succinat; G-M – Glutamat-Malat; ADP – Adenosindiphosphat; O₂ – Sauerstoff

Um eine Proteinkonzentration von 6mg/ml zu erreichen wurde zunächst das Gewebehomogenat in eine bestimmte Menge Respirationspuffer (siehe Anhang) gegeben. Diese Mischung wurde anschließend in die Messkammer pipettiert (siehe Abb. 2). Während der gesamten Messung sorgte ein elektromagnetischer Rührer für eine optimale Durchmischung der Probe. Die Messkammer wurde durch einen Stopfen verschlossen, in welchem sich eine dünne Kapillare befand. Diese wurde dazu verwendet während der Messung die einzelnen Substrate anhand einer Spritze in die Kammer zu injizieren. Die Sauerstoffkonzentrationen wurden durch die Clark-Elektrode gemessen und während des gesamten Messvorgangs aufgezeichnet (siehe Abb. 2).

Chance und Williams formulierten bereits 1956 verschiedene Respirationsstadien [68]. Diese werden wie folgt beschrieben:

State 1: ADP- und Substratlevel sind gering, dadurch geringe mitochondriale Atmung

State 2: Substratlevel ist hoch, ADP-Level allerdings niedrig, dadurch geringe mitochondriale Atmung

State 3: Zugabe von ADP, dadurch hohe mitochondriale Atmung

State 4: Umwandlung von ADP in ATP, sodass das ADP-Level und die mitochondriale Atmung sinken

State 5: Sauerstoffmangel, dadurch sinkt die mitochondriale Atmung

Um den Ablauf dieser Messung nachzuvollziehen ist die Kenntnis der Atmungskette von Relevanz (siehe Abb. 3). Daher werden im Folgenden die wichtigsten Aspekte erörtert. Über die Substrate Malat-Glutamat und Succinat wurden die Komplexe I und II der Atmungskette stimuliert. Komplex I der Atmungskette reduziert $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ . Die Glutamatdehydrogenase oxidiert Glutamat zu α -Ketoglutarat, wobei NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert wird. Die Malat-Dehydrogenase oxidiert wiederum Malat zu Oxalacetat, dabei entsteht ebenfalls durch Reduktion von NAD^+ $\text{NADH} + \text{H}^+$. Somit steht $\text{NADH} + \text{H}^+$ für die Reaktionen von Komplex I zur Verfügung. Dieser Reaktionsmechanismus wird auch Malat-Aspartat-Shuttle genannt und dient dem Transport von $\text{NADH} + \text{H}^+$ vom Zytosol über die innere Mitochondrienmembran in die mitochondriale Matrix.

Zur Stimulation von Komplex II wurde Succinat hinzugegeben. Komplex II wandelt Succinat zu Fumarat und überträgt dabei Wasserstoffionen auf FAD.

Im Anschluss wurde ADP hinzugegeben, welches als Substrat für die ATP-Synthase dient.

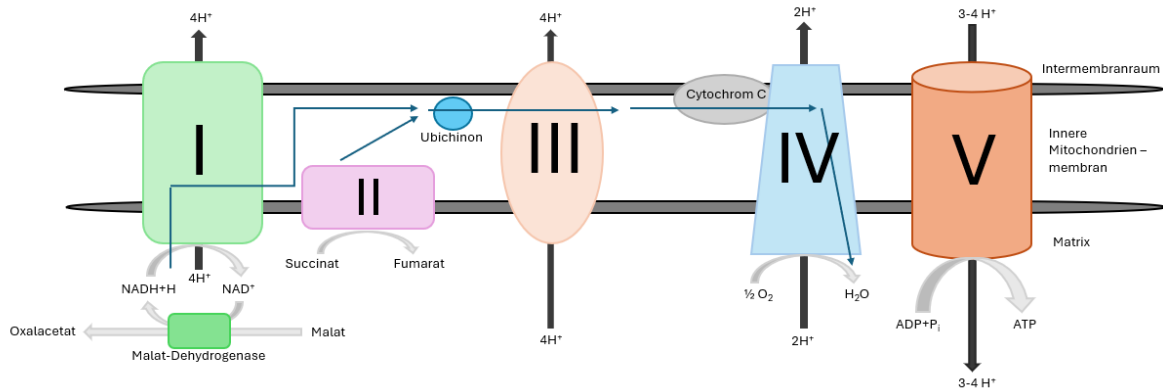


Abb. 3: schematische Darstellung der Atmungskette mit den Komplexen I-IV und der ATP-Synthase

I – Komplex I: NADH-Dehydrogenase-Komplex; II – Komplex II: Succinat-Dehydrogenase-Komplex; III – Komplex III: Cytochrom-c-Reduktase; IV – Komplex IV: Cytochrom-c-Oxidase; V: ATP-Synthase

Anhand eines Elektronenflusses über den Komplexen I - IV wird Energie für die Protonenpumpen geliefert. Diese transportieren H⁺-Ionen von der Matrix des Mitochondriums in den Intermembranraum. So werden Elektronen für die ATP-Synthase in den Mitochondrien bereitgestellt. Die Atmungskette kann jeweils über Komplex I oder II angesteuert werden.

Es wurden zwei verschiedene Messvorgänge durchgeführt, um die Komplexe I und II getrennt anzusteuern. Vor der Zugabe der Substrate startete die Messung mit der Aufzeichnung des Sauerstoffverbrauchs. Diese Phase des Sauerstoffverbrauches ohne Zugabe von Substraten wird als State 1 bezeichnet. Der erste Messvorgang diente der Ansteuerung von Komplex I durch die Zugabe von 2,5mM Glutamat und 2,5mM Malat nach einer Minute. Durch die Zugabe von 5mM Succinat wurde im zweiten Messvorgang Komplex II angesteuert. Hier wurden vor Beginn des Messvorgangs anfangs 0,5mM Rotenon zu dem Gemisch aus Gewebehomogenat und Respirationspuffer hinzugegeben. Rotenon ist ein Inhibitor des Komplex I der Atmungskette. Somit wird verhindert, dass Komplex I im zweiten Messvorgang ebenfalls angesteuert wird. Nach Zugabe der Substrate konnte die basale Geschwindigkeit der Atmungskette abgeleitet werden. Dies bezeichnet man als State 2 (siehe Abb. 4). Nach 2 Minuten wurde in beiden Messvorgängen 125µM ADP in die Messkammer injiziert. Dadurch wird die ATP-Synthase angesteuert und zur maximalen ATP-Synthese stimuliert. Der Sauerstoffverbrauch steigt. Diese Phase wird als State 3 bezeichnet. State 4 beschreibt den anschließenden Abschnitt, in welchem das zugegebene ADP zu ATP umgewandelt wurde, der

vorhandene Sauerstoff aber noch nicht vollständig verbraucht ist. Die beiden Messvorgänge wurden nach 6 Minuten beendet. Zu diesem Zeitpunkt ist der gesamte Sauerstoff verbraucht und State 5 ist erreicht.

Die Angabe der Respirationsraten erfolgte in nmol/min/mg Protein.

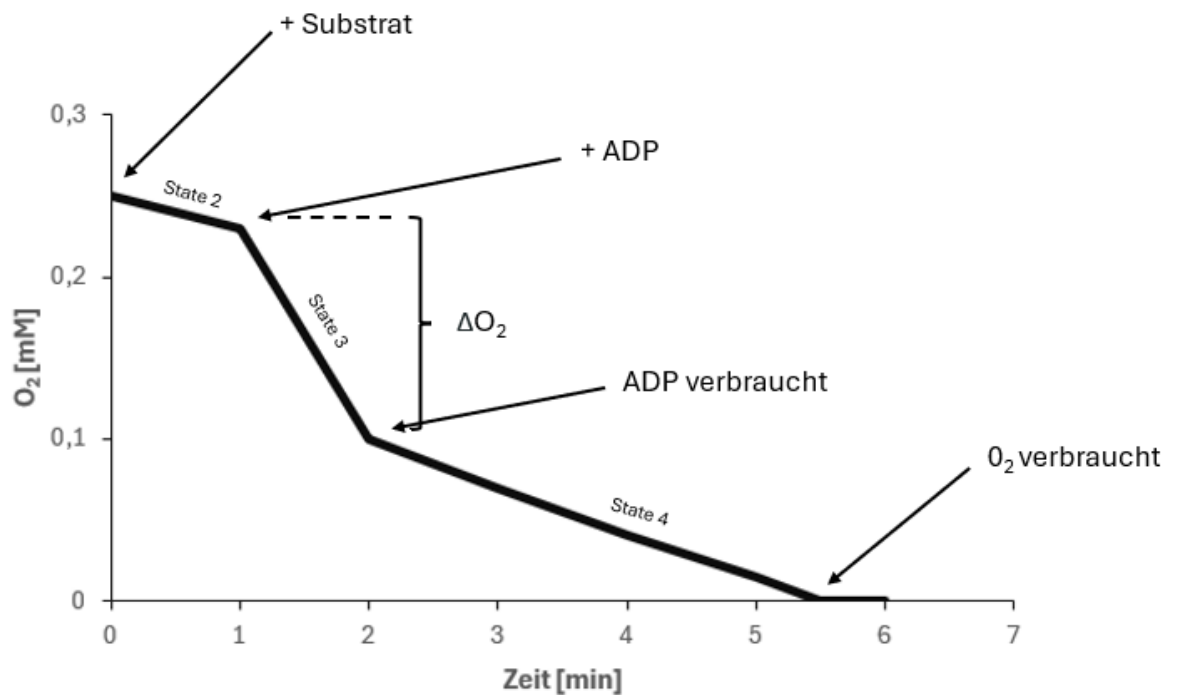


Abb.4: schematische Darstellung der Messkurve bezogen auf den Sauerstoffverbrauch

mM – Millimolar; O₂ – Sauerstoff; ΔO_2 – Sauerstoffverbrauch im State 3; ADP – Adenosindiphosphat; min – Minute

