

Aus der Klinik und Poliklinik der Anästhesiologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. N. Roewer



**Veränderungen der murinen mitochondrialen Funktion unter
Einfluss verschiedener Sauerstoffkonzentrationen während
mehrstündiger Beatmung**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Milena Aurelia Balz

aus Pfaffenhofen

Würzburg, Dezember 2017

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Thorsten Smul
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Christoph Maack
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2018

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Größenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Beatmung	1
1.1.1 Sevofluran	2
1.2 Mitochondrienfunktion	3
1.2.1 Oxidative Phosphorylierung	3
1.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress	7
1.2.3 Mitochondrial Permeability Transition	10
1.3 Fragestellung	11
2 Material und Methoden	14
2.1 Versuchsgenehmigung	14
2.2 Präparation der Versuchstiere	14
2.2.1 Versuchstiere	14
2.2.2 Anästhesie und Beatmung	14
2.2.3 Organentnahme	15
2.3 Biochemische Auswertung	15
2.3.1 Herstellung der Lysate	15
2.3.2 Mitochondrienisolation	15
2.3.3 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford	16
2.3.4 Calcium induzierte mitochondriale Schwellung	17
2.3.5 Citrat Synthase Aktivitätsmessung	18

Inhaltsverzeichnis

2.3.6	Superoxiddismutase Aktivitätsmessung	19
2.3.7	Messung der Proteincarbonylierung	19
2.3.8	Photometrische Komplex Aktivitätsmessungen	20
2.3.9	Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis	23
2.3.10	Coomassie Färbung	25
2.3.11	In-Gel Komplex Aktivitätsmessungen	26
2.4	Verwendete Chemikalien und Kits	28
2.5	Geräte und sonstige Materialien	31
2.6	Statistik und Auswertung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Aktivität der Citrat Synthase	33
3.2	Calcium induzierte mitochondriale Schwellung	34
3.3	Aktivität der Superoxiddismutase	36
3.4	Mitochondrialer Proteincarbonylierung mittels DNPH	37
3.5	Aktivitäten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe mittels spezifischer photometrischer Assays	38
3.6	Native Gelelektrophorese zur Charakterisierung mitochondrialer Superkomplexe	41
3.6.1	Komplex I in-Gel Aktivität in kardialen Mitochondrien	42
3.6.2	Komplex I in-Gel Aktivität in renalen Mitochondrien	44
3.6.3	Komplex III und Superkomplex III/IV in-Gel Aktivität in kardialen Mitochondrien	46
3.6.4	Komplex IV in-Gel Aktivität in kardialen Mitochondrien	48
3.6.5	Komplex IV in-Gel Aktivität in renalen Mitochondrien	50
4	Diskussion	52

Inhaltsverzeichnis

5	Zusammenfassung	59
	Literaturverzeichnis	60

Abkürzungs- und Größenverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
ANT	adenine nucleotide translocator, Adenin Nukleotidtransporter
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninicsäure
BN-PAGE	Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺	Calciumionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CcO	Cytochrom-C-Oxidase
CoA-SH	Coenzym A mit einer Thiol Gruppe
Cu ²⁺	Kupferionen
CypD	Cyclophilin D
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazine
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ETF	Elektronen transferierendes Flavoprotein
FiO ₂	Fraction of inspired oxygen
FRK	Funktionelle Residualkapazität
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
KCl	Kaliumchlorid

Abkürzungs- und Größenverzeichnis

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MAC	minimale alveoläre Konzentration
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
mPT	Mitochondrial Permeability Transition
mPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
NADH	Reduziertes Nicotinamidadeninukleotid
NTB	Nitrotetrazolium Blue chloride, 2,2'-bis(4-Nitrophenyl)-5,5'-diphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenylene)ditetrazolium chloride
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
OSCP	oligomycin sensitivity-conferring protein
P _a O ₂	Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PEEP	Positive endexpiratory pressure
P _i	Anorganisches Phosphat
ROS	reactive oxygen species; reaktive Sauerstoffspezies
S _a O ₂	Sauerstoffsättigung
SOD	Superoxid Dismutase
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNB	Thionitrobenzoic acid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton™ X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol
TSPO	translocator protein, peripherer Benzodiazepin Rezeptor
VDAC	voltage-dependent anion channel, spannungsabhängiger Anionenkanal
WST-1	(2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

Abkürzungs- und Größenverzeichnis

Messgröße	Einheit	Einheitsbezeichnung
Elektrische Spannung	V	Volt
Elektrische Stromstärke	A	Ampere
Länge	m	Meter
	cm	Zentimeter
	mm	Millimeter
	μm	Mikrometer
	nm	Nanometer
	Masse	kg
g		Gramm
mg		Milligramm
μg		Mikrogramm
Da		Dalton
Stoffmenge		mol
	mmol	Millimol
Temperatur	$^{\circ}\text{C}$	Celsius
Volumen	l	Liter
	ml	Milliliter
	μl	Mikroliter
Zeit	h	Stunde
	min	Minute
	s	Sekunde

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung .	4
Abbildung 7: Übersicht der sequentiellen in-Gel Färbung A-D	27
Abbildung 2: Aktivität der Citrat Synthase	33
Abbildung 3: Calcium induzierte mitochondriale Schwellung	35
Abbildung 4: Aktivität der mitochondrialen Superoxiddismutase	36
Abbildung 5: Mitochondriale Proteincarbonylierung	37
Abbildung 6: Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-IV, A-D	40
Abbildung 8: Kardiale Komplex I in-Gel Aktivität nach BN-PAGE	43
Abbildung 9: Renale Komplex I in-Gel Aktivität nach BN-PAGE	45
Abbildung 10: Kardiale Komplex III und Superkomplex III/IV in-Gel Aktivität nach BN-PAGE	47
Abbildung 11: Kardiale Komplex IV in-Gel Aktivität nach BN-PAGE	49
Abbildung 12: Renale Komplex IV in-Gel Aktivität nach BN-PAGE	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gelzusammensetzung	24
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Kits	28
Tabelle 3: Geräte.....	31
Tabelle 4: Sonstige Materialien	31

1 Einleitung

1.1 Beatmung

Die Sauerstoffaufnahme ist essentiell für die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien und die Versorgung der Gewebe.¹ Um dies zu gewährleisten ist, aufgrund der atemdepressiven Nebenwirkungen von Anästhetika, Hypnotika, Opioiden und Muskelrelaxation, während einer Narkose häufig eine invasive Beatmung nötig. Bei horizontaler Rückenlage verschiebt sich das Zwerchfell nach kranial, wodurch die funktionelle Residualkapazität (FRK) und die thorakale Compliance verringert wird. Durch die verminderte FRK kann es zu einem Belüftungsdefizit der terminalen Luftwege, den sogenannten Mikroateletasen kommen und somit zu einer verschlechterten Oxygenierung des Blutes.² Um für eine ausreichende Sauerstoffversorgung aller Organe zu sorgen, kann man den Sauerstoffanteil im Inspirationsgasgemisch (F_{iO_2}) am Beatmungsgerät auf bis zu 100% Sauerstoff erhöhen. Aufgrund der potentiell toxischen Wirkung von Sauerstoff, versucht man die inspiratorische Konzentration während einer Beatmung jedoch möglichst gering zu halten. Ebenso besteht die Gefahr der Resorptionsateletasen unter Beatmung mit 100% Sauerstoff. Physiologischer Weise hält Stickstoff die Alveolen offen, wenn Sauerstoff in das Kapillarblut diffundiert. Wird jedoch bei einer F_{iO_2} aller Stickstoff durch Sauerstoff verdrängt kommt es zum Kollaps der Alveolen nach Diffusion des Sauerstoffes. Eine hohe F_{iO_2} kann jedoch auch positive Auswirkungen auf den Verlauf oder Folgen einer Operation haben, wie zum Beispiel die Reduktion der Wahrscheinlichkeit für postoperative Übelkeit und Erbrechen (PONV) oder ein gesteigertes Sauerstoffangebot an die Gewebe bei starkem Blutverlust. So gilt es die Vor- und Nachteile einer intraoperativen Beatmung mit hoher F_{iO_2} auf jeden Patienten und Situation individuell anzupassen. Im klinischen Alltag orientiert man sich an der Sauerstoffsättigung (S_aO_2) die > 90% betragen sollte und einem Sauerstoffpartialdruck (P_aO_2) von etwa 60 mmHg.³ Ein lungengesunder Erwachsener wird während einer Allgemeinanästhesie meist mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 30-50% beatmet.²

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass es unter physiologischen Bedingungen bei normobarer Hyperoxie über 5 Stunden, zu einem verringerten kardialen Auswurf, einem verringerten Grundumsatz und Sauerstoffverbrauch kommt. Auf die koronaren Gefäße konnten bereits ebenfalls deutliche Auswirkungen der Hyperoxie im Sinne eines signifikant verminderten Blutflusses und reduziertem myokardialen Sauerstoffverbrauches, nachgewiesen werden.^{4,5} Andere Studien belegen, dass hohe Sauerstoffkonzentrationen zu einer Vasokonstriktion mit Anstieg des Gefäßwiderstandes in vielen Organen⁶⁻⁸ u.a. der Niere⁹ und des Herzens¹⁰ führen. Man geht davon aus, dass der Anstieg des Gefäßtonus vor allem auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zurückzuführen ist. Da durch diese eine endotheliale Dysfunktion mit Abnahme der vasodilatativen Kapazität durch die Reaktion mit Stickstoffmonoxid bewirkt wird. Deutlich wird dies dadurch, dass durch eine i.v. Gabe von Vitamin C als Radikalfänger ein Hyperoxie-bedingter Anstieg des Gefäßwiderstandes verhindert werden kann.¹⁰

1.1.1 Sevofluran

Sevofluran (1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-(fluormethoxy)propan) zählt zu den meist verwendeten volatilen Anästhetika. Dabei handelt es sich um einen halogenierten Ether mit sieben Fluoratomen, welcher in den siebziger Jahren von Bernard Regan synthetisiert wurde.¹¹ Die klare Flüssigkeit ist nicht entflammbar und hat einen etherartigen Geruch, der im Vergleich zu anderen volatilen Anästhetika die Atemwege kaum reizt. Daher eignet sich Sevofluran gut zur Narkoseeinleitung in der Kinderanästhesie.^{12,13} Über einen Verdampfer wird die Flüssigkeit in einen gasförmigen Zustand überführt.

Die anästhetische Potenz von volatilen Anästhetika wird durch den MAC (minimale alveoläre Konzentration) Wert angegeben. Die MAC ist definiert als die alveoläre Konzentration eines Anästhetikums, bei welcher 50% der Patienten keine gezielten Abwehrbewegungen auf einen definierten Schmerzreiz zeigen. Demnach ist die anästhetische Potenz eines Narkosegases umso höher desto niedriger die MAC ist. Verschiedene Faktoren können die minimale alveoläre

Konzentration beeinflussen. So vermindert sich beispielsweise mit zunehmendem Alter des Patienten die MAC von Sevofluran.¹⁴ Der Blut-Gas-Verteilungskoeffizient beschreibt in der Gleichgewichtsphase das Verhältnis von Anästhetikumkonzentration im Blut zu Anästhetikumkonzentration in dem Luft-Gasgemisch der Alveolen. Je kleiner der Blut-Gas-Verteilungskoeffizient ist, desto schneller flutet das Inhalationsanästhetikum an.¹⁵ Der Verteilungskoeffizient beträgt bei Sevofluran 0,63, wodurch die Inhalationsanästhesie mit Sevofluran gut steuerbar ist.^{16,17}

1.2 Mitochondrienfunktion

1.2.1 Oxidative Phosphorylierung

Um eine ausreichende Energieversorgung der Zellen zu gewährleisten, bedarf es der Bereitstellung von ATP durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) in den Mitochondrien. Dabei katalysiert die ATP-Synthase, welche auch als Komplex V der Atmungskette bezeichnet wird und in der inneren Mitochondrienmembran liegt, die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat.

1 Einleitung

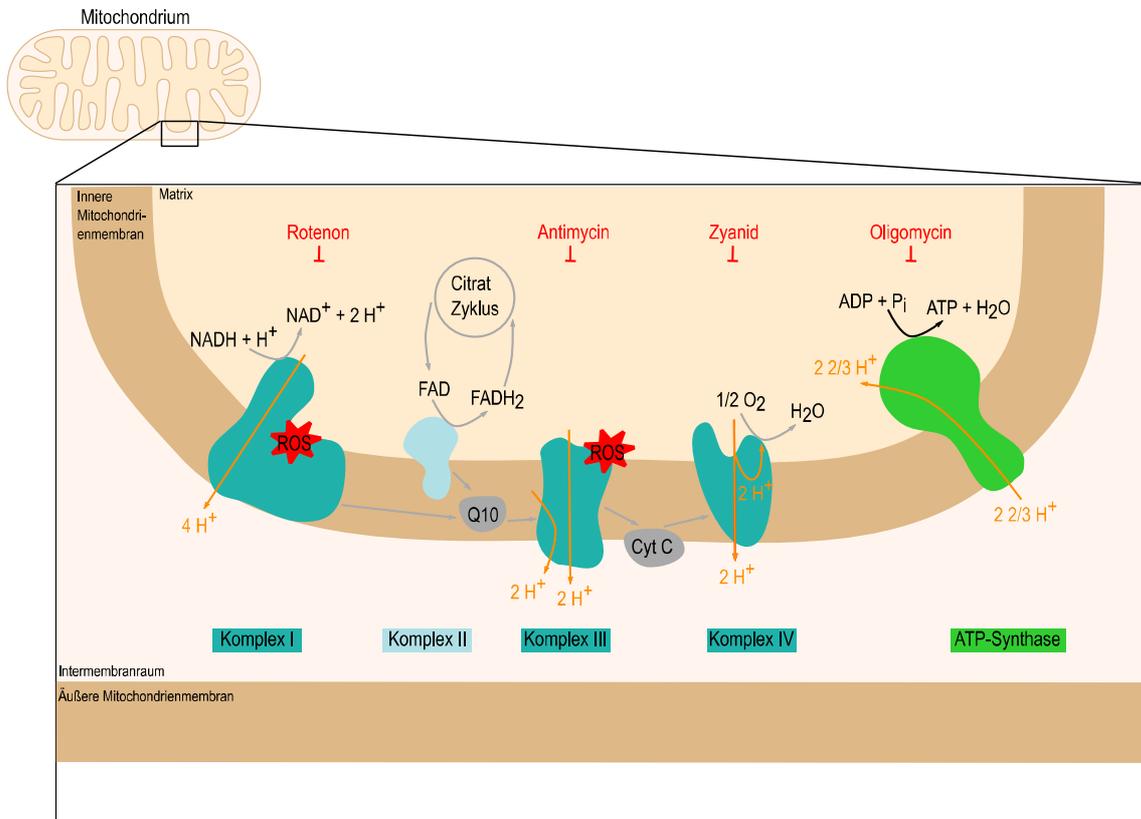


Abbildung 1: Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung

Einspeisung der Elektronen über den Komplex I durch Oxidation von NADH zu NAD⁺ + H⁺. Das Coenzym Q (Q10) nimmt die Elektronen von Komplex I und FAD aus dem Citratzyklus auf und gibt sie an Komplex III ab. An Komplex I und III kommt es zur Entstehung von ROS. Über Cytochrom C (Cyt C) werden die Elektronen zum Komplex IV transportiert, wodurch dort die Reduktion von Sauerstoff (O₂) zu Wasser erfolgen kann. An der ATP-Synthase wird durch den Rückstrom der Protonen in die Matrix ATP synthetisiert. Ebenfalls dargestellt sind die spezifischen Hemmstoffe der Atmungskettenkomplexe und der ATP-Synthase.

Die Triebkraft dafür ist zum einen das Membranpotential und zum anderen der Protonengradient zwischen dem Intermembranraum und der Matrix der Mitochondrien. Zum Aufbau und zur Aufrechterhaltung dieses Protonengradienten, dienen die Komplexe I-IV der Atmungskette, die ebenfalls in die innere Mitochondrienmembran eingebettet sind. Die Komplexe I, III und IV fungieren als Protonenpumpen, welche ihre Energie aus den Elektronen beziehen, die durch die Atmungskette fließen.

Der Komplex I wird auch als NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase bezeichnet, da er Elektronen von NADH aufnimmt und auf das Coenzym Ubichinon reversibel überträgt und dabei 4 Protonen in den Intermembranraum pumpt. Er ist einer der größten bekannten membranständigen Proteinkomplexe mit 44 Untereinheiten und einem Molekulargewicht von fast 1 MDa und gilt zusammen mit Komplex III als Hauptquelle der mitochondrialen ROS.¹⁸⁻²⁰

Der Komplex II oder auch Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase besteht aus 4 Untereinheiten. Bei den beiden hydrophilen Untereinheiten handelt es sich um die Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus. Durch die Oxidation von Fumarat werden zwei Elektronen über FADH_2 auf das Coenzym Ubichinon übertragen. Dabei werden jedoch keine Protonen in den Intermembranraum gepumpt.

Das Coenzym Ubichinon oder auch Coenzym Q ist frei löslich in der inneren Mitochondrienmembran und dient als Elektronen-Überträger. Es nimmt Elektronen von Komplex I und II auf, aber auch von zytosolischem NADH aus der Glykolyse über die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase und über die ETF-Ubichinon-Oxidoreduktase von verschiedenen Reaktionen des mitochondrialen Stoffwechsels. Somit ist das Ubichinon eine zentrale Sammelstelle für Elektronen, welche schließlich an den Komplex III übertragen werden. Ubichinon wird durch die Aufnahme von zwei Elektronen zu Ubichinol reduziert und gibt dadurch, bei der Übertragung der Elektronen auf den Komplex III, zwei Protonen an den Intermembranraum ab.

Beim Komplex III handelt es sich um die Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, welche auch Cytochrom- bc_1 -Komplex genannt wird und besteht aus 11 Untereinheiten. Der Komplex III überträgt Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom C. Ubichinol gibt dabei an der ersten Q-Bindestelle zwei Protonen in den Intermembranraum und zwei Elektronen an Komplex III ab. Die Elektronen können teilweise über den Komplex III rezirkulieren, wodurch an einer zweiten Q-Bindestelle das Ubichinon nochmals zu Ubichinol reduziert wird. Infolgedessen kann das Ubichinol ein weiteres Mal an der ersten Q-Bindestelle zwei Protonen in den Intermembranraum abgeben. Dieser Zyklus wird als Q-Zyklus bezeichnet. Der Hemmstoff Antimycin A kann durch spezifi-

sche Bindung an die zweite Q- Bindestelle den Q-Zyklus unterbrechen. Letztlich werden alle Elektronen auf Cytochrom C übertragen, ein hämhaltiges frei bewegliches Protein an der Außenseite der Innenmembran.

Der letzte Komplex der Elektronentransportkette ist der Komplex IV, auch als Cytochrom-c-Oxidase bezeichnet, da sie die Elektronen von Cytochrom C auf Sauerstoff überträgt. Dabei werden unter der Entstehung von einem Molekül H_2O zwei Protonen über die Membran gepumpt. Der Komplex IV besteht aus 13 Untereinheiten. Der Sauerstoff bindet erst im reaktiven Zentrum, wenn dieses schon mit zwei Elektronen besetzt ist. Somit wird das Sauerstoffmolekül unmittelbar im reaktiven Zentrum zur Peroxidstufe reduziert und in seine beiden Einzelatome gespalten. Auf diese Weise kann effektiv die Bildung schädlicher Hyperoxid-Anionen verhindert werden. Zyanid-Ionen (CN^-) haben eine hohe Affinität für die Sauerstoffbindestelle und bringen daher die Zellatmung zum Erliegen.

Die ATP-Synthase (Komplex V) nutzt den, durch die Atmungskette aufgebauten, Protonengradienten und das Membranpotential um die Reaktion von ADP und Phosphat zu ATP zu katalysieren. Sie besteht aus 16 Untereinheiten, diese bilden zum einen den membranständigen F_0 -Teil, durch den die Protonen fließen, und zum anderen den in die Matrix hineinragenden F_1 -Teil, welcher die Nucleotidbindungsstellen enthält. Durch die, entlang ihres Gradienten in die Matrix strömenden, Protonen, wird eine Rotation im F_0 -Teil der ATP-Synthase bewirkt.²¹ Dadurch kann im F_1 -Teil ATP synthetisiert und freigesetzt werden. Der Hemmstoff Oligomycin kann am F_0 -Teil binden und somit die ATP-Synthase hemmen.^{18,22,23}

Die Annahme, dass die Komplexe der Atmungskette frei in der Mitochondrienmembran diffundieren und der Elektronentransfer bei zufälligen Kollisionen stattfindet, verliert zunehmend an Bedeutung.²⁴ Im letzten Jahrzehnt gab es immer mehr Publikationen welche darauf hinwiesen, dass es zwischen den

Komplexen stabile Interaktionen in Form von definierten Superkomplexen gibt.²⁵⁻²⁸

Die Komplexe I, III und IV bilden Superkomplexe, welche auch Respirasomen genannt werden, die speziesabhängig unterschiedliche Konfigurationen und Stöchiometrien annehmen können. So sind Kombinationen von Komplex I/III_n, Komplex I/III_n/IV_n und Komplex III/IV_n bekannt.²⁹⁻³² Komplex II hingegen liegt vor allem frei in der inneren Mitochondrienmembran vor und nur ein kleiner Teil scheint mit dem Superkomplex I/III/IV assoziiert zu sein.^{33,34} Komplex V bildet Dimere, welche als lange Ketten zusammengelagert, zur Form der Cristae beitragen.³⁵ Es gibt Hinweise, dass die Superkomplexe *in vivo* in einer komplexeren Organisation vorliegen und sich in Ketten oder Reihen zu sogenannten Megakomplexen zusammenlagern.^{36,37}

Die Superkomplexe scheinen vor allem für die Stabilität der einzelnen Komplexe eine bedeutende Rolle zu spielen.^{27,38} Es wird vermutet, dass es innerhalb der Superkomplexe zu allosterischen Effekten kommt, wodurch eine maximale enzymatische Aktivität ermöglicht wird. Durch die räumliche Nähe und Orientierung zueinander bietet sich ein kinetischer Vorteil durch einen beschleunigten Transfer der Elektronen zwischen den Komplexen.³⁹ Es konnte eine erhöhte ROS Bildung bei isoliert vorliegendem Komplex I gemessen werden, so dass die Assoziation von Komplex I innerhalb der Superkomplexe, die ROS Bildung einzuschränken scheint.⁴⁰ Die Assoziation der Komplexe in der mitochondrialen Membran zu Superkomplexen wird durch den Gehalt an Lipiden und deren Zusammensetzung beeinflusst.^{41,42}

1.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind kleine, kurzlebige und sehr reaktive Moleküle, die durch eine inkomplette Reduktion von Sauerstoff entstehen. Freie Radikale wie das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) und das Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) und Peroxide wie das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zählen zu den ROS.⁴³

ROS werden in vielen Kompartimenten der Zellen und von vielen verschiedenen Enzymen generiert. So sind die membranständigen NADPH Oxidasen, der Fettstoffwechsel in den Peroxisomen, aber auch zytosolische Enzyme wie die Cyclooxygenasen an der Entstehung von ROS beteiligt.⁴⁴ Der überaus größte Teil entsteht jedoch in den Mitochondrien.^{45,46}

In der Signaltransduktion spielen ROS eine wichtige physiologische Rolle, sind aber in höheren Konzentrationen, aufgrund ihrer Reaktivität, schädlich für viele zelluläre Bestandteile wie die mitochondriale DNA^{47,48}, aber auch für Proteine⁴⁹ und Lipide⁵⁰. Dadurch scheinen ROS einen großen Anteil am Alterungsprozess der Zellen zu haben.^{51,52} Die über ROS vermittelten Effekte schützen die Zellen wiederum gegen oxidativen Stress.⁴⁸ Mitochondrien produzieren unter physiologischen Bedingungen geringe Mengen an ROS als Nebenprodukt des oxidativen Metabolismus. Vor allem an Komplex I und III, aber auch bei Nebenreaktionen des Cytochrom P450, kann es, durch eine ein-Elektronen Reduktion zur Entstehung von Hyperoxid-Anionen kommen.^{53,54}

Die Superoxiddismutase wandelt zwei Hyperoxid-Anionen in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid um und bildet so einen wichtigen Baustein in der Entgiftung von ROS. Die drei unterschiedlichen Typen von Superoxiddismutasen unterscheiden sich sowohl durch ihre Lokalisation als auch durch ihr aktives Zentrum. Zu ihnen gehören die dimere zytoplasmatische CuZn-Superoxiddismutase (SOD1) und die beiden tetramere mitochondriale Mn-Superoxiddismutase (SOD2) und die extrazelluläre CuZn-Superoxiddismutase (SOD3).⁵⁵ Die Expression von SOD2 kann durch oxidativen Stress verursacht z.B. durch UV-Strahlung oder Hyperoxie, induziert werden.⁵⁶⁻⁵⁸ Wasserstoffperoxid kann zum einen, durch Katalasen über die Reaktion zu Wasser und Sauerstoff unschädlich gemacht werden und zum anderen, durch verschiedene Glutathion Peroxidasen, welche die Reaktion zu reduziertem Glutathion und Wasser katalysieren.⁵⁹ Aber auch Cytochrom C, Ubichinol und Vitamin E haben antioxidative Wirkung.⁶⁰⁻⁶²

Oxidativer Stress beschreibt die verschiedensten schädlichen Effekte, die durch ein Ungleichgewicht zwischen der Bildung von ROS und der limitierten antioxi-

dativen Entgiftung entstehen. Die Pathogenesen vieler verschiedener neurodegenerativer wie Morbus Parkinson, als auch kardiopulmonaler Erkrankungen werden in Verbindung mit oxidativem Stress gebracht.⁶³

Bei einem myokardialen Ischämie/Reperfusionsschaden kann es zu einer exzessiven ROS Produktion kommen.⁶⁴⁻⁶⁷ So kommt es nach einer längeren Ischämiephase, nach Zuführung von Sauerstoff durch Reperfusion, zu einem ROS Anstieg.^{68,69} Aber auch schon während der Ischämie kommt es zu einer vermehrten ROS Produktion.⁷⁰ Die Überproduktion von mitochondrialen ROS führt zu einer Inaktivierung der Enzyme der Atmungskette, der Antioxidationsenzyme, der Lipid Peroxidation und zur Schädigung der mitochondrialen DNA.⁷¹

An Proteinen kann oxidativer Stress zu reversiblen, als auch irreversiblen Veränderungen führen. Die reversiblen Veränderungen können durch spezifische Enzyme wieder repariert werden, scheinen aber auch die Proteinfunktionen zu beeinflussen und eine Rolle in der Redox Regulation zu spielen.⁷² Irreversible Veränderungen wie die Carbonylierung von Proteinen können nicht rückgängig gemacht werden und gelten daher als Marker der oxidativen Schädigung von Proteinen. Viele verschiedene Mechanismen tragen zur Carbonylierung von Proteinen und Aminosäuren bei. So können ROS direkt mit bestimmten Aminosäureseitenketten, wie Prolin, Arginin, Lysin und Threonin reagieren, welche dadurch zu Aldehyden oder Ketonen oxidiert werden.⁷³ Durch Reaktionen mit den Produkten der Lipidperoxidation wie Malondialdehyd, 2-Propenal und 4-Hydroxynonenal können ebenfalls Carbonylierungen entstehen. Bei der sogenannten Michael Addition handelt es sich um eine Addition von reaktiven Aldehyd Gruppen an die Seitenketten von Histidin-, Lysin- und Cysteinresten.^{74,75} Reaktive Carbonylgruppen können aber auch durch die Reaktion von Lysinresten mit reduzierenden Zuckern oder ihren Oxidationsprodukten entstehen.⁷⁶⁻⁷⁸

Wenn die zellulären Abwehrmechanismen nicht mehr ausreichen und die Schäden durch den oxidativen Stress zu groß sind, kann dies zum Zelltod und zur Apoptose führen. Diese kann sowohl durch extrazelluläre Signale über den extrinsischen Weg, als auch durch intrazelluläre Prozesse und somit über den intrinsischen Weg getriggert werden. Vermehrte Bildung mitochondrialer ROS

löst den intrinsischen Weg, durch Erhöhung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (Mitochondrial Permeability Transition mPT) aus.⁷⁹

1.2.3 Mitochondrial Permeability Transition

Unter physiologischen Bedingungen sind die mitochondrialen Membranen für Moleküle von einer Größe über 1500 Da nicht frei passierbar. Eine Vielzahl von Faktoren, wie zum Beispiel die Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, oxidativer Stress, Depletion von Adenin Nukleotiden oder eine erhöhte Phosphatkonzentration können zu einer Durchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran führen, welche im Weiteren Mitochondrial Permeability Transition (mPT) genannt wird.⁸⁰

Die mPT bewirkt eine Größenzunahme bzw. Schwellung der Mitochondrien, eine Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran und schließlich die Freisetzung apoptotischer Mediatoren. Durch den Zusammenbruch des Protonengradienten kommt es zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, welche zu einer ATP Depletion führt. Moleküle mit einem niedrigen Molekulargewicht und Ionen können nun ebenfalls in die Matrix der Mitochondrien diffundieren. Dies führt dazu, dass die unter physiologischen Umständen bestehenden Gradienten, zwischen dem Zytosol und der Matrix der Mitochondrien, zusammenbrechen und das akkumulierte Ca^{2+} aus der Matrix ausströmen kann. Die hohe Proteinkonzentration in der Matrix und der daraus resultierende hohe kolloidosmotische Druck, verursachen eine Schwellung der Mitochondrien.⁸¹ Kommt es zur Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran gelangen Cytochrom C und andere proapoptotische Proteine in das Zytosol.^{82,83}

Die mPT scheint ein wichtiger Baustein eines Reperfusionsschadens zu sein und bietet somit ein effektives Ziel der Kardioprotektion.⁸⁴⁻⁸⁶ Martin Crompton beschrieb erstmals, dass die mPT auf einen Reperfusionsschaden des Herzens nach einer Ischämie hindeutet.^{87,88} Andere Arbeiten bestätigten, dass bei Reperfusionsschäden mPT auftritt und dass die Verhinderung von mPT einen Schutz vor Reperfusionsschäden darstellt.^{89,90}

Als Erklärung für die Durchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran und der Ausbildung der mPT nahm man an, dass sich eine sogenannte Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) bildet. Dabei werden die äußere und innere Mitochondrienmembran über eine Art Proteinkomplex miteinander verbunden und es kommt zur Ausbildung der mPTP. Als Bestandteile dieses Multi-komplexes wurden unter anderem der spannungsabhängige Anionenkanal (VDAC), das Translocator Protein (TSPO), welche sich beide in der äußeren Mitochondrienmembran befinden, sowie der Adenin Nukleotidtransporter (ANT) der inneren Mitochondrienmembran und die in der Matrix befindliche Peptidyl-Prolin Isomerase Cyclophilin D (CypD), diskutiert.⁹¹⁻⁹³ Jedoch konnte durch genetische Modifikationen gezeigt werden, dass trotz Verlust von ANT⁹⁴, VDAC⁹⁵, und TSPO⁹⁶ eine mPT ausgelöst werden kann. Neuere Studien weisen darauf hin, dass die mPTP durch ein Dimer der F₀F₁-ATP-Synthase gebildet wird. Es konnte gezeigt werden, dass das regulatorisch wirkende CypD abhängig von P_i (anorganisches Phosphat), an die Untereinheiten b, d und oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP) bindet.^{97,98} Mäuse mit einem CypD Mangel scheinen vor einem Reperfusionsschaden *in vivo* geschützt zu sein, während *in vitro* deren Mitochondrien keine Schwellung und keine mPT aufwiesen.⁹⁹ Dies unterstreicht die essentielle Rolle der mPTP, wobei die genauen molekularen Mechanismen noch weiterer Aufklärung bedürfen.

1.3 Fragestellung

Gerschman begründete erstmals die Toxizität von Sauerstoff, durch die Bildung von freien Radikalen und deren oxidativen Eigenschaften. Sie postulierte ebenfalls, dass eine Sauerstoffkonzentration von 20% möglicherweise toxisch ist und die Zunahme von Sauerstoff in der Atmosphäre die Evolution eines zellulären Abwehrmechanismus bewirkte.¹⁰⁰ Diese These wurde gestützt, durch die Beobachtung, dass anaerobe Bakterien, welchen die Enzyme Katalase und Superoxiddismutase fehlen, unter physiologischen Sauerstoffbedingungen nicht lebensfähig sind. Erhöhte Sauerstoffkonzentrationen können, appliziert über

einen größeren Zeitraum von Tagen, zu einer Schädigung der menschlichen Lunge führen.¹⁰¹ In Tierversuchen konnte eine letale Schädigung der Lunge durch Sauerstoff beobachtet werden.^{102,103} Eine Hyperoxie führt zu einer Vaskonstriktion in der Endstrombahn vieler Organe, die maßgeblich auf die Bildung von ROS zurückzuführen ist.^{9,10,104,105} Des Weiteren scheint eine erhöhte Sauerstoffkonzentration einen reduzierenden Effekt auf das Schlagvolumen und die Herzfrequenz zu haben, woraus ein vermindertes Herzzeitvolumen folgt.^{5,106,107} Aber auch für ein erhöhtes Risiko einer Atemwegsentzündung¹⁰⁸ und für Störungen des Blutglukosespiegels¹⁰⁹ werden hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen verantwortlich gemacht. Es werden aber auch positive Effekte wie eine verbesserte Heilung kolorektaler Anastomosen¹¹⁰, die Reduktion von postoperativer Übelkeit und Erbrechen^{111,112} beschrieben und es wird ein möglicher positiver Einfluss auf die postoperative Wundheilung¹¹³⁻¹¹⁷ diskutiert.

Lange Zeit galt die Gabe von 100% Sauerstoff als therapeutische Notfallmaßnahme erster Wahl bei akuten Krankheitsbildern wie dem akuten Koronarsyndrom, Schlaganfall oder unter Reanimation.¹¹⁸⁻¹²⁰ In den aktuellen Leitlinien des European Resuscitation Councils (ERC) wird die Gabe von Sauerstoff weitaus kritischer gesehen und nur noch empfohlen bei Symptomen von Dyspnoe, Herzinsuffizienz und Zeichen der Hypoxie.¹²¹

Bisweilen gibt es wenige prospektive, randomisierte und verblindete Studien zu den Effekten einer Hyperoxie in den Bereichen der Anästhesie und Intensivmedizin. Ebenso ist die Datenlage zur optimalen perioperativen FiO_2 uneinheitlich und wird kontrovers diskutiert. Es konnte bisher weder bewiesen noch widerlegt werden, dass eine hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentration zur Verbesserung des perioperativen Outcomes beiträgt. Zudem untersuchten Studien, welche auf volatile Anästhetika und mitochondriale Funktion oder die Modulation von oxidativem Stress Bezug nehmen, mehrheitlich vor allem die Konditionierung durch Anästhetika, wohingegen Änderungen der mitochondrialen Respiration unter einer Allgemeinanästhesie per se nicht analysiert wurden.

1 Einleitung

Daher war das Ziel dieser Arbeit Veränderungen mitochondrialer Atmungskettenfunktionen und die hieraus resultierenden oxidativen Schäden unter einer inhalativen Anästhesie mit Sevofluran in Abhängigkeit von der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsgenehmigung

Nach Antragstellung gemäß dem Tierschutzgesetz über Versuche an lebenden Tieren, wurde von der zuständigen Behörde der Regierung von Unterfranken in Würzburg die Tierversuchsgenehmigung unter dem Aktenzeichen 10/12 erteilt.

2.2 Präparation der Versuchstiere

2.2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von sieben Wochen (Harlan Laboratories, Inc., Niederlande). Die Tiere wurden für mindestens eine Woche nach Ankunft im Tierstall der Universitätsklinik in einem geregelten 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. In dem Tierstall herrschten Standardbedingungen mit konstanter Umgebungstemperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Alle Tiere erhielten feste Nahrung und Wasser ad libitum.

2.2.2 Anästhesie und Beatmung

Die Versuchstiere wurden einer von 4 Studiengruppen randomisiert zugeordnet. Bei Tieren welche in die Wildtypgruppe (WT) randomisiert wurden, erfolgte die Euthanasie durch zervikaler Dislokation ohne weitere Interventionen. Die Tiere die den 3 weiteren Gruppen zugeordnet wurden erhielten eine Sevoflurannarkose mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen. Zur Einleitung der Narkose wurde 60 µg/ g Pentobarbital-Natrium verwendet, welches den Mäusen intraperitoneal injiziert wurde und zur Aufrechterhaltung der Narkose bei Bedarf nachgegeben wurde. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde im Verlauf wiederholt der Kornealreflex und der Fußwegzieh-Reflex durch Druckreiz auf die Hinterpfoten getestet. Um die Körpertemperatur der Mäuse, welche rektal gemessen wurde, konstant bei 37 °C ± 0,1 °C zu halten, wurde sie auf eine Wär-

meplatte gelegt. Die Tiere wurden tracheal intubiert und je nach Gruppe mit einem inspiratorischen Sauerstoffanteil von 21%, 50% oder 100% und mit einer MAC von 1,0 Sevofluran über 6 Stunden druckkontrolliert beatmet. Dabei betrug die Atemfrequenz 130 Atemzügen pro Minute, der maximale Beatmungsdruck 30 cm H₂O und der positive endexpiratorische Druck 1-3 cmH₂O. Zur kontinuierlichen Überwachung der Herzfrequenz wurde ein Drei-Kanal-EKG angeschlossen.

2.2.3 Organentnahme

Nach Euthanasie der Tiere wurde für die Präparation das Fell mit flüssigem Paraffin bestrichen und mit Hilfe eines Stereomikroskopes eine Thorakotomie vorgenommen, um das Herz zu entnehmen. Anschließend erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle und zügig die Entnahme der Niere. Die Organe wurden sofort in eiskaltes PBS gegeben und gespült.

2.3 Biochemische Auswertung

2.3.1 Herstellung der Lysate

Nach der Präparation der Organe wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt und eiskalte Lösungen verwendet. Die Organe wurden sofort in PBS Puffer gewaschen und im Mitochondrienisolationspuffer 1 manuell zerkleinert. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe eines Homogenisators in einem Glaszylinder und dem entsprechenden Glaskolben bei ca. 1500 U/ min homogenisiert.

2.3.2 Mitochondrienisolation

Das jeweilige Homogenisat wurde bei 4 °C und 800 g für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde nun nochmals bei 4 °C und 4000 g für 20 min zentrifugiert. Der hierbei gewonnene Überstand wurde verworfen und das Pellet in dem Mitochondrienisolationspuffer 2 resuspendiert.

Verwendete Lösungen:

- Mitochondrienisolationsspuffer 1 (pH 7,5)
 - 0,25 mol/ l Sucrose
 - 10 mmol/ l Tris
 - 10 mmol/ l HEPESIn H₂O gelöst
- Mitochondrienisolationsspuffer 2 (pH 7,5)
 - 0,25 mol/ l Sucrose
 - 10 mmol/ l Tris
 - 10 mmol/ l HEPES
 - 1 mmol/ l EGTAIn H₂O gelöst

2.3.3 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe der BCA Methode. Dabei werden Cu²⁺ Ionen in alkalischer Lösung mit Protein zu Cu⁺ Ionen reduziert. Bicinchoninsäure bildet mit den Cu⁺ Ionen einen violetten Farbkomplex, dessen Absorption spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann.¹²²

Für die Proteinbestimmung wurde das Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet und die Bestimmung nach Angaben des Herstellers und in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Nach Herstellung einer BSA-Standard Verdünnungsreihe wurden die Proben 1:25 verdünnt. Auf einer Mikrotiterplatte wurden pro Vertiefung je 25 µl BSA-Lösung oder Probe aufgetragen. Nach Zugabe von 200 µl Arbeitsreagenz wurde die Mikrotiterplatte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem Spektralphotometer gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Standardwerte berechnet.

Ein Aliquot frisch isolierter Mitochondrien wurde direkt anschließend für den Swelling Assay verwendet. Die isolierten Mitochondrien wurden zu einer Kon-

zentration von 5 µg/ µl mitochondriales Protein mit Mitochondrienisolationpuffer 2 verdünnt, aliquotiert und bei -37 °C gelagert. Die Membran der Organellen wurde durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren fragmentiert.

2.3.4 Calcium induzierte mitochondriale Schwellung

Durch exogene Zugabe von Ca^{2+} kann eine mPT induziert werden, wodurch ein Zusammenbruch des Membranpotentials und die Zunahme des mitochondrialen Volumens bewirkt wird. Dies führt dazu, dass die äußere Membran reißt und es zu einem irreversiblen Funktionsverlust kommt.¹²³ Durch die Zerstörungen der Mitochondrien kommt es zu einer Absorptionsänderung, die mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen werden kann.

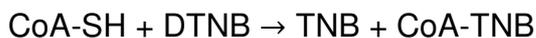
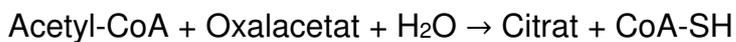
Die nativen frisch isolierten Mitochondrien wurden im Mitochondrienisolationpuffer 2 zu einer Konzentration von 50 µg/ 10 µl verdünnt und auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Jede Probe wurde viermal auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen, da die Absorptionsänderung nach Zugabe von drei unterschiedlichen CaCl_2 Konzentrationen gegen eine Probe ohne Zugabe von CaCl_2 gemessen wurde. Zu allen Proben wurde zügig Swelling Puffer zugegeben zu einer Proteinkonzentration von 2 mg/ ml. Nach Zugabe von CaCl_2 zu einer Endkonzentration von 50 µmol/ l, 100 µmol/ l und 200 µmol/ l je Mitochondrienprobe wurde die Absorptionsänderung bei 540 nm jede Minute mit einem Spektralphotometer über 10 min gemessen.

Verwendete Lösung:

- Swelling Puffer (pH 7,6)
 - 120 mmol/ l KCl
 - 20 mmol/ l MOPS
 - 10 mmol/ l Tris
 - 5 mmol/ l KH_2PO_4In H_2O gelöst

2.3.5 Citrat Synthase Aktivitätsmessung

Die Citrat Synthase ist das Schlüsselenzym im Citratzyklus und gilt als ein enzymatischer Marker der mitochondrialen Matrix.¹²⁴ Der Citratzyklus ist über NADH und FADH₂ mit der Atmungskette verbunden. Die Aktivität der Citrat Synthase wird mit Hilfe des Ellmann's Reagenz DTNB bestimmt.¹²⁵ Dabei katalysiert die Citrat Synthase die Kondensation von Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citrat und CoA-SH. DTNB reagiert nun mit CoA-SH zu TNB, welches sein Absorptionsmaximum bei 412 nm hat. Die Intensität der Absorption von TNB ist proportional zu der Aktivität der Citrat Synthase.



Für die Bestimmung der Citrat Synthase Aktivität wurden die Mitochondrienlysate zu einer Konzentration von 30 µg/ 30 µl mitochondriales Protein mit dem Mitochondrienisolationspuffer 2 verdünnt. Alle für den Test benötigten Lösungen wurden vorbereitet und die Proben in einer Doppelbestimmung gemessen. Es wurde eine Leerprobe mit Mitochondrienisolationspuffer ohne Mitochondrienlysat mitgeführt. Die Proben wurden auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und je 30 µl 0,1% Triton™ X-100 Lösung zugegeben. Anschließend wurden je 225 µl Tris-Lösung und auf 30 °C vorgewärmtes 2,5 µl DTNB und 2,5 µl Acetyl-CoA zugegeben. Die Ellmann's Reaktion wurde mit 12,5 µl Oxalacetat gestartet, welches ebenfalls auf 30 °C vorgewärmt wurde. Die Absorptionsänderung wurde bei 405 nm alle 10 s in einem Spektralphotometer über 30 Zyklen gemessen.

Verwendete Lösungen:

- 0,1 mol/ l Tris in H₂O, pH 8
- 0,1% Triton™ X-100 in PBS
- 0,01 mol/ l DTNB in Ethanol
- 0,01 mol/ l Oxalacetat in H₂O
- 0,03 mol/ l Acetyl-CoA in H₂O

2.3.6 Superoxiddismutase Aktivitätsmessung

Superoxiddismutasen sind Enzyme, welche die Reaktion von Hydroperoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff katalysieren.

Für die Aktivitätsbestimmung der SOD wurde ein kommerziell erhältliches Assay Kit verwendet. Der Test wurde anhand der Herstellerangaben durchgeführt. Das Testprinzip beruht auf der Reaktion von Superoxid-Anionen mit WST-1 zu einem wasserlöslichen Formazan Farbstoff. Diese Reaktion wird durch die Superoxiddismutase inhibiert. Da die Absorption von WST-1 Formazan bei 440 nm proportional zu der Menge an Superoxid-Anionen ist, kann die Superoxiddismutase Aktivität indirekt über die Inhibition durch eine geringere Farbentwicklung gemessen werden.

Nach Herstellung der Lösungen, wurden auf eine Mikrotiterplatte je 20 µg/ 20 µl Mitochondrienlysat in Mitochondrienisolationspuffer 2 aufgetragen. Es wurde je eine Leerprobe 1 ohne Mitochondrienlysat, eine Leerprobe 2 ohne Enzymlösung und eine Leerprobe 3 ohne Mitochondrienlysat und Enzymlösung mitgeführt. Anschließend wurden 200 µl Arbeitsreagenz zu jeder Probe und den Leerproben zugegeben. Es wurden 20 µl Verdünnungspuffer zu Leerprobe 2 und 3 zugegeben und 20 µl Enzymlösung zu jeder Probe und der Leerprobe 1. Nach vorsichtigem Schütteln wurde die Mikrotiterplatte bei 37 °C 20 min inkubiert und danach die Absorption bei 450 nm in einem Spektralphotometer gemessen.

Die Aktivität wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\text{SOD Aktivität (Inhibitionsrate in \%)} = \frac{[(\text{OD Leerprobe 1} - \text{OD Leerprobe 3}) - (\text{OD Probe} - \text{OD Leerprobe 2})]}{(\text{OD Leerprobe 1} - \text{OD Leerprobe 3})} \times 100$$

2.3.7 Messung der Proteincarbonylierung

Die Proteincarbonylierung ist die häufigste, sowie irreversible oxidative Modifikation des Proteoms. Zur Bestimmung der Carbonylierung wurde ein Protokoll basierend auf der Reaktion zwischen 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) und den Carbonylgruppen der oxidierten Proteine angewendet. In diesem Testan-

satz wurde nach Inkubation mit DNPH Natriumhydroxid zugegeben, welches das Absorptionsmaximum der derivatisierten Proteine von 370 nm auf 450 nm verschiebt. Somit kommt es zu weniger Interferenzen durch DNPH und die Proben können direkt quantifiziert werden.¹²⁶

40 µl 10 mM DNPH gelöst in 0,5 mol/ l H₂PO₄ wurde mit 40 µl Mitochondrienlysat (1 mg/ ml Proteinkonzentration) 10 min bei Raumtemperatur in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurden 20 µl 6 mol/ l NaOH zugegeben und weitere 10 min inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 450 nm bei Raumtemperatur in einem Spektralphotometer gemessen.

2.3.8 Photometrische Komplex Aktivitätsmessungen

2.3.8.1 *Komplex I Aktivität*

Alle Schritte der Analyse wurden auf Eis und in Doppelbestimmung durchgeführt. Es wurde eine Leerprobe ohne Mitochondrienlysat und eine Leerprobe mit Mitochondrienlysat aber ohne NADH mitgeführt. Je Vertiefung wurden 15 µg mitochondriales Protein mit hypotonem Puffer (Tris 5 mmol/ l, pH 7,6) zu 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Es wurde ein Reaktionspuffer (2-fach) hergestellt und je 100 µl zu den Proben und den entsprechenden Leerwerten dazugegeben. Sofort danach wurde die Absorptionsänderung bei 540 nm bei Raumtemperatur in einem Spektralphotometer jede Minute über 30 Zyklen gemessen.

Verwendete Lösung:

- Reaktionspuffer (2-fach) Komplex I
 - 10 mmol/ l Tris pH 7,4
 - 2 mg/ ml Nitrotetrazolium Blue chloride
 - 2 mmol/ l Kaliumzyanid, aus 1 mol/ l Stocklösung in DMSO
 - 2 µmol/ l Antimycin A, aus 8 mmol/ l Stocklösung in DMSO
 - 0,2 mg/ ml NADH

In H₂O gelöst

2.3.8.2 **Komplex II Aktivität**

Alle Schritte der Analyse wurden auf Eis und in Doppelbestimmung durchgeführt. Es wurde eine Leerprobe ohne Mitochondrienlysate und eine Leerprobe mit Mitochondrienlysate, aber ohne Decylubiquinon mitgeführt. Je Vertiefung wurden 20 µg mitochondriales Protein mit hypotonem Puffer (Tris 5 mmol/l, pH 7,6) zu 90 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Es wurde ein Reaktionspuffer (2-fach) hergestellt und je 100 µl zu den Proben und entsprechenden Leerproben dazugegeben. Anschließend wurde 10 µl des 2 mmol/l oxidierten Decylubiquinon dazugegeben. Sofort danach wurde die Absorptionsänderung bei 540 nm bei Raumtemperatur in einem Spektralphotometer jede Minute über 30 Zyklen gemessen.

Verwendete Lösung:

- Reaktionspuffer (2-fach) Komplex II
 - 10 mmol/l Tris pH 7,4
 - 40 mmol/l Succinylsäure
 - 2 mg/ml Nitrotetrazolium Blue chloride
 - 2 mmol/l Kaliumcyanid, aus 1 mol/l Stocklösung in DMSO
 - 2 µmol/l Antimycin A, aus 8 mmol/l Stocklösung in DMSO
 - 10 µmol/l Diphenyleneiodoniumchlorid, aus 10 mmol/l Stocklösung in DMSO
 - 0,2 mg/ml NADH
 - 0,4 mmol/l PhenazinmethosulfatIn H₂O gelöst

2.3.8.3 **Komplex III Aktivität**

Alle Schritte der Analyse wurden auf Eis und in Doppelbestimmung durchgeführt. Es wurde eine Leerprobe ohne Mitochondrienlysate und eine Leerprobe mit Mitochondrienlysate aber ohne reduziertes Decylubiquinon mitgeführt. Je Vertiefung wurden 20 µg mitochondriales Protein mit dem Reaktionspuffer zu 80 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Zur Herstellung des reduzierten Decylubiquinon wurde das, in Ethanol zu 10 mmol/l gelöste, Decylubiquinon mit etwas Kalium-

borohydrid vermischt und so viel 0,1 mol/l Salzsäure dazugegeben bis sich die zuvor bräunliche Lösung entfärbt hat. Das oxidierte Kaliumborohydrid wurde durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert und der Überstand mit dem nun reduzierten Decylubiquinon in ein frisches Gefäß überführt. Zur Stabilisierung wurde noch 3 mol/l Salzsäure zugegeben.

Zu den Proben und entsprechenden Leerproben wurde 10 µl des 1 mmol/l Cytochrom C und 10 µl des frisch reduzierten Decylubiquinon dazugegeben. Sofort danach wurde die Absorptionsänderung bei 540 nm bei Raumtemperatur in einem Spektralphotometer alle 3 s über 180 Zyklen gemessen.

2.3.8.4 **Komplex IV Aktivität**

Alle Schritte der Analyse wurden auf Eis und in Doppelbestimmung durchgeführt. Es wurde eine Leerprobe ohne Mitochondrienlysat und eine Leerprobe mit Mitochondrienlysat aber ohne 3,3'-Diaminobenzidine mitgeführt. Je Vertiefung wurden 20 µg mitochondriales Protein mit hypotonem Puffer (Tris 5 mmol/l, pH 7,6) zu 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Zur Herstellung des reduzierten 0,22 mol/l Cytochrom C wurde das, in 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer gelöste, Cytochrom C mit 0,5 mmol/l Dithiothreitol versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zu den Proben und entsprechenden Leerproben wurde 100 µl des Reaktionspuffers (2-fach) zugegeben um die Reaktion zu starten. Sofort danach wurde die Absorptionsänderung bei 540 nm bei Raumtemperatur in einem Spektralphotometer jede Minute über 60 Zyklen gemessen.

Verwendete Lösung:

- Reaktionspuffer (2-fach) Komplex IV
 - 0,1 mol/l Cytochrom C
 - 0,1 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 - 1 mg/ml 3,3'-DiaminobenzidineIn H_2O gelöst

2.3.9 Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Zur Auftrennung intakter mitochondrialer Proteinkomplexe diente die BN-PAGE.^{127,128} Hierfür wurde das PROTEAN® II xi cell- System verwendet.

Zunächst wurde ein Gradientengel hergestellt mit den Maßen 16 x 16 x 0,015 cm. Zur Vorbereitung der Gelkammer wurden die zwei entsprechenden Glasplatten mit 1,5 mm dicken Spacern in einer speziellen Halterung fixiert. Der Gradientenmischer wurde etwas erhöht auf einem Magnetrührer positioniert, die Ventile wurden geschlossen und in die Mischsäule ein Magnetstäbchen gegeben. Für die Herstellung des Gradientengeles wurde in die Reservoirsäule des Gradientenmixers ein 4% Trenngel und in die Mischsäule ein 12% Trenngel gegossen und der Magnetrührer gestartet. Nach Zugabe von APS und TEMED wurden die Ventile geöffnet und die Gelkammer befüllt. Zur Glättung der Oberfläche wurde, eine das Gel bedeckende Menge, Ethanol in die Gelkammer gefüllt.

Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Anschließend wurde ein Kamm, welcher 15 Vertiefungen ausspart, luftblasenfrei in das noch flüssige Sammelgel eingeführt. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Elektrophoresekammer zusammengebaut. Die obere Kammer wurde mit Kathodenpuffer befüllt und die Probenaschen ausgespült.

Die vorbereiteten Proben konnten, nach 40 min Inkubation, zusammen mit dem Proteinstandard in die entsprechenden Probenaschen aufgetragen werden. Je Gel wurden einmal der Proteinstandard und 4 Proben aufgetragen. Diese 4 Proben wurden nochmals auf das gleiche Gel aufgetragen, so dass man das Gel, nachdem die Proben aufgetrennt wurden, in 2 Gelhälften mit den gleichen 4 Proben, trennen konnte. In die untere Kammer wurden 2 l Anodenpuffer gefüllt, die Elektrophoresekammer geschlossen und an den Stromgeber angeschlossen. Die Spannung wurde auf 100 V für 1 h eingestellt und anschließend auf 500 V bei 15 mA erhöht. Nach 12 h wurde der Stromgeber ausgeschaltet, das Gel entnommen und in 2 Gelhälften getrennt. Beide Gelhälften wurden 3 x 3 min in H₂O gewaschen. Die Gelhälfte auf der auch der Proteinstandard aufge-

2 Material und Methoden

tragen wurde, wurde nun mit einer Coomassiefärbung gefärbt. Die andere Gelhälfte wurde für die in-Gel Komplex Aktivitätsmessungen verwendet.

Tabelle 1: Gelzusammensetzung

	Trenngel 4%	Trenngel 12%	Sammelgel 3%
Acrylamid/ Bis	2,4 ml	7,2 ml	1,6 ml
Gel Puffer (3-fach)	6 ml	6 ml	4 ml
H ₂ O	9,6 ml		6,3 ml
Glycerol 25%		4,5 ml	
APS 10%	90 µl	90 µl	100 µl
TEMED	9 µl	9 µl	10 µl
Gesamtvolumen	18 ml	17,7 ml	12 ml

Verwendete Lösungen:

- Probenpuffer (4-fach), pH 7,5
 - 0,1 mol/ l 6-Aminohexansäure
 - 20 mmol/ l Imidazol
 - 40% Glycerol
 - 0,1% Coomassie Blue G250
 In H₂O gelöst
- Gelpuffer (3-fach), pH 7,5
 - 1,5 mol/ l 6-Aminohexansäure
 - 75 mmol/ l Imidazol
 In H₂O gelöst
- Anodenpuffer (10-fach), pH 7,0
 - 0,25 mol/ l Imidazol
 In H₂O gelöst
- Kathodenpuffer (10-fach), pH 7,0
 - 0,5 mol/ l Tricine

- 75 mmol/ l Imidazol
- 0,5% Sodium deoxycholate
- 0,1% n-Dodecyl β -D-maltoside

In H₂O gelöst

- Probenvorbereitung
 - 100 μ g mitochondriales Protein
 - 20% Digitonin (8 g/ g Protein)
 - 50% Coomassie Blue
 - Probenpuffer (1-fach)

Mit Mitochondrienisolationpuffer 2 auf 60 μ l auffüllen

2.3.10 Coomassie Färbung

Das Gel wurde vor der Färbung in einer Fixierlösung für 30 min inkubiert. Nach der Fixierung wurde das Gel 1 h in einer Coomassie Färbelösung gefärbt. Um den Hintergrund wieder zu entfärben, wurde das Gel über Nacht bei 4 °C in H₂O gelagert. Anschließend wurde das Gel blasenfrei in eine Folie gelegt und eingescannt. Die optische Dichte der Proteinbanden wurde mit dem Programm ImageJ ermittelt.

Verwendete Lösungen:

- Fixierungslösung
 - 40% Ethanol
 - 10% Essigsäure

Mit H₂O auffüllen

- Coomassie Färbelösung
 - 10% Essigsäure
 - 6% Coomassie Blau G250

Mit H₂O auffüllen

2.3.11 In-Gel Komplex Aktivitätsmessungen

Zur Bestimmung der Aktivität der Komplexe im Gel wurde das Gel in eine Schale gelegt und mit dem jeweiligen Puffer auf einem Schüttler inkubiert. Die Puffermenge richtete sich dabei nach der Größe der Schale. Danach wurde das Gel in eine Folie gelegt und eingescannt.

Zunächst wurde das Gel mit dem Puffer für die Komplex III Aktivität für 1 h inkubiert. Nachdem das Gel eingescannt wurde, erfolgte die Inkubation des Gels mit dem Puffer für die Komplex IV Aktivität für 30 min, wonach das Gel wieder eingescannt wurde. Anschließend wurde das Gel in H₂O gewaschen und mit dem Puffer für die Komplex I Aktivität 15 min inkubiert und eingescannt. Die optische Dichte der Proteinbanden wurde mit dem Programm ImageJ ermittelt.

Verwendete Lösungen:

- Komplex III Puffer
 - 0,117 mmol/l 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate
 - In 50 mmol/l Natriumphosphat, pH 7,2
- Komplex IV Puffer
 - 0,117 mmol/l 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate
 - 0,05 mmol/l Cytochrom C, aus 2,5 mmol/l Stocklösung
 - In 50 mmol/l Natriumphosphat, pH 7,2
- Komplex I Puffer
 - 1 mg/ml Nitrotetrazolium Blue chloride
 - 0,1 mg/ml NADH
 - In 5 mmol/l Tris, pH 7,4

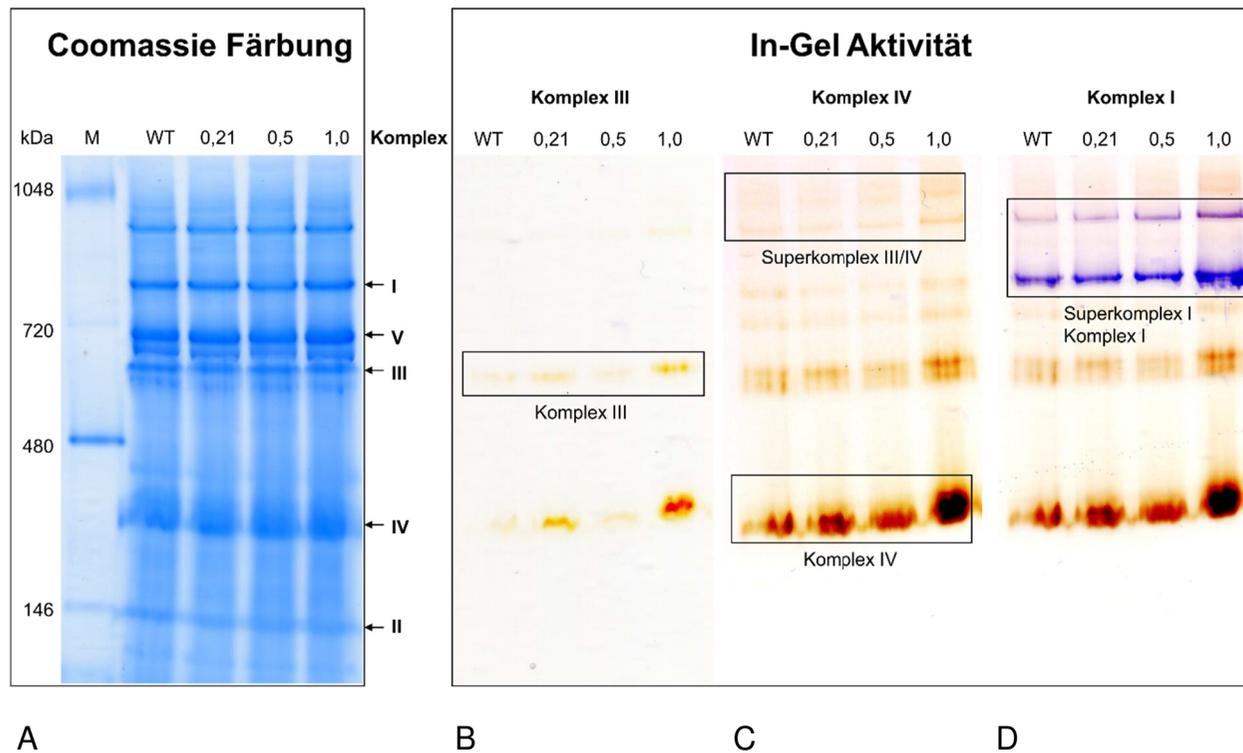


Abbildung 2: Übersicht der sequentiellen in-Gel Färbung A-D

Die Mitochondrienlysate wurden auf ein Gradientengel (4 - 12%) aufgetragen und aufgetrennt. Durch die unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie zeigen sich die Proteinbanden (A). Mit Hilfe des Proteinmarkers lassen sich die Komplexe und Superkomplexe in ihrer spezifischen Position bestimmen. Mit einem separaten Gel wurde die konsekutive in-Gel Aktivität dargestellt. Hierzu wurde das Gel konsekutiv in entsprechende Puffer getaucht und nach Inkubation eingescannt (B, C, D). Komplex III (ca. 490 kDa) erscheint als bräunliche Bande, Komplex IV (ca. 200 kDa) und seine Superkomplexe (ca. 10000 kDa) werden ebenfalls als bräunliche Banden im Gel sichtbar, Komplex I (ca. 1000 kDa) und Superkomplex I (ca. 2500 kDa) färben sich blau an.

A: Anfärbung der Proteinbanden im Gel durch eine Proteinfärbung mit Coomassie, B: Darstellung der in-Gel Aktivität von Komplex III, C: Darstellung der in-Gel Aktivität von Komplex IV und der Superkomplexe III/IV, D: Darstellung der in-Gel Aktivität von Komplex I und Superkomplex I; M = Marker, WT = Wildtyp, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, (n = 5)

2.4 Verwendete Chemikalien und Kits

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Kits

Chemikalie/ Lösung/ Kit	Hersteller
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3,3'-Diaminobenzidine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
30% Acrylamide/Bis Solution	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
6-Aminohexansäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acetyl-CoA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Antimycin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
APS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie Blue G250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cytochrom C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Decylubiquinon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Digitonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diphenyleneiodoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt

2 Material und Methoden

DTNB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
H ₂ O	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
H ₃ PO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES	AppliChem GmbH, Darmstadt
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumborohydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumzyanid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck KGaA, Darmstadt
MOPS	Merck KGaA, Darmstadt
NADH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
NaOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
n-Dodecyl β-D-maltoside	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nitrotetrazolium Blue chloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2 Material und Methoden

	heim
Oxalacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraffin	Merck KGaA, Darmstadt
PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pentobarbital-Natrium, Narcoren®	Merial GmbH, Hallbergmoos
Phenazinmethosulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinstandard, NativeMark Unstained Protein Standard	Life Technologies™ Novex®, USA
Sevofluran	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
SOD Assay Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sodium deoxycholate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Succinylsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, USA
Tricine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris	Merck KGaA, Darmstadt
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.5 Geräte und sonstige Materialien

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller
Beatmungsgerät, SAR-P 830	CWE Inc., Ardmore, PA
Gradientenmischer, MX40	Ilf -Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg
Homogenisator, IKA®RW14 basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Intraoperatives Tierbewärmungssystem, IOW-3703	FMI GmbH, Seeheim-Ober Beerbach
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Narkosegerät, Trajan 808	Drägerwerk AG & Co. KGaA in Lübeck
PROTEAN® II xi cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Scanner, Perfection 3200 Photo	Seiko Epson Corporation, Japan
Schüttler	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
Spektralphotometer, Sunrise™	Tecan Group AG, Schweiz
Stereomikroskop, OPMI-9-FC	Carl Zeiss AG, Jena
Stromgeber, EV265 Consort Power Supply	Hoefer Inc., USA
Zentrifuge, 5418R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Heraeus™ Megafuge™ 16	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Tabelle 4: Sonstige Materialien

Sonstige Materialien	Hersteller
Bildbearbeitungsprogramm Image J	Wayne Rasband (NIH)
Mikrotiterplatte, F-Form	A. Hartenstein GmbH, Würzburg

2.6 Statistik und Auswertung

Die Zusammenstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel 2013.

Die statistische Analyse der Daten innerhalb und zwischen den Versuchsgruppen wurde durch Varianzanalyse mittels ANOVA für wiederholte Messungen und post-hoc Fisher-LSD Test mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

Unterschiede der Daten zwischen den experimentellen Gruppen wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn $*p < 0,05$ war. Alle Werte wurden als arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler angegeben (Mittelwert \pm SD).

3 Ergebnisse

Es wurden 24 männliche Black Six Mäuse 4 experimentellen Gruppen randomisiert zugeordnet. Die Narkoseinduktion erfolgte mittels Pentobarbital (60 µg/ g i. p.), endotrachealer Intubation und druckkontrollierter Beatmung. Die Inhalationsnarkose wurde für weitere 6 Stunden mit 1.0 MAC Sevofluran fortgeführt. Je nach Versuchsgruppe wurde mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 21%, 50% oder 100% ventiliert. Am Ende des Versuchsprotokolls wurden Herz und Nieren entnommen.

3.1 Aktivität der Citrat Synthase

Die Citrat Synthase gilt als ein enzymatischer Marker der mitochondrialen Matrix. So lässt sich über die Aktivität der Citrat Synthase der Gehalt an funktionellen mitochondrialen Proteinen in den Lysaten vergleichen.

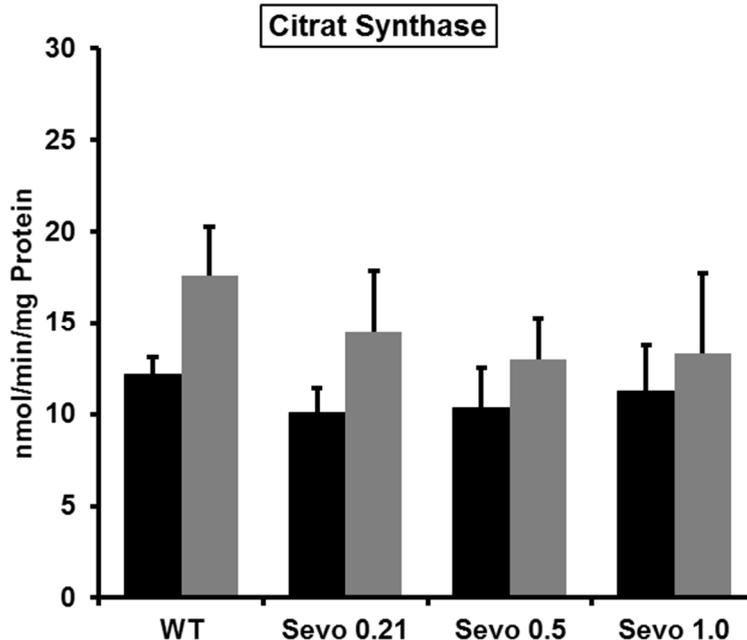


Abbildung 3: **Aktivität der Citrat Synthase**

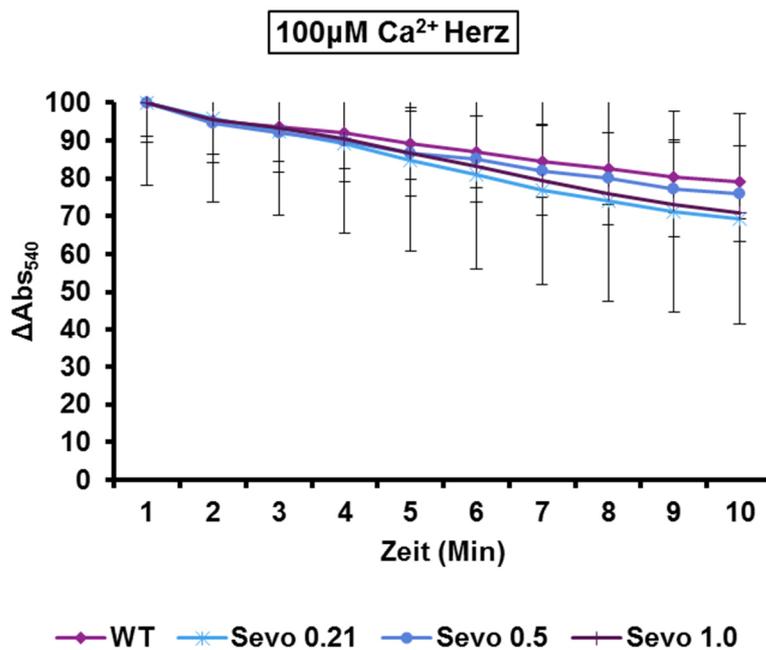
Darstellung der Aktivität der Citrat Synthase in nmol/min/mg Protein aus Mitochondrienlysate des Herzens (schwarzes Balkendiagramm) und der Niere (graues Balkendiagramm); WT = Wildtyp ohne Narkose und Beatmung, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, (n = 6)

3 Ergebnisse

In den Mitochondrienlysaten gab es keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität der Citrat Synthase zwischen den Gruppen. Das deutet darauf hin, dass in den unterschiedlichen Proben eine vergleichbare Menge funktioneller Mitochondrien enthalten war.

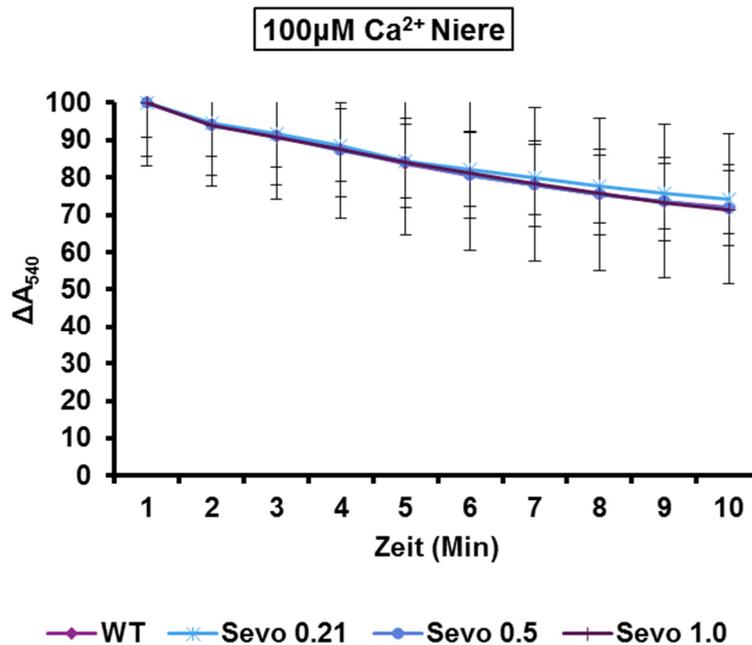
3.2 Calcium induzierte mitochondriale Schwellung

Durch exogene Zugabe von Ca^{2+} zu den frisch isolierten nativen Mitochondrien kann die Ca^{2+} Konzentration in der mitochondrialen Matrix erhöht werden. Dadurch kommt es zur mPT. Die mPT bewirkt eine Schwellung der Mitochondrien, welche dazu führt, dass die äußere Membran reißt.



A

3 Ergebnisse



B

Abbildung 4: Calcium induzierte mitochondriale Schwellung

Darstellung der Calcium induzierten mitochondrialen Schwellung. Messung der Absorption bei 540 nm nach Zugabe von Ca²⁺ (100 μ M) zu den frisch isolierten Mitochondrien aus Herz (A) und Niere (B); W = Wildtyp ohne Narkose und Beatmung, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, (n = 6)

Weder die kardialen noch die renalen Mitochondrien zeigten signifikante Unterschiede in der Absorptionsänderung über die zehnminütige Messdauer. Somit ergab sich nach sechsstündiger inhalativer Anästhesie mit Sevofluran und unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen kein Unterschied in der Permeabilität der renalen und kardialen mitochondrialen Membranen.

3.3 Aktivität der Superoxiddismutase

Die kardiale Aktivität der mitochondrialen Superoxiddismutase als Inhibitionsrate des Enzyms zeigte in der Gruppe mit 50% Sauerstoff während der Beatmung eine signifikante Minderung. In den renalen Proben haben weder Sevofluran noch die differente Sauerstoffkonzentration einen Einfluss auf die Aktivität der Superoxiddismutase.

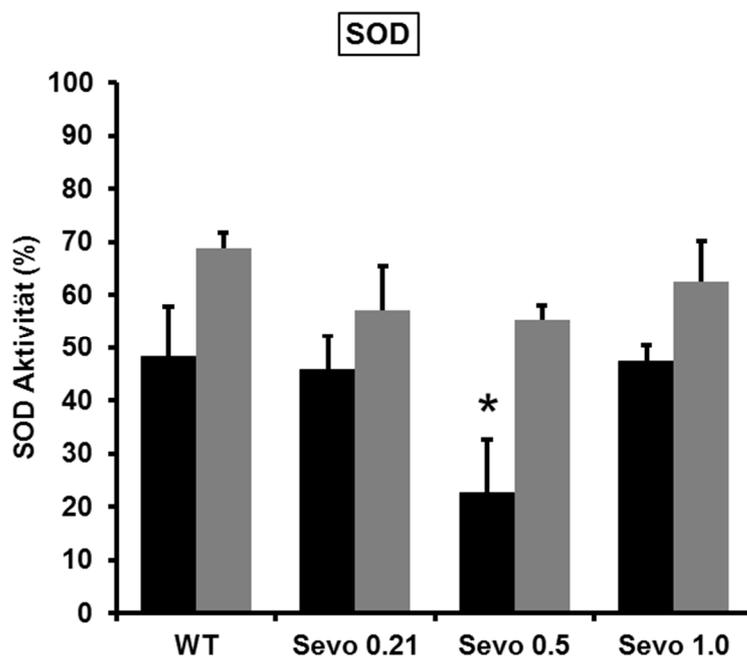


Abbildung 5: Aktivität der mitochondrialen Superoxiddismutase
Dargestellt ist die kardiale (schwarzes Balkendiagramm) und renale (graues Balkendiagramm) Aktivität der mitochondrialen Superoxiddismutase als Inhibitionsrate des Enzyms in %; * $p < 0,05$ vs. WT, WT = Wildtyp ohne Narkose und Beatmung, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, (n = 6)

3.4 Mitochondrialer Proteincarbonylierung mittels DNPH

Als Marker der oxidativen Schädigung von Proteinen gilt die irreversible Proteincarbonylierung. Viele verschiedene Mechanismen tragen zur Carbonylierung von Proteinen und Aminosäuren bei. Proteincarbonylierung ist die häufigste, sowie irreversible oxidative Modifikation des Proteoms.

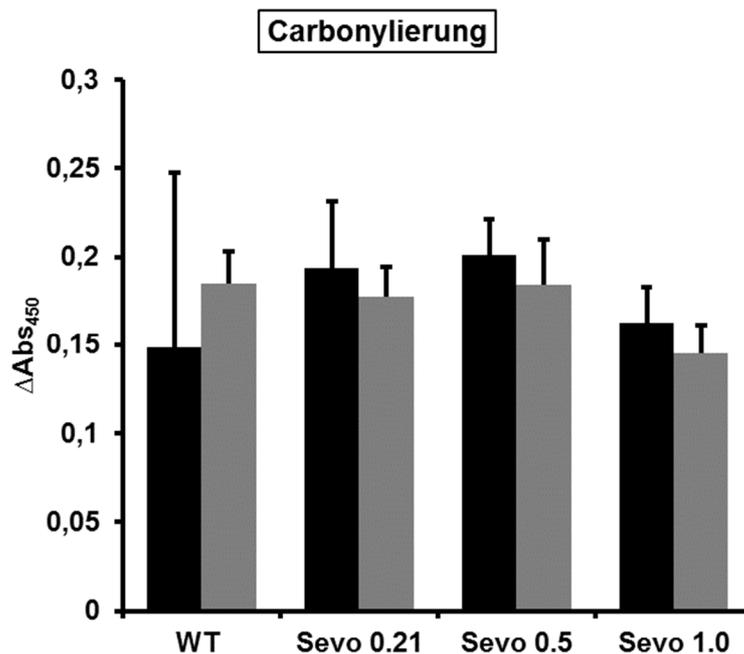


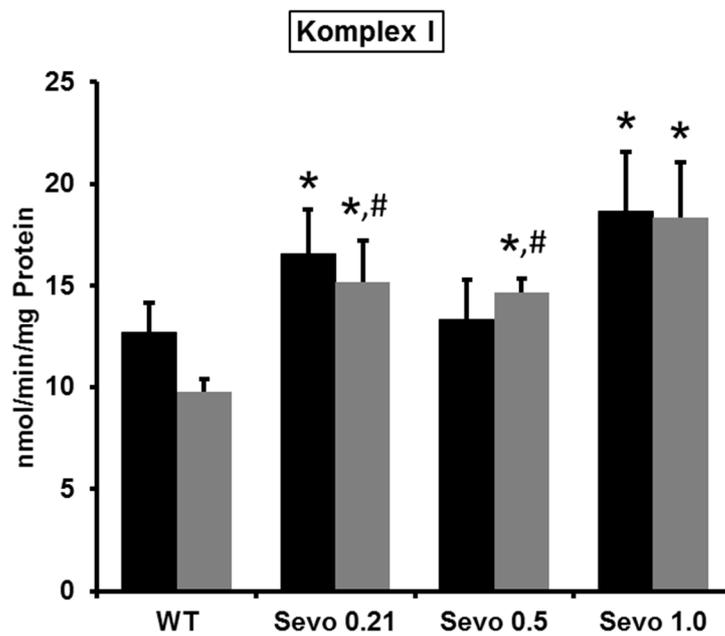
Abbildung 6: **Mitochondriale Proteincarbonylierung**

Dargestellt ist die kardiale (schwarzes Balkendiagramm) und renale (graues Balkendiagramm) mitochondriale Proteincarbonylierung mittels DNPH bei einem Absorptionsmaximum von 450 nm; WT = Wildtyp ohne Narkose und Beatmung, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, (n = 6)

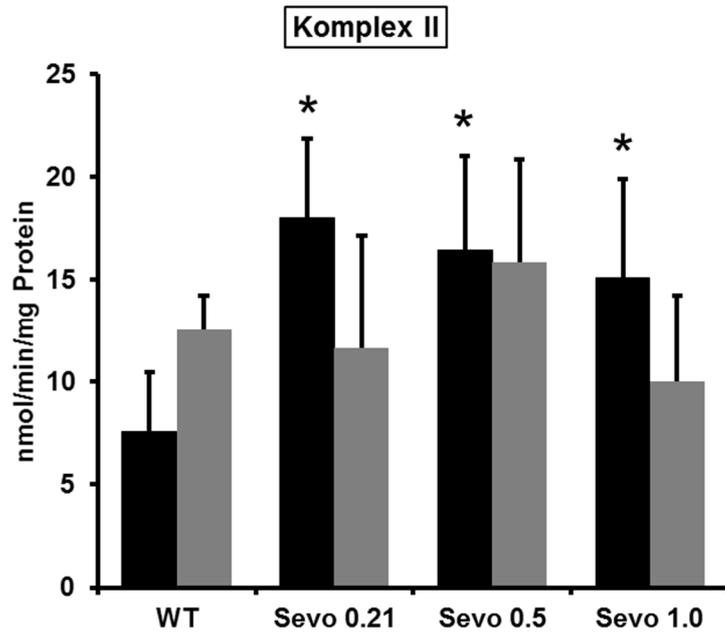
Die Menge an Proteincarbonylierung zeigt sich nach sechstündiger inhalativer Anästhesie mit unterschiedlichen inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen im renalen und kardialen Gewebe unverändert.

3.5 Aktivitäten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe mittels spezifischer photometrischer Assays

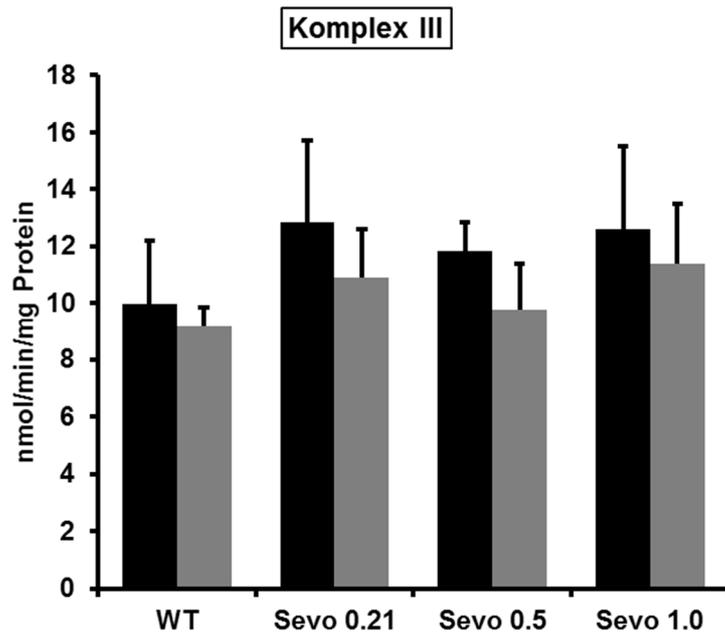
Um herauszufinden ob unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen Einfluss auf die Aktivität der Komplexe der Atmungskette haben, wurden spezifische photometrische Messungen durchgeführt.



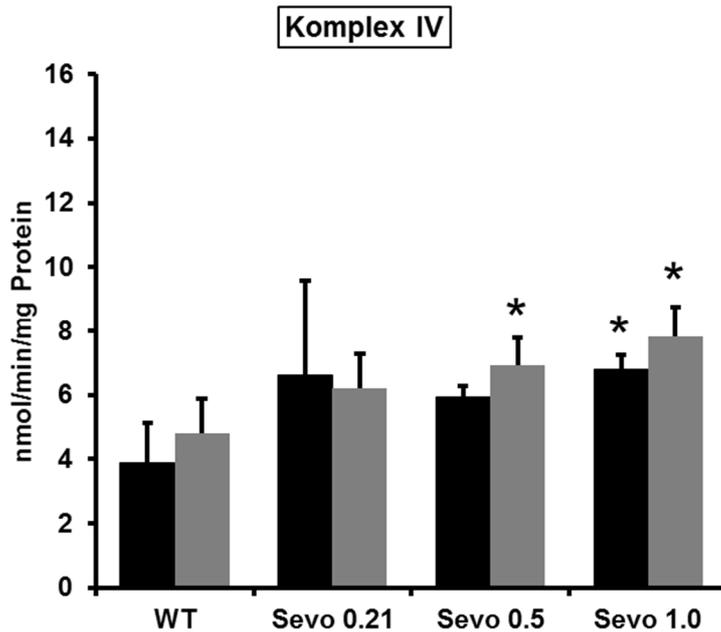
A



B



C



D

Abbildung 7: Aktivitäten der Atmungskettenkomplexe I-IV, A-D

Dargestellt sind die Aktivitäten in nmol/min/mg Protein der Atmungskettenkomplexe I, II, III und IV jeweils isoliert aus Herz (schwarzes Balkendiagramm) und Niere (graues Balkendiagramm); * $p < 0,05$ vs. WT; # $p < 0,05$ vs. Sevo 1,0, WT = Wildtyp ohne Narkose und Beatmung, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, (n = 6)

Sevofluran bewirkte unabhängig von der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration in kardialen Mitochondrien signifikant erhöhte Aktivitäten der Komplexe I und II. In renalen Mitochondrien zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Aktivität von Komplex I, jedoch keine erhöhte Aktivität von Komplex II.

Die Aktivität von Komplex III zeigte sich unter unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in beiden Geweben unverändert.

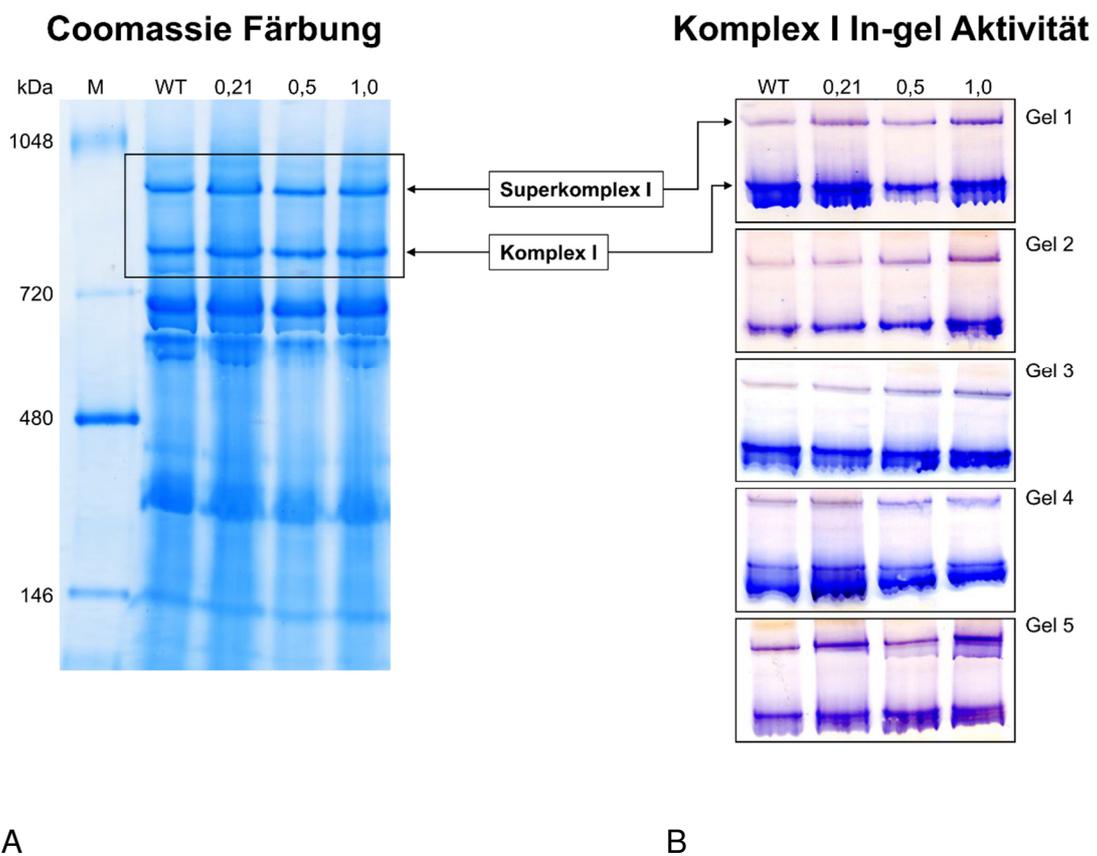
Die Aktivität von Komplex IV stieg nur unter der Verwendung einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 100% in kardialen Mitochondrien bzw. von 50% und 100% in renalen Mitochondrien an.

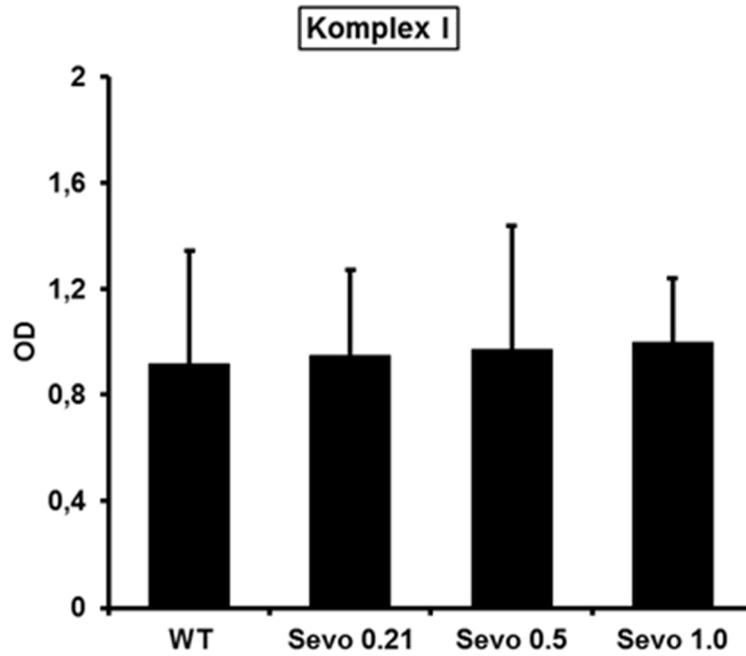
3.6 Native Gelelektrophorese zur Charakterisierung mitochondrialer Superkomplexe

Für die Darstellung der in-Gel Aktivität intakter mitochondrialer Proteinkomplexe und ihrer Superkomplexe diente die BN-PAGE Elektrophorese. Hierbei lassen sich die Superkomplexe abhängig von Größe und Struktur von den Komplexen trennen. Die Proteine werden dabei nicht denaturiert und liegen in ihrer nativen Form vor, so dass die Katalyse ihrer spezifischen Reaktionen noch gegeben ist. Durch Zugabe der entsprechenden Substrate kann somit die jeweilige Reaktion ausgelöst und durch Kopplung an Nebenreaktionen makroskopisch sichtbar gemacht werden.

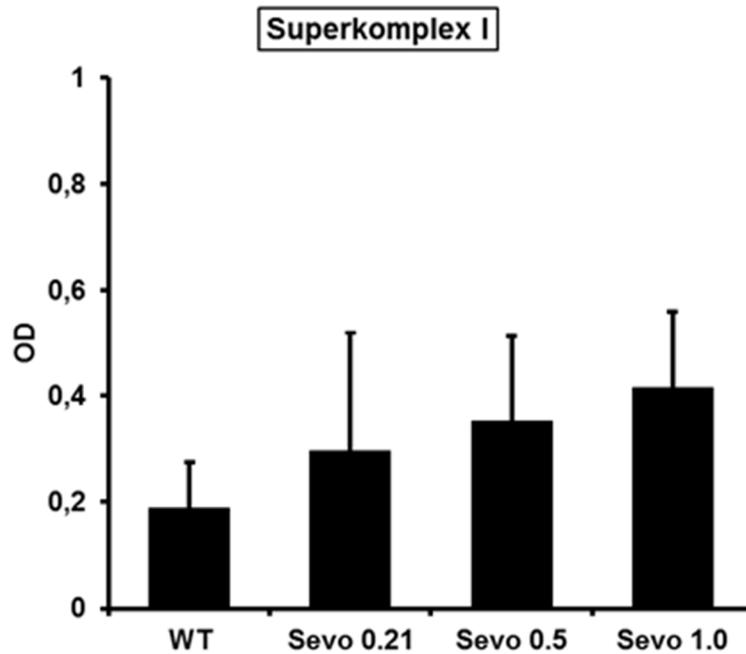
3.6.1 Komplex I in-Gel Aktivität in kardialen Mitochondrien

Komplex I aus den kardialen Mitochondrien zeigte keine Veränderung bezüglich seiner Aktivität bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen. Die Superkomplex I Aktivität stieg mit zunehmender Sauerstoffkonzentration an, jedoch in einem nicht signifikanten Ausmaß.





C

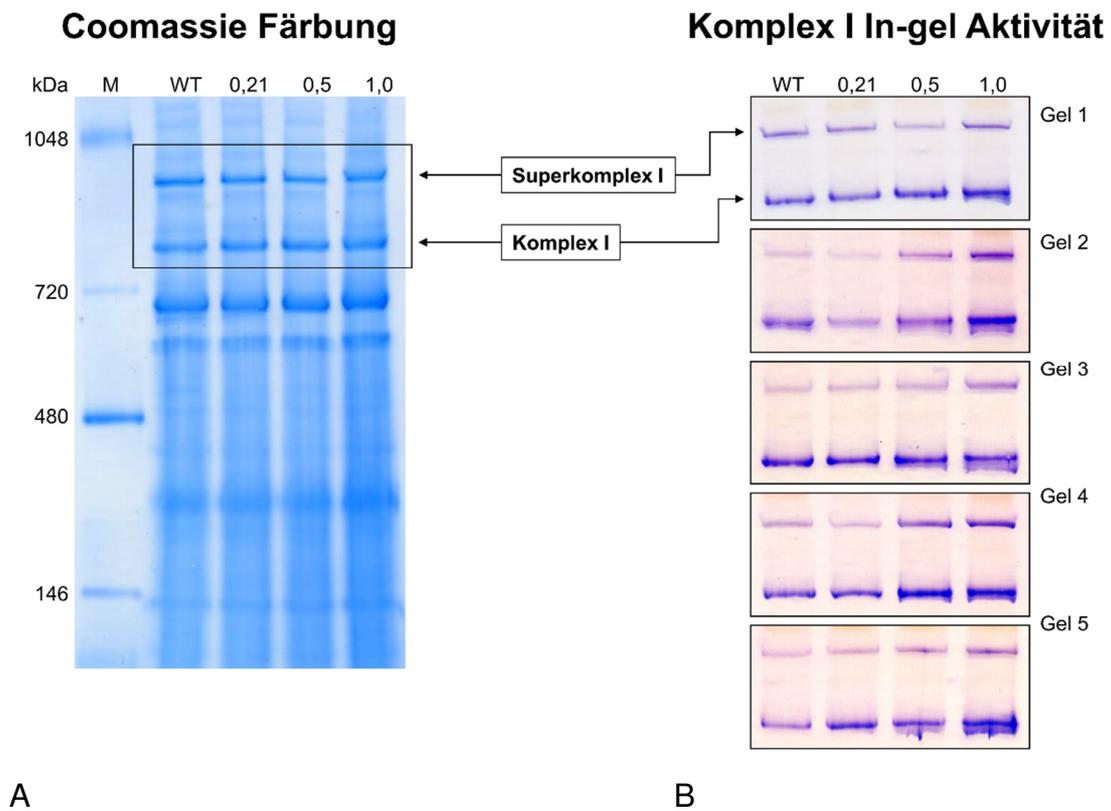


D

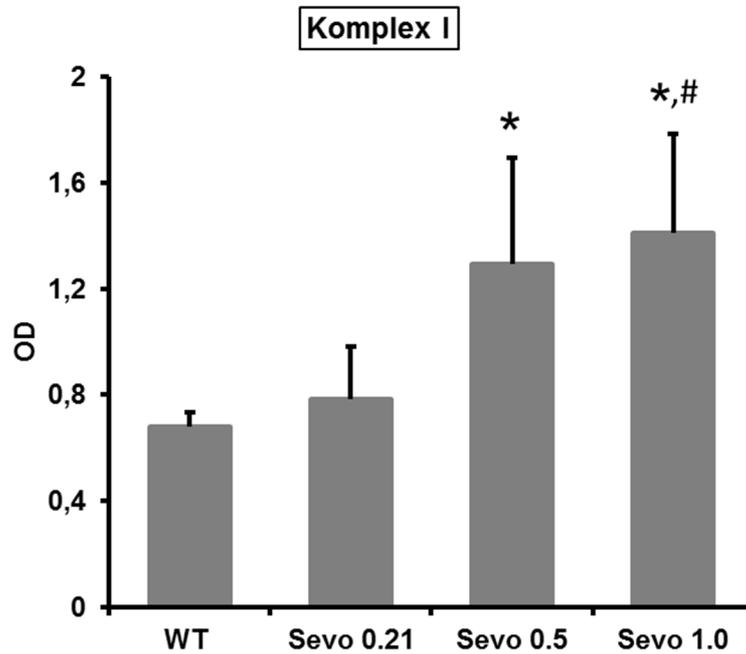
Abbildung 8: Kardiale Komplex I in-Gel Aktivität nach BN-PAGE
 Anfärbung der Proteinbanden im Gel durch eine Proteinfärbung mit Coomassie (A) und Darstellung der in-Gel Aktivität von Komplex I und seiner Superkomplexe (B); Darstellung der Komplex I (C) und Superkomplex I (D) in-Gel Aktivität nach Auswertung mit Image J; M = Marker , WT = Wildtyp, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, OD = Optische Dichte, (n = 5)

3.6.2 Komplex I in-Gel Aktivität in renalen Mitochondrien

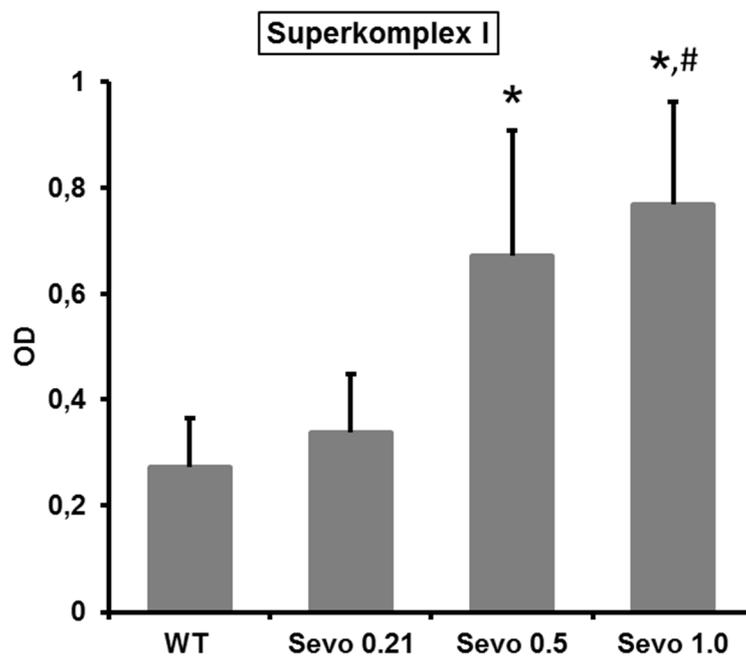
Die Aktivität von renalem Komplex I und Superkomplex I nahm mit höherer inspiratorischer Sauerstoffkonzentration zu. Bei einer Beatmung mit 50% Sauerstoff erhöhte sich die Aktivität signifikant im Vergleich zum Wildtyp. Bei 100%iger Sauerstoffkonzentration kam es zu einem signifikanten Anstieg der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp und einer Beatmung mit 21% Sauerstoff über 6 Stunden.



3 Ergebnisse



C



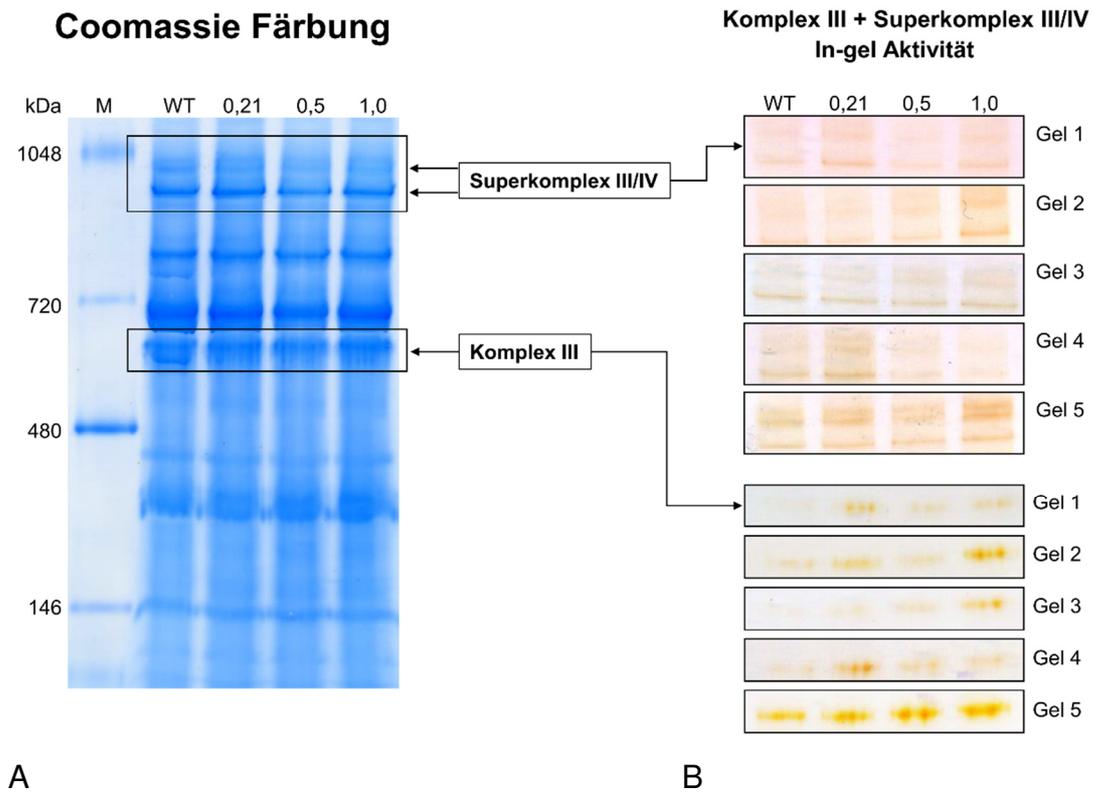
D

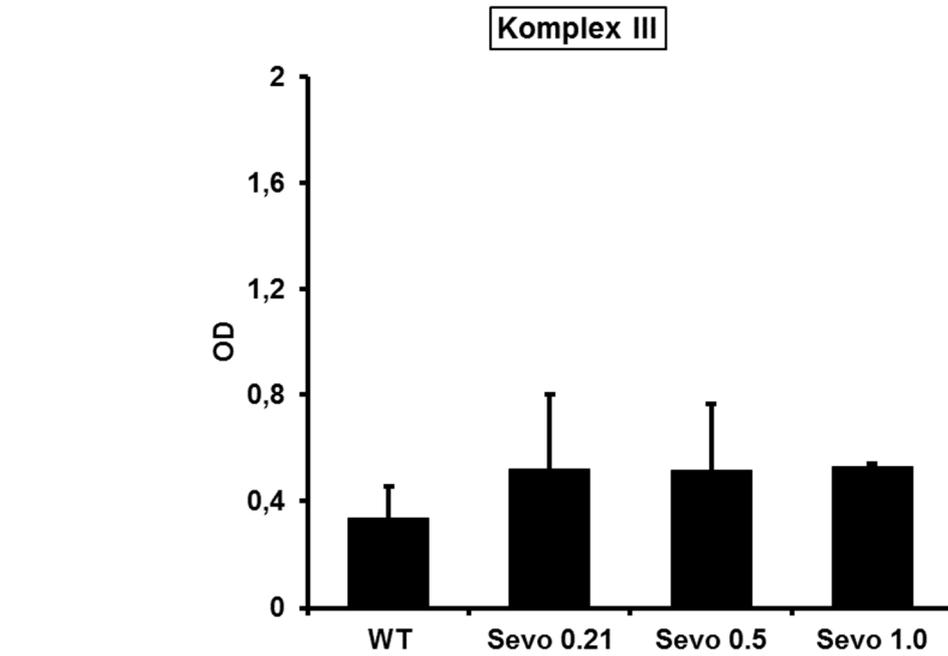
Abbildung 9: Renale Komplex I in-Gel Aktivität nach BN-PAGE

Anfärbung der Proteinbanden im Gel durch eine Proteinfärbung mit Coomassie (A) und Darstellung der in-Gel Aktivität von Komplex I und seiner Superkomplexe (B); Darstellung der Komplex I (C) und Superkomplex I (D) in-Gel Aktivität nach Auswertung mit Image J; * $p < 0,05$ vs. WT; # $p < 0,05$ vs. Sevo 0,21, M = Marker, WT = Wildtyp, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, OD = Optische Dichte, (n = 5)

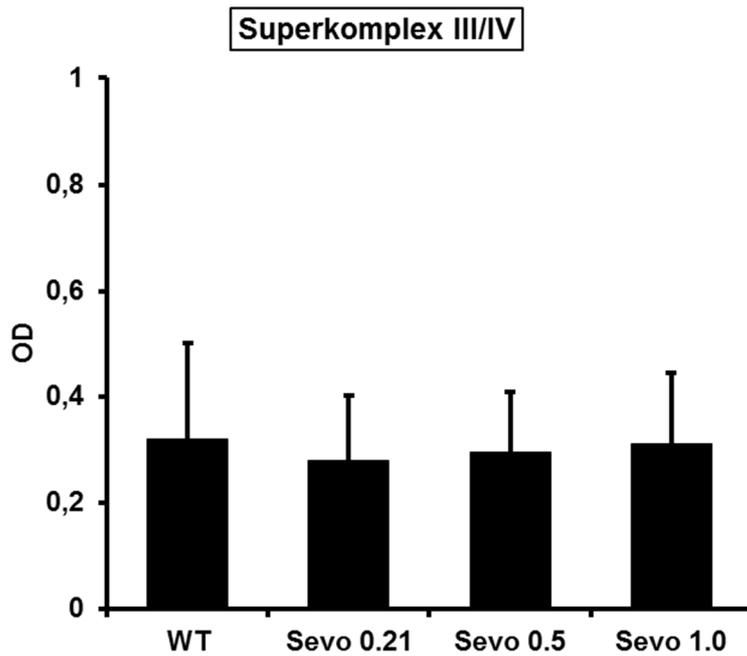
3.6.3 Komplex III und Superkomplex III/IV in-Gel Aktivität in kardialen Mitochondrien

Unter variierenden inspiratorischen Sauerstoffkonzentrationen kam es zu keinen Veränderungen der Aktivität von kardialem Komplex III und Superkomplex III/IV.





C

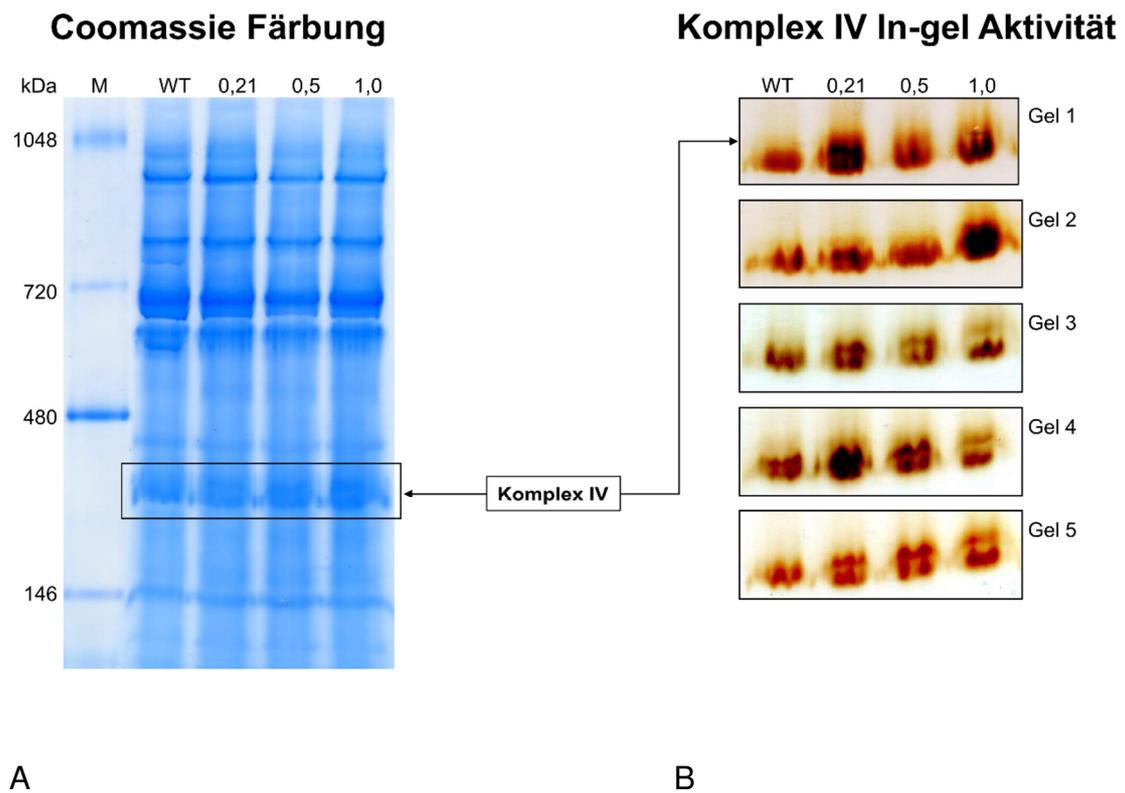


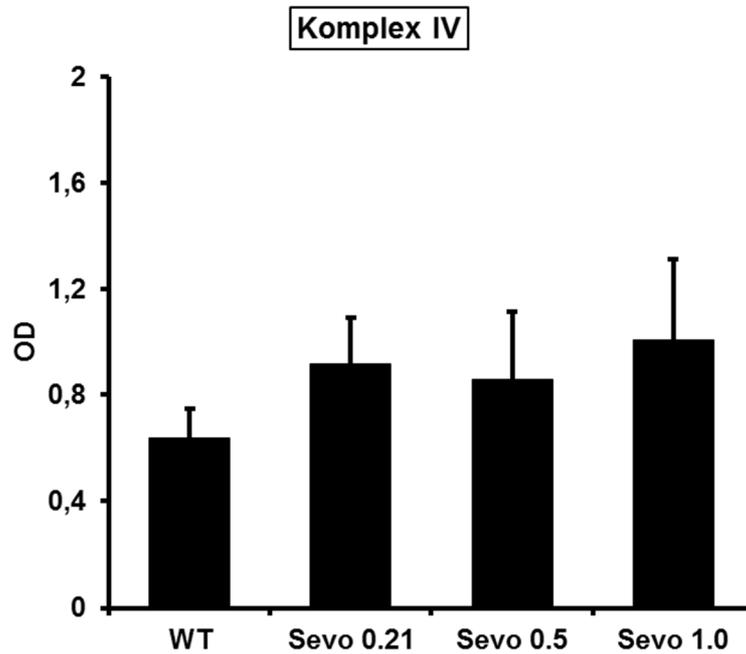
D

Abbildung 10: Kardiale Komplex III und Superkomplex III/IV in-Gel Aktivität nach BN-PAGE
 Anfärbung der Proteinbanden im Gel durch eine Proteinfärbung mit Coomassie (A) und Darstellung der in-Gel Aktivität von Komplex III und Superkomplex III/IV (B), Darstellung der Komplex III (C) und Superkomplex III/IV (D) in-Gel Aktivität nach Auswertung mit Image J; M = Marker, WT = Wildtyp, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, OD = Optische Dichte, (n = 5)

3.6.4 Komplex IV in-Gel Aktivität in kardialen Mitochondrien

Kardialer Komplex IV zeigte in seiner Aktivität keine Unterschiede bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen während der sechsstündigen inhalativen Anästhesie.





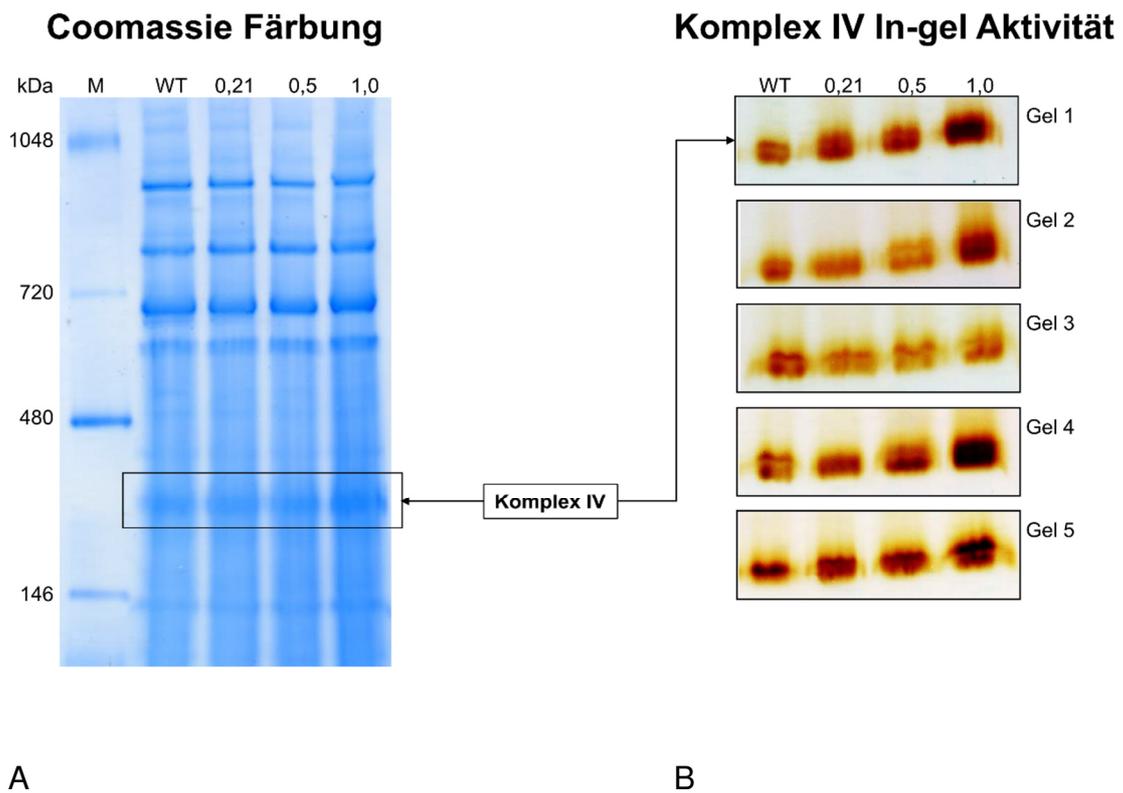
C

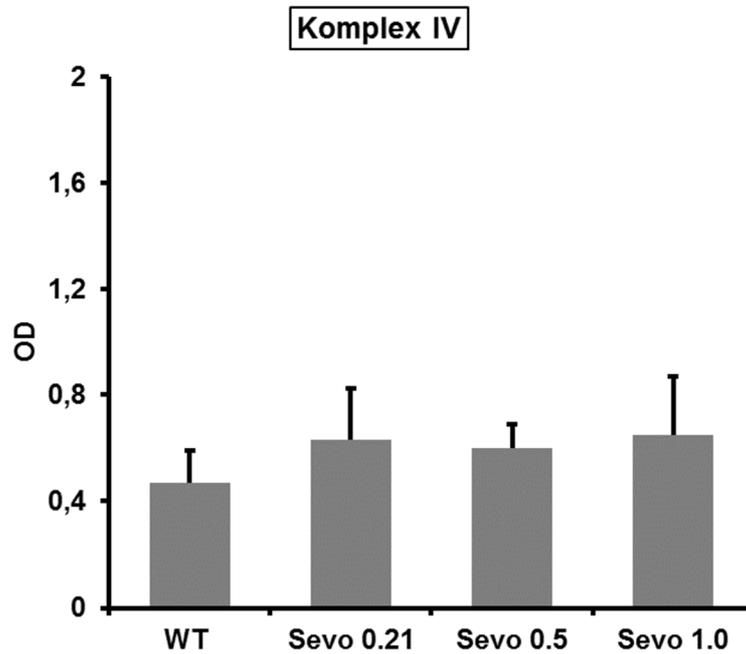
Abbildung 11: Kardiale Komplex IV in-Gel Aktivität nach BN-PAGE

Anfärbung der Proteinbanden im Gel durch eine Proteinfärbung mit Coomassie (A) und Darstellung der in-Gel Aktivität von Komplex IV (B); Darstellung der Komplex IV in-Gel Aktivität (C) nach Auswertung mit Image J; M = Marker, WT = Wildtyp, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, OD = Optische Dichte, (n = 5)

3.6.5 Komplex IV in-Gel Aktivität in renalen Mitochondrien

Ebenso wie in der kardialen Komplex IV Aktivität gab es in der renalen Komplex IV Aktivität keine Unterschiede bei variierenden Sauerstoffkonzentrationen während der sechsständigen Narkose mittels Sevofluran.





C

Abbildung 12: Renale Komplex IV in-Gel Aktivität nach BN-PAGE

Anfärbung der Proteinbanden im Gel durch eine Proteinfärbung mit Coomassie (A) und Darstellung der in-Gel Aktivität von Komplex IV (B); Darstellung der Komplex IV in-Gel Aktivität (C) nach Auswertung mit Image J; M = Marker, WT = Wildtyp, Sevo 0,21 = 21% Sauerstoff über 360 min, Sevo 0,50 = 50% Sauerstoff über 360 min, Sevo 1,0 = 100% Sauerstoff über 360 min, OD = Optische Dichte, (n = 5)

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den Einfluss einer Sevoflurannarkose auf die Funktionalität der mitochondrialen Atmungskette in Abhängigkeit der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration. Es zeigte sich nach sechsständiger inhalativer Anästhesie eine signifikant erhöhte Aktivität des respiratorischen Komplex I, sowohl im Herzen als auch in der Niere. Die Aktivität der Komplexe III und IV wurde durch die inspiratorische Sauerstoffkonzentration nicht beeinflusst.

Es ist bekannt, dass volatile Anästhetika die mitochondriale Atmungskette beeinflussen können. So bewirkt Isofluran sowohl eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und dadurch eine verbesserte respiratorische Funktion, als auch eine verminderte mitochondriale Ca^{2+} Aufnahme und hat Einfluss auf die ROS Produktion.¹²⁹⁻¹³¹ Hanley et al. konnten in submitochondrialen Partikeln aus Schweineherzen zeigen, dass hohe Konzentrationen von Halothan, Sevofluran und Isofluran die Enzymaktivität von Komplex I inhibieren. In ihrer Studie führte Sevofluran nach 20minütiger Inkubation mit einem MAC von 2.6 zu einer Reduktion von 15%, Isofluran führte mit einer MAC von 3.2 zu einer Reduktion von 19% der Komplex I Aktivität, während Komplex II, III, und IV weder von Isofluran noch von Sevofluran beeinflusst wurden.¹³² Interessanterweise erhielten wir zu diesen *in vitro* Ergebnissen gegenteilige Ergebnisse *in vivo*. Unsere Studie zeigte eine erhöhte Aktivität von Komplex I, II und IV, welche bei Komplex I und II unabhängig von der inhalativen Sauerstoffkonzentration zu sein scheint. Um die klinische Situation großer Operationen besser abbilden zu können, wählten wir jedoch ein experimentelles Setup mit einer MAC von 1.0 über eine Dauer von 6 Stunden. Die Beeinflussung der mitochondrialen Funktion konnte auch unter myokardialer Ischämie und Reperfusion in einer Studie von Lotz et al. gezeigt werden. Hierbei führte die 30-minütige Applikation von Isofluran mit einem MAC von 1.0 zur Reduktion des ischämischen Schadens und dem Erhalt der Aktivitäten des Atmungskettenkomplex III, sowie von Superkomplexen aus III und IV. Allerdings zeigte sich keine signifikante Ände-

rung der mitochondrialen Komplex-Aktivitäten nach der 30-minütiger Isofluran Narkose im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Isofluranexposition.¹³³ Diese Ergebnisse deuten im Vergleich zu den hier beobachteten Aktivitätsveränderungen auf eine Abgängigkeit zur Expositionsdauer hin.

Die in unserer Studie erhöhte Aktivität von renalem und kardialem Komplex I, als auch von kardialem Komplex II, deutet auf eine erhöhte Respirationsrate unter inhalativer Anästhesie hin. Dies war jedoch nur teilweise abhängig von der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration. Eine erhöhte Aktivität unter Verwendung von mindestens 50% inspiratorischer Sauerstoffkonzentration zeigte sich bei Komplex IV, als finaler Teil der mitochondrialen Elektronentransportkette. Die Kombination aus Sevoflurannarkose und erhöhtem Sauerstoffangebot erhöht in unserer Studie die katalytische Aktivität von Komplex I, II und IV. In verschiedenen mitochondrialen Erkrankungen ist eine verminderte Aktivität von z.B. Komplex I mit einer erhöhten Produktion von ROS beschrieben.¹³⁴⁻¹³⁷ Ist die katalytische Aktivität von Komplex I durch Mutation, Schädigung oder Inhibition vermindert, führt dies zu einer Erhöhung des NADH/NAD⁺ Verhältnisses, wodurch es wiederum zu einem Anstieg der ROS Bildung kommt. Studien deuten darauf hin, dass es durch eine gesteigerte Aktivität von Komplex I zu einem protektiven Effekt durch eine verminderte ROS Produktion kommt.¹³⁸⁻¹⁴⁰

Zusätzlich untersuchten wir Veränderungen in den mitochondrialen respiratorischen Superkomplexen. Die mitochondrialen respiratorischen Superkomplexe liegen in unterschiedlichen Stöchiometrien meist aus Komplex I mit III oder IV vor. Es wird angenommen, dass durch die Zusammenlagerung der Komplexe ein effizienterer Elektronentransfer begünstigt wird und zum anderen mehr Schutz vor oxidativem Stress besteht. So scheint es, durch eine Trennung oder Verhinderung der Zusammenlagerung von Komplex I und III, zu einer gesteigerten Generation von Superoxiden durch Komplex I zu kommen.⁴⁰ Es ist anzunehmen, dass die Rolle der Superkomplexe innerhalb des mitochondrialen und zellulären Redoxsystems weitaus komplexer ist, da die Zusammenlagerung dieser großen Strukturen ebenfalls das Level der ROS, welche an der Signaltransduktion beteiligt sind, mit beeinflusst. Umgekehrt scheinen Sauerstoffradi-

kale an dem Feedback auf die Superkomplex Formation während einer Hypoxie beteiligt zu sein.¹⁴¹ Zusammenfassend lässt sich daraus folgern, dass die Formation von mitochondrialen respiratorischen Superkomplexen eine zentrale Bedeutung für die Funktion der Atmungskette, als auch für die Balance des zellulären Redoxsystems hat. Interessanterweise veränderte sich die Komplex I Aktivität im Herzen nicht wenn dieser als Superkomplex vorlag, wohingegen die Ergebnisse der renalen Proben weitestgehend mit den Einzelkomplexmessungen übereinstimmen. Sauerstoffkonzentrationen ab 50% erhöhen signifikant den Substratumsatz der supramolekularen Anordnung der Komplexe.

Die unbeeinträchtigte Formation, Interaktion und Funktion der respiratorischen Komplexe I, III/IV in Superkomplexen im Herzen und in der Niere, deuten auf eine intakte mitochondriale Respiration nach sechsständiger inhalativer Anästhesie hin, wohingegen höhere Sauerstoffkonzentrationen eine schnellere Enzymkinetik bewirken.

Wir konnten hierbei keine toxischen Effekte durch die Zufuhr der supraphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen beobachten. Trotz der Zufuhr von 100 % Sauerstoff waren keine oxidativen Schäden des mitochondrialen Proteoms oder der mitochondrialen Membranen vorhanden. Sowohl die Superoxid Produktion als auch die Proteincarbonylierung und die mitochondriale Suszeptibilität gegenüber der Ca^{2+} induzierten Schwellung blieben unverändert.

Dies ist vor allem hinsichtlich der Tatsache interessant, dass Komplex I als wichtige Quelle der Superoxid Produktion identifiziert wurde und dessen gesteigerte Aktivität auf erhöhten oxidativen Stress hinweisen könnte.^{53,142,143} Dieser könnte andererseits auch nur unter besonderes hohem Stress wie z. B. einem Ischämie und Reperfusionsschaden auftreten. Eine erhöhte Respirationsrate per se ist jedoch nicht mit einer erhöhten Superoxid Produktion assoziiert, im Gegensatz zu der Rate des Sauerstoffverbrauches. Limitierter Sauerstoffverbrauch durch eine inaktivierte ATPase, ein hohes NADH/NAD^+ Verhältnis oder Hypoxie, verstärkt die Reduktion von Cofaktoren der mitochondrialen Atmungskette und begünstigt die ROS Entstehung vor allem über Komplex III.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Diese Szenarien lagen in der aktuellen Studie nicht vor.

Dies spiegelt sich auch in der Messung der Superoxid Dismutase (SOD) wieder. Die SOD katalysiert die Disproportionierung von Superoxiden. Genauso wie die Katalase und Glutathion Peroxidase gehört die SOD somit zu den zellulären Antioxidantien und dient dem Schutz der Zelle vor oxidativem Stress.¹⁴⁷

Die zytosolische Isoform (SOD1) enthält Kupfer und Zink, die mitochondriale Isoform (SOD2), welche in der aktuellen Studie untersucht wurde, enthält Mangan im aktiven Zentrum. In den untersuchten Geweben konnte keine Änderung der Superoxiddismutaseaktivität festgestellt werden, was auf keine erhöhte ROS Produktion aufgrund hoher inspiratorischer Sauerstoffkonzentrationen in Verbindung mit Sevofluran hindeutet. Unser Ergebnis deckt sich mit einer Studie von Gupta et al. bei welcher es zu einer Überexpression der SOD2 in murinen pulmonalarteriellen Muskelzellen, jedoch nicht zu einem Aktivitätsanstieg nach einer Hyperoxie von 95 % Sauerstoff über 24 Stunden, kam.¹⁴⁸

Teilweise konnte für Sevofluran auch eine antioxidative Wirkung nachgewiesen werden.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Der Schutz vor oxidativen Schäden bei einer Bypass Operation scheint unter eine Sevoflurannarkose größer zu sein als unter einer Anästhesie mit Propofol.¹⁵¹ In anderen Studien zeigten sich ähnliche Effekte von Propofol und Sevofluran, dagegen trat unter einer Desflurannarkose erhöhter oxidativer Stress auf.¹⁵² Insgesamt zeigen diverse volatile Anästhetika einen Anstieg der ROS Generation in unterschiedlichen Organen, vermutlich aufgrund einer milden Entkopplung der Elektronentransportkette.^{130,153,154} Dies scheint jedoch im Sinne einer Präkonditionierung auch dafür verantwortlich zu sein, dass es während einer Ischämie und Reperfusion zu einer verringerten ROS Produktion kommt und somit der initiale Anstieg an ROS über eine protektive Wirkung verfügt.^{155,156} In der hier vorliegenden Studie konnte ein Anstieg des oxidativen Stresses unter einer sechstündigen Sevoflurannarkose weder in den kardialen noch in den renalen Mitochondrienisolaten nachgewiesen werden. Irreversible Änderungen durch oxidative Proteinmodifikation, welche durch ROS verursacht werden können waren nicht detektierbar.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine übermäßige ROS Bildung mitochondriale Dysfunktion verursacht, an der mPT beteiligt ist,¹⁵⁹ und den Verlauf der Zell-

schädigung hin zur Nekrose bzw. Apoptose beschleunigt^{157,158}. Die Mitochondrial Permeability Transition (mPT) beschreibt einen abrupten Anstieg der Durchlässigkeit der inneren Mitochondrienmembran für lösliche Stoffe, welche größer als 1500 Da sind. Man nimmt an, dass dies auf eine Öffnung eines Kanals in der inneren Mitochondrienmembran zurückzuführen ist, welche als sogenannte Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) bezeichnet wird. Neuere Studien zeigen, dass die ATP Synthase in Form von Dimeren am Aufbau der mPTP beteiligt sein könnte.^{97,160} Oxidativer Stress oder eine intrazelluläre Calciumerhöhung führen zu einer Öffnung der mPTP. In unserer Studie zeigten sich keine erhöhte mitochondriale Suszeptibilität gegenüber der Ca^{2+} induzierten Schwellung. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der Messung der Superoxiddismutase und der Proteincarbonylierung, welche ebenfalls auf keinen erhöhten oxidativen Stress hindeuten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Sevofluran im Sinne einer Postkonditionierung einen protektiven Effekt auf die mPTP hat.^{161,162} Eine erhöhte inhalative Sauerstoffkonzentration scheint in Kombination mit einer Sevoflurannarkose somit per se keinen negativen Einfluss auf die mitochondriale Membranstabilität zu haben.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Studie müssen einige wichtige Einschränkungen berücksichtigt werden. Wir verwendeten Wildtyp Tiere als Referenz. Diese Tiere wurden unmittelbar vor Organentnahme durch zervikale Dislokation euthanasiert und wurden keiner sechsstündigen inhalativen Sevoflurannarkose unterzogen. Diese Entscheidung basierte darauf, dass eine Vergleichbarkeit der mitochondrialen Funktion der unbehandelten Tiere mit denen, welche eine inhalative Anästhesie erhalten haben, einen höheren translationalen Wert hat und weitaus mehr die molekularen Veränderungen wieder spiegelt. Darüber hinaus bestand das hämodynamische Monitoring nur aus EKG und einer Herzfrequenzmessung. Zusätzlicher operativer Stress durch die Anlage eines arteriellen Katheters konnte so vermieden werden, um ausschließlich Veränderungen in der mitochondrialen Funktion in Abhängigkeit der Verabreichung von Sevofluran und differenten Sauerstoffkonzentrationen darzustellen. Zusätzlich wurde die Vergleichbarkeit der experimentellen Gruppen

erhöht. Wir wählten als Fokus in der vorliegenden Studie Herz und Niere da deren Funktionen eng miteinander verbunden sind. Das Herz enthält die höchste mitochondriale Dichte, wohingegen die Niere im Gesamten nur die Hälfte der mitochondrialen Dichte des Herzens enthält. Berücksichtigt man jedoch den Gehalt an mtDNA pro Gramm Organ und die mitochondriale Dichte sind die beiden Organe vergleichbar. Das Gehirn, als weiteres interessantes Organ in diesem Kontext, besitzt z. B. eine sehr geringe Dichte an Mitochondrien, was eine zuverlässige und reproduzierbare Analyse erschwert.¹⁶³

Die Citratsynthase ist das Schlüsselenzym im Citratzyklus und gilt als ein enzymatischer Marker der mitochondrialen Matrix.¹²⁴ In unseren Analysen der Aktivität der Citratsynthase zeigten sich ähnliche Aktivitäten in allen untersuchten Gruppen, was auf eine gleichmäßige Aufreinigung und einen ähnlichen Gehalt an Mitochondrien in den Gruppen hinweist. Somit war eine gute Vergleichbarkeit der Mitochondrienlysate gewährleistet.

Zusammenfassend konnten wir in unserer Studie zeigen, dass eine Sevoflurananarkose über mehrere Stunden auch mit höheren Sauerstoffkonzentrationen lediglich zu einer schnelleren Enzymkinetik der mitochondrialen Komplexe in Herz und Niere ohne toxische Schädigungen oder Veränderungen wie Protein-carbonylierungen oder oxidativen Stress führt. Diese laborchemischen Daten könnten darauf hinweisen, dass perioperativ eine zeitlich begrenzte erhöhte inspiratorische Sauerstoffkonzentration keine höhergradigen irreversiblen zell- und organschädigenden Effekte bedingt. Damit stehen unsere laborchemischen Resultate im Einklang mit den klinischen Ergebnissen einer Studie von Panwar et al.. In dieser randomisierten, kontrollierten, unverblindeten und internationalen multizentrischen Studie, wurden die Effekte einer konservativen Oxygenierung (Sauerstoffsättigung 88-92 %) gegenüber eines konventionellen Beatmungsregimes (Sauerstoffsättigung >96 %) über zwei Tage bei erwachsenen beatmeten Intensivpatienten untersucht.¹⁶⁴ Die Entwicklung von multiplen Organversagen, Verschlechterung der Lungenfunktion und anderen ungünstigen klinischen Folgen war in beiden Gruppen vergleichbar. Demgegenüber stehen

die Ergebnisse einer Studie von Girardis et al.¹⁶⁵ Hierbei zeigte sich im Vergleich einer konservativ beatmeten Gruppe (Sauerstoffsättigung 94-98 %) zu einer konventionell beatmeten Gruppe (97-100 %) erwachsener Intensivpatienten, welche über mindestens 72 Stunden beatmet wurden, eine geringere Mortalität in der konservativen Gruppe. Hierbei ist zu beachten, dass in dieser Studie die Beatmungszeit länger gewählt wurde als in der zuvor genannten. Des Weiteren wurden in beiden Studien schwerkranke Intensivpatienten eingeschlossen, wohingegen in unserer Studie gesunde Tiere nach einer sechsstündigen Sevoflurannarkose untersucht wurden.

Interessant wären weitere Untersuchungen zu Produktion und Effekten von Sauerstoffradikalen, vor allem in Hinsicht auf die kurzfristigen Auswirkungen und die Signaltransduktion. Die sehr kurze Halbwertszeit der hochreaktiven Sauerstoffspezies stellt dabei eine größere Herausforderung dar.¹⁶⁶ In diesem Zusammenhang ist auch eine weitere Erforschung der mitochondrialen respiratorischen Superkomplexe von zentraler Bedeutung, da wie unsere Studie zeigte, es einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Komplexe und der Assoziation der Komplexe untereinander zu bestehen scheint. Dies wiederum könnte Einfluss auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen haben.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es Veränderungen mitochondrialer Atmungskettenfunktionen von murinem Herz und muriner Niere unter einer inhalativen Anästhesie mit Sevofluran in Abhängigkeit von der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration zu untersuchen.

In unserer *in vivo* Studie wurden männliche Black Six Mäuse 6 Stunden mit 1.0 MAC Sevofluran anästhesiert. Je nach Versuchsgruppe wurde mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration von 21%, 50% oder 100% ventiliert. Am Ende des Versuchsprotokolls wurden Herz und Nieren entnommen und direkt weiterverarbeitet. Es erfolgten photometrische Analysen und einer Blue Native Polyacrylamid Gel Elektrophorese zur Darstellung der mitochondrialen Komplexaktivitäten, der Proteincarbonylierung mitochondrialer Proteine und der Empfindlichkeit der isolierten Mitochondrien gegenüber der Ca^{2+} induzierten Schwellung.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass eine sechsstündige volatile Anästhesie zu einer deutlichen Änderung der mitochondrialen respiratorischen Komplexaktivitäten, sowohl in der Niere als auch im Herzen führt. Insbesondere wies Komplex I eine erhöhte enzymatische Aktivität auf. Die Veränderungen der mitochondrialen Respiration waren größtenteils unabhängig von der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration und führten zu keiner mitochondrialen Schädigung. Sowohl die Superoxid Produktion als auch die Proteincarbonylierung blieben unverändert. Die mitochondriale Empfindlichkeit gegenüber der Ca^{2+} induzierten Schwellung zeigte keine Veränderung gegenüber den Kontrolltieren. Somit ergaben sich keine toxischen Auswirkungen hoher Sauerstoffkonzentrationen im Sinne eines erhöhten oxidativen Schadens des mitochondrialen Proteoms oder einer Membranschädigung.

Literaturverzeichnis

1. Schober P, Schwarte LA: *From system to organ to cell: oxygenation and perfusion measurement in anesthesia and critical care*. J Clin Monit Comput 2012; 26: 255-65
2. Roewer N, Thiel H: *Taschenatlas Anästhesie*, 5th edition, Thieme, 2013
3. Larsen R, Ziegenfuß T: *Beatmung*, 5th edition, Springer, 2004
4. Farquhar H, Weatherall M, Wijesinghe M, Perrin K, Ranchord A, Simmonds M, Beasley R: *Systematic review of studies of the effect of hyperoxia on coronary blood flow*. Am Heart J 2009; 158: 371-7
5. Thomson AJ, Drummond GB, Waring WS, Webb DJ, Maxwell SR: *Effects of short-term isocapnic hyperoxia and hypoxia on cardiovascular function*. J Appl Physiol (1985) 2006; 101: 809-16
6. Watson NA, Beards SC, Altaf N, Kassner A, Jackson A: *The effect of hyperoxia on cerebral blood flow: a study in healthy volunteers using magnetic resonance phase-contrast angiography*. Eur J Anaesthesiol 2000; 17: 152-9
7. Rousseau A, Steinwall I, Woodson RD, Sjoberg F: *Hyperoxia decreases cutaneous blood flow in high-perfusion areas*. Microvasc Res 2007; 74: 15-22
8. Crawford P, Good PA, Gutierrez E, Feinberg JH, Boehmer JP, Silber DH, Sinoway LI: *Effects of supplemental oxygen on forearm vasodilation in humans*. J Appl Physiol (1985) 1997; 82: 1601-6
9. Iscoe S, Beasley R, Fisher JA: *Supplementary oxygen for nonhypoxemic patients: O2 much of a good thing?* Crit Care 2011; 15: 305
10. Gao Z, Spilk S, Momen A, Muller MD, Leuenberger UA, Sinoway LI: *Vitamin C prevents hyperoxia-mediated coronary vasoconstriction and impairment of myocardial function in healthy subjects*. Eur J Appl Physiol 2012; 112: 483-92
11. Wallin RF, Regan BM, Napoli MD, Stern IJ: *Sevoflurane: a new inhalational anesthetic agent*. Anesth Analg 1975; 54: 758-66
12. Doi M, Ikeda K: *Airway irritation produced by volatile anaesthetics during brief inhalation: comparison of halothane, enflurane, isoflurane and sevoflurane*. Can J Anaesth 1993; 40: 122-6

13. Lerman J: *Sevoflurane in pediatric anesthesia*. *Anesth Analg* 1995; 81: S4-10
14. Katoh T, Suguro Y, Ikeda T, Kazama T, Ikeda K: *Influence of age on awakening concentrations of sevoflurane and isoflurane*. *Anesth Analg* 1993; 76: 348-52
15. Loscar M, Annecke T, Conzen P: *Inhalationsanästhetika, Die Anästhesiologie*. Edited by Rossaint R, Werner C, Zwißler B, Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp 273-293
16. Mutoh T, Nishimura R, Kim H, Matsunaga S, Kadosawa T, Mochizuki M, Sasaki N: *Rapid inhalation induction of anesthesia by halothane, enflurane, isoflurane and sevoflurane and their cardiopulmonary effects in dogs*. *J Vet Med Sci* 1995; 57: 1007-13
17. Yasuda N, Targ AG, Eger EI, 2nd, Johnson BH, Weiskopf RB: *Pharmacokinetics of desflurane, sevoflurane, isoflurane, and halothane in pigs*. *Anesth Analg* 1990; 71: 340-8
18. Sazanov L: *A Structural Perspective on Respiratory Complex I: Structure and Function of NADH:ubiquinone oxidoreductase*, Springer, 2012
19. Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE: *Bovine complex I is a complex of 45 different subunits*. *J Biol Chem* 2006; 281: 32724-7
20. Vinothkumar KR, Zhu J, Hirst J: *Architecture of mammalian respiratory complex I*. *Nature* 2014; 515: 80-4
21. Stock D, Leslie AG, Walker JE: *Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase*. *Science* 1999; 286: 1700-5
22. Heinrich PC, Müller M, Graeve L: *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 9th edition. Berlin, Springer Berlin Heidelberg, 2014
23. Rassow J: *Duale Reihe Biochemie*, 2nd edition, Thieme, 2008
24. Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS: *The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport*. *J Bioenerg Biomembr* 1986; 18: 331-68
25. Bianchi C, Genova ML, Parenti Castelli G, Lenaz G: *The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis*. *J Biol Chem* 2004; 279: 36562-9

26. Diaz F, Fukui H, Garcia S, Moraes CT: *Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts*. Mol Cell Biol 2006; 26: 4872-81
27. Schagger H, Pfeiffer K: *Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria*. EMBO J 2000; 19: 1777-83
28. Heinemeyer J, Braun HP, Boekema EJ, Kouril R: *A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria*. J Biol Chem 2007; 282: 12240-8
29. Berry EA, Trumpower BL: *Isolation of ubiquinol oxidase from Paracoccus denitrificans and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes*. J Biol Chem 1985; 260: 2458-67
30. Schagger H, Pfeiffer K: *The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes*. J Biol Chem 2001; 276: 37861-7
31. Stroh A, Anderka O, Pfeiffer K, Yagi T, Finel M, Ludwig B, Schagger H: *Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in Paracoccus denitrificans*. J Biol Chem 2004; 279: 5000-7
32. Dudkina NV, Kudryashev M, Stahlberg H, Boekema EJ: *Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography*. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108: 15196-200
33. Eubel H, Jansch L, Braun HP: *New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II*. Plant Physiol 2003; 133: 274-86
34. Muster B, Kohl W, Wittig I, Strecker V, Joos F, Haase W, Bereiter-Hahn J, Busch K: *Respiratory chain complexes in dynamic mitochondria display a patchy distribution in life cells*. PLoS One 2010; 5: e11910
35. Strauss M, Hofhaus G, Schroder RR, Kuhlbrandt W: *Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane*. EMBO J 2008; 27: 1154-60
36. Nicastro D, Frangakis AS, Typke D, Baumeister W: *Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria*. J Struct Biol 2000; 129: 48-56
37. Bultema JB, Braun HP, Boekema EJ, Kouril R: *Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato*. Biochim Biophys Acta 2009; 1787: 60-7

38. Dudkina NV, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun HP: *The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes*. J Bioenerg Biomembr 2008; 40: 419-24
39. Genova ML, Lenaz G: *Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes*. Biochim Biophys Acta 2014; 1837: 427-43
40. Maranzana E, Barbero G, Falasca AI, Lenaz G, Genova ML: *Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I*. Antioxid Redox Signal 2013; 19: 1469-80
41. Lenaz G, Genova ML: *Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling*. Am J Physiol Cell Physiol 2007; 292: C1221-39
42. Bottinger L, Horvath SE, Kleinschroth T, Hunte C, Daum G, Pfanner N, Becker T: *Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes*. J Mol Biol 2012; 423: 677-86
43. Scherz-Shouval R, Elazar Z: *ROS, mitochondria and the regulation of autophagy*. Trends Cell Biol 2007; 17: 422-7
44. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W: *The neutrophil NADPH oxidase*. Arch Biochem Biophys 2002; 397: 342-4
45. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T: *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell 2005; 120: 483-95
46. Turrens JF: *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol 2003; 552: 335-44
47. Richter C: *Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging?* FEBS Lett 1988; 241: 1-5
48. Droge W: *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev 2002; 82: 47-95
49. Stadtman ER, Levine RL: *Protein oxidation*. Ann N Y Acad Sci 2000; 899: 191-208
50. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA: *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. J Biol Chem 1994; 269: 26066-75

51. Richter C: *Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing*. Int J Biochem Cell Biol 1995; 27: 647-53
52. Lenaz G, Baracca A, Fato R, Genova ML, Solaini G: *New insights into structure and function of mitochondria and their role in aging and disease*. Antioxid Redox Signal 2006; 8: 417-37
53. Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A: *Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state*. Biochem J 2002; 368: 545-53
54. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnfsky EJ: *Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III*. J Biol Chem 2003; 278: 36027-31
55. Fridovich I: *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem 1995; 64: 97-112
56. Murley JS, Kataoka Y, Hallahan DE, Roberts JC, Grdina DJ: *Activation of NFkappaB and MnSOD gene expression by free radical scavengers in human microvascular endothelial cells*. Free Radic Biol Med 2001; 30: 1426-39
57. Tsan MF, Clark RN, Goyert SM, White JE: *Induction of TNF-alpha and MnSOD by endotoxin: role of membrane CD14 and Toll-like receptor-4*. Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280: C1422-30
58. Warner BB, Stuart L, Gebb S, Wispe JR: *Redox regulation of manganese superoxide dismutase*. Am J Physiol 1996; 271: L150-8
59. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: *Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*. Arch Biochem Biophys 1991; 288: 481-7
60. Butler J, Jayson GG, Swallow AJ: *The reaction between the superoxide anion radical and cytochrome c*. Biochim Biophys Acta 1975; 408: 215-22
61. Eto Y, Kang D, Hasegawa E, Takeshige K, Minakami S: *Succinate-dependent lipid peroxidation and its prevention by reduced ubiquinone in beef heart submitochondrial particles*. Arch Biochem Biophys 1992; 295: 101-6
62. Ham AJ, Liebler DC: *Vitamin E oxidation in rat liver mitochondria*. Biochemistry 1995; 34: 5754-61
63. Dawson TM, Dawson VL: *Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease*. Science 2003; 302: 819-22

64. Wang P, Zweier JL: *Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury.* J Biol Chem 1996; 271: 29223-30
65. Ambrosio G, Zweier JL, Duilio C, Kuppusamy P, Santoro G, Elia PP, Tritto I, Cirillo P, Condorelli M, Chiariello M, et al.: *Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow.* J Biol Chem 1993; 268: 18532-41
66. Granger DN, Korthuis RJ: *Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury.* Annu Rev Physiol 1995; 57: 311-32
67. Kim MS, Akera T: *O₂ free radicals: cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺-K⁺-ATPase.* Am J Physiol 1987; 252: H252-7
68. Vanden Hoek T, Becker LB, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT: *Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion.* Circ Res 2000; 86: 541-8
69. Zhao X, He G, Chen YR, Pandian RP, Kuppusamy P, Zweier JL: *Endothelium-derived nitric oxide regulates postischemic myocardial oxygenation and oxygen consumption by modulation of mitochondrial electron transport.* Circulation 2005; 111: 2966-72
70. Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schumacker PT, Becker LB: *Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion.* J Mol Cell Cardiol 1997; 29: 2571-83
71. Zuo L, Chen YR, Reyes LA, Lee HL, Chen CL, Villamena FA, Zweier JL: *The radical trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide exerts dose-dependent protection against myocardial ischemia-reperfusion injury through preservation of mitochondrial electron transport.* J Pharmacol Exp Ther 2009; 329: 515-23
72. Herrero E, Ros J, Belli G, Cabisco E: *Redox control and oxidative stress in yeast cells.* Biochim Biophys Acta 2008; 1780: 1217-35
73. Stadtman ER: *Protein oxidation and aging.* Free Radic Res 2006; 40: 1250-8
74. Sayre LM, Lin D, Yuan Q, Zhu X, Tang X: *Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one.* Drug Metab Rev 2006; 38: 651-75

75. Uchida K, Stadtman ER: *Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal*. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 4544-8
76. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J: *Protein carbonylation: proteomics, specificity and relevance to aging*. Mass Spectrom Rev 2014; 33: 21-48
77. Moller IM, Rogowska-Wrzesinska A, Rao RS: *Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective*. J Proteomics 2011; 74: 2228-42
78. Weiss MF, Erhard P, Kader-Attia FA, Wu YC, Deoreo PB, Araki A, Glomb MA, Monnier VM: *Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease*. Kidney Int 2000; 57: 2571-85
79. Chernyak BV: *Redox regulation of the mitochondrial permeability transition pore*. Biosci Rep 1997; 17: 293-302
80. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY: *Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart*. Biochim Biophys Acta 1998; 1366: 79-94
81. Bernardi P: *Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition*. Physiol Rev 1999; 79: 1127-55
82. Doran E, Halestrap AP: *Cytochrome c release from isolated rat liver mitochondria can occur independently of outer-membrane rupture: possible role of contact sites*. Biochem J 2000; 348 Pt 2: 343-50
83. Crompton M, Barksby E, Johnson N, Capano M: *Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their involvement in cell death*. Biochimie 2002; 84: 143-52
84. Di Lisa F, Bernardi P: *Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole*. Cardiovasc Res 2006; 70: 191-9
85. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M: *Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury*. J Mol Cell Cardiol 2005; 38: 367-74
86. Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM: *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res 2003; 60: 617-25

87. Crompton M, Costi A, Hayat L: *Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria.* Biochem J 1987; 245: 915-8
88. Crompton M, Costi A: *Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload.* Eur J Biochem 1988; 178: 489-501
89. Griffiths EJ, Halestrap AP: *Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts.* J Mol Cell Cardiol 1993; 25: 1461-9
90. Griffiths EJ, Halestrap AP: *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion.* Biochem J 1995; 307 (Pt 1): 93-8
91. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH: *Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier.* Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 3170-4
92. Kottke M, Adam V, Riesinger I, Bremm G, Bosch W, Brdiczka D, Sandri G, Panfili E: *Mitochondrial boundary membrane contact sites in brain: points of hexokinase and creatine kinase location, and control of Ca²⁺ transport.* Biochim Biophys Acta 1988; 935: 87-102
93. Zamzami N, Kroemer G: *The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.* Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2: 67-71
94. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC: *The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore.* Nature 2004; 427: 461-5
95. Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, Bernardi P: *Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria.* Biochim Biophys Acta 2006; 1757: 590-5
96. Sileikyte J, Blachly-Dyson E, Sewell R, Carpi A, Menabo R, Di Lisa F, Ricchelli F, Bernardi P, Forte M: *Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (Translocator Protein of 18 kDa (TSPO)).* J Biol Chem 2014; 289: 13769-81
97. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabo I, Lippe G, Bernardi P: *Dimers of*

- mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 5887-92
98. Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P, Lippe G: *Cyclophilin D modulates mitochondrial F0F1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. J Biol Chem* 2009; 284: 33982-8
99. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkenin JD: *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. Nature* 2005; 434: 658-62
100. Gerschman R: *Historical Introduction to the "Free Radical Theory" of Oxygen Toxicity, Oxygen and Living Processes.* Edited by Gilbert D, Springer New York, 1981, pp 44-46
101. Caldwell PR, Lee WL, Jr., Schildkraut HS, Archibald ER: *Changes in lung volume, diffusing capacity, and blood gases in men breathing oxygen. J Appl Physiol* 1966; 21: 1477-83
102. Crapo JD, Barry BE, Foscue HA, Shelburne J: *Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. Am Rev Respir Dis* 1980; 122: 123-43
103. Smith LJ: *Hyperoxic lung injury: biochemical, cellular, and morphologic characterization in the mouse. J Lab Clin Med* 1985; 106: 269-78
104. Mak S, Egri Z, Tanna G, Colman R, Newton GE: *Vitamin C prevents hyperoxia-mediated vasoconstriction and impairment of endothelium-dependent vasodilation. Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H2414-21
105. Welsh DJ, Peacock AJ: *Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation. High Alt Med Biol* 2013; 14: 111-6
106. Reinhart K, Bloos F, Konig F, Bredle D, Hannemann L: *Reversible decrease of oxygen consumption by hyperoxia. Chest* 1991; 99: 690-4
107. Heringlake M, Garbers C, Kabler JH, Anderson I, Heinze H, Schon J, Berger KU, Dibbelt L, Sievers HH, Hanke T: *Preoperative cerebral oxygen saturation and clinical outcomes in cardiac surgery. Anesthesiology* 2011; 114: 58-69
108. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Barnes PJ: *Supplementary oxygen in healthy subjects and*

- those with COPD increases oxidative stress and airway inflammation. Thorax 2004; 59: 1016-9*
109. Bandali KS, Belanger MP, Wittnich C: *Does hyperoxia affect glucose regulation and transport in the newborn?* J Thorac Cardiovasc Surg 2003; 126: 1730-5
110. Garcia-Botello SA, Garcia-Granero E, Lillo R, Lopez-Mozos F, Millan M, Lledo S: *Randomized clinical trial to evaluate the effects of perioperative supplemental oxygen administration on the colorectal anastomosis.* Br J Surg 2006; 93: 698-706
111. Greif R, Laciny S, Rapf B, Hickie RS, Sessler DI: *Supplemental oxygen reduces the incidence of postoperative nausea and vomiting.* Anesthesiology 1999; 91: 1246-52
112. Turan A, Apfel CC, Kumpch M, Danzeisen O, Eberhart LH, Forst H, Heringhaus C, Isselhorst C, Trenkler S, Trick M, Vedder I, Kerger H: *Does the efficacy of supplemental oxygen for the prevention of postoperative nausea and vomiting depend on the measured outcome, observational period or site of surgery?* Anaesthesia 2006; 61: 628-33
113. Greif R, Akca O, Horn EP, Kurz A, Sessler DI, Outcomes Research G: *Supplemental perioperative oxygen to reduce the incidence of surgical-wound infection.* N Engl J Med 2000; 342: 161-7
114. Belda FJ, Aguilera L, Garcia de la Asuncion J, Alberti J, Vicente R, Ferrandiz L, Rodriguez R, Company R, Sessler DI, Aguilar G, Botello SG, Orti R, Spanish Reduccion de la Tasa de Infeccion Quirurgica G: *Supplemental perioperative oxygen and the risk of surgical wound infection: a randomized controlled trial.* JAMA 2005; 294: 2035-42
115. Mayzler O, Weksler N, Domchik S, Klein M, Mizrahi S, Gurman GM: *Does supplemental perioperative oxygen administration reduce the incidence of wound infection in elective colorectal surgery?* Minerva Anestesiol 2005; 71: 21-5
116. Pryor KO, Fahey TJ, 3rd, Lien CA, Goldstein PA: *Surgical site infection and the routine use of perioperative hyperoxia in a general surgical population: a randomized controlled trial.* JAMA 2004; 291: 79-87
117. Meyhoff CS, Wetterslev J, Jorgensen LN, Henneberg SW, Hogdall C, Lundvall L, Svendsen PE, Mollerup H, Lunn TH, Simonsen I, Martinsen KR, Pulawska T, Bundgaard L, Bugge L, Hansen EG, Riber C, Gocht-Jensen P, Walker LR, Bendtsen A, Johansson G, Skovgaard N, Helto K, Poukinski A, Korshin A, Walli A, Bulut M, Carlsson PS, Rodt SA, Lundbech LB, Rask H, Buch N, Perdawid SK, Reza J, Jensen KV, Carlsen CG,

- Jensen FS, Rasmussen LS, Group PT: *Effect of high perioperative oxygen fraction on surgical site infection and pulmonary complications after abdominal surgery: the PROXI randomized clinical trial*. JAMA 2009; 302: 1543-50
118. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, Jr., Chavey WE, 2nd, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Wright RS, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, American College of C, American Heart Association Task Force on Practice G, American College of Emergency P, Society for Cardiovascular A, Interventions, Society of Thoracic S, American Association of C, Pulmonary R, Society for Academic Emergency M: *ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol 2007; 50: e1-e157
119. Arntz HR, Bossaert L, Filippatos GS, European Resuscitation C: *European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 5. Initial management of acute coronary syndromes*. Resuscitation 2005; 67 Suppl 1: S87-96
120. Nolan JP, Deakin CD, Soar J, Bottiger BW, Smith G, European Resuscitation C: *European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 4. Adult advanced life support*. Resuscitation 2005; 67 Suppl 1: S39-86
121. Nikolaou NI, Arntz HR, Bellou A, Beygui F, Bossaert LL, Cariou A, Initial management of acute coronary syndromes section C: *European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015 Section 8. Initial management of acute coronary syndromes*. Resuscitation 2015; 95: 264-77
122. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: *Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid*. Analytical Biochemistry 1985; 150: 76-85
123. Marcu R, Neeley CK, Karamanlidis G, Hawkins BJ: *Multi-parameter measurement of the permeability transition pore opening in isolated mouse heart mitochondria*. J Vis Exp 2012
124. Lanza IR, Nair KS: *Functional assessment of isolated mitochondria in vitro*. Methods Enzymol 2009; 457: 349-72

125. Ellman GL: *Tissue sulfhydryl groups*. Arch Biochem Biophys 1959; 82: 70-7
126. Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues JV, Marcos JC: *Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins*. Anal Biochem 2014; 458: 69-71
127. Wittig I, Braun HP, Schagger H: *Blue native PAGE*. Nat Protoc 2006; 1: 418-28
128. Wittig I, Karas M, Schagger H: *High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes*. Mol Cell Proteomics 2007; 6: 1215-25
129. Sedlic F, Sepac A, Pravdic D, Camara AK, Bienengraeber M, Brzezinska AK, Wakatsuki T, Bosnjak ZJ: *Mitochondrial depolarization underlies delay in permeability transition by preconditioning with isoflurane: roles of ROS and Ca²⁺*. Am J Physiol Cell Physiol 2010; 299: C506-15
130. Ljubkovic M, Mio Y, Marinovic J, Stadnicka A, Wartier DC, Bosnjak ZJ, Bienengraeber M: *Isoflurane preconditioning uncouples mitochondria and protects against hypoxia-reoxygenation*. Am J Physiol Cell Physiol 2007; 292: C1583-90
131. Tanaka K, Weihrauch D, Kehl F, Ludwig LM, LaDisa JF, Jr., Kersten JR, Pagel PS, Wartier DC: *Mechanism of preconditioning by isoflurane in rabbits: a direct role for reactive oxygen species*. Anesthesiology 2002; 97: 1485-90
132. Hanley PJ, Ray J, Brandt U, Daut J: *Halothane, isoflurane and sevoflurane inhibit NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of cardiac mitochondria*. J Physiol 2002; 544: 687-93
133. Lotz C, Zhang J, Fang C, Liem D, Ping P: *Isoflurane protects the myocardium against ischemic injury via the preservation of mitochondrial respiration and its supramolecular organization*. Anesth Analg 2015; 120: 265-74
134. Valsecchi F, Koopman WJ, Manjeri GR, Rodenburg RJ, Smeitink JA, Willems PH: *Complex I disorders: causes, mechanisms, and development of treatment strategies at the cellular level*. Dev Disabil Res Rev 2010; 16: 175-82
135. Koene S, Rodenburg RJ, van der Knaap MS, Willemsen MA, Sperl W, Laugel V, Ostergaard E, Tarnopolsky M, Martin MA, Nesbitt V, Fletcher J, Edvardson S, Procaccio V, Slama A, van den Heuvel LP, Smeitink JA:

- Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: what we learned from 130 cases.* J Inherit Metab Dis 2012; 35: 737-47
136. Schapira AH: *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.* Adv Neurol 1993; 60: 288-91
137. Hardy L, Clark JB, Darley-Usmar VM, Smith DR, Stone D: *Reoxygenation-dependent decrease in mitochondrial NADH:CoQ reductase (Complex I) activity in the hypoxic/reoxygenated rat heart.* Biochem J 1991; 274 (Pt 1): 133-7
138. Raha S, Myint AT, Johnstone L, Robinson BH: *Control of oxygen free radical formation from mitochondrial complex I: roles for protein kinase A and pyruvate dehydrogenase kinase.* Free Radic Biol Med 2002; 32: 421-30
139. Ceaser EK, Ramachandran A, Levonen AL, Darley-Usmar VM: *Oxidized low-density lipoprotein and 15-deoxy-delta 12,14-PGJ2 increase mitochondrial complex I activity in endothelial cells.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285: H2298-308
140. Martinez Banaclocha M: *N-acetylcysteine elicited increase in complex I activity in synaptic mitochondria from aged mice: implications for treatment of Parkinson's disease.* Brain Res 2000; 859: 173-5
141. Diaz F, Enriquez JA, Moraes CT: *Cells lacking Rieske iron-sulfur protein have a reactive oxygen species-associated decrease in respiratory complexes I and IV.* Mol Cell Biol 2012; 32: 415-29
142. Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS: *Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria.* J Biol Chem 2004; 279: 4127-35
143. Boveris A, Chance B: *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen.* Biochem J 1973; 134: 707-16
144. Guzy RD, Schumacker PT: *Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia.* Exp Physiol 2006; 91: 807-19
145. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA: *High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria.* FEBS Lett 1997; 416: 15-8

146. Sarewicz M, Osyczka A: *Electronic connection between the quinone and cytochrome C redox pools and its role in regulation of mitochondrial electron transport and redox signaling*. *Physiol Rev* 2015; 95: 219-43
147. Sies H: *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. *Exp Physiol* 1997; 82: 291-5
148. Gupta A, Perez M, Lee KJ, Taylor JM, Farrow KN: *SOD2 activity is not impacted by hyperoxia in murine neonatal pulmonary artery smooth muscle cells and mice*. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 6373-90
149. Yalcin S, Aydogan H, Yuce HH, Kucuk A, Karahan MA, Vural M, Camuzcuoglu A, Aksoy N: *Effects of sevoflurane and desflurane on oxidative stress during general anesthesia for elective cesarean section*. *Wien Klin Wochenschr* 2013; 125: 467-73
150. Turkan H, Aydin A, Sayal A, Eken A, Akay C, Karahalil B: *Oxidative and antioxidative effects of desflurane and sevoflurane on rat tissue in vivo*. *Arh Hig Rada Toksikol* 2011; 62: 113-9
151. Ballester M, Llorens J, Garcia-de-la-Asuncion J, Perez-Griera J, Tebar E, Martinez-Leon J, Belda J, Juez M: *Myocardial oxidative stress protection by sevoflurane vs. propofol: a randomised controlled study in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery*. *Eur J Anaesthesiol* 2011; 28: 874-81
152. Allaouchiche B, Debon R, Goudable J, Chassard D, Duflo F: *Oxidative stress status during exposure to propofol, sevoflurane and desflurane*. *Anesth Analg* 2001; 93: 981-5
153. Kevin LG, Novalija E, Stowe DF: *Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice*. *Anesth Analg* 2005; 101: 1275-87
154. Wong CH, Liu TZ, Chye SM, Lu FJ, Liu YC, Lin ZC, Chen CH: *Sevoflurane-induced oxidative stress and cellular injury in human peripheral polymorphonuclear neutrophils*. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1399-407
155. Kevin LG, Novalija E, Riess ML, Camara AK, Rhodes SS, Stowe DF: *Sevoflurane exposure generates superoxide but leads to decreased superoxide during ischemia and reperfusion in isolated hearts*. *Anesth Analg* 2003; 96: 949-55, table of contents
156. Riess ML, Kevin LG, McCormick J, Jiang MT, Rhodes SS, Stowe DF: *Anesthetic preconditioning: the role of free radicals in sevoflurane-induced*

- attenuation of mitochondrial electron transport in Guinea pig isolated hearts.* Anesth Analg 2005; 100: 46-53
157. Chen YR, Zweier JL: *Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation.* Circ Res 2014; 114: 524-37
158. Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabo R, Giorgio M: *Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase.* Basic Res Cardiol 2009; 104: 131-9
159. Bernardi P, Di Lisa F: *The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection.* J Mol Cell Cardiol 2015; 78: 100-6
160. Bernardi P, Di Lisa F, Fogolari F, Lippe G: *From ATP to PTP and Back: A Dual Function for the Mitochondrial ATP Synthase.* Circ Res 2015; 116: 1850-62
161. Yao YT, Li LH, Chen L, Wang WP, Li LB, Gao CQ: *Sevoflurane postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury: the role of radical oxygen species, extracellular signal-related kinases 1/2 and mitochondrial permeability transition pore.* Mol Biol Rep 2010; 37: 2439-46
162. He W, Zhang FJ, Wang SP, Chen G, Chen CC, Yan M: *Postconditioning of sevoflurane and propofol is associated with mitochondrial permeability transition pore.* J Zhejiang Univ Sci B 2008; 9: 100-8
163. Veltri KL, Espiritu M, Singh G: *Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs.* J Cell Physiol 1990; 143: 160-4
164. Panwar R, Hardie M, Bellomo R, Barrot L, Eastwood GM, Young PJ, Capellier G, Harrigan PW, Bailey M, Investigators CS, Group ACT: *Conservative versus Liberal Oxygenation Targets for Mechanically Ventilated Patients. A Pilot Multicenter Randomized Controlled Trial.* Am J Respir Crit Care Med 2016; 193: 43-51
165. Girardis M, Busani S, Damiani E, Donati A, Rinaldi L, Marudi A, Morelli A, Antonelli M, Singer M: *Effect of Conservative vs Conventional Oxygen Therapy on Mortality Among Patients in an Intensive Care Unit: The Oxygen-ICU Randomized Clinical Trial.* JAMA 2016; 316: 1583-1589
166. Kehrer JP: *The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity.* Toxicology 2000; 149: 43-50

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Norbert Roewer bedanken, für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Klinik anfertigen zu können.

Mein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas gilt auch Herrn Dr. Thorsten Smul.

Besonders aber bedanke ich mich sehr herzlich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Christopher Lotz für sein Engagement, seine außerordentliche Unterstützung und seine konstruktive Kritik. Mein Dank gilt darüber hinaus dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Organprotektion, insbesondere Dr. Anja Frank.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des gesamten Labors der Anästhesiologie, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein großes Dankeschön geht auch an meine treue Begleiterin und Freundin während des gesamten Studiums Isabel Bär für ihre Unterstützung in vielerlei Hinsicht.

Und schließlich gebührt ganz besonderer Dank meinen Eltern und meinen Brüdern, die eine unersetzbare seelische und moralische Stütze waren, die zu jeder Zeit an mich geglaubt haben und die mich in meiner gesamten beruflichen Laufbahn mit unendlicher Geduld und Liebe unterstützt und begleitet haben.

Ich bestätige, dass ich die vorliegende Dissertation alleine und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Würzburg, 12.12.2017

Milena Balz