

Universität Ulm
Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und
Verfahrensentwicklung (APV)

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. P. Radermacher

***Effekte von Adrenomedullin-Antikörper auf die Mitochondrien-
Funktion in der Leber der Maus im CLP-induziertem septischen
Schock. Vergleich einer Früh- und Spättherapie***

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Marlene Gabrielle Weingärtner
Heidelberg
2019

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Enrico Calzia
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Miriam Kalbitz

Tag der Promotion: 11.01.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Sepsis und septischer Schock	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Pathophysiologie mitochondrialer Funktion allgemein und während einer Sepsis	1
1.2 Adrenomedullin.....	3
1.2.1 Geschichte	3
1.2.2 Gene, Biochemie und Vorkommen	3
1.2.3 Rezeptoren und Signaltransduktion.....	4
1.2.4 Biologische Aktivität von ADM.....	5
1.2.5 ADM und Sepsis.....	6
1.3 Zielsetzung/Hypothese	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Versuchsplan	10
2.1.1 Biometrie	10
2.1.2 Tiermodell Maus	10
2.2 OROBOROS® Oxygraph-2k.....	10
2.3 Weitere verwendete Materialien	12
2.4 Versuchsdurchführung	13
2.4.1 Operative Vorbereitung	13
2.4.2 Operation	14
2.4.3 Entnahme der Gewebeprobe.....	15
2.5 Respiratorische Messung.....	16
2.5.1 Vorbereitung des Oxygraph-2k	16
2.5.2 Protokoll der respiratorischen Messungen	16
2.6 Statistische Methoden.....	22
3 Ergebnisse	23
3.1 Messprotokoll.....	23
3.1.1 Basaler Sauerstoffverbrauch.....	23

3.1.2	Cytochrom c	24
3.1.3	Malat und Glutamat: LEAK Komplex I.....	25
3.1.4	ADP: OXPHOS Komplex I.....	26
3.1.5	Succinat: OXPHOS Komplex I und II	27
3.1.6	Oligomycin: LEAK Komplex I und II	28
3.1.7	FCCP: ETS-Kapazität	29
4	Diskussion.....	30
4.1	Mitochondriale Funktion im septischen Schock	30
4.2	Effekte der Therapie mit ADM-Antikörper auf die mitochondriale Funktion in der Leber septischer Mäuse.....	31
4.3	Effekte der Früh- und Spättherapie mit ADM-Antikörper.....	32
4.4	Methodenlimitation	34
4.5	Zusammenfassende Bewertung und Ausblick	35
5	Zusammenfassung	37
6	Literaturverzeichnis	39
7	Anhang.....	48
	Danksagung.....	50
	Lebenslauf	51

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AA	Antimycin A
ACTH	Adrenocortikotropes Hormon
ADM	Adrenomedullin
ADM-AK	Adrenomedullin-Antikörper
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Atemfrequenz
ANT	Adenine nucleotide translocator
Asc	Ascorbat
ATP	Adenosintriphosphat
CI	Komplex I
CII	Komplex II
CIII	Komplex III
CIV	Komplex IV
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CLP	Cecal ligation puncture
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoQ	Coenzym Q
COX	Cytochrom C Oxidase
CRLR	Calcitonin receptor-like
Cytc	Cytochrom c
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ETF	Elektronen-transferierendes Flavoprotein
ETS	Electron transport chain
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion
HAM	Human adrenomedullin
K ⁺	Kalium
MIRO05	Mitochondrial respiration medium 05
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid

NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OLG	Oligomycin
ONOO ⁻	Peroxinitrit
OP	Operation
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PKA	Proteinkinase A
RAMP	Receptor activity modifying protein
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
V.	Vena
VT	Tidalvolumen
ZVK	Zentralvenenkatheter
α	Alpha
β	Beta

1 Einleitung

1.1 Sepsis und septischer Schock

1.1.1 Epidemiologie

Das Krankheitsbild Sepsis gehört zu den am häufigsten tödlich verlaufenden Erkrankungen in der heutigen Zeit. Der septische Schock stellt immer noch eine der am häufigsten Todesursachen von Patienten auf der Intensivstation dar.¹ Zahlreiche klinischen Studien zeigen eine hohe Mortalität von durchschnittlich bis zu 50 % der hospitalisierten Patienten sowie eine stetige Zunahme septischer Patienten.²

Die Gründe für den Insidenzanstieg der Sepsisfälle in Deutschland sind noch nicht ganz geklärt. Es wird vermutet daß ein demographische Wandel mit Zunahme älterer multimorbider Patienten und zunehmenden Einsatzes von Breitspektrum-Antibiotika sowie invasiver und immunsuppressiver Maßnahmen hierfür verantwortlich sein könnten. Auch vermehrte Sepsiskodierungen im (SIRS-)Sepsis-Codes im ICD-9/10-System durch eine erhöhte Vergütung wurden diskutiert.¹

1.1.2 Pathophysiologie mitochondrialer Funktion allgemein und während einer Sepsis

Eine Sepsis ist eine systemische Entzündungsreaktion, welche durch eine Infektion getriggert wird. Es kommt zu einer Kettenreaktion pathogener Prozesse, die letztendlich zum septischen Schock führen können und mit therapierefraktärer Hypotension und Organdysfunktion einhergehen.³ Die Hypotension ist die Folge einer starken peripheren Vasodilatation und einer erhöhten Membranpermeabilität. Dies führt zu einem Plasma-Kapillarleck in die extrazelluläre Matrix. Insgesamt enden diese Prozesse in den sogenannten „hyperdynamen Shock-Syndrom“ (hyperdynamie Phase der Sepsis) mit reflektorisch ansteigender Herzfrequenz, normalem bis erhöhtem Herzminutenvolumen und niedrigem peripheren Gefäßwiderstand.⁴ Bei längeren Krankheitsverläufen kann es zu einem Übergang dieser hyperdynamen in die hypodynamie Phase der Sepsis kommen. Diese endet in einer therapierefraktären Hypotonie mit erniedrigtem Herzzeitvolumen.⁴

Unabhängig von der Genese führt zudem der septische Schock, wie auch jede andere Form des Schocks, zu einer inadäquaten Gewebssperfusion und infolgedessen zu einer Zelldys-

funktion und zum Zelltod. Die Pathogenese der Sepsis und des septischen Schocks auf zellulärer Ebene und die daraus resultierende Organschädigung sind dennoch noch nicht ganz geklärt. Bezüglich der Entstehung der Gewebshypoxie, die als häufige Erscheinung der Sepsis bekannt ist, werden momentan zwei Hypothesen diskutiert. Die erste Hypothese beschreibt eine verminderte Sauerstoffzufuhr, die sogenannte „mikrovaskuläre Hypothese“, bei der die Sepsis durch geschädigte kleine Blutgefäße und defekte Kapillaren entsteht.⁵ Die zweite Hypothese geht von einer mitochondrialen Funktionsstörung aus, die zu einer ineffizienten Sauerstoffverwertung führt. Diese wird auch als „zelluläre Hypoxie“ genannt.⁶

Während einer Sepsis konnte eine Abnahme der mitochondrialen Funktion eindeutig nachgewiesen werden.⁷ Der dafür verantwortliche Mechanismus ist eine gesteigerte NO-Synthese. Dadurch entsteht eine Inhibition der Atmungskette. Die Inhibition fördert die Entstehung von Peroxinitrit und es kommt zu weiteren Schäden wie zum Beispiel Membranschädigungen oder Proteindenaturierungen.^{8,9} Mitochondrien bieten deshalb multiple potenzielle Angriffspunkte für eine Therapie während einer Sepsis. Nach vielen Untersuchungen und Studien wurden einige Kategorien für mögliche mitochondriale Therapien gebildet.¹⁰

1. Verbesserung des Sauerstoffverbrauchs durch Gabe von verschiedenen Substraten und Förderung der oxidativen Phosphorylierung: Carnitin, Succinat, ATP.^{11,12}
2. Verbesserung des Elektronen-Flux durch Gabe von Ubichinol und Cytochrome c und Schutz vor zellulärer Hypoxie.¹⁰ Bei geschädigtem oder reduziertem Cytochrom c kommt es zu einer Dysfunktion des Komplex IV (Cytochrom-Oxidase) während einer Sepsis. Dieses Phänomen beruht auf einer Inhibition der Cytochrome-Oxidase durch NO.¹³ Durch Gabe von Koffein wird das cAMP ebenfalls erhöht und zur Cytochrom c Oxidase Phosphorylierung genutzt. Dies steigert die oxidative Phosphorylierung.¹⁴ cAMP wird auch von Adrenomedullin stimuliert.
3. Reduktion von ROS und oxidativem Stress durch Antioxidantien.
Mitochondrien produzieren unter physiologischen Bedingungen ROS, welches durch ein Leakage von Komplex I und III entsteht. 2-4 % der Elektronen leaken im Normalzustand. Im Krankheitszustand erhöht sich die Rate und es entsteht ein Teufelskreis: Durch oxidativen Stress und freie Radikale werden die Mitochondrien geschädigt. Durch die eingeschränkte mitochondriale Funktion kommt es dann zu einer Organdysfunktion und/oder einer Organschädigung. Bei möglichen Antioxidantien-Therapien wurden Melatonin, Glutathion, Pyruvat und NO-Inhibitoren angewendet.¹⁰

Es ist hinreichend bekannt, daß in der Sepsis die metabolischen Funktionen der Leber, vor allem die Gluconeogenese, stark beeinträchtigt sind.¹⁵ Dementsprechend wird auch gemäß der neuesten Definition der Sepsis die Leberfunktionsstörung im Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment (SOFA) Score berücksichtigt.^{16,17} In unserem Sepsismodell lässt sich diese metabolische Funktionsstörung der Leber nachbilden. Zugleich zeigen die Tiere auch eine verminderte mitochondriale Atmungsaktivität in der Leber.¹⁸ Es ist bisher aber nicht bekannt, ob die veränderte mitochondrialen Funktion in den Hepatozyten zur gestörten Gluconeogenese beiträgt. Dies lässt sich jedoch aufgrund des hohen Energiebedarfs der Gluconeogenese vermuten.

1.2 Adrenomedullin

1.2.1 Geschichte

1993 wurde das Hormon Adrenomedullin (ADM) erstmals im menschlichen Pheochromozytom im Nebennierenmark nachgewiesen.¹⁹ Verschiedene Studien zeigten, dass ADM eine Erhöhung von intrazellulärem cAMP induziert, welches in Thrombozyten von Ratten nachgewiesen wurde. Weitere biologische Aktivitäten, die dem ADM zuzusprechen sind, haben das Interesse vieler Forscher geweckt.^{19,20}

Erhöhte Plasmaspiegel von ADM wurden vor allem bei Herz- und Nierenerkrankungen entdeckt und mit dem starken hypotensiven Effekt aufgrund des erniedrigten Gefäßwiderstandes der vasodilierten Gefäße in Verbindung gebracht.²¹ 2003 wurde zusätzlich noch das ADM 2 aus der ADM-Familie entdeckt.²²

1.2.2 Gene, Biochemie und Vorkommen

Das ADM-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des 11. Chromosoms (p11.1-3). Es besteht aus bis zu vier Exonen sowie drei Intronen und kodiert für das Pro-ADM-Hormon mit 185 Aminosäuren, aus dem ADM und PAMP (Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide) entstehen.²³ Die biochemische Struktur des aktiven ADM-Peptids besteht aus 52 Aminosäuren mit einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cystein-Bausteinen zwischen Position 16 und 21 sowie einer Amin-Gruppe am Carboxylende.²³ ADM gehört zur Familie der „Calcitonin

gene-related peptides“, da es eine ähnliche Struktur aufweist.²⁴ Es kommt in fast allen Geweben vor, insbesondere in der Lunge, dem Herz, der Niere und den Nebennieren; vor allem in Endothelzellen.¹⁹

1.2.3 Rezeptoren und Signaltransduktion

ADM kann zwei verschiedene Rezeptoren aktivieren:

1. CGRP-Rezeptoren
2. spezifische ADM-Rezeptoren

CGRP-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt und aktivieren Gs-Proteine mit darauffolgender Aktivierung der Adenylcyclasen. Sie besitzen eine 7-fache erhöhte Affinität zu CGRP als zu ADM. CGRP-Rezeptoren können durch CGRP inhibiert werden und sind in ihrer Aminosäuresequenz identisch mit dem Calcitonin-ähnlichen Rezeptor (CLR) sowie mit dem ADM-Rezeptor. Die Wirkung nach Anbindung von ADM ist vasodilatatorisch.^{19,25,26}

Spezifische ADM-Rezeptoren wurden durch verschiedene Studien entdeckt. Sie haben eine 23-fache erhöhte Affinität für ADM als für CGPR. Es wurde keine Inhibierung der Aktivität von ADM durch eine erhöhte CGPR-Konzentration von bis zu 10 µM festgestellt. Dies bestätigt das Vorhandensein von eigenen ADM-Rezeptoren.²⁷ Sie sind ebenfalls G-Protein-gekoppelt und besitzen zwei Untereinheiten: CRLR und RAMP (receptor activity modifying protein). ADM aktiviert die Ko-Expression von CRLR und RAMP-2 und 3 und es kommt zu einem cAMP-Anstieg. CGPR hingegen aktiviert die Ko-Expression von CRLR und RAMP-1. Das Resultat ist ebenfalls ein cAMP-Anstieg (siehe Abb. 2).²⁸

Die Signaltransduktion ADM-stimulierter Zellen beruht hauptsächlich auf einer Erhöhung von cAMP. Die Calcitonin-Familie, zu der ADM und CGRP gehören, erhöht das cAMP in verschiedenen Geweben und Zellen ebenso. Erst dadurch konnte das ADM entdeckt werden.¹⁹ Der Mechanismus ist meist eine G-Protein-gekoppelte Aktivierung von Gs, Adenylatzyklase und Proteinkinase A.²⁹ Die Proteinkinase A modifiziert die Myosinleichtkettenkinase in eine weniger aktive Form und führt dadurch zu einer Relaxation der glatten Muskulatur und Vasodilatation.³⁰ Es gibt noch einen zweiten Weg der ebenfalls zu einer Vasodilatation führt: ADM beziehungsweise CGRP verstärken hier die NO-Synthese bei zytokin-stimulierten glatten Gefäßmuskelzellen.³¹ In beiden Fällen kommt es zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen durch ATP-sensitive K⁺-Kanäle (siehe Abb. 3).³² Weitere Signaltransduktionswege sind:

- Protein-Tyrosin-Kinase (PTK)/ Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK) Pathway, welcher mitogene Effekte sowohl auf tumorale als auch auf nicht-tumorale Zellen ausübt.³³
- cAMP/PKA Pathway, welcher antimitogene Effekte wie z.B. Inhibierung der DNA-Synthese aufzeigt.³⁴
- P13 Kinase/AKT Pathway, durch den es zu einer NO-abhängigen Vasodilatation der glatten Muskelzellen kommt.³⁴

1.2.4 Biologische Aktivität von ADM

Das Peptid wirkt auf verschiedene Organe und wurde primär durch seine vasodilatatorischen Wirkungen bekannt. Es gibt zwei Wege, welche zu einem Verlust des peripheren Gefäßwiderstandes führen und somit zur Vasodilatation. Direkt, durch die Erhöhung von intrazellulärem cAMP, und indirekt, durch die Induktion der NO-Ausschüttung des Gefäßendothels.^{19,35} Außerdem wurden unter anderem endokrine Effekte gefunden, welche beispielsweise die ACTH-Sekretion des Hypophysenvorderlappens oder die β -Zellen des Pankreas inhibieren, was eine Verminderung der Insulinproduktion zur Folge hat.^{19,36,37} Weitere Effekte sind antimikrobieller Art. ADM befindet sich im Epithelium der Schleimhäute unseres Körpers wie beispielsweise in der Lunge, im Darm und im Mund und ist der erste Abwehrmechanismus bei dem Eindringen von potentiell pathogenen Mikroorganismen.^{19,27} Es konnte nachgewiesen werden, dass ADM einen bakteriziden Effekt auf grampositive und gramnegative Bakterien hat. Die Konzentration ist generell in den Schleimhäuten höher als im Blutplasma. Eine Ausnahme stellt beispielsweise die Sepsis dar, da sie zusätzlich eine zelluläre inflammatorische Reaktion hervorruft.^{19,38}

Tab. 1: Wirkungen von Adrenomedullin (Universtitätsklinikum Ulm, 2015)
ACTH: Adrenocortikotropes Hormon

Organ	Funktion
Haut, Schleimhaut	antimikrobiell, bakterizid
Herz	positiv-inotrop und -chronotrop
Gefäße	Vasodilatation, antikoagulativ
Lunge	Vasodilatation, antiphlogistisch, Bronchodilatation
ZNS	Hemmung der Wasser- und Salzaufnahme
Hypothalamus	Hemmung Vasopressin

Hypophyse	Hemmung ACTH
Gastrointestinaltrakt	antimikrobiell, Protektion der Schleimhaut
Niere	Diurese, Natriurese
Nebenniere	Hemmung Aldosteron

1.2.5 ADM und Sepsis

Es gibt mehrere Studien in denen nachgewiesen wurde, dass die ADM-Konzentration im Blut während des septischen Schocks mit dem Ausmaß der Organfunktionsstörungen und der Mortalität der Patienten korreliert. Je höher die Konzentration, desto schlechter ist die Prognose und desto höher ist die Mortalität.^{39,40} ADM wird als „double-edged sword“ bezeichnet, da es während einer Sepsis einerseits eine protektive, andererseits jedoch auch eine deletäre Funktion besitzt. Da die Letztere dominiert, werden wir in dieser Studie hauptsächlich auf diese eingehen.^{4,41} Die positiven (protektiven) Mechanismen sind folgende: während eines septischen Schocks kommt es zu einem Flüssigkeitsverlust durch endotheliale (vaskuläre) Hyperpermeabilität und Leakage, bis hin zur Gewebsschäden und Multi-Organ-Versagen. Es wurde gezeigt, dass ADM die endotheliale Hyperpermeabilität durch eine cAMP-abhängige Relaxation des Endothels reduziert und stabilisiert und somit den Flüssigkeitsverlust reduziert.^{42,43} Zusätzlich wird dem ADM noch eine positiv chronotrope und inotrope Wirkung auf das Herz zugeschrieben. Es erhöht das Herzzeitvolumen und bewirkt dadurch eine Verbesserung des Kreislaufs und der Organperfusion.⁴ Durch diese Mechanismen kann ADM einen so genannten „hypodynamen Kreislaufzustand“ mit arterieller Hypotension und stark erniedrigten Herzzeitvolumen durchbrechen und auch einen hyperdynamen Zustand aufrechterhalten.⁴⁴

Deletäre Effekte

ADM spielt eine wichtige Rolle in der körpereigenen Abwehr während eines Schockgeschehens.^{4,41,45} Wenn jedoch die hypodynam Phase des septischen Schocks erreicht ist und alle körpereigenen Abwehrmechanismen und therapeutischen Eingriffe versagen, dann wirkt ADM nicht mehr protektiv, sondern deletär. Die daraus resultierende überschießende Produktion von ADM, die sich während des Fortschreitens des septischen Schocks entwickelt, führt zu einem zirkulatorischen Kollaps mit Verstärkung des Schockgeschehens und zu einer schnellen Verschlechterung des Allgemeinzustandes.⁴⁵⁻⁴⁷ Der Grund dieser überschießenden

Antwort wurde noch nicht geklärt und soll in zukünftigen Studien analysiert werden. Mögliche Ursachen der genetischen Hochregulation können einerseits von der Kreislaufinsuffizienz und/oder der Stimulation von bakteriellen Endotoxinen, von pro-inflammatorischen Zytokinen und/oder einer Akkumulation durch Nierenversagen stammen.⁴

1.2.5.1 Pathophysiologische Funktion von ADM auf die Atmungskette

Die Pathophysiologie der durch einer Sepsis-induzierten Adrenomedullin-Ausschüttung ist noch nicht ganz geklärt. Studien zeigen daß das ADM-Hormon die NO-Synthese in vaskulären endothelialen glatten Muskelzellen steigern kann.³¹ Der genaue molekulare Mechanismus ist nicht ganz geklärt. Man geht davon aus, dass die NO-Synthese durch cAMP, welches durch CTLR nach Andocken von ADM aktiviert wird, gesteigert wird. Das ist jedoch nur bei gleichzeitiger proinflammatorischer zytokiner Stimulation durch Interleukin-I, TNF α und/oder Lipopolysaccharide möglich. Diese stimulieren die ADM-Freisetzung.^{30,47} NO kann die mitochondriale Atmungskette inhibieren. Es konkurriert mit Sauerstoff um die Bindungsstelle der Cytochrom c-Oxidase. Bei hoher NO-Produktion, wie im Falle einer Sepsis, kann es zur irreversiblen Inhibition der Cytochrom c-Oxidase kommen und damit zu oxidativen Stress führen.¹³

In verschiedenen in vitro-Studien zeigte NO weitere inhibitorische Wirkungen. NO inhibiert die zwei wichtigen Enzyme des Komplex I (NADH-Ubichonon, Oxidoreduktase) und Komplex II (Succinat-Ubichinon, Oxidoreduktase) in der Elektronentransportkette. Die Inhibition kommt durch die Interaktion zwischen dem NO und den 8-Eisen-Schwefel-Zentren-Enzymen zustande. Es kommt zu einer eingeschränkten mitochondrialen Atmungskette und einem partiellen Uncoupling der oxidativen Phosphorylierung (siehe Abb. 4).^{48,49}

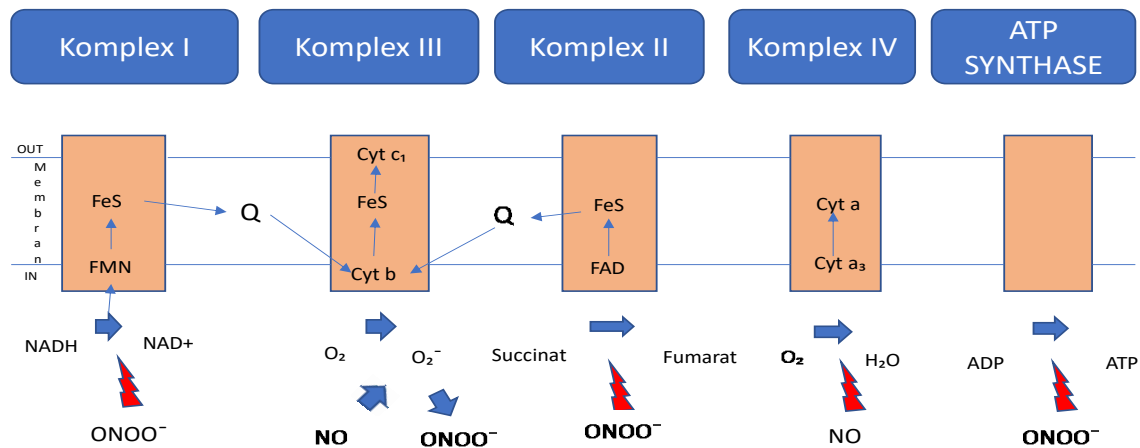


Abb. 1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette der Interaktionen von NO und ONOO^- auf die fünf Komplexe. Der Elektronenfluss ist durch die blauen Pfeile dargestellt. Die roten Donnerkeile repräsentieren die Inhibition der Atmungskette (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

IN: innere Mitochondrienmembran, **OUT:** äußere Mitochondrienmembran, **FeS:** Eisen-Schwefel-Zentrum, **FMN:** Flavinmononukleotid, **NADH:** Nicotinamidadenindinukleotid, **NAD⁺:** reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid, **ONOO^- :** Peroxinitrit, **NO:** Stickstoffmonoxid, **Q:** Ubichinon, **Cyt c:** Cytochrom c, **Cyt b:** Cytochrom b, **FAD:** Flavin-Adenin-Dinukleotid, **O₂:** Sauerstoff, **O₂⁻:** Superoxid, **Cyt a:** Cytochrom a, **H₂O:** Wasser, **ADP:** Adenosindiphosphat, **ATP:** Adenosintriphosphat

Durch die Inhibition der Atmungskette arbeiten die Komplexe schlecht. Elektronen leaken und reagieren mit molekularem Sauerstoff, um O_2^- zu formen. Das O_2^- Superoxid bindet schnell an NO und es entsteht Peroxinitrit; ONOO^- . Dieses sehr starke Oxidantium kann Proteine denaturieren, DNA-Stränge und Membrane schädigen sowie die Atmungskette irreversibel blockieren.^{8,9}

1.3 Zielsetzung/Hypothese

Intention dieser Studie ist, die mitochondriale Funktion der Hepatozyten anhand des Sauerstoffverbrauchs während einer Sepsis mit und ohne Gabe von ADM-Antikörpern zu beobachten. Ausschlaggebend für die Entscheidung, die Effekte von ADM-Antikörper auf die mitochondriale Atmung in der Leber zu untersuchen war eine vorausgegangene Studie die am gleichen CLP-Modell durchgeführt worden war.⁵⁰ Diese hatte nämlich gezeigt, dass die mitochondriale Atmungsaktivität in der Leber nach einer CLP-induzierten Sepsis deutlich reduziert ist. Dies entspricht den bereits weiter oben beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Sepsis und mitochondrialer Atmung, die letztlich zu einer zellulären Hypoxie und einer gestörten ATP-Produktion mit darauffolgendem Multiorganversagen führen.⁶ Es war also davon auszugehen, dass das hier verwendete CLP Modell grundsätzlich geeignet ist, um die

Effekte der Sepsis auf Mitochondrien zu analysieren. Da die Leber als zentrales Stoffwechselorgan eine besondere Rolle im Sepsisgeschehen einnimmt, sollte auch in der hier vorliegenden Untersuchung speziell die Funktion der Lebermitochondrien im Mittelpunkt stehen.^{51,52}

In dieser Studie waren speziell die spezifischen Effekte von ADM bzw. des ADM-Antikörpers von besonderem Interesse. Wie bereits ausgeführt, trägt die erhöhte Freisetzung von ADM während einer Sepsis vermutlich zu einer gesteigerten NO-Synthese sowie zu einer Verstärkung der zellulären Hypoxie bei. NO wirkt inhibierend auf die Atmungskettenfunktion. Dadurch wird nicht nur die Atmung beeinträchtigt, sondern es können zusätzlich Sauerstoffradikale gebildet werden, die wiederum toxisch auf die Mitochondrien wirken. Deshalb sollte hier die Funktion der respiratorischen Komplexe der Atmungskette durch die Erfassung der mitochondrialen Atmungsaktivität mit und ohne Therapie mit ADM-Antikörper quantifiziert werden.

Fragestellungen dieser Studie sind:

3. Wie wirkt sich die Sepsis mit einer erhöhten ADM-Freisetzung auf die mitochondriale Atmung aus?
4. Kann durch Gabe von ADM-AK eine Verbesserung der mitochondrialen Atmung im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht werden?
5. Gibt es einen Unterschied zwischen der frühen Therapie und der späten Therapie mit ADM-AK?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsplan

Adrenomedullin-Antikörper zur Behandlung von Sepsis-induzierten Mäusen (Tierversuchsgenehmigung durch Regierungspräsidium Tübingen, Registrierungsnummer 1055).

2.1.1 Biometrie

Die Mäuse der Versuche waren 8 bis 12 Wochen alt und wogen zwischen 22 und 30 g. Es wurden C57Bl/6-Mäuse verwendet, da diese genetisch modifizierten Mäuse für die Erforschung humaner Erkrankungen geeignet sind. Sie kommen aus kongenen Stämmen und sind sehr leicht zu züchten.⁵³ Die Mäuse werden durch ein Randomisierungsverfahren auf 3 Gruppen verteilt. Die Gruppen ergaben eine Gesamtzahl von 24 Mäusen.

1. Septische Mäuse, Vehikel (n=9)
2. Septische Mäuse, ADM-Antikörper, "frühe Therapie" (n=10)
3. Septische Mäuse, ADM-Antikörper, "späte Therapie" (n=5)

2.1.2 Tiermodell Maus

Mäuse haben im Vergleich zum Menschen einen etwa 10 % höheren Metabolismus. Um das septische Krankheitsbild in vollem Ausmaß zu erlangen und damit eine Kreislaufinsuffizienz zu erzielen, führte man das Tierexperiment in vivo durch. Das Tiermodell sollte in der Klinik der Standardbehandlung entsprechen.

2.2 OROBOROS® Oxygraph-2k

Die Messungen wurden mit dem Oxygraphen (OROBOROS® INSTRUMENTS GmbH (Corp.) high-resolution respirometry; Innsbruck, Österreich) durchgeführt. Der OROBOROS-Oxygraph ist inzwischen das Standardgerät hochauflösender mitochondrialer Messungen; vor allem bei niedriger Sauerstoffkonzentration, niedriger respiratorischer Aktivität sowie schneller kinetischer Überleitung. Diese finden sich vornehmlich in folgenden pathologischen Zuständen:

- Apoptosis, mitochondriale und metabolische Erkrankungen, Alterung, Ischämie
- genetische mitochondriale Defekte

- Zellkulturen mit wenig Zellen
- Mutanten mit verminderter respiratorischer Kapazität
- Antioxidant-Kapazität
- intrazelluläre reduzierte Sauerstoffkonzentration

Das Besondere des Oxygraphen ist es, die Messung des Sauerstoffverbrauchs (O_2 -Flux) der biologischen Gewebeproben während der Inkubationszeit registrieren zu können. Das ist das Prinzip der High Resolution-Respirometrie. Das Gerät hat ein großes Temperatur-reguliertes Kupfergehäuse, an dem alle anderen Bestandteile fixiert sind. Die Temperatur wird zwischen der Peltier-Wärmeableitungsplatte und dem Kupferblock reguliert (siehe Abb. 6).⁵⁴

Es gibt zwei identische Glaskammern. Diese haben ein Volumen von 1,5 - 6 ml. In unseren Versuchen haben wir diese auf 2 ml eingestellt. Die Kammern können mit einem Titan-Stopfen und einem Viton O-Ring luftdicht verschlossen werden. Der Stopfen enthält eine Titan-Kanüle für die Hamilton-Injektionsspritzen, die zur späteren Gabe der Substrate verwendet wird.⁵⁴



Abb. 2: Bild des OROBOROS® Oxygraph-2k (Universitätsklinikum Ulm, 2015), genehmigt von Oroboros Instruments GmbH

In jeder Kammer findet sich eine Clark-Elektrode. Diese misst kontinuierlich über den polarographischen Sauerstoffsensor die Sauerstoffaktivität. Sie besteht aus einer Gold-Kathode und einer Silber-Silberchlorid-Anode. Daneben befindet sich eine Elektrolyt-Lösung aus Kaliumchlorid, eine O_2 -durchlässige Membran aus Teflon und PEEK-Rührstäbe mit Sensoren. Sauerstoff durchwandert die Membran und wird an der Kathode mit Wasser zu Hydroxid-Ionen reduziert. Die Sauerstoffsensoren werden an 0,8 V angeschlossen. Nun kann das

Signal an die DatLab4®-Software weitergeleitet werden.⁵⁵ Die DatLab4®-Software zeichnet zwei Kurven auf: die Sauerstoffkonzentration sowie den aktuellen Sauerstoffverbrauch, welcher aus der Sauerstoffkonzentration errechnet wird, (siehe Abb. 8). Die Elektroden sind in einem Winkel von etwa 40 ° in die Kammer eingebracht und ermöglichen dadurch die optimale Position der Kathode, welche sonst die PEEK-Rührstäbe (Polyetheretherketon), die zwischen 100 und 900 Umdrehungen pro Minute drehen, stören könnte. Dadurch würde das Signal falsch weitergeleitet und es würden Artefakte dargestellt.⁵⁴

Ein Problem, das sich bei den älteren Modellen der Oxygraphen öfters zeigt, ist die Sauerstoff-Rückdiffusion. Glas und Titan sind jedoch geeignete Materialien, um genaue Messungen ohne Artefakte zu erhalten. Der PEEK-Rührstab zeigt im Vergleich zum Teflon-Rührstab eine 10-fach geringere Sauerstofflöslichkeit aufgrund der schnelleren Sauerstoff-Rückdiffusion während des Absinkens von Sauerstoff in der geschlossenen Kammer.

2.3 Weitere verwendete Materialien

Es wurden den Mäusen jeweils 2 µg/g KG ADM-Antikörper HAM1101 (human adrenomedullin modulating antibody 1101) injiziert, einmal zum Zeitpunkt der CLP und bei der anderen Gruppe 16 Stunden nach der CLP.⁵⁵ Der Vehikel-Gruppe wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) anstelle des Antikörpers verabreicht. Der Antikörper bindet sich am N-Terminus des ADM-Hormons an. Das mitochondriale Respirationsmedium 05 (MIR05) wird für die respiratorischen Messungen als Inkubationsmedium der Gewebeproben verwendet. Die Sauerstofflöslichkeit beträgt 0,92 bei 37 °C und ist wichtig, um den partiellen Sauerstoffdruck in Sauerstoffkonzentration korrekt konvertieren zu können. Die Osmolarität liegt bei 330 mOsm; der pH-Wert bei 7,0. Die Bestandteile des Mediums sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tab. 2: Bestandteile des mitochondrialen Respirationsmediums 05 (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

MiRO5: mitochondriales Respirationsmedium, **μM :** Mikromol, **mM:** Millimol, **l:** Liter, **g:** Gramm, **Ca^{2+} :** Calciumion, **EGTA:** Ethylenglykol-Tetraessigsäure, **MgCl_2 :** Magnesiumchlorid, **HEPES:** 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, **H_2O :** Wasser, **Na^+ :** Natriumion, **BSA:** bovines Serumalbumin, **KH_2PO_4 :** Monokaliumphosphat; **Pi:** anorganisches Phosphat

Substanz	Konzentration
EGTA	0,5 mM
K-Lactobionat	60 mM
Sucrose	100 mM
HEPES	20 mM
Taurin	20 mM
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	3 mM
KH_2PO_4	10 mM
BSA	1 g/l
Freies Ca^{2+}	0,0 mM
Na^+	0,0 μM

2.4 Versuchsdurchführung

2.4.1 Operative Vorbereitung

2.4.1.1 CLP

Zuerst wurde das Versuchstier gewogen. Zur Narkoseinduktion wurde die Maus kurz in eine Kammer mit 1 ml Sevofluran eingesetzt. Die Spontanatmung der Maus wurde über eine „Sulla-Maske“ bei Flow 1-2 l/min, FiO_2 0,5 und Sevofluran 2,5-4,5 % unterstützt. Nach Messung der rektalen Körperkerntemperatur wurde die Temperatur mit Hilfe einer Wärmematte und -lampe zwischen 37 - 38 °C beibehalten. Anschließend wurden der Maus subkutan 1 $\mu\text{g/g}$ KG Buprenorphin und 1 Milliliter (ml) Ringer-Laktat-Lösung mit 4 $\mu\text{g/g}$ KG gelöster Glukose in den Nacken injiziert. Der Bauch wurde rasiert und desinfiziert.

Es folgte eine mediane Laparotomie über ca. 1 cm mit basisnaher Ligatur des Zökums mit einer 4.0 Seidennaht und einmaliger Punktion mit einer 18 G-Nadel. Es wurde etwas Stuhl

ausgedrückt und der Darm wieder in die Bauchhöhle verlegt. Die Bauchdecke wurde in zwei Schritten verschlossen; das Peritoneum mit einer innen fortlaufenden Naht mittels eines 8-0 Ethilon-Fadens und die Oberhaut per Einzelknopfnah mit einem 6-0 Ethilon-Faden. Nun wurde die erste Injektion mit 100 µl/25g des ADM-Antikörpers in die Penisvene der Maus injiziert. Dieses Vorgehen repräsentiert die frühe Therapie unserer Studie. Die Maus wurde in den aufgewärmten Käfig zurückgelegt. Postoperativ wurde Wasser und Futter ad libitum bereitgestellt.

2.4.1.2 8 Stunden post CLP

8 Stunden nach Sepsisinduktion erfolgte eine erneute subkutane Injektion in den Rücken der Maus mit 1 µg/g KG Buprenorphin und 1 ml Ringer-Laktat-Lösung, mit 4 µg/g KG-gelöster Glukose, plus Ceftriaxon 30 µg/g und Clindamycin 30 µg/g.

2.4.2 Operation

Diese Phase beginnt nach 16-stündigem Sepsis-induziertem Zustand der Maus. Die Maus wurde wieder gewogen. Dann wurde die Maus zur Narkoseinduktion kurz in die Kammer mit 1 ml Sevofluran eingesetzt. Die Spontanatmung der Maus wurde über die „Sulla-Maske“ bei Flow 1-2 l/min, FiO₂ 0,5 und Sevofluran 2,5-4,5 % unterstützt. Nach wiederholter Messung der rektalen Körperkerntemperatur wurde die Temperatur durch eine Wärmematte und -lampe zwischen 37 - 38 °C beibehalten. Anschließend folgte die Narkose mittels intraperitonealer Injektion von 120 µg/g Körpergewicht (KG) Ketamin, 1,25 µg/g KG Midazolam und 0,25 µg/g KG Fentanyl mit einem Gesamtvolumen von 200 bis 250 µl.

Es folgte eine Tracheostomie, danach wurde die lungenprotektive Beatmung (Respirator Flexivent®, Emka Technologies) begonnen. Nach einem Recruitment-Manöver wurden die respiratorischen Parameter folgendermaßen eingestellt: FiO₂ 0,5; PEEP 5 mmH₂O; I:E 1:2; VT 6-8 µl/g und AF 160/min. Dann wurde ein ZVK in die Vena jugularis externa dextra bis in den rechten Vorhof vorgeschoben. Es wurden 30 µg/g KG x h Ketamin und 0,3 µg/g KG x h Fentanyl per Infusion während des gesamten Versuchs eingestellt. Ferner wurden noch 80 µl/g KG x h einer kolloidalen Volumenersatzlösung infundiert. Bei Bedarf erfolgte eine Vasopressorgabe (Noradrenalin), um den Blutdruck über 65 mmHg zu halten.

Jetzt wurde die zweite Bolusinjektion des ADM-Antikörpers mit 100 µl/25g KG in den Venenkatheter injiziert. Dieses Prozedere repräsentiert die späte Therapie unserer Studie. Ebenso wurde eine intravenöse Antibiose mit Ceftriaxon 30 µg/g und Clindamycin 30 µg/g

verabreicht. Zur kontinuierlichen Überwachung des Blutdruckes und der Herzfrequenz wurde auch die rechtsseitige A. Carotis comunis kanüliert. Durch intravenöse Gabe von Glukose konnte eine Normoglycemie erhalten bleiben.

Es wurde eine erneute Laparotomie durchgeführt und ein perivaskulärer Flusskopf um die A. mesenterica superior und V. portae platziert, um die Blutflussrate per Ultraschall zu messen. Ebenso wurde die mikrozirkulatorische Durchblutungsrate und die intrakapilläre Hämoglobinsauerstoffsättigung der Leber durch eine Laser-Doppler-Blutflussmessung und Remissionsspektroskopie-Technik determiniert. Das Anlegen eines Blasenkatheters durch Punktion war zur Auswertung der Harnwerte nötig.

Es wurden innerhalb eines Beobachtungszeitraums von 5 Stunden nach der OP stündliche Blutentnahmen aus der A. carotis comunis zur Bestimmung des Säure-Basen-Haushaltes und der Gaspartialdrücke mittels Blutgasanalysator entnommen. Nach der letzten Blutentnahme (5.) starb das Versuchstier und der Thorax wurde eröffnet. Nun wurde die Beatmung abgestellt und Gewebeproben der Leber wurden gewonnen. Alle Messzeitpunkte der Blutentnahmen sowie Flüssigkeitsbilanzen und die Urinproduktion wurden dokumentiert. Alle operativen Eingriffe erfolgten steril.

Dieser Versuchsplan wurde im Institut für Anästhesiologie, Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung der Universität Ulm entwickelt. In diesem Versuchsmodell wurden weitere Organe entnommen. Diese Arbeit befasst sich ausschließlich mit der mitochondrialen Atmung der Leber – die übrigen Gewebe fanden in anderen Studien Verwendung.

2.4.3 Entnahme der Gewebeprobe

Die Leberbiopsie wurde in Stücke geteilt und davon zwischen 10 - 15 mg in ein mit 2 ml MiR05 befülltes Behältnis gefüllt. Anschließend wurden diese Behälter in einer eisgefüllten Schachtel zur mechanischen Homogenisierung transportiert. Es wurde dann in Abhängigkeit des Gewichtes der Leberbiopsie die richtige Menge mit dem Medium MiR05 ausgerechnet, um davon dann insgesamt 2 ml der Suspension pro Kammer des Oxygraphen hinzuzugeben.

2.5 Respiratorische Messung

2.5.1 Vorbereitung des Oxygraph-2k

Die beiden Kammern des Oxygraphen wurden zunächst mit 70 %-igem Ethanol und dreimal mit destilliertem H₂O gespült. Es wurden beide Kammern mit je 2,3 ml MiR05 befüllt. Die Temperatur wurde auf 37 °C eingestellt. Beide Kammern wurden mit geöffneten Stopfen 30 - 45 min mittels eines Magnetrührers bei 750 Umdrehungen/Minute durchgemischt. Diese Äquilibration diente der Anpassung des O₂-Partialdruckes des äußeren Milieus an den O₂-Partialdruck des inneren Milieus (Medium). Nun konnte mit der Kalibrierung des Geräts begonnen werden. Sobald die Sauerstoffverbrauchskurve und die Peltier-Anzeige (Temperatur) konstant und stabil waren, wurde eine bestimmte Messlänge für die Kalibrierung markiert, gespeichert und für die folgenden Messungen verwendet.

Es wurden alle Spritzen und Substrate in der richtigen Reihenfolge vorbereitet und auf den Tisch gelegt. Nun wurde die Suspension des Mediums und des permeabilisierten Lebergewebes in beide Kammern gefüllt und Sauerstoff mit einer Spritze hinzugefügt. Bei Erreichen der O₂-Konzentration von ca. 300 nmol/ml, wurden die Kammern mit den Titan-Stopfen verschlossen, so dass keine verbleibenden Luftbläschen in den Kammern sichtbar waren.

2.5.2 Protokoll der respiratorischen Messungen

Die Substrate wurden in einer bestimmten Reihenfolge und in einer bestimmten Dosierung in die Kammern injiziert. Es musste nach jeder Injektion immer ein Plateau erreicht werden, bevor die nächsten Substrate oder Inhibitoren injiziert wurden. Es wurde folgende Substrate und Inhibitoren laut Tabelle und Abb. 7 injiziert:

Tab. 3: Protokoll der Substrate und Inhibitoren (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

M: Mol; **µl:** Mikroliter; **mM:** Millimol; **µMol:** Mikromol; **ADP:** Adenosindiphosphat; **FCCP:** Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon

Nr.	Substrat/Inhibitor	Menge (µl)	Konzentration
1.	Pyruvat	10	10 mM
2.	Cytochrom c	5	10 µM
3.	Malat + Glutamat	12,5 + 10	5 mM + 10 mM
4.	ADP	20	5 mM
5.	Octanoyl-Carnitin	10	0,5 mM
6.	Succinat	20	10 mM
7.	Oligomycin	2	5 µM
8.	FCCP	0,5	0,25 µM
9.	Rotenon	5	0,5 µM
10.	Antimycin A	2	5 µM

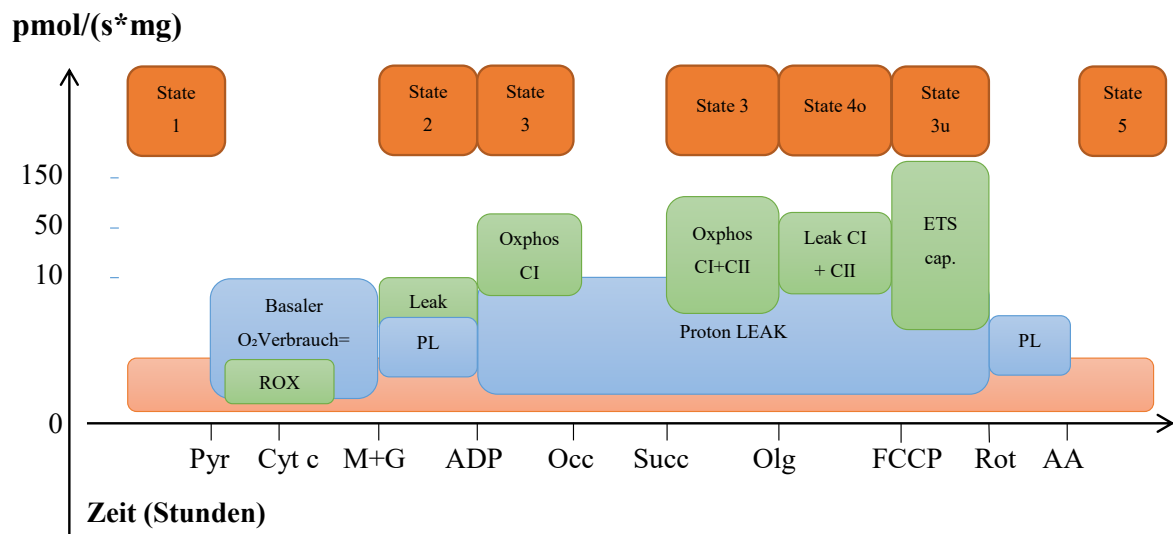


Abb. 3: Darstellung der Atmungskette nach dem Protokoll. (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

pmol: Pikomol, **mg:** Milligramm, **s:** Sekunde, **Cyt c:** Cytochrom C, **Pyr:** Pyruvat, **G:** Glutamat, **M:** Malat, **ATP:** Adenosintriphosphat, **Occ:** Octanoyl-Carnitin, **ADP:** Adenosindiphosphat, **Olg:** Oligomycin, **Succ:** Succinat, **FCCP:** Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon, **AA:** Antimycin A, **Rot:** Rotenon, **ROX:** residual oxygen consumption, **PL:** Proton Leak, **Leak CI:** Leak Komplex I, **Oxphos CI:** oxidative Phosphorylation Komplex I, **Oxphos CI + CII:** oxidative Phosphorylation Komplex I + II, **Leak CI + II:** Leak Komplex I + II, **ETS cap.:** electron transfer system capacity

In dieser Grafik ist die chronologische Substrat- und Inhibitoren-Gabe (untere Skala) sowie der Sauerstoffverbrauch (linke Skala) der respiratorischen Messung am Oroboros-Oxygraph dargestellt. Die dargestellte hellrote Box zeigt die non-mitochondriale Atmung, d.h. die Atmung, die durch andere oxidative Nebenreaktionen entsteht. Die hellblaue Box spiegelt den basalen Sauerstoffverbrauch wider, der sich aus der ATP-gekoppelten Atmung und der Protonen-Leak-Atmung zusammensetzt. Die grünen und orangenen Boxen repräsentieren die variablen Atmungszustände (Respiratory States) bzw. die Klassifikation der Atmungszustände nach Charles und Williams.

2.5.2.1 Beginn der Messung

Dieses Protokoll beginnt mit State 1 nach Chance und Williams (1956). Dieses besagt, dass die Mitochondrien des permeabilisierten Gewebes noch eigene (endogene) Substrate ohne Adenylate und anorganische Phosphate aus dem Nährmedium MiR05 enthalten. Um die fortbestehende Funktion der mitochondrialen Atmungskette in vitro zu gewährleisten, wurden exogene Substrate hinzugefügt. Um den maximalen Effekt der Substrate zu erreichen, wurden die Substanzen im Überschuss verabreicht.

Chance und Williams haben in der unteren Tabelle eine Klassifizierung der verschiedenen Atmungszustände (Respiratory Steady States) erstellt, um die Funktion der Mitochondrien besser einteilen zu können.

Tab. 4: Klassifikation der Atmungszustände (Respiratory Steady States) nach Charles und Williams (Universitätsklinikum Ulm, 2015)
ATP: Adenosintriphosphat; **ADP:** Adenosindiphosphat; **ETS:** Electron Transport System; **u:** uncoupling; **ROX:** residual oxygen consumption; **omy:** Oligomycin; **OXPHOS:** oxidative Phosphorylierung

State	Definition	Coupling State
1	Isoliertes Mitochondrium und anorganisches Phosphat	
2	+ Reduzierte Substrate (Malat, Glutamat, Succinat), niedrige Atmungsrate	LEAK Komplex I
3	+ ADP, schnelle Atmungsrate, maximal gekoppelte Atmungsaktivität	OXPHOS Komplex I+II
4	Gesamtes ADP in ATP umgewandelt, niedrige Atmungsrate	LEAK Komplex I+II
5	Kein Sauerstoff mehr vorhanden, keine Atmung	ROX
4o	Hemmung der ATP-Synthase durch Oligomycin	LEAKomy
3u	Maximale Entkoppelung der Atmungskette	ETS capacity

2.5.2.2 LEAK-Atmung Komplex I

Durch die Zugabe der Substrate von Pyruvat, Malat und Glutamat werden die nötigen Reduktionsäquivalente, NAD^+ , durch den Krebszyklus gebildet. Diese werden für den Elektronenfluss der Atmungskette des Komplex I benötigt. Es ist nur geringes endogenes ADP vorhanden. Dies wird als State 2 nach Chance und Williams eingestuft. Es konnte dadurch die Leak-Atmung des Komplex I im Leak-State ohne Adenylate (L_N) und nach Oxidation der endogenen Substrate gemessen werden.

Unter physiologischen Bedingungen kann man in der Messung am Oxygraphen einen leichten Anstieg des Sauerstoffverbrauchs nach Gabe der Substrate sehen, welcher dann geringfügig abfällt, ein Plateau erreicht und den Verbrauch vom restlichen endogenen ADP widerspiegelt. Dieses Plateau repräsentiert die LEAK-Atmung. Diese zeigt, dass der aufgebaute Protonengradient durch ein minimales Protonen-Leak über andere Kanäle abgebaut wird, deswegen die Atmungsaktivität erhalten bleibt und nicht auf null abfällt.

Eine erhöhte Atmungsaktivität im Leak-State könnte auf einen Schaden der Mitochondrienmembran hindeuten, da noch mehr Protonen leaken als unter physiologischen Bedingungen.

2.5.2.3 Cytochrom c

Um die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran zu messen, wurde Cytochrom c in die Kammern hinzugefügt. Ein leichter Anstieg des Sauerstoffverbrauches nach Zugabe des Substrats wäre normal. Bei stark erhöhtem Sauerstoffverbrauch würde das auf einen Schaden der äußeren Mitochondrienmembran hindeuten. Durch Freisetzung des Cytochrom c in die Matrix wird die Atmungsaktivität stark reduziert, da der Elektronentransfer von Cytochrom c auf den Sauerstoff ausfällt und die oxidative Phosphorylierung blockiert. Die externe Zugabe von Cytochrom c kompensiert den Defekt und zeigt somit eine eventuelle Beschädigung der äußeren Membran an.

2.5.2.4 OXPHOS-Kapazität Komplex I

Die Messung der OXPHOS-Kapazität von Komplex I wird durch Zugabe von ADP durchgeführt. ADP ist das zentrale Substrat von ANT (adenine nucleotide translocator) und der ATP-Synthase. Durch den aufgebauten Protonengradienten im Intermembranraum (der durch die vorangegangenen Komplexe entstanden ist) und die Synthese von ADP und Phosphat kann ATP produziert werden. Durch den Abbau des Protonengradienten kann die Atmungskette wieder in Gang gebracht werden. Der Sauerstoffverbrauch steigt.

2.5.2.5 OXPHOS-Kapazität Komplex I und II

In der folgenden Grafik wird nach Zugabe von Octanoyl-Carnitin und Succinat die maximale oxidative Phosphorylierung dargestellt. Octanoyl-Carnitin ist ein mittelkettiges Triglycerid und kovalent an Carnitin gebunden. Es wird zur Ankurbelung der Fettsäureoxidation injiziert, wobei Elektronen an Ubichinon geliefert werden. Succinat entsteht im Krebszyklus und ist ein Substrat von Komplex II. Durch das Enzym Succinat-Dehydrogenase wird die Oxidation von Succinat zu Fumarat katalysiert und es können Elektronen an Komplex II geliefert werden. Es sind jetzt ADP sowie alle Substrate von Komplex I und II vorhanden. Durch die ATP-Synthase wird ADP zu ATP katalysiert und der Kopplungszustand der Atmungskette erreicht. Dieser wird als State 3 bezeichnet.

In der graphischen Darstellung des Oxgraphen der DatLab4®-Software wird ein plötzlich steil ansteigender Sauerstoffverbrauch mit gleichzeitiger Abnahme der Sauerstoffkonzentration sichtbar (siehe Abb. 8).

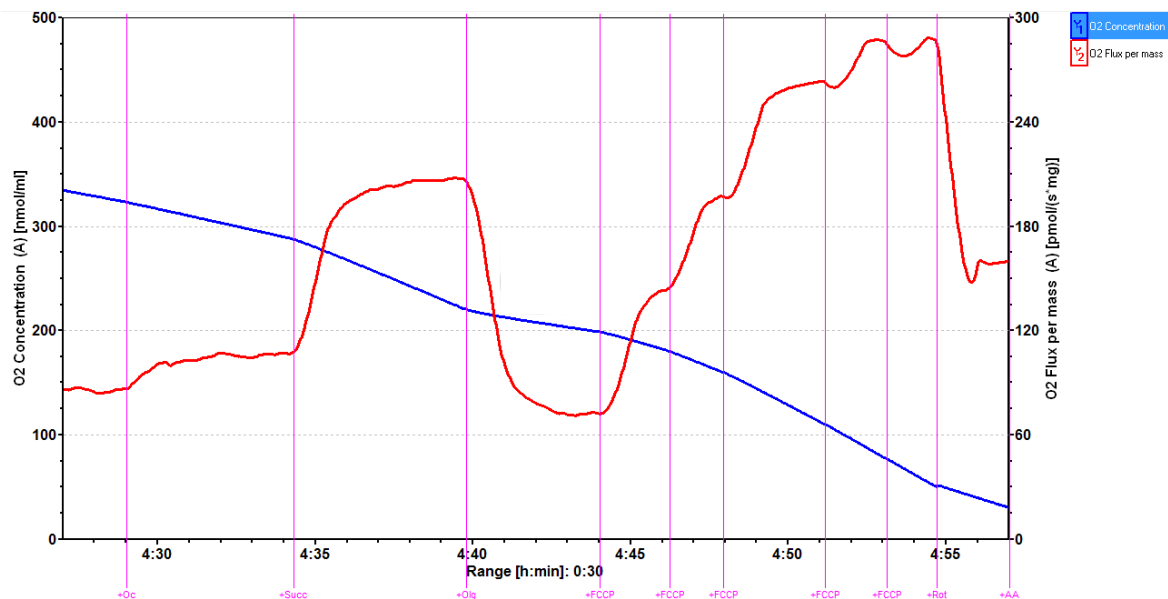


Abb. 4: Graphische Darstellung einer respiratorischen Messung durch die DatLab4®-Software während des Versuchs. Sauerstoffkonzentration (blaue Kurve) und Sauerstoffverbrauch (rote Kurve) nach Zugabe der Inhibitoren und Substrate (pinke Markierung). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

O₂: Sauerstoff, **ml**: Milliliter, **nmol**: Nanomol, **pmol**: Pikomol, **mg**: Milligramm, **s**: Sekunde, **min**: Minute, **h**: Stunde, **M**: Malat, **Oc**: Octanoylcarnitin, **Succ**: Succinat, **Olg**: Oligomycin, **FCCP**: Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon, **Rot**: Rotenon, **AA**: Antimycin A

2.5.2.6 LEAK-Atmung Komplex I und II

Der maximale LEAK-State wird durch Gabe von Oligomycin erreicht. Oligomycin ist ein Hemmer des Protonenkanals der ATP-Synthase mit Bindung am F_0 -Teil. Dadurch wird die oxidative Phosphorylierung blockiert. Die Atmungskette und der Elektronenfluss werden gebremst, da sich der Protonengradient nun kaum abbauen kann und die meisten Protonen im Intermembranraum bleiben.

Es gibt allerdings einen Kompensationsmechanismus, den sogenannten „Protonen-Leak“, welcher dazu führt, dass der Protonengradient viel langsamer abgebaut wird. Hier werden Protonen, unabhängig von der ATP-Synthase, über andere Wege vom Intermembranraum in die Matrix geschleust. Durch den Protonen-Leak wird etwa 20-30 % des gesamten Sauerstoffverbrauchs vor allem in den Hepatozyten von Mäusen verbraucht.⁵⁶ Der Protonen-Leak spiegelt damit die LEAK-Atmung wider und wird als State 4o eingestuft. Im Diagramm kann man ein starkes Absinken des Sauerstoffverbrauchs sehen.

2.5.2.7 ETS-Kapazität

Die ETS-Kapazität kann durch Zugabe des Entkopplers FCCP (Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine) gemessen werden. Entkoppler machen in der Membran einen Kanal für Protonen neben Komplex V frei. Sie besitzen eine sogenannte „protonophore“ Wirkung. Die Protonen, die in den Intermembranraum gepumpt wurden, werden nun mithilfe von Protein-Kanälen und Carriern wieder in die Matrix zurück transportiert. Dadurch bricht der aufgebaute Protonengradient zusammen und es kann keine Kopplung der Atmungskette und damit auch keine ATP-Produktion stattfinden. Die Atmungskette läuft sozusagen im Leerlauf und wird als State 3u eingeteilt. Der Elektronenfluss lief maximal und man konnte damit den maximalen Sauerstoffverbrauch im entkoppelten Zustand nach mehrfacher Auftitrierung von je 0,5 μ l FCCP messen.

2.5.2.8 Ende der Messung

Am Ende der Messreihe wurde noch Rotenon und Antimycin A hinzugefügt. Dies führte zu einem totalen Stillstand der mitochondrialen Atmungsaktivität (siehe Abb. 1). Hier kann man ebenso den residualen Sauerstoffverbrauch (ROX) messen.

2.6 Statistische Methoden

Die Parameter zum Sauerstoffverbrauch unter Gabe der verschiedenen Substrate wurden als quantitative Größen anhand von Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie den Quartilen inkl. Median beschreibend dargestellt und mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Konnte eine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung nachgewiesen werden, wurden die drei Gruppen mittels nicht-parametrischem Kruskal-Wallis-Test verglichen. Im Falle eines signifikanten Globaleffekts wurden anschließend Post-Hoc-Paarvergleiche mit dem U-Test durchgeführt. Zeigten sich keine signifikanten Abweichungen von einer Normalverteilung, so wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse verwendet, um die drei Gruppen miteinander zu vergleichen.

Es wurde zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5 % zugrunde gelegt. Eine Alpha-Adjustierung für multiples Testen fand nicht statt; die Ergebnisse haben demnach explorativen und beschreibenden Charakter. Für die Durchführung der statistischen Berechnungen wurde IBM SPSS Statistics 23 (SPSS Inc. an IBM Company, Chicago, IL) eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Messprotokoll

3.1.1 Basaler Sauerstoffverbrauch

Es sind keine signifikanten Unterschiede der basalen Atmung zwischen den drei Gruppen festzustellen.

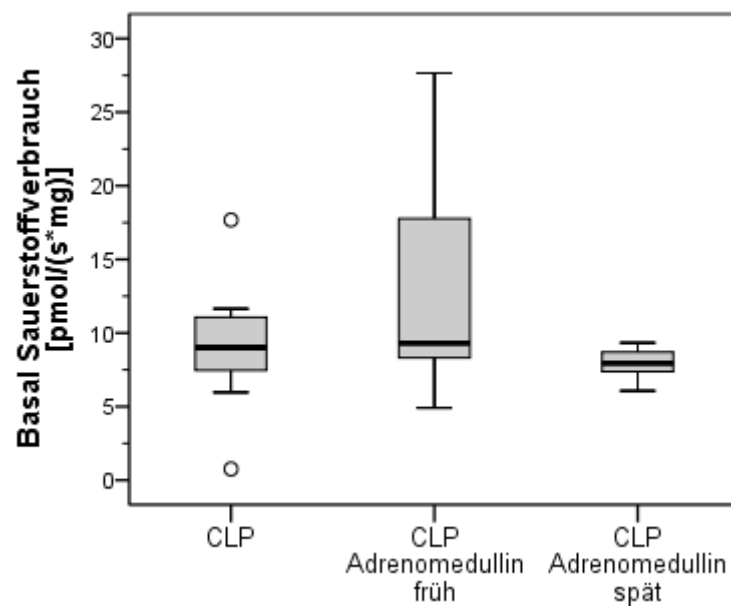


Abb. 5: Basaler Sauerstoffverbrauch der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie-Mäuse in Lebermitochondrien. Die Daten sind in einem sog. Boxplot dargestellt mit dem Medianwert (Querbalken in der Box), 1. Quartile (unterer Querbalken), 3. Quartile (oberer Querbalken), Maximum (oberer Whisker) und Minimum (unterer Whisker). (Universitätsuniklinikum Ulm, 2015)

FCCP: Carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, **mg:** Milligramm, **pmol:** Pikomol, **s:** Sekunde **CLP:** cecal ligation and puncture, **ADM:** Adrenomedullin-Antikörper

3.1.2 Cytochrom c

Cytochrom c transferiert Elektronen von Komplex III zu Komplex IV. Durch den Transfer der Elektronen wird Sauerstoff verbraucht. Durch Beschädigung der äußeren Mitochondrienmembran kann Cytochrom c in das Zytosol austreten, damit die Apoptose der Zelle auslösen und der Sauerstoffverbrauch sinkt. Es sind keine signifikanten Unterschiede der drei Gruppen festzustellen.

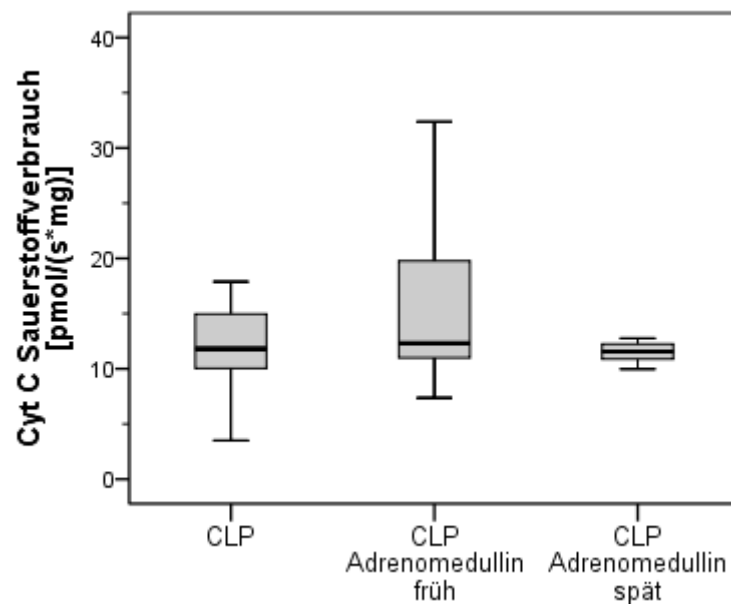


Abb. 6: Sauerstoffverbrauch nach Cytochrom c Gabe der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie- Mäuse in Lebermitochondrien. Die Daten sind in einem sog. Boxplot dargestellt mit dem Medianwert (Querbalken in der Box), 1. Quartile (unterer Querbalken), 3. Quartile (oberer Querbalken), Maximum (oberer Whisker) und Minimum (unterer Whisker). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

FCCP: Carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, **mg:** Milligramm, **pmol:** Pikomol, **s:** Sekunde **CLP:** cecal ligation and puncture, **ADM:** Adrenomedullin-Antikörper

3.1.3 Malat und Glutamat: LEAK Komplex I

Durch die Zugabe von Malat und Glutamat kann die Leak-Atmung von Komplex I gemessen werden. Es ist ein leichter Anstieg des Sauerstoffverbrauchs mit anschließendem Plateau zu erwarten. Bei einer erhöhten Atmungsaktivität im Leak-State könnte das auf einen Schaden der Mitochondrienmembran hindeuten. Es sind keine signifikanten Unterschiede der drei Gruppen festzustellen.

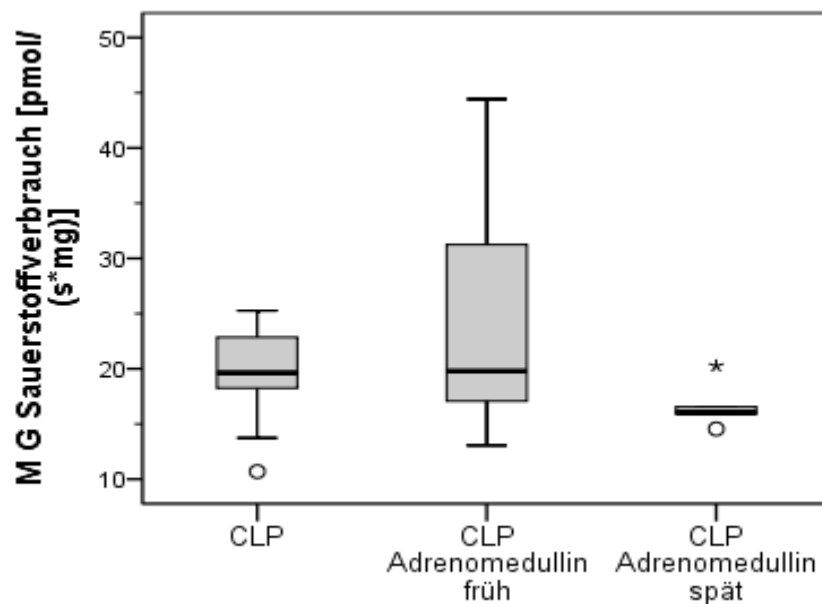


Abb. 7: Mitochondriale Atmung nach Malat und Glutamat Gabe der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie-Mäuse in Lebermitochondrien. Die Daten sind in einem sog. Boxplot dargestellt mit dem Medianwert (Querbalken in der Box), 1. Quartile (unterer Querbalken), 3. Quartile (oberer Querbalken), Maximum (oberer Whisker) und Minimum (unterer Whisker). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

FCCP: Carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, **mg**: Milligramm, **pmol**: Pikomol, **s**: Sekunde **CLP**: cecal ligation and puncture, **ADM**: Adrenomedullin-Antikörper

3.1.4 ADP: OXPHOS Komplex I

Hier wird die maximale oxidative Phosphorylierung von Komplex I dargestellt. Die nötigen Substrate des Komplex II (Succinat) fehlen hier noch und sind später hinzugefügt worden. Es sind keine signifikanten Unterschiede der drei Gruppen festzustellen.

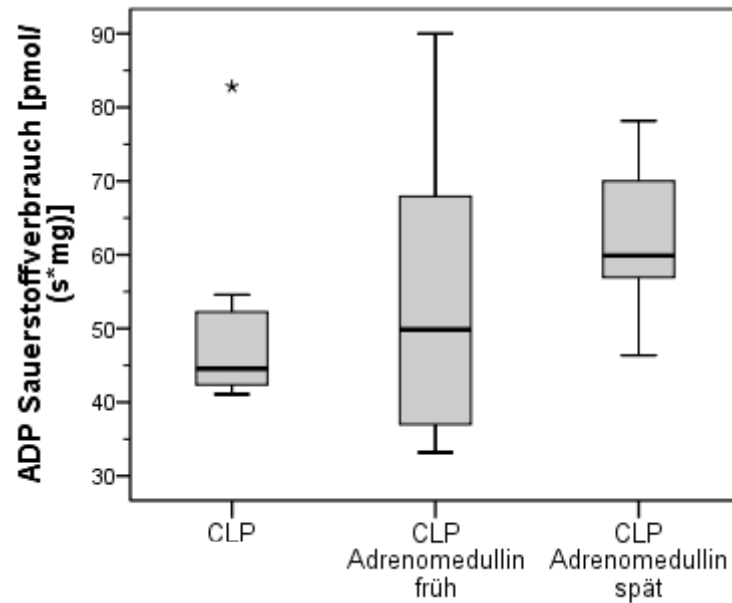


Abb. 8: Mitochondriale Atmung nach ADP Gabe der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie-Mäuse in Lebermitochondrien. Die Daten sind in einem sog. Boxplot dargestellt mit dem Medianwert (Querbalken in der Box), 1. Quartile (unterer Querbalken), 3. Quartile (oberer Querbalken), Maximum (oberer Whisker) und Minimum (unterer Whisker). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

FCCP: Carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, **mg**: Milligramm, **pmol**: Pikomol, **s**: Sekunde **CLP**: cecal ligation and puncture, **ADM**: Adrenomedullin-Antikörper

3.1.5 Succinat: OXPHOS Komplex I und II

Succinat entsteht im Citratzyklus und wird über die Succinat-Dehydrogenase zu Fumarat. Aus dieser Reaktion entsteht FADH_2 . Es erfolgt der Transport von zwei Elektronen über die innere Mitochondrienmembran, welche an Komplex II gekoppelt ist. So kann die maximale oxidative Phosphorylierung stattfinden, die durch das Vorhandensein aller nötigen Substrate von Komplex I (NADH), Komplex II (Succinat) und ADP gemessen wird. Der Sauerstoffverbrauch steigt. Es sind keine signifikanten Unterschiede der drei Gruppen festzustellen.

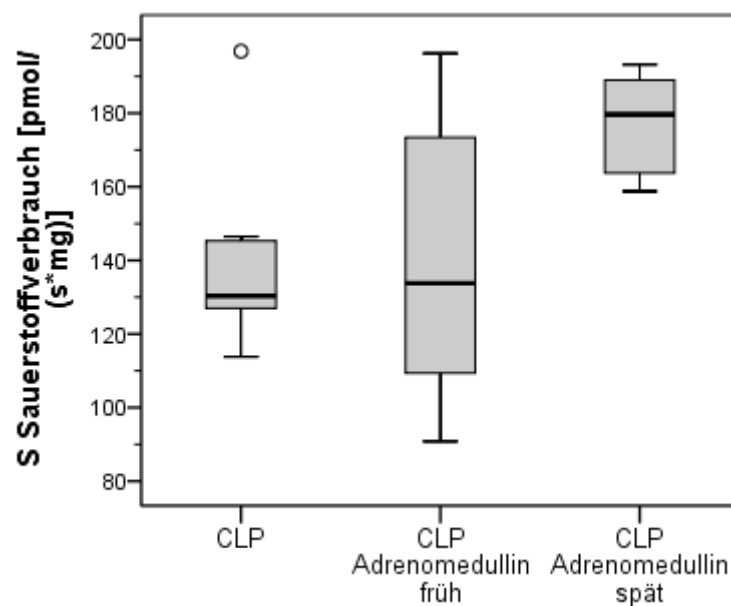


Abb. 9: Mitochondriale Atmung nach Succinat Gabe der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie-Mäuse in Lebermitochondrien. Die Daten sind in einem sog. Boxplot dargestellt mit dem Medianwert (Querbalken in der Box), 1. Quartile (unterer Querbalken), 3. Quartile (oberer Querbalken), Maximum (oberer Whisker) und Minimum (unterer Whisker). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

FCCP: Carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, **mg:** Milligramm, **pmol:** Pikomol, **s:** Sekunde **CLP:** cecal ligation and puncture, **ADM:** Adrenomedullin-Antikörper

3.1.6 Oligomycin: LEAK Komplex I und II

Das Antibiotikum Oligomycin ist ein ATP-Synthase-Hemmer und blockiert den Protonen-Kanal, der für die oxidative Phosphorylierung zuständig ist. Unter physiologischen Bedingungen wird der Elektronenfluss verlangsamt und der Sauerstoffverbrauch reduziert sich. Oligomycin dient auch gleichzeitig als Entkoppler, der durch den hohen Protonengradienten ein Protonen-Leak der inneren Mitochondrienmembran erzeugt und damit den Elektronenfluss wieder ankurbelt und Sauerstoff verbraucht. Es sind keine signifikanten Unterschiede der drei Gruppen festzustellen.

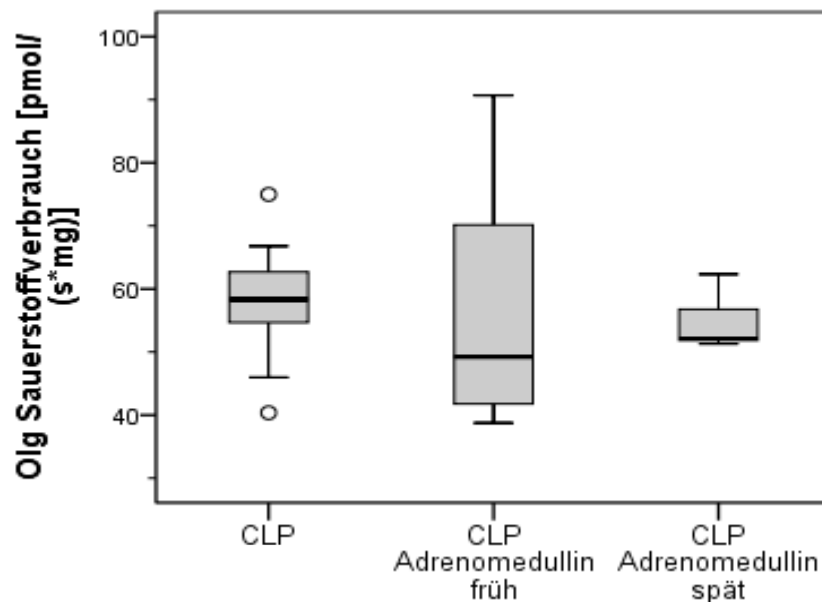


Abb. 10: Mitochondriale Atmung nach Gabe des ATP-Synthase Hemmers Oligomycin der CLP Vehikel-Gruppe, der CLP ADM-Antikörper früh und der spät therapierten Mäuse in Lebermitochondrien. Die Daten sind in einem sog. Boxplot dargestellt mit dem Medianwert (Querbalken in der Box), 1. Quartile (unterer Querbalken), 3. Quartile (oberer Querbalken), Maximum (oberer Whisker) und Minimum (unterer Whisker). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

FCCP: Carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, **mg:** Milligramm, **pmol:** Pikomol, **s:** Sekunde **CLP:** cecal ligation and puncture, **ADM:** Adrenomedullin-Antikörper

3.1.7 FCCP: ETS-Kapazität

FCCP macht die Membranen für die Protonen durchlässig. Dadurch wird die oxidative Phosphorylierung mehr oder weniger von der Atmungskette abgekoppelt und es entsteht kein ATP. Man sieht die maximale Atmung im entkoppelten Zustand der Mitochondrien. Hier zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen

- der CLP Vehikel-Gruppe und der CLP ADM-Antikörper spät therapierten Gruppe (U-Test, $p = 0,012$)
- der CLP ADM früh therapierten Gruppe und der CLP ADM-Antikörper spät therapierten Gruppe (U-Test, $p = 0,028$)

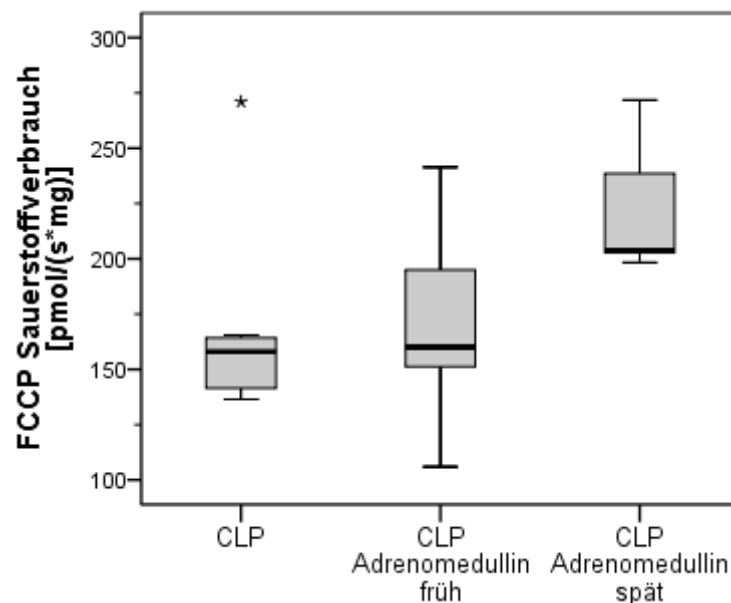


Abb. 11: Maximale Atmung im entkoppelten Zustand nach Gabe von FCCP der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie-Mäuse in Lebermitochondrien. Die Daten sind in einem sog. Boxplot dargestellt mit dem Medianwert (Querbalken in der Box), 1. Quartile (unterer Querbalken), 3. Quartile (oberer Querbalken), Maximum (oberer Whisker) und Minimum (unterer Whisker). (Universitätsklinikum Ulm, 2015)

FCCP: Carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, **mg:** Milligramm, **pmol:** Pikomol, **s:** Sekunde **CLP:** cecal ligation and puncture, **ADM:** Adrenomedullin-Antikörper.

4 Diskussion

Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob ADM-Antikörper in der Lage sind, die Sepsis-spezifische Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion zu verhindern bzw. wieder rückgängig zu machen. Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1. Die mitochondriale Aktivität in der Leber septischer Tieren war erwartungsgemäß reduziert. Dies bestätigt die Validität unseres Sepsismodells im Hinblick auf die mitochondriale Dysfunktion.
2. Die mitochondriale Atmungsaktivität war nach Gabe von ADM-Antikörpern trotz manifester Sepsis höher. Dies weist darauf hin, dass unter der Therapie mit ADM-Antikörper die mitochondriale Funktion tatsächlich aufrechterhalten wird. Allerdings konnte dieser Effekt sehr überraschend nur in der spät-therapierten aber nicht in der früh-therapierten Gruppe beobachtet werden.

4.1 Mitochondriale Funktion im septischen Schock

Die Untersuchung der mitochondrialen Funktion beim septischen Schock steht schon lange im Fokus vieler Studien. Diese gilt als beeinträchtigt und wird als partielle Ursache für Zellversagen und Zelltod angesehen. Im Verlauf sind diese Prozesse vermutlich an der Entstehung des multiplen Organversagens beteiligt. Es wird insbesondere vermutet, dass in der Sepsis trotz suffizienter Gewebsoxygenierung eine Störung der Sauerstoffverwertung der Zelle bzw. der Mitochondrien selbst vorliegt. Dadurch kommt es zur sogenannten zellulären Hypoxie.⁶ Mediatoren wie TNF α und Peroxynitrit sind in diesen Prozess involviert, da sie die mitochondriale Atmungsaktivität hemmen können.⁵⁷

Die Ergebnisse unserer Versuche zeigen eine reduzierte mitochondriale Atmungsaktivität in der Leber der CLP Vehikel-Gruppe im Vergleich zu einer früheren Kontroll-(Sham-) Gruppe. Um die Anzahl der Tierversuche einzuschränken, haben wir in unserer aktuellen Versuchsreihe auf eine gesonderte Sham-Gruppe verzichtet, da wir auf eine entsprechende Gruppe aus eben dieser vorangegangenen Studie zurückgreifen konnten.¹⁸ Aus dieser vorausgegangenen Studie konnten wir die Werte der mitochondrialen Atmung aus der Sham-Gruppe der normoglykämischen Tiere übernehmen. Der Versuchsablauf war in dieser Studie identisch gewesen im Vergleich zu unserer aktuellen Studie. Insofern können die Daten als Kontrollen gewertet werden.

Dieser Teil der Untersuchung diene als Validierung der Methode. Denn die Wirkung der ADM-Antikörper sollte u.a. unter der Annahme getestet werden, dass die mitochondriale Atmung in der Sepsis beeinträchtigt ist. Dies ist mehrfach gezeigt worden und kann als Merkmal eines septischen Zustandes angesehen werden. Andererseits sind die Effekte der Sepsis auf die mitochondriale Funktion auch Spezies- und Organ-abhängig. Insofern ist es zwingend erforderlich, am spezifischen Versuchsmodell zu zeigen, dass sie eindeutig zu beobachten sind, so wie es im Falle unseres experimentellen Modells der Fall ist.

4.2 Effekte der Therapie mit ADM-Antikörper auf die mitochondriale Funktion in der Leber septischer Mäuse

Die maximale Aktivität im entkoppelten Zustand (ETS-Kapazität) war in der spät-therapierten Gruppe höher im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Frühtherapie-Gruppe. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig den protektiven Effekt der ADM-Antikörper bezüglich der mitochondrialen Atmung in der Leber. Es lässt sich aber nicht klären, ob die Therapie zu einer Wiederherstellung der mitochondrialen Atmungskapazität oder lediglich zum Erhalten der physiologischen Aktivität geführt hat. Die ETS-Kapazität weist nämlich Werte auf, die denen der Sham-Gruppe entsprechen. Dies könnte also darauf hinweisen, dass die mitochondriale Aktivität durch die Therapie auf das Ausgangsniveau gehalten werden konnte. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Spättherapie unter bereits manifester Sepsis begonnen wurde. Es lässt sich nicht sagen, ob zu diesem Zeitpunkt die mitochondriale Aktivität bereits eingeschränkt war und die ADM-Antikörper zu einer Steigerung der Atmungsaktivität und einer Wiederherstellung des Ausgangswertes geführt haben. Um diese Frage zu beantworten, wäre eine zusätzliche Versuchsgruppe notwendig gewesen, um die Organfunktion vor Therapiebeginn zu untersuchen.

Im gekoppelten Zustand (OxPhos-Aktivität) waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten, wenn auch eine Tendenz im Sinne einer erhöhten Aktivität in der Spät-Therapie Gruppe entsprechend der Ergebnisse der ETS-Kapazität zu beobachten war. Die OxPhos-Aktivität ist ein weiterer Indikator für die maximale Atmungskapazität; im Gegensatz zur ETS-Kapazität ist sie aber nicht nur von der Aktivität der Atmungskettenkomplexe, sondern auch vom ATP-Umsatz und von der Aktivität der ATP-Synthase abhängig. In diesem Sinne spiegelt sie genauer die physiologische Funktion der aeroben Zellatmung wieder als die ETS-Kapazität. Andererseits ist sie weniger spezi-

fisch als Indikator für die Funktion der Atmungskette selbst, die von der ETS Kapazität besser angezeigt wird. Zusammengefasst lassen sich die vorliegenden Daten wie folgt interpretieren: die Therapie mit ADM-Antikörper hat eine protektive Wirkung auf die Atmungsketten-Funktion in der Leber septischer Mäuse. Die funktionelle Bedeutung dieses Befundes ist nicht klar, da der Effekt nur im entkoppelten (ETS), aber nicht im gekoppelten (OxPhos) Zustand zu sehen war.

Als weiteres Qualitätsmerkmal der mitochondrialen Atmung gilt der Kopplungsgrad. Dieser lässt sich messen als Atmungsaktivität vor der Zugabe von ADP und nach Injektion des ATP-Synthase-Inhibitors Oligomycin. Diesbezüglich zeigten die Daten keine Unterschiede zwischen den Gruppen und liegen im Bereich der Daten der Sham-Gruppe aus der vorausgegangenen Studie. Dies deutet darauf, dass bei den septischen Tieren die Kopplung der Atmungskettenaktivität an die ATP-Synthese noch intakt war. Sie wurde auch nicht von der Therapie beeinflusst.

4.3 Effekte der Früh- und Spättherapie mit ADM-Antikörper

Die oben beschriebenen Effekte wurden nur in der Spät-Therapie-Gruppe, aber nicht unter der Früh-Therapie beobachtet. Die Werte der früh-therapierten Gruppe haben sich nicht verändert. Dieses Ergebnis ist sehr ungewöhnlich, denn die Intention der Früh-Therapie ist gerade der Nachweis des Wirkungsprinzips. Deshalb würde man beim Nachweis eines Effektes in der Spät-Therapie-Gruppe erst recht den gleichen Effekt in der Früh-Therapie-Gruppe erwarten. Der Früh-Therapie-Gruppe wurde der ADM-Antikörper etwa zum gleichen Zeitpunkt der CLP-Sepsisinduktion injiziert. Das Tier, welches zu diesem Zeitpunkt klinisch noch gesund war, zeigte keine Sepsiszeichen. Üblicherweise wird in Medikamenten-Wirkungsstudien das Medikament zuerst bei gesunden Tieren getestet, um die Wirkung vor dem eigentlichen Krankheitsgeschehen zu dokumentieren.

Die späte ADM-AK Gabe wurde 16 Stunden post CLP injiziert. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die Sepsis entwickelt und es wurden die zu erwartenden Effekte gesehen. Dies würde in der Klinik zu dem gleichen Zeitpunkt geschehen und als klinisch relevant eingestuft werden.

Mögliche Ursache des negativen Ergebnisses in der früh-therapierten Gruppe kann ein Effektverlust der ADM-Antikörper über den Zeitraum zwischen CLP und Tötung des Tieres sein, der etwa 21 Stunden betrug. Das negative Ergebnis der frühen Therapie ist dennoch

von Bedeutung, weil es auf die Notwendigkeit eines besseren Verständnisses der Pharmakokinetik der verwendeten Antikörper deutet. Eine frühe Therapie macht bezogen auf die mitochondriale Funktion wenig Sinn, solange keine Anzeichen eines beginnenden Sepsisgeschehens feststellbar sind. Eine klinische Relevanz hätte eine so frühe Therapie jedoch aus Gründen der Prophylaxe bei länger hospitalisierten oder multimorbiden Patienten oder auch bei einem traumatisch penetrierenden Trauma (wie zum Beispiel einer Darmperforation). Insofern ist es empfehlenswert, die Pharmakokinetik der ADM-Antikörper genauer zu untersuchen, um sie z.B. in solchen Situationen erfolgreich einsetzen zu können.

Bei einer Studie der Autoren Wagner et al. hat sich die ADM-Konzentration im Blutplasma bei der frühen Gabe des ADM-AK gesenkt und es konnte eine verminderte NO- und Peroxinitrit-Formation gemessen werden. Daher konnte man davon ausgehen, dass sich auch in unserer Studie wirksame Effekte in der Frühphase des Versuchs zeigen würden.⁵⁸ Wie schon vorher erwähnt, könnte dies durch die Abnahme der Antikörper-Wirkung nach der langen Versuchsdauer oder einer zu geringen Applikation des Antikörpers verhindert worden sein. Möglich wäre jedoch ein Schutzmechanismus aufgrund der ADM-Blockierung, indem ein vermehrter Anstieg des Hormons provoziert wird.

Unser Ziel bestand darin, die klinische Situation so gut wie möglich zu imitieren. Unsere Ergebnisse belegen, dass bei einer Manifestation der Sepsis die Zugabe des ADM-Antikörpers eine verbesserte mitochondriale Funktion induziert. Dieser Effekt könnte eine klinische Relevanz haben. Die ADM-Konzentration im Blutplasma scheint der am meisten ausschlaggebende Faktor hinsichtlich der Effektivität der Behandlung mit ADM-Antikörpern zu sein. Die normale Konzentration bei Gesunden beträgt etwa 10 pmol/L. Um eine hämodynamische Veränderung mit diastolischem Blutdruckabfall sowie einer Erhöhung des Pulses zu provozieren, wurde etwa die 40-fache Konzentration von ADM injiziert. Nach dem Versuch hat sich der Kreislauf aufgrund einer etwa 20-minütigen Halbwertszeit des Hormons stabilisiert.⁵⁹

Bei septischen Patienten variiert die Konzentration mit dem Fortschreiten des septischen Zustandes. Die Konzentration des Biomarkers Pro-ADM stieg in einer Studie des Autors Guignant umso höher, je fortgeschrittener das Sepsisgeschehen war.³⁹ In einigen Studien mit ADM-Antikörpern wurden widersprüchliche Ergebnisse in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe des Antikörpers ermittelt. Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche Rezeptordichte von ADM und CGRP während des Sepsisgeschehens sein. Diese könnte von Maus zu Maus

variieren. Der ADM-Rezeptor ist Agonist; jedoch kann der CGRP-Rezeptor auch als Antagonist via dem humanen Fragment α CGRP-(8-37) agieren.²⁰ Da ADM an beide Rezeptoren andockt, ist die Menge der jeweiligen Rezeptoren ausschlaggebend. So kann eine erhöhte Rezeptordichte von CGPR den Effekt von ADM reduzieren und andersherum kann durch ein septisches Geschehen die Expression der ADM-Rezeptoren erhöht sein und dementsprechend der ADM-AK unwirksam sein. Man sollte in zukünftigen Studien möglicherweise CGPR-Rezeptoren blockieren, um den alleinigen Effekt von ADM und ADM-Antikörpern zu detektieren.

4.4 Methodenlimitation

Dieser Versuch ist nur ein Modell und kann somit nicht völlig der Realität entsprechen. Die CLP ist ein künstlich induziertes Sepsis-Modell und entspricht nur bedingt einer klinischen Situation. Dennoch sind viele charakteristische Symptome der Sepsis im Modell zu beobachten und belegen die Nähe zur klinischen Situation. Die Therapie der Tiere erfolgte zudem in einer klinikähnlichen Umgebung.

Die Messungen der mitochondrialen Atmungsaktivität wurden mit der High Resolution Respirometry der Firma Oroboros durchgeführt. Die High Resolution Respirometry ist ein sehr genaues Verfahren, um feine Unterschiede der zu untersuchenden Versuchsgruppen zu detektieren. Das Gerät bietet viele Vorteile: Artefakte der Sauerstoffdiffusion werden durch die hochverarbeiteten Materialien minimalisiert. Das optimale Volumen der Kammern ist 2.0 cm³. Das Volumen wird anhand einer Oberflächen-Volumen-Ratio bestimmt. Je höher die Ratio, desto kleiner das Volumen. Das bedeutet, dass größere (flächigere) Fehler bei weniger Volumen entstehen können und die Genauigkeit der Ergebnisse verändern können.⁶⁰

Die mitochondriale Funktion wurde nach Entnahme von Gewebeproben der Leber in vitro gemessen und kann Abweichungen zu in vivo Messungen beinhalten. Während der Messungen wurden Substrate und Inhibitoren in die Kammern injiziert. Diese wurden in weit höherer Konzentration als unter physiologischen Bedingungen hinzugefügt, um während des Experiments einen verfrühten Abbau der Substanzen zu verhindern.⁶¹

Als besondere Limitation der vorliegenden Studie muss beachtet werden, dass nur die mitochondriale Funktion in der Leber untersucht wurde. Dies wurde deshalb gemacht, weil die Mitochondrien der Leber besonders stark im Rahmen eines septischen Prozesses beeinträch-

tigt werden und somit die Wahrscheinlichkeit den Effekt des ADM-Antikörpers nachzuweisen hoch war.⁶² Andererseits ist nicht bekannt, ob die beobachteten Effekte auf andere Organe übertragen werden können. Zudem ist ein eindeutiger Funktionsparameter für die Leber nicht verfügbar im Gegensatz z.B. zur Niere, wo die Kreatininclearance als geeigneter Funktionsindikator gilt. Dies erschwert erneut die Bedeutung der gefundenen Effekte auf die Funktion der Leber zu übertragen. In diesem Sinne wäre es empfehlenswert, in zukünftige Studien auch andere Organe einzuschließen und deren Funktion parallel zur mitochondrialen Atmung zu analysieren. Insgesamt muss auch berücksichtigt werden, dass unter der Therapie mit ADM-Antikörper keine funktionelle Besserung des septischen Zustandes der Tiere gefunden wurde. Auch diese Beobachtung weist darauf hin, dass die hier gefundenen Wirkungen noch genauer auf deren funktionelle Bedeutung für den Krankheitsverlauf geprüft werden sollten.

4.5 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick

Im vorliegenden Experiment wurden stabilisierende Effekte der ADM-Antikörper auf die mitochondriale Atmung in der Leber der septischen Maus eindeutig gezeigt. Weitere Experimente konnten dennoch nicht zeigen, daß die Funktion lebenswichtiger Organe im septischen Schock durch diese therapeutische Intervention aufrechterhalten werden konnte. Im Prinzip konnte ein positiver Effekt von ADM-Antikörpern in der Sepsis gezeigt werden, allerdings nur im Sinne eines Pre-treatments.⁵⁸ Gerade unter Pre-treatment Bedingungen konnte aber im Rahmen meiner Studie kein Effekt auf die mitochondriale Atmung der Leber gezeigt werden. In Experimenten, bei denen der ADM-Antikörper als (klinisch relevantere) Post-treatment Intervention getestet wurde (persönliche Mitteilung, Daten bisher nicht veröffentlicht), konnten dagegen keine Effekte auf physiologische Organfunktionen beobachtet werden. Einschränkend muss erneut darauf hin gedeutet werden, daß in klinischen Modellen nicht nur die Funktion der Leber, sondern und insbesondere auch die der Niere und des Kreislaufs im Mittelpunkt standen. Eben die Funktion der Niere konnte unter einer Frühtherapie mit ADM-Antikörpern positiv beeinflusst werden. Die Untersuchung der mitochondrialen Funktion im Rahmen meiner Experimente war dagegen auf die Leber als zentrales Stoffwechsel-Organ fokussiert. Dennoch ist ein Zusammenhang zwischen der Mitochondrienfunktion in der Leber und dem möglichen Erfolg einer Therapie der Sepsis aufgrund der derzeitigen Datenlage nicht feststellbar. Insofern wäre eine umfassendere Untersuchung der mitochondrialen Funktion am gleichen Sepsismodell wünschenswert, die sich auch auf wei-

tere Organe erstrecken müsste. Auf dieser Grundlage könnte die Bedeutung der mitochondrialen Dysfunktion und einer Mitochondrien-zentrierten Therapie in der Sepsis z.B. durch ADM-Antikörper neu bewertet werden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob Adrenomedullin-Antikörper während eines septischen Schocks die mitochondriale Funktion stabilisieren bzw. verbessern können. Vorherige Studien zeigten nämlich, dass Adrenomedullin einen deletären Effekt auf die Sepsisentwicklung im Spätstadium hat.⁴⁵⁻⁴⁷ Die erhöhten Adrenomedullin-Werte im Blutplasma korrelieren mit dem Ausmaß des Organschadens sowie mit der Mortalität der Patienten. Je höher die Konzentration, desto schlechter die Prognose und desto höher die Mortalität.³⁹⁴⁰

Für den Versuch wurden 24 C57BI/6-Mäuse in drei Gruppen aufgeteilt. Bei allen wurde eine sogenannte cecal ligation puncture durchgeführt. Nach einem 16-stündigen Intervall folgte eine Beobachtungsphase mit intensivmedizinischer Überwachung. Die Vehikel-Gruppe bekam keine Therapie. Die zweite Gruppe bekam als Therapie den Adrenomedullin-Antikörper zum Zeitpunkt der cecal ligation puncture (Frühtherapie) und die dritte Gruppe erst 16 Stunden nach der cecal ligation puncture, daß heißt zu Beginn der Beobachtungsphase (Spättherapie). Nach Ende des Versuchs und Tötung der Mäuse wurde das Lebergewebe entnommen und mit einem Oxygraphen die mitochondriale Funktion gemessen. Dazu wurde eine definierte Menge des entnommenen Gewebes homogenisiert und in die Oxygraph-Kammern eingebracht. Zur Quantifizierung der mitochondrialen Atmungsaktivität wurden Substrate und Inhibitoren nach einem spezifischen Protokoll injiziert. Die Sauerstoffkonzentration in den Kammern wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Daraus berechnete die Dat-Lab4®-Software den Sauerstoffverbrauch. Die verschiedenen Substrate und Inhibitoren wurden benötigt, um die Funktion der verschiedenen Komplexe der Atmungskette im gekoppelten und entkoppelten Zustand zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Studie bestätigen zunächst, dass die mitochondriale Funktion in der Leber als Folge der cecal ligation puncture beeinträchtigt ist. Dies zeigt der Vergleich der Ergebnisse der Vehikel-Gruppe unserer Studie mit einer Sham-Gruppe aus einer früheren Untersuchung. Gründe dafür können die erhöhte Stickstoffmonoxid-Produktion und anderer Mediatoren sein, welche zu oxidativen Schäden der Mitochondrien führen können. Dieses Ergebnis zeigt zunächst, dass das Modell valide ist, um Effekte einer Therapie auf Sepsis-induzierte Veränderungen der mitochondrialen Atmung zu untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die mitochondriale Aktivität durch die spät-Therapie aufrecht erhalten werden kann. Die mitochondriale Atmungsaktivität war nämlich sowohl im gekoppelten als auch im entkoppelten Zustand höher als in der Vehikel-Gruppe. Sie war auf dem gleichen

Niveau wie die mitochondriale Aktivität in der Leber der Sham-Gruppe aus der bereits erwähnten früheren Studie.¹⁸ Bei der früh-therapierten Gruppe wurde dagegen keine Veränderung im Vergleich zur Vehikel-Gruppe gesehen. Dies ist sehr überraschend, da ein positiver Effekt einer Therapie am ehesten in einem Pre-treatment-Ansatz zu erwarten wäre. Als Grund dafür kann nur ein frühzeitiger Effektverlust des Antikörpers über den Zeitraum des Versuchs in Frage kommen. Denn im Rahmen der Frühtherapie wurde der Antikörper zum Zeitpunkt der cecal ligation puncture appliziert. Es wurde davon ausgegangen, dass der Antikörper-Spiegel mit dieser Injektion für die gesamte Versuchsdauer im therapeutischen Bereich gehalten werden kann, was aber möglicherweise nicht der Fall war. Der Antikörper wurde entsprechend zuvor vom Hersteller bestimmter Daten zur Pharmakokinetik appliziert, eine Kontrolle des Spiegels war im Rahmen des aktuellen Versuchs deshalb auch nicht vorgesehen. Dies wäre aufgrund des geringen Blutvolumens der Maus auch technisch nicht ohne weiteres möglich gewesen. Dennoch belegen die Daten der Spättherapie den positiven Effekt des Antikörpers, so dass der fehlende Effekt in der Frühtherapie die Bewertung des Therapie-Ansatzes nicht beeinträchtigt. Für die unterschiedlichen Ergebnisse der Adrenomedullin-Antikörper-Therapie in der Früh- und Spätphase kann auch die Rezeptordichte von Adrenomedullin und das Calcitonin Gene-Related Peptid verantwortlich sein. Das Calcitonin Gene-Related Peptid kann Adrenomedullin antagonisieren. Bisher ist noch nicht klar, in wie weit die Aktivität von Adrenomedullin dadurch in den verschiedenen Stadien der Sepsis beeinflusst wird. Dieses herauszufinden könnte in zukünftigen Studien ein interessanter Ansatz sein.

Insgesamt muss abschließend festgehalten werden, dass in begleitenden Experimenten die hier eindeutig beobachteten Effekte der Therapie mit Adrenomedullins-Antikörpern auf die Mitochondrien-Funktion in der Leber der septischen Maus offensichtlich nicht mit einem insgesamt positiven Einfluss auf das Outcome der Sepsis einhergingen. Insofern erscheint dieser therapeutische Ansatz derzeit trotzdem nicht erfolgversprechend zu sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Fleischmann C, Thomas–Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. Hospital incidence and mortality rates of sepsis — an analysis of hospital episode (DRG) statistics in Germany from 2007 to 2013. *Dtsch Arztebl Int.* 2016; 113:159–66.
2. Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Review of Antiinfective Therapy.* 2012;10:701-706.
3. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):762-774.
4. Westphal M, Sander J, Van Aken H, Ertmer C, Stubbe HD, Booke M. Role of adrenomedullin in the pathogenesis and treatment of cardiovascular dysfunctions and sepsis. *Anaesthesist.* 2006;55:171-178.
5. Elbers PW, Ince C. Mechanisms of critical illness--classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Crit Care.* 2006;10:221.
6. Fink MP. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit Care.* 2002;6:491-499.
7. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *The Lancet.* 2002;360:219-223.

8. Fukuyama N, Takebayashi Y, Hida M, Ishida H, Ichimori K, Nakazawa H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic Biol Med.* 1997;22:771-774.
9. Lanone S, Mebazaa A, Heymes C, Henin D, Poderoso JJ, Panis Y, Zedda C, Billiar T, Payen D, Aubier M, Boczkowski J. Muscular contractile failure in septic patients: role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine.* 2000;162:2308-2315.
10. Dare AJ, Phillips AR, Hickey AJ, Mittal A, Loveday B, Thompson N, Windsor JA. A systematic review of experimental treatments for mitochondrial dysfunction in sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:1517-1525.
11. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002;30:620-650.
12. Meldrum DR, Ayala A, Chaudry IH. Energetics of lymphocyte "burnout" in late sepsis: adjuvant treatment with ATP-MgCl₂ improves energetics and decreases lethality. *J Surg Res.* 1994;56:537-542.
13. Borutaite V, Matthias A, Harris H, Moncada S, Brown GC. Reversible inhibition of cellular respiration by nitric oxide in vascular inflammation. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology.* 2001;281:H2256-2260.
14. Verma R, Huang Z, Deutschman CS, Levy RJ. Caffeine restores myocardial cytochrome oxidase activity and improves cardiac function during sepsis. *Crit Care Med.* 2009;37:1397-1402.

15. Nessler N, Launey Y, Aninat C, White J, Seguin P, Mallédant Y. Liver Dysfunction Is Associated with Long-Term Mortality in Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016; 193: 335-7.
16. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016; 315(8):801-10.
17. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med*. 1996; 22(7):707–710.
18. Koenemann B. *Einfluss der Hyperglykämie auf die mitochondriale Atmung von Leberzellen septischer Mäuse mit und ohne Imeglimin*. [Dissertation]. Universität Ulm; 2014.
19. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*. 2000;21:138-167.
20. Valenzuela-Sánchez F, Valenzuela-Méndez B, Francisco Rodríguez-Gutiérrez J, Estella-García Á, González-García MÁ. New role of biomarkers: mid-regional pro-adrenomedullin, the biomarker of organ failure. *Ann Transl Med*. 2016 Sep; 4(17): 329.
21. Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, Kawahara T, Bannai H, Miyano S. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. *FEBS Lett*. 2004;556:53-58.

22. Smith DM, Coppock HA, Withers DJ, Owji AA, Hay DL, Choksi TP, Chakravarty P, Legon S, Poyner DR. Adrenomedullin: receptor and signal transduction. *Biochem Soc Trans.* 2002;30:432-437.
23. Zudaire E, Portal-Nunez S, Cuttitta F. The central role of adrenomedullin in host defense. *J Leukoc Biol.* 2006;80:237-244.
24. Wimalawansa SJ. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol.* 1997;11:167-239.
25. Wimalawansa SJ. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev.* 1996;17:533-585.
26. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev.* 2002;54:233-246.
27. Allaker RP, Zihni C, Kapas S. An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedullin on members of the skin, oral, respiratory tract and gut microflora. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 1999;23:289-293.
28. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 1998;393:333-339.
29. Coppock HA, Owji AA, Bloom SR, Smith DM. A rat skeletal muscle cell line (L6) expresses specific adrenomedullin binding sites but activates adenylate cyclase via calcitonin gene-related peptide receptors. *Biochem J.* 1996;318:241-245.

30. Fowler DE, Wang P. The cardiovascular response in sepsis: proposed mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and its binding protein (review). *Int J Mol Med*. 2002;9:443-449.
31. Hattori Y, Nakanishi N, Gross SS, Kasai K. Adrenomedullin augments nitric oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Cardio-vasc Res*. 1999;44:207-214.
32. Sakai K, Saito K, Ishizuka N. Adrenomedullin synergistically interacts with endogenous vasodilators in rats: a possible role of K(ATP) channels. *Eur J Pharmacol*. 1998;359:151-159.
33. Kano H, Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Horio T, Ikeda M, Minami M, Hanehira T, Takeda T, Yoshikawa J. Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 1996;14:209-213.
34. Nishimatsu H, Suzuki E, Nagata D, Moriyama N, Satonaka H, Walsh K, Sata M, Kangawa K, Matsuo H, Goto A, Kitamura T, Hirata Y. Adrenomedullin induces endothelium-dependent vasorelaxation via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway in rat aorta. *Circ Res*. 2001;89:63-70.
35. Lopez J, Martinez A. Cell and molecular biology of the multifunctional peptide, adrenomedullin. *Int Rev Cytol*. 2002;221:1-92.
36. Samson WK, Murphy T, Schell DA. A novel vasoactive peptide, adrenomedullin, inhibits pituitary adrenocorticotropin release. *Endocrinology*. 1995;136:2349-2352.

37. Martinez A, Weaver C, Lopez J, Bhathena SJ, Elsasser TH, Miller MJ, Moody TW, Unsworth EJ, Cuttitta F. Regulation of insulin secretion and blood glucose metabolism by adrenomedullin. *Endocrinology*. 1996;137:2626-2632.
38. Dackor R, Caron K. Mice heterozygous for adrenomedullin exhibit a more extreme inflammatory response to endotoxin-induced septic shock. *Peptides*. 2007;28:2164-2170.
39. Guignant C, Voirin N, Venet F, Poitevin F, Malcus C, Bohe J, Lepape A, Monneret G. Assessment of pro-vasopressin and pro-adrenomedullin as predictors of 28-day mortality in septic shock patients. *Intensive Care Med*. 2009;35:1859-1867.
40. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Muller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care*. 2005;9:R816-824.
41. Fowler DE, Yang S, Zhou M, Chaudry IH, Simms HH, Wang P. Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1: their role in the septic response. *J Surg Res*. 2003;109:175-181.
42. Temmesfeld-Wollbruck B, Brell B, zu Dohna C, Dorenberg M, Hocke AC, Martens H, Klar J, Suttorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin reduces intestinal epithelial permeability in vivo and in vitro. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal & Liver Physiology*. 2009;297:G43-51.
43. Temmesfeld-Wollbruck B, Brell B, David I, Dorenberg M, Adolphs J, Schmeck B, Suttorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin reduces vascular hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensive Care Med*. 2007;33:703-710.

44. Yang S, Zhou M, Chaudry IH, Wang P. Novel approach to prevent the transition from the hyperdynamic phase to the hypodynamic phase of sepsis: role of adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1. *Ann Surg.* 2002;236:625-633.
45. Roch A. Increased levels of pro-AVP and pro-ADM in septic shock patients: what could it mean?. *Intensive Care Med.* 2009;35:1827-1829.
46. Westphal M, Stubbe H, Bone HG, Daudel F, Vocke S, Van Aken H, Booke M. Hemodynamic effects of exogenous adrenomedullin in healthy and endotoxemic sheep. *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 2002;296:134-138.
47. Nishio K, Akai Y, Murao Y, Doi N, Ueda S, Tabuse H, Miyamoto S, Dohi K, Minamino N, Shoji H, Kitamura K, Kangawa K, Matsuo H. Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 1997;25:953-957.
48. Ikeda U, Kanbe T, Shimada K. Adrenomedullin increases inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells stimulated with interleukin-1. *Hypertension.* 1996;27:1240-1244.
49. Stadler J, Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, Ochoa JB, Simmons RL. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 1991;260:910-916.
50. Merz T, Vogt JA, Wachter U, Calzia E, Szabo C, Wang R, Radermacher P, McCook O. Impact of hyperglycemia on cystathionine- γ -lyase expression during resuscitated murine septic shock. *Intensive Care Med Exp.* 2017 Dec;5(1):30.

51. Strnad P, Tacke F, Koch A, Trautwein C. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jan;14(1):55-66.
52. Eyenga P, Roussel D, Morel J, Rey B, Romestaing C, Gueguen-Chaignon V, Sheu SS, Viale JP. Time course of liver mitochondrial function and intrinsic changes in oxidative phosphorylation in a rat model of sepsis. *Intensive Care Med Exp*. 2018 Sep 5;6(1):31.
53. Fisch C, Robin MA, Letteron P, Fromenty B, Berson A, Renault S, Chachaty C, Pessayre D. Cell-generated nitric oxide inactivates rat hepatocyte mitochondria in vitro but reacts with hemoglobin in vivo. *Gastroenterology*. 1996;110:210-220.
54. Gnaiger E. Polarographic oxygen sensors, the oxygraph, and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. In: Dykens J, Will Y, eds. *Drug- Induced Mitochondrial Dysfunction*. John Wiley and Sons, Inc.,; 2008:327-352.
55. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, Obata Y, Yoshiki A. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Experimental Animals*. 2009;58:141-149.
56. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*. 2010;47:53-67.
57. Harrois A, Huet O, Duranteau J. Alterations of mitochondrial function in sepsis and critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2009;22:143-149.
58. Wagner K. *Adrenomedullin binding improves catecholamine responsiveness and kidney function in resuscitated murine septic shock*. [Dissertation]. Universität Ulm; 2013.

59. Meeran K, O'Shea D, Upton PD, Small CJ, Ghatei MA, Byfield PH, Bloom SR. Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in humans: a pharmacokinetic study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82:95-100.
60. Gnaiger E. The Oxygraph for High-Resolution Respirometry (HRR). *Mitochondrial Physiology Network*. 2010:1-18.
61. Gnaiger E. Mitochondrial Pathways to Complex I: Respiration with Pyruvate, Glutamate and Malate. In: Gnaiger E, ed. *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*. 2. Auflage ed. Innsbruck: OROBOROS MiPNet Publications; 2008:7-15.
62. Porta F. Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. *Crit.Care*. 2006;10:R118.

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der mitochondrialen Atmungskette der Interaktionen von NO und ONOO ⁻ auf die fünf Komplexe. Der Elektronenfluss ist durch die blauen Pfeile dargestellt. Die roten Donnerkeile repräsentieren die Inhibition der Atmungskette.....	8
Abb. 2:	Bild des OROBOROS® Oxygraph-2k	11
Abb. 3:	Darstellung der Atmungszustände nach Protokoll	17
Abb. 4:	Graphische Darstellung der respiratorischen Messung durch die DatLab4®-Software. Sauerstoffkonzentration (blaue Kurve) und Sauerstoffverbrauch (rote Kurve) nach Zugabe der Inhibitoren und Substrate (violette Markierung).....	20
Abb. 5:	Basaler Sauerstoffverbrauch der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie-Mäuse in Lebermitochondrien.	23
Abb. 6:	Sauerstoffverbrauch nach Cytochrom c Gabe der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie- Mäuse in Lebermitochondrien.....	24
Abb. 7:	Mitochondriale Atmung nach Malat und Glutamat Gabe der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie-Mäuse in Lebermitochondrien.....	25
Abb. 8:	Mitochondriale Atmung nach ADP Gabe der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie-Mäuse in Lebermitochondrien.....	26
Abb. 9:	Mitochondriale Atmung nach Succinat Gabe der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie-Mäuse in Lebermitochondrien.....	27
Abb. 10:	Mitochondriale Atmung nach Gabe des ATP-Syntase Hemmers Oligomycin der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper früh und spät therapierten -Mäuse in Lebermitochondrien.	28
Abb. 11:	Maximale Atmung im entkoppelten Zustand nach Gabe von FCCP der CLP Vehikel-, CLP ADM-Antikörper frühe Therapie- und späte Therapie-Mäuse in Lebermitochondrien.....	29

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Wirkungen von ADM.....	5
Tab. 2:	Bestandteile des mitochondrialen Respirationsmediums 05	13
Tab. 3:	Protokoll der Substrate und Inhibitoren.....	17
Tab. 4:	Klassifikation der Atmungszustände (Respiratory Steady States) nach Charles und Williams	18

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Enrico Calzia danken, der mich richtungsweisend und unterstützend während meiner Arbeit begleitet hat. Für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Desweiteren möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung der Universität Ulm bedanken, die es mir ermöglicht haben, meine Arbeit im Labor durchzuführen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern Dres. Josef und Johanna Weingärtner sowie meinen Großeltern Helene und Ilie Dobrescu. Vielen Dank für die Unterstützung sowie Euren motivierenden Beistand während meines gesamten Studiums!

Lebenslauf

Name: Marlene Gabrielle Weingärtner

Geburtsjahr: 1980

Geburtsort: Heidelberg

Studium

2009-2013 Universität Ulm Studium Medizin
Praktisches Jahr in Melbourne, Australien
Abschluss: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Ärztin

2008-2009 Universität für Medizin Victor babes, Timisoara, Rumänien Studium
Medizin
Abschluss: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2006-2012 Romanian American University Studium Betriebswirtschaftslehre (mit
Unterbrechung)
Abschluss: Betriebswirt International Business (Bachelor)

Weiterbildung

2014 Kompaktkurs Ernährungsmedizin DAEM e.V.

2014-2015 Manuelle Medizin/Chirotherapie MWE

2015-2016 Osteopathie DAAO

Beruflicher Werdegang

1995-2005 Tennis-Profi

2014 Assistenzärztin Rehabilitations-und Universitätskliniken Ulm im Zent-
rum für Integrierte Rehabilitation in der Orthopädie

2016-dato Osteopathische Ärztin Schön Klinik Berchtesgadener Land

Sonstige Kenntnisse

Sprachen Englisch fließend in Wort und Schrift
Rumänisch fließend in Wort und Schrift
Französisch Grundkenntnisse

Sonstiges

2011-2014 Ehrenamt Studentische Unternehmensberatung
PRIAMOS Consulting Group
Sport Tennis-Trainer Lizenz

Schulbildung

1994-1998 Hermann Oberth Gymnasium, Deutsche Schule Bukarest, Rumänien
Abschluss: Abitur

1992-1994 Englisches Institut, Privates Gymnasium, Heidelberg

1990-1992 Stetten Gymnasium, Augsburg

1986-1990 Grundschule, Mering

Hobbys Sport, Musik, Malerei