Der respiratorische Kontrollquotient (RCI, *respiratory control index*) beschreibt die Kopplung zwischen der Elektronentransportkette und der oxidativen Phosphorylierung. Den RCI berechnet man aus dem Verhältnis von State 3 zu State 2. Ist die Kopplung zwischen den beiden oben genannten Komponenten hoch, so steigt der errechnete RCI-Wert. Ein hoher RCI-Wert bedeutet dabei, dass eine hohe Substratoxidation mit einer hohen ATP-Produktion vorliegt. Bei einem Protonenleck liegen somit kleinere RCI-Werte vor, da durch das Protonenleck die ATP-Produktion bei dennoch hoher Substratoxidation sinkt. Die RCI-Werte können zwischen eins und unendlich liegen.

$$RCI = [\text{State 3}] / [\text{State 2}]$$

Die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung kann durch das ADP-Sauerstoff-Ratio beschrieben werden. Dieses wird aus dem Verhältnis von zugegebener ADP-Menge und dem Sauerstoffverbrauch in State 3 berechnet.

$$ADP/O = \text{zugegebenes ADP} / \Delta O_2$$

2.3 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden an das Computerprogramm *GraphPad Prism v6.01* (GraphPad Software, Inc., USA) weitergeleitet. Die ermittelten Daten wurden in eine Excel-Tabelle eingepflegt. Die Datenanalyse wurde anhand des Kruskal-Wallis-Test mit Dunns-Korrektur für multiple Vergleiche durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist $p < 0,05$. Mithilfe des Programms *GraphPad* wurden die zu sehenden box-plot-Diagramme erstellt.

3 Ergebnisse

Um den Effekt von RIPC auf die intestinale mitochondriale Funktion im späten Fenster der Protektion zu untersuchen, bedienen wir uns als wesentliche Messwerte dem RCI und der ADP/O. Im Folgenden werden die Daten als Median (Minimum-Maximum) dargestellt.

3.1 Effekt der Schockinduktion auf die oxidative Phosphorylierung in Colon und Ileum (Abb. 5+6, Tab. 2-5)

Vergleicht man die Auswirkungen der Schockinduktion (Sham-Interventionen) auf die oxidative Phosphorylierung im normovolämen Versuchsaufbau, so ist zu erkennen, dass der RCI und die ADP/O-Ratio keinen signifikanten Unterschied zwischen dem normovolämen und hypovolämen Versuchsaufbau aufweisen. Dies gilt sowohl nach Stimulation von Komplex I als auch von Komplex II (Abb. 5+6 und Tab. 2-5).

3.2 Effekt der RIPC-Intervention auf die oxidative Phosphorylierung im normovolämen Versuchsaufbau im Colon (Abb. 5, Tab. 2 und 3)

Nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I des Colons zeigt sich im normovolämen Versuchsaufbau kein signifikanter Unterschied zwischen der Sham-Gruppe und der RIPC-Gruppe sowohl für RCI als auch für das ADP/O-Ratio. Die Effekte der Sham- und RIPC-Intervention auf die Stimulation der Atmungskette über Komplex II im normovolämen Versuchsaufbau werden in den Abbildungen 5 B) und D) dargestellt. In diesen ist zu erkennen, dass eine Durchführung von RIPC im Vergleich zur Sham-Intervention ebenfalls keinerlei Einfluss auf die Werte von RCI und ADP/O-Ratio nach Ansteuerung der oxidativen Phosphorylierung über Komplex II hat.

3.3 Effekt der RIPC-Intervention auf die oxidative Phosphorylierung im hypovolämen Versuchsaufbau im Colon (Abb. 5, Tab. 2 und 3)

Auch beim hypovolämen Versuchsaufbau kann kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezogen auf die Auswirkungen auf die oxidative Phosphorylierung bei Ansteuerung der Atmungskette über Komplex I auf den RCI und auf das ADP/O-Ratio gefunden werden. Auch bei Ansteuerung der Atmungskette über Komplex II im hypovolämen Versuchsaufbau können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

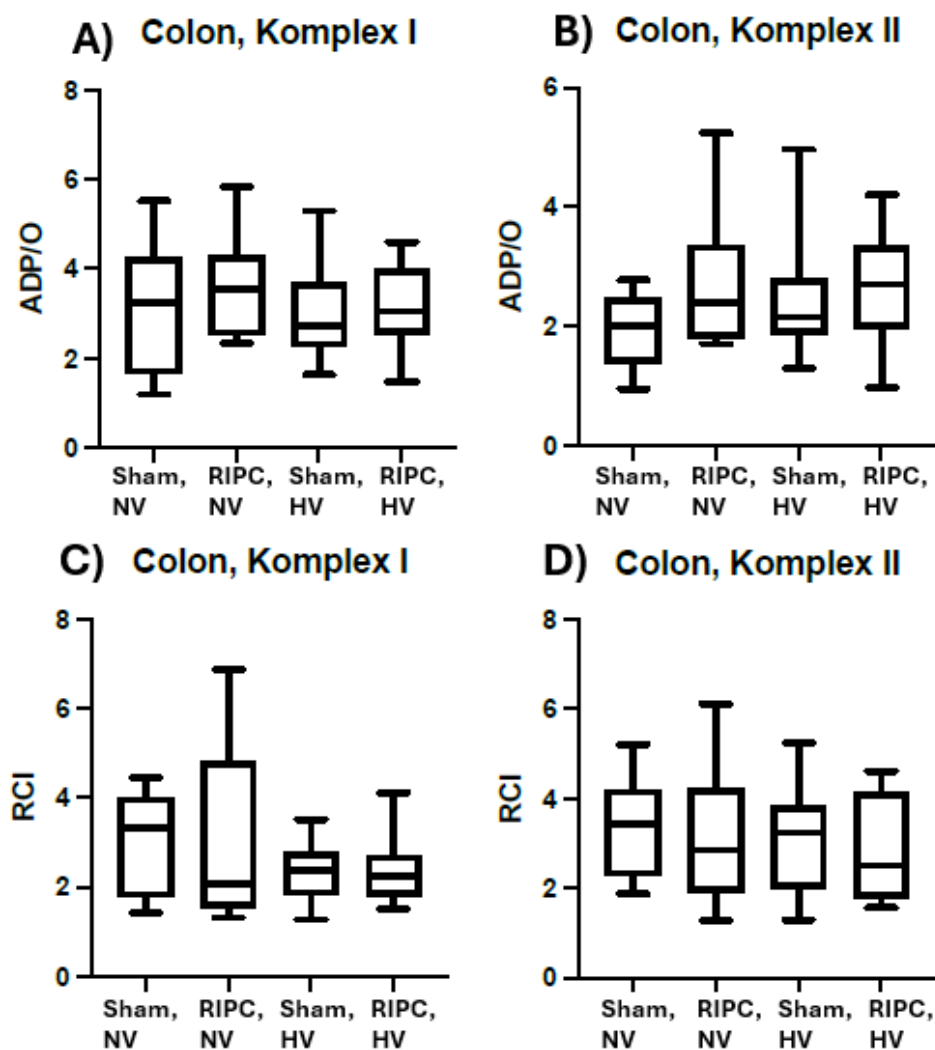


Abb. 5: Ergebnisse der respiratorischen Messungen bei Ansteuerung der Atmungskette über Komplex I + II im Colon; NV = Normovolämie; HV = Hypovolämie

Darstellung der ADP/O-Ratio und des RCI als Median mit Minimum und Maximum nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I mittels Glutamat/Malat und über Komplex II mittels Succinat/Rotenon für die verschiedenen Vergleichsgruppen (Kontrolle (n = 9), Schock (n= 10), RIPC (n= 10), Schock + RIPC (n= 10)) im Colon.

	Sham, NV	RIPC, NV	Sham, HV	RIPC, HV
Komplex I	3,230 (1,19-5,52)	3,530 (2,30-5,85)	2,720 (1,63-5,30)	3,045 (1,47-4,60)
Komplex II	2,000 (0,95-2,77)	2,400 (1,70-5,23)	2,150 (1,30-4,97)	2,705 (0,97-4,20)

Tabelle 2: Darstellung der ADP/O-Ratio als Median (Minimum-Maximum) im Colon; NV = Normovolämie; HV = Hypovolämie

	Sham, NV	RIPC, NV	Sham, HV	RIPC, HV
Komplex I	3,330 (1,42-4,45)	2,085 (1,31-6,86)	2,380 (1,27-3,50)	2,230 (1,51-4,11)
Komplex II	3,430 (1,86-5,22)	2,850 (1,26-6,12)	3,235 (1,29-5,25)	2,505 (1,56-4,61)

Tabelle 3: Darstellung des RCI als Median (Minimum-Maximum) im Colon; NV = Normovolämie; HV = Hypovolämie

3.4 Effekt der RIPC-Intervention auf die oxidative Phosphorylierung im normovolämen Versuchsaufbau im Ileum (Abb. 6, Tab. 4 und 5)

Die Abbildung 6 zeigt die Effekte auf die Ansteuerung der oxidativen Phosphorylierung über Komplex I und II des Ileums im normovolämen und hypovolämen Versuchsaufbau. Auch hier bringt die Auswertung für RCI in der normovolämen Gruppe für die Stimulation der Atmungskette über Komplex I und in der normovolämen Gruppe über die Ansteuerung der Atmungskette über Komplex II ähnliche Ergebnisse hervor, sodass kein signifikanter Unterschied besteht. Für das ADP/O-Ratio ergeben sich in dieser Gruppe ebenfalls vergleichbare Ergebnisse innerhalb der normovolämen über Komplex I angesteuerten Versuchsgruppe sowie der normovolämen über Komplex II angesteuerten Versuchsgruppe.

3.5 Effekt der RIPC-Intervention auf die oxidative Phosphorylierung im hypovolämen Versuchsaufbau im Ileum (Abb. 6, Tab. 4 und 5)

Bezogen auf die Effekte der RIPC- und Sham- Intervention auf die oxidative Phosphorylierung im hypovolämen Versuchsaufbau im Ileum sind ähnliche Ergebnisse wie in den vorherigen Gruppen zu erkennen. So zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sham- und RIPC-Gruppen unter hypovolämen Bedingungen sowohl nach Stimulation von Komplex I als auch nach Stimulation von Komplex II.

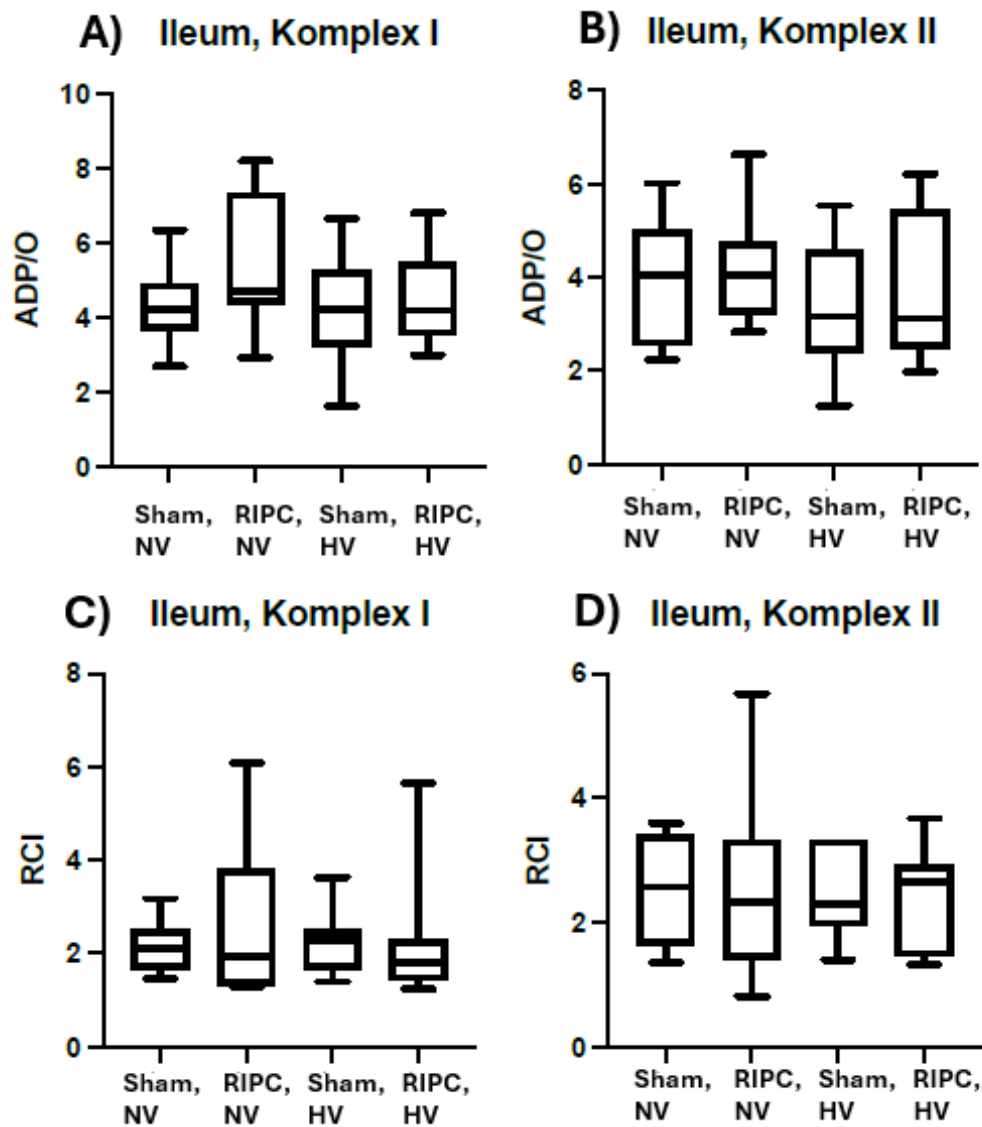


Abb. 6: Ergebnisse der respiratorischen Messungen bei Ansteuerung der Atmungskette über Komplex I + II im Ileum; NV = Normovolämie; HV = Hypovolämie

Darstellung der ADP/O-Ratio und des RCI als Median mit Minimum und Maximum nach Stimulation der Atmungskette über Komplex I mittels Glutamat/Malat und über Komplex II mittels Succinat/Rotenon für die verschiedenen Vergleichsgruppen (Kontrolle (n = 9), Schock (n = 10), RIPC (n = 10), Schock + RIPC (n = 10)) im Ileum.

	Sham, NV	RIPC, NV	Sham, HV	RIPC, HV
Komplex I	4,230 (2,68-6,33)	4,680 (2,92-8,19)	4,205 (1,60-6,63)	4,185 (2,99-6,79)
Komplex II	4,040 (2,22-6,01)	4,045 (2,82-6,62)	3,165 (1,24-5,53)	3,115 (1,97-6,21)

Tabelle 4: Darstellung der ADP/O-Ratio als Median (Minimum-Maximum) im Ileum; NV = Normovolämie; HV = Hypovolämie

	Sham, NV	RIPC, NV	Sham, HV	RIPC, HV
Komplex I	2,110 (1,46-3,17)	1,930 (1,28-6,09)	2,290 (1,39-3,62)	1,810 (1,23-5,65)
Komplex II	2,570 (1,36-3,60)	2,335 (0,81-5,67)	2,305 (1,40-3,33)	2,645 (1,33-3,67)

Tabelle 5: Darstellung des RCI als Median (Minimum-Maximum) im Ileum; NV = Normovolämie; HV = Hypovolämie

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die Schockinduktion als auch die Durchführung von RIPC keinen Einfluss auf die oxidative Phosphorylierung hatten. RCI und die ADP/O-Ratio bleiben nach Stimulation über beide Komplexe des Colons und des Dünndarms sowohl nach Schockinduktion als auch nach RIPC unverändert. Zusätzlich ist festzuhalten, dass kein signifikanter Unterschied der ADP/O-Ratio und des RCI als Messwerte für die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung und der Kopplung zwischen Elektronentransportkette und der oxidativen Phosphorylierung im normovolämen Versuchsaufbau im Vergleich zum hypovolämen Versuchsaufbau gezeigt werden konnte.

4 Diskussion

Abschließend lassen sich im Hinblick auf die zu Anfang beschriebenen Fragestellungen folgende Ergebnisse aus der vorliegenden Studie ableiten:

1. Die intestinale mitochondriale Funktion wird durch einen hämorrhagischen Schock mit anschließender Reperfusion im späten Fenster nicht beeinflusst.
2. Unter physiologischen Kreislaufbedingungen hat RIPC im späten Fenster der Protektion keine Auswirkungen auf die intestinale mitochondriale Funktion.
3. Auch nach einem hämorrhagischen Schock mit anschließender Reperfusion konnte die mitochondriale Funktion im Ileum und Colon durch RIPC im späten Fenster der Protektion nicht moduliert werden.

4.1 Ergebnisdiskussion:

4.1.1 Effekt von RIPC nach hämorrhagischen Schock mit anschließender Reperfusion auf die intestinale oxidative Phosphorylierung im späten Fenster der Protektion

Der zentrale Fokus unserer Studie lag auf den Auswirkungen von RIPC nach hämorrhagischem Schock mit anschließender Reperfusion auf die intestinale mitochondriale Funktion im späten Fenster der Protektion. Hier zeigte sich kein Effekt. Auch im frühen Fenster der Protektion zeigte sich in unserer früheren Studie keine Veränderung der mitochondrialen Funktion in Ileum und Colon durch RIPC im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks [19]. Eine positive Auswirkung auf die Morphologie der Darmschleimhaut zeigte sich in der Studie von Hummitzsch et al. und einigen anderen Studien dennoch [56, 69].

Die genauen Mechanismen, welche diesem Schutz von RIPC zugrunde liegen, sind noch nicht ausreichend untersucht worden.

Hummitzsch et al. erwähnen in ihrer Studie beispielsweise andere potenzielle Mediatoren von RIPC im Gastrointestinaltrakt wie etwa HIF-1 α , ADAMTS1, Cited2 und Cytochrom C [56]. Diese sind vorgebildete Moleküle und können somit schnell aktiviert werden. Die Wechselwirkung dieser Mediatoren muss allerdings noch genauer erschlossen werden [70]. Diese Mediatoren wurden allerdings in der hier vorliegenden Studie nicht untersucht.

Hummitzsch et al. unterstützen mit ihren Erkenntnissen folglich die Theorie von Saeki et al., dass das frühe Fenster der Protektion geprägt ist durch eine schnelle Aktivierung intrazellulärer Signalwege unter Beteiligung bereits vorgebildeter Moleküle wie beispielsweise HO-1, NF- κ B und NO. Im Gegensatz dazu steht die Annahme, dass das späte Fenster der Protektion durch langsamere Transkriptionsvorgänge und die De-Novo-Synthese von Schutzproteinen gekennzeichnet ist [60]. In den letzten Jahren wurden bereits viele Mechanismen und Proteine identifiziert, welche so zur RIPC-vermittelten-Kardioprotektion beitragen. In Studien zur Kardioprotektion wird beschrieben, dass die schützende Wirkung von RIPC im Herzen mit einer erhöhten Phosphorylierung von Pro-Survival-Kinasen (z.B. Erk1/2 und Akt) verbunden ist [71, 72]. Hummitzsch et al. konnten allerdings keine erhöhte Phosphorylierung dieser Moleküle im Gastrointestinaltrakt nachweisen [56]. Neben diesen beschriebenen kardioprotektiven Mechanismen rücken die Mitochondrien in der RIPC-vermittelten-Protektion in den Kardiomyozyten immer mehr in den Mittelpunkt und viele Autoren schreiben den Mitochondrien eine zentrale Rolle zu [73, 74]. Die Mitochondrien sind von großer Bedeutung, da die meisten Signalwege, welche durch RIPC beeinflusst werden, einen mitochondrialen Kanal hemmen. Dieser kann über eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und eine Schwellung der Mitochondrien den Zelltod induzieren [72]. Auch in einer Studie an Rattenherzen von Cellier et al. führte RIPC nach einer Ischämie und Reperfusion zu einer geringeren Infarktgröße, einem Anstieg des mitochondrialen Fusionsproteins OPA1 und einer Abnahme des mitochondrialen Spaltprotein DRP1 und somit zu einer erhaltenen Morphologie der Mitochondrien [74].

Aus diesem Abschnitt ist bereits ersichtlich, dass viele Studien bisher nur die Auswirkungen von RIPC auf das Herz untersuchten. Die Studie von Hummitzsch et al. sowie unsere Studie nahmen hingegen die Auswirkungen auf den Gastrointestinaltrakt in den Blick. Beide Studien deuten darauf hin, dass sich die RIPC-vermittelnden Schutzmechanismen im Darm von denen für das Herz beschriebenen Mechanismen unterscheiden.

Interessant wäre hier, ob eine ischämische Präkonditionierung einen Effekt auf die mitochondriale Funktion in der intestinalen Schleimhaut zeigt. Zu dieser Fragestellung konnte keine hinreichende Datenlage gefunden werden. Lediglich

eine Untersuchung von Wu et al. weist darauf hin, dass eine ischämische Präkonditionierung (IPC) an der oberen Mesenterialarterie die mitochondriale Atmung im Dünndarm reduziert. Die mitochondriale Funktion wurde in dieser Studie mittels einer Dehydrogenase-abhängigen Umwandlung als Maß für die Glykolyserate gemessen [75]. Aufgrund der mangelnden Datenlage ist eine Auswirkung von IPC auf die intestinale mitochondriale Funktion weiterhin unklar.

4.1.2 Auswirkungen des hämorrhagischen Schocks mit anschließender Reperfusion auf die intestinale oxidative Phosphorylierung im späten Fenster

Die zu Beginn formulierte These, dass die intestinale mitochondriale Funktion durch eine Minderperfusion mit anschließender Reperfusion, beeinträchtigt wird, konnten wir in unserem Versuchsaufbau interessanterweise nicht bestätigen. Xiong et al. zeigten hingegen anhand einer an Ratten durchgeführten Studie eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Aktivität in den Enterozyten nach einem hämorrhagischen Schock mit anschließender Reperfusion. Hier ist allerdings festzuhalten, dass die Aufrechterhaltung des Schockzustandes in dem Versuchsaufbau von Xiong et al. im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau 120 Minuten andauerte. Dies kann eine mögliche Ursache für die vorliegenden Diskrepanzen sein [18].

Der Frage, ob es schon in einem früheren Zeitfenster nach der Induktion eines hämorrhagischen Schocks zu Veränderungen in der mitochondrialen Funktion kommt, ging eine andere Studie unserer Arbeitsgruppe nach. Hier wurde wie auch in der vorliegenden Studie keine intestinale mitochondriale Dysfunktion nach einem einstündigen hämorrhagischen Schock nachgewiesen. So blieben der Elektronentransfer innerhalb der Atmungskette, die maximale Atmungsrate, die mitochondriale Kopplung und die Atmungseffizienz nach einer Stunde des hämorrhagischen Schocks erhalten und unterschieden sich nicht zwischen normovolämischen Kontrollen und der hämorrhagischen Interventionsgruppe. Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass die mikrozirkulatorische Sauerstoffversorgung während des hämorrhagischen Schocks reduziert ist. Es ist allerdings wichtig zu erwähnen, dass die hier besprochene Studie unserer Arbeitsgruppe nur die frühen Effekte nach hämorrhagischem Schock ohne eine anschließende Reperfusion beschreibt [19].

Einige andere Studien stellten hingegen fest, dass ein Ischämie-/Reperfusionsschaden weiterhin zu einer beeinträchtigten Heilung einer Kolonanastomose und histopathologischen Schäden führt [76, 77]. Diese Studien und unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass am ehesten mikrovaskuläre Störungen und nicht eine mitochondriale Dysfunktion ursächlich für funktionelle Gewebeschäden des Gastrointestinaltraktes während des hämorrhagischen Schocks mit anschließender Reperfusion sind. Die Datenlage zu Auswirkungen des hämorrhagischen Schocks mit anschließender Reperfusion auf die intestinale mitochondriale Funktion bleibt weiterhin inhomogen.

4.1.3 Auswirkung von RIPC unter physiologischen Kreislaufbedingungen auf die intestinale oxidative Phosphorylierung im späten Fenster der Protektion

In dieser Arbeit wurden auch die alleinigen Auswirkungen von RIPC unter physiologischen Kreislaufbedingungen auf die intestinale Funktion der Mitochondrien im späten Fenster untersucht. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass RIPC unter diesen Bedingungen die mitochondriale Funktion in Ileum und Colon nach 24 Stunden nicht beeinflusst. So konnten wir weder eine Verbesserung der intestinalen mitochondrialen Funktion noch eine Verschlechterung nachweisen. Wie bereits anfangs beschrieben zeigten einige wenige klinische Studien bereits, dass die Durchführung von RIPC und IPC keine Auswirkungen auf die Gewebemorphologie und die Funktion von Organen wie Herz, Lunge, Nieren und Gastrointestinaltrakt hat [44, 65, 78]. Die bereits oben genannte Studie unserer Arbeitsgruppe beschreibt die Auswirkungen von RIPC im frühen Fenster der Protektion. Auch hier konnte keine Auswirkung von RIPC, weder auf die mitochondriale Funktion noch auf die intestinale Mikrozirkulation und die Gewebsintegrität unter physiologischen Kreislaufbedingungen, gezeigt werden [19].

Hummitzsch et al. untersuchten ebenfalls die Effekte von RIPC auf die intestinale Schleimhaut im frühen Fenster. Hier zeigten sich folgende Erkenntnisse:

Histomorphologisch zeigten sich hier nach der Durchführung von RIPC allein keine Veränderungen an der Darmepithelschicht und eine weiterhin normale Zottenstruktur. Im Kontrast dazu waren nach dem Ischämie-/Reperfusionsschaden aufgeplatzte und denudierte Zotten mit Epithelschuppung zu erkennen, welche bei

mit RIPC vorbehandelten Tieren weniger ausgeprägt darzustellen war [56]. Eine Metaanalyse von Boengler et al. beschäftigte sich schließlich mit den Auswirkungen von RIPC auf die mitochondriale Funktion in Kardiomyozyten. Sie stellten fest, dass es nur wenige Studien gibt, welche den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch in Tiermodellen sowohl nach RIPC als auch nach RIPC mit anschließender Schockinduktion analysierten. In den betrachteten Studien hatte RIPC allein keine Auswirkung auf die oxidative Phosphorylierung in aus Rattenherzen isolierten Mitochondrien [63, 79].

Unsere Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der genannten Studien in Bezug auf die normovolämischen Untersuchungsbedingungen überein und zeigen, dass in unserem Modell RIPC keinen Effekt auf die mitochondriale Funktion im Ileum- und Colongewebe unter normovolämischen Kreislaufbedingungen erzielt.

4.1.4 RIPC in klinischer Anwendung

Es lohnt sich ebenfalls ein Blick auf die klinische Anwendbarkeit der ischämischen Fernpräkonditionierung. Erwähnenswert sind hier zwei große klinische Studien (ERICCA und RIPHeart), welche die kardioprotektiven Effekte von RIPC im klinischen Setting untersuchten [80]. Sie konnten im Gegensatz zu der bisher vorherrschenden Datenlage keine kardioprotektive Wirkung von RIPC nachweisen [80]. Auch die Datenlage bezüglich der Wirkung der ischämischen Fernpräkonditionierung auf den Gastrointestinaltrakt ist sehr inhomogen. Sowohl in Tierversuchen [56, 81] als auch in klinischen Studiendesigns [82, 83] wurden positive Effekte auf einen intestinalen Ischämie-/Reperfusionsschaden nachgewiesen. Andere Studien zeigten jedoch gegenteilige Ergebnisse [76, 84, 85]. Yi et al. untersuchten in ihrer Studie die Effekte der ischämischen Fernpräkonditionierung auf die postoperative gastrointestinale Funktion von Patient/-innen nach laparoskopischer Darmkrebs-Resektion. RIPC wurde hier mittels drei Zyklen von je fünfminütiger Ischämie mit anschließender fünfminütiger Reperfusion durch Verwendung einer Blutdruckmanschette am rechten Oberarm durchgeführt. Die Messung der postoperativen gastrointestinalen Funktion erfolgte mithilfe des I-FEED-Scores. Es wurden die postoperativen Funktionen der Patient/-innen anhand von fünf Punkten (Essensaufnahme, Übelkeit, Erbrechen, klinische Untersuchung und Dauer der Symptome) gemessen und unterteilt. Hier zeigte sich,

dass RIPC eine schützende Wirkung auf die postoperative gastrointestinale Funktion der Patient/-innen hatte [86]. Auch Li et al. konnten einen positiven Effekt von RIPC auf die intestinale Funktion zeigen. Sie untersuchten Patient/-innen, welche sich einer elektiven offenen infrarenalen Aneurysma-Operation unterzogen. Hier wurde RIPC anhand von drei Zyklen von je fünfminütiger Ischämie mit anschließender fünfminütiger Reperfusion durch Verwendung einer Blutdruckmanschette, hier allerdings im Gegensatz zu der Studie von Yi et al. am linken Oberarm, durchgeführt. Li et al. haben hier das Ausmaß der Darmverletzung anhand von drei Markern gemessen. Zum einen verwendeten sie das Protein I-FABP, welches bei einer Verletzung der Darmschleimhaut einen Anstieg im peripheren Blutkreislauf aufweist. Auch die DAO-Aktivität im Serum ist ein Marker, welcher als Index für die Schädigung der Dünndarmschleimhaut verwendet wird. Als dritten Marker verwendeten Li et al. den Serumendotoxinspiegel, da er als Indikator für die intestinale Permeabilität dient [82]. Im Gegensatz zu den Studien von Yi et al. und Li et al., konnten Struck et al. keine Auswirkungen von RIPC auf die Darmschädigung bei Patienten und Patientinnen feststellen, welche sich einer Herzoperation mit kardiopulmonalem Bypass unterzogen haben. Struck et al. haben sowohl die Höhe des Proteins I-FABP im Serum gemessen als auch zweimal täglich eine klinische Untersuchung der Patienten und Patientinnen bezüglich des Auftretens von gastrointestinalen Komplikationen durchgeführt. RIPC wurde hier durch vier Zyklen von je fünfminütiger Ischämie mit anschließender fünfminütiger Reperfusion durch Verwendung einer Blutdruckmanschette an einem Arm angewendet [85].

Die Inhomogenität dieser Datenlage in Bezug auf die Anwendung von RIPC im klinischen Setting wird vermutlich durch mehrere Faktoren ausgelöst. Einerseits ist die Definition einer gastrointestinalen Dysfunktion nur sehr vage und kann aus diesem Grund nicht standardisiert diagnostiziert und in Studien festgehalten werden [86]. Die oben genannten Studien verwendeten jeweils unterschiedliche Strategien, um die intestinale Funktion beziehungsweise Schädigung zu untersuchen. Andererseits sind die klinischen Studiendesigns meist sehr unterschiedlich und haben keine große Stichprobengröße. Die oben genannten Studien beschäftigen sich mit den Effekten von RIPC im frühen Fenster der Protektion. Bisher konnten keine klinischen Studien zu den Auswirkungen der ischämischen

Fernpräkonditionierung auf den Gastrointestinaltrakt im späten Fenster der Protektion gefunden werden.

4.2 Methodendiskussion

Wie bereits oben erwähnt bestehen große Unterschiede in der Datenlage zur Auswirkung von RIPC auf die intestinale Schleimhaut. Folgende Faktoren können dazu beitragen und als Ursache in Betracht gezogen werden:

Die Messung wurde jeweils zu einem bestimmten Zeitpunkt 24h nach der Durchführung von RIPC durchgeführt. Somit können wir nur Aussagen zu diesem einen Zeitpunkt treffen. Wir können keine Aussagen zu den Zeitpunkten davor und danach tätigen und somit nicht ausschließen, dass Veränderungen in der intestinalen mitochondrialen Aktivität zu einem anderen Zeitpunkt messbar gewesen wären. In anderen Studiendesigns wurde ebenfalls meist nur zu einem Zeitpunkt eine Messung durchgeführt. Somit ist ein Vergleich dieser unterschiedlichen Zeitpunkte schwierig.

Da wir uns in der vorliegenden Studie auf die Untersuchung der mitochondrialen Aktivität beschränkten, lohnt sich ein näherer Blick auf die Mitochondrien. Mitochondrien sind Zellorganellen, welche sehr anpassungsfähig sind und sich schnell an wechselnde Stoffwechsellagen adaptieren können [87]. Auf diese Weise können Schäden an der mitochondrialen DNA durch eine DNA-Polymerase repariert und somit die Mitochondrien vor einem Zellschaden geschützt werden [88]. Wir können nicht ausschließen, dass diese und andere Reparaturmechanismen bereits zum Messzeitpunkt mögliche mitochondrialen Schäden repariert hatten und somit in unserer Studie keine anhaltende mitochondriale Dysfunktion sowohl nach hämorrhagischen Schock als auch nach RIPC nachgewiesen werden konnte.

Wie bereits oben dargestellt, besteht ein Unterschied in der Wirkungsweise von RIPC im Darm und im Herzen. Das Herz besteht überwiegend aus einer Zellart, den Kardiomyozyten. In der Zusammensetzung ist das Darmgewebe jedoch komplexer und beinhaltet verschiedene Zelltypen wie Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Immunzellen usw. In unserer Studie, wie auch in der Studie von Hummitzsch et al. und anderen Studien zur intestinalen Wirkung von IPC und RIPC wurden Gewebekomponenten verwendet. Dies kann eventuell dazu führen, dass

RIPC-vermittelte Effekte auf einen bestimmten Zelltyp (z.B. Epithelzellen) durch andere Zelltypen, welche nicht auf RIPC reagieren, überdeckt werden. Somit könnten die Ergebnisse dieser, aber auch anderer, Studien zur intestinalen Wirkung von RIPC verfälscht sein. Ebenfalls kann es zu einer Schädigung der Mitochondrien durch den Homogenisierungsprozess kommen. Um dies auszuschließen, führten wir bei jeder Messung eine Kontrollmessung durch. Eine Alternative zur Herstellung von Gewebehomogenaten stellt die Gewinnung von Mitochondrien durch einen aufwendigen Isolationsprozess dar. Die so gewonnenen Mitochondrien werden einzeln zur Messung verwendet. Bei diesem Verfahren wird allerdings diskutiert, ob die Daten dieser gewonnenen Mitochondrien repräsentativ für das gesamte Gewebe verwendet werden können. Bei dem Isolationsprozess besteht zusätzlich die Gefahr, dass die Mitochondrien beschädigt werden können [89]. Das Verfahren zur Herstellung von Gewebehomogenaten ist im Institut für experimentelle Anästhesie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf ein gängiges und somit standardisiertes Verfahren. Gegenüber dem aufwendigen Isolationsprozess weist die Herstellung von Gewebehomogenaten viele Vorteile wie einen zeitlich geringeren Arbeitsaufwand, die Verwendung von kleineren Mengen zur Messung bestimmter Parameter und die Stabilität der Gewebeproben auf [89].

Andere Confounder wie zum Beispiel das Alter der Tiere, Komorbiditäten der Versuchstiere, Geschlecht und andere mögliche Kompensationsmechanismen müssen ebenfalls als Ursache für die inhomogene Datenlage in Erwägung gezogen werden. Bezüglich des Alters der Tiere deutet eine Studie von Ren et al. daraufhin, dass die Ileumzotten verschiedener Sprague-Dawley-Ratten mit steigendem Alter atrophisch werden und somit die Barrierefunktion der Mukosa herabsetzen könnten [90]. Andere Studien zeigten ebenfalls eine mit zunehmendem Alter stärker ausgeprägte mitochondriale Dysfunktion [91]. In unserer Studie wurden die Versuche an acht Wochen alten Wistar-Ratten durchgeführt, womit weitestgehend altersbedingt eingeschränkte Funktionen der Barrierefunktion und der mitochondrialen Dysfunktion ausgeschlossen werden können. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass mögliche Kompensationsmechanismen bei so jungen Tieren noch nicht komplett entwickelt sind. Neben dem Alter der Tiere können auch deren Komorbiditäten einen Einfluss auf die Studienergebnisse haben. Wider et al. zeigten in ihrem Versuch, dass der kardioprotektive Effekt der ischämischen

Fernpräkonditionierung bei an Diabetes Typ 2 erkrankten Versuchstieren nicht auftritt [92]. Als Versuchstiere verwendeten wir ausschließlich Wistar-Ratten. Hier können wir weitestgehend davon ausgehen, dass keine Komorbiditäten bestehen. Um darüber hinaus hormonelle Einflüsse auszuschließen und eine höhere Homogenität zwischen den einzelnen Versuchstieren zu etablieren, beschränkten wir uns auf die Untersuchung von männlichen Wistar-Ratten (siehe Seite 14).

Andere mögliche Kompensationsmechanismen können ebenfalls Ursache für die inhomogenen Studienergebnisse sein. Hier sind zum Beispiel sympathoadrenerge Mechanismen wie eine Tachykardie, eine Tachypnoe und eine Zentralisierung durch periphere Vasokonstriktion zu beachten. Da diese Mechanismen nicht Teil der Fragestellung waren und in dem Zeitraum zwischen RIPC beziehungsweise Sham und der letztendlichen Laparotomie nach gegebenenfalls durchgeführter Ischämie-Reperfusion-Phase nicht gemonitort wurden, kann keine Aussage über mögliche Auswirkungen dieser Faktoren auf die Studienergebnisse getätigt werden. Eine Hypothermie wäre ein weiterer Kompensationsmechanismus und kann über eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs und einer Verminderung des Stoffwechsels eine protektive Wirkung auf die mitochondriale Funktion bewirken. Anhand des Einsatzes einer Wärmematte und rektaler Temperaturmessung können wir in unserem Versuchsaufbau eine Hypothermie allerdings weitestgehend ausschließen (siehe Seite 15).

Nicht unerwähnt bleiben darf, dass viele Autoren einen Einfluss von Anästhetika auf die Wirkung der ischämischen Fernpräkonditionierung beschreiben. So beschreiben Chen et al., dass es zu einer Aufhebung der kardioprotektiven Mechanismen von RIPC kommt, wenn Propofol vor der Anwendung von RIPC verabreicht wird. Kommt es allerdings zu einer Verabreichung nach der Anwendung der ischämischen Fernpräkonditionierung liegt weiterhin ein kardioprotektiver Schutz vor. Die Signalmechanismen des kardioprotektiven Schutzes durch RIPC können also in der späten Phase der Protektion nicht durch Propofol aufgehoben werden [93]. Bisher wurden solche Effekte nur für Propofol beschrieben. In unserer Studie verwendeten wir daher Pentobarbital als Anästhetikum (siehe Seite 15).

Zur Reduktion von Messfehlern bildeten wir jeweils einen Mittelwert aus den drei durchgeführten Messungen (siehe Seite 18).

Es wurden somit bereits viele mögliche Faktoren erörtert, dennoch ist es nicht auszuschließen, dass weitere bisher noch unbekannte Confounder die Ergebnisse beeinflussen können.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Versuchsreihe konnte weder ein Einfluss auf die mitochondriale Funktion unter normovolämen noch unter hypovolämen Bedingungen oder nach Durchführung von RIPC festgestellt werden. Die mitochondriale Funktion wird also weder durch RIPC noch durch eine Hypovolämie mit anschließender Reperfusion verändert. Es können daraus folgend keine Aussagen über die Wirksamkeit beziehungsweise die Effekte von RIPC im Allgemeinen getroffen werden. Aufgrund der weiterhin inhomogenen und teils widersprüchlichen Datenlage besteht die Notwendigkeit weitere Nachforschungen zu möglichen Wirkmechanismen von RIPC aufs intestinale Gewebe durchzuführen.

Gelingt es Wirkmechanismen herauszukristallisieren wäre dies eine gute Möglichkeit zur klinischen Anwendbarkeit von RIPC und somit Protektion vor einer Sepsis oder einem Multiorganversagen bei einem hämorrhagischen Schock. Allerdings ist zu bedenken, dass es viele mögliche Einflüsse wie Komorbiditäten oder das verwendete Anästhetikum gibt, welche den Effekt der ischämischen Fernpräkonditionierung auch im klinischen Setting mildern könnten.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Vincent, J.L. and D. De Backer, *Circulatory shock*. N Engl J Med, 2013. **369**(18): p. 1726-34.
2. Nunez, T.C. and B.A. Cotton, *Transfusion therapy in hemorrhagic shock*. Curr Opin Crit Care, 2009. **15**(6): p. 536-41.
3. Mochhala, S., J. Wu, and J. Lu, *Hemorrhagic shock: an overview of animal models*. Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 4631-9.
4. Cannon, J.W., *Hemorrhagic Shock*. N Engl J Med, 2018. **378**(4): p. 370-379.
5. Marietta, M., et al., *Pathophysiology of bleeding in surgery*. Transplant Proc, 2006. **38**(3): p. 812-4.
6. Standl, T., et al., *The Nomenclature, Definition and Distinction of Types of Shock*. Dtsch Arztebl Int, 2018. **115**(45): p. 757-768.
7. Mannucci, P.M. and M. Levi, *Prevention and treatment of major blood loss*. N Engl J Med, 2007. **356**(22): p. 2301-11.
8. Fulop, A., et al., *Experimental models of hemorrhagic shock: a review*. Eur Surg Res, 2013. **50**(2): p. 57-70.
9. Cairns, C.B., *Rude unhinging of the machinery of life: metabolic approaches to hemorrhagic shock*. Curr Opin Crit Care, 2001. **7**(6): p. 437-43.
10. Cairns, C.B., et al., *Evidence for early supply independent mitochondrial dysfunction in patients developing multiple organ failure after trauma*. J Trauma, 1997. **42**(3): p. 532-6.
11. Singer, M., *The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure*. Virulence, 2014. **5**(1): p. 66-72.
12. Soares, R.O.S., et al., *Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(20).
13. Gattinoni, L., et al., *A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients*. SvO2 Collaborative Group. N Engl J Med, 1995. **333**(16): p. 1025-32.
14. Singer, M., *Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure*. Crit Care Med, 2007. **35**(9 Suppl): p. S441-8.
15. Spronk, P., Kanoore-Edul, V., Ince, C., *Microcirculatory and mitochondrial distress syndrome (MMDS): a new look at sepsis*. Functional Hemodynamic Monitoring. Update in Intensive Care and Emergency Medicine, 2005. **42**: p. 47-67.
16. Ince, C., *The microcirculation is the motor of sepsis*. Crit Care, 2005. **9 Suppl 4**: p. S13-9.
17. Leskova, G.F., *Phospholipids in mitochondrial dysfunction during hemorrhagic shock*. J Bioenerg Biomembr, 2017. **49**(2): p. 121-129.
18. Santos, C.H., et al., *Importance of duration and number of ischemic postconditioning cycles in preventing reperfusion mesenteric injuries. Experimental study in rats*. Acta Cir Bras, 2015. **30**(10): p. 709-14.

19. Hof, S., et al., *Effects of remote ischemic preconditioning on early markers of intestinal injury in experimental hemorrhage in rats*. Sci Rep, 2024. **14**(1): p. 12960.
20. Cowled, P. and R. Fitridge, *Pathophysiology of Reperfusion Injury*, in *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*, R. Fitridge and M. Thompson, Editors. 2011: Adelaide (AU).
21. Galley, H.F., *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis*. Br J Anaesth, 2011. **107**(1): p. 57-64.
22. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
23. Deitch, E.A., *Gut-origin sepsis: evolution of a concept*. Surgeon, 2012. **10**(6): p. 350-6.
24. Trzeciak, S., et al., *Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis*. Intensive Care Med, 2008. **34**(12): p. 2210-7.
25. Schorghuber, M. and S. Fruhwald, *Effects of enteral nutrition on gastrointestinal function in patients who are critically ill*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018. **3**(4): p. 281-287.
26. Hof, S., et al., *Local Mucosal CO₂ but Not O₂ Insufflation Improves Gastric and Oral Microcirculatory Oxygenation in a Canine Model of Mild Hemorrhagic Shock*. Front Med (Lausanne), 2022. **9**: p. 867298.
27. 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.
28. Truse, R., et al., *Topical Melatonin Improves Gastric Microcirculatory Oxygenation During Hemorrhagic Shock in Dogs but Does Not Alter Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers*. Front Med (Lausanne), 2020. **7**: p. 510.
29. Truse, R., et al., *Local gastric RAAS inhibition improves gastric microvascular perfusion in dogs*. J Endocrinol, 2019. **241**(3): p. 235-247.
30. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. **74**(5): p. 1124-36.
31. Vetrugno, L. and T. Bove, *Ischemic preconditioning: light and shadow*. Minerva Anesthesiol, 2020. **86**(3): p. 241-243.
32. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 893-9.
33. Meybohm, P., et al., *A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery*. N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1397-407.
34. Liu, A., et al., *Ischemic preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1-mediated autophagy*. Crit Care Med, 2014. **42**(12): p. e762-71.

35. Gao, M. and D. Liu, *Ischemic preconditioning may attenuate lung ischemia-reperfusion injury partly by stimulating autophagy*. J Formos Med Assoc, 2015. **114**(8): p. 677-8.
36. Toosy, N., et al., *Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury*. BJU Int, 1999. **84**(4): p. 489-94.
37. Kitagawa, K., et al., *'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain*. Brain Res, 1990. **528**(1): p. 21-4.
38. Cinel, I., et al., *Ischemic preconditioning reduces intestinal epithelial apoptosis in rats*. Shock, 2003. **19**(6): p. 588-92.
39. Jan, W.C., et al., *Limb ischemic preconditioning mitigates lung injury induced by haemorrhagic shock/resuscitation in rats*. Resuscitation, 2011. **82**(6): p. 760-6.
40. Hu, X., et al., *Remote ischemic preconditioning mitigates myocardial and neurological dysfunction via K(ATP) channel activation in a rat model of hemorrhagic shock*. Shock, 2014. **42**(3): p. 228-33.
41. Leung, C.H., et al., *Remote Ischemic Conditioning Prevents Lung and Liver Injury After Hemorrhagic Shock/Resuscitation: Potential Role of a Humoral Plasma Factor*. Ann Surg, 2015. **261**(6): p. 1215-25.
42. Cheung, M.M., et al., *Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(11): p. 2277-82.
43. Zhou, H., et al., *Remote Ischemic Preconditioning Prevents Postoperative Acute Kidney Injury After Open Total Aortic Arch Replacement: A Double-Blind, Randomized, Sham-Controlled Trial*. Anesth Analg, 2019. **129**(1): p. 287-293.
44. Moscarelli, M., et al., *Remote ischemic preconditioning in isolated valve intervention. A pooled meta-analysis*. Int J Cardiol, 2021. **324**: p. 146-151.
45. Tian, C., et al., *Effects of remote ischemic preconditioning in hepatectomy: a systematic review and meta-analysis*. BMC Anesthesiol, 2024. **24**(1): p. 118.
46. Donatelli, F. and L. Pietropaoli, *Remote ischemic preconditioning: the hunt is still open*. Minerva Anesthesiol, 2018. **84**(11): p. 1243-1245.
47. Bolli, R., *The late phase of preconditioning*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 972-83.
48. Yang, B., et al., *Intestinal and Limb Ischemic Preconditioning Provides a Combined Protective Effect in the Late Phase, But not in the Early Phase, Against Intestinal Injury Induced by Intestinal Ischemia-Reperfusion in Rats*. Shock, 2018. **49**(5): p. 596-603.
49. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *The second window of preconditioning (SWOP) where are we now?* Cardiovasc Drugs Ther, 2010. **24**(3): p. 235-54.
50. Hou, Y.Y., et al., *Effects of differential-phase remote ischemic preconditioning intervention in laparoscopic partial nephrectomy: A single blinded, randomized controlled trial in a parallel group design*. J Clin Anesth, 2017. **41**: p. 21-28.

51. Guo, Y., et al., *Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice*. Am J Physiol, 1998. **275**(4): p. H1375-87.
52. Mallick, I.H., M.C. Winslet, and A.M. Seifalian, *Ischemic preconditioning of small bowel mitigates the late phase of reperfusion injury: heme oxygenase mediates cytoprotection*. Am J Surg, 2010. **199**(2): p. 223-31.
53. Mallick, I.H., et al., *Protective effects of ischemic preconditioning on the intestinal mucosal microcirculation following ischemia-reperfusion of the intestine*. Microcirculation, 2005. **12**(8): p. 615-25.
54. Mallick, I.H., et al., *Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine*. Br J Surg, 2005. **92**(9): p. 1169-76.
55. Pinheiro, D.F., et al., *Ischemic preconditioning modifies mortality and inflammatory response*. Acta Cir Bras, 2016. **31**(1): p. 1-7.
56. Hummitzsch, L., et al., *Remote ischemic preconditioning attenuates intestinal mucosal damage: insight from a rat model of ischemia-reperfusion injury*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 136.
57. Dickson, E.W., et al., *Myocardial preconditioning factors evoke mesenteric ischemic tolerance via opioid receptors and K(ATP) channels*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(1): p. H22-8.
58. Vlasov, T.D., D.A. Smirnov, and G.M. Nutfullina, *Preconditioning of the small intestine to ischemia in rats*. Neurosci Behav Physiol, 2002. **32**(4): p. 449-53.
59. Zheng, M.Y., et al., *Short cycles of remote ischemic preconditioning had no effect on tensile strength in small intestinal anastomoses: an experimental animal study*. J Gastrointest Surg, 2024. **28**(11): p. 1777-1782.
60. Saeki, I., et al., *Ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning have protective effect against cold ischemia-reperfusion injury of rat small intestine*. Pediatr Surg Int, 2011. **27**(8): p. 857-62.
61. Lotfollahi, H., et al., *Effect of remote ischemic post-conditioning on oxidative stress in blood of STEMI patients treated with primary angioplasty*. J Cardiovasc Thorac Res, 2016. **8**(3): p. 113-118.
62. Lee, W.Y. and S.M. Lee, *Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver*. Shock, 2005. **24**(4): p. 370-5.
63. Boengler, K., G. Lochnit, and R. Schulz, *Mitochondria "THE" target of myocardial conditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018. **315**(5): p. H1215-H1231.
64. Gomes, P.F.M., et al., *Remote Ischemic Preconditioning Is Efficient in Reducing Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in a Growing Rat Model and Does Not Promote Histologic Lesions in Distant Organs*. Transplant Proc, 2018. **50**(10): p. 3840-3844.
65. Kraemer, R., et al., *Acute effects of remote ischemic preconditioning on cutaneous microcirculation--a controlled prospective cohort study*. BMC Surg, 2011. **11**: p. 32.
66. Hauser, C.J., *Preclinical models of traumatic, hemorrhagic shock*. Shock, 2005. **24 Suppl 1**: p. 24-32.

67. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
68. Gnaiger, E., *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control - An introduction to OXPHOS Analysis*. Mitochondrial Physiology Network, 2014. **19.12**.
69. Candilio, L., A. Malik, and D.J. Hausenloy, *Protection of organs other than the heart by remote ischemic conditioning*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2013. **14**(3): p. 193-205.
70. Liao, S., et al., *Mitochondrial DNA Release Contributes to Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury*. Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 854994.
71. Heusch, G., *Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning*. Circ Res, 2015. **116**(4): p. 674-99.
72. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection*. Heart Fail Rev, 2007. **12**(3-4): p. 217-34.
73. Heusch, G., *Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic*. Lancet, 2013. **381**(9861): p. 166-75.
74. Cellier, L., et al., *Remote Ischemic Conditioning Influences Mitochondrial Dynamics*. Shock, 2016. **45**(2): p. 192-7.
75. Wu, B., et al., *Ischemic preconditioning attenuates ischemia-reperfusion-induced mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondria-dependent pathway in rat small intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **286**(4): p. G580-7.
76. Colak, T., et al., *The effect of remote ischemic preconditioning on healing of colonic anastomoses*. J Surg Res, 2007. **143**(2): p. 200-5.
77. Kologlu, M., et al., *Effect of local and remote ischemia-reperfusion injury on healing of colonic anastomoses*. Surgery, 2000. **128**(1): p. 99-104.
78. Camara-Lemarroy, C.R., *Remote ischemic preconditioning as treatment for non-ischemic gastrointestinal disorders: beyond ischemia-reperfusion injury*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(13): p. 3572-81.
79. Ferko, M., et al., *Remote ischemic preconditioning of the heart: protective responses in functional and biophysical properties of cardiac mitochondria*. Physiol Res, 2014. **63**(Suppl 4): p. S469-78.
80. Garratt, K.N., P. Whittaker, and K. Przyklenk, *Remote Ischemic Conditioning and the Long Road to Clinical Translation: Lessons Learned From ERICCA and RIPHeart*. Circ Res, 2016. **118**(7): p. 1052-4.
81. Filaretova, L., et al., *Non-Invasive Remote Ischemic Preconditioning May Protect the Gastric Mucosa Against Ischemia-Reperfusion-Induced Injury Through Involvement of Glucocorticoids*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 682643.
82. Li, C., et al., *Limb remote ischemic preconditioning for intestinal and pulmonary protection during elective open infrarenal abdominal aortic*

- aneurysm repair: a randomized controlled trial.* Anesthesiology, 2013. **118**(4): p. 842-52.
83. Zitta, K., et al., *Serum from patients undergoing remote ischemic preconditioning protects cultured human intestinal cells from hypoxia-induced damage: involvement of matrixmetalloproteinase-2 and -9.* Mol Med, 2012. **18**(1): p. 29-37.
 84. Hausenloy, D.J., et al., *Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery.* N Engl J Med, 2015. **373**(15): p. 1408-17.
 85. Struck, R., et al., *Effect of Remote Ischemic Preconditioning on Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury in Adults Undergoing On-Pump CABG Surgery: A Randomized Controlled Pilot Trial.* J Cardiothorac Vasc Anesth, 2018. **32**(3): p. 1243-1247.
 86. Yi, M., et al., *Effect of remote ischemic preconditioning on postoperative gastrointestinal function in patients undergoing laparoscopic colorectal cancer resection.* Int J Colorectal Dis, 2023. **38**(1): p. 68.
 87. Yoo, S.M. and Y.K. Jung, *A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics.* Mol Cells, 2018. **41**(1): p. 18-26.
 88. Scheibye-Knudsen, M., et al., *Protecting the mitochondrial powerhouse.* Trends Cell Biol, 2015. **25**(3): p. 158-70.
 89. Pecinova, A., et al., *Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates.* Mitochondrion, 2011. **11**(5): p. 722-8.
 90. Ren, W.Y., et al., *Age-related changes in small intestinal mucosa epithelium architecture and epithelial tight junction in rat models.* Aging Clin Exp Res, 2014. **26**(2): p. 183-91.
 91. Pichaud, N., et al., *Age Dependent Dysfunction of Mitochondrial and ROS Metabolism Induced by Mitonuclear Mismatch.* Front Genet, 2019. **10**: p. 130.
 92. Wider, J., et al., *Remote ischemic preconditioning fails to reduce infarct size in the Zucker fatty rat model of type-2 diabetes: role of defective humoral communication.* Basic Res Cardiol, 2018. **113**(3): p. 16.
 93. Chen, K., et al., *The timing of propofol administration affects the effectiveness of remote ischemic preconditioning induced cardioprotection in rats.* J Cell Biochem, 2020. **121**(11): p. 4535-4541.

7 Anhang

7.1 Materialien und Geräte des laborexperimentellen

Versuchsteils

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

Mikrotitrierplatten	Mikrotestplatte 96-Well F, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Multi-Detektions-Plattenlesegerät	BioTek Synergy 2 mit Software Gen5™ Version 1.11, BioTek, Winooski, USA (Protein- und MDA- Konzentrationsbestimmung)
Petrieschalen	
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Pinzette gebogen	
Pinzette spitz	
Pipetten	Pipettensatz Eppendorf Research R 100µl bis 5000µl
Reaktionsgefäß 1,5ml	Micro tube 1,5ml, SARSTEDT AG & Ko.KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 2ml	Micro tube 2ml, SARSTEDT AG & Ko.KG, Nümbrecht, Deutschland
Respirometer	MT200 und SI782, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland

Respirometer Software	782 System Version 4.4 HID, Strathkelvin Instruments, North Lanarkshire, Schottland
Tiefkühlschrank	Forma 900 Ultratiefkühlschrank, Thermo Fischer Scientific, Waltham MA, USA
Trockenschrank	UT6060, Hereaus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Vortexgerät	Vortex Genie Touch Mixer 1, Scientific Industries, New York, USA
Waage	LA230S, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	JULABO GmbH Typ: ED (v.2), Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

7.2 Reagenzien und Chemikalien des laborexperimentellen Versuchsteils

ADP (Adenosintriphosphat)	Sigma A5285, MG 501,31 g/mol
Antimycin A from Streptomyces sp.	Sigma A8674, 50mM
Aqua dest.	Merck, Darmstadt Deutschland
BSA 0,1% fatty acid free (bovine serum albumine)	Sigma A6003
cOmplete™ (Protease Inhibitor Cocktail)	Roche Life Science, Mannheim, Deutschland
Cytochrom C from bovine heart	Sigma C2037 - 50MG
Ethylenglykoltetraacetat EGTA	Roth 3054, MG 380,3 g/mol
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Linda, Duisburg, Deutschland
Glutamat	Fluka, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth 6781, MG 74,56g/mol
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck 4873, MG 136,09g/mol
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Malat	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mannitol (D(-)-Mannit)	Roth 4175.1, MG 182,18g/mol

MDA (Tetramethoxypropan)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
3-(N-Morpholino)-1-Propansulfonsäure MOPS	Roth 6979, MG 209,27g/mol
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Roth 8551.1, MG 84,01g/mol
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
n-Butanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oligomycin	5mg/ml in DMS, CAIbiochem, Israel
Phosphorsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt Deutschland
Rotenon	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Succinat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Sucrose (D(+)-Saccharose)	Roth 4621, MG 342,3g/mol
Thiobarbitursäure (TBA)	Merck 1.08180.0025 MG 144,15g/mol
Tetrasodiumpyrophosphat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat) 0.05%	Gibco 25300-054 100ml

7.3 Puffer und Lösungen des laborexperimentellen Versuchsteils

Isolationspuffer (pH 7,15)	200mM Mannitol 50mM Sucrose 5mM KH_2PO_4 5mM MOPS 0,1% BSA 1mM EGTA zusätzlich wurden für Colon und Ileum 20mg BSA/ml hinzugefügt
Respirationspuffer (pH 7,4)	130mM KCL 5mM K_2HPO_4 20mM MOPS 2,5mM EGTA 1 μM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1% BSA zusätzlich wurden für Colon und Ileum 20mg BSA/ml hinzugefügt
Lowry Reagenz A	10g Natriumcarbonat 0,5l Natriumhydroxid
Lowry Reagenz B	2g Kupfersulfat-Pentahydrat
Lowry Reagenz C	1g Kaliumtartrat

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die in den letzten Jahren an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren und mich unterstützt haben.

Ein großer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Olaf Picker, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen und mich in allen Phasen der Dissertation unterstützt hat.

Ein großer Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. med. Anna Herminghaus für die hervorragende Betreuung, ihre großartige Hilfsbereitschaft, das mehrmalige Korrekturlesen und ihre unendliche Geduld dabei.

Zusätzlich möchte ich Frau Claudia Dohle für die tatkräftige Unterstützung und das Beantworten jeglicher Fragen im Labor danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich jederzeit unterstützt haben.

Zum Abschluss möchte ich noch ein besonderes Dankeschön an meine Schwester, meine Mutter und meinen Freund für das ausdauernde Korrekturlesen, die große Hilfe beim Layout und die ständige Unterstützung aussprechen